

# 1. Streszczenie

Celem niniejszej pracy jest konstrukcja, implementacja oraz weryfikacja skonstruowanych miar uporządkowania (wywodzących się z dwucząstkowych funkcji korelacji) dla wody solwatacyjnej wokół peptydów. Zaprezentowane w mojej pracy parametry określające uporządkowanie zarówno pozycyjne (translacyjne) jak i orientacyjne pozbawione są zasadniczych wad najczęściej dotąd stosowanego parametru uporządkowania Chaua i Hardwicka [1]. Stworzone parametry pozwoliły mi na wykreślenie diagramu uporządkowania obrazującego w przejrzysty i zarazem ilościowy sposób zmiany struktury wody solwatacyjnej względem czystego rozpuszczalnika. Stworzone parametry umożliwiają określenie zmian uporządkowania wody nie tylko wokół prostych peptydów - takich jak badane przeze mnie poliglicyna, polialanina i poliseryna - lecz również wokół niejednorodnej makrocząsteczki takiej jak pochodzące z pewnego gatunku śmy białko sbwAFP, przeciwdziałające zamarzaniu płynów komórkowych. Weryfikacja opracowanych przeze mnie parametrów polegała na skonfrontowaniu otrzymanych przy ich pomocy wniosków dotyczących struktury wody w warstwie solwatacyjnej z wnioskami wynikającymi z zastosowania szerokiego spektrum innych metod obliczeniowych. Wykorzystałem w tym celu miary określające geometrię i energię pojedynczego wiązania wodorowego jak też geometrię sieci wiązań wodorowych, z funkcji rozkładu radialnego atomów wodoru i tlenu wody wokół wybranych atomów biopolimeru, a także z preferencjami dla określonych kątów Eulera opisujących orientację cząsteczek wody względem peptydu. Określiłem także właściwości dynamiczne wody solwatacyjnej takie jak: współczynniki autodyfuzji (translacyjnej i rotacyjnej) cząsteczek rozpuszczalnika, stałe czasowe opisujące czas życia wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy cząsteczkami wody, funkcje autokorelacji prędkości translacyjnej i rotacyjnej oraz transformaty Fouriera tych prędkości jak również stałe czasowe opisujące „przebywanie” cząsteczek wody wokół wybranych atomów peptydu.

Skonstruowane w mojej pracy parametry uporządkowania pozwoliły na stworzenie „klasyfikacji” wody solwatacyjnej wokół badanych polipeptydów. Okazało się, że największym uporządkowaniem (ale mniejszym od tego w czystej wodzie) charakteryzuje się woda wokół rozmaitych konformacji poliglicynowych (liniowej, helisy: PII,  $3_{10}$ ,  $\alpha$ ); umiarkowanym uporządkowaniem – woda wokół formy liniowej oraz helisy PII polialaniny i poliseryny, zaś najmniejszym woda wokół  $\alpha$ -helisy oraz helisy  $3_{10}$  tychże peptydów. W swojej pracy określiłem także związek zachodzący pomiędzy uporządkowaniem wody, a stabilnością określonych struktur drugorzędowych poliglicyny, polialaniny i poliseryny.

Zastosowanie opracowanych metod do opisu właściwości wody w warstwie solwatacyjnej wokół badanego przeze mnie białka sbwAFP prowadzi do wniosku, że woda solwatacyjna okazuje się być zawsze nieco bardziej uporządkowana aniżeli woda czysta. Zastosowane przeze mnie parametry uporządkowania potwierdziły także, że struktura wody wokół płaszczyzny, która *in vivo* przyczepia się do kryształka lodu jest wyraźnie odmienna od struktury rozpuszczalnika wokół pozostałych dwóch głównych płaszczyzn tego białka.

## 2. Założenia i cel pracy

Głównym celem tejże pracy jest KONSTRUKCJA, IMPLEMENTACJA oraz WERYFIKACJA parametrów określających uporządkowanie wody solwatacyjnej. Obecnie najczęściej stosowanymi miarami uporządkowania wody solwatacyjnej są parametry tetraedryczności Chaua i Hardwicka [1]. Mają one jednak dwie zasadnicze wady:

1) są uzależnione od „tetraedryczności” określonej substancji jako takiej, co oznacza że nie można za ich pomocą porównywać uporządkowania dwóch różnych rozpuszczalników np. metanolu i wody;

2) silnie wpływa na nie efekt „wyłączonej objętości”, czyli w przypadku cząsteczek wody znajdujących się w bezpośredniej bliskości cząsteczki rozpuszczonej o znaczących rozmiarach nie tyle odzwierciedlają one strukturę samej wody, ale także brak cząsteczek rozpuszczalnika w miejscu zajętym przez substancję rozpuszczoną.

KONSTRUKCJA pożądaných przeze mnie parametrów polegała na wykorzystaniu dwucząstkowych funkcji korelacji peptyd-woda jak również woda-woda oraz ich rozłożeniu na składowe określające uporządkowanie pozycyjne (translacyjne) i orientacyjne. Dzięki temu możliwe się stało opisanie uporządkowania wody względem peptydu (poprzez wykorzystanie funkcji korelacji peptyd-woda) jak również uporządkowania samej wody (dzięki funkcji korelacji woda-woda). Wykorzystanie dwucząstkowych funkcji korelacji do opisu uporządkowania wody względem peptydu zostało już podjęte przez A. Kuffel i J. Zielkiewicza [2]. Jeśli chodzi o uporządkowanie samej wody to dokonując wspomnianego rozkładu na składowe mogłem wykreślić diagram uporządkowania, gdzie oś rzędnych reprezentuje uporządkowanie orientacyjne, zaś oś odciętych uporządkowanie translacyjne. Aby uniknąć efektu „wyłączonej objętości” spowodowanej obecnością peptydu najpierw obliczyłem owe parametry dla sytuacji w której zamiast objętości zajętej przez peptyd miałbym równoważną objętość zajętą przez niezaburzoną wodę (ang. *bulk water*). Następnie od tak uzyskanych wartości odjąłem wartości odpowiadające sytuacji gdybym także zamiast wody solwatacyjnej miał wodę niezaburzoną. Uzyskane w ten sposób parametry pozbawione są zasadniczej wady parametrów Chaua i Hardwicka czyli wrażliwości na efekt „wyłączonej objętości”.

IMPLEMENTACJA polegała na napisaniu (w języku Fortran) programów liczących owe parametry, a następnie wykorzystaniu ich do liczenia uporządkowania wody wokół czterech konformacji (liniowej, helis: PII,  $3_{10}$ ,  $\alpha$ ) następujących peptydów składających się z 15 aminokwasów – poliglicyny, polialaniny, poliseryny, a także polialaniny, w której przed symulacją dynamiki molekularnej „wyzerowano” ładunki cząstkowe na atomach tego peptydu (w celu określenia wpływu efektu hydrofobowego). Aby uniknąć zarzutu, że wspomniane parametry mogą znaleźć zastosowanie wyłącznie dla wody wokół prostych peptydów zastosowano je także do określenia uporządkowania wody wokół trzech płaszczyzn białka sbwAFP, przeciwdziałającego zamarzaniu płynów komórkowych.

WERYFIKACJA skonstruowanych miar uporządkowania została dokonana poprzez porównanie otrzymanych przy ich pomocy wniosków dotyczących struktury wody w warstwie solwacyjnej z wnioskami będących rezultatem zastosowania innych metod. Wykorzystałem w tym celu szerokie spektrum metod obliczeniowych pozwalających na opisanie struktury wody solwacyjnej, takich jak miary określające geometrię pojedynczego wiązania wodorowego (długość wiązania wodorowego  $d_{OH}$ , odległość tlen-tlen  $R_{OO}$ , kąt tlen-tlen-wodór  $\beta_{OOH}$ ) a także geometrię sieci wiązań wodorowych (kąt tlen-tlen-tlen  $\theta_{HB}$  – przy założeniu, że wszystkie brane pod uwagę atomy tlenu należą do cząsteczek tworzących między sobą wiązanie wodorowe); funkcje rozkładu radialnego atomów wodoru i tlenu wody wokół wybranych atomów peptydu, a także co ważne zwłaszcza w przypadku interpretacji uporządkowania wody względem peptydu, z preferencjami dla kątów Eulera określającymi orientację cząsteczek wody względem peptydu. Zakres poszczególnych warstw solwacyjnych określiłem na podstawie usytuowania minimów na wykresach funkcji rozkładu gęstości wody wokół osi peptydu  $g(r)$ .

Właściwości strukturalne wody w otoczce solwacyjnej implikują jej właściwości dynamiczne (które również zostały zbadane) takie jak współczynniki autodyfuzji (translacyjnej i rotacyjnej), stałe czasowe opisujące dynamikę zaniku wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy cząsteczkami wody, funkcje autokorelacji prędkości translacyjnej i rotacyjnej oraz transformaty Fouriera tych funkcji, a także stałe czasowe opisujące dynamikę „przebywania” cząsteczek wody wokół wybranych atomów peptydu.

Wybór do moich badań takich właśnie peptydów nie był przypadkowy, lecz został podyktowany chęcią zbadania wpływu rozpuszczalnika na stabilność różnych struktur drugorzędowych formowanych przez modelowe łańcuchy polipeptydowe. Ilustracją faktu, że

rozpuszczalnik w istotny sposób wpływa na preferencje peptydu do przyjmowania określonej struktury drugorzędowej [3][4][5], może być fakt, że w przypadku polialaniny stabilność  $\alpha$ -helisy w wodzie jest znacznie niższa aniżeli w próżni [6]. Jeśli chodzi o skłonność do przyjmowania struktury  $\alpha$ -helikalnej seryna zajmuje miejsce pośrednie pomiędzy alaniną i glicyną (0,5 kcal/mol na skali Pace-Scholtza [7]), względem 0 kcal/mol dla aminokwasu najbardziej sprzyjającego  $\alpha$ -helisie czyli alaniny i 1 kcal/mol dla aminokwasu najbardziej destabilizującego tę konformację tj. glicyny; dlatego też analizowane peptydy składały się z reszt Gly, Ala bądź Ser. Ponadto poliglicyna stanowi istotny punkt odniesienia ponieważ reszty aminokwasowe wchodzące w jej skład nie posiadają łańcuchów bocznych, dlatego może ona służyć jako model szkieletu peptydowego. Również szybkość rozwijania się łańcucha peptydowego zależy od rodzaju aminokwasów go tworzących. Znaleziono np. że szybkość rozwijania się peptydu zwiększa się w kolejności Ala $\leq$ Val<Ser<Gly. Rozfałdowywanie się helisy polialaninowej jest przyspieszane wskutek solwatacji. W przeciwieństwie do tego poliseryna jest bardziej stabilna w wodzie w porównaniu z próżnią, ponieważ jej łańcuchy boczne (z grupami hydroksylowymi) mogą tworzyć przerywające strukturę helisy wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe ze szkieletem łatwiej w próżni aniżeli w wodzie [6]. Wszystko to sugeruje, że struktura otoczki hydratacyjnej będzie odmienna w przypadku poliglicyny, polialaniny i poliseryny. Jednym z głównych celów mojej pracy było określenie czy i w jakim kierunku te zmiany następują – czy w stronę zwiększenia uporządkowania wody, czy też w stronę bardziej chaotycznego ułożenia cząsteczek w warstwie solwatacyjnej.

W wyciąganiu wniosków nie chciałem się jednak ograniczyć jedynie do weryfikacji parametrów uporządkowania oraz do stwierdzenia kierunku zmian w uporządkowaniu wody, ale także pokusiłem się o znalezienie jakiegoś związku między uporządkowaniem wody w otoczce solwatacyjnej, a stabilnością w rozpuszczalniku peptydów o określonej konformacji. Nie są to rozważania „czysto akademickie” biorąc pod uwagę fakt, że homopolipeptydy takie jak polialanina mogą odgrywać istotną rolę w tworzeniu kilku chorób neurodegeneratywnych [8] takich jak np. płasawica Huntingtona. Przejście pomiędzy strukturami  $\alpha$ -helikalnymi, a  $\beta$ -harmonijkowymi uważa się za warunek wstępny powstawania i wzrostu zarodków włóknistych odpowiedzialnych za chorobotwórcze działanie polialanin [9][10].

Dynamika molekularna pomimo oczywistej wady jaką jest to, że korzysta z pewnych przybliżeń, posiada ogromną zaletę polegającą na tym, że pozwala na symulowanie układów, które nie istnieją w rzeczywistości co pozwala na bezpośrednie uchwycenie wpływu określonych czynników. Oprócz stworzenia wspomnianego peptydu z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi

(wysocze hydrofobowego) atomy szkieletu 15-resztowych polipeptydów w moim przypadku są sztucznie utrzymywane mniej więcej w tym samym położeniu. Dzięki temu jestem w stanie utrzymywać peptyd w określonej konformacji, nawet jeśli normalnie nie byłby on stabilny w wodzie.

W przeciwieństwie np. do polialaniny literatura poświęcona hydratacji poliseryny nie jest zbyt obszerna ([6][11]). Moja praca w dużej mierze wypełnia tę lukę.

Wybór białka sbwAFP (o masie 9 kDa znajdującego w ćmie z rodziny zwójkowatych - *Choristoneura fumiferana*) podyktowany był nie tylko wspomnianą weryfikacją parametrów uporządkowania dla wody wokół niejednorodnych makrocząsteczek, ale także chęcią określenia zmian w strukturze wody indukowanej obecnością tego białka (co zapobiega jej zamarzaniu). Moim celem jest poznanie charakteru i zakresu tej modyfikacji, co powinno pomóc w dokładnym zrozumieniu aktywności przeciwmroźniowej tego i podobnych białek.

Część wyników zawartych w tej pracy została już opublikowana ([12]).

### 3. Przegląd literatury

#### 3.1. „Woda matrycą życia” (Paracelsus) – przegląd literatury dotyczący wody solwatacyjnej oraz parametrów uporządkowania rozpuszczalnika

Już Tales z Miletu stwierdził, że woda jest najważniejszym składnikiem przyrody. Czy jest niezbędna do życia – jeszcze nie wiadomo, na pewno jest jednak konieczna dla funkcjonowania życia w tej formie którą znamy, mając na myśli zestaw biocząsteczek (białek, kw. nukleinowych, lipidów oraz sacharydów), który wykształcił się w trakcie ewolucji. O ile chyba nigdy nie kwestionowano roli wody jako rozpuszczalnika biomolekuł, to już niezauważanie wody jako reagenta jeszcze do niedawna było dosyć powszechne wśród biochemików (mimo, że woda stanowi średnio ~60% objętości żywych komórek; w stężeniu średnio ~54 M). Nie zauważano też roli wody jako czynnika umożliwiającego poprawne funkcjonowanie białek i peptydów albo poprzez ulokowanie w odpowiednim miejscu wewnątrz/na powierzchni białka, albo poprzez współdziałanie z otoczką solwatacyjną. Niektóre cząsteczki wody wokół białek i peptydów są równie ważne (a czasami nawet ważniejsze) jak poszczególne reszty aminokwasowe; nie ma więc nic absurdalnego w przenośnym sformułowaniu Prabhu i Sharpa, że *w efekcie woda jest "21. aminokwasem"* [3].

Woda w otocze solwatacyjnej wraz z białkiem stanowi pewną całość. O tym, że zaburzenie w jednym z tych indywiduów wpływa na drugie może świadczyć fakt, że komórki rakowe zawierają dużo więcej wody swobodnej (niezaburzonej obecnością białka) aniżeli normalne komórki, zaś stopień złośliwości zwiększa się wraz ze stopniem uwodnienia komórki, co tłumaczy się przyśpieszeniem metabolizmu w komórce rakowej [13]. Przy uwzględnianiu roli wody w otocze solwatacyjnej nie można się jednak ograniczać wyłącznie do jej właściwości chemicznych co uprzytamnia fakt, że gdy wodę “lekka” zastąpimy wodą ciężką, homeostaza komórki jest drastycznie zmieniona i w konsekwencji prowadzi do śmierci [14]. Podkreśla to rolę badania fizycznych właściwości wody w otoczeniu białek.

### 3.1a. Charakterystyka cząsteczki wody

Na cząsteczkę wody składają się dwa lekkie atomy (wodoru) oraz jeden ciężki atom (tlenu). Niewielka masa wodoru powoduje, że efekty kwantowe są w tej cząsteczce znaczące (co niestety odbija się negatywnie na stosowanych w symulacjach komputerowych modelach wody). Długość wiązania tlen-wodór wynosi 0,991 Å w cieczy, zaś 0,985 Å w lodzie Ih, w temp. -20 °C. Za wartość kąta HOH przyjmuje się wartość 105,5° w cieczy, zaś 106,6±1,5° w lodzie Ih w temp. -20 °C. Ta wartość jest bliska nie tylko wartości kąta tetraedrycznego (~ 109,5°), ale także wartości kąta wewnętrznego w pięciokącie (108°) i jest ona wynikiem hybrydyzacji sp<sup>3</sup>. Jak więc widać pierścienie pięciokątne (składające się z cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi) powszechnie znajdowane w różnych fazach wody mogą być uważane za naturalną konsekwencję geometrii jej cząsteczki [15].

Cząsteczka wody może drgać w różny sposób, co znajduje odzwierciedlenie w widmie absorpcyjnym. W stanie gazowym drgania cząsteczki wody polegają na **drGANIACH SYMETRYCZNYCH ROZCIĄGAJĄCYCH** ( $\nu_1$ ), **drGANIACH ASYMETRYCZNYCH ROZCIĄGAJĄCYCH** ( $\nu_3$ ) oraz **ZGINAJĄCYCH** ( $\nu_2$ ) wiązań kowalencyjnych. **Obroty** są zawsze mniej lub bardziej powiązane z tymi drganiami; w fazie ciekłej są one dodatkowo osłabiane wskutek obecności wiązań wodorowych dając w rezultacie **libracje** (ang. *librations*) przejawiające się dwoma pasmami (**mniejsze pasmo L<sub>1</sub>** przy 395,5 cm<sup>-1</sup>; **główne pasmo L<sub>2</sub>** przy 686,3 cm<sup>-1</sup> (ciekła woda; 0°C). Absorbancja L<sub>1</sub> wzrasta wraz ze wzrastającą temperaturą, podczas gdy absorbancja L<sub>2</sub> zmniejsza się, ale odpowiedni pik ulega poszerzeniu. Generalnie częstotliwość drgań wahadłowych silnie zależy od momentu bezwładności cząsteczki (np. częstotliwość drgań wahadłowych D<sub>2</sub>O jest mniejsza niż H<sub>2</sub>O). Ponadto w cieczy linie spektralne są szersze powodując nakładanie się na siebie pików absorpcyjnych pochodzących od różnych drgań. Główne pasmo drgań rozciągających jest przesunięte w kierunku niższych częstotliwości ( $\nu_3=3490$  cm<sup>-1</sup> zaś  $\nu_1=3280$  cm<sup>-1</sup>) zaś częstotliwość drgań zginających jest zwiększona ( $\nu_2=1644$  cm<sup>-1</sup>) wskutek występowania w cieczy wiązań wodorowych. Częstotliwość drgań rozciągających zwiększa się o ~360 (przy 3,1 Å) – 1000 (przy 2,6 Å) cm<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> ze zwiększającą się odległością O-----O i około 9 cm<sup>-1</sup> stopień<sup>-1</sup> ze zmniejszającym się kątem O-H-----O. Jak widać, zwiększona siła wiązania wodorowego zazwyczaj przesuwa drgania rozciągające w kierunku niższych częstotliwości (przesunięcie w kierunku podczerwieni) z silnie zwiększoną intensywnością w podczerwieni (ale nie w widmie ramanowskim) z powodu zwiększonych wartości momentów dipolowych. Z tego też powodu w ciekłej wodzie wraz ze wzrostem temperatury drgania rozciągające cząsteczek przesuują w kierunku wyższych

częstotliwości, (gdy wiązanie wodorowe słabnie, kowalencyjne wiązania O-H jest wzmocnione powodując że drgają one z większą częstotliwością) podczas gdy wewnątrzcząsteczkowe drgania czyli drgania zginające przesuwają się do niższych częstotliwości, zaś pik tych drgań staje się węższy i mocniejszy, w ekstremalnym stanie z brakiem wiązań wodorowych, częstotliwość drgań rozciągających „dyndającego” wiązania OH przy powierzchniach gdzie cząsteczka wody ma trzy wiązania wodorowe (dwa akceptujące i jedno donujące) wynosi  $3697\text{ cm}^{-1}$ . Zwiększanie temperatury powoduje jednak obniżenie intensywności pasm drgań rozciągających. Zwiększanie ciśnienia natomiast zmniejsza odległości O-----O powodując wzmocnienie wiązania wodorowego, co z kolei skutkuje zwiększeniem odległości kowalencyjnych wiązań O-H i obniżeniem częstotliwości drgań rozciągających tych wiązań. Zmiany w środowisku wokół każdej cząsteczki ciekłej wody powodują znaczące poszerzenie linii spektralnej wynikające z przesunięcia drgań, przy czym w przypadku zmian wokół donora wiązania wodorowego to przesunięcie jest większe niż w przypadku zmian wokół cząsteczki akceptora; jednak w obu przypadkach mamy do czynienia ze zmianami w tym samym kierunku, i kumulującymi się wraz ze zwiększaniem się liczby wiązań wodorowych. Intensywność absorpcyjna drgań w ciekłej wodzie wynosi  $\nu_1; \nu_2; \nu_3 = 0,87; 0,33; 1,00$ , dla porównania w fazie gazowej te intensywności wynoszą ( $\text{H}_2^{16}\text{O}$ )  $\nu_1; \nu_2; \nu_3 = 0,07; 1,47; 1,00$  [16]. Nawet w temperaturze zera absolutnego, cząsteczka wody nie jest statyczna; częstotliwość drgań w punkcie zerowym wynosi  $4634\text{ cm}^{-1}$ , co odpowiada energii  $55,4\text{ kJ mol}^{-1}$  [15].

Jeśli chodzi o rozkład ładunków, to w najprostszy, a zarazem chyba w najbardziej ilościowy sposób można go przedstawić poprzez ciąg momentów multipolowych. Pierwszy składnik tego szeregu – moment dipolowy – dla wody wynosi  $\sim 1,85\text{ D}$ . Cząsteczka wody podobnie jak wiele innych małych cząsteczek charakteryzuje się znaczącą polaryzowalnością dipolową, a więc moment dipolowy może zostać znacznie zwiększony (nawet do  $\sim 4\text{ D}$ ) wskutek oddziaływania z zewnętrznym polem elektrycznym. Bez tego wartość przenikalności dielektrycznej ciekłej wody nie byłaby tak wysoka, a więc nie byłaby ciekła woda tak dobrym środowiskiem do dysocjacji jonowej. Drugi człon wspomnianego szeregu, czyli moment kwadrupolowy jest również znaczący ( $-4.27\text{ D}\text{\AA}^{xx}$ ;  $-7.99\text{ D}\text{\AA}^{yy}$ ;  $-5.94\text{ D}\text{\AA}^{zz}$ , w temperaturze  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ), i można go powiązać, ze znanym prostym modelem cząsteczki wody jako posiadającej dwa centra ładunku dodatniego umieszczone na jądrach wodoru, i dwa centra ładunku ujemnego (“wolne pary elektronowe”) tetraedrycznie rozmieszczone względem centrów ładunku dodatniego. Bardziej szczegółowa analiza rozkładu ładunku pokazuje jednak, że powinniśmy rozważać ładunek ujemny jako nie rozdzielony na dwie oddzielne „gałęzie” (ang. *lobes*), ale jako pojedynczą strefę ładunku ujemnego, gdyż obszary



ładunku ujemnego (wolnych par elektronowych) okazują się być dużo bliższe środka cząsteczki, aniżeli dodatnio naładowane regiony znajdujące się wokół wodorów. Tak więc w rzeczywistości rozkład ładunków jest bliższy trójkątnemu, aniżeli tetraedrycznemu.

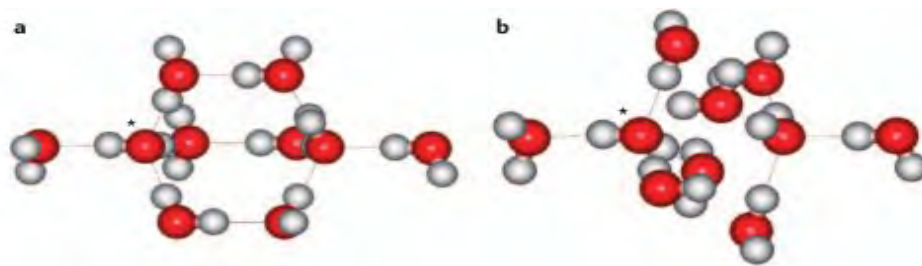
Cząsteczki wody oddziałują ze sobą poprzez wiązania wodorowe. Energia wiązania wodorowego pomiędzy dwiema cząsteczkami wody jest rzędu  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  (wartość pośrednia pomiędzy prostym oddziaływaniem van der Waalsa, a wiązaniem jonowym). Jest to wartość w przybliżeniu 10 razy większa od typowych fluktuacji termicznych w temperaturze pokojowej ( $\sim 10k_B T_{\text{pokojowa}}$ ), i względna siła tego wiązania (o ile można zwać je wiązaniem, gdyż udział oddziaływania elektrostatycznego jest tu dominujący) daje proste wytłumaczenie tego, że woda w temperaturze pokojowej znajduje się w stanie ciekłym, w odróżnieniu od innych cząsteczek o podobnej masie cząsteczkowej. Poza energią wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody charakteryzują się kierunkowością oraz liczbą cząsteczek, które mogą oddziaływać ze sobą [15]. Jedną z cech wiązania wodorowego w wodzie jest jego względna liniowość; jeśli jest ono zgięte wówczas nakładanie się orbitali (tzn. wolnej pary elektronowej na tlenie jednej cząsteczki wody z orbitalem antywiązącym  $\sigma^*_{\text{OH}}$  usytuowanym na drugiej cząsteczce) jest mniej efektywne, a w konsekwencji samo wiązanie jest słabsze [4][17]. Ta właściwość ma poważne konsekwencje – powoduje ona utrzymywanie sąsiednich cząsteczek wody “na długość wiązania”, zapobiegając tak znaczącemu upakowaniu cząsteczek wody jak ma to miejsce w innych cieczach [4]. Pomimo, że rozkład ładunku w cząsteczce wody raczej nie jest tetraedryczny, to jednak klasyczny obraz preferowanego ułożenia 2 akceptorów i 2 donorów wiązań wodorowych w narożach tetraedru jest dobrym przybliżeniem (zwłaszcza w przypadku fazy krystalicznej – lodu) wynikającym nie tylko z rozmieszczenia ładunków na cząsteczce centralnej, ale również z proporcji akceptorów do donorów (2:2) oraz uwzględnienia przestrzeni dostępnej do ulokowania 2 donorowych wodorów w obszarze wolnych par elektronowych [15][18][17]. Równa liczba donorów i akceptorów jest jedną z najbardziej specyficznych właściwości wody (podobnie jest w przypadku krzemionki) mającą olbrzymie znaczenie biologiczne.

### 3.1b. Struktura czystego rozpuszczalnika

Motyw cząsteczki wody związanej tetraedrycznie z czterema sąsiednimi cząsteczkami jest kluczowy dla zrozumienia geometrii faz skondensowanych np. takie motywy składają się na strukturę najpowszechniej znanej formy lodu, a mianowicie lodu Ih. Struktura tego lodu składającego się z sześcioczłonowych pierścieni jest strukturą bardzo otwartą; można zauważyć biegnące przez nią kanały. W tego typu lodzie, jeśli bierzemy pod uwagę wiązania wodorowe możemy zauważyć, że odległości tlen-tlen są niemal równe (2,759 Å i 2,761 Å w 223 K); podobnie rzecz ma się z kątami (kąt OOO: 109,36° oraz 109,58°), a więc są to niewielkie odchylenia od wartości kąta tetraedrycznego (109,47°) i średniej wartości kąta HOH pojedynczej cząsteczki wody – 104,52° . Oczywiście lód Ih nie jest jedyną znaną postacią krystaliczną wody; przy większych ciśnieniach obserwujemy inne jego postacie krystaliczne. Dla faz powstających przy wyższych ciśnieniach obserwujemy większą tolerancję dla długości i wartości kątów wiązań wodorowych; oprócz pierścieni sześcioczłonowych spotykamy również pierścienie pięcioczłonowe. W szczególności część potencjału woda-woda zależna od kątów wydaje się być elastyczna pozwalając na znaczne odchylenia od idealnej geometrii tetraedrycznej. Począwszy od lodu IV obserwujemy także strategię “nawlekania” wiązań wodorowych przez niektóre otwarte pierścienie sześcioczłonowe. Niemniej we wszystkich strukturach krystalicznych czterokoordynacyjna geometria zostaje utrzymana [15]. Oprócz faz krystalicznych wody (termodynamicznie stabilnych i metastabilnych, których dotychczas odkryto przynajmniej 16) mamy jeszcze 2, albo 3 postacie amorficzne (szkliste) termodynamicznie nietrwale: stan amorficzny o wysokiej gęstości (HDA; ang. *high-density amorphous state*), stan amorficzny o niskiej gęstości (LDA; ang. *low-density amorphous state*) i być może również stan amorficzny o bardzo wysokiej gęstości (VHDA; ang. *very-high-density amorphous state*) [19][20][21].

W przypadku ciekłej wody nie możemy oczywiście mówić o sieci w periodyczny sposób składającej się z powtarzalnych elementów. Woda ciekła jest zasadniczo nieuporządkowaną strukturą, której nie można odnosić do żadnej sieci krystalicznej. Mamy tutaj nadal do czynienia z czterokoordynacyjnym motywem, charakteryzującym się niższą energią potencjalną, entropią, gęstością i bardziej stabilną dynamiką; aczkolwiek oprócz tego motywu jest znaczący udział trójkoordynacyjnej “**trójkątnej**” **koordynacji** zgodnej z geometrią rozkładu gęstości elektronowej w wodzie oraz struktury **bipiramidy trygonalnej**, w której atom tlenu jest akceptorem dla trzech atomów wodoru. Te dwa ostatnie rodzaje struktur charakteryzują się wyższą gęstością, energią potencjalną i entropią, mniej stabilną dynamiką i tendencją do wzajemnej agregacji. Badania

dynamiki molekularnej ujawniają obecność pierścieni cztero-, pięcio-, sześć- i siedmioczłonowych – wszystkie zgodne z zakresem wartości kątów spotykanych w uprzednio omawianych fazach krystalicznych (lodu), aczkolwiek rozkład tych wartości ma oczywiście bardziej ciągły charakter aniżeli w ciele stałym [15][18]. W czasie topnienia lodu zerwaniu ulega jedynie 15% wiązań wodorowych, co oznacza, że zdecydowana większość wiązań wodorowych pozostaje nietknięta [20]. Maksimum gęstości przy 4 °C może być właśnie widziane jako konsekwencja utrzymania się znacznej liczby ”lodopodobnych” konfiguracji wody. Niektórzy nawet posuwają się do stwierdzenia, że ciekła woda (w warunkach otoczenia) jest mieszaniną dwóch rodzajów faz, jednak ten pogląd jest krytykowany. Mówi się raczej o ciągłym, aczkolwiek bimodalnym rozkładzie geometrii i energii wiązań wodorowych [4][22][23]. Niemniej jednak obecnie coraz częściej mówi się o istnieniu tzw. **drugiego punktu krytycznego wody** (lokowanego w okolicach  $200 \pm 30$  K przy ciśnieniach rzędu 50-340 MPa; czyli powyżej temperatury zeszklenia [16]) oraz linii współistnienia (na diagramie fazowym p-T) dwóch metastabilnych faz – jednej przypominającej stan amorficzny HDA (ang. *high-density amorphous state*) i najczęściej określanej jako HDL (ang. *high-density liquid*) oraz drugiej będącej ciekłym analogiem szklistej fazy LDA (ang. *low-density amorphous state*) i określanej jako LDL (ang. *low-density liquid*). W przypadku HDL w pełni tetraedryczna struktura nie ma być rozwinięta, podczas gdy struktura LDL ma być ”bardziej otwarta”, niezbyt odbiegająca od lodu (Rys. 3.1.1). Według tego poglądu anomalie wody takie jak: wysoka wartość ciepła właściwego czy zależność temperaturowa izotermicznego współczynnika ściśliwości mają być odzwierciedleniem ”konkurencji” pomiędzy tymi dwoma postaciami wody. Oczywiście powyżej tzw. drugiej temperatury krytycznej nie można mówić o dwóch oddzielnych fazach (o czym nadmieniałem mówiąc o kontinuum rozkładu geometrii wiązania wodorowego); jednak pewna ”bimodalność” się utrzymuje dając tzw. **linię Widoma** na diagramie fazowym T-p. Ta izochora rozdziela (na diagramie) wodę na ciecz o strukturze bardziej przypominającą LDL (wodę bardziej lepka), i na tę bardziej przypominającą HDL (bardziej płynną) [21][24].



**Rys. 3.1.1.** Proponowane struktury wody LDL (a) oraz HDL (b). Gwiazdką oznaczono cząsteczkę wody tetraedrycznie łączącą się ze swoimi sąsiadami. Struktura (b) charakteryzuje się wyższą entropią i entalpią. W przypadku (b) cząsteczka wody oznaczona gwiazdką jest tetraedrycznie połączona wiązaniami wodorowymi z czterema cząsteczkami wody, ale ponadto znajduje się równie blisko trzech innych cząsteczek (mogących pochodzić z innych agregatów) nie tworząc z nimi wiązań wodorowych oddziaływując z nimi poprzez oddziaływania dipolowe bądź indukcyjne. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [13].

Warto zaznaczyć, że istnieją dane eksperymentalne potwierdzające istnienie dwóch różnych faz w przechłodzonej wodzie jak i wody LDL otrzymanej przez “ściśnięcie” cieczy w nanoporach [25][26]; jednak reżim temperaturowy przechłodzonej cieczy pomiędzy **temperaturą przejścia szklistego**, a **temperaturą jednorodnej nukleacji** (231 K), poniżej której bez zastosowania obejścia w postaci ściśnięcia cieczy nie można mieć do czynienia z przechłodzoną cieczą jest dostępny tylko w symulacjach dynamiki molekularnej również potwierdzających istnienie drugiego punktu krytycznego wody [27]. Warto też pamiętać mówiąc o anomaliach wody, że w temperaturach większych od  $\sim 60$  °C i ciśnieniach powyżej  $\sim 3,0$  kbar woda zachowuje się jak wiele innych cieczy, a jej zachowanie jest tak naprawdę odmienne głównie przy niższych temperaturach i ciśnieniach [27]. Badania wykonane przez Rao i wsp. [28] wskazują na istnienie wielorakich metastabilnych stanów w ciekłej wodzie oraz na istnienie znacznej różnicy w drugiej warstwie solwatacyjnej dwóch typów czterokoordynacyjnych struktur w ciekłej wodzie co można wiązać z przejściem fazowym ciec-ciecz w niskich temperaturach [28]. Struktury charakteryzujące się większą tetraedrycznością, które można wiązać z wodą LDL są stabilizowane entalpowo (mocne wiązania ułożone niemal tetraedrycznie), zaś struktury o mniejszym uporządkowaniu są stabilizowane entropowo (bardziej „wygięte” wiązania wodorowe i mniej idealne ułożenie) [29].

Jednym z ważniejszych elementów spotykanych w ciekłej wodzie jest układ trójczłonowy zwany **rozwidlonym wiązaniem wodorowym** (ang. *bifurcated hydrogen bond*). Energia takiego rozwidlonego wiązania jest 2 razy mniejsza aniżeli energia “normalnego” wiązania wodorowego, z czego Sciortino i wsp. wnioskują, że rozwidlone wiązania wodorowe odgrywają centralną rolę w ruchliwości cząsteczek w stanie ciekłym właśnie wskutek obniżonej energii potrzebnej do zrywania takiego wiązania [4][15]. W przypadku tego typu wiązania wodorowego jeden donor wiązania wodorowego łączy się z dwoma akceptorami [15]. Ostatnie badania [17] wskazują, że rozwidlone

wiązanie wodorowe nie jest stabilnym stanem, ale niestabilnym stanem przejściowym w trakcie tzw. przełączania wiązania wodorowego (omówię to bardziej szczegółowo przy okazji omawiania **rearanżacji wiązań wodorowych** tj. zrywania i jednocześnie tworzenia wiązań wodorowych). Rozwidlone wiąz. wodorowe może być stabilne jedynie w przypadku układów z silnymi akceptorami i niedostateczną liczbą donorów [18]. Powoduje to, że lokalnie cząsteczka wody może być połączona wiązaniami wodorowymi, aż z 5 sąsiadami; generalnie jednak liczba wiązań wodorowych zależy od użytej definicji, bezpiecznie jest przyjąć że wynosi ona 3,4 [17] (choć istnieją prace podające wartość 2 [30], to są one jednak podważane [31][32][33] i reinterpretacja wyników dała wartość 3,3 [31]; dla definicji Werneta i wsp. [30] wiązania wodorowego i temp 300 K podaje się wartość 3,59 [34]). Znajduje to też odzwierciedlenie w funkcji rozkładu przestrzennego (ang. *spacial distribution function*), opisującej prawdopodobieństwo znalezienia cząsteczki wody w określonej pozycji i odległości względem rozważanej cząsteczki wody. Dookoła atomów wodoru rozważanej cząsteczki wody widzimy dwie wyraźne „gałęzie” odpowiadające dwóm „akceptorowym” cząsteczkom wody. Natomiast z przeciwległej strony widoczny jest rozmyty obszar obrazujący cząsteczki wody donujące wiązania wodorowe. Rozmycie to wynika z nakładania się na siebie dwóch wolnych par elektronowych, powodując że cząsteczki donujące mają większą możliwość odpowiedniego ułożenia się względem cząsteczki centralnej, a więc istnieje możliwość, że takich cząsteczek może być ze 3, albo i więcej [15]. Tak więc w przypadku cząsteczki wody z punktu widzenia wiązań wodorowych nie widać wyraźnego dowodu na obecność „oddzielnych” wolnych par elektronowych. Raczej możemy dostrzec rozciągniętą powierzchnię na której wodory sąsiednich cząsteczek mogą się „ślizgać”. To nadaje strukturze wody pewną giętkość, a przez to pewną orientacyjną „elastyczność” w oddziaływaniach woda-woda i w ogóle w oddziaływaniach woda-donory wiązań wodorowych. To także sugeruje, że wiązania wodorowe pomiędzy wodą, a grupami peptydowymi także muszą się charakteryzować pewną orientacyjną tolerancją (do czego jeszcze powrócę) [35][36].

### **3.1c. Oddziaływania wody z indywidualnymi chemicznymi o niewielkiej masie cząsteczkowej**

Zanim przejdę do rozważania korelacji pomiędzy strukturą peptydów a strukturą wody zatrzymam się najpierw na oddziaływaniu wody z indywidualnymi chemicznymi o niewielkiej masie, co powinno ułatwić zrozumienie bardziej złożonych procesów zachodzących na granicy woda/peptyd.

Ułożenie cząsteczek wody wokół jonów charakteryzuje się znaczną kierunkowością. Badania Enderby, Neilsona, Sopera i wsp. [wg 4] z użyciem rozpraszania neutronów potwierdziły, że w przypadku solwatacji anionów chlorkowych wiązanie wodorowe jest niemal liniowe co stoi w sprzeczności z tradycyjnym postrzeganiem solwatacji anionów, w którym to zakładano, że oba atomy wodoru cząsteczki wody są mniej więcej w tej samej odległości od jonu. W przypadku solwatacji kationów niklowych jednakże nie zauważono tak dużego odchylenia od tradycyjnego obrazu w którym to atomy tlenu są zorientowane w kierunku jonu; niemniej również tutaj nie możemy powiedzieć, aby oba atomy wodoru były w równej odległości od kationu. Stopień reorganizacji otoczki solwatacyjnej wydaje się też zależeć od ładunku kationu. Co ważne wpływ jonu zdaje się ograniczać niemal wyłącznie do pierwszej otoczki solwatacyjnej; badania pokazały że jony zasadniczo nie mają żadnego wpływu na dynamikę rotacyjną poza pierwszą warstwą solwatacyjną [4].

Jednak rozważanie wyłącznie jonów i cząsteczek polarnych nie może być wystarczające do przybliżenia zrozumienia solwatacji peptydów, które mają przecież charakter amfifilowy. Dlatego też tak istotne jest zrozumienie **efektu hydrofobowego**, który odnosi się do słabej rozpuszczalności związków niepolarnych w wodzie, a pod względem termodynamicznym charakteryzuje się dodatnim potencjałem chemicznym przeniesienia cząsteczki z jej własnej fazy ciekłej do fazy wodnej ( $\Delta\mu^0 > 0$ ) [37]. Jego pełne zrozumienie pomogłoby w wyjaśnieniu tak istotnych procesów biologicznych jak:

- a) fałdowanie się białek;
- b) oddziaływania białko-ligand;
- c) współzawodnictwo pomiędzy błonami, a wodą w rozpuszczaniu ważnych cząsteczek z punktu widzenia biochemicznego (w tym oczywiście peptydów);
- d) działanie receptorów błonowych [37].

Ponieważ rozpuszczaniu niepolarnych grup w wodzie towarzyszy niekorzystna zmiana entropii, istnieje skłonność tych grup do łączenia się razem w celu zmniejszenia obszaru kontaktu z wodą. Ta skłonność niepolarnych grup do łączenia się ze sobą w celu minimalizacji energetycznie niekorzystnych oddziaływań z wodą jest określana jako **oddziaływanie hydrofobowe** (bardziej ogólną nazwą odnoszącą się nie tylko do roztworów wodnych jest **agregacja solwofobowa**) [38] [39]).

Jak dotąd pojawiło się wiele modeli wyjaśniających efekt hydrofobowy, przy czym każdy z nich ma wady i zalety, trudno więc znaleźć model, który by zarówno w ilościowy jak i jakościowy sposób opisywał dokładnie wszystkie wątki związane z tym zjawiskiem.

Jeden z pierwszych modeli starających się wyjaśnić efekt hydrofobowy został zaproponowany przez Franka i Evansa w 1945 r. Jest to tzw. **model "górn lodowych"** (ang. *"iceberg" model*). Zakłada on, że wysokie uporządkowanie (a więc niska wartość entropii) po przeniesieniu cząsteczki hydrofobowej do zimnej wody (o temperaturze bliskiej pokojowej), wynika z kosztu uporządkowania cząsteczek wody wokół substancji rozpuszczonej; zakłada on, że woda tworzy coś w rodzaju klatki otaczającej substancję rozpuszczoną. Wiązania wodorowe "nie są tracone" przez cząsteczki wody (poprzez "wycelowanie" ich w stronę substancji rozpuszczonej), ale ograniczona zostaje możliwość "skierowania" tych wiązań w określone kierunki, co oczywiście odpowiada za obniżenie entropii, a wynika to z faktu, że 1) część kierunków zostaje zajęta przez cząsteczkę niepolarną, 2) partnerzy, z którymi cząsteczka wody może utworzyć wiązania wodorowe znajdują się w określonych dość ograniczonych miejscach (co jest wynikiem względnie niewielkich ruchów cieplnych). Model ten zakłada, że klatka jest tworzona przez cząsteczki wody, których ułożenie przypomina stan krystaliczny. W miarę wzrostu temperatury cząsteczki pierwszej otoczki solwatacyjnej uzyskują możliwość zmiany orientacji względem innych cząsteczek wody (a więc entropia ulega zwiększeniu), ale ulegają przy tym zrywaniu wiązań wodorowych co jest energetycznie niekorzystne. Zwiększające się entalpie i entropie dają dodatnią wartość pojemności cieplnej solwatacji  $\Delta C_p$  [40]. Model "górn lodowych" zakładał więc, że rozpuszczanie substancji niepolarnych w zimnej wodzie jest w gruncie rzeczy tworzeniem klatratów [40]. Kauzmann opierając się na tym modelu zwrócił uwagę na to, że agregacja cząsteczek hydrofobowych może wynikać z faktu, iż wówczas część wody bardziej uporządkowanej przechodzi w głąb roztworu, prowadząc do wzrostu entropii [4]. Z tego punktu widzenia mówienie o substancjach "hydrofobowych" jest błędne; lepiej by było mówić, iż woda jest "lipofobowa" [39]. Model ten wywarł wielki wpływ na postrzeganie efektu hydrofobowego, jednak obecnie uważany jest za niepoprawny. Jak pisze Pratt: *"The conclusion seems to be that if you look for clathrate-style hydration structures you probably see them, but if you ask whether they are necessary for a correct quantitative understanding, the answer is no. Clathrate is in the eye of the beholder"* [41]. Badania Blokzijla i Engbertsa [wg 4] nie wskazują na to aby wiązania wodorowe były wzmocnione w pierwszej otoczce hydratacyjnej bądź na to, że korzystna entalpia hydratacji hydrofobowej może zostać przypisana do czegoś więcej, aniżeli do zwykłych oddziaływań van der Waalsa pomiędzy cząsteczką niepolarną a wodą. Ponadto nie znaleźli oni żadnych dowodów na wzmocnienie

uporządkowania (zmniejszenie entropii) cząsteczek wody znajdujących się wokół substancji rozpuszczonej. Sieć wiązań wodorowych zdaje się jedynie utrzymywać tą strukturę poprzez orientowanie cząsteczek tak, że wiązania O-H są styczne do powierzchni niepolarniej cząsteczki. Jednak preferencje określonych lokalnych orientacji cząsteczek wody mają miejsce nawet w czystym rozpuszczalniku, a więc nie ma żadnej niezgodności pomiędzy pojawieniem się takich efektów orientacyjnych, a brakiem wzmocnienia struktury [4]. Bardzo ciekawe rezultaty dały badania przeprowadzone techniką EXAFS (ang. *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) przez Bowrona i wsp. [42][4]. Porównywali oni uzyskane w ten sposób funkcje rozkładu radialnego (rdf) krypton-tlen  $g_{\text{Kro}}(r)$  dla a) kryptonu w wodzie powyżej linii zamarzania; b) kryptonu w wodzie poniżej linii zamarzania, jak wiadomo tworzącego wówczas kryształy klatratów (w tym przypadku ściślej mówiąc: hydratów). Pokazały one jednoznacznie wyższy stopień uporządkowania w drugim przypadku. Ponadto styczna orientacja wiązań O-H cząsteczek wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej znaleziona w hydracie, nie jest ściśle zachowana w cieczy. Na dodatek wyniki uzyskane w wyniku symulacji dynamiki molekularnej ujawniły znaczną wartość współczynnika dyfuzji dla wody w otoczeniu małych substancji hydrofobowych co również zadaje cios modelowi "górn lodowych" [4]. Jeszcze ciekawsze rezultaty uzyskali Finney i wsp. [42], którzy przy użyciu rozpraszania neutronów badali hydratację *tert*-butanolu w wodzie. Wykazały one że: 1) funkcja rozkładu radialnego wodór-wodór  $g_{\text{HH}}(r)$  dla ułamka molowego metanolu w wodzie wynoszącego 1:9 jest nie do odróżnienia od tej funkcji dla czystej wody; 2) funkcja gęstości przestrzennej (ang. *spatial density function*; sdf)  $g_{\text{OO}}(r, \Omega)$  dająca trójwymiarową mapę względnej gęstości miejsc gdzie znajdują się atomy tlenu w funkcji odległości  $r$ , i orientacji  $\Omega$  względem tlenu "odniesienia" (tlenu cząsteczki wody z pierwszej warstwy hydratacyjnej) ujawniła, że w przypadku 0,06 ułamka molowego *tert*-butanolu w wodzie w temperaturach 25 °C i 65 °C pierwsza warstwa "sąsiadów" cząsteczki wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej *tert*-butanolu nie różni się niczym znaczącym od pierwszej warstwy "sąsiadów" cząsteczki wody pochodzącej z czystego rozpuszczalnika. Chcę tu podkreślić, że z definicji pierwsza warstwa "sąsiadów" cząsteczki wody to nie to samo co pierwsza otoczka solwatacyjna cząsteczki hydrofobowej! 3) znaczną różnicę w wyglądzie sdf można zaobserwować jeśli popatrzymy na drugą warstwę "sąsiadów" cząsteczki wody z pierwszej warstwy hydratacyjnej. Wówczas widzimy, że ta druga warstwa jest bardziej "wciągnięta" do środka w przypadku *tBuOH* w wodzie. Efekt ten staje się jeszcze wyraźniejszy w temperaturze 65 °C, aniżeli w temperaturze 25 °C (co idzie w parze ze wzrostem oddziaływań hydrofobowych). Temu "wciągnięciu" drugiej otoczki solwatacyjnej towarzyszy uporządkowanie wody w otoczce, skutkiem czego zajmuje ona mniejszą objętość [42]. Biorąc to pod uwagę, można przyjąć zgodnie z sugestią Finneya i wsp., że przedstawiona wyżej koncepcja Kauzmanna może być całkiem



sensowna jeśli odniesiemy ją nie do pierwszej warstwy hydratacyjnej substancji hydrofobowej ale do drugiej warstwy "sąsiadów" cząsteczek wody z tejże warstwy [42][4]. Ponadto Bowron zauważył, że cząsteczki wody wokół hydrofobowych grup metylowych *tert*-butanolu przyjmują w dużej mierze orientację styczną względem powierzchni niepolarniej; przy czym dozwolony jest znaczący zakres innych orientacji (ułożenia cząsteczek wody również tutaj są zgodne z zasadniczo tetraedrycznym motywem strukturalnym). Natomiast polarna grupa hydroksylowa jest hydratowana poprzez wysoce zorientowane wiązania wodorowe. Badania Dixita i wsp. [wg 4] ujawniły, że stężone roztwory metanolu (stosunek metanol:woda=7:3) są niedoskonale zmieszane i wysoce uporządkowane: agregaty wody „mostkują” grupy hydroksylowe alkoholu tworząc łańcuchy powiązane wiązaniami wodorowymi, które przenikają pomiędzy grupami metylowymi; jednak większość cząsteczek wody przypomina strukturę czystego rozpuszczalnika, bynajmniej nie przypominając "górn lodowych". Segregacja metanolu i wody utrzymuje się nawet przy wysokim rozcieńczeniu metanolu (podobne wyniki uzyskał Bowron [43] dla wodnego roztworu *tert*-butanolu). Również tutaj badania przy użyciu rozpraszania neutronów nie dały żadnej przesłanki, że następuje wzmocnienie struktury w otoczkach hydratacyjnych grup metylowych metanolu [4][42].

### 3.1d. Efekt hydrofobowy

Obecne próby wyjaśnienia efektu hydrofobowego w znacznej mierze wywodzą się z hipotezy małego rozmiaru (ang. *the small size hypothesis*). Opierają się one wszystkie na następującym równaniu:

$$\Delta\mu_A = -RT \ln p_0, \quad (3.1.1)$$

gdzie:  $\Delta\mu_A$  jest wkładem do potencjału chemicznego solwatacji (nadmiarowym potencjałem chemicznym) pochodzącym od tworzenia wnęki dla substancji A, co jest równoważne solwatacji sztywnej kuli o wielkości równej substancji A;  $p_0$  jest prawdopodobieństwem, że w obserwowanej objętości równej wyłączonej objętości oddziaływań substancji A z wodą zawarte jest 0 cząsteczek wody [44][41][45]. W modelach tych wysoki koszt przeniesienia niepolarniej cząsteczki do wody nie wynika z orientacyjnego uporządkowania wody w pierwszej otoczce solwatacyjnej, ale z trudności w znalezieniu odpowiedniej wnęki (ang. *cavity*) w wodzie, z powodu małego rozmiaru cząsteczek wody jako, że duże wnęki z większym prawdopodobieństwem powstaną w cieczach o dużych rozmiarach cząsteczek [40]. Uważa się, że te wnęki mogą powstawać spontanicznie wskutek fluktuacji gęstości cieczy [4]. Pogląd jakoby tylko ich tworzenie było przyczyną efektu hydrofobowego jest kwestionowany [4], niemniej bardzo niekorzystna entropia tworzenia wnęk jest istotną przyczyną hydrofobowości substancji

niepolarnych [46]. Proces tworzenia się kulistej wnęki jest równoważny wejściu “sztywnej kuli” w strukturę wody [47].

Biorąc to wszystko pod uwagę proces solwatacji można myślowo rozdzielić na 3 niezależne procesy – tworzenie wnęki, włączanie oddziaływań dyspersyjnych (van der Waalsa) pomiędzy cząsteczką rozpuszczoną, a wodą oraz na włączanie oddziaływań elektrostatycznych (Coulomba). Każdemu z tych procesów można przypisać określoną zmianę entalpii oraz entropii [47]. Jeśli chodzi o oszacowania zmian entropii i entalpii towarzyszących oddziaływaniom dyspersyjnym i elektrostatycznym to obiecujące wydają się przybliżenia uzyskane z **teorii odpowiedzi liniowej** (ang. *linear response theory*) opierające się na nierównościach Gibbsa [47], natomiast jeśli chodzi o samo tworzenie wnęki to można się posłużyć choćby **teorią cząstek skalowanych** (SPT, ang. *scaled particle theory*), zwłaszcza jej udoskonaloną wersją (ang. *revised scaled particle theory*) [44], tzw. **teorią informacji** (ang. *information theory*) [44] bądź też z **równania stanu wnęki w wodzie** (C-EOS; ang. *aqueous cavity equation of state*) [47]. Warto zwrócić uwagę na zjawisko “znoszenia się entropii (ang. *entropy cancellation*), które polega na tym, że podczas gdy fluktuacje energii substancja rozpuszczona – woda powodują zmniejszenie entropii, towarzyszące temu uwolnienie ciepła do otaczających cząsteczek wody prowadzi do wzrostu entropii rozpuszczalnika niemal równego pod względem wartości. Powoduje to, że całkowita zmiana entropii towarzysząca solwatacji niewiele różni się pomiędzy rozpuszczaniem substancji jonowych, polarnych i niepolarnych. Natomiast można zaobserwować znaczne różnice pomiędzy entalpią (oraz entalpią swobodną) solwatacji pomiędzy tymi trzema rodzajami substancji, co wynika oczywiście z dużych różnic pomiędzy oddziaływaniami elektrostatycznymi substancji niepolarnych, a polarnych i jonowych z wodą [47].

W przypadku dużych wnęk entalpia swobodna dla otwarcia sferycznej wnęki o promieniu R (tzw. **kawitacji**) jest sumą **członu powierzchniowego** i **członu objętościowego**:

$$\Delta\mu_A \approx 4\pi R^2\gamma + (4/3)\pi R^3p \quad (3.1.2)$$

gdzie:

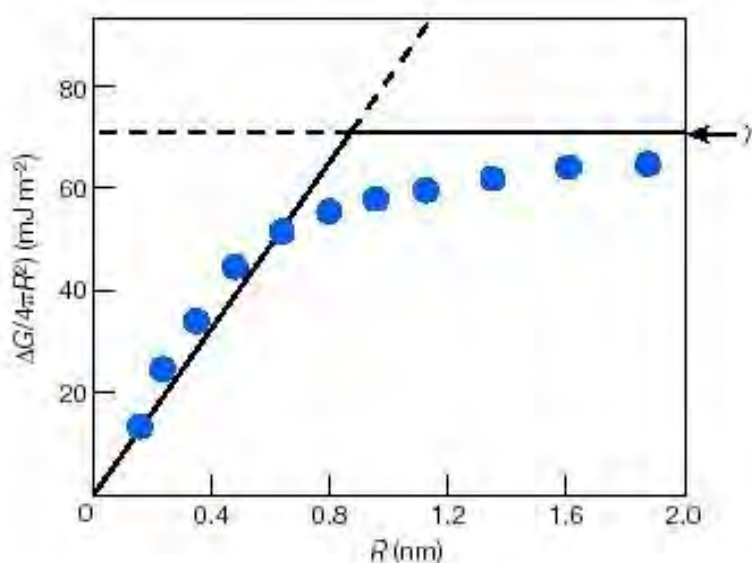
$\gamma$  - napięcie powierzchniowe na płaskiej powierzchni międzyfazowej

$p$  – ciśnienie.

Człon objętościowy  $(4/3)\pi R^3p$  można zaniedbać w przypadku wnęk o promieniu R mniejszym aniżeli kilka nanometrów, a więc możemy przyjąć, że:

$$\Delta\mu_A \approx 4\pi R^2\gamma \quad (3.1.3)$$

Powyższe równanie można wyjaśnić tym, że w przypadku dużych substancji niepolarnych, zawsze ma miejsce tworzenie powierzchni międzyfazowych (gdyż ma miejsce zrywanie wiązań wodorowych), a więc w wyrażeniu na entalpię swobodną solwatacji mamy składnik proporcjonalny do tej powierzchni ( $4\pi R^2$ ). W przypadku małych substancji rozpuszczonych solwatacja nie prowadzi do zrywania wiązań wodorowych, pociąga za sobą natomiast ich reorganizację. Powoduje to, że w przypadku tych substancji entalpia swobodna solwatacji rośnie liniowo wraz z jej objętością, nie zaś z jej powierzchnią jak ma to miejsce przy rozpuszczaniu dużych substancji niepolarnych; przy czym w rzeczywistości przejście pomiędzy tymi dwoma zachowaniami nie jest ostre co widać na Rys. 3.1.2 [48].



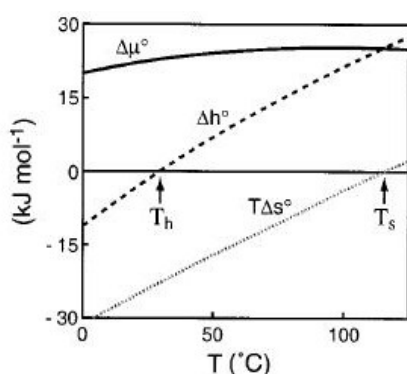
**Rys. 3.1.2.** Entalpia swobodna solwatacji  $\Delta G$ , dla sferycznej wnęki w wodzie jako funkcja promienia wnęki  $R$ . Wyniki dla temp. pokojowej i ciśnienia 1 atm. Kółka pokazują wyniki dokładnych obliczeń mikroskopowych.  $\gamma$  - napięcie powierzchniowe na płaskiej powierzchni międzyfazowej. Linie ciągłe pokazują w przybliżeniu rosnący przebieg  $\Delta G/4\pi R^2$  dla małych  $R$ , i asymptotyczny dla dużych  $R$ . Rysunek i częściowo opis pochodzą z [48].

Wartość entalpii swobodnej solwatacji  $\Delta G$  wskazuje prawdopodobieństwo zajścia tego procesu.  $\Delta G$  ma wartość odwracalnej pracy dla reorganizacji rozpuszczalnika i solwatacji przez niego substancji rozpuszczonej. Prawdopodobieństwo zajścia solwatacji jest proporcjonalne do  $\exp(-\Delta G/k_B T)$ , gdzie  $T$  oznacza temperaturę, zaś  $k_B$  stałą Boltzmanna. To równanie mechaniki statystycznej, które wiąże odwracalną pracę z prawdopodobieństwem, pozwala na określenie  $\Delta G$  poprzez pomiar stałych równowagi, takich jak stężenie substancji rozpuszczonej w wodzie względem stężenia w jakichś innych środowiskach (poprzez równanie  $\Delta G = -k_B T \ln(c_2/c_1)$ , gdzie  $T$  -

temperatura,  $k_B$  - stała Boltzmana,  $c_1$  - stężenie substancji niepolarnej w fazie olejowej,  $c_2$  - stężenie substancji niepolarnej w fazie wodnej) lub poprzez obliczenia np. z użyciem teorii mikroskopowej.

**Entalpia swobodna solwatacji** ma dwie główne składowe;  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , gdzie  $\Delta H$  i  $\Delta S$  oznaczają zmiany entalpii i entropii podczas solwatacji. Wkład entalpowy jest miarą średniej energii potencjalnej oddziaływań pomiędzy cząsteczkami, zaś wkład entropowy jest miarą uporządkowania (korelacji międzycząsteczkowych). Entalpia swobodna procesu oznaczająca znaczne zmiany w liczbie oddziaływań międzycząsteczkowych, takich jak zrywanie wiązań wodorowych w celu stworzenia powierzchni międzyfazowej na wzór powierzchni międzyfazowej ciecz-para będzie zdominowana przez składową entalpową.

Proces, który wymaga swoistej przestrzennej organizacji sieci wiązań wodorowych będzie się charakteryzował istotnym wkładem entropowym. W temp. pokojowej np. koszt entropowy hydratacji małych substancji hydrofobowych jest dominujący, co jest zmanifestowane przez  $\Delta G$  wzrastające wraz ze wzrastającą temperaturą. Aczkolwiek wraz z jej wzrostem, zakres wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody zmniejsza się, zaś utrzymujące się wiązania wodorowe stają się mniej istotne. Faktycznie, podczas gdy zmiana entropii związana z hydratacją małego alkanu w temperaturze pokojowej jest ujemna (i znacząco duża pod względem zakresu), staje się ona dodatnia w pobliżu temperatury wrzenia wody. Obrazuje to wszystko następujący wykres, w którym  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  oraz  $\Delta S$  zostały odniesione do warunków standardowych i do 1 mola substancji ( $\Delta\mu^0, \Delta h^0, \Delta s^0$ )



**Rys. 3.1.3.** Zależności  $\Delta\mu^0, \Delta h^0$  oraz  $T\Delta s^0$  od temperatury  $T$  przeniesienia neopentanu z jego własnej fazy ciekłej do wody

Patrząc na wykres zależności  $\Delta\mu^0, \Delta h^0$  oraz  $T\Delta s^0$  od temperatury (Rys. 3.1.3.), w przypadku niewielkich substancji niepolarnych takich jak np. neopentan, możemy zaobserwować znaczną

zależność temperaturową członów entalpowego i entropowego (a więc m. in. dużą wartość  $\Delta C_p = d\Delta h^0/dT$ ). Przy czym jednocześnie widzimy kompensację efektów pochodzących od obu tych efektów, co powoduje, że  $\Delta\mu^0$  w nieznacznym stopniu zależy od temperatury, będąc  $\gg 0$  w całym rozważanym zakresie temperatur. Niemniej wykorzystując zależność  $(\partial\Delta\mu^0/\partial T)_p = -\Delta s^0$  jesteśmy w stanie wyznaczyć temperaturę  $T_s$ , w której  $\Delta\mu^0$  osiąga wartość maksymalną wiedząc, że w tej temperaturze  $\Delta s^0 = 0$ . Podobnie, wykorzystując równanie Gibbsa-Helmholtza  $[\partial(\Delta\mu^0/T)/\partial T]_p = -\Delta h^0/T^2$  możemy określić temperaturę  $T_h$ , w której  $\Delta\mu^0/kT$  osiąga wartość maksymalną, a więc temperaturę w której  $\Delta h^0 = 0$ . Dla niewielkich cząsteczek, takich jak benzen, czy neopentan  $T_h \approx 25^\circ\text{C}$ , a  $T_s \approx 113^\circ\text{C}$ . Jak widać na Rys. 3.1.3 w przypadku zimnej wody (o temp. bliskiej temperaturze pokojowej) "niechęć" oleju do do wody wynika głównie z entropii przeniesienia ( $-T\Delta s^0 \gg 0$ ,  $\Delta h^0 \approx 0$ ); natomiast w przypadku gorącej wody (w pobliżu temp. wrzenia) pochodzi ona głównie od entalpii przeniesienia ( $-T\Delta s^0 \approx 0$ ,  $\Delta h^0 \gg 0$ ). Mogłoby się wydawać, iż efekt hydrofobowy jest największy, tam gdzie  $\Delta\mu^0$  osiąga wartość maksymalną, a więc w temperaturze  $T_s$ , jednak dane eksperymentalne pokazują, że rozpuszczalność oleju w wodzie jest proporcjonalna do  $\Delta\mu^0/kT$ , i jest najniższa w temperaturze  $T_h$ .

O ile małe cząsteczki hydrofobowe można umieścić w sieci wiązań wodorowych wody bez jej znaczącego zaburzenia, to już z inną sytuacją mamy do czynienia w przypadku dużych cząsteczek hydrofobowych, np. w przypadku powierzchni białek [49]. Wystarczająco duże fluktuacje gęstości są konieczne dla umieszczenia w sieci wiązań wodorowych dużej cząsteczki hydrofobowej. Pociąga to za sobą entropowy koszt, który nie może być zrównoważony korzystnymi entalpowo oddziaływaniami pomiędzy wodą a substancją rozpuszczoną (np. w postaci wiązań wodorowych). Stąd solwatacja takich substancji jest kosztowna pod względem entalpii swobodnej. O różnicach pomiędzy sytuacją w której mamy do czynienia z małymi a dużymi cząsteczkami hydrofobowymi napomknąłem już przy omawianiu teorii SPT. Jest rzeczą niemożliwą ze względów geometrycznych aby sieć wiązań wodorowych utrzymywała swoją integralność w pobliżu rozciągniętej powierzchni hydrofobowej. Lum, Chandler i Weeks (**LCW**) stworzyli model, który przewiduje, że może to nawet doprowadzić do sytuacji, w której jeśli dwie powierzchnie hydrofobowe znajdują się zbyt blisko siebie, rozpuszczalnik znajdujący się pomiędzy tymi powierzchniami zacznie się stamtąd "wycofywać", a powstające w ten sposób podciśnienie doprowadzi do przyciągnięcia się tych powierzchni, co jednocześnie oznacza, że ściśnięta w ten sposób woda przechodzi parowanie kapilarne [4]. W teorii LCW również przyjmuje się przejście graniczne pomiędzy sytuacją w której mamy do czynienia z niewielkimi substancjami hydrofobowymi, a dużymi powierzchniami hydrofobowymi przy wartości  $\sim 1$  nm, która to

odpowiada średnicy van der Waalsa  $\alpha$ -helisy (patrz Rys. 3.1.2) [4][50] (w tym samym przejściowym obszarze można też lokować rozmiary cząsteczek adamantanu, bicyklooktanu i fullerenu  $C_{60}$  [51]). Graniczną odległość  $D_c$  przy której to zjawisko może zajść oszacowano na podstawie następującego rozumowania [52]: „ciecz znajdująca się na powierzchni hydrofobowej ma niekorzystną energię powierzchniową proporcjonalną do pola tej powierzchni, gdzie stałą proporcjonalności jest napięcie powierzchniowe  $\gamma$ ; energii tej przeciwdziała korzystna entalpia swobodna masy rozpuszczalnika proporcjonalna do średniej liczby cząsteczek w cieczy pomiędzy warstwami, gdzie stałą proporcjonalności jest różnica pomiędzy potencjałem chemicznym fazy ciekłej i gazowej  $\mu_l - \mu_g$ . Dla wystarczająco dużej odległości  $D$ , przy założeniu  $\mu_l - \mu_g < 0$ , energia ściśniętego rozpuszczalnika przeważa nad energią powierzchniową i ciecz znajdująca się pomiędzy powierzchniami hydrofobowymi jest stabilna. Natomiast przy odległości  $D$  mniejszej od

$$D_c \approx 2\gamma / (\rho |\mu_l - \mu_g|) \quad (3.1.4)$$

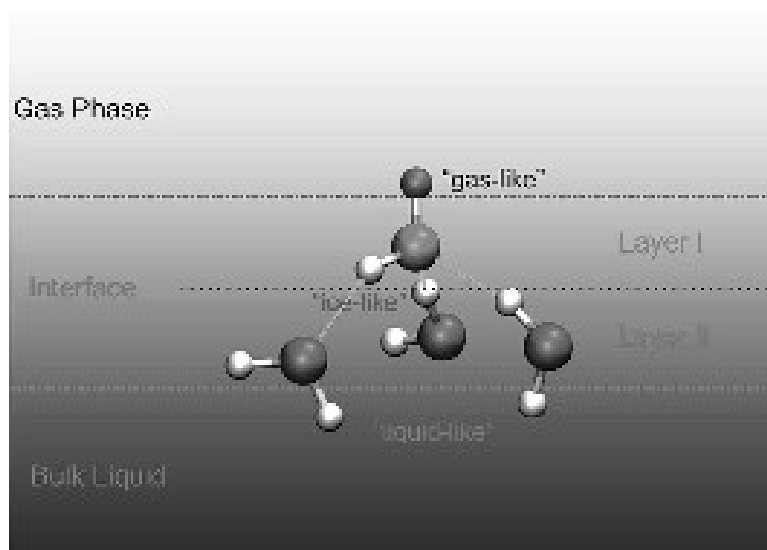
energia powierzchniowa przeważa i ściśnięta ciecz jest niestabilna w porównaniu z parą” ( $\rho$  oznacza tutaj gęstość liczbową cząsteczek). Dla wody w temperaturze pokojowej przy ciśnieniu 1 atm  $D_c \approx 100$  nm. Jak widać rozumowanie to jest analogią rozumowania pokazanego przy omawianiu teorii SPT: entalpia swobodna hydratacji jest liniową funkcją objętości substancji rozpuszczonej w przypadku małych rozmiarów cząstek, ale w przypadku większych rozmiarów substancji rozpuszczonej staje się proporcjonalna do jej powierzchni [52].

Choudhury i Pettitt [53][54] badając zależność potencjału średniej siły od odległości **hydrofobowych płytek** między sobą jak i od charakteru oddziaływań van der Waalsa pomiędzy płytką a rozpuszczalnikiem (zależnie od tego czy uwzględniają one oddziaływania przyciągające, czy też nie) usiłowali wyjaśnić te zagadnienia. Odkryli oni, że istnienie/nieobecność warstwy ciekłej wody pomiędzy płytkami w odległościach mniejszych niż 1 nm zależy od delikatnej równowagi pomiędzy energią oddziaływań płytka-woda, od energii wiązań wodorowych i rozmiaru płytki. Np. płytki grafitowe o wymiarach  $11 \times 12 \text{ \AA}^2$  przechodzą wymuszone geometrycznie parowanie kapilarne przy odstępnie poniżej  $\sim 6,8 \text{ \AA}$  w przypadku uwzględnienia zarówno odpychających jak i przyciągających oddziaływań van der Waalsa; jeśli jednak uwzględnia się tylko oddziaływania odpychające płytka-woda wówczas odwodnienie pojawia się już przy około  $10 \text{ \AA}$ . Co ciekawe, to zachowanie przypominające LCW znika, gdy płytki stają się mniejsze. Podkreśla to znaczną rolę przyciągających oddziaływań van der Waalsa w hydratacji dużych obszarów hydrofobowych (mogą one kompensować niemożność utworzenia wiązań wodorowych z innymi cząsteczkami wody wskutek stłoczenia) w porównaniu z ich rolą wokół niewielkich substancji hydrofobowych, gdzie odpychające oddziaływania van der Waalsa determinują kształt funkcji

rozkładu radialnego cząsteczek wody wokół takich substancji. Badania te potwierdziły także, że cząsteczki wody w I warstwie hydratacyjnej wokół takich hydrofobowych płytek mają skłonność do takiego się układania, że duża część wiązań O-H w cząsteczce wody skierowana jest w stronę powierzchni hydrofobowej. Badania Choudhury i Pettitta [54] ujawniły także, że odwodnienie w obszarze pomiędzy dwoma płytkami niekoniecznie następuje poprzez początkowe wytworzenie się cienkiej warstwy pary dookoła pojedynczego obszaru i że w niektórych przypadkach można zaobserwować zjawisko kooperatywności; podkreślili oni także, że oprócz rozważania stanu obszaru między płytkami jako „suchego”, bądź „mokrego”, można wyróżnić stan „oscylujący” z szybko zmieniającą się gęstością wody [4][53][54]. Jest on jakby odpowiednikiem sytuacji z którą możemy mieć do czynienia w przypadku czystego rozpuszczalnika tj. współistnienia fazy ciekłej i gazowej. W odróżnieniu jednak od wody *bulk* tutaj współistnienie fazy ciekłej i gazowej możliwe jest w czasie, ale nie w przestrzeni, co oznacza oscylacje pomiędzy tymi dwoma stanami. Również w odróżnieniu od czystego rozpuszczalnika istnieje skończony zakres warunków termodynamicznych (np. temperatury i odległości pomiędzy płytkami) w których ciecz i para mogą współistnieć w warunkach równowagi dynamicznej [55].

To wszystko prowadzi do bardziej ogólnego pytania, jak woda zachowuje się i jest uporządkowana w pobliżu **pojedynczej powierzchni hydrofobowej**. Tutaj ostatnie dane eksperymentalne (jak również rozważania teoretyczne) wskazują na obecność warstwy o zmniejszonej gęstości o grubości tego samego rzędu co średnica cząsteczki wody. Można się zapytać czy podobny efekt jest widoczny w przypadku innych cieczy, co mogłoby wyjawic rolę sieci wiązań wodorowych w wodzie. Maccarini i wsp. [wg 4] rzeczywiście znaleźli warstwy o zmniejszonej gęstości w podobnym zakresie obszaru na powierzchniach hydrofilowych w obecności niepolarnych cieczy, co pokazuje, że nie jest to jednak właściwość, którą można przypisywać tylko wodzie. W przypadku niewielkich substancji hydrofobowych można zaobserwować odrębne warstwy solwatacyjne, natomiast w przypadku dużych powierzchni hydrofobowych, zwłaszcza w przypadku gdy przyciągające oddziaływania dyspersyjne (van der Waalsa) są niewielkie lub żadne (jak w przypadku idealnej substancji hydrofobowej), można zaobserwować **obszar „odwodniony”** (ang. *depletion layer*). Nawet w przypadku większych wartości energii przyciągających oddziaływań dyspersyjnych rozkłady prawdopodobieństwa dla znalezienia środka cząsteczki wody w danej odległości od środka dużej, płaskiej substancji rozpuszczonej przypominają wartości uzyskane dla powierzchni międzyfazowej pomiędzy wodą, a parą. Jednak w przypadku wzmocnionych oddziaływań przyciągających szerokość warstwy w której gęstość cząsteczek wody jest zmniejszona zawęża się. Uzyskane dane wskazują, że

powierzchnia międzyfazowa woda-idealna powierzchnia hydrofobowa (z wyłączonymi oddziaływaniami przyciągającymi) niczym szczególnym nie odbiega od granicy woda-para. Również rozkłady orientacji cząsteczek wody na takiej granicy nie różnią się od takich rozkładów dla powierzchni woda-para [56]. Ostatnio Gao i wsp. [57] dokonali z wykorzystaniem spektroskopii częstotliwości sumy drgań (VSFS, ang. *vibrational sum frequency spectroscopy*) oraz dynamiki molekularnej wglądu w strukturę wody na granicy woda-para. Obraz powierzchni woda-para jaki oni uzyskali przedstawiłem na Rys. 3.1.4.



**Rys. 3.1.4.** Schematyczna reprezentacja struktury sieci wiązań wodorowych na granicy woda-para. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [57].

Jak sugeruje Rys. 3.1.4 jedynie dwie najbardziej górne warstwy cząsteczek wody wykazują silne uporządkowanie. Mamy tutaj do czynienia z mocną preferencją do ułożenia górnej warstwy w ten sposób, że cząsteczki wody kierują jedną ze swoich grup OH w stronę fazy gazowej. Taka orientacyjna preferencja wynika z dwóch czynników, które pociągają za sobą 1) maksymalizację liczby tworzonych wiązań wodorowych oraz 2) minimalizację eksponowanego ładunku cząstkowego. W szczególności istnieje mniejsze prawdopodobieństwo (w porównaniu z wiązaniem O-H wody) tego, że wolne pary elektronowe z tlenu będą stykały się z fazą gazową, gdyż takie ułożenie cząsteczki wody spowodowałoby większe eksponowanie ładunku cząstkowego i tym samym jest niekorzystne pod względem energetycznym. W celu utworzenia maksymalnej liczby wiązań wodorowych woda na granicy powierzchni międzyfazowej ma skłonność orientacji aż 3 wiązań wodorowych w stronę cieczy. Również w przypadku cząsteczek wody znajdujących się w drugiej warstwie (*Layer 2* na Rys. 3.1.4) ich ułożeniem rządzą dwa wspomniane przed chwilą czynniki. Ponieważ jednak gęstość cząsteczek wody w drugiej warstwie jest większa aniżeli w



pierwszej, stąd efekty schowania ładunku będą mniej wyraźne i tutaj decydującym czynnikiem będzie maksymalizacja liczby tworzonych wiązań wodorowych. Stąd stopień uporządkowania w drugiej warstwie jest mniejszy niż w pierwszej. W trzeciej warstwie nie obserwuje się żadnego znaczącego uporządkowania w porównaniu z wodą z głębi roztworu (ang. *bulk water*) [57].

Dynamika pojedynczej cząsteczki wody wykazuje znacząco różne zachowanie w pobliżu powierzchni hydrofobowych i hydrofilowych: w pobliżu pojedynczej powierzchni hydrofobowej dynamika wody jest czysto dyfuzyjna (w czasie symulacji od 1 do 1000 ps), natomiast w pobliżu pojedynczej powierzchni hydrofilowej dyfuzja jest spowolniona przejściowym wiązaniem się wody poprzez wiązania wodorowe, lub wręcz jej „uwięzieniem”. Czas relaksacji (ang. *exponential decay time*) takiej „uwięzionej” wody jest rzędu setek pikosekund. W przypadku czystej wody ruch jest także dyfuzyjny już po czasie symulacji równym  $\sim 20$  fs, a więc krótszym niż średni czas życia wiązania wodorowego ( $\sim 1$  ps) [58].

DeBenedetti i wsp. [59][60] kontynuowali badania **wody ściśniętej pomiędzy dwoma płytkami o różnym charakterze chemicznym**. Podkreślmy iż taką wodę często spotyka się w układach biologicznych, czego przykładem mogą być kanały jonowe, pory błonowe, środowiska wewnątrzkomórkowe oraz wnęki (ang. *cavities*) w białkach. W danej temperaturze woda znajdująca się pomiędzy płytkami może znajdować się w stanie stałym, ciekłym lub gazowym w zależności od wartości ciśnienia i odległości pomiędzy płytkami. Gęstość cząsteczek wody umieszczonych pomiędzy powierzchniami hydrofilowymi jest większa niż wody ściśniętej płytkami hydrofobowymi, wciąż jednak nie osiąga gęstości czystej wody przy tych samych warunkach termodynamicznych. Różnica pomiędzy gęstościami w przypadku ściśnięcia płytkami hydrofobowymi, a hydrofilowymi zmniejsza się w miarę chłodzenia, co jest zgodne ze stopniowym zamazywaniem się różnic pomiędzy hydrofobowością a hydrofilowością wraz ze zmniejszaniem się temperatury. Profile gęstości pokazują, że podczas chłodzenia ciekła woda przybliżyła się do powierzchni hydrofobowych, co oznacza że efektywna hydrofobowość płytki zmniejsza się wraz z obniżeniem temperatury. Symulacje wody ściśniętej przez heterogeniczne płytki „udekorowane” hydrofobowymi i hydrofilowymi motywami ujawniły, że chłodzenie prowadzi do znaczącego zamazania się różnic pomiędzy gęstościami wody na powierzchniach hydrofobowych i hydrofilowych. Osłabienie hydrofobowości powierzchni pociąga za sobą eksponowanie na zewnątrz powierzchni hydrofobowych, a w konsekwencji rozfałdowywanie się białek podczas schładzania (tzw. **zimna denaturacja**). A więc zimna denaturacja jest skutkiem energetycznie korzystnych oddziaływań pomiędzy wodą, a resztami hydrofobowymi, czemu towarzyszy przy

niższych temperaturach redukcja kosztu entropowego związanego z uporządkowaniem wody w pobliżu (częściowo) rozfałdowanego białka. To ostatnie można wytłumaczyć tym, że w niższych temperaturach mamy mniej wody o niższej gęstości, a więcej wody „upakowanej”. W konsekwencji uwolnieniu do głębi roztworu wody, która znajdowała się uprzednio pomiędzy fałdującymi się elementami białka nie towarzyszy termodynamicznie korzystny wzrost entropii. W analogiczny sposób jak zimną denaturację można wyjaśnić denaturację białek spowodowaną ciśnieniem [61] [60]. To wszystko uwidacznia rolę charakteru rozpuszczalnika w stabilizowaniu określonych konformacji polipeptydu [60].

Symulacje **wody znajdującej się pomiędzy powierzchniami hydrofilowymi** w temperaturze  $T=300$  K wskazują, że woda pozostaje w stanie ciekłym, nawet w warunkach termodynamicznych w których czysty rozpuszczalnik paruje. Gęstość wody ściśniętej pomiędzy płytkami hydrofilowymi wzrasta podczas chłodzenia izobarycznego. Stąd, chłodzenie izobaryczne powstrzymuje tworzenie się fazy gazowej stabilizując fazę ciekłą. Wpływ obniżenia temperatury na profil gęstości  $\rho(z)$  jest zauważalnie słabszy od tego obserwowanego w przypadku płytek hydrofobowych. Podobnie jak w przypadku profilu gęstości  $\rho(z)$ , zmiany profilu średniej liczby koordynacyjnej  $CN(z)$  podczas schładzania izobarycznego zarówno w przypadku płytek hydrofobowych jak i hydrofilowych są pod względem ilościowym podobne do zmian podczas sprężania izotermicznego ( $z$  - odległość od środka obszaru znajdującego się między płytkami). Natomiast w przypadku profilu stopnia tetraedryczności widoczne jest odmienne zachowanie się tego profilu w przypadku schładzania i sprężania. Schładzanie izobaryczne powoduje zauważalny wzrost stopnia uporządkowania, czego nie można powiedzieć o sprężaniu izotermicznym. Podkreśla to wagę badania parametrów określających stopień uporządkowania do czego jeszcze wrócę przy szczegółowym omawianiu tych wielkości. Podobieństwo w zachowaniu się wody międzyfazowej poddawanej schładzaniu izobarycznemu i sprężaniu izotermicznemu jest odzwierciedlone w analogicznym zachowaniu się odpowiednich funkcji związanych z tymi procesami (współczynnika rozszerzalności cieplnej i współczynnika ściśliwości izotermicznej). Wartości tych funkcji są największe w przypadku cieczy znajdującej się pomiędzy płytkami hydrofobowymi, mniejsze w przypadku płytek hydrofilowych, zaś najniższe wartości przyjmują dla czystej wody. Orientacja cząsteczek wody na powierzchni międzyfazowej jest bardzo odmienna w pobliżu płytki hydrofobowej i hydrofilowej. Jak już wspominałem w pobliżu płytek hydrofobowych, cząsteczki mają jeden atom preferencyjnie skierowany prostopadle w kierunku powierzchni (czyli tak jak na granicy woda-para); pozostałe 3 wiązania wodorowe tworzą kąt  $\sim 70^\circ$  z wektorem wychodzącym od powierzchni. Natomiast cząsteczki wody w pobliżu powierzchni hydrofilowych akceptują w

przeważającej mierze jedno wiązanie wodorowe skierowane prostopadle ku powierzchni, pozostałe 3 wiązania wodorowe tworzą kąt  $\sim 110^\circ$  stopni z wektorem wychodzącym od powierzchni. Co ciekawe w obu przypadkach orientacja cząsteczek wody jest w szerokim zakresie niewrażliwa na zmiany temperatury i ciśnienia. Te wyniki wskazują, że orientacja cząsteczek wody, jak również kąt zwilżania na powierzchni międzyfazowej zależą przede wszystkim od polarności płaszczyzny (chemiczny charakter powierzchni) a nie od warunków termodynamicznych [60].

Debenedetti i wsp. [60] badali także wpływ **niejednorodności powierzchni** na gęstość ściśniętej wody - rozważano płytki składające się z hydrofobowych (hydrofilowych) motywów otoczonych przez hydrofilowe (hydrofobowe) obrzeża. Symulacje pokazują, że dla badanych modelowych powierzchni, lokalna gęstość w pobliżu regionów hydrofobowych jest wzmocniona obecnością sąsiednich domen hydrofilowych. Ponieważ powierzchnie hydrofobowe stają się bardziej „przyciągające” dla wody w czasie chłodzenia, indukowane hydrofilowością zwilżenie regionów hydrofobowych staje się mniej wyraźne w miarę obniżania temperatury.

Z uzyskanych badań wynika, że model LCW opisujący agregację hydrofobową wywołaną odwodnieniem nie jest w stanie dostarczyć ogólnego mechanizmu dla opisu makrocząsteczkowych oddziaływań hydrofobowych w tym np. fałdowania się białek [4]. Symulacje wykonane przez ten Wolde'a i Chandlera na polimerze składającym się ze „sztywnych kul” sugerują, że polimer hydrofobowy „fałduje się” w procesie przypominającym przejście fazowe pierwszego rodzaju w którym krokiem limitującym szybkość jest nukleacja wystarczająco dużego bąbelka pary wskutek fluktuacji rozpuszczalnika [62]. Jednak symulacje fałdowania się białek pokazują bardziej złożoną sytuację [4]. Ciekawe wyniki uzyskał Berne i wsp. [wg 4][wg 63] w czasie symulacji enzymu BphC, składającego się z dwóch domen. Przy "normalnych" oddziaływaniach (tj. zarówno oddziaływania kulombowskie jak i van der Waalsa "włączone"), gdy dwie domeny zbliżały się do siebie "odwodnienie" się nie pojawiało. Wywołano je natomiast gdy "wyłączono" oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy białkiem, a wodą i pojawiało się (choć w mniejszym stopniu) gdy wyłączono przyciągające oddziaływania van der Waalsa. Mimo, że Berne i wsp. [63][64] znaleźli kilka struktur w których "odwodnienie" pojawiało się w trakcie asocjacji podjednostek (jak np. w przypadku tetrameru mellityny, małego polipeptydu znajdowanego w pszczelim jadzie [63]), to jednak generalnie nie zaobserwowano tego zjawiska. Wyciągnięto z tych i jeszcze innych badań wnioski, że znaczna liczba reszt polarnych na asocjujących powierzchniach (np. hydrofobowego rdzenia białka) wystarcza do powstrzymania parowania kapilarnego. A więc, nawet jeśli mechanizm LCW uczestniczy w fałdowaniu niektórych białek, to jest on niezmiernie wrażliwy zarówno na

chemiczne właściwości zaangażowanych domen białkowych, a być może również na geometrię asocjacji [4][63]. Badania nad mellityną podkreślają też rolę topografii, czyli rozmieszczenia poszczególnych reszt aminokwasowych. Aminokwasy wystające z powierzchni, rozrywające sieć wiązań wodorowych wokół nich sprzyjają zmianom konformacji zachodzącym za pośrednictwem „odwodnienia” [63]. Berne i wsp. [64] podkreślają, że odwodnienie powierzchni może nie tylko być istotne w niektórych przypadkach fałdowania białek, ale także w wiązaniu przez białka ligandów. Na to, że odwodnienie powierzchni nie jest jednak ogólnym mechanizmem w fałdowaniu białek wskazują także badania MacCalluma i wsp. [65] którzy to odkryli, że w czasie dimeryzacji  $\alpha$ -helis polialaninowych i polileucynowych (Ala<sub>20</sub> i Leu<sub>20</sub>) nie występuje żadne odwodnienie pomiędzy łańcuchami do czasu aż jest ono sterycznie wymuszone zwykłym brakiem miejsca dla wyścielenia warstwą wody. Istnieją jednak dane wskazujące, że teoria LCW może się jednak okazać użyteczna do wyjaśnienia agregacji i fałdowania białek amyloidalnych, które powodują takie choroby jak zespół Alzheimerera [66].

### 3.1e. Woda w białkach i wokół białek

Tym samym przybliżyłem się do omawiania hydratacji tak niejednorodnych pod względem chemicznym układów jak peptydy. Jak widać nawet w przypadku prostych modelowych układów obraz hydratacji jest dosyć złożony. Zanim przejdę do opisu struktury i dynamiki wody wokół peptydów (w tym białek) omówię znaczenie wody w przypadku tych biomolekuł.

Woda otaczająca biocząsteczki, z których gros stanowią białka, nie zachowuje się jak czysta woda, ponieważ jej oddziaływania z powierzchnią biocząsteczek muszą nieuchronnie zaburzać trójwymiarową sieć wiązań wodorowych; powierzchnie te siłą rzeczy wymuszają granicę tej sieci. Natura tego zaburzenia zależy od wielu czynników: od tego czy powierzchnia jest hydrofilowa, czy hydrofobowa; jak wygląda rozkład ładunków elektrycznych na tej powierzchni (czy jest ona spolaryzowana), czy zawiera ugrupowania chemiczne, które mogą tworzyć wiązania wodorowe; jaki jest jej kształt; również od obecności jonów i kosolwentów [67]. Rozróżnianie klas wody wokół białek jest wygodne (woda *bulk*, związana, z otoczki solwatacyjnej itd.), jednak czytając poniższą charakterystykę należy pamiętać, że w rzeczywistości istnieje **kontinuum** wpływu wody na makrocząsteczkowe oddziaływania i konformacje [68]. Również mówienie o wodzie uporządkowanej wokół białek (ang. *structured water*) jest często powtarzaniem nadużyciem, zwłaszcza w kontekście upadku teorii „gór lodowych” [67].

**Cząsteczki z pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej** znajdują się na zewnątrz powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika [36]. Cząsteczki wody z pierwszej warstwy definiuje się jako te, które bezpośrednio oddziałują z atomami na powierzchni peptydu poprzez wiązania wodorowe i/lub oddziaływania van der Waalsa. Cząsteczki z drugiej warstwy nie mają żadnych bezpośrednich oddziaływań z białkiem [36]. Wpływ białka na wodę jest znaczący w jego pierwszej warstwie solwatacyjnej i zmniejsza się gwałtownie wraz z oddalaniem się od jego powierzchni. Szeroki wachlarz badań pokazuje, że struktury tworzone przez cząsteczki wody dopasowują się z łatwością do dostępnych miejsc na powierzchni białka, które mogą tworzyć wiązania wodorowe z rozpuszczalnikiem. Cząsteczki wody mogą dopasowywać się do nieregularności powierzchni i mogą, poprzez trójrotną koordynację neutralizować znaczące nierównowagi donorowo-akceptorowe. Możliwość tworzenia przez wodę układów “trójkoordynacyjnych” może tłumaczyć przewagę (w kontekście biologicznym) wody nad innymi substancjami tetraedrycznymi jak krzemionka, krzem czy german [15]. Cząsteczki wody zajmują określone miejsca w białku i tworzą w określonych miejscach **agregaty** (w których cząsteczki wody są powiązane ze sobą wiązaniami wodorowymi na wzór sieci) [5][66]. Te agregaty pokrywają powierzchnię białka jak pstrokaczna i łączą się one poprzez wiązania wodorowe z polarnymi atomami na powierzchni białka [36]. Zdaniem Levy'iego i Onuchica [5] około 55% wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej jest związana ze szkieletem, zaś reszta z naładowanymi łańcuchami bocznymi. Sieć wodna dookoła białka łączy elementy struktury drugorzędowej i nie tylko stanowi pewien element struktury, lecz także wpływa na dynamikę białka określając m. in. preferowane drgania cząsteczki białka [5]. Jak już wspomniałem pewne cząsteczki wody są związane w specyficznych miejscach i mogą być zidentyfikowane krystalograficznie, a przez to są uważane za integralną część struktury białkowej. Rozmiar i zakres sieci wiązań wodorowych wzrasta silnie powyżej progowego poziomu równego  $\sim 0,3$  g wody na 1 g białka ( $0,3 \text{ gg}^{-1}$ ). Ta ilość wody jest bliska tej wymaganej do tego aby białko charakteryzowało się odpowiednimi właściwościami termodynamicznymi i mechanicznymi (tzn. umożliwiającymi ruchy poszczególnych części białka) oraz jest bliska wartości wymaganej dla pokrycia powierzchni białka jedną warstewką cząsteczek wody [36][69]. Aktywność enzymatyczna różnych częściowo uwodnionych białek przyspiesza znacznie przy poziomach hydratacji rzędu 0,1-0,2  $\text{gg}^{-1}$  np. aktywność enzymatyczna lizozymu może być jedynie wykryta, gdy poziom hydratacji osiąga wartość  $\sim 0,20 \text{ gg}^{-1}$ , a pełnię dynamiki osiąga przy  $0,38 \text{ gg}^{-1}$  [70][71]. Dostyc podobne gwałtowne wzrosty aktywności enzymatycznej dla innych enzymów można zaobserwować przy podobnym poziomie uwodnienia. Innym przykładem aktywności biologicznej indukowanej hydratacją jest gwałtowny wzrost pompowania protonów w bakteriorodopsynie przy  $\sim 60\%$

wilgotności względnej [70][72]. To wszystko można wyjaśnić tym, że w danej temperaturze mogą istnieć dwa odmienne stany wody: stany jedynie z **niewielkimi agregatami** powiązanymi wiązaniami wodorowymi i stany z siecią wodną **owijającą** całą cząsteczkę białka (ang. *spanning network*). Te pierwsze występują przy niskiej wilgotności, gdy cząsteczki wody adsorbują się głównie na hydrofilowych (naładowanych i wysoce polarnych) grupach białek, natomiast drugie występują przy zwiększonym uwodnieniu gdy cząsteczki wody tworzą obszerną sieć powiązaną wiązaniami wodorowymi zawierającą większość cząsteczek wody i otaczającą całe białko [70]. Przejście pomiędzy tymi dwoma stanami może objawić się gwałtownie poprzez **przejście fazowe pierwszego rodzaju polegające na nawarstwieniu cząsteczek wody** (ang. *the first-order layering transition*), czyli poprzez dwuwymiarową kondensację lub w sposób ciągły poprzez **przejście perkolacyjne** (ang. *percolation transition*) [36][70]. W czystej wodzie sieć powiązana wiązaniami wodorowymi ulega rozerwaniu poprzez trójwymiarowe przejście perkolacyjne w temperaturze krytycznej (ciecz-para) czyli przy ~647 K. W przypadku kwazi-dwuwymiarowej wody hydratacyjnej, to rozrywanie zachodzi w zasadniczo niższych temperaturach, bliskich temperaturze krytycznej „dwuwymiarowej” wody, a więc w pobliżu 315 K (ok. połowa wartości dla wody „trójwymiarowej”) [70]. Zarówno badania eksperymentalne jak i symulacje komputerowe pokazują, że dwuwymiarowe przejście perkolacyjne pojawia się przy poziomie hydratacji odpowiadającym w przybliżeniu jednej warstwie wody, co patrząc na gwałtowny wzrost aktywności przy tym poziomie uwodnienia nie wydaje się przypadkowe (choć w przypadku pewnych enzymów np. lakkazy (ang. *laccase*) ilość wody wymagana do działania zależy także od charakteru kosolwentu np. od jego polarności, zdolności dotworzenia wiązań wodorowych) [70][73]. Poziom hydratacji przy którym sieć wodna owijająca całe białko istnieje z prawdopodobieństwem 50%, a rozmiar przeciętnego agregatu osiąga maksimum określa się jako **połowę przejścia perkolacyjnego** przy powierzchni o określonym rozmiarze, które (na skali temperatury lub wilgotności) jest przesunięte względem **pełnego przejścia perkolacyjnego** niezależnego od rozmiaru układu, gdzie obszerny agregat istnieje niemal permanentnie [70][74]. W połowie przejścia perkolacyjnego fluktuacje pomiędzy dwoma jakościowo różnymi stanami (tj. siecią owijającą białko i nieowijającą) największego agregatu są też największe, co może mieć znaczenie w indukowanych hydratacją konformacyjnych zmianach białek [70][75]. „*Wskazuje na to fakt, iż połowa przejścia perkolacyjnego wody hydratacyjnej przy powierzchni cząsteczki DNA jest bliska połowie przejścia konformacyjnego z formy A-DNA do biologicznie aktywnej formy B-DNA, a także to, że istnieje korelacja pomiędzy termostabilnością sieci wiązań wodorowych wokół białka, a stopniem termofilności białka*” [70][75]. Sieć otaczająca białko rządzi dynamiką białka co potwierdzają eksperymenty termicznie rozrywające tę sieć doprowadzające do denaturacji białka i

utrąty jego biologicznej aktywności (ale tylko w obecności wody) [13]. To wszystko nie oznacza jednak, że aktywność enzymów w rozpuszczalnikach organicznych jest zawsze dużo niższa aniżeli w wodzie, jednak nawet pewne lipazy które mogą funkcjonować w środowisku stosunkowo bezwodnym potrzebują około  $2\pm 3$  cząsteczek wody do swojej aktywności i żadne enzymy w obecności substratów w fazie gazowej nie wykazują aktywności bez obecności wody [73][13]. Temperatura połowy przejścia perkolacyjnego, gdzie sieć otaczająca białko zawiera większość wody hydratacyjnej i obwija cały peptyd wynosi  $\sim 330$  K. Powyżej tej temperatury największy agregat zawiera mniej niż połowę cząsteczek wody w warstwie hydratacyjnej, gdyż otaczająca białko sieć powiązana wiązaniami wodorowymi ulega rozerwaniu na mniejsze agregaty. Wskutek obecności owej sieci, woda hydratacyjna jest bardziej "izolowana" od wody z głębi roztworu, i peptyd razem z wodą otoczki hydratacyjnej może być postrzegany jako pewna całość; gdy jej brak wówczas woda hydratacyjna "odczepia" się od powierzchni peptydu i coraz bardziej staje się częścią wody z głębi roztworu w efekcie powodując, że białko staje się bardziej hydrofobowe. Gwałtowne wzmocnienie efektywnej hydrofobowości białka w trakcie ogrzewania może tłumaczyć indukowaną cieplnie agregację biocząsteczek. Zmiana łączności pomiędzy wodą hydratacyjną, a woda z głębi roztworu spowodowana przejściem perkolacyjnym w otoczce hydratacyjnej może wpływać także na konformację biocząsteczek i ich dynamikę. Ma to odzwierciedlenie w tym, że wzrasta wkład biocząsteczki do pojemności cieplnej układu ( $C_p$ ), zaś wkład oddziaływań woda-woda w obrębie otoczki hydratacyjnej do  $C_p$  zmniejsza się gwałtownie, podczas gdy wkład z powodu oddziaływań pomiędzy wodą hydratacyjną a wodą z głębi roztworu do  $C_p$  silnie się zwiększa [75]. Ciepło właściwe wody hydratacyjnej  $C_p$  przekracza wartość ciepła właściwego wody z głębi roztworu i zmniejsza się podczas ogrzewania [75].

Całkowitą energię potencjalną otoczki hydratacyjnej peptydu ( $E_{tot}$ ) można rozłożyć na trzy składowe: energię oddziaływań z peptydem ( $E_{hp}$ ), z cząsteczkami wody z głębi roztworu ( $E_{hb}$ ) i energię oddziaływań w samej otoczce hydratacyjnej ( $E_{hh}$ ). „*W niskich temperaturach,  $E_{tot}$  w pobliżu peptydu hydrofilowego jest bliska  $E_b$ , podczas gdy w pobliżu peptydu hydrofobowego jest nieco poniżej  $E_b$  (tylko o  $\sim 0,002 E_b$ )*” [75]. Podczas ogrzewania  $E_{tot}$  wzrasta szybciej niż  $E_b$ , powodując, że energia potencjalna (przypadająca na 1mol) wody hydratacyjnej jest wyższa od energii potencjalnej czystej wody z powodu istniejącego siłą rzeczy braku sąsiedniej cząsteczki wody w pobliżu powierzchni białka. „*Gdy jedynie rozważamy oddziaływania woda-woda, suma  $E_{hh}+E_{hb}$  jest bardziej ujemna niż w pobliżu peptydu hydrofobowego*” [75]. W zakresie temperatur 275-425 K,  $E_{hb}$  przekracza  $E_{hh}$  i stosunek  $E_{hh}/E_{hb}$  wynosi  $\sim 1,4$  w niskich temperaturach w otoczkach hydratacyjnych obu peptydów i w czasie ogrzewania przybliży się do jedności. Chociaż obie składowe energii

potencjalnej wody hydratacyjnej w czasie ogrzewania zmniejszają się jeśli chodzi o wartość bezwzględną, to jednak procentowo ich udziały wzrastają (energia  $E_{hh}$  wzrasta o  $\sim 30\%$ , zaś energia  $E_{hb}$  o  $\sim 10\%$ ) [75].

Jedna cząsteczka wody z I warstwy solwatacyjnej jest w stanie pokryć **obszar dostępny dla rozpuszczalnika (SAS; ang. solvent accessible surface; definiowany jako obszar uzyskany przez rozwinięcie kulki o promieniu  $1,4 \text{ \AA}$  na powierzchnię van der Waalsa cząsteczki białka; SAS jest uzyskiwany jako powierzchnia zawierająca wszystkie środki rozwijanych kulek; pozwala to na rozróżnienie objętości dostępnej dla rozpuszczalnika i niedostępnego wnętrza białka)** o powierzchni  $20 \text{ \AA}^2$  [36][71]. Pierwsza warstwa solwatacyjna wokół białek ma o 10-20% większą gęstość w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem [76]. Merzel i Smith [77] na przykładzie lizozymu (wzrost gęstości o  $\sim 15\%$ ) wyjaśnili przyczyny tego zjawiska. Około 2/3 z z zaobserwowanego wzrostu gęstości wynika z przyczyn geometrycznych i ten wkład zależy od kształtu biocząsteczki, a nie od jej charakteru chemicznego. Natomiast  $\sim 1/3$  tego efektu wynika z indukowanego przez chemiczny charakter białka zaburzenia struktury wody w otocze, z czego połowa jest skutkiem skrócenia średnich odległości woda-woda, zaś druga połowa jest spowodowana wzrostem liczby koordynacyjnej cząsteczek wody. Jak piszą Merzel i Smith [77] - „*Chociaż sąsiadujące z białkiem cząsteczki wody znajdują się generalnie dalej od atomów białka, aniżeli znajdowałyby się one w czystym rozpuszczalniku, większe "zagęszczenie" atomów białka na jego powierzchni powoduje wzrost gęstości wody w porównaniu z porównywalną otoczką cząsteczki rozpuszczalnika w głębi roztworu*” [77]. We wnękach białka woda ma większą gęstość gdyż w tych miejscach cząsteczki wody mają większą skłonność do układania się wzdłuż linii sił pola elektrostatycznego generowanego przez atomy białka; po prostu we wnękach cząsteczki wody są mniej narażone na randomizujący, dezorientujący efekt pochodzący od innych cząsteczek wody. Dipole cząsteczek wody w obniżeniach układają się bardziej stycznie do powierzchni i bardziej równolegle względem siebie, aniżeli ma to miejsce w czystym rozpuszczalniku, co w rezultacie daje gęstsze upakowanie cieczy [77][78]. Ponadto także koncentracja wiązań wodorowych jest zwiększona w miejscach o większej gęstości rozpuszczalnika [78]. Istnieje także korelacja pomiędzy wzrostem gęstości, a obecnością atomów tlenu na ujemnie naładowanych grupach powierzchniowych, w atomach szkieletu (często znajdujących w jamach i wnękach białka), i w miejscach niepolarnych [78]. Z wyjątkiem grup naładowanych, stanowiących w przypadku lizozymu tylko  $\sim 5\%$  powierzchni białka (i stąd nie mających większego wpływu na gęstość całej otoczki hydratacyjnej) nie znaleziono żadnego wyraźnego związku pomiędzy zmianami gęstości w pierwszej warstwie solwatacyjnej, a charakterem chemicznym grup chemicznych w białku [72].



Zachowanie się wody hydratacyjnej w czasie chłodzenia, gdy czysty rozpuszczalnik przechodzi zmrożenie do lodu Ih, nie jest do końca jasne. Badania eksperymentalne krystalizacji wody w porach o różnym rozmiarze dowodzą, że woda z otoczki solwatacyjnej nie zmraża się jednocześnie z wodą we wnętrzu porów. W bardzo wąskich porach zmrażanie wody zachodzi w szerokim zakresie temperatur wokół  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Eksperymenty z wodą w porach nie do końca wypełnionymi wodą dowodzą przejścia ciecz-ciecz przy  $\sim -35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperatura przejścia fazowego I rodzaju ciecz-ciecz (ze zwykłej wody do wody LDL) w wąskich szparopodobnych porach (uzyskana z symulacji komputerowych) zmienia się z  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  gdy powierzchnia poru zmienia się z krzemionkowopodobnej (hydrofilowej) do parafinopodobnej (hydrofobowej). Obie możliwości (krystalizacja wody hydratacyjnej oraz przejście fazowe ciecz-ciecz wody hydratacyjnej w trakcie schładzania) sugerują, że woda hydratacyjna przechodzi przejście do stanu z silnie tetraedrycznym uporządkowaniem cząsteczek [A70].

Badania Nakasako [36] ujawniły, że na wykresie pokazującym rozkład odległości cząsteczek wody solwatacyjnej od atomów na powierzchni białka możemy zaobserwować jeden silny pik o maksimum przy  $2,9\text{ \AA}$  i wzmocnieniu („garbie”) przy  $\sim 3,5\text{ \AA}$ .  $2/3$  tego piku reprezentuje cząsteczki mocno związane z atomami tlenu białka, zaś pozostała  $1/3$  obrazuje cząsteczki połączone wiązaniami wodorowymi z atomami azotu; wzmocnienie jest zaś skutkiem oddziaływań wody z obszarami hydrofobowymi poprzez dyspersyjne oddziaływania przyciągające (co kolejny raz podkreśla rolę tych oddziaływań o czym nadmieniałem wcześniej). Z badań Nakasako (uzyskanych z badań hydratacji 15 białek) wynika też, że cząsteczki wody tworzą 2 do 3 wiązań wodorowych z tlenem, azotem lub/i innymi cząsteczkami wody. Badania te przeprowadzone m. in. z użyciem dynamiki molekularnej ujawniły, że cząsteczki wody przebywają w pewnych miejscach wokół białka chętniej niż w innych. Pokazały one również, że uporządkowanie orientacyjne cząsteczek wody jest wyraźne jedynie dookoła atomów polarnych, zaś cząsteczki wody wokół powierzchni hydrofobowej odznaczają się znaczącą wartością współczynnika dyfuzji rotacyjnej. Cząsteczki wody dookoła **wiązań peptydowych** są gęsto rozmieszczone w trzech skupieniach: z jednej strony dwa skupienia wokół atomu tlenu karbonylowego odzwierciedlające wiązania wodorowe tworzone przez ten atom z wodą, z drugiej zaś jedno skupienie wokół atomu azotu amidowego. Natomiast cztery skupienia cząsteczek wody dookoła reszt glutaminowych/aspartanowych odzwierciedlają dwa „ramiona” wiązań wodorowych wychodzące od każdego z dwóch **atomów tlenu łańcucha bocznego**. W przeciwieństwie do wzorów dookoła polarnych atomów białek, w przypadku **obszaru hydrofobowego** na powierzchni białka nie widać żadnych wyraźnych trendów w rozkładzie

cząsteczek wody zarówno w temperaturach bardzo niskich jak i w temperaturze otoczenia. Jedną z przyczyn tego faktu jest to, że cząsteczki wody na powierzchni hydrofobowej oddziałują przeważnie z atomami węgla poprzez izotropowe oddziaływania van der Waalsa, anizeli przez anizotropowe wiązania wodorowe. Jedną z cech charakterystycznych hydratacji powierzchni hydrofobowej są wielokątowe “wzory” cząsteczek wody hydratacyjnej, które są charakterystyczne dla tego typu struktur i przypominają jednocześnie struktury znajdujące w hydratách. Na hydrofobowej powierzchni trimerycznego enzymu dehydratazy skitalonowej (ang. *scytalone dehydratase*), cząsteczki wody hydratacyjnej w kontakcie z trzema resztami fenyloalaninowego tworzą trzy pięciokątne układy. Pięciokątne wzory są zawieszane nad powierzchnią hydrofobową i są zakotwiczone poprzez polarne atomy otaczające powierzchnię hydrofobową. Kształt, rozmiar i orientacja tych pięciokątnych wzorów nie wykazuje związku z charakterem reszt hydrofobowych, natomiast wpływa na nią rozmieszczenie polarnych atomów białka otaczających powierzchnię hydrofobową. Stąd trudno oszacować energię swobodną hydratacji reszt hydrofobowych przy użyciu jedynie SAS tych reszt [36]. “Śliskie” agregaty wody, mające większą swobodę dla dwuwymiarowego ruchu postępowego wzdłuż powierzchni, ale odznaczające się ograniczoną zdolnością do ruchu obrotowego tworzą się dookoła rozciągniętych obszarów hydrofobowych [66]. W cząsteczkach wody tworzących wiązania wodorowe z **polarnymi atomami peptydu**, jeśli weźmiemy pod uwagę statystykę tworzenia wiązań wodorowych, widoczne są dwa skupienia polarnych atomów białek leżące w kierunku dwóch z czterech “ramion” standardowej geometrii cząsteczki wody, a dwa mniejsze mniej uporządkowane skupienia odpowiadają miejscom wychodzącym z pozostałych dwóch “ramion”. Sposób w jaki cząsteczki wody oddziałują ze sobą jest także zgodny ze standardową geometrią. Średnia wartość kąta pomiędzy jakąkolwiek rozważaną parą wiązań wodorowych wynosi  $110^\circ$ , zaś odchylenie od tej wartości wynosi  $\pm 30^\circ$ , odzwierciedlając giętkość wiązań wodorowych [36]. Atomy polarne zajmują w rozpuszczalnych białkach około 35-50% powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika i są bardzo istotne dla reakcji enzymatycznych w enzymach oraz oddziaływań cząsteczkowych w kompleksach białko-białko itp. [79]. Zarówno badania Sharpa i wsp. [22] oraz badania Raschke i Levitta [188] pokazały, że oddziaływania woda-woda składają się z dwóch populacji: jednej z **niską wartością kąta wiązania wodorowego**, i drugiej z **wysoką wartością**. Ekspozycja w stronę cząsteczek polarnych zwiększa drugą populację, podczas gdy powierzchnie hydrofobowe zwiększają pierwszą. Grupa Sharpa pokazała, że w przypadku typu I i III białek przeciwzmrożeniowych (AFP), miejsca wiążące, które składają się zarówno z grup polarnych jak i niepolarnych, ogólnie indukują “hydrofobową” strukturę wody w otoczeniu cząsteczek wody. To stabilizuje oddziaływania białka AFP z zarodkami kryształu lodu, oddzielając je i w ten sposób, obniżając punkt zamarzania wody [66]. Badania

Thanki i wsp. [wg 14] pozwoliły na ustalenie “wzorów” hydratacji dookoła 20 podstawowych reszt aminokwasowych, w tym zarówno wzory hydratacji głównego łańcucha jak i łańcuchów bocznych. Symulacje MD wykonane przez Bizzarri i Cannistraro [80] ujawniły, że jeśli idzie o orientację cząsteczek wody wokół plastocyaniny w pierwszej warstwie hydratacyjnej to istnieje preferencja dla takiego ułożenia cząsteczek wody, w których kąt pomiędzy wektorem dipola wody a normalną do powierzchni białka wynosi  $\sim 120^\circ$ . Natomiast najmniejsze prawdopodobieństwo występowania ma wartość tego kąta wynosząca  $\sim 90^\circ$ . W szczególności okazało się, że w pierwszej warstwie hydratacyjnej białka cząsteczki wody najchętniej kierują swoje dipole w kierunku powierzchni białka (czyli, że atomy wodoru znajdują się bliżej jego powierzchni niż atomy tlenu).

Wiadomo, że „liczba wiązań wodorowych woda-woda wokół określonych reszt aminokwasowych zmniejsza się w następującym porządku: reszty niepolarne > reszty polarne > reszty naładowane. Wpływ łańcuchów bocznych na strukturę wody staje się bardziej wyraźny wraz ze zwiększaniem się powierzchni reszty dostępnej dla rozpuszczalnika” [76]. Natomiast z badań przy użyciu spektroskopii w podczerwieni wynika, że rozmiar agregatów wody dookoła łańcuchów bocznych hydrofobowych aminokwasów zwiększa się w następującym porządku: Gly<Ala<Val<Ile,Leu [76]. Można zaobserwować obszary zwiększonego prawdopodobieństwa występowania cząsteczek wody umieszczonych w linii wiązań N-H i O-H i wolnych par elektronowych grup C=O (przy czym jak już wspomniałem wokół grupy C=O rozkłady prawdopodobieństwa kątów charakteryzujących wiązanie wodorowe są wyraźnie szersze pozwalając na większą tolerancję ułożenia atomów wodoru wody wokół nich). Wyjątki od tej reguły można znaleźć w rozkładach prawdopodobieństwa wokół grup karbonylowych wiązania peptydowego, reszty aspartanowej i asparaginowej, co wynika z oddziaływań van der Waalsa pomiędzy cząsteczką wody, grupami C=O, i tworzącymi „środowisko” grupami łańcucha bocznego lub łańcuchów bocznych [69]. Większość „polarnych atomów białek jest ułożona w taki sposób, że dopasowuje się ona do tetraedrycznej geometrii wiązań wodorowych cząsteczek wody co wskazuje na „geometryczną” rolę cząsteczek wody w procesie fałdowania białek i w stabilizowaniu ich struktury” [69]. Atomy tlenu cząsteczek wody mają skłonność do układania się wzdłuż kierunku wiązań N(lub O)-H donujących wodory, ponieważ te donowane atomy wodoru znajdują się w ograniczonym zakresie kątów względem tej osi. Wokół grup C=O, pozycja wodoru donowanego przez cząsteczkę wody jest istotniejsza niż orientacja wiązania O-H w cząsteczce wody względem osi wiązania C=O [69]. Odległości cząsteczek wody względem grup C=O i O-H są do siebie zbliżone i wahają się w wąskim zakresie (0,265-0,275 nm), a więc są niezależne od typu hybrydyzacji atomu tlenu. Tak więc, grupy: karboksylowa i hydroksylowa odpowiadają za bliskie

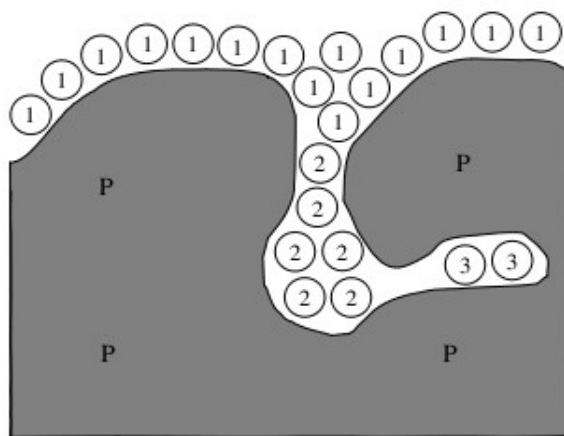
kontakty cząsteczek wody z powierzchnią białka, natomiast grupy aminowe (NH, NH<sub>2</sub> oraz NH<sub>3</sub>) są korzystne, jeśli cząsteczki wody mają się znajdować nieco dalej od tej powierzchni. Ponadto Grupy NH mogą utrzymywać pozycje atomów tlenu wody w węższym zakresie kątów dookoła osi wiązania. Z drugiej strony, choć grupy C=O indukują bliższe kontakty cząsteczek wody aniżeli grupy N-H, wywierają one mniejszy wpływ na orientację cząsteczek rozpuszczalnika względem atomów tlenu wody. Zarówno grupy C=O jak i N-H mogą być zaangażowane w **rozpoznawanie cząsteczkowe** np. w kompleksie enzymu i fragmentu DNA, grupy N-H zasady DNA (tyminy, cytozyny, guaniny, adeniny) są zdolne kontrolować kierunek wiązań wodorowych z grupami C=O w białku i/lub cząsteczkami wody hydratacyjnej pośredniczącymi w wiązaniach wodorowych [69]. Wraz ze wzrostem temperatury pozycje pików wskazujących na największe prawdopodobieństwo napotkania cząsteczki wody w odległości (i w określonym kierunku) od wybranych atomów białka nie zmieniają się, jednak same piki stają się nieco szersze [69]. *„Podczas gdy w niskich temperaturach wiązania wodorowe chętnie tworzą się pomiędzy białkiem, a otaczającym rozpuszczalnikiem, wysokie temperatury sprzyjają tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w białku”, a więc „współzawodnictwo pomiędzy białkiem i rozpuszczalnikiem w tworzeniu sieci wiązań wodorowych jest kontrolowane termicznie”* [80].

Cząsteczki wody hydratuujące atomy polarne mogą działać jako **punkty zakotwiczące** agregaty wody na powierzchni białek stabilizując strukturę tych powierzchni i w ten sposób mogą pomagać w fałdowaniu się białka, nie mówiąc już o tym, że mogą indukować agregację hydrofobowych rdzeni w rozpuszczalnych białkach [81][69][75]. Te punkty zakotwiczące spowalniają ruch wody znajdującej się w agregacie i przemieszczanie się całego agregatu; bez tych oddziaływań woda tworzy jedynie małe agregaty i wówczas dyfuzja na powierzchni białka zachodzi szybciej [81].

Badania Higo i Nakasako [wg 36] ujawniły, że sposób ułożenia cząsteczek wody (a więc jednocześnie ich dipoli) odbiega od tego którego można by się spodziewać dla cząsteczek wody ustawionych w polu elektrostatycznym uzyskanym z równania Poissona-Boltzmann, często używanego w symulacjach dynamiki molekularnej biocząsteczek. W skutek czego lokalnie można spodziewać się wartości stałej dielektrycznej mniejszej niż 80, co wynika z tego że w sąsiedztwie cząsteczki białka, cząsteczki wody oddziałują wzajemnie poprzez oddziaływania dipol-dipol i są ograniczone siecią wiązań wodorowych innych cząsteczek wody (której kształt z kolei zależy od geometrycznego i chemicznego charakteru powierzchni białka). Podkreśla to wartość symulacji dynamiki molekularnej z uwzględnieniem środowiska składającego się z poszczególnych

cząsteczek rozpuszczalnika, a nie tylko „uśrednionego” pola siłowego bazującego na równaniu Poissona-Boltzmanna.

“**Wewnętrzne cząsteczki wody**” umieszczone są wewnątrz powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika (ang. *solvent accessible surface*) i zajmują zagłębienia w cząsteczce białka. W czasie fałdowania białka są one prawdopodobnie ściśnięte i ledwie wymieniają się z cząsteczkami wody *bulk*. Posiadają one średnio czterech partnerów tworzących z nimi wiązania wodorowe i zachowują się jak klej stabilizujący trzeciorzędowe i czwartorzędowe struktury białek oraz kompleksy cząsteczkowe [14][69]. Zarówno pojedyncze cząsteczki wody jak i agregaty mogą ułatwiać konformacyjne zmiany białek, a więc woda może działać jako **smar** pomagający (poprzez obniżanie barier energetycznych) w ruchach domen bądź też jako **mechanizm zapadkowy** powodujący, że te ruchy odbywają się w określonym kierunku [69][66][14]. Wiązania wodorowe cząsteczek wody i ich agregatów mogą także funkcjonować jako “**sprzęgła**” przenoszące ruch pomiędzy podjednostkami i domenami [66]. W białkach składających się z wielu podjednostek lub wielu domen, spora liczba cząsteczek wody umieszczona jest na granicy podjednostek [14]. Zmiana w hydratacji hemoglobiny w czasie przyłączenia tlenu (związanie czterech tlenów do hemoglobiny wymaga związania aż 60 cząsteczek wody !!!) powoduje zmianę struktury czwartorzędowej białka w obszarze dostępnym dla cząsteczek rozpuszczalnika [68]. Cząsteczki wody pośredniczą w oddziaływaniach pomiędzy tymi podjednostkami i regulują kształt tych podjednostek, tak aby one w czasie oddziaływań między sobą pasowały do siebie. We wszystkich tych przypadkach cząsteczki wody mogą wykorzystywać swoje cztery „ramiona” tworzące wiązania wodorowe [14][69]. Z termodynamicznego punktu widzenia, “wewnętrzne” cząsteczki wody mogą powodować częściową kompensację kosztu entropowego związanego z fałdowaniem i asocjacją cząsteczek poprzez swój mały ale znaczący poziom ruchliwości. To wszystko potwierdza tezę, że dynamika wody jest konieczna dla białka, aby istniało ono w konformacji o odpowiedniej giętkości koniecznej dla jego funkcjonowania [4]. Purkiss i wsp. [14] wyróżniają (choć jak sami przyznają, ten podział jest trochę sztuczny) **zagłębienia** (ang. *clefts*), **kanaly** (ang. *channels*) oraz **jamy** (ang. *cavities*). Ich wygląd został schematycznie przedstawiony na Rys. 3.1.5.



**Rys. 3.1.5.** Schemat białka pokazujący cząsteczki wody na powierzchni (1), we wnękach (2) i w jamach (3). Rysunek i częściowo opis pochodzi z [14].

**Zagłębienia** często tworzą **miejsca aktywne enzymów** zawierające cząsteczki rozpuszczalnika, zwłaszcza w nieobecności substratu. Efekt entropowy uwalniania wody w czasie wiązania ligandu jest ważnym etapem “pracy” enzymu, jednak nie wszystkie cząsteczki wody muszą być wówczas wyparte np. badania białek takich jak kinazy uwidocznily obecność zakonserwowanych sieci wodnych w miejscu aktywnym w obecności przyłączonego peptydu i ATP [14]. Niektóre reakcje enzymatyczne wykorzystują wodę jako donory i akceptory protonów. W światłoczułej pompie protonowej, agregat cząsteczek wody w obszarze transbłonowym służy jako środowisko dla transportu protonów [69].

**Indukowanie ruchliwości łańcuchów białkowych** i generalnie „zmiękczenie” białka nie jest jedynym mechanizmem poprzez który woda hydratacyjna może stymulować aktywność enzymów, gdyż może ona także wywoływać zasygnalizowane przez mnie **zmiany strukturalne** w białku. Te zmiany są możliwe jedynie przy wyższych aktywnościach wody; dla zbyt niskich aktywności struktura białka jest zbyt sztywna co może np. utrudniać odwracanie częściowej denaturacji która pojawia się podczas zamrażania, suszenia bądź liofilizacji. Innym mechanizmem poprzez który hydratacja może oddziaływać na aktywność białka mogą być **szlaki przewodzenia protonów przez wodę hydratacyjną**, co jest szczególnie istotne dla miejsc aktywnych tych enzymów, które używają katalizy kwasowo-zasadowej jako części ich mechanizmu [73]. W przypadku większości enzymów wartości stałej Michaelisa  $K_M$  wzrastają wraz ze wzrostem aktywności wody, a więc biokatalizator wykazuje mniejsze powinowactwo do substratu, co oznacza że woda może też działać jako **inhibitor kompetytywny**, który musi być usunięty z miejsca aktywnego enzymu, aby mógł on związać ligand (substrat) czego przykładem może być

heksokinaza wiążąca glukozę [68][73][71]. Rozważając wpływ wody na działanie enzymu trzeba odróżnić jej wpływ na stałą  $K_M$ , od jej wpływu na maksymalną szybkość reakcji enzymatycznej  $V_{max}$  (lub stałą szybkości katalizowanej reakcji  $k_{cat}$ ), gdzie zwiększona aktywność wody w większości wypadków oznacza podwyższenie  $V_{max}$  [73]. Cząsteczki wody znajdujące się w miejscach aktywnych enzymów nie tylko mogą pomagać w **wiązaniu się liganda** poprzez tworzenie „**mostkujących**” **wiązań wodorowych** pomiędzy nim a łańcuchem polipeptydowym ale także mogą odgrywać aktywną chemicznie rolę w samym mechanizmie katalitycznym. Mogą one bowiem **dostarczać nukleofila** „atakującego” ligand, **“przewodu”** dla transportu protonów, bądź też same mogą służyć jako **źródło protonów** (a więc służyć jako **elektrofil**). Agregaty wodne w pobliżu kofaktorów reakcji utleniania i redukcji mogą również przyspieszać **transport elektronów** poprzez wytwarzanie silnie powiązanych ze sobą ścieżek umożliwiających tunelowanie pomiędzy donorem a akceptorem elektronu. Zdarza się, że woda w miejscach aktywnych enzymów może pełnić kilka funkcji jednocześnie [67][13]. Obecnie wiemy, że niektóre inne cząsteczki mogą zastępować rolę wody w aktywowaniu słabo uwodnionych enzymów przynajmniej częściowo. Taką aktywację zaobserwowano m. in. w przypadku różnych glikoli, formamidu, dimetylosulfotlenku (DMSO) i metanolu, ale nie zaobserwowano w przypadku takich związków jak etanol [73]. Gramicydyna stanowi klasyczny przykład białka przechodzącego przez błonę, przyjmującą liczne konformacje w zależności od warunków zewnętrznych. Cząsteczka ta tworzy **kanaly** przez które mogą przechodzić woda i jony. Xu & Cross zaproponowali, że obecność wody może działać jako **“foldaza”** katalizująca przejście pomiędzy dwoma konformacjami gramicydyny A. Sugeruje się także, że **kanaly wodne** pozwalają na funkcjonowanie zawierającego hem cytochromu 450. Chociaż w tym enzymie miejsce aktywne (hemowe) nie jest bezpośrednio dostępne dla rozpuszczalnika cząsteczki wody mogą dostać się tam (lub wydostać się stamtąd) wskutek zmian konformacyjnych określonych łańcuchów bocznych białka. Odwodnienie lub parowanie kapilarne, o którym wspominałem pisząc o wodzie ściśniętej między powierzchniami może odbywać się także w porach, gdzie może stanowić podstawę mechanizmu “bramkowania” w kanałach białkowych, które transportują jony, małe cząsteczki bądź samą wodę jak w przypadku białka akwaporyny. Owe białko jest jednym z największych kanałów białkowych; kontroluje przepuszczalność czerwonych krwinek - choć jest ono wysoce specyficzne dla wody musi także zapobiegać wchodzeniu przez błonę innych substancji i jonów, w tym także protonów [66][14]. Z badań przeprowadzonych przez Murata i wsp. [14] wynika, że reszty hydrofobowe go wyściełające pozwalają na szybki transport wody, ale ograniczone rozmiary do  $\sim 3 \text{ \AA}$  są odpowiedzialne za jego selektywność [14]. Kooperatywne działanie ściśniętej wody jest kluczowe dla zrozumienia jego działania. W stanie “suchym” (przy niskiej aktywności wody) jony nie mogą przechodzić pomimo tego, że kanał jest

teoretycznie wystarczająco szeroki, ponieważ wymagałoby to “zdrapywania” otoczek cząsteczek wody, które je otaczają, a to jest zbyt kosztowne pod względem energetycznym [66][68]. Odkryto również kanały “mechanosensytywne”, gdzie niewielkie deformacje błony przechylają równowagę pomiędzy stanem “suchym”, a “mokrym” w określonym kierunku; sugeruje to, że “odwadnianie” może być indukowane przyłożonym ciśnieniem [66]. W kanałach białkowych może istnieć obok siebie kilka sieci wodnych jednocześnie. Te sieci wodne doczepiają się do polarnych elementów na powierzchni białka. Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami wody w takich sieciach są zgodne z zasadniczo tetraedryczną (ale jednocześnie i asymetryczną) geometrią oddziaływań pomiędzy cząsteczkami wody [15].

**Jamy** mają tendencję do zawierania reszty polarnej, z którą cząsteczka wody może utworzyć wiązanie wodorowe. Obecność jam w białkach budzi zainteresowanie ponieważ nie do końca jest jasne czy jamy (wypełnione wodą bądź nie) wprowadzają stabilność czy niestabilność. Jeśli chodzi o głęboko ukryte cząsteczki wody w jamach, to jedne badania wskazują, że mogą one zwiększać giętkość białka, inne zaś pokazują, że nawet jedna cząsteczka wody w jamie może zmniejszać entropię wibracyjną i poprzez to usztywniać białko. Dlatego też, efekty termodynamiczne uwodnionych jam w białkach są tak ważne. Przy użyciu metod teoretycznych Wade i wsp. [wg 14] pokazali, że jest korzystne shydratowanie pewnych jam w białkach, ale innych już nie. Przeniesienie cząsteczek wody do jamy polarnej jest pod względem entropowym bardzo niekorzystne, podczas gdy przeniesienie do jamy niepolarniej jest entropowo korzystne. Ogólnie rzecz biorąc, cząsteczki rozpuszczalnika schowane w białku mogą być stabilizowane zarówno entalpowo jak i entropowo [71]. Wraz ze wzrostem liczby wiązań wodorowych wynikających z dodawania cząsteczek wody, zysk entalpowy utworzenia wiązania wodorowego zaczyna przeważa nad kosztem entropowym. Gdy odejmiemy wkład wynikający z wpływu wiązań wodorowych zależność od objętości wielkości  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  oraz  $\Delta H$  jest niewielka i w przybliżeniu taka sama dla jamy hydrofobowej jak i hydrofilowej [82]. Entalpia swobodna zmniejsza się wraz z liczbą wiązań wodorowych o około  $8 \text{ kJ mol}^{-1}$  co wynika ze zmniejszenia się entalpii o  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$  i ze wzrostu wkładu entropowego  $-T\Delta S$  o  $8 \text{ kJ mol}^{-1}$  (co jest bliskie teoretycznym oszacowaniom przy wykorzystaniu entropii topnienia lodu przewidującym wzrost członu  $-T\Delta S$  o  $6,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  na każde wiązanie wodorowe). Zmiana objętości jamy ma mniejszy wpływ na entalpię swobodną. Należy jednak mieć na uwadze nie tylko wiązania wodorowe tworzone przez cząsteczkę wody, ale także wiązania wodorowe tracone wskutek dodania tej cząsteczki np. woda w jamach tworząca 4 wiązania wodorowe może odznaczać się mniejszą stabilnością od wody w jamach tworzącej mniej wiązań wodorowych co ma miejsce gdy jej dodanie rozrywa większą liczbę wiązań wodorowych

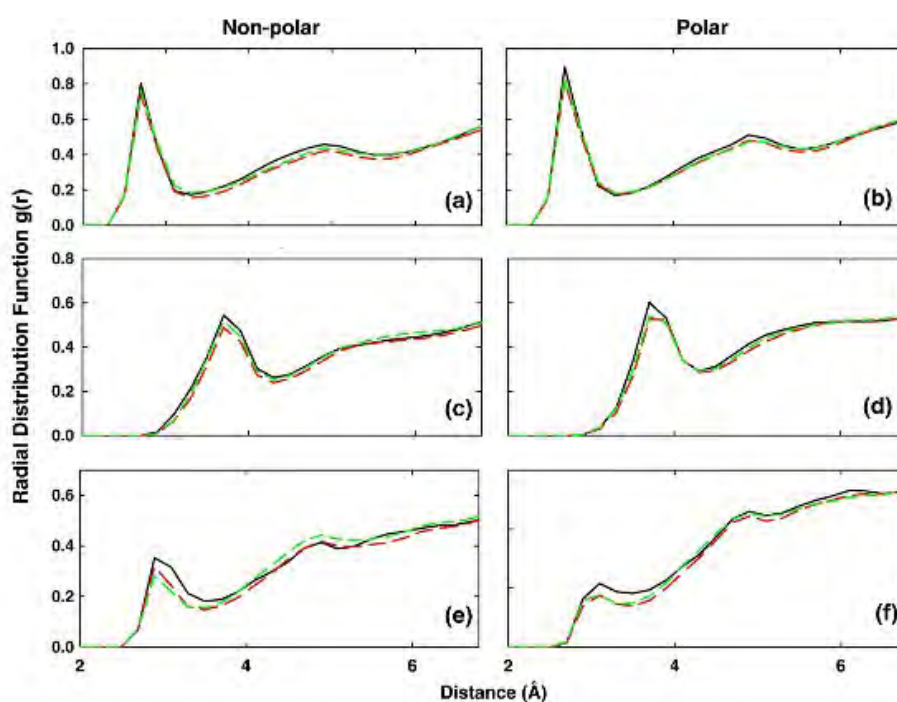


[82]. Cząsteczki wody na powierzchni nie muszą być statyczne i mogą penetrować z powierzchni do wnętrza białka [14]. Ponieważ związane cząsteczki wody tworzą ważne oddziaływania z grupami, które w innym wypadku nie tworzyłyby żadnych oddziaływań, cząsteczki wody w ustalonych pozycjach powinny być uważane za integralną część struktury trzeciorzędowej, i jakkolwiek szczegółowy opis struktury, który ich nie włącza jest niekompletny. Miejsca, w których znajdują się cząsteczki wody wewnątrz białek są wysoce zakonserwowane, wskazując na to, że uwzględnienie tych cząsteczek może poprawiać przewidywania struktur białkowych i że hydrataowanie atomów szkieletu jest kluczową funkcją tych ukrytych cząsteczek rozpuszczalnika [5] [71]. Schowane cząsteczki wody mają skłonność do tworzenia wiązań wodorowych z atomami polarnymi głównego łańcucha, których aminokwasy nie są częścią struktur drugorzędowych takich jak helisy bądź warstwy; raczej łączą się one poprzez wiązania wodorowe z bardziej nieregularnymi strukturami takimi jak **zgięcia** (ang. *bends*) i **zwroty** (ang. *turns*) [66][71]. Cząsteczki wody w **jamach** w większości białek globularnych są obecne w podobnej liczbie do liczby poszczególnych aminokwasów, które są obecne i zakonserwowane jako integralna część białka. Chociaż te cząsteczki wody wymieniają się z cząsteczkami wody na zewnątrz, wiele z nich jest niezbędnych do funkcjonowania podobnie jak aminokwasy [66].

**„Kontaktowe” cząsteczki wody** (ang. *contact water*), zwane też **cząsteczkami wody w obszarach wzajemnego oddziaływania** (ang. *interface water*) umieszczone są na zewnątrz powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika i pośredniczą w oddziaływaniach międzycząsteczkowych pomiędzy sąsiednimi białkami, a też z małymi ligandami czy też z oligonukleotydami [36][66]. Posiadają one trzech albo czterech partnerów z którymi wiążą się wiązaniami wodorowymi przy średniej odległości 2,9 Å od polarnych atomów białka [36]. Ostatnie badania wskazują na obfitość cząsteczek wody w takich obszarach wzajemnego oddziaływania. Niejednokrotnie mamy do czynienia z przynajmniej tak wieloma oddziaływaniami w których pośredniczy woda jak wiele jest bezpośrednich oddziaływań pomiędzy oddziałującymi cząsteczkami substancji rozpuszczonej. Generalnie, obszar wzajemnego oddziaływania dwóch białek nie różni się znacząco od reszty powierzchni białkowej. Za to obszary wzajemnego oddziaływania białka i DNA okazują się być bardziej polarne z bardziej schowanymi cząsteczkami wody. Można znaleźć też takie punkty styku makročząsteczek z których woda jest wypierana zgodnie z mechanizmem opisanym uprzednio np. woda może być wypierana podczas wiązania, co jest entropowo korzystne dla oddziaływania. Aczkolwiek woda, która pozostaje jest także ważna ponieważ wpływa ona na specyficzność procesu rozpoznawania pomiędzy cząsteczkami substancji rozpuszczonej. Więcej cząsteczek wody pozostaje we wzajemnym obszarze oddziaływania dwóch

makrocząsteczek gdy oddziałują one między sobą niespecyficznie [66]. Cząsteczki wody mogą się wiązać pomiędzy obszarami białka, które znajdują się w niewielkiej odległości od siebie, ale się nie stykają, i mogą przenosić sygnały pomiędzy podjednostkami i w stronę wody w głębi roztworu (ang. *bulk water*). Przykładem takiej struktury może być agregat wody pomiędzy dwoma grupami hemowymi i resztami białkowymi dwóch identycznych podjednostek w hemoglobinie małża *Scapharca inaequalvis* [66].

Na Rys. 3.1.6 przedstawiłem funkcje rozkładu radialnego cząsteczek wody wokół wybranych atomów białka (owomukoidu) w różnych temperaturach [108]; jak widać funkcje te nie zależą mocno od temperatury w rozpatrywanym zakresie temperatur.



**Rys. 3.1.6.** Funkcje rozkładu radialnego wokół atomów niepolarnych (lewe panele) i polarnych (prawe panele) jako funkcja odległości pomiędzy tlenem (a),(b); tlenem karbonylowym (c),(d); i azotem (e),(f) (pochodzącymi ze szkieletu peptydowego) a atomami tlenu wody dla temperatur: 273 K (kolor czarny), 288 K (kolor czerwony) i 303 K (kolor zielony). Rysunek i częściowo opis pochodzą z [108].

### 3.1f. Dynamika cząsteczek wody w otocze solwatacyjnej peptydów i białek

Wiele jest prawdy w stwierdzeniu Bizzarri i Canistraro [80], że dynamika białka i rozpuszczalnika są tak silnie ze sobą związane, że "powinny być postrzegane jako jedna całość". Wskazują na to zarówno dane z symulacji dynamiki molekularnej jak i dane eksperymentalne [83].

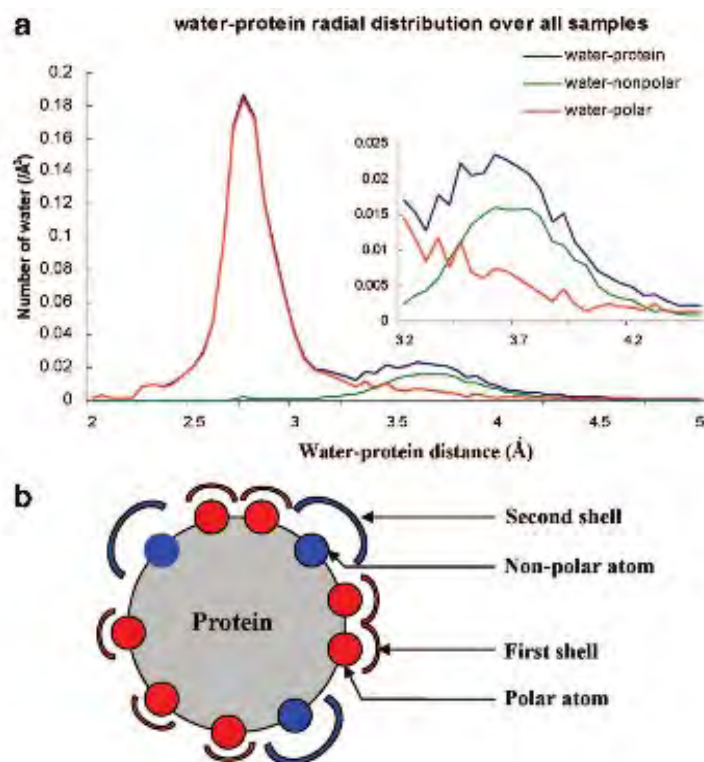
Sieć wiązań wodorowych otaczająca białko, aby mogło ono spełniać swoją funkcję musi sprzęgać się ze zmianami jego konformacji, czego przykładem mogą być zmiany struktury wody towarzyszące ruchom domen w heksamerycznej dehydrogenazie glutaminowej [36]. Trzeba jednak pamiętać o tym iż jedynie ta część białka, która jest eksponowana w stosunku do rozpuszczalnika jest silnie sprzężona z wodą, podczas gdy reszta białka, włączając w to dużą część powierzchni, wykazuje dużo słabsze sprzężenie [84]. Białka w stanie natywnym przechodzą przejście dynamiczne polegające na aktywacji ruchów anharmonicznych, przejawiające się zmianą nachylenia średniego kwadratu przesunięcia jego atomów w funkcji temperatury [83][85][72]. Od tego przejścia w dużej mierze zależy funkcjonalność biologiczna białek [232][233]. Obecnie wiadomo, że mamy do czynienia przynajmniej z dwoma niskotemperaturowymi przejściami dynamicznymi [232][233][27]:

- 1) niezależnym od obecności rozpuszczalnika przy ~130-180 K. Przejście to jest spowodowane aktywacją **lokalnych ruchów cząsteczkowych** takich jak np. ruchu obrotowego grup metyloowych;
- 2) zależnym od uwodnienia przejściem w temperaturze zależnej od skali czasowej eksperymentu (**przejście ~240 K** na laboratoryjną skalę czasową 100 ps). Bierze się tutaj pod uwagę dwie odmienne koncepcje: **przejście szkliste** tzn. przejście szkła w ciecz w otocze solwatacyjnej powodujące przejście szkła w gumę samego białka (przy czym tutaj pojęcia „szkło” i „guma” należy rozumieć szeroko tzn. pod kątem własności mechanicznych substancji) oraz **niskotemperaturowe przejście perkolacyjne** (nie mylić z omawianym wcześniej przejściem perkolacyjnym w wyższej temperaturze), często wiązane ze zmianą charakteru wody z tej przypominającej LDA na tę przypominającą HDA. To pierwsze przejście jest dosyć gwałtowne, drugie ma charakter ciągły. Wciąż nie jest jasne, która koncepcja odnosi się do wody hydratacyjnej. Zresztą jedno i drugie przejście wiąże się ze strukturalnym „uwięzieniem” na skalę makroskopową [233]. Moim osobistym zdaniem przejście perkolacyjne lepiej opisuje zależność dynamiki od stopnia uwodnienia białka, zaś przejście szkliste zależność od temperatury. Zmianę dynamiki białka określa się jako **przejście guma-szkło**, a nie jako **przejście ciecz-szkło** gdyż atomy białka charakteryzują się ograniczonymi stopniami swobody ruchu postępowego. Zmiany w dynamice białka spowodowane jego „zeszkleniem” wiążą się bowiem z utratą przez białko giętkości i wytrzymałości mechanicznej [92][93]. Dopiero powyżej temperatury denaturacji struktura białka staje się ciekłopodobna ze zmniejszonymi ograniczeniami reszt białka do wykonywania dyfuzji translacyjnej [233]. Omawiając w dalszej części tekstu „przejście

dynamiczne” będą miał na myśli przejście  $\sim 240$  K.

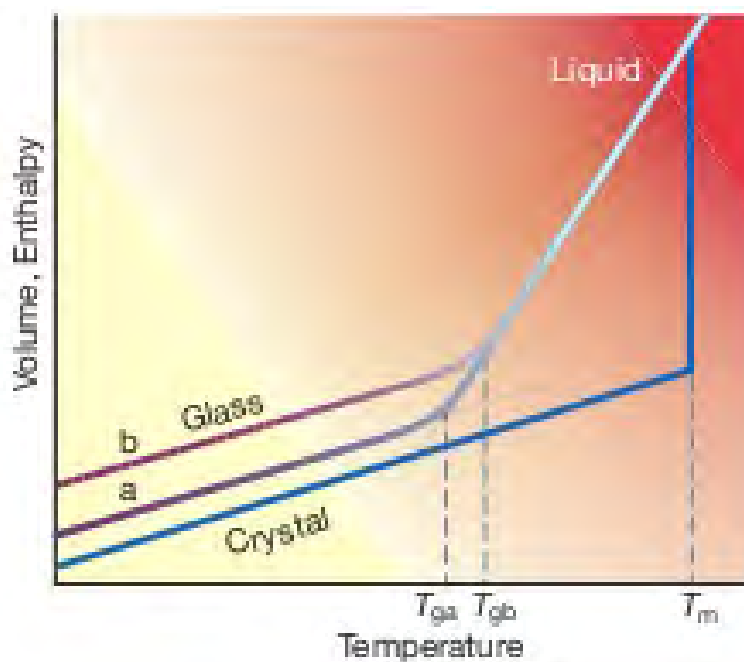
- 3) Ostatnio coraz więcej danych wskazuje na obecność zależnego od rozpuszczalnika **przejścia w  $\sim 180$  K** (na laboratoryjną skalę czasową 100 ps) związanego z nasyceniem kooperatywnego uporządkowania sieci wiązań wodorowych w celu maksymalizacji orientacji tetraedrycznych wśród wiązań wodorowych w trakcie obniżania temperatury [233][19]. O ile przejście  $\sim 180$  K jest wynikiem właśnie „nasycaenia tetraedrycznością”, to wcześniej wspomniane przejście  $\sim 240$  K jest rezultatem „nasycaenia wiązaniami wodorowymi” [19].

Weik, Tobias i wsp. [85] dowiedli przy użyciu nieelastycznego rozpraszania neutronów, oddzielnie badającego dynamikę białka i rozpuszczalnika, że zmiana w dynamice rozpuszczalnego białka (na przykładzie białka wiążącego maltozę, BMP) i jego otoczki hydratacyjnej pojawia się w tej samej temperaturze. Symulacje dynamiki molekularnej przeprowadzone przez Bandyopadhyaya i wsp. [88] również potwierdziły sprzężenie pomiędzy dynamiką łańcuchów bocznych białka, a strukturą i dynamiką wody. Badali oni trzy helisy znajdujące się w podjednostce HP-36 białka wiliny (ang. *villin protein*); okazało się, że największa amplituda ruchów oscylacyjnych pojawiała się w tej helisie wokół której woda była najmniej uporządkowana. Wokół tej helisy zarówno ruch postępowy jak i obrotowy cząsteczek wody był szybszy niż wokół pozostałych dwóch badanych helis. W kolejnych symulacjach [89] okazało się, że dla podjednostki HP-36, zróżnicowany wpływ 3 helikalnych odcinków na dynamikę wody dookoła nich ograniczał się do ich pierwszych warstw hydratacyjnych, co oznacza że dynamika wody w drugiej warstwie hydratacyjnej jest jednolita i zbliżona do dynamiki w wodzie z głębi roztworu, a więc że otoczka solwatacyjna składa się z co najwyżej dwóch warstw cząsteczek wody. Z pomiarów spektroskopii terahercowej (ang. *terahertz spectroscopy*) [90] wynika, że wpływ białka na dynamikę wody sięga 1,8 nm (6 warstw cząsteczek wody) od powierzchni białka ubikwityny, co autorzy określają **dynamiczną otoczką hydratacyjną**, w odróżnieniu od pierwszej warstwy hydratacyjnej określanej mianem **statycznej otoczki hydratacyjnej**, ze względu na wiązania wodorowe tworzone pomiędzy tą warstwą a powierzchnią białka. Jednak jak sami autorzy niewyraźnie wskazują może tutaj nie tyle chodzić o zaburzenie dynamiki poszczególnych cząsteczek wody, co o wpływ na dynamikę całych **sieci wodnych (agregatów)** otaczających białko. Tylko dwie warstwy hydratacyjne są widoczne na funkcji rozkładu powierzchniowego (ang. *surface distribution function*) opisującej gęstość wody jako funkcję odległości od powierzchni peptydu [91] (Rys. 3.1.7).



**Rys. 3.1.7.** (a) Funkcja rozkładu powierzchniowego (kolor niebieski), funkcja rozkładu radialnego woda-atom polarny (kolor czerwony), i funkcja rozkładu radialnego woda-atom niepolarny (kolor zielony). Rozkład pochodzi z uśrednienia danych uzyskanych ze 105 struktur krystalicznych; (b) model pierwszej i drugiej otoczki hydratacyjnej na powierzchni białka. Czerwone i niebieskie kółka oznaczają odpowiednio polarne (lub naładowane) i niepolarne atomy na powierzchni białka. Czerwone i niebieskie zakola oznaczają odpowiednio pierwszą i drugą warstwę solwatacyjną. Te dwie warstwy nie nakładają się na siebie. Rysunek i opis pochodzą z [91].

Woda jest nietypową cieczą również dlatego, że przechłodzenie jest dość trudne do uzyskania w masie rozpuszczalnika, ale łatwe do osiągnięcia w przypadku zaadsorbowanej cieczy. Około 0,4 g wody/g białka nie jest w stanie zamarznąć: w przybliżeniu dwie warstwy cząsteczek wody zaadsorbowanych na powierzchni białka nie zostaje włączone do kryształów lodu, gdy wodny roztwór białka zamarza [233]. Przejściem szklistym określa się drastyczną zmianę makroskopowych właściwości cieczy w zakresie przechłodzonym; lepkość bezwzględna zmienia się gwałtownie, choć w sposób ciągły w wąskim zakresie temperatur [233]. Punkt przegięcia na wykresie objętości (bądź entalpii) jako funkcji temperatury stanowi jedną z definicji temperatury przejścia szklistego  $T_G$  (Rys. 3.1.8) [234]. Z rysunku widać wyraźnie, że anharmoniczność sieci wiązań wodorowych wnosi dominujący wkład do współczynnika rozszerzalności cieplnej [233].



**Rys. 3.1.8.** Zależność temperaturowa objętości cieczy ( $v$ ) bądź entalpii ( $h$ ) przy stałym ciśnieniu  $p$ .  $T_m$  oznacza temperaturę topnienia. Wolne tempo schładzania powoduje przejście szkliste w temperaturze  $T_{ga}$ ; szybsze tempo schładzania prowadzi do przejścia szklistego w temperaturze  $T_{gb}$ . Współczynnik rozszerzalności cieplnej  $\alpha_p = (\partial \ln v / \partial T)_p$  i ciepło właściwe  $c_p = (\partial h / \partial T)_p$  zmieniają się gwałtownie, ale wciąż w sposób ciągły przy przejściu szklistym w odróżnieniu od topnienia/kryształizacji. Rysunek i częściowo opis pochodzi z [234].

W temperaturze przejścia szklistego  $T_G$  zawsze niższej od temperatury topnienia fazy krystalicznej  $T_M$  materiał przechodzi nagłą przemianę z lepkiej cieczy do amorficznego ciała stałego. Pod względem fizycznym przejście szkliste jest zmianą zasadniczą, gdyż następuje przejście z zachowania ergodycznego do nieergodycznego, co oznacza że cząsteczki zmieniają położenie tak wolno, że nie są w stanie dokładnie próbować konfiguracji w czasie określonym tempem schładzania [233][234]. Pod względem eksperymentalnym w  $T_G$  obserwuje się dość gwałtowne zmniejszenie wartości ciepła właściwego  $c_p$  i współczynnika rozszerzalności cieplnej  $\alpha_p$  [233]. W odróżnieniu od przejść fazowych przedział w którym następuje przejście szkliste nie jest nieskończenie mały i wynosi zawsze 10-20 K. Często błędnie utrzymuje się, że przejście szkliste nie ma miejsca gdyż na wykresie obrazującym zmianę określonej wielkości fizycznej nie jest zauważalne. Wynika to jednak zazwyczaj z odnoszenia się wyłącznie do skali logarytmicznej bez brania pod uwagę skali liniowej [233].

Obecnie najlepszą teorią cieczy opisującą przejście szkliste cieczy w tym wody hydratacyjnej jest teoria sprzężenia modów (ang. *mode-coupling theory*, MCT) poszerzona przez Goetze'go i wsp. w celu objęcia zakresu przechłodzonego i przejścia z cieczy do szkła [233]. MCT zakłada mechanizm zwiększającej się lepkości indukującej **strukturalne uwięzienie** cząsteczki

rozpuszczalnika, gdy osiągnięta zostaje **krytyczna gęstość** równoważna łatwiejszej do zmierzenia **temperaturze uwięzienia strukturalnego**  $T_A$  [233]. MCT przewiduje, że anomalie przechłodzonych cieczy (w tym pojawienie się nieergodyczności) stają się widoczne już w pobliżu temperatury  $T_A$ , która generalnie leży powyżej  $T_G$ .

Fundamentalne zrozumienie sprzężenia dynamiki wody i białka wymaga przydzielenia różnych procesów relaksacyjnych odpowiednio do białka i wody, a po drugie identyfikacji, które **procesy relaksacyjne białka** oraz **wody** są ze sobą związane [87]. Ciecze tworzące szkła wykazują co najmniej dwa typy **fluktuacji równowagowych**, zwanych również **relaksacjami:  $\alpha$  (pierwszorzędową) i  $\beta$  (drugorzędową)**. Ponieważ ciecz jest fazą skondensowaną nie zawierającą kanałów bądź jam, stąd dalekosiężna dyfuzja wymaga kolektywnego przegrupowania wielu cząstek. Istotną skalę przestrzenną stanowi odległość między cząsteczkami; każda cząsteczka jest ograniczona poprzez klatkę utworzoną przez sąsiednie cząsteczki. Procesem inicjującym dalekosiężną dyfuzję jest więc ucieczka z tej klatki. To przemieszczenie jest obrazem tzw.  **$\alpha$ -procesu**, który przywraca ergodyczność na laboratoryjną skalę czasową. Powyżej krytycznej gęstości klatka staje się pułapką co powoduje strukturalne uwięzienie także na skalę makroskopową [233]. Ruch obrotowy często oznacza mniejsze fluktuacje gęstości aniżeli ruch postępowy. Korelacja pomiędzy rotacją i  $\alpha$ -relaksacją nie jest więc tak ścisła jak pomiędzy translacją i  $\alpha$ -relaksacją. Czas  $\alpha$ -relaksacji  $\tau_\alpha$  (a jednocześnie stała szybkości tego procesu  $k_\alpha$ ) jest związany z lepkością bezwzględną cieczy  $\eta$  równaniem Maxwella:

$$\tau_\alpha(T) = k_\alpha^{-1} = G\eta(T) \quad (3.1.5)$$

$G$  oznacza wartość naprężenia ścinającego w cieczy w niewielkim stopniu zależnego od temperatury i rodzaju substancji. Czas  $\alpha$ -relaksacji  $\tau_\alpha$  jest więc miarą lepkości w pobliżu powierzchni białka, a więc tzw. **lepkości powierzchniowej**. Przejście szkliste jest zawsze związane z czasem  $\alpha$ -relaksacji układu, co wyjaśnia dlaczego temperatura przejścia szklistego zależy od **laboratoryjnej skali czasowej**. Fenomenologiczną definicją temperatury przejścia szklistego (przydatną w technologii ale bez głębszego znaczenia fizycznego) stanowi czas eksperymentu wynoszący 100 s, równoważny lepkości  $10^{13}$  puaza [233]. Na skalę czasową eksperymentu wynoszącą 1 s woda hydratacyjna mioglobiny przechodzi przejście z cieczy do szkła w 170 K; natomiast na skalę czasową 100 ps temperatura przejścia szklistego wynosi 240 K [233]. Oznacza to, że  $T_G$  zwiększa się wraz ze zwiększającą się szybkością chłodzenia. Stała szybkości  $k_\alpha(T)$  (a jednocześnie czas  $\alpha$ -relaksacji  $\tau_\alpha(T)$ ) może być przybliżona **równaniem Vogla-Fulchera-**

**Taumanna (VFT; superarrheniusowskim):**

$$k_{\alpha}(T) \equiv \tau_{\alpha}^{-1}(T) = \tau_{\alpha\infty}^{-1} \exp\left(-\frac{T_{VFT}}{T-T_0}\right) \quad (3.1.6)$$

$k_B T_{VFT}$  odgrywa rolę ograniczającej **energii aktywacji** przy temperaturach dalekich od  $T_0$ ;  $T_{VFT}$ ,  $T_0$  i

$\tau_{\alpha\infty} = \lim_{T \rightarrow \infty} \tau_{\alpha}$  są współczynnikami określanymi eksperymentalnie [94][87]. **Temperatura osobliwości**  $T_0$  odpowiada punktowi przegięcia na wykresie Arrheniusa, choć jej znaczenie fizyczne jest niejasne. Super-arrheniusowska zależność temperaturowa odzwierciedla **kooperatywny mechanizm** wiążący się z silnymi oddziaływaniami wielu cząsteczek i fluktuującymi barierami energetycznymi. Ciecz nie jest odpowiednio reprezentowana przez krajobraz ustalonej energii, gdyż z szybko zmieniającymi się barierami sama koncepcja krajobrazu staje się wątpliwa [233].  $\alpha$ -Relaksacja będąca z natury procesem kolektywnym różni się znacząco od lokalnych procesów cząsteczkowych. Różnice polegają na tym, że lokalne ruchy cząsteczkowe nie sprzęgają się z właściwościami rozpuszczalnika takimi jak lepkość czy dyfuzja translacyjna oraz tym, że lokalne ruchy cząsteczkowe zasadniczo wykazują arrheniusowską zależność od temperatury [233].

Lepkie ciecze w pobliżu temperatury  $T_G$  wykazują relaksację niewykładniczą. Przebieg wybranej funkcji odpowiedzi  $R$  w funkcji czasu  $t$  (np. polaryzacji w odpowiedzi na przyłożone pole elektryczne, deformacji wynikającej z przyłożonej siły) może być często przybliżony rozciągniętą funkcją wykładniczą tzn. funkcją Kohlrauscha-Williamsa-Wattsa (KWW):

$$R(t) \equiv \frac{[\sigma(t) - \sigma(\infty)]}{[\sigma(0) - \sigma(\infty)]} = \exp[-(t/\tau)^{\beta}] \quad (\beta < 1) \quad (3.1.7)$$

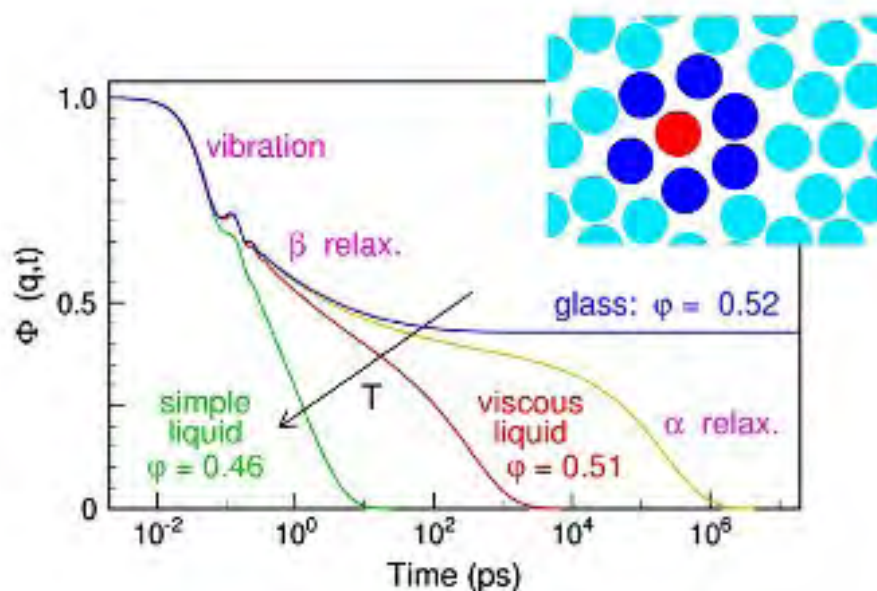
$\sigma$  jest mierzoną wielkością (np. chwilową siłą następującą po zmianie stopnia deformacji;  $\tau$  jest czasem relaksacji, czyli czasem po którym wartość funkcji  $R$  spada e-razy;  $e$  – liczba Napiera. „Spowolnienie długotrwałej relaksacji ucieleśnione powyższym równaniem kontrastuje z zachowaniem się cieczy powyżej temperatury topnienia charakteryzującym się prostą relaksacją wykładniczą”. Z badań eksperymentalnych i symulacji komputerowych wynika, że owo spowolnienie wynika z przestrzennej niejednorodności lepkiej cieczy [234]. Wykładnik rozciągnięcia funkcji  $\beta$  równy 0,5 jest powszechny dla cieczy tworzących szkła [233] i stanowi pewną miarę owej niejednorodności.



$\beta$ -proces w teorii MCT definiuje się jako lokalną relaksację wewnątrz klatki zawsze szybszą od strukturalnej reorganizacji tej klatki. W literaturze  $\beta$ -procesem często określa się wszystkie rodzaje procesów drugorzędowych różniące się zależnością temperaturową od pierwszorzędowej relaksacji ( $\alpha$ ) [233]. Nie jest to jednak podejście słuszne, gdyż jak pokażę,  $\beta$ -procesy także mogą wykazywać superarrheniusowską zależność temperaturową. Wśród  $\beta$ -procesów główną rolę odgrywają tzw.  **$\beta$ -procesy Johari-Goldsteina ( $\beta$  JG)** powszechnie występujące w cieczech tworzących szkła. W zależności od rodzaju substancji  $\beta$ -relaksacja JG może oznaczać ruch postępowy lub/i obrotowy w obrębie klatki tworzonej przez sąsiednie cząsteczki.  $\beta$ -proces JG od innych relaksacji drugorzędowych odróżnia się tym, że angażuje ruch całej cząsteczki oraz może indukować  $\alpha$ -relaksację [236]. W dalszej części omawiając  $\beta$ -proces będę miał zawsze na myśli relaksację  $\beta$  Johari-Goldsteina. W przypadku wody klatka tworzona przez najbliższych sąsiadów angażuje nie tylko **oddziaływania van der Waalsa** ale także **wiązania wodorowe**. Tak więc wewnątrz klatki fluktuacje są związane ze zrywaniem („otwieraniem”) i tworzeniem („zamykaniem”) wiązań wodorowych. Poprzez ten mechanizm nastanie nieharmonicznych przemieszczeń odzwierciedla krytyczny ułamek „otwartych” wiązań [233]. *„Ograniczenia, którymi jest poddana cząsteczka wody ze strony klatki utworzonej przez sąsiednie cząsteczki są zdominowane przez sieć wiązań wodorowych. Tak więc  $\beta$ -relaksację można przypisać do przemieszczeń cząsteczki wody w obrębie klatki w wyniku fluktuacji wiązań wodorowych”*. Amplituda  $\beta$ -procesu wzrastająca wraz z temperaturą odzwierciedla zwiększające się lokalne fluktuacje strukturalne (co w dalszej części tekstu wyjaśnię bardziej szczegółowo) będące prekursorem głównej strukturalnej relaksacji ( $\alpha$ ) wymagającej dezintegracji klatki. Populacja „otwartych” wiązań wodorowych zwiększa się wykładniczo wraz z temperaturą [233]. Krytyczna liczba otwartych wiązań wodorowych kontrolowanych przez  $\beta$ -proces jest warunkiem koniecznym aby pojawiła się  $\alpha$ -relaksacja. W przypadku wody ruch postępowy wewnątrz klatki jest możliwy tylko wówczas gdy ulegają jednoczesnemu zerwaniu aż cztery wiązania wodorowe [233].

Poniżej temperatury topnienia  $T_M$  przechłodzona ciecz nie jest w równowadze termodynamicznej, którą stanowi rzecz jasna stan krystaliczny, ale jest wciąż w stanie równowagi dynamicznej, ponieważ fluktuacje gęstości mogą ulegać relaksacji i odpowiednia funkcja korelacji gęstości  $\Phi(q,t)$  opada do 0. *„Odpowiadająca temu lepkość bezwzględna ma skończoną wartość i materiał może płynąć. W temperaturze  $T_G$  układ wypada ze stanu równowagi dynamicznej; funkcja korelacji  $\Phi(q,t)$  opada do niezerowej wartości plateau i lepkość wzrasta o więcej niż 10 rzędów wielkości. Dzieje się to na makroskopową skalę czasową, zazwyczaj 10 do 100 s”* [233].

Przewidywana relaksacja przechłodzonej cieczy zawsze oznacza dwuetapowy spadek funkcji odpowiedzi np. funkcji korelacji gęstości  $\Phi(q,t)$ . „Początkowy spadek po zdefazowaniu wibracyjnym (ang. *dephasing*) opisuje lokalną dynamikę wewnątrz klatki czyli szybki  $\beta$ -proces. Drugim etapem jest główna strukturalna relaksacja,  $\alpha$ -proces wyjścia z klatki”. Zilustrowano to na Rys. 3.1.9 dla idealnego przejścia szklistego układu składającego się ze sztywnych kul [233].

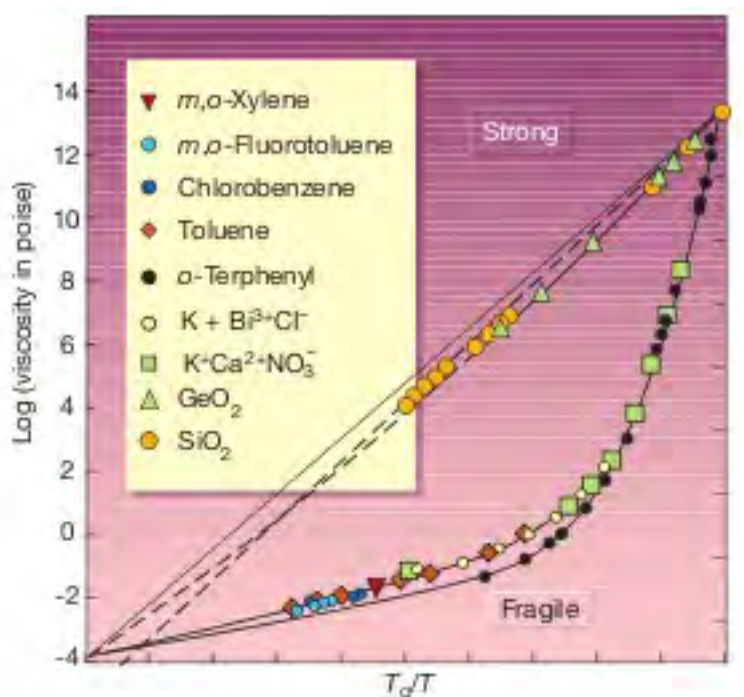


**Rys. 3.1.9.** Schematyczny wykres funkcji korelacji gęstości  $\Phi(q,t)$  cieczy składającej się ze sztywnych kul zgodnie z przewidywaniami MCT. Przedstawiono zmiany dla różnych wartości ułamka objętości  $\phi$  bądź temperatura. Wskazano zakres czasowy  $\alpha$ - i  $\beta$ - procesu. W okienku z prawej strony u góry w sposób schematyczny przedstawiono „strukturalne uwięzienie”. Rysunki i częściowo opis pochodzą z [233].

Tutaj parametrem jest gęstość i ułamek objętości  $\phi$ , którego krytyczna wartość (odpowiadająca wspomnianej przez mnie gęstości krytycznej) dla tego układu wynosi 0,52. W temperaturach dobrze poniżej temperatury uwięzienia strukturalnego  $T_A$ , która generalnie leży powyżej  $T_G$ , szybki  $\beta$ -proces opada z określoną szybkością do wartości plateau. „Odpowiadająca temu amplituda zmniejsza się wraz ze zmniejszającą się temperaturą (nie pokazano). W temperaturze  $T_A$  lokalna amplituda  $\beta$  osiąga wartość krytyczną, gdzie plateau zaczyna opadać poprzez  $\alpha$ -proces na dłuższą skalę czasową. Zwiększająca się temperatura przyspiesza  $\alpha$ -proces aż zlewa się on z  $\beta$ -procesem w wysokich temperaturach” [233].

Ciecze można podzielić [234][233] na **mocne** (ang. *strong*) i **krucho** (ang. *fragile*). Zależność temperaturowa lepkości i czasów relaksacji (np. relaksacji dielektrycznej) jest zgodna z równaniem Arrheniusa, podczas gdy ciecze krucho wykazują znaczne odchylenia od zachowania arrheniusowskiego. W tzw. **cieczach krucho** tworzących szkła czas relaksacji wykazuje super-

wykładniczą zależność temperaturową; wykres Arrheniusa staje się zakrzywiony (Rys. 3.1.10), co oznacza że bariery energetyczne wzrastają wraz z obniżającą się temperaturą [233].



**Rys. 3.1.10.** Skalowany względem temperatury przejścia szklistego  $T_g$  wykres Arrheniusa obrazujący podział cieczy na kruche i mocne. Ciecze mocne wykazują w przybliżeniu liniowość (zachowanie arrheniusowskie) jako wskaźnik niezależnej od temperatury energii aktywacji. Ciecze kruche wykazują przebieg super-arrheniusowski co oznacza, że odpowiednia energia aktywacji ulega zwiększeniu wraz z obniżaniem się temperatury. Rysunek i opis pochodzą z [234]

W przypadku przechłodzonej czystej wody zależność wielkości takich jak lepkość czy współczynnik autodyfuzji od temperatury ma mieć charakter arrheniusowski poniżej temperatury  $T_L \sim 225$  K; w tej temperaturze następuje przejście do zachowania super-arrheniusowskiego (tj. zgodnego z równaniem VFT). To zachowanie jest opisywane jako przejście z cieczy mocnej do kruchej (w trakcie schładzania), chociaż przyczyny tego przejścia nie są wciąż jasne [93]. Woda jest wysoce kruchą cieczą powyżej  $T_L$ . Ostatnie badania (NMR, spektroskopia relaksacji dielektrycznej oraz symulacje dynamiki molekularnej) [87][95] podważyły istnienie ostrego przejścia ciecza krucha-ciecz mocna dla wody hydratacyjnej mioglobiny, elastyny i kolagenu.

Obecnie wskazuje się, że zarówno przejście dynamiczne  $\sim 240$  K jak i przejście ciecza krucha-ciecz mocna mogą być związane ze zmianą mechanizmu ruchu obrotowego w obrębie klatki (a więc procesu  $\beta$  JG) z ruchu charakteryzującego się „drobnymi kroczkami” do libracji w których ruch obrotowy charakteryzuje się znaczną wartością kąta (zob. też. Rozdz. 3.1g). W trakcie obniżania temperatury cząsteczka wody napotyka coraz wyższą barierę energetyczną, w postaci

coraz to liczniejszych wiązań wodorowych, co z kolei prowadzi do ograniczeń zarówno w pozycjach cząsteczek jak i ich orientacji. Uzyskane wyniki wskazują na to, że liczba miejsc zaangażowanych w reorientację wody (poprzez przeskoki) w sposób ciągły zmniejsza się z nieskończonej liczby do kilku, być może 2, podczas chłodzenia. W temperaturze poniżej 165 K obserwacja dynamiki rotacyjnej wody (przez spektroskopię dielektryczną) wykluczyła zwykle dwumiejscowe przeskoki wokół 2-krotnych osi symetrii, ale nie można wykluczyć zniekształconych 2-miejscowych przeskoków (tzw. zniekształconych przeskoków o kąt  $\pi$ ), którym towarzyszą pewne drgania osi symetrii [95]. Liczba cząsteczek wody wykazujących idealną liczbę 4 wiązań wodorowych wzrasta stopniowo podczas schładzania aż do nasycenia w zakresie temperaturowym (190-210 K) gdzie następuje nieostre przejście ciecz krucha-ciecz mocna w przypadku wody hydratacyjnej białek, co wskazuje na ścisły związek pomiędzy strukturą i dynamiką wody hydratacyjnej. Wraz ze spadkiem temperatury, liczba wiązań wodorowych i uporządkowanie orientacyjne wzrasta, co skutkuje wzrostem energii aktywacji i, stąd zachowaniem niearrheniusowskim. Podczas dalszego chłodzenia, tempo zmian nieuporządkowania orientacyjnego osiąga maksimum i następnie gwałtownie opada do 0, prowadząc do niezależnych od temperatury (w niskich zakresach temperatur): nieuporządkowania i energii aktywacji [87].

Dynamika otoczki solwatacyjnej silnie zależy od lepkości w pobliżu powierzchni białka (tzw. **lepkości powierzchniowej**). W przypadku mioglobiny szybkości wejścia i wyjścia liganda (CO) zależą od lepkości podczas gdy wewnętrzne szybkości przeniesienia pomiędzy wnękami są niezależne od lepkości. Funkcja biologiczna włącza się, gdy szybkość ucieczki ligandu zaczyna przekraczać szybkość wewnętrznego wiązania i wskutek tego temperatura nastania aktywności jest wyższa od temperatury przejścia szklistego. Plastyfikująca funkcja wody jest wymagana dla wymiany liganda, co może odnosić się także do lizozymu i innych białek [233]. Doster [233] sugeruje, że w przypadku mioglobiny sprzężenie woda-białko polega na zgranych ze sobą ruchu libracyjnym reszt na powierzchni białka sprzężonych z translacyjnymi przeskokami cząsteczek wody na tą samą skalę czasową. Pokazuje on, iż nastanie przejścia dynamicznego (obrazowanego zwiększeniem się średniego kwadratu przesunięcia atomu żelaza hemowego) zależy od lepkości rozpuszczalnika w pobliżu powierzchni białka. Według Dostera [233] zależność nastania ruchów anharmonicznych od lepkości stoi nie tylko w sprzeczności z modelem krajobrazu lokalnej energii, ale także z sugestią, że przejście dynamiczne pochodzi z niezależnych od lepkości  $\beta$ -procesów w otoczce solwatacyjnej [235][86]. Ta druga opinia jest jednak podważana [87][95][236].

Badania Vitkupa i wsp. [83], a także innych autorów (Tourniera i wsp. [72], Keblińskiego i

wsp. [84]) pokazały, że średni kwadrat przesunięcia atomów białka, długości szkieletu białka, jak i łańcuchów bocznych oraz fluktuacje kątów są w pierwszym rzędzie kontrolowane przez temperaturę wody bez względu na to jaką temperaturę ma białko. Należy jednak przyznać, że powierzchnia białka także wpływa na strukturalne i dynamiczne właściwości wody. W rzeczywistości bowiem obie powierzchnie: wody i rozpuszczalnika są sprzężone, a więc wykonują skorelowane ruchy [233][237][95]. Zmiana zależności temperaturowej procesu  $\beta$  JG w przypadku wody w temperaturze przejścia szklanego  $T_G$  jest dosyć specyficzną własnością tej substancji odróżniającą ją od wielu konwencjonalnych substancji tworzących szkła [236], w których to dla procesu  $\beta$  stała szybkości  $k_\beta(T)$  (i czas relaksacji  $\tau_\beta(T)$ ) można przybliżyć zwykłym **równaniem Arrheniusa** [86]:

$$k_\beta(T) \equiv \tau_\beta^{-1}(T) = A_\beta \exp [-E_\beta / (k_B T)] \quad (3.1.8)$$

$E_\beta$  oznacza wartość energii aktywacji dla tego procesu.

Oprócz powszechnie obserwowanych relaksacji  $\alpha$  i  $\beta$ , przynajmniej duża część cieczy tworzących wiązania wodorowe (jeśli nie wszystkie), takich jak alkohole i woda wykazuje dodatkowy wolniejszy proces relaksacji o charakterze Debye'a. Podobnie jak  $\alpha$ -proces zależność temperaturową relaksacji Debye'owskiej dobrze opisuje równanie VFT, przy czym ekstrapolowana wartość stałej szybkości tej relaksacji  $k_{\text{Debye}}$  jest dużo mniejsza od wartości  $k_\alpha$  dla relaksacji  $\alpha$ . Generalnie w przypadku procesu Debye'owskiego gdy temperatura zmierza do nieskończoności wartość  $\tau_{\text{Debye}\infty}$  wynosi  $10^{-11}$  s (i to zarówno w przypadku alkoholi jak i wody), zaś w przypadku relaksacji  $\alpha$  wartość  $\tau_{\alpha\infty}$  znajduje się w zakresie  $10^{-14}$ - $10^{-15}$  s. Względnie wysoka wartość stałej czasowej  $\tau_\infty$  w porównaniu do typowego czasu drgań pojedynczych cząsteczek sugeruje, że ten proces jest spowodowany kolektywnym ruchem większych jednostek strukturalnych czyli agregatów. Poniżej temperatury 310 K (a więc poniżej temperatury przejścia perkolacyjnego) relaksacja  $\alpha$  i relaksacja Debye'owska są ze sobą związane relacją  $k_\alpha \approx 10^4 k_{\text{Debye}}$ . Przyczyną zmiany w temp. 310 K jest najprawdopodobniej to, że agregaty odpowiedzialne za wolną relaksację Debye'owską (w tym zapewne przede wszystkim sieć otaczająca białko) zaczynają rozrywać się na mniejsze sieci prowadząc do zwiększającego się stosunku  $k_{\text{Debye}}$  do  $k_\alpha$ . Zauważmy, że to przejście pojawia się w temperaturze bliskiej górnemu limitu temperaturowego organizmów stałocieplnych (ptaków, ssaków) równego  $315 \pm 3$  K, co może wskazywać na jego istotne znaczenie biologiczne. O tym, że istotnie tak jest wskazuje analiza wyników eksperymentalnych przeprowadzona przez Fisenkę i Małomuza [184]. Jeżeli symbolem  $\tau_{\text{osc}}$  oznaczymy charakterystyczny czas niewielkich oscylacji cząsteczki w pobliżu jej tymczasowej pozycji równowagowej (czas rezydencji; ang.

residence time; nie mylić z czasami rezydencji cząsteczek wody wokół peptydu; dla lodu Ih mamy  $\tau_{osc}=\infty$ ; identyfikowany przez autorów z czasem życia agregatów o strukturze zawierającej znaczną liczbę sześciokątnych pierścieni), zaś przez  $\tau_T$  stałą czasową, charakteryzującą przemieszczenie cząsteczki wody z jej początkowego stanu wibracyjnego do innego (czas przejścia; ang. *transition time*; identyfikowany ze stałą czasową niesprężystych zderzeń pomiędzy cząsteczkami wody) to poniżej temperatury  $\sim 315\pm 3$  K mamy sytuację gdzie  $\tau_{osc} > \tau_T$ ; zaś powyżej tej temperatury z nierównością przeciwną. Autorzy określają tę temperaturę jako temperaturę „dynamicznego przejścia fazowego”; w przypadku gdy  $\tau_{osc} \gg \tau_T$  mówi się o ruchu kryształopodobnym, zaś gdy  $\tau_{osc} \ll \tau_T$  to o ruchu argonopodobnym. Dla czystej wody w temp. otoczenia  $\tau_{osc} = 0,8 \times 10^{-12}$  s. Rozerwanie sieci otaczającej białko wiąże się ze zmniejszeniem się liczby pierścieni sześciokątnych, a zwiększeniem liczby struktur, w których cząsteczki wody tworzą tylko dwa wiązania wodorowe, czyli struktur raczej łańcuchowych niż pierścieniowych. Ponieważ cząsteczki wody mają wówczas zwiększoną możliwość obracania się prowadzi to do zmiany charakteru ruchu obrotowego cząsteczek wody, czemu towarzyszą również zmiany w zależnościach temperaturowych wielu innych wielkości fizycznych np. lepkości. Te i inne zmiany, które zachodzą w czystej wodzie mają miejsce także w płynach organizmu jak np. w plazmie krwi mogąc istotnie wpływać na funkcje biologiczne jak np. na zdolność przenoszenia substancji odżywczych/odprowadzania substancji szkodliwych czy rozpuszczalność tlenu [184].

Początkowo dynamika wody w otoczeniu białek była rozważana w kontekście teorii "górnolodowych", a więc twierdzono że musi być ona znacznie spowolniona w porównaniu z wodą z głębi roztworu. Ponieważ jednak oddziaływanie peptyd-woda, zwłaszcza jeśli chodzi o wiązania wodorowe nie różni się bardzo od oddziaływań woda-woda i stąd nie można oczekiwać, że indukują one znaczne zaburzenia struktury wody [97]. Przy dyskusji **dynamicznych właściwości wody** w otocze hydratacyjnej, trzeba pamiętać o rozróżnieniu tych własności od **właściwości termodynamicznych i strukturalnych**, np. czasy rezydencji cząsteczek wody w warstwie hydratacyjnej nie mówią nam nic o wpływie wody na stabilność białka. Jak zaznacza Halle [97] słowa "dynamika" nie można używać do opisu nieuporządkowania lub elastyczności układów biocząsteczkowych, gdyż właściwości równowagowe są całkowicie określone przez energię oddziaływania i są całkowicie niezależne od sił, które wywołują ruchy. „Szybkości ruchów cząsteczek wody są określone głównie przez wysokość **barier energetycznych**, podczas, gdy struktura i termodynamika zależą przede wszystkim od **lokalnych minimów energetycznych**. Zgodnie z tym, czasy rezydencji cząsteczek wody są określone nie tyle przez oddziaływania przyciągające (w minimum energetycznym) jak przez brak takich oddziaływań (na szczycie bariery

*energetycznej*)”. Stąd np. niezwykle długie czasy rezydencji dla cząsteczek wody hydratacyjnej, nie wskazują na szczególnie silne oddziaływania woda-białko, ale raczej na topografię, której przykładem mogą być jamy i pory wewnątrz białka utrudniające cząsteczkom wody wymianę z innymi cząsteczkami rozpuszczalnika [97]. Czasy rezydencji mogą być liczone albo względem otoczki solwatacyjnej określonego atomu ( $\tau_a$ ), bądź względem warstwy hydratacyjnej białka o określonej grubości ( $\tau_R$ ). Zaobserwowano następujące uporządkowanie czasów  $\tau_a$  w przypadku przynajmniej kilku białek w odniesieniu do chemicznego charakteru reszty (w przypadku czystej wody w odniesieniu do innej cząsteczki wody) [80][98]:

$$\tau_{\text{naładowane}} \geq \tau_{\text{polarne}} > \tau_{\text{niepolarne}} \approx \tau_{\text{woda}} \quad (3.1.9)$$

( $\tau_{\text{woda}}$  - czas rezydencji cząsteczek wody w czystym rozpuszczalniku względem innych cząsteczek wody). **Czasy życia wiązań wodorowych** pomiędzy białkiem i rozpuszczalnikiem wykazują szeroki wachlarz wartości: od 0,5 ps do 100 ps, a nawet więcej. W przypadku dłuższych czasów używa się najczęściej żargonowego określenia, że cząsteczki są „przywiązane” do makrocząsteczki białka [80] [36]. Średni czas rezydencji jest dużo dłuższy dla cząsteczek wody ukrytych w głębi białka niż dla wody z pierwszej otoczki hydratacyjnej (nawet do 1 ms w wewnętrznych jamach białka) [5][71].

Jak pisze Halle [97] - „Ścisłejszą miarę zaburzeń lokalnej dynamiki wody aniżeli czasy rezydencji stanowi stosunek współczynników dyfuzji rotacyjnej w wodzie z głębi roztworu i w wodzie z otoczki hydratacyjnej  $D_R^{\text{bulk}}/D_R^{\text{hyd}}$ , lub równoważnie stosunek odpowiednich czasów korelacji rotacyjnej  $\langle \tau_{R,\text{hyd}} \rangle / \tau_{R,\text{bulk}}$ . Ta wielkość jest możliwa do uzyskania zarówno eksperymentalnie, jak i z symulacji dynamiki molekularnej. Ponieważ zarówno postępowymi jak i obrotowymi ruchami cząsteczek wody kieruje szybkość z jaką wiązania wodorowe są zrywane i odtwarzane, **współczynnik spowolnienia ruchu obrotowego** (ang. *rotational retardation factor*)  $D_R^{\text{bulk}}/D_R^{\text{hyd}}$  nie powinien znacznie się różnić od **współczynnika spowolnienia ruchu postępowego** (ang. *translational retardation factor*)  $D_T^{\text{bulk}}/D_T^{\text{hyd}}$ . Współczynnik spowolnienia ruchu obrotowego ma jednak tą przewagę, że odzwierciedla ruch bardziej zlokalizowany”. Współczynnik spowolnienia ruchu obrotowego może służyć jako **współczynnik zaburzenia dynamiki** (ang. *dynamic perturbation factor*) w otoczce hydratacyjnej [99].

**Energię aktywacji dla rotacji cząsteczek wody w otoczce hydratacyjnej**  $E_{\text{hyd}}$  można opisać równaniem:

$$E_{\text{hyd}}(T) = -k_B T^2 \frac{d \ln \langle \tau_{R,\text{hyd}} \rangle}{dT} \quad (3.1.10)$$

gdzie:  $\langle \tau_{\text{hyd}} \rangle$  jest czasem korelacji rotacyjnej uśrednionym względem wszystkich miejsc w otoczce

hydratacyjnej. Podobnie definiuje się **energię aktywacji rotacji cząsteczek w czystej wodzie**

$$E_{bulk}(T) = -k_B T^2 \frac{d \ln \tau_{R, bulk}}{dT} \quad (3.1.11)$$

gdzie:  $\tau_{bulk}$  oznacza **czas korelacji rotacyjnej dla czystej wody** [99]. Z badań wynika, że w temperaturach różnych od temperatury w którym te dwie energie aktywacji są sobie równe (256 K w przypadku peptydu Ace-Leu-NMe), energia aktywacji dla rotacji wody jest niższa w warstwie hydratacyjnej **peptydu hydrofobowego** czy też wokół grup hydrofobowych w białku, aniżeli w czystej wodzie, co oczywiście po raz kolejny stoi w sprzeczności z poglądami o klatratowej strukturze wokół grup hydrofobowych [99][98]. Niższa **energia aktywacji** w przypadku cząsteczek wody w warstwie hydratacyjnej wokół grup hydrofobowych oznacza, że te cząsteczki rotują szybciej niż w czystej wodzie przy wystarczająco niskich temperaturach. Wyniki Halle'go i wsp. [99] sugerują, że w przypadku peptydu Ace-Leu-NMe ma to miejsce dla temperatur niższych od 237 K i zgadza się to z wynikami eksperymentów z użyciem kwazielastycznego rozpraszania neutronów, badających dynamikę wody wokół grup hydrofobowych w lizozymie [wg 100]. Gdy czysta woda jest schładzana **energia aktywacji dla rotacji cząsteczek** wody  $E_{bulk}$  wzrasta ponieważ struktura cieczy jest stopniowo przekształcana w stronę bardziej otwartych konfiguracji z wyższym stopniem uporządkowania tetraedrycznego co wielu łączy z przekroczeniem linii Widoma i większym udziałem cząsteczek wody LDL. W otoczce hydratacyjnej, spowolnienie rotacji wody może zostać także przypisane do interferencji z **kooperatywnym mechanizmem rotacji** umożliwiającą szybsze ruchy obrotowe w czystej wodzie. Powoduje to, że  $\tau_{R,hyd}$  wzrasta, co częściowo wynika ze zmniejszonej liczby pobliskich cząsteczek wody z którymi następuje wymiana wiązań wodorowych a częściowo z tego, że wiązania wodorowe w roztworze są albo nieobecne (w miejscach niepolarnych) bądź są ograniczone do określonych miejsc wokół atomów polarnych. „*Ponieważ te ograniczenia są zasadniczo niezależne od temperatury, energia aktywacji  $E_{hyd}$  nie zależy tak mocno od temperatury jak  $E_{bulk}$ , [99].*

Silna niejednorodność warstwy hydratacyjnej białka pod względem właściwości dynamicznych może zostać opisana poprzez potęgowy rozkład rotacyjnych czasów korelacji z wykładnikiem bliskim 2; „ogon” przy dużych wartościach  $\tau$  na tym rozkładzie potęgowym wynika ze swoistej dla białka niewielkiej populacji wolno obracających się „schowanych” cząsteczek wody, które związane są z peptydem przynajmniej dwoma wiązaniami wodorowymi [99][87]. Z symulacji dynamiki molekularnej, badań relaksacji  $^{17}\text{O}$  NMR oraz relaksacji  $^2\text{H}$  NMR wynika, że kilka cząsteczek wody spędza długie okresy (aż do  $\sim 1$  ns) uwięzione w kieszeniach na powierzchni białka, podczas gdy  $\sim 90\%$  cząsteczek wody w otoczce hydratacyjnej białek, podobnie jak w



otoczce hydratacyjnej niewielkich cząsteczek organicznych, podlega zaledwie dwukrotnemu średniemu spowolnieniu dynamiki w porównaniu z czystą wodą [101] i jedynie spowolnieniu o czynnik 1,3 w przypadku najbardziej ruchliwej połowy połowy cząsteczek wody [99]. Podobne wyniki uzyskano przy wykorzystaniu niespójnego kwazielastycznego rozpraszania neutronów (ang. *incoherent quasi-elastic neutron scattering, incoherent QENS*) (współczynnik spowolnienia ruchu obrotowego wynoszący  $\sim 1,0-2,2$  przy czym największe wartości odnoszą się do pierwszej warstwy hydratacyjnej i do bardziej hydrofobowej cząsteczki (Ace-Leu-NMe w porównaniu z Ace-Gly-NMe), oraz z pomiarów dyspersji relaksacji magnetycznej (ang. *magnetic relaxation dispersion, MRD*) (np. współczynnik spowolnienia ruchu obrotowego dla warstwy hydratacyjnej BPTI uzyskany przez Modiga i wsp. (w  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) wynosi 3,3; dla porównania dla cząsteczki alaniny uzyskano wartość 1,7; dla leucyny 2,4; zaś dla metanolu 1,4) [98][102][97][103]. W ostatnich latach ten obraz był podważony przez wyniki pomiarów fluorescencji jako funkcji czasu (ang. *time-resolved fluorescence measurements*), które to miały wskazywać, że cząsteczki wody w otoczce hydratacyjnej są spowolnione znacznie bardziej (10-40 razy w przypadku subtylizyny *Carlsberg*) [101][71][98]. Jednak reszta tryptofanowa będąca sondą w pomiarach fluorescencyjnych jest dość mocno ukryta wewnątrz białka i w rzeczywistości nie odzwierciedla dynamiki "powolnej" wody, a jedynie wewnętrzne ruchy w białku w odpowiedzi na rozkład ładunków w stanie wzbudzonym [97]. Twierdzenie o względnie niewielkim spowolnieniu dynamiki wody, a tym samym niewielkim zaburzeniu sieci wiązań wodorowych w otoczce hydratacyjnej było podważane również przy wykorzystaniu relaksacji dielektrycznej (ang. *dielectric relaxation, DR*). Wiele badań DR pokazywało, że znaczna część (zazwyczaj połowa) cząsteczek wody w warstwie hydratacyjnej ma mocno spowolniony ruch obrotowy, z wartościami  $\langle \tau_{R,hyd} \rangle / \tau_{R,bulk}$  w zakresie  $10^2-10^3$  [97]. Jednak tutaj najprawdopodobniej błędnie przypisano jedną ze składowych profilu dielektrycznego (tzw. dyspersję  $\delta$  na nanosekundową skalę czasową) dynamice wody w pobliżu białka [97]. Jak dotąd nie ma więc żadnej potrzeby rewizji dominującego obrazu dynamiki hydratacyjnej białka [101].

Analiza danych symulacyjnych pokazała, że dynamika wody w niewielkim stopniu zależy od rodzaju peptydu i jest spowolniona w ich sąsiedztwie wskutek tworzenia się (zwłaszcza w niskich temperaturach) wiązań wodorowych pomiędzy wodą a cząsteczką peptydu [87]. Z dotychczasowych danych [99] wynika, iż *„poza ułamkiem odosobnionych miejsc hydratacyjnych, otoczka hydratacyjna białek nie różni się znacząco od otoczki hydratacyjnej krótkich peptydów i innych niewielkocząsteczkowych substancji organicznych. W obu przypadkach, czynnik zaburzenia dynamicznego jest mniejszy od 2 w temperaturze pokojowej i wykazuje maksimum w*

*pobliżu 260 K*". Badania dyspersji relaksacji magnetycznej (MRD) białek potwierdziły istnienie dwóch populacji cząsteczek wody hydratacyjnej: wewnętrzne cząsteczki wody, które przebywają w kieszeniach białka w czasie rzędu mikrosekund i takie, które oddziałują z powierzchnią białka w skali czasowej rzędu 10-100 ps [102]. Woda w **warstwach hydratacyjnych biocząsteczek w żywej komórce bakteryjnej** (czyli *in vivo*) „zachowuje się podobnie jak woda wokół wspomnianych wcześniej prostszych układów modelowych (białek i w ogóle peptydów *in vitro*), jedyną różnicą jest nieco większe tarcie odosobnionych (mocno zaburzonych) miejsc hydratacyjnych, co jest związane z supramolekularną organizacją w komórce” [99]. **Wewnątrzkomórkowa woda**, która nie jest w bezpośrednim kontakcie z biopolimerami ma zasadniczo tą samą dynamikę jak czysta woda, co można odnieść do >80% wody komórkowej. Nie znaleziono żadnych znaczących różnic w dynamice wody komórkowej pomiędzy dobrze znaną bakterią *Escherichia coli* a halofilnym archeonem *Haloarcula marismortui*, pomimo wysokich stężeń Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> w tym drugim przypadku [99]. Jest to ważne w kontekście rozważania hydratacji krótkich peptydów jako modelu hydratacji białek i modelu wody znajdującej się wewnątrz komórek organizmów żywych.

Obliczając współczynnik autodyfuzji translacyjnej z **równania Einsteina**,

$$D_T = \frac{1}{2M} \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \frac{\langle |\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(0)|^2 \rangle}{\Delta t} = \frac{1}{6} \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \frac{\langle \Delta r^2 \rangle}{\Delta t} \quad (3.1.12)$$

(gdzie: M=3 oznacza wymiarowość przestrzeni,  $\mathbf{r}_i(t)$  oraz  $\mathbf{r}_i(0)$  są odpowiednio pozycjami cząsteczki wody i w czasie t, oraz w czasie t=0; nawias kwadratowy „ $\langle \rangle$ ” oznacza średnią po wszystkich rozważanych cząsteczkach i początkach odcinków czasowych t=0); bądź z **równania Greena-Kubo**

$$D_T = \frac{1}{M} \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \int_0^{\Delta t} \left\langle \frac{\mathbf{r}_i(t)}{dt} \cdot \frac{\mathbf{r}_i(0)}{dt} \right\rangle dt = \frac{1}{3} \lim_{\Delta t \rightarrow \infty} \int_0^{\Delta t} \langle \mathbf{v}_i(t) \cdot \mathbf{v}_i(0) \rangle dt \quad (3.1.13)$$

zakłada się liniowy wzrost średniego kwadratu przesunięcia cząstki wraz z czasem. Ten warunek, który jest zwykle spełniony w przypadku większości jednorodnych izotropowych trójwymiarowych cieczy na skalę czasową dłuższą od kilku pikosekund, nie jest jednak generalnie spełniony w przypadku cząsteczek wody dyfundujących w pobliżu białka. W tym przypadku średni kwadrat przesunięcia cząstki  $\langle \Delta r^2 \rangle$  następuje według zależności  $\langle \Delta r^2 \rangle \approx t^\alpha$ , gdzie  $\alpha < 1$ . Generalnie, odchylenia wykładnika  $\alpha$  od jedności są wskaźnikami **dyfuzji anomalnej** [80]. W obecności dyfuzji anomalnej nachylenie  $d\langle \Delta r^2 \rangle / dt$  zmienia się wraz z czasem t i obliczanie wsp. dyfuzji przy użyciu równania Einsteina bądź Greena-Kubo mogłoby prowadzić do nieprawidłowych i zależnych od czasu wartości. Aczkolwiek wyliczenia w których zakłada się liniową zależność średniego kwadratu przesunięcia od czasu są bardzo użyteczne, gdyż mimo wszystko pozwalają na

porównywanie współczynników dyfuzji z różnych obszarów roztworu (często określa się je wówczas jako **efektywne współczynniki dyfuzji**, ang. *effective diffusion coefficients*). Poza tym oprócz rozważania **całkowitego współczynnika dyfuzji**, można rozważać również **współczynniki dyfuzji względem określonych osi** [80]. Warto zauważyć, że przynajmniej w przypadku lizozymu efektywny współczynnik dyfuzji względem osi równoległej do powierzchni białka odznacza się wartościami porównywalnymi z całkowitym współczynnikiem autodyfuzji wody z głębi roztworu [74]. Zależność średniego kwadratu przesunięcia od czasu można podzielić na cztery obszary opisujące ruch postępowy: **obszar balistyczny** w pierwszych odcinkach czasowych, gdzie  $\alpha=2$ , następnie **obszar plateau**, którego można się spodziewać zwłaszcza w niskich temperaturach (typowy dla przechłodzonych cieczy osiągających ich przejścia szkliste), wskazujący na to, że cząsteczki wody są uwięzione w klatce tworzonej przez sąsiednie cząsteczki wody i cząsteczkę peptydu. Po dłuższym czasie, cząsteczki wody zaczynają wydostawać się z tych klatek (proces  $\alpha$ ) i stąd średni kwadrat przesunięcia ulega zwiększeniu, co oznacza przejście do **obszaru dyfuzji sublinearnej**, gdzie  $\alpha < 1$  (np. dla lizozymu  $\alpha=0,75$ ), odzwierciedlając to, że obecność łańcucha peptydowego zapobiega swobodnej dyfuzji wody. To właśnie istnienie wyraźnej dyfuzji sublinearnej powoduje, że określenie wiarygodnych współczynników dyfuzji z symulacji MD wymaga względnie długiego równoważenia i trajektorii (zwłaszcza z wykorzystaniem równania Einsteina, zamiast Greena-Kubo) [87]. W końcu przy wyższych temperaturach i/lub dłuższym czasie pojawia się **obszar dyfuzji linearnej**, gdzie  $\alpha=1$ , wskazujący, że przestrzenne ściśnięcie z powodu obecności peptydu staje się nieistotne przy wystarczająco dużym zasięgu. Czym dalej od powierzchni białka, tym wartość  $\alpha$  szybciej przybliża się do jedności, czyli *de facto* to dla tego obszaru podaje się wartości efektywnego współczynnika dyfuzji translacyjnej [87].

W celu wyjaśnienia przyczyny anomalnej dyfuzji na powierzchni międzyfazowej białko-woda, Pizzitutti i wsp. [81] wykonali symulacje dynamiki molekularnej dwóch układów: pierwszy układ stanowił zmrożony lizozym otoczony przez wodę o temperaturze 300 K; drugi układ stanowił również zmrożony lizozym z wodą o temperaturze 300 K przy czym wyłączono oddziaływania elektrostatyczne woda-białko. Wyniki uzyskane z tych dwóch układów porównywano z roztworem, gdzie w pełni uwzględniono oddziaływania elektrostatyczne, dynamika nie została ograniczona, a temperatura całego układu woda-lizozym wynosiła 300 K. Uzyskane wyniki potwierdziły, że zarówno nierówności na powierzchni białka (tzw. **nieuporządkowanie geometryczne**; ang. *geometrical disorder*); jak i niejednorodność powierzchni białka, wynikająca ze zróżnicowania oddziaływania elektrostatycznego poszczególnych miejsc na białku z wodą (tzw. **nieuporządkowanie czasowe**, ang. *temporal disorder*) powodują anomalną dyfuzję wody. Owe

symulacje [81] ujawniły, że dynamika rotacyjna wody na powierzchni białka zależy przede wszystkim od oddziaływań elektrostatycznych, a więc przede wszystkim od nieuporządkowania czasowego. Jest to zgodne ze wcześniejszymi symulacjami MD peptydu Ace-Leu-NMe wykonanymi przez Russo i wsp. [104] które pokazały, że cząsteczki wody w pobliżu hydrofilowego szkieletu peptydu Ace-Leu-NMe są ~3-4 razy wolniejsze niż cząsteczki wody przebywające w pobliżu hydrofobowego łańcucha bocznego tego peptydu; o wpływie nieuporządkowania geometrycznego świadczy zaś fakt, że woda znajdująca się zarówno wokół hydrofobowego jak i hydrofilowego środowiska Ace-Leu-NMe dyfunduje wolniej niż woda wokół Ace-Gly-NMe. Z tego autorzy wyciągają wniosek, że cząsteczki Ace-Leu-NMe ustanawiają przestrzennie niejednorodne środowisko dla oddziaływań z wodą; jeden obszar znajduje przy **hydrofilowym szkielecie** i stabilizuje on jeden rodzaj agregatu wody, podczas gdy inny obszar utrzymuje sieć wody z krótkotrwałymi wiązaniami wodorowymi nietworzącą oczywiście wiązań wodorowych z **hydrofobowym łańcuchem bocznym** wokół którego się znajduje. Sugeruje się, że to właśnie niedopasowanie tych dwóch rodzajów agregatów wody do siebie może być przyczyną anomalnej dyfuzji wody na powierzchni białka [105]. Pizzitutti i wsp. [81] pokazali także, że dynamiczne anomalie nie pochodzą od cząsteczek wody ściśle związanych z białkami o czasach rezydencji ~1 ns.

Warstwę hydratacyjną można postrzegać jako defekt w sieci wiązań wodorowych rozpuszczalnika, indukowany przez białko utrudniające tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody. Ponieważ te ograniczenia są zasadniczo niezależne od temperatury, woda hydratacyjna wykazuje odchylenie od super-Arrheniusowskiej (rozciągniętej wykładniczej, VFT) zależności temperaturowej czasów korelacji rotacyjnej  $\tau_R$  [a więc jednocześnie współczynników dyfuzji rotacyjnej  $D_R=(6\tau_R)^{-1}$ ] dla czystej wody np. zarówno w przypadku 0,5 M Ace-Leu-NMe jak i 2,0 M Ace-Leu-NMe obserwujemy arrheniusowską zależność czasu  $\tau_R$  od temperatury [105]. W tym sensie, woda hydratacyjna jest mniej anomalna aniżeli woda niezaburzona (*bulk*) [99], co wynika z tworzenia przez cząsteczki wody hydratacyjnej wiązań wodorowych z białkiem spowalniających ruch obrotowy i postępowy cząsteczek wody co znajduje odzwierciedlenie chociażby w odpowiednich funkcjach korelacji prędkości rotacyjnej bądź translacyjnej [87]. Nucci i wsp. [wg. 106] przy wykorzystaniu spektroskopii NMR białek umieszczonych w odwróconych micelach odkryli, że cząsteczki tworzące agregaty wokół białka w obrębie danego agregatu charakteryzują się podobną dynamiką np. czasem rezydencji. W ciekłej wodzie cząsteczki tworzą i zrywają wiązania wodorowe z innymi cząsteczkami w sieci wiązań wodorowych tworzących ten agregat. Szybkie ruchy cząsteczek w ciekłej wodzie wynikają z

ruchów całego agregatu – cząsteczki wody mogą zmieniać położenie bez przechodzenia przez stany przejściowe podczas których jedno lub kilka wiązań wodorowych musi ulec zerwaniu. Obecność białka wpływa na tą sieć zmieniając nie tylko prawdopodobieństwa zajścia różnych strukturalnych rearanżacji rozpuszczalnika, ale także łatwość z którą cząsteczki mogą „przechodzić” pomiędzy danymi stanami sieci. Cząsteczki wody w agregatach działają kooperatywnie, ale jednocześnie niezależnie od zachowania się wody w głębi roztworu czy też w innych regionach, a więc białko w ukierunkowany geometrycznie sposób wpływa na rozpuszczalnik. Szybkości procesów rearanżacji różnią się o czynnik większy niż  $10^{10}$  w jednym miejscu powierzchni białka w porównaniu z innym. Agregat, gdzie wiele wiązań wodorowych z innymi agregatami bądź białkiem musi ulec zerwaniu w celu przemieszczenia się jego całego będzie przebywać dłużej wokół powierzchni białka niż ten nie wymagający tylu zerwań. Innymi słowy, geometryczne ograniczenia wymuszone przez ubikwitynę na otaczające cząsteczki wody skutecznie indukują (w pierwszym przybliżeniu) niezależne agregaty (sieci rozpuszczalnika) wokół każdego regionu. To odkrycie wydaje się mieć istotne znaczenie w zrozumieniu takich procesów jak wiązanie ligandów (np. kofaktorów, substratów enzymów) przez białko oraz w zrozumieniu funkcji białek i ich ewolucji jak również może pomóc w projektowaniu białek *de novo* [106]. Odkrycie to pokazuje, że białka nie działają wyłącznie poprzez własne ruchy ale również przez indukowanie ruchów cząsteczek rozpuszczalnika o odpowiedniej szybkości.

W celu zbadania roli ruchu postępowego wody (dyfuzji translacyjnej) w dynamice białka Tarek i Tobias [107] wykonali symulację dynamiki molekularnej roztworu rybonukleazy A (RNazy) w temp. 300 K, przy czym pozycje tlenu wody ograniczono za pomocą potencjału harmonicznego. Okazało się, że to ograniczenie miało niewielki wpływ na ruch obrotowy cząsteczek wody (dyfuzję rotacyjną), aczkolwiek oczywiście wpłynęły one ogromnie na ruch postępowy (dyfuzję translacyjną). W tym świetle nie ma nic dziwnego, że ograniczenia te w niewielkim stopniu wpływały na czas życia wiązania wodorowego woda-białko, który wynosił średnio 0,45 ps w symulacji bez użycia potencjału ograniczającego i 0,47 ps z użyciem tego potencjału. Ponadto, z symulacji tych wynika, że w przypadku ograniczenia ruchów postępowych cząsteczek wody przez potencjał ograniczający ulegają zmniejszeniu fluktuacje ruchów białka, zarówno szkieletu jak i łańcuchów bocznych, tak że mają one zakres podobny do tego jaki ma miejsce w białku odwodnionym [107].

Ponieważ za ruchy pojedynczych cząsteczek wody w masie rozpuszczalnika odpowiedzialna jest przede wszystkim relaksacja  $\alpha$ , wynika z tego, że w temperaturach powyżej temperatury

przejścia szklanego również współczynnik dyfuzji translacyjnej będzie spełniał zależność Vogla-Fulchera-Tammanna od temperatury [4][105][108], ponieważ zgodnie z Równ. 3.1.12 współczynnik autodyfuzji pojedynczej cząsteczki  $D_s^{(1)}$  związany jest z czasem  $\alpha$ -relaksacji  $\tau_\alpha$  (w czasie, którego zachodzi przemieszczenie o odcinek  $l_0$ ) następującą zależnością:

$$D_s^{(1)} = l_0^2/\tau_\alpha \quad (3.1.14).$$

Jednak musimy pamiętać, że oprócz jednocząsteczkowego wkładu do współczynnika dyfuzji istnieje także jeszcze niewielki wkład pochodzący od przemieszczeń całych agregatów wynoszący (z danych rozpraszania neutronów)  $0,17 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ , co razem z  $D_s^{(1)}$  daje wartość całkowitego współczynnika autodyfuzji translacyjnej  $D_T$  równą  $2,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  [184]. W temperaturze  $\sim 290 \text{ K}$  następuje zmiana zależności temperaturowej zgodnej z równaniem Stokesa-Einsteina, gdzie  $D \propto (\tau_\alpha/T)$  do zależności określanej jako „ułamkowe równanie Stokesa-Einsteina” -  $D \propto (\tau_\alpha/T)^{-\zeta}$ , gdzie  $\zeta \approx 3/5$ . Tą zmianę wiąże się z temperaturą, gdzie stosunek liczby cząsteczek wody ze strukturą przypominającą HDA do cząsteczek wody ze strukturą przypominającą LDA zaczyna się gwałtownie zmieniać wraz z temperaturą [21].

Czas życia wiązania wodorowego w symulacjach MD jest zwykle opisywany z wykorzystaniem funkcji korelacji czasu życia wiązania wodorowego  $C_{HB}(t)$ , zdefiniowanej następującym równaniem [103][94][109]:

$$C_{HB}(t) \equiv \langle h(0)h(t) \rangle / \langle h \rangle \quad (3.1.15)$$

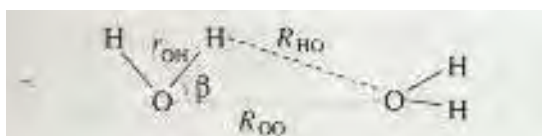
gdzie  $h(t)$  jest funkcją binarną czasu życia wiązania wodorowego;  $h(t)=1$  gdy wiązanie wodorowe w obrębie pary cząsteczek wody istnieje nieprzerwanie w przedziale czasowym  $\langle 0, t \rangle$ ; gdy w tym czasie jest zerwane  $h(t)=0$ . W przypadku nieskończonego układu średnia  $\langle h \rangle \equiv 0$ , ponieważ wówczas prawdopodobieństwo, że dwa arbitralnie wybrane cząsteczki związane są ze sobą jest równe 0; jednak w przypadku układów skończonych (jak w przypadku pudełek symulacyjnych)  $\langle h \rangle \neq 0$  [109]. Jak widać obie funkcje zależą od kryterium tworzenia/zrywania wiązania wodorowego jak i od samej definicji wiązania wodorowego [103]. Funkcję  $C_{HB}(t)$  można opisać jako krzywą charakteryzującą się dwoma stałymi czasowymi. Ostatnio uzyskano wartość czasu życia, a właściwie rearanzacji wiązania wodorowego (tj. czasów po których funkcja opada e razy; e – liczba Napiera) wynoszącą 1,5 ps w czystej wodzie temperaturze 300 K, co jest zgodne z wynikami licznych eksperymentów i symulacji dynamiki molekularnej zakładającymi czas życia wiązania wodorowego równy 1-2 ps [103][110]. Druga stała czasowa równa  $\sim 150\text{—}170 \text{ fs}$  opisuje

szybki spadek funkcji na początku, który przypisuje się międzycząsteczkowym drganiom rozciągającym wiązania wodorowego. W przypadku wody hydratacyjnej białek wspomniana funkcja opada wolniej, zaś wartości odpowiednich stałych czasowych (czasów życia) wiązań wodorowych dla I warstwy hydratacyjnej są ~2-3 razy większe. Wynika to z tego, że wzrasta udział cząsteczek wody tworzących silne wiązania wodorowe z powierzchnią białka. W przypadku II warstwy hydratacyjnej różnice w porównaniu z czystą wodą są niewielkie [89][111].

Geometria wiązań wodorowych zmienia się z temperaturą. Dla wielkości  $R_{OO}$  (odległość tlen-tlen),  $R_{HO}$  (długość wiązania wodorowego) i kąt  $\beta_{HB}$  jak na Rys. 3.1.13 Halle i wsp. [112] w zakresie temperatur 0-80 °C uzyskali następujące zależności:

$$\langle R_{HO} \rangle / \text{\AA} = 1,874 + 0,00224(T/^\circ\text{C}) \quad (3.1.16a)$$

$$\langle \beta_{HB} \rangle / \text{deg} = 11,71 + 0,1233(T/^\circ\text{C}) \quad (3.1.16b)$$



Rys. 3.1.13. Definicja parametrów użytych w tekście do opisu wiązania wodorowego. Rysunek pochodzi z [34].

### 3.1g. Mechanizmy rearanżacji wiązania wodorowego

Wykazano [113][114], iż zasadniczy mechanizm zrywania i tworzenia wiązania wodorowego (tzw. **przełączanie wiązania**; ang. *switching*) składa się z trzech zasadniczych kroków (Rys. 3.1.14):

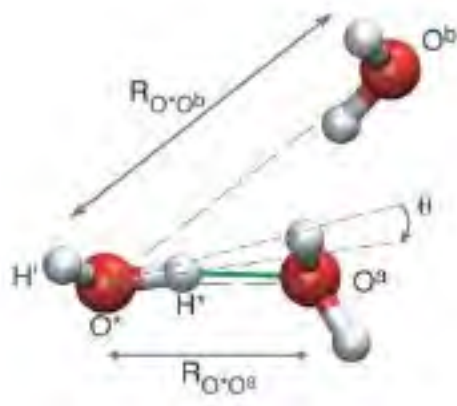
- 1) „zrywania początkowego wiązania wodorowego  $\text{HO}^*-\text{H}^*\cdots\text{O}^a\text{H}_2$  tworzonego przez dwie cząsteczki wody;
- 2) „obrotu wodoru  $\text{H}^*$  centralnej cząsteczki wody”;
- 3) „tworzenia nowego wiązania wodorowego z inną cząsteczką wody  $\text{HO}^*-\text{H}^*\cdots\text{O}^b\text{H}_2$ ”

W tym celu po przyjęciu geometrycznej definicji wiązania wodorowego Laage i Hynes [113][114] badali:

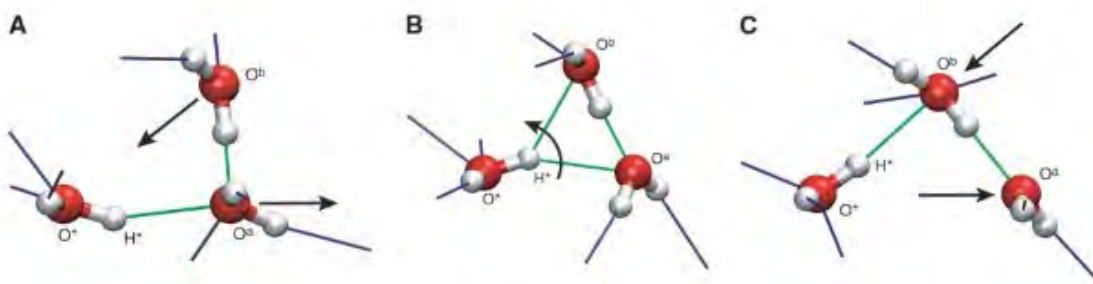
a) odległości tlen-tlen  $R_{O^*O^a}$  i  $R_{O^*O^b}$

b) kąt  $\theta$  – kąt pomiędzy rzutem wektora  $\text{O}^*\text{H}^*$  na płaszczyznę  $\text{O}^*\text{O}^a\text{O}^b$  i dwusieczną kąta  $\text{O}^a\text{O}^*\text{O}^b$ . Taka definicja kąta  $\theta$ , czyni go niezależnym zarówno od ruchu  $\text{H}^*$  poza płaszczyznę  $\text{O}^*\text{O}^a\text{O}^b$  i zginania kąta  $\text{O}^a\text{O}^*\text{O}^b$ . Gdy  $\theta=0$ ;  $\text{H}^*$  jest w równej odległości od  $\text{O}^a$  i  $\text{O}^b$ .

a)



b)



**Rys. 3.1.12.** a) Definicja wielkości użytych w tekście; b) mechanizm przełączania wiązania. Rysunki pochodzą z [113].

Analiza trajektorii pokazała, że przed osiągnięciem sytuacji  $R_{O^*O^a} = R_{O^*O^b}$ ,  $O^a$  jest związane wiązaniem wodorowym z  $H^*$  i leży w pierwszej otoczce koordynacyjnej  $O^*$  ( $R_{O^*O^a} \approx 2,95 \text{ \AA}$ ), podczas gdy  $O^b$  leży wewnątrz drugiej otoczki koordynacyjnej  $O^*$  ( $R_{O^*O^b} \approx 4,10 \text{ \AA}$ ). Zarówno  $O^a$  jak  $O^b$  przyjmują średnio  $n_{\text{bulk}} \approx 1,8$  wiązań wodorowych (jak czynią cząsteczki wody stanowiące czysty rozpuszczalnik). Odejście  $O^a$  od  $O^*$  i ruch  $O^b$  w kierunku  $O^*$  zapoczątkowane są przez zmiany w liczbie wiązań wodorowych przyjmowanych przez  $O^a$  i  $O^b$  w wyniku fluktuacji w sieci wiązań wodorowych czystego rozpuszczalnika. Koordynacja  $O^a$  wzrasta znacząco o około 0,3 w porównaniu ze średnią wartością dla rozpuszczalnika, i stąd  $O^a$  odchodzi od wiązania wodorowego dostarczanego przez  $H^*$ . Z drugiej strony, koordynacja  $O^b$  spada o  $\sim 0,3$  w porównaniu ze średnią wartością, przyciągając  $O^b$  w kierunku  $H^*$  w celu odzyskania koordynacji. Ta różnica w koordynacji jest początkiem ruchu  $O^a$  i  $O^b$  prowadząc do sytuacji gdy



$R_{O^a O^b} = R_{O^b O^a}$ , gdzie ma miejsce obrót H\*.

Pierwszym krokiem w reorientacji jest stąd tworzenie wiązania wodorowego wokół O<sup>a</sup> i ucięcie wiązania wodorowego wokół O<sup>b</sup> w drugiej warstwie koordynacyjnej względem obracającej się cząsteczki wody. Stoi to w sprzeczności ze standardowym założeniem, mianowicie, że pierwszym krokiem jest takie zrywanie wiązania wodorowego, że tworzy się „dyndająca” nietworząca wiązania wodorowego grupa O\*H\*; która dopiero w następnym kroku ulega reorientacji. W mechanizmie przeskoku (przełączania) zaproponowanym przez Laage'a i Hynesa „dyndająca” grupa O\*H\* nie pojawia się. Zamiast tej jak okazało się niestabilnej struktury pojawia się stan przejściowy, którego struktura zawiera rozwidlone wiązanie wodorowe, z obracającą się wodą powiązaną pięcioma wiązaniami wodorowymi.

Ponieważ wiązanie O\*H\* oscyluje w kierunku O<sup>a</sup> dla t<0 i w kierunku O<sup>b</sup> dla t>0, kąt O<sup>a</sup>O\*O<sup>b</sup> w t=0 daje amplitudę przeskoku  $\theta_0=60^\circ$ . Drugim parametrem, który bierzemy pod uwagę jest częstotliwość przeskoków  $1/\tau_0$ . Jednakże powyższy model zwany **modelem Ivanova** zakłada, że orientacja O\*H\* pomiędzy przeskokami jest „zamrożona”. Tak jednak nie jest z dwóch powodów: wiązanie O\*H\* drga wokół osi wiązania wodorowego O\*-H\*...O (drżanie to zachodzi w obrębie stożka, którego tworzącą stanowi odcinek O\*-H\* [115]), i sama oś powoli się obraca. Oprócz „przeskoków” powodujących przełączanie wiązania wodorowego mamy do czynienia z wolniejszym procesem – reorientacją O\*H\*, która jest procesem dyfuzyjnym. Ruch układu odniesienia, który stanowi grupa O\*H\* uwzględnia **rozszerzony model przeskoku (EJM, ang. extended jump model)** zaproponowany przez Laage'a i Hynesa.

Symulacje MD wykonane przez Laage'a i Hynesa [115] pokazały, że im mocniejsze wiązanie wodorowe, tym mniejszy jest kąt bryłowy zataczany przez wektor tlen-wodór  $\mathbf{u}_{OH}$  jak również mniejsza jest amplituda tego ruchu wahadłowego. Ponadto udowodnili oni, że na dłuższą skalę czasową kształt krzywej opisującej zanik wiązań wodorowych nie zależy od mocy wiązania wodorowego. Na początku zdefiniujemy czasową funkcję korelacji:

$$C_n^{OH}(t) = \langle P_n[\mathbf{u}_{OH}(0)\mathbf{u}_{OH}(t)] \rangle \quad (3.1.17)$$

gdzie:

$P_n$  – wielomian Legendre'a n-tego rzędu, definiowany następująco

$$P_n(x) = \frac{1}{2^n} \sum_{i=0}^{\lfloor \frac{n}{2} \rfloor} (-1)^i \binom{n}{i} \binom{2n-2i}{n} x^{n-2i}. \quad (3.1.18.)$$

$\mathbf{u}_{OH}$  – wektor wzdłuż kierunku obracającego się wiązania OH (w układzie laboratoryjnym)

W rozszerzonym modelu przeskoku (EJM) tą funkcję korelacji możemy przedstawić jako iloczyn dwóch innych funkcji korelacji

$$C_n^{OH}(t) = \langle P_n[\hat{\mathbf{u}}_{OH}(0)\hat{\mathbf{u}}_{OH}(t)] \rangle \langle P_n[\mathbf{u}_{OO}(0)\mathbf{u}_{OO}(t)] \rangle \quad (3.1.19)$$

gdzie:

$\hat{\mathbf{u}}_{OH}$  – wektor wzdłuż kierunku obracającego się wiązania OH (względem osi  $O^*O^a$ )

$\mathbf{u}_{OO}$  – wektor wzdłuż osi  $O^*O^a$  (w układzie laboratoryjnym)

Powyższym funkcjom korelacji można przypisać odpowiednie stałe czasowe:

$\tau_n^{OH}$  - czas spadku wykładniczego (czas po którym funkcja wykładnicza maleje  $e$  razy, gdzie  $e$  – liczba

Napiera) dla czasowej funkcji korelacji związanej z wektorem  $\mathbf{u}_{OH}$

$\tau_n^{jump}$  - czas spadku wykładniczego dla czasowej funkcji korelacji związanej z wektorem  $\hat{\mathbf{u}}_{OH}$

$\tau_n^{OO}$  - czas spadku wykładniczego dla czasowej funkcji korelacji związanej z wektorem  $\mathbf{u}_{OO}$  –

Te stałe czasowe w ramach rozszerzonego modelu przeskoku (EJM) można powiązać ze sobą poprzez równanie:

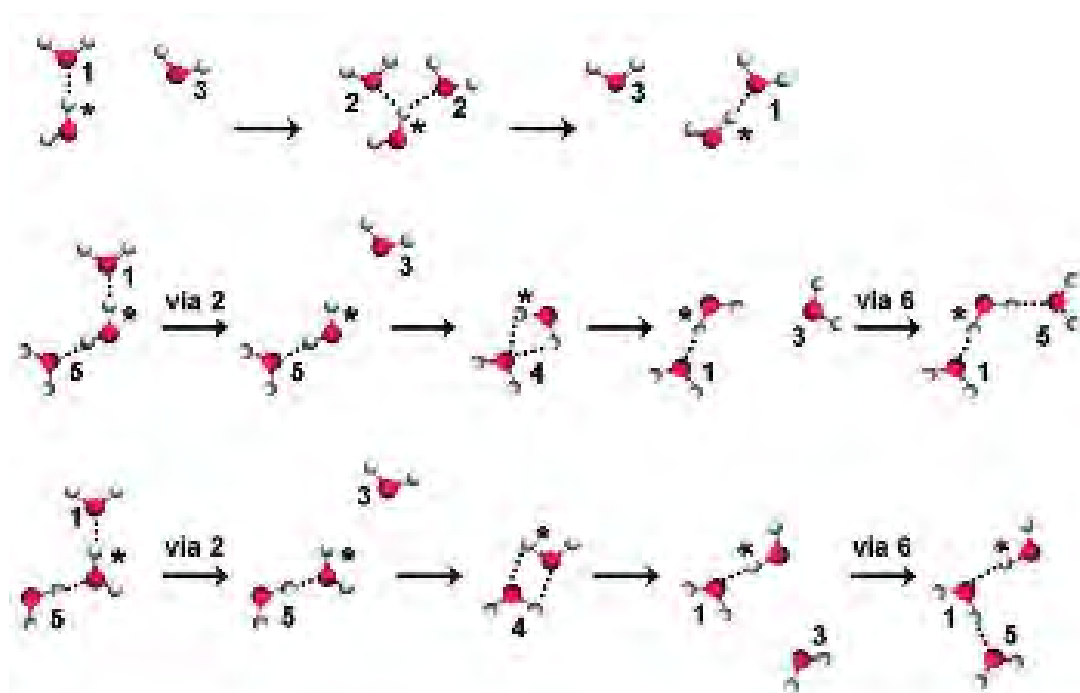
$$\frac{1}{\tau_n^{OH}} = \frac{1}{\tau_n^{jump}} + \frac{1}{\tau_n^{OO}} \quad (3.1.20)$$

Wartość  $\tau_n^{jump}$  można wyliczyć z odpowiednich parametrów modelu przeskoku Ivanova (tj. z amplitudy  $\theta_0$  i częstości przeskoków  $1/\tau_0$ ):

$$\tau_n^{jump} = \tau_0^{-1} \left[ 1 - \frac{1}{2n+1} \frac{\sin[(n+\frac{1}{2})\theta_0]}{\sin(\frac{\theta_0}{2})} \right] \quad (3.1.21)$$

Jak już zasygnalizowałem stosunek czasów  $\tau_n^{OH}$  w otoczce solwatacyjnej do czasów  $\tau_n^{OH}$  w czystej wodzie może służyć jako miara spowolnienia ruchów w warstwie solwatacyjnej (czyli wspomniany przeze mnie **współczynnik spowolnienia**, ang. *retardation factor*) [116][97]. Laage i wsp. [116] za pomocą symulacji MD wykonali obliczenia tego współczynnika dla otoczki solwatacyjnej tlenu trimetyloaminy (TMAO), w pobliżu grupy metylowej i uzyskali oni wartość  $\sim 1,5$ , co obaliło hipotezę Rezusa i Bakker'a o immobilizacji cząsteczek wody przez grupy metylowe [117]. Było to o tyle istotne, że teoria Rezusa i Bakker'a „przywracała do życia” model „górlodowych” Franka i Evansa. Rozszerzony model przeskoku został potwierdzony eksperymentalnie przez Laage'a dzięki badaniom kwazielastycznego rozpraszania neutronów (QENS) [118].

Badania Henchmana i Irudayama [18] pokazały, że mechanizm zaproponowany przez Laage i Hynesa (tzw. **przełączenie pojedyncze**) jest tylko jednym z 4 możliwych scenariuszów (Rys. 3.1.15). Pomimo tego stanowi ono główny sposób rearanżacji wiązania wodorowego. Jak widać odbywa się ono bez konieczności zrywania wiązania wodorowego (dla którego  $R_{OH} \approx 0,18$  nm;  $\beta_{HB} \approx 0^\circ$ ) w celu utworzenia nowego wiązania z **wodą międzywęzłową** (tj. wodą, która nie tworzy wiązań wodorowych z cząsteczką wody odniesienia dla której  $R_{OH} \approx 0,34$  nm;  $\beta_{HB} \approx 55^\circ$ ) i które nie posiada żadnego wiązania wodorowego z wodorem przed przełączeniem. Pierwszy akceptor staje się cząsteczką wody międzywęzłowej poprzez stan z **rozwidlonym wiązaniem wodorowym**, podczas gdy drugi akceptor staje się cząsteczką tworzącą wiąz. wodorowe z cząsteczką odniesienia. Podobne zjawisko zostało zaobserwowane w lodzie. „Zmienność liczby akceptorowych cząsteczek wody jest kluczowa aby ten mechanizm miał możliwość zajścia - liczba akceptorowa pierwszego akceptora zmniejsza się o jeden, a liczba drugiego akceptora zwiększa się o jeden”, co jednocześnie oznacza, że „zmienna liczba akceptorów nie byłaby możliwa bez tych rodzajów przełączeń” [18]. Przełączenia pojedyncze są prawdopodobnie szczególnie częste wówczas gdy najbardziej dostępna cząsteczka wody międzywęzłowej znajduje się w pobliżu donującego wodoru [18].



**Rys. 3.1.15.** Sposoby rearanżacji wiązania wodorowego. U góry rearanżacja poprzez przełączenie pojedyncze; na środku poprzez przełączenie podwójne z „rozwidlonym tlenem”; na dole rearanżacja poprzez przełączenie podwójne cykliczne. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [18].

Innymi sposobami rearanżacji wiązania wodorowego są **podwójne przełączenie** (ang. *double switching*) oraz **odwrócone przełączenie** (ang. *reverse switching*) w których zachodzi

zerwanie wiązania wodorowego i zmiana wiązania wodorowego pomiędzy tymi samymi dwoma cząsteczkami wody, w podobny sposób jak to obserwujemy z dimerami w fazie gazowej. Wśród podwójnych i odwróconych przełączeń możemy wyróżnić dwa typy: przełączenia cykliczne i przełączenia z „rozwidlonym tlenem”. Dla **przełączenia z „rozwidlonym tlenem”** (tj. gdy tlen akceptuje wiąz. wodorowe od dwóch atomów wodoru jednej cząsteczki wody) dwa wodory wody przełączają miejsca na tym samym akceptorze. Cząsteczka akceptująca wodór (z cząsteczki donora) przestaje być cząsteczką tworzącą wiąz. wodorowe z cząsteczką otoczenia, a staje się wodą międzywęzłową; zaś akceptor innego wodoru cząsteczki donorowej przestaje być **wodą „tetraedryczną”** (tzn. cząsteczką wody tworzącą inne wiązania wodorowe z wodą donującą wodór lub akceptującą tlen dla której  $R_{HO} \approx 0,32 \text{ nm}$ ;  $\beta_{HB} \approx 105^\circ$ ), a staje się wodą tworzącą wiąz. wodorowe z cząsteczką odniesienia poprzez dimer z „rozwidlonym tlenem”, a jeszcze inne cząsteczki wody przestają być „międzywęzłowe”, a stają się „tetraedryczne” w celu zaakceptowania innego wodoru donującej wody. Jeżeli cząsteczka najbardziej dostępnej wody międzywęzłowej znajduje się w pobliżu innego atomu wodoru cząsteczki donora aniżeli atomu wodoru donującego wówczas prawdopodobieństwo zajścia przełączenia z „rozwidlonym tlenem” jest najprawdopodobniej szczególnie wysokie [18].

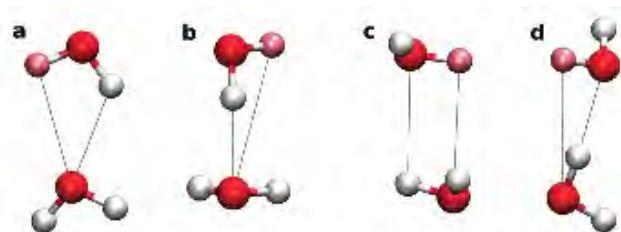
W trakcie **przełączeń cyklicznych** zachodzi zmiana kierunku wiązania wodorowego pomiędzy dwiema cząsteczkami wody (Rys. 3.1.15d). Cząsteczka akceptująca atom wodoru donora przestaje być cząsteczką tworzącą wiązanie wodorowe z cząsteczką odniesienia, a staje się wodą „międzywęzłową” jak wcześniej, ale w tym samym, czasie inna woda donująca do donora przestaje być wodą „tetraedryczną”, a staje się cząsteczką tworzącą wiązanie wodorowe z cząsteczką odniesienia poprzez dimer cykliczny, i inny akceptor przestaje być wodą „międzywęzłową”, a staje się wodą tworzącą wiązanie wodorowe poprzez zaakceptowanie swobodnego wodoru akceptora zmienionego w donora. Przełączenie cykliczne występuje zapewne szczególnie często wówczas gdy cząsteczka najbardziej dostępnej wody międzywęzłowej znajduje się w pobliżu obu atomów cząsteczki donującej. Dla obu rodzajów podwójnych przełączeń, „**dyndające” atomy wodoru** poprzedzają i następują po **dimerach z „rozwidlonym tlenem”** bądź **dimerach cyklicznych** [18].

Zamiast przedstawionych powyżej scenariuszów może zajść sytuacja, że oba typy intermedatów (intermediat z „rozwidlonym” tlenem, bądź intermediat cykliczny) powracają do swoich początkowych konfiguracji. Właśnie taką rearanżację wiązania wodorowego określa się jako przełączenie odwrócone (ang. *reverse switch*). Zachodzi ono wówczas gdy w pobliżu

wyjściowego akceptora nie znajduje się dla cząsteczki donującej wiązanie wodorowe żaden „lepszy” akceptor [18].

Przełączenia pojedyncze wiążą się z koniecznością pokonania przez cząsteczkę wody większego dystansu, jednak to że zachodzi ono  $\sim 4x$  częściej niż przełączenie podwójne i odwrócone razem wzięte, sugeruje że przełączenie bezpośrednio do cząsteczki wody międzywęzłowej wiąże się z pokonaniem mniejszej bariery energetycznej (co z kolei tłumaczy się mniejszym kątem przemieszczenia i mniejszą liczbą przełączeń wiązania wodorowego) aniżeli w przypadku przełączenia podwójnego bądź odwrotnego. Ponieważ jest bardziej prawdopodobnym że przynajmniej jedna międzywęzłowa woda znajdzie się wokół jednego z trzech innych wodorów przełączenia podwójne są ponad dwa razy tak częste jak przełączenia odwrócone, z kolei zaś przełączenia cykliczne pojawiają się około dwa razy tak często jak przełączenia z „rozwidlonym tlenem” ponieważ akceptor ma dwa razy tyle konkurujących ze sobą wodorów jak donor [18].

Definicja topologiczna wiązania wodorowego wykorzystana przez Henchmana i Irudayama [18] pozwoliła na wyróżnienie czterech (wspomnianych już przeze mnie mimochodem) intermedatów w trakcie zrywania wiązań wodorowych: **symetrycznych i asymetrycznych** dimerów z „rozwidlonym tlenem” oraz symetrycznych i asymetrycznych dimerów cyklicznych (Rys. 3.1.16).



**Rys. 3.1.16.** Typy umiarkowanie stabilnych intermedatów pojawiających się w trakcie rearanżacji wiązania wodorowego poprzez przełączenie podwójne lub odwrotne. a) intermedat z symetrycznym „rozwidlonym tlenem”, b) z asymetrycznym „rozwidlonym tlenem”, c) symetryczny intermedat cykliczny, d) asymetryczny intermedat cykliczny. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [18].

Jako dimery asymetryczne określa się te dimery w których „wiązanie wodorowe” jest dość naprężone. Wyniki Henchmana i Irudayama wskazują, że nie istnieją żadne wysokoenergetyczne intermedaty dla przełączeń pojedynczych (ang. *single switch*) ale istnieją intermedaty zerwanych wiązań wodorowych dla przełączeń podwójnych (ang. *double switch*) i odwróconych (ang. *reverse switch*) [18].

W przypadku przełączania wiązania wodorowego bariera energetyczna wynosi tylko kilka

$k_B T$  [18]. Przełączenia wiązań wodorowych odbywają się na skalę czasową zaburzonej rotacji (libracji) cząsteczki wody. Czasy życia pojedynczych i potrójnych akceptorów odpowiadają ruchowi drgającemu cząsteczki, co oznacza że te ugrupowania mają skłonność do przełączania wiązań wodorowych do którejkolwiek najbliższej cząsteczki wody [18].

Jana i wsp. [119] w wyniku analizy wyników symulacji dynamiki molekularnej pokazali, że cząsteczki wody w warstwie solwatacyjnej lizozymu, wykazują trzy różne mechanizmy pojedynczego przełączania wiązania wodorowego. Niemniej następujące własności są wspólne dla tych wszystkich trzech mechanizmów:

- i) „przeskok ( $\sim 60^\circ$ ) w trakcie przełączania wiązania wodorowego (ang. *hydrogen bond-switching event*);
- ii) nowy akceptor wiązania wodorowego, cząsteczka  $O^b H_2$ , przechodzi z drugiej otoczki koordynacyjnej ( $R_{O^a O^b} > 4,1 \text{ \AA}$ ) do pierwszej otoczki koordynacyjnej ( $R_{O^a O^b} < 3,5 \text{ \AA}$ ) donora wiązania wodorowego ( $O^* H_2$ );
- iii) stary akceptor wiązania wodorowego  $O^a H_2$ , wychodzi z pierwszej otoczki koordynacyjnej do drugiej otoczki koordynacyjnej cząsteczki donorowej w sposób dyfuzyjny;
- iv) wzrost wartości liczby koordynacyjnej starej cząsteczki akceptorowej i spadek wartości liczby koordynacyjnej nowej cząsteczki akceptorowej przed przełączeniem wiązania;
- v) wzrost liczby wiązań wodorowych przyjmowanych przez  $O^a$  i spadek liczby wiązań wodorowych przyjmowanych przez  $O^b$  przed przełączeniem”.

Analiza poszczególnych przypadków przełączania wiązania wodorowego w otocze solwatacyjnej lizozymu ujawniła, że można je podzielić na trzy kategorie [119]:

**a) I mechanizm.** Przed przełączeniem oba cząsteczki akceptorowe znajdują się początkowo w obrębie pierwszej otoczki koordynacyjnej donora i pozostają tam po przełączeniu wiązania wodorowego. Ten mechanizm przeważa w otocze hydratacyjnej białka ( $\sim 80\%$  analizowanych przypadków). Jest on wyraźną konsekwencją dwuwymiarowej sieci wody dookoła powierzchni białka. Warto zauważyć, że ruch wchodzących i odchodzących cząsteczek akceptorowych nie jest dyfuzyjny przed, a nawet po zerwaniu starego wiązania. Ograniczony ruch starego akceptora, który nie może wyjść z pierwszej otoczki koordynacyjnej donora jest konsekwencją obecności połączonej sieci wodnej na powierzchni lizozymu. Gdyby stary akceptor wyszedł z pierwszej otoczki koordynacyjnej do drugiej otoczki koordynacyjnej donora, spójność sieci wodnej dookoła białka, uległaby zniszczeniu, co jest niekorzystne zarówno pod względem energetycznym jak i entropowym. Jednocześnie, taka sieć zapobiega wejściu nowej cząsteczki akceptorowej z drugiej

otoczki koordynacyjnej.

**b) II mechanizm.** (obecny w  $\sim 10\%$  przypadków), nowa cząsteczka akceptorowa ( $O^bH_2$ ) przechodzi z drugiej warstwy koordynacyjnej do pierwszej warstwy koordynacyjnej donora. Jakkolwiek, stara cząsteczka akceptorowa ( $O^aH_2$ ) pozostaje w otoczce solwatacyjnej przed, a nawet po przełączeniu wiązania i nie opuszcza pierwszej otoczki koordynacyjnej donora po zerwaniu wiązania.

**c) III mechanizm** (obecny w  $\sim 10\%$  przypadków). Obie cząsteczki akceptorowe znajdują się początkowo w pierwszej otoczce koordynacyjnej donora, ale ostatecznie, stary akceptor wychodzi z pierwszej warstwy koordynacyjnej po zerwaniu wiązania.

### 3.1h. Rola wody w fałdowaniu się białek

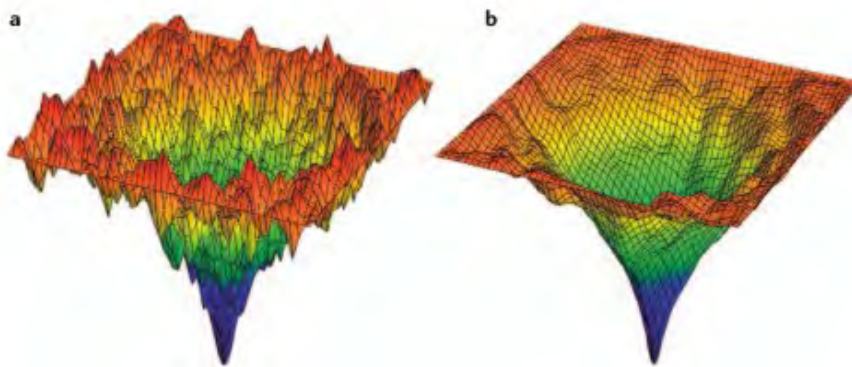
W warunkach fizjologicznych białka przechodzą spontaniczne przejście ze stanów charakteryzujących się większym nieuporządkowaniem, zwanych **stanami rozfałdowanymi (zdenaturowanymi)** D, do unikalnego stanu charakteryzującego się większym uporządkowaniem nazywanym **stanem natywnym** (N; ang. *native*). Do niedawna uważano, że to oddziaływania pomiędzy łańcuchami bocznymi w sekwencji aminokwasowej są w pierwszym rzędzie odpowiedzialne za konformacyjne różnice pomiędzy białkami ponieważ szkielety peptydowe pod względem chemicznym nie różnią się między sobą. Jednakże ostatnio coraz bardziej popularny jest pogląd, że to właśnie szkielet peptydu jest w pierwszym rzędzie odpowiedzialny za sposób w jaki białka się fałdują, ponieważ wiązania wodorowe w peptydzie i pomiędzy peptydami dominują w tym procesie.

Proces fałdowania możemy przedstawić w postaci równania  $D \rightleftharpoons N$ , ze stałą równowagi  $K_{eq} = [N]/[D]$ , której odpowiada różnica entalpii swobodnych  $\Delta G_{conf}^0 = -RT \ln K_{eq}$  i zazwyczaj jej wartości mieszczą się w zakresie pomiędzy  $-20$  a  $-60 \text{ kJ mol}^{-1}$  [120]. Aby móc wyjaśnić fałdowanie się białek trzeba było się zmierzyć przede wszystkim z tzw. **paradoksem Levinthala**, który to postawił pytanie jak to jest możliwe, że rozfałdowany łańcuch polipeptydowy po znalezieniu się w warunkach sprzyjających sfałdowaniu, który może próbować ogromną ilość możliwości w przestrzeni konformacyjnej znajduje natywną konformację w realnym czasie biologicznym [120]. Po pierwsze okazało się, że ilość dostępnych konformacji nie jest tak wielka, chociażby dlatego, że wiązanie peptydowe ma częściowo charakter wiązania podwójnego, i stąd sześć atomów szkieletu w jednostce peptydowej ( $-C_{\alpha}-CO-NH-C_{\alpha}-$ ) przynajmniej w dużym stopniu leży w jednej

płaszczyźnie [120][3]. W konsekwencji mamy do czynienia z mniejszą liczbą konformacji co przejawia się chociażby w tym, że każda jednostka peptydowa charakteryzuje się tylko dwoma głównymi stopniami swobody, które można przedstawić w postaci dwóch kątów dwuściennych:  $\varphi$  i  $\psi$ . Dozwolone dla danej jednostki peptydowej kąty  $\varphi$  i  $\psi$  można przedstawić na tzw. **wykresie Ramachandrana**. Ponadto okazało się, że **hipoteza izolowanych par (Flory'ego)** jest w ogólności błędna, co oznacza że sytuacja, że dana para kątów dwuściennych ( $\varphi, \psi$ ) jest niezależna od innej pary tych kątów w danym peptydzie nie zawsze jest spełniona z powodu zaważ sterycznych jakie potencjalnie mogą mieć miejsce, wskutek czego np. konformacja  $\beta$  nie może następować bezpośrednio po  $\alpha$ -helisie. Proces fałdowania się białka można przedstawić myślowo w postaci tzw. **leja fałdowania** (ang. *foldng funnel*), gdzie proces ten rozpoczyna się od sytuacji charakteryzującej się wysoką entropią (tzn. stanem nieuporządkowanym bez oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych np. wiązań wodorowych pomiędzy tlenem karbonylowym a azotem amidowym) zobrazowanej w postaci szerokiej górnej krawędzi leja, a kończy się na niskoentropowym uporządkowanym stanie przedstawianym w postaci spustu (Rys. 3.1.15). Podobnie jak w przypadku kulki toczącej się wskutek działania pola grawitacyjnego białko „staczające” się z góry na dół fałduje się napędzane dążeniem do zminimalizowania wartości swojego potencjału chemicznego, czyli ujemną wartością entalpii swobodnej fałdowania. Do niedawna uważano, że kształt tego leja zależy od sekwencji aminokwasowej [120]. Ponieważ jednak okazało się m. in. że, podczas reakcji fałdowania białka D $\rightleftharpoons$ N sposób działania zarówno tzw. **osmolitów ochronnych** (ang. *protectng osmolytes*) np. tlenku trimetyloaminy (TMAO) jak i **denaturantów** np. mocznika nie zależy od sekwencji aminokwasowej (ich działanie ogranicza się przede wszystkim do szkieletu peptydowego) jak i istnienie tzw. **hierarchii strukturalnej** (ang. *structural hierarchy*), która oznacza, że w procesie fałdowania najpierw tworzy się rusztowanie w postaci dobrze zdefiniowanych struktur drugorzędowych takich jak prawoskrętne  $\alpha$ -helisy, helisy  $3_{10}$ , helisy PII,  $\beta$ -nici,  $\beta$ -warstwy,  $\beta$ -zwroty i  $\beta$ -szpilki [120][3]. Dawniej sądzono, że uwodnione krótkie peptydy o mniej niż 10 resztach tworzą przypadkowe struktury drugorzędowe fluktuujące pomiędzy różnymi konformacjami sfałdowanymi, a konformacjami przypominającymi **kłębek przypadkowy**, jednak obecnie wiemy, że nawet bardzo krótkie peptydy mogą preferować pewne kąty dwuścienne jak np. sprzyjające konformacjom PII i  $\beta$  w przypadku krótkich polimerów alaninowych [3]. Struktury drugorzędowe bez istotnych zmian tworzą większe elementy np. struktury  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\beta\alpha\beta$ , te z kolei tworzą struktury wyższego rzędu itd; w wyniku tego liczba stabilnych domen jest ograniczona do kilku tysięcy. Po „ustawieniu rusztowań” ma też miejsce kolejno **relaksacja łańcuchów bocznych**, **uwolnienie rozpuszczalnika** i dalsze **uszywnianie struktury**. Hierarchia ta również nie zależy w istotny sposób od łańcuchów bocznych peptydu. **Teoria mechanizmu fałdowania zależnego od szkieletu**



(ang. *backbone-based theory of protein folding*) zakłada, że **konformacja białka** a **stabilność białka** to dwa różne zagadnienia. Jak pisze Rose i wsp. [120] - „*Natywna konformacja może wciąż zostać osiągnięta podczas działania wysoce destabilizujących warunków, które jedynie przesuwiają równowagę  $D \rightleftharpoons N$ , bądź w kierunku  $N$  bądź  $D$ , ale nie w kierunku  $N^*$  tj. alternatywnego stanu sfalowanego*). (...) *Łańcuchy boczne mają za zadanie wybrać odpowiednią konformację z ograniczonego zestawu konformacji szkieletu:  $\alpha$ -helisy,  $\beta$ -nici, zwrotów i pętli.*„ Konformacja zależy więc od szkieletu peptydowego, zaś jej stabilność od sekwencji i warunków otoczenia. Teoria ta uwzględnia ponadto, że konformacja natywna jest unikalna, zaś fałdowanie odwracalne i w jego trakcie nie ulegają zerwaniu żadne wiązania kowalencyjne, zaangażowane są jedynie słabe oddziaływania jak wiązania wodorowe. Ponieważ można sobie wyobrazić, że powierzchnia leja fałdowania jest poszarpana powstaje pytanie jak białka unikają „uwięzienia” w metastabilnych stanach. Z punktu widzenia teorii fałdowania opartego na szkielecie peptydowym tylko kilka tysięcy stabilnych domen jest możliwych, co radykalnie zmniejsza prawdopodobieństwo „uwięzienia” w lokalnym minimum energetycznym. Równie istotne jest to, że w przypadku gdy białko znajduje się w wodzie, cząsteczki rozpuszczalnika powodują obniżenie barier energetycznych pomiędzy energetycznymi minimami wygładzając w ten sposób lej fałdowania (Rys. 3.1.17).

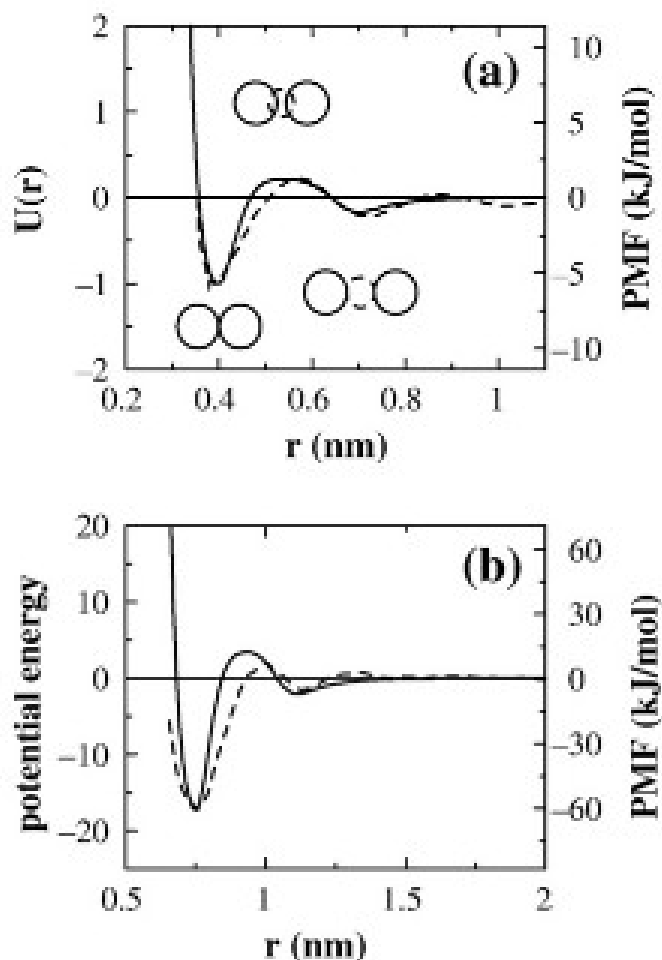


**Rys. 3.1.17.** Schemat leja fałdowania białka. Po lewej stronie białka w próżni (a), po prawej tego samego białka uwodnionego (b). Rysunek pochodzi z [13].

Czynniki stabilizujące białko w trakcie fałdowania muszą skompensować główny czynnik destabilizujący, którym jest **entropia konformacyjna** wynikająca z tego, że w stanie zdenaturowanym możliwość obrotów wielu wiązań w białku jest zwiększona w porównaniu ze stanem natywnym [121]. Entropię konformacyjną można zobrazować poprzez szerokość leja fałdowania [122]. Obecnie nie do końca jest jasne co bardziej sprzyja stabilności danej konformacji – **efekt hydrofobowy**, wynikający ze schowania grup niepolarnych, czy też **tworzenie się**

**wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych** w białku [120]. Wyniki badań przeprowadzonych przez Pace i wsp. [121] wskazują na te wiązania wodorowe oraz na schowanie grup polarnych są decydujące w stabilizowaniu określonej konformacji. O ile bowiem schowanie grup niepolarnych generalnie stabilizuje stan natywny, to również co jest mniej oczywiste schowanie grup polarnych również może stabilizować białko jeśli tylko w białku istnieje odpowiednie miejsce do umieszczenia takiej grupy tzn. gdy ma miejsce korzystne oddziaływanie elektrostatyczne, wiązanie wodorowe bądź oddziaływanie van der Waalsa [121]. Natomiast Harano i Kinoshita [123][124] (do czego skłaniają się także Brovchenko i Oleinikova [70]) podtrzymują pogląd, że **efekt hydrofobowy** jest główną przyczyną fałdowania się białek wskutek zwiększenia się entropii translacyjnej wody (ang. *translational-entropy gain*), która przed sfałdowaniem znajdowała się wokół grup hydrofobowych. Gdy dwa duże segmenty hydrofobowe zaczynają się stykać, wykluczone (ang. *excluded*) objętości nakładają się na siebie i całkowita objętość dostępna dla ruchu postępowego niewielkich cząsteczek wody zwiększa się. Białka są stabilizowane również przez **oddziaływania ładunek-ładunek** w tym **mostki solne (pary jonowe)**, które definiuje się zazwyczaj jako przeciwnie naładowane grupy na powierzchni białka znajdujące się w odległości mniejszej niż 0,5 nm. Liczba ukrytych mostków solnych w jakimkolwiek białku jest zbyt mała aby mogły mieć one jakiś znaczący wpływ na jego stabilność, ale mogą stanowić one dominującą siłę w próżni oraz w rozpuszczalniku niepolarnym. W przypadku rozpuszczalników niepolarnych wkład do stabilizacji białka pochodzący z grup polarnych jest wzmocniony, zaś wkład schowania grup niepolarnych zmniejszony [121]. **Efekt hydrofobowy** jest w przypadku białka znajdującego się w wodzie ciężkiej wzmocniony w porównaniu z białkiem w wodzie lekkiej, co wynika z silniejszych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami D<sub>2</sub>O [125]. W próżni oraz w rozpuszczalniku niepolarnym **efekt hydrofilowy**, czyli schowanie grup polarnych stanowi główny czynnik stabilizujący polipeptyd. Z powyższego wynika, że peptydy mogą pozostawać sfałdowane w próżni, zwłaszcza gdy w nim nie występują silne oddziaływania elektrostatyczne mogące spowodować jego rozfałdowanie [121] np. Kohtani i wsp. [126] pokazali, że niezsolwatywany polipeptyd Ac-A<sub>15</sub>K+H<sup>+</sup> pozostaje niemal zupełnie helikalny aż do temperatury przynajmniej 450 °C, chociaż peptyd jest niemal zupełnie zdysocjowany. Zarówno rozważania teoretyczne, symulacje komputerowe jak i wyniki eksperymentów wskazują na istnienie odpowiednio **barier desolwatacji/solwatacji** w procesach fałdowania/rozfaldowania białek. „*Bariery desolwatacji w fałdowaniu białek wynikają ze skończonych*”, niewielkich „*rozmiarów cząsteczek wody i najkrócej mówiąc można je widzieć jako skutek asynchronii pomiędzy odejściem wody a tworzeniem się oddziaływań wewnętrznych. Innymi słowy, cząsteczki wody wymagają wyłączenia z obszaru pomiędzy zbliżającymi się do siebie segmentami białka zanim bliski kontakt zostanie osiągnięty.*”

Gdy patrzymy z perspektywy rozfałdowywania białka, bariera związana z wodą może być postrzegana jako wynikająca z asynchronii pomiędzy penetracją wody i rozpadem wewnętrznych oddziaływań w białku, i stąd określa się ją jako barierę solwatacji” [128]. Na wykresie energii potencjalnej jako funkcji odległości pomiędzy dwoma rozpatrywanymi cząsteczkami/segmentami hydrofobowymi bariera solwatacji/desolwatacji może zostać przedstawiona w postaci garbu pomiędzy dwoma minimami (Rys. 3.1.18) [129].



Rys. 3.1.18. Efektywny potencjał z barierą desolwatacji. a) Energia potencjalna bariery desolwatacji dla dwóch cząsteczek metanu uzyskana przy użyciu uśrednionego pola siłowego „udającego wodę” (ang. *implicit water*) podana poprzez wyrażenie na energię potencjalną solwatacji (linia ciągła), która została wyrażona w jednostkach głębokości minimum energii ( $-\epsilon$ ) jako funkcja odległości pomiędzy środkami dwóch cząsteczek metanu. Linią przerywaną oznaczono potencjał średnich sił (PMF) dla dwóch cząsteczek metanu symulowanych w środowisku wody TIP4P. b) Linią przerywaną oznaczono PMF uzyskany z symulacji dwóch  $\alpha$ -helis polialaninowych składających się z 20 reszt w wodzie TIP4P jako funkcja odległości między osiami tych helis, zaś linią ciągłą energię potencjalną tych helis uzyskaną z symulacji przy użyciu uśrednionego pola siłowego „udającego wodę”. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [129].

Od wysokości barier solwatacji/desolwatacji w dużym stopniu zależy szybkość fałdowania się białek [129][130]. Trzeba podkreślić, że choć bariery solwatacji/desolwatacji odpowiadają za postrzępienie krajobrazu energetycznego, to jednak raczej zwiększają, aniżeli zmniejszają kooperatywność procesu fałdowania, gdyż eliminują one możliwość zaistnienia wielu częściowo

pofałdowanych konformacji podatnych na „uwięzienie” w minimum energetycznym. Jak piszą Chan i wsp. [129]: „krajobraz energetyczny z barierami desolvatacji jest postrzępiony barierami, ale nie postrzępiony pułapkami”. Z badań przeprowadzonych przez Costasa i wsp. [130] wynika, że białka nie różniące się znacząco strukturą, a mające tę samą funkcję przynależące do różnych organizmów mogą różnić się znacząco barierami desolvatacji, co może wynikać z różnej presji ewolucyjnej w kierunku określonej stabilności kinetycznej białka, kooperatywności bądź innych czynników. Stabilność kinetyczna białka jest najprawdopodobniej bowiem *in vivo* istotniejsza od stabilności termodynamicznej [130].

### 3.1i. Parametry uporządkowania

Podsumowując możemy powiedzieć, że:

- 1) cząsteczki wody odgrywają aktywną rolę biologiczną;
- 2) aktywność biologiczna cząsteczek wody w stosunku do białek przejawia się w najrozmaitszy sposób;
- 3) właściwości biologiczne białka silnie zależą od rozpuszczalnika, zmiany w rozpuszczalniku znajdują odzwierciedlenie w zachowaniu się białka;
- 4) rozpuszczalnik ułatwia fałdowanie białka i wpływa na stabilność określonych konformacji;
- 5) białko także wpływa na rozpuszczalnik;
- 6) właściwości dynamiczne wody wynikają z jej właściwości strukturalnych;
- 7) pojęcie „struktury ciekłej wody” jest ściśle związane z tym jak daleko jej struktura odbiega od struktury lodu Ih, a więc od struktury z idealnie tetraedrycznym ułożeniem cząsteczek i sześciokątnymi pierścieniami; a także od stopnia „granularności” tj. od wielkości i kształtu agregatów;
- 8) istnieje wciąż wiele znaków zapytania jeśli chodzi o strukturę i dynamikę wody zwłaszcza tej wokół biocząsteczek, a proponowane wyjaśnienia mają często tylko charakter krótkotrwałych hipotez.

Można się więc zapytać czy istnieje miara, która w sposób ścisły, a jednocześnie w sposób łatwy do wyjaśnienia jest w stanie określić uporządkowanie wody? Celem Chaua i Hardwicka [1] było stworzenie parametru uporządkowania, który byłby użyteczny w opisie różnych kwazitetraedrycznych konfiguracji wody. Byłoby to szczególnie użyteczne dla analizy wyników dynamiki molekularnej i symulacji Monte Carlo. Zdaniem autorów parametr opisujący

uporządkowanie powinien się charakteryzować następującymi właściwościami:

- 1) „Parametr powinien przyjmować jedną określoną ustaloną wartość optymalną jeśli wiązania są ułożone regularnie tetraedrycznie.
- 2) Ta optymalna wartość nie może zostać uzyskana przy jakimś innym ułożeniu wiązań.
- 3) Wartość optymalna musi być granicą zakresu wartości jakie parametr może przyjmować. Pozwala to na obliczenie tego parametru jako średniej dla rozważanego układu bez ryzyka, że ta uzyskana średnia równa wartości dla ułożenia tetraedrycznego będzie tylko i wyłącznie wynikiem uśredniania, dając złudne wrażenie tetraedryczności.
- 4) Wartość tego parametru musi być niezależna od ruchu postępowego i obrotowego całego rozważanego układu. Musi zależeć jedynie od orientacji wiązań względem siebie.
- 5) Czym mniejsze jest ułożenie tetraedryczne, tym bardziej parametr powinien odbiegać od wartości optymalnej, i zmiany powinny być ciągłe. Umożliwia to porównywanie ułożeń, które nie są idealnie tetraedryczne.
- 6) Pożądane jest, by ten parametr był szybki do wyliczenia przy użyciu komputerów.”

Chau i Hardwick zaproponowali parametr S składający się z dwóch członów: członu kąтового  $S_g$  i członu odległościowego  $S_k$ . Te dwie części są zawsze rozważane oddzielnie.

#### a) człon kątowy parametru tetraedryczności, $S_g$

Jako taki parametr Chau i Hardwick zaproponowali znormalizowaną sumę kwadratów różnic pomiędzy kosinusami kątów pomiędzy wiązaniami wewnątrz czworościanu a kosinusem kąta wewnątrz czworościanu, gdyby wiązania były ułożone idealnie tetraedrycznie, wynoszącym  $(-1/3)$ . Stąd zaproponowany parametr można wyrazić wzorem:

$$S_g = \frac{3}{32} \sum_{j=1}^3 \sum_{k=j+1}^4 \left( \cos \psi_{j,k} + \frac{1}{3} \right)^2 \quad (3.1.22)$$

gdzie:  $\Psi_{j,k}$  jest kątem znajdującym się naprzeciwko atomu centralnego pomiędzy j-tym, a k-tym wiązaniem. Czynniki  $3/32$  normalizuje wartość  $S_g$  do zakresu  $\langle 0,1 \rangle$  (wartości łatwe do zapamiętania), zaś podniesienie do kwadratu zapewnia, że wkład od każdego rozważanego kąta wewnątrz czworościanu jest zawsze większy lub równy 0 (spełnienie warunków: 2., 3. i 5.). Stąd  $S_g$ , które jest sumą wkładów pochodzących od sześciu kątów, jest równe zero tylko wówczas gdy kosinusy wszystkich kątów wynoszą  $(-1/3)$  tzn. gdy wszystkie wiązania są ułożone ściśle tetraedrycznie (spełnienie warunków 1. i 2.). Ponadto,  $S_g$  przyjmuje maksymalną wartość, równą jedności dla całkowicie nietetraedrycznego ułożenia, gdzie wszystkie wiązania się na siebie nakładają (*vide* warunek 5.).

Ponieważ średnia wartość  $\langle S_g \rangle$  dla przypadkowo ułożonych wiązań, z nieskorelowanym jednolitym rozkładem kątów wynosi  $1/4$  [1], niekiedy zamiast czynnika normalizacyjnego  $3/32$  stosuje się czynnik normalizacyjny  $3/8 = (3/32:1/4)$  [131].

**b) człon odległościowy parametru tetraedryczności,  $S_k$**

Ten człon jest definiowany poprzez równanie:

$$S_k = \frac{1}{3} \sum_{k=1}^4 \frac{(r_k - \bar{r})^2}{4\bar{r}^2} \quad (3.1.23)$$

gdzie:  $r_k$  „jest odległością pomiędzy atomem centralnym a  $k$ -tym atomem peryferyjnym,  $\bar{r}$  - jest średnią arytmetyczną z czterech odległości radialnych, zaś  $1/3$  to czynnik normalizacyjny. Fizycznie,  $S_k$  jest właśnie miarą różnicowania odległości radialnych od atomu centralnego do atomów peryferyjnych. Dla perfekcyjnego tetraedru,  $S_k$  wynosi 0. Czym konfiguracja jest mniej tetraedryczna,  $S_k$  zwiększa wartość, i osiąga maksimum równe 1.” [1]

W praktyce często bierze się pod uwagę nie parametry  $S_g$  i  $S_k$ , lecz parametry  $(1-S_g)$ ,  $(1-S_k)$ , tak aby wraz ze wzrostem tetraedryczności wzrastała wartość parametru. Czasami w literaturze można się jeszcze spotkać z następującą serią parametrów określających tetraedryczność:

$$Q_l \equiv \sqrt{\frac{4\pi}{N(2l+1)} \sum_{m=-l}^l \left| \sum_{j=1}^N Y_l^m(\theta_j, \varphi_j) \right|^2} \quad (3.1.24)$$

np.

$$Q_6 \equiv \sqrt{\frac{4\pi}{13} \sum_{m=-6}^6 |\bar{Y}_{6m}|^2} \quad (3.1.25)$$

gdzie:  $N$  oznacza liczbę „wiązań”,  $Y_l^m(\theta, \varphi_j)$  jest sferyczną harmoniczną (np.  $\bar{Y}_{6m}$  oznacza średnią względem wszystkich wiązań), zaś  $\theta_j$  i  $\varphi_j$  są współrzędnymi kątowymi cząsteczki związanej przez  $j$ -te „wiązanie” w odniesieniu do atomu centralnego, przy czym  $1 \leq j \leq N$ . Np. parametr  $Q_3$  przyjmuje wartość  $\sqrt{5}/3$  gdy cztery cząsteczki dookoła cząsteczki centralnej tworzą czworościan foremny, jednak wartość tego parametru równa  $\sqrt{5}/3$  nie gwarantuje, że mamy do czynienia z czworościanem foremnym, a więc warunek 2. nie jest spełniony, co podkreśla wadę tego parametru jako miary konfiguracji tetraedrycznej. Wartość  $Q_6$  jest zaś miarą tego w jakim stopniu układ przybliżył się do układu regularnego ściennie centrowanego; w przypadku idealnego kryształu  $Q_6 \approx 0,575$ .

Typ parametru uporządkowania translacyjnego dla sieci układu regularnego ściennie centrowanego zaproponował Torquato i wsp. [132]. Jest on zdefiniowany następująco:

$$T = \left| \frac{\sum_{i=1}^{N_c} (n_i - n_i^{ideal})}{\sum_{i=1}^{N_c} (n_i^{fcc} - n_i^{ideal})} \right| \quad (3.1.26)$$

„gdzie  $n_i$  (dla rozważanego układu) wskazuje średnią liczbę obsadzenia otoczek o grubości  $a\delta$  znajdującej się w pewnej odległości od kuli odniesienia, który jest równy separacji do najbliższego  $i$ -tego sąsiada dla otwartej sieci układu regularnego ściennie centrowanego o tamtej gęstości, a jest odległością do najbliższych sąsiadów dla sieci ściennie centrowanej, zaś  $N_c$  jest całkowitą liczbą warstw. Natomiast  $n_i^{ideal}$  i  $n_i^{fcc}$  są liczbami obsadzenia otoczki odpowiednio dla gazu doskonałego (przestrzennie nieskorelowane kule) i otwartej sieci krystalicznej ściennie centrowanej. W przypadku gazu doskonałego mamy  $T=0$  (doskonała przypadkowość), zaś dla idealnego ułożenia sieci ściennie centrowanej  $T=1$ ” [132].

Innym często spotykanym parametrem używanym do opisu uporządkowania w wodzie [131][133] jest **parametr uporządkowania translacyjnego**  $t$  [131]:

$$t = \frac{1}{\xi_c} \int_0^{\xi_c} |g_{OO}(\xi) - 1| d\xi \quad (3.1.27)$$

gdzie: „ $\xi = r\sigma^{1/3}$  jest odległością pomiędzy atomami tlenu pary cząsteczek  $r$  podzieloną przez średnią odległość pomiędzy parą cząsteczek przy danej gęstości,  $\sigma^{1/3}$ ;  $\sigma$  oznacza gęstość liczbową ( $=N/V$ ;  $N$  – liczba cząsteczek wody,  $V$  – objętość układu);  $g_{OO}$  jest funkcją rozkładu radialnego tlen-tlen; zaś  $\xi_c$  to promień obcięcia” (np. w pracy [131] przyjęto wartość 2,843). „W gazie doskonałym  $g=1$  i  $t=0$ ; natomiast w kryształach mamy do czynienia z dalekosiężnym translacyjnym uporządkowaniem, i  $g \neq 1$  w zakresie dalekich odległości i stąd wysoka wartość parametru  $t$ ”. Wartość bezwzględna zapewnia, że zarówno dodatnie jak i ujemne odchylenia od  $g_{OO}(\xi)$  wnoszą ten sam wkład do wartości parametru  $t$ .

Stopień korelacji pomiędzy parametrami uporządkowania orientacyjnego, a translacyjnego zależy m. in. od temperatury. Np. w niższych temperaturach gdy wiązania wodorowe określają zarówno wzajemne orientacje jak i odległości pomiędzy cząsteczkami np. zmiana ciśnienia powoduje określoną zmianę zarówno translacyjnego jak i orientacyjnego parametru uporządkowania, natomiast w temperaturach wyższych ta korelacja ulega osłabieniu i zwiększeniu się wartości parametru  $S_g$  podczas ściskania cieczy nie musi towarzyszyć zmniejszenie się wartości parametru  $t$  [131].

## 3.2. Charakterystyka analizowanych peptydów

### 3.2.1. Peptydy zawierające reszty Gly, Ala, Ser

W stanie sfałdowanym mechanicznymi właściwościami białek rządzą oddziaływania van der Waalsa i wiązania wodorowe. Te drugie są główną siłą stabilizującą drugorzędową strukturę białek. W helisach wiąz. wodorowe tworzone są pomiędzy grupami N-H reszty i i atomami tlenu z grupy C=O w reszcie i+n, gdzie n = 3, 4, 5 lub 6. Te cztery liczby odpowiadają czterem różnym helikalnym konformacjom oznaczanym jako: **helisa 3<sub>10</sub>** (co oznacza 3 reszty na obrót helisy i 10 atomów w pierścieniu tworzonym przez wiązania wodorowe; skok co 0,20 nm; prawoskrętna *in vivo*), helisę 3,6<sub>13</sub> zwaną częściej **helisą α** (gdzie skok następuje co 0,54 nm; prawoskrętna), helisę 4,4<sub>16</sub> (**helisę π**; skok co 0,115 nm; prawoskrętna), helisę 6<sub>19</sub> (**helisę λ**) [134]. **Helisa π** staje się najbardziej hydrofilowym konformerem jedynie w zakresie, który nie jest istotny biologicznie (ponad 15 reszt) [135]. Stąd **helisy π** stanowią tylko 0,02% reszt w białkach odgrywają one jednak pewną rolę w fałdowaniu białek [136]. Son i wsp. [137] zaobserwowali w symulacjach MD i obliczeniach *ab initio* nowy typ helisy w peptydzie polialaninowym w postaci cwiterjonu, który nazwali **helisą λ** (formalnie helisą 6<sub>19</sub>). Autorzy sugerują, że ta helisa może odgrywać ważną rolę w fałdowaniu białek w środowiskach niepolarnych i w próżni. **Helisa PII** to lewoskrętna helisa kształtem przypominająca trójkątną pryzmę w której ok. 3 reszty przypadają na obrót; jest to sterycznie wymuszona konformacja dla poliproliny, aczkolwiek peptydy nie zawierające proliny mogą także przyjmować tę konformację [138][136]. Skok tej helisy wynosi 0,93 nm [136]. W przypadku helisy PII nie mamy do czynienia z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi.

α-helisy stanowią ok. 1/3 reszt znajdujących w białkach [136]. Peptydy alaninowe są znane z wysokiej skłonności do tworzenia struktur helikalnych przy czym skłonność ta zależy również od temperatury. Kemp i wsp. [139] stwierdzili, że skłonność do tworzenia helisy α w temperaturze 2 °C można uszeregować następująco: Pro<<Gly<His<Cys,Thr,Asn <Ser<Tyr,Phe,Trp <Val,Asp <Lys<Gln<Ile <Arg,Met<Leu<Glu<Ala; natomiast w temp. 60 °C szereg ten zmienia się na następujący:His,Pro<Gly<Cys<Arg,Lys<Thr,Tyr,Phe<Asn,Val<Ser<Gln<Trp,Asp<Ile,Met<Glu<Ala<Leu. W temperaturze 2 °C reszty aminokwasowe Thr, Asn, Ser, Tyr, Phe, Trp, Val, Asp, Gln są resztami silnie niesprzyjającymi strukturze α-helikalnej (ang. *helix-breakers*), natomiast w temp. 60 °C ich niesprzyjanie stabilności struktury helikalnej ulega znacznemu zmniejszeniu [139]. α-helisa okazała się być strukturą stanowiącą globalne minimum energetyczne dla peptydów Ace-Ala<sub>n</sub>-NMe w wodzie, gdzie n=8, 12, 16, lub 19. Ponadto, jak wynika z rezultatów symulacji



dynamiki molekularnej helisy  $\alpha$  w przeważającej ilości obserwowano w przypadku peptydów polialaninowych składających się z 15 lub 20 reszt [8]. Tworzeniem  $\alpha$ -helisy alaninowej kieruje korzystna zmiana entalpii, wynikająca z tego, że wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe w  $\alpha$ -helisie pomiędzy grupami  $-C=O$  a  $-NH$  są bardziej korzystne od wiązań wodorowych tych grup z wodą. Zysk entalpowy przeważa nad kosztem entropowym pochodzącym od spadku wartości entropii konformacyjnej peptydu [140]. **Prawdopodobieństwo helikalne** (ang. *helical probability*) określonej reszty bądź wiązania wodorowego jest miarą częstości z którą poszczególne reszty lub wiązania wodorowe znajdują się w konformacji helikalnej (przyjmując odpowiednie wartości kątów  $\phi$  i  $\psi$  w pierwszym przypadku, bądź określony układ wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w drugim przypadku). Prawdopodobieństwa helikalne odnoszone do wiązań wodorowych wskazują, że: N-koniec polialaniny o długości 15 reszt w postaci cwiterjonu jest znacznie mniej helikalny od pozostałych reszt, zaś C-koniec tego peptydu jest nieco mniej helikalny od reszt w środku łańcucha. W przypadku polialaniny zbudowanej z 15 reszt, ale z zabezpieczonymi końcami (N-końcem zabezpieczonym grupą acylową i C-końcem zabezpieczonym grupą amidową) obserwuje się w przypadku reszt terminalnych znaczne zwiększenie helikalności. Zarówno dla polialaniny w postaci cwiterjonu, jak i dla polialaniny z zabezpieczonymi końcami prawdopodobieństwo helikalne odniesione do reszty spada w kierunku C-końca, przy czym w przypadku reszty z zablokowanymi końcami utrzymuje się ono na stałym poziomie w środku peptydu, co wskazuje że N-koniec jest najbardziej prawdopodobnym miejscem dla nukleacji  $\alpha$ -helisy [141]. Na oddziaływania które stabilizują  $\alpha$ -helisy składają się **oddziaływania pomiędzy terminalnymi ładunkami i makrodipolem helisy**, **oddziaływania kapujące** (ang. *helix capping*), **mostki solne**, **oddziaływania Phe-His**, **oddziaływania hydrofobowe**, **oddziaływania jonowe** oraz **wiązania wodorowe łańcuchów bocznych** jak też sama **nukleacja tworzenia helisy** [142].

W próżni polialanina wykazuje silną preferencję dla stanu  $\alpha$ -helikalnego, natomiast w próżni poliglicyna pozostaje uwięziona w lokalnych minimach energetycznych stabilizowanych przez wiązanie wodorowe pomiędzy  $(CO)_{i-1}$ , a  $(NH)_{i+1}$  [6]. Kohtani i wsp. [126] pokazali, że niezsolwotowany polipeptyd  $Ac-Ala_{15}Lys+H^+$  pozostaje niemal zupełnie helikalny aż do temperatury przynajmniej 450 °C, gdzie peptyd jest niemal zupełnie zdysocjowany. Jeśli chodzi o peptyd w formie globularnej ( $Ac-LysAla_{15}+H^+$ ) dysocjacja następuje w temperaturze ok. 340 °C. W obu przypadkach dysocjacja następuje od C-końca. Fakt, że helisa utrzymuje się do temperatury ok. 450 °C wskazuje, że połączone wkłady oddziaływań niekowalencyjnych, które stabilizują konformację helikalną przekraczają energię wiązania kowalencyjnego. Dodatkowo, oprócz sieci

wiązań wodorowych, helisa Ac-LysAla<sub>15</sub>+H<sup>+</sup> jest stabilizowana przez C-terminalną lizynę poprzez oddziaływania zwane "kapującymi" (ang. *capping interactions*), gdzie sprotonowana amina z lizynowego łańcucha bocznego tworzy wiązania wodorowe z dyndającymi grupami C=O na C-końcu helisy) i przez oddziaływania pomiędzy ładunkiem, a makrodipolem helisy, gdyż równoległe ułożenie zarówno grup aminowych jak i karbonylowych każdej reszty stanowiącej  $\alpha$ -helisę prowadzi do powstania momentu dipolowego (makrodipola) z częściowym ładunkiem dodatnim na N-końcu i częściowym ujemnym na C-końcu [126][127][143].

Przypuszczalnie, odczepienie łańcucha bocznego lizyny od C-końca jest kluczowym etapem w inicjacji dysocjacji [126][127], co jednak stoi w sprzeczności z tym, że peptydy AcAla<sub>n</sub>+H<sup>+</sup> są helikalne, co mogłoby oznaczać że lizyna na C-końcu nie jest konieczna do bezpośredniego tworzenia helisy, wystarczy zacylowanie N-końca [144]. **Oddziaływania N-kapujące** polegają na tym, że, że reszty takie jak Asp, Asn, Ser, Cys i Thr, oraz grupa acylowa Ac (ang. *N-cap*; znajdujące się tuż przed pierwszą resztą przyjmującą strukturę helikalną zwaną N1) akceptują wiązanie wodorowe pochodzące z grupy -NH trzeciej reszty przyjmującej konformację helikalną (N3); analogicznie definiuje się **oddziaływania C-kapujące**, gdzie reszta znajdująca się poza strukturą helikalną od C-końca (ang. *C-cap*) tworzy wiązanie wodorowe z grupą karbonylową z obszaru helikalnego [145][146]. Motywy C-kapujące  $\alpha$ -helis są często stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe pomiędzy resztami helikalnymi, a resztami na zewnątrz powtarzających się struktur czego przykładem może być **prolinowy motyw C-kapujący** [136].

Konformacja peptydów w próżni silnie zależy od rozmieszczenia ładunku; odpowiednio umieszczone ładunki na końcach stabilizują helisy w próżni [141]. Ponieważ globularne fragmenty peptydowe (Ac-LysAla<sub>15</sub>+H<sup>+</sup>) utrzymują się do znacznie niższej temperatury aniżeli helikalne Ac-Ala<sub>15</sub>Lys+H<sup>+</sup>, wskazuje na to, że helikalna konformacja może stabilizować peptyd Ac-A<sub>15</sub>K+H<sup>+</sup> i zapobiegać jego fragmentacji. Dysocjacja helikalnego Ac-Ala<sub>15</sub>Lys+H<sup>+</sup> i okazuje się być blisko związana z przerwaniem helisy w symulacjach dynamiki molekularnej [126][127]. Dodatni ładunek (taki jak sprotonowana terminalna amina) na końcu N  $\alpha$ -helis może oddziaływać niekorzystnie z dodatnim końcem makrodipola helisy (którym jest także N-koniec) destabilizując strukturę  $\alpha$ -helikalną [141][144]. Z tego powodu niezsolwatowane peptydy Ac-Ala<sub>15</sub>Lys+H<sup>+</sup> (ale już nie peptydy AcGly<sub>n</sub>Lys+H<sup>+</sup>) w temperaturze pokojowej są niemal całkowicie helikalne, natomiast niezsolwatowane peptydy Ac-LysAla<sub>15</sub>+H<sup>+</sup> w temperaturze pokojowej przyjmują **strukturę globularną** [126][127]. Podobnie za destabilizujące uważa się ujemne ładunki na C-końcu [141]. Eksperymenty w środowisku wodnym pokazały, że reszty z ujemnie naładowanymi łańcuchami

bocznymi mogą stabilizować helisę, gdy znajdują się na N-końcu. Grupy acetylowe i aminowe umieszczone na N- i C-końcach nie tylko neutralizują ładunki na tych końcach, ale również działają jako dodatkowe grupy donorowe i akceptorowe wiązań wodorowych, a więc stabilizują na dwa sposoby (poprzez oddziaływania kapujące i makrodipol-ładunek).

**Prolina** redukuje konformacyjne stopnie swobody w pierwszej pętli helisy, pomagając zabezpieczyć dość ruchliwy N-końiec, tak by tworzył strukturę  $\alpha$ -helikalną i oba te substytucje (tj. usunięcie ładunków poprzez dodanie grupy acylowej i amidowej oraz dodatek proliny zwiększają skłonność do tworzenia helisy [141].

Badania Goddarda III i Parka [143] wskazują, że oddziaływania dipol-makrodipol w obrębie  $\alpha$ -helisy stabilizują je wraz ze wzrostem ich długości. Są one bardziej osłabiane przez wpływ rozpuszczalnika niż oddziaływania ładunek-makrodipol [143]. Te oddziaływania pomagają peptydom utrzymywać strukturę  $\alpha$ -helikalną poprzez stabilizowanie każdej reszty o konformacji  $\alpha$ -helikalnej względem konformacji  $\beta$ -harmonijki i można je postrzegać jako wypadkową oddziaływań dipol-dipol pomiędzy momentem dipolowym każdej reszty z momentami dipolowymi pozostałych reszt w  $\alpha$ -helisie. Badania Goddarda III i Parka [143] wspierają wniosek, że tworzenie pierwszego obrotu  $\alpha$ -helisy jest „wąskim gardłem” jej tworzenia czyli krokiem limitującym szybkość. Oddziaływania dipol-makrodipol stabilizują więc  $\alpha$ -helisę, ale działają destabilizująco gdy reszta alaninowa na N-końcu jest w konformacji  $\beta$ . Wyjaśnia to kooperatywność procesu tworzenia się struktury  $\alpha$ -helikalnej. Po utworzeniu pierwszego obrotu  $\alpha$ -helisy, dodatkowe reszty dodane do końca  $\alpha$ -helisy stabilizują konformację  $\alpha$ -helikalną względem konformacji  $\beta$ -harmonijki z powodu oddziaływań monodipol-makrodipol. Badania eksperymentalne pokazują także, że pierwszy zwrot  $\alpha$ -helisy jest odpowiedzialny za większość oddziaływań dipol-dipol oraz ładunek-dipol pomiędzy momentem dipolowym  $\alpha$ -helisy a dipolarnymi lub naładowanymi grupami umieszczonymi na jej końcu (~80% całości); dwa pierwsze zwroty wnoszą w sumie 95% [143].  $\alpha$ -Helisa polialaninowa ma niższą liczbę wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w wodzie w porównaniu z wartościami w próżni.

$\alpha$ -Helikalna struktura drugorzędowa nie pojawia się prawdopodobnie w peptydach krótszych niż 10 reszt, z absolutnym minimum 7 reszt koniecznych dla nukleacji [141]. Etap zapoczątkowania tworzenia struktury helikalnej przejawia się w tworzeniu pośredniej struktury **zwrotu** z utworzeniem zarówno helikalnych wiązań wodorowych, jak i przejściem kilku reszt w konformację  $\alpha$ -helisy. Względnie wysoka częstość z jaką obserwuje się jedno i dwa kolejne

wiązania wodorowe (i, i+4) oznacza szybkie tworzenie i dysocjację pre-helikalnych struktur ze względnie rzadkimi przypadkami nukleacji. Zakłada się, że utworzenie pojedynczego wiązania wodorowego (i, i+4) z trzema nieterminalnymi resztami o "helikalnych" wartościach kątów dwuosiennych to wystarczająca definicja nukleacji helisy; aczkolwiek, obecne symulacje wskazują, że nawet dwa helikalne wiązania wodorowe mogą się tworzyć bez utraty entropii związanej z tworzeniem przez reszty wysoce uporządkowanej struktury [141]. Tworzenie się  $\alpha$ -helis tradycyjnie opisuje się za pomocą **modelu Zimma-Bragga**, zaś obecnie najczęściej poprzez **model Lifsona-Roiga i jego pochodne** (uwzględniające: ograniczenia **teorii Flory'ego o niezależnych od siebie parach kątów ( $\phi, \psi$ )**, oddziaływania „kapujące”, oddziaływania pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów, preferencje aminokwasów na N-końcu czy też oddziaływania ładunek-makrodipol helisy); przejrzysty opis tych modeli można znaleźć w publikacji Doiga [145]. Zgodnie z hipotezą Flory'ego, para kątów ( $\phi, \psi$ ) określająca konformację danej reszty jest niezależna od par kątów ( $\phi, \psi$ ) określających konformacje sąsiednich reszt [147]. Ogólnie rzecz biorąc zarówno w teorii Zimma-Bragga jak i Lifsona-Roiga posługujemy się dwoma parametrami: **parametrem inicjacji (nukleacji) helisy** („ $\sigma$ ” w teorii Zimma-Bragga i „ $v$ ” w teorii Lifsona Roiga) oraz **parametrem propagacji helisy** („ $s$ ” w teorii Zimma-Bragga i „ $w$ ” w teorii Lifsona-Roiga) [142][145]. Małe wartości stałej inicjacji prawdopodobnie wynikają z potrzeby jednoczesnego dopasowania przynajmniej 4 kolejnych reszt, aby utworzyć pierwsze wiązanie wodorowe tworzące helisę  $\alpha$  [145]. Początkowe klasyczne obliczenia wskazywały, że sekwencje polialaninowe jedynie w niewielkim stopniu są sprzyjające, z **wartościami propagacji "w"** pomiędzy 1,03 a 1,15 [148] (dla destabilizatorów helisy, ang. *helix-breakers*, wartość parametru „ $w$ ” leży w zakresie 0-1,0; zaś dla stabilizatorów helisy, ang. *helix-formers*, w zakresie 1,0-1,8 [139]). Jednakże dane eksperymentalne, dla krótkich helis wykonane w latach 90. ubiegłego wieku wskazują na wartości propagacji dla alaniny pomiędzy 1,5 a 1,8; co czyni tą resztę jednostką o najwyższej skłonności do tworzenia struktury helikalnej. Badane heteropolimery były bogate w alaninę, ale zawierały również N-terminalną grupę acetylową (bądź N-terminalną sekwencję oznaczaną jako N-cap) oraz reszty hydrofilowe (zwykle lizynę bądź argininę) dodane w celu zapewnienia rozpuszczalności. Stąd Scheraga i wsp. [149] przypisali tą niespodziewaną helikalność takich krótkich peptydów hydrofilowym łańcuchom bocznym, co miało skutkować desolwatacją szkieletu peptydu, a więc pośrednio miało sprzyjać tworzeniu się wiązań wodorowych spinających helisę. Jednakże ostatnie badania przeprowadzone przez Lina i wsp. [148] z zastosowaniem tzw. klatki tryptofanowej na C-końcu umożliwiły badanie sekwencji polialaninowych bez konieczności dodawania na N-końcu N-terminalnej grupy acetylowej, bądź "N-kapującej". Badania te potwierdziły, że wysoka skłonność alaniny do propagacji helisy, jest samoistną właściwością alaniny wbrew sugestiom Scheraga'i i

wsp. [149] (uzyskana wartość wsp. propagacji  $w=1,62\pm 0,11$ ) [148]. W pozycjach wewnątrz helisy, reszta alaninowa jest uważana za najbardziej stabilizującą  $\alpha$ -helisę resztę, podczas gdy reszta glicynowa, zaraz po prolinowej za najbardziej destabilizującą  $\alpha$ -helisę [144]. Reszta alaninowa stabilizuje konformację helikalną względem reszty glicynowej z trzech powodów:

1) z obniżonej bariery desolvatacji w czasie fałdowania. W trakcie fałdowania w przypadku reszty alaninowej schowaniu "przed rozpuszczalnikiem" ulega mniejsza część powierzchni polarnej niż w przypadku glicyny (w stanie rozfałdowanym grupy  $-\text{CH}_3$  z reszty alaninowej bardziej osłaniają grupy  $-\text{C}=\text{O}$  i  $-\text{NH}$  przed wpływem wody aniżeli atomy  $-\text{H}$  z reszty glicynowej). A więc zerwaniu ulega mniejsza liczba wiązań wodorowych peptyd-woda, co pociąga za sobą mniejszy koszt entalpowy. Wpływ tego zjawiska na ogólną stabilizację  $\alpha$ -helisy przez Ala względem Gly wynosi  $\sim 50\%$ .

2) ze zwiększonego efektu hydrofobowego w przypadku alaniny. Wiadomo, że dla małych cząsteczek hydrofobowych istnieje liniowa zależność pomiędzy obszarem powierzchni cząsteczkowej a entalpią swobodną przeniesienia cząsteczki z wody do rozpuszczalnika hydrofobowego (która oczywiście z przeciwnym znakiem jest równa entalpii swobodnej przeniesienia cząsteczki z rozpuszczalnika hydrofobowego do wody; *vide*: Równ 3.1.2). Ponieważ włączenie reszty alaninowej do  $\alpha$ -helisy powoduje zazwyczaj schowanie większego obszaru niepolarnego niż w przypadku reszty glicynowej pozwala założyć, że istnieje korelacja pomiędzy schowaniem względnej powierzchni niepolarniej (w przypadku mutacji alaninowych i glicynowych umiejscowionych w danej pozycji helikalnej), a stabilnością określonej konformacji peptydu. Udział w stabilizacji  $\sim 35\%$ .

3) różnica w entropii konformacyjnej szkieletu pomiędzy helisą zawierającą resztę alaninową, a glicynową (wbrew powszechnym mniemaniom) tłumaczy tylko pozostałe  $\sim 15\%$ . [150][144].

Rozwijanie się  **$\alpha$ -helisy alaninowej** jest przyspieszone w środowisku wodnym w porównaniu do próżni, natomiast  **$\alpha$ -helisy serynowej** spowolnione. Cząsteczki wody osłabiają rozfałdowywanie helisy serynowej poprzez "przechwytywanie" grup hydroksylowych z łańcuchów bocznych, które to w próżni mają skłonność do tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy grupą OH łańcucha bocznego z grupą  $\text{C}=\text{O}$  trzeciej lub czwartej poprzedzającej reszty przyspieszając w ten sposób rozwijanie [6].  $\alpha$ -Helisy poliserynowe są dodatkowo stabilizowane przez **mostki wodne**

tworzone przez dwie cząsteczki wody pomiędzy dwoma grupami hydroksylowymi pochodzącymi z łańcuchów bocznych; atom tlenu hydroksylowego charakteryzuje się bowiem silną skłonnością do tworzenia wiązań wodorowych z rozpuszczalnikiem [11][6].

We **zwrotach** w odróżnieniu od helis kąty dwuścienne definiujące konformację charakteryzują się znaczną tolerancją; aby nie nastąpiło pomieszanie pojęć zakłada się, że centralne reszty zwrotu (tj.  $i+1$  oraz  $i+2$  dla  $\beta$ -zwrotu) nie mogą być helikalne ani nie mogą tworzyć  $\beta$ -harmonijki.  **$\beta$ -zwrotami** (ang.  *$\beta$ -turn*) określa się struktury w których atomy  $C_\alpha$  dwóch reszt oddzielonych od siebie przez trzy wiązania peptydowe znajdują się w niewielkiej odległości od siebie ( $<0,7$  nm). Wyróżnia się kilkanaście rodzajów  $\beta$ -zwrotów w zależności od przyjmowanych wartości kątów  $\phi$  i  $\psi$ .  $\beta$ -zwroty są bardzo częste i odpowiadają w przybliżeniu za 25-30% reszt znajdujących w białkach [136]. W przypadku peptydów z zabezpieczonymi końcami (Ace- $A_n$ -NMe) pojawia się więcej  $\beta$ -zwrotów niż w przypadku polialaniny w postaci cwiterjonu, przy czym ten efekt obserwowany jest właściwie tylko dla reszt w pobliżu N- bądź C-końca [8].

Helisy  $3_{10}$  stanowią ok. 4% reszt znajdujących w białkach [136]. Eksperymenty wykonane na peptydach bazujących na alaninie wskazują, że w tych cząsteczkach tworzy się struktura helisy  $3_{10}$ , zwłaszcza na N- i C-końcach  $\alpha$ -helis [145][136]. Również w białkach helisa  $3_{10}$  często pojawia się na końcach [127], co jest skutkiem tego, że ma tam miejsce mniejsze osłanianie od wpływu rozpuszczalnika przez łańcuchy boczne i/lub sąsiednie regiony szkieletu peptydowego, co pozwala na zwiększone oddziaływanie pomiędzy peptydem, a środowiskiem wodnym. Reszty terminalne tak więc znajdują się w lokalnym środowisku, które różni się od tego co znajduje się bliżej środka peptydu, a więc nie ma nic dziwnego w tym, że pojawia się tzw. efekt końca [135]. Helisy te mogą też stanowić łączniki pomiędzy dwoma  $\alpha$ -helisami, często stanowią one też pętle w  $\beta$ -spinkach (ang.  *$\beta$ -hairpin*) oraz  $\beta$ -zgięciach (ang.  *$\beta$ -corner*) [136]. Ponadto współistnienie, zarówno formy  $\alpha$  i  $3_{10}$  ma miejsce w przypadku krótkich peptydów opartych na alaninie; w odcinkach helikalnych w białkach i peptydach  $<6$  reszt helisa  $3_{10}$  konkuruje z helisą  $\alpha$  [145][127][151] co wspiera tezę, że helisy  $3_{10}$  stanowią intermediaty (formy pośrednie) w fałdowaniu (jak też w rozfałdowywaniu)  $\alpha$ -helis, a więc przejścia pomiędzy wiązaniami wodorowymi ( $i, i+3$ ) a ( $i, i+4$ ) stanowią ważny mechanizm rozwijania/zwijania  $\alpha$ -helisy [136][6]. Wiązania wodorowe pomiędzy resztą  $i$ , a resztą  $i+3$  stabilizują mniejsze polimery, gdzie odpychające oddziaływania kulombowskie są silniejsze [152]. Warto zauważyć, że inicjacja helisy  $3_{10}$  wymaga dopasowania trzech reszt, o 1 mniej niż w przypadku  $\alpha$ -helisy. Tak więc, można się spodziewać, że stała nukleacji w przypadku helisy  $3_{10}$  będzie o rząd wielkości większa niż w przypadku helisy  $\alpha$ , co ma pokrycie w rzeczywistości [153].

W próżni helisa  $3_{10}$  jest stabilniejsza niż helisa  $\alpha$ , wbrew wcześniejszym wyliczeniom dynamiki molekularnej [151] (co jest prawdą także w przypadku obojętnych peptydów polialaninowych z zabezpieczonymi końcami [127]). W helisie  $\alpha$ , wiązania wodorowe  $-N-H\cdots O=C-$  są niemal równoległe do osi helisy, natomiast w helisie  $3_{10}$  są nieco przechylone [145]. Symulacje wykonane przez Ireta'ę i wsp. [134] wskazują, że przechylenie grup  $C=O$  nie wynika z hydratacji, lecz jest samoistną własnością peptydu. Z tego też powodu jak również dlatego, że oddziaływania van der Waalsa pomiędzy kolejnymi obrotami nie są tak korzystne w helisach  $3_{10}$  jak w  $\alpha$ -helisach pomimo większej liczby wiązań wodorowych około 90% z reszt znalezionych w helikalnych odcinkach białek globularnych przyjmuje konformację  $\alpha$ -helisy, a jedynie pozostałe 10 % przyjmuje konformację  $3_{10}$  [145][154]. Helisie  $3_{10}$  sprzyja środowisko hydrofilowe, co wynika z faktu, że ta konformacja pozwala na większy dostęp rozpuszczalnika do peptydu [135].

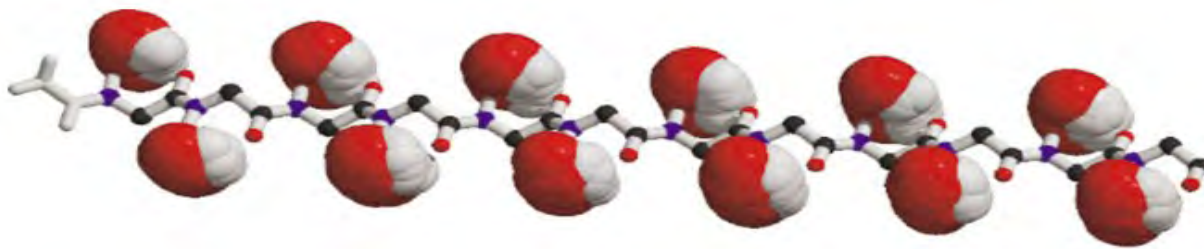
Obliczenia kwantowochemiczne przy wykorzystaniu procedury ONIOM wskazują, że w próżni strukturą geometryczną o najniższej energii spośród struktur rozfałdowanych bez wiązań wodorowych  $-N-H\cdots O=C-$  jest struktura  **$\beta$ -nici**. Ta struktura zawdzięcza część swojej stabilności cyklicznym wewnątrzcząsteczkowym **wiązaniom wodorowym C5** (ang. *cyclic C5 H-bonding interactions*), które charakteryzują się pewną wzajemną kooperatywnością [138]. Konformacja  $\beta$  pomimo, że jest stosunkowo rozciągnięta to jednak jej geometria wymusza to, że grupa amidowa N-H i karbonylowa C=O znajdują się w tej samej płaszczyźnie wskutek czego, wodór amidowy i tlen karbonylowy są mniej dostępne dla cząsteczek wody mogących z nimi tworzyć wiązania wodorowe. Konkurencja pomiędzy tlenem karbonylowym a wodorem amidowym powoduje, że cząsteczki wody mają trudności z jednoczesnym wiązaniem się do grup N-H i C=O [147]. Energie wiązań wodorowych uzyskanych przez Sheu i wsp. [155] wewnątrz  $\alpha$ -helisy wynoszą ok. 5,57 kcal/mol w fazie gazowej i ok. 1,93 kcal/mol w wodzie. W porównaniu z  **$\beta$ -harmonijką** w tej samej fazie,  $\alpha$ -helisa charakteryzuje się nieco wyższą energią wiązania wodorowego.  $\alpha$ -helisa utrzymuje podobną strukturę drugorzędową w próżni jak i w wodzie; przy czym zmniejszeniu ulega liczba wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, za to pojawiają się wiązania wodorowe z wodą [155]. Gdy  $\beta$ -harmonijka znajduje się w wodzie w porównaniu z próżnią znacznie redukuje liczbę i moc wiązań wodorowych nie-nić [155]. Badania teoretyczne ujawniły, że dla polialaniny składającej się z 12 reszt aminokwasowych,  $\alpha$ -helisa jest strukturą stabilną w próżni podczas gdy ta helikalna konformacja jest destabilizowana w środowisku wodnym, gdzie konformacja  $\beta$  okazuje się bardziej stabilnym stanem [8].  $\beta$ -harmonijka jest tworzona przez co najmniej dwie  $\beta$ -nici, tworzące między sobą wiązania wodorowe. Nici tworzące  $\beta$ -harmonijkę mogą być względem siebie ułożone równoległe, bądź antyrównoległe.  $\beta$ -harmonijka wprowadza pewną periodyczność w

ułożeniu łańcuchów bocznych, które są naprzemiennie skierowane w lewą i prawą stronę [155]. Ok. 1/5 reszt znajdujących w białkach tworzy  $\beta$ -harmonijki [136]. Badania przeprowadzone przez Fitzkee'go i Rose'a [156] ujawniły, że  $\beta$ -nić, ze względów sterycznych nie może następować po  $\alpha$ -helisie; że pomiędzy nimi musi znajdować się giętki łącznik (ang. *linker*).  $\beta$ -nici mogą także tworzyć struktury zwane  **$\beta$ -zgięciami** (ang.  *$\beta$ -corner*;  *$\beta$ - $\beta$  corner*), w których dwie kolejne  $\beta$ -nici tworzą strukturę przypominającą kształtem literę „L” [136].

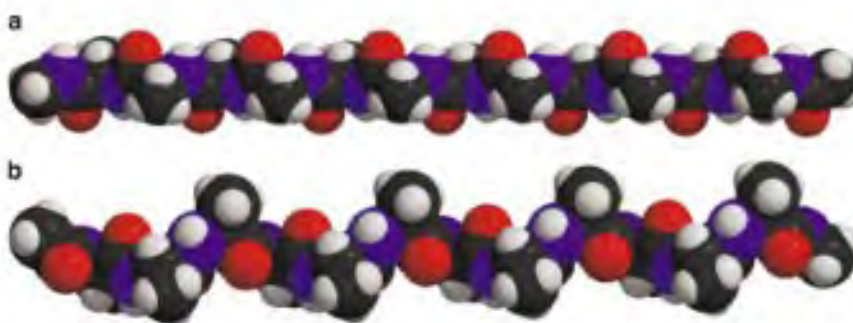
Trzecią helikalną strukturą obserwowaną (w badaniach eksperymentalnych jak i symulacjach komputerowych) zarówno w przypadku peptydów polialaninowych, jak i zawierających w przeważającej ilości reszty alaninowe jest struktura helisy poliprolinowej II (helisy PII) [138]. Skłonność alaniny do tworzenia helisy PII jest wysoka [157]. Obliczona skala do przyjmowania struktury PII wyróżnia dwie ogólne klasy: **stabilizatory PII** (ang. *formers*) – Met, Phe, Arg, Gln, Lys, Ala, Trp, Glu, His; oraz **destabilizatory PII** (ang. *nonformers*) Leu, Ser, Cys, Ile, Val, Asp, Gly, Asn, Thr [158]. Struktura PII jest zaangażowana w rozmaite procesy biologiczne jak: przekazywanie sygnałów, procesy rozpoznawania cząsteczkowego (np. wiązanie kwasów nukleinowych), transkrypcja, ruch komórek, odporność immunologiczna jak i tworzenie chorobotwórczych struktur amyloidalnych [159][160][136]. Shi i wsp. [161] stwierdzili, że PII jest dominującą konformacyjną strukturą w wodnych roztworach polialanin zbyt krótkich do tworzenia typowych helis. Półempiryczne obliczenia przy użyciu hamiltonianu AM1 ujawniły, że najbardziej optymalną rozfałdowaną strukturą polialaniny w wodzie nie tworzącą wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych  $-N-H\cdots O=C-$  jest konformacja PII co pozostaje w zgodzie zarówno z danymi eksperymentalnymi jak i teoretycznymi.

W porównaniu ze strukturami  $\beta$  helisa PII zastępuje stabilizację wynikającą z cyklicznych wiązań wodorowych C5 wiązaniami wodorowymi z wodą, jako że wszystkie akceptory (grupy  $C=O$ ) jak i donory (grupy  $N-H$ ) wiązań wodorowych są skierowane od szkieletu peptydu w stronę rozpuszczalnika [138]. Badania z użyciem jądrowego efektu Overhausera peptydów w niskich temperaturach przyjmujących strukturę PII ( $AcGly_2Ala_nGly_2NH_2$ ) pokazują, że w temp. 40 °C helisa PII ulega rozfałdowaniu, co wskazuje na to, że wyższych temperaturach mamy do czynienia z większym udziałem konformacji  $\beta$  [162]. Symulacje MD oktaalaniny pokazały, że mostkujące cząsteczki wody stabilizują PII względem  $\beta$  [163][136].





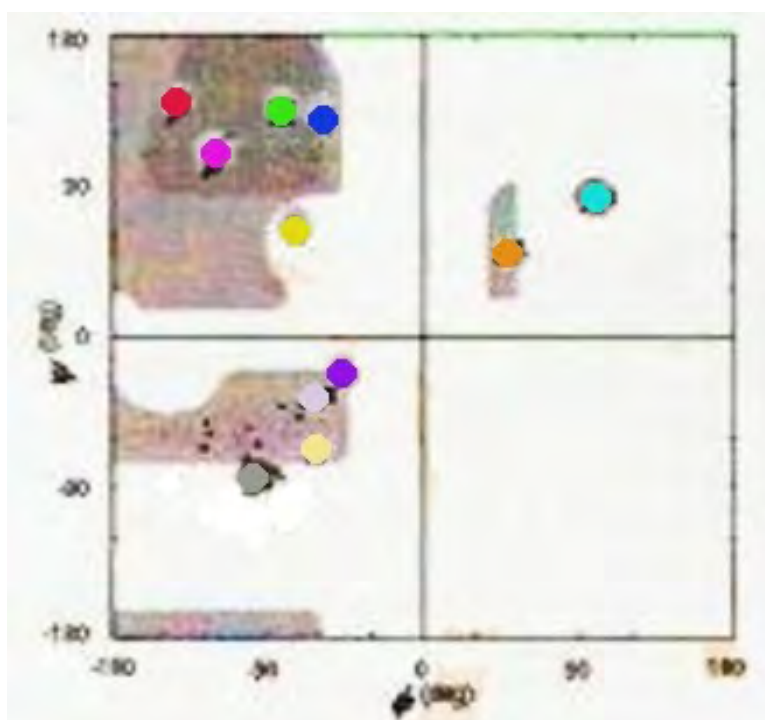
**Rys. 3.2.1.1.** Woda tworzy łatwo mostki z  $\beta$ -niciami. Rysunek przedstawia nić antyrównoległą (model kulkowo-szkieletowy; przedstawiono tylko atomy szkieletu; kolor czerwony – tlen, kolor niebieski – azot, kolor czarny - węgiel) na którą nałożono na siebie 911 „migawek” mostkujących cząsteczek wody (atom tlenu – kolor czerwony, atom wodoru – kolor biały) z wielokrotnych symulacji Monte Carlo. Mostki wodne są dynamiczne i krótkotrwałe, ale „sumując” je względem czasu wyraźnie widać ugrupowania, podwójnie połączone wiązaniami wodorowymi z każdym peptydowym karboksamidem. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [164].



**Rys. 3.2.1.2.** Mostki wodne w przypadku polialaniny są niedopasowane do geometrii helisy PII, ale pasują do geometrii  $\beta$ -nici. W  $\beta$ -niciach, atomy tlenu karbonylowego znajdują się na wypukłej powierzchni peptydu (a), gdzie są one dostępne dla wody; w helisie PII atomy te znajdują się na wklęsłej powierzchni peptydu (b), gdzie są one odseparowane od cząsteczek wody. Rysunek i opis pochodzą z [164].

Przez **mostek wodny** (Rys. 3.2.1.1) rozumie się cząsteczkę wody lub łańcuszek cząsteczek wody np. 2 lub 3, która/y jest podwójnie powiązana/y wiązaniami wodorowymi z peptydem; zarówno z grupą -N-H jak i -C=O [164]. Takie mostkowanie izoluje cząsteczki wody od fazy "bulk" rozpuszczalnika. Co ważne, woda może tworzyć mostki łatwo z  $\beta$ -niami, ale geometria PII jest nieodpowiednia do tworzenia takich mostków (podobnie jak  $\alpha$ -helisa) (Rys. 3.2.1.2) [164]. Atomy tlenu karbonylowych w  $\beta$ -niciach są zlokalizowane na dostępnej wypukłej powierzchni peptydu, podczas gdy tlenu karbonylowe w PII znajdują się na zajętej wklęsłej powierzchni, która ogranicza orientację cząsteczek wody. W porównaniu do PII,  $\beta$ -nici nie tylko płacą wyższą cenę w entropii rozpuszczalnika ale także otrzymują mniejszy zysk w energii rozpuszczalnika, co jest odzwierciedlone zarówno w ich zredukowanej energii oddziaływań z pierwszą otoczką rozpuszczalnika jak i w mniejszej liczbie wiązań wodorowych peptyd-woda. W gruncie rzeczy, woda jest po prostu lepszym rozpuszczalnikiem dla PII aniżeli dla  $\beta$ -nici, albo inaczej mówiąc peptyd o konformacji PII w najmniejszym stopniu zaburza strukturę wody [164][158] (czyli jest bardziej hydrofilowy). Stabilność PII w rozfałdowanych białkach jest spowodowana kombinacją

zwiększonej entropii szkieletu i zwiększonej entropii hydratacji oraz obniżonej entalpii solwatacji [164][158]. Chociaż większość entalpii solwatacji alaniny jest spowodowana oddziaływaniami C=O:woda, entalpowa preferencja dla konformacji PII w roztworze wodnym jest spowodowana hydratacją grupy N-H pochodzącej ze szkieletu [158]. Korzystna entropia łańcucha w PII przewyższa tą w  $\beta$ -niciach czy  $\alpha$ -helisach. Obliczono, że energia swobodna solwatacji sprzyja PII w porównaniu z  $\beta$ -nićmi (energia swobodna solwatacji  $\Delta A$  niższa o  $\sim 0,7$  kcal/mol/resztę), czy  $\alpha$ -helisą ( $\Delta A$  niższa o 2,7 kcal/mol/resztę) [164]. Pappu i Rose uważają, że hipoteza Flory'ego jest prawdziwa dla górnej lewej ćwierci diagramu Ramaćandrana (Rys. 3.2.1.3), gdzie poszczególne wartości pary kątów ( $\phi, \psi$ ) fluktuują wokół wartości typowych dla PII i sPII, gdzie PII oznacza helisę lewoskrętną ( $\phi, \psi$ )= $(-77,2^\circ; 145,9^\circ)$ ; zaś sPII oznacza symetryczną względem niej helisę prawoskrętną ( $-147,42^\circ; 80,94^\circ$ ).



**Rys. 3.2.1.3.** Wykres Ramaćandrana dla drugorzędowych struktur białkowych składających się z aminokwasów alaninowych. Kolorowe kółka oznaczają standardowe wartości kątów struktur drugorzędowych:  $\alpha$ -helisa prawoskrętna ( $-57^\circ, -47^\circ$ ) - kolor jasnoszary;  $\beta$ -harmonijka z nici równoległych ( $-119^\circ, 113^\circ$ ) - kolor czerwony;  $\beta$ -harmonijka z nici antyrównoległych ( $-139^\circ, 135^\circ$ ) - kolor różowy; prawoskrętna helisa  $3_{10}$  ( $-49^\circ, -26^\circ$ ) - kolor fioletowy;  $\pi$ -helisa prawoskrętna ( $-57^\circ, -70^\circ$ ) - kolor jasnożółty; struktura 2,2, ( $-78^\circ, 59^\circ$ ) - kolor ciemnożółty; lewoskrętna helisa PII ( $-79^\circ, 150^\circ$ ) - kolor zielony; kolagen ( $-51^\circ, 153^\circ$ ) - kolor niebieski; lewoskrętna  $\alpha$ -helisa ( $57^\circ, 47^\circ$ ) - kolor pomarańczowy; lewoskrętna  $\lambda$ -helisa ( $-100^\circ, -80^\circ$ ) - kolor ciemnoszary; prawoskrętna  $\lambda$ -helisa ( $100^\circ, 80^\circ$ ) - kolor jasnoniebieski. Rysunek i częściowo opis wykonany na podstawie [137].

W przypadku helisy PII, zarówno entropia łańcucha peptydowego jak i rozpuszczalnika w jego sąsiedztwie jest zmaksymalizowana [165]. Ponieważ hipoteza Flory'ego o izolowanych parach kątów ma być spełniona w tym regionie diagramu Ramaćandrana, jakkolwiek kooperatywność

powinna wynikać z oddziaływań peptyd-rozpuszczalnik, nie zaś z oddziaływań wewnątrz peptydu [163]. Nieobecność wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w helisie jest najprawdopodobniej przyczyną zarówno giętkości tej helisy jak i stabilizacji jej przez cząsteczki wody, nawet jeśli dodatkowym czynnikiem stabilności jest to, że rozciągnięte helisy PII znacząco umożliwiają swoiste oddziaływania z wodą łańcuchów bocznych [160]. Zarówno oddziaływania łańcuch:łańcuch (a więc tworzenie  $\beta$ -harmonijek i  $\beta$ -spinek) jak i łańcuch:woda sprzyjają konformacji PII w krótkich peptydach polialaninowych;  $\beta$ -spinkami (ang.  *$\beta$ -hairpin*) określa się zwroty (ale niekoniecznie  $\beta$ -zwroty!!!) łączące antyrównoległe ułożone nici, wskutek zagięcia konformacji  $\beta$  (czasami także poprzez mostki disiarczkowe) [164]. Ponadto sugeruje się, że wiązania wodorowe pomiędzy łańcuchem bocznym, a szkieletem peptydu są istotne w stabilizowaniu konformacji PII [136]. Przegląd białek z bazy PDB (Protein Data Bank) pokazuje, że helisy PII są rzadkie w natywnych białkach, aczkolwiek poszczególne reszty często przyjmują wartości kątów  $\phi$  i  $\psi$  charakterystyczne dla helisy PII [164]. Badania potwierdzają, że struktury PII dominują w stanie określanym jako kłębek (ang. *coil*) [166][167]. Jak pisze Kallenbach i wsp. [163] - „Wyniki te pokazują, że termin przejście „helisa-kłębek” jest błędnym sformułowaniem w odniesieniu do rozfałdowywania helisy alaninowej, gdyż w rzeczywistości mamy do czynienia z przejściem pomiędzy dwoma przeważnie ustrukturyzowanymi formami,  $\alpha$ -helisą i helisą PII” np. w modelowym „kłębkowym” peptydzie AcGly<sub>2</sub>XGly<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (gdzie X $\neq$ Gly) konformacja PII dominuje ze współudziałem przede wszystkim struktury  $\beta$  [168]. Jest to o tyle istotne, że „stan kłębka” obejmuje niemal 50 % wszystkich reszt stanowiących białka [136]. Antykorelacja pomiędzy skłonnością do przybierania struktury PII i  $\beta$  wspiera pogląd, że rozfałdowane białka składają się głównie z konformacji PII i  $\beta$  z niewielką domieszką zwrotów i innych struktur [168][147]. To, że helisa PII jest faworyzowana w stanie rozfałdowanym, ale nieczęsto występuje w stanie natywnym wynika najprawdopodobniej z tego, że helisy PII nie mogą tworzyć ani wewnątrz- ani międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z innymi elementami regularnej struktury drugorzędowej, stąd nie spełniają wymagań odnośnie wiązań wodorowych sfałdowanych białek [164]. Badania polialaninowych  $\beta$ -nici jak i helis PII potwierdzają, że woda chętniej solwatuje grupy C=O i N-H peptydu aniżeli hydrofobowe grupy metylowe. Ponieważ jak już, wcześniej napisałem cząsteczki wody wokół grup N-H są bardziej zlokalizowane aniżeli wokół grup C=O, zaś najbardziej korzystne miejsce gdzie wokół azotu amidowego znajduje się cząsteczka wody znajduje się w odległości 0,295 nm od tego atomu w przybliżeniu zgodnie z kierunkiem wektora N-H. Wokół tlenu karbonylowego takie dwa miejsca znajdują się w odległości  $\sim$ 0,295 nm od tego atomu [157]. Zmiana grupy metylowej do hydroksymetylowej (a więc np. zmiana alaniny do seryny) prowadzi do przerywania struktury PII w peptydzie Gly<sub>2</sub>XGly<sub>2</sub> (X $\neq$ Gly) jako wynik przerywania

hydratacji szkieletu przez pobliski łańcuch boczny. O ile np. skłonność do przyjmowania struktury  $\alpha$ -helikalnej jest spowodowana w dużej mierze wpływem łańcuchów bocznych na entropię konformacyjną szkieletu, zaś skłonność do tworzenia  $\beta$ -harmonijki jest spowodowana ochranianiem „przed rozpuszczalnikiem” szkieletu peptydu przez łańcuchy boczne to skłonność łańcuchów aminokwasowych do tworzenia konformacji PII jest ściśle związana z otoczką hydratacyjną szkieletu polipeptydowego, i może zostać obniżona wskutek „przerwania” tej otoczki przez znajdujący się w pobliżu łańcuch boczny. Podkreśla to rolę barier solwatacji w fałdowaniu i wiązaniu białek zawierających PII [158].

Krittana i wsp. [169] stwierdzili, że skłonność peptydów do przyjmowania struktury  $\alpha$ -helikalnej zależy od rozpuszczalnika. Wpływ rozpuszczalnika na preferencje aminokwasów do przyjmowania określonej struktury drugorzędowej przez białko mógłby wyjaśnić dlaczego przewidywanie struktury drugorzędowej z sekwencji aminokwasowej odnosi sukces jedynie w ~70% przypadków [145]. Eksperyment w przypadku ubikwityny wykazał, że jeśli po termicznym rozfałdowaniu dodamy np. 60% MeOH, i obniżymy temperaturę ubikwityna nie powróci do stanu wyjściowego. Pojawi się **intermediat**, który zgodnie z oczekiwaniami nie jest stabilny w wodzie (tzn. w wodzie powróci do wyjściowego stanu sfałdowanego). Jest to kolejny dowód na to, że rozpuszczalnik i rzecz jasna temperatura wpływają na stabilność określonej konformacji [170]. Struktura PII silnie zależy od rodzaju rozpuszczalnika. Konformacja PII przyjmowana przez resztę alaninową w peptydzie  $\text{AcGly}_2\text{AlaGly}_2\text{NH}_2$  jest destabilizowana przez rozpuszczalniki takie jak proste alkohole wraz ze wzrostem polarności. Jest to zgodne z hipotezą, że cząsteczki wody uczestniczą w utrzymywaniu konformacji PII [161]. Badania Nguyena i wsp. [9] z wykorzystaniem nieciągłej dynamiki molekularnej (ang. *discontinuous molecular dynamics*) peptydu  $\text{AcLysAla}_{14}\text{LysNH}_2$  przy różnych wartościach parametrów potencjału oddziaływań potwierdziły, że środowisko i temperatura mają znaczący wpływ na stabilność określonych konformacji:  $\alpha$ -helisy,  $\beta$ -struktur (włączając w to  $\beta$ -spinki i struktury przypominające  $\beta$ -harmonijkę), oraz kłębka przypadkowego (czyli *de facto* PII) w zależności od temperatury. W środowisku charakteryzującym się niewielką hydrofobowością, peptyd wykazuje dwustanowe przejście: helisa  $\alpha$  jest najbardziej stabilną strukturą w niskich temperaturach, zaś kłębek przypadkowy jest strukturą najbardziej stabilną w temperaturach wysokich. Jest to zgodne z symulacjami Monte Carlo (MC) Villa'i wsp. na  $\text{Ala}_{10}$  i  $\text{Ala}_{16}$ . Zaobserwowali oni, że helikalność dla obu peptydów była bliska 0 gdy stała dielektryczna modelowego rozpuszczalnika wynosiła 80, co odpowiada wartości dla czystej wody, i była >90 % gdy stała dielektryczna modelu wynosiła 2, co odpowiada wartości wewnątrz białka (bez efektów polaryzacyjnych rozpuszczalnika). Przy średniej sile oddziaływań hydrofobowych

Nguyen i wsp. [9] zaobserwowali, że pojawia się stan  $\beta$ -spinki, co skutkuje tym, że konformacja  $\alpha$ -helisy pojawia się w niskich temperaturach,  $\beta$ -spinka w temperaturach pośrednich, a kłębek przypadkowy w wysokich temperaturach. Przy bardzo wysokich wartościach oddziaływań hydrofobowych peptyd fałduje się według dwustanowego mechanizmu w którym różne typy  $\beta$ -struktur, włączając  $\beta$ -spinkę i struktury przypominające  $\beta$ -harmonijkę są układami najbardziej stabilnymi w niskich temperaturach a stan kłębka przypadkowego jest strukturą najstabilniejszą w wysokich temperaturach. Badania (przeprowadzone chociażby na Ala<sub>12</sub>) wskazują [9][171], że konformacji  $\alpha$ -helikalnej sprzyja środowisko hydrofobowe, zaś konformacja  $\beta$  jest bardziej stabilna w środowisku hydrofilowym. Zgodnie z tym można się spodziewać, że polialanina przyjmuje konformację  $\alpha$ -helikalną w rozpuszczalniku niepolarnym, zaś konformację  $\beta$  w wodzie. Potwierdza to fakt, że w dodatku pewnych alkoholów (np. TFE) skłonność alaniny do przyjmowania struktury helikalnej zwiększa się. Zaproponowano, że alkohol może działać na eksponowane grupy CO i NH przez zmniejszanie ich ekspozycji w stosunku do rozpuszczalnika tj. przesuując równowagę konformacyjną w kierunku bardziej upakowanych struktur takich jak  $\alpha$ -helisa. Równowagę helisę-kłębek polialaniny w kierunku konformacji  $\alpha$ -helikalnej można przesunąć poprzez wprowadzenie reszt naładowanych do sekwencji; aczkolwiek w tym przypadku skłonność do tworzenia  $\alpha$ -helisy nie powinna być wiązana ze skłonnością helikalną samej reszty alaninowej [171]. Goodwin i wsp. [wg. 172] zaobserwowali, że dodatek alkoholu zwiększa stabilność helikalnej konformacji peptydu (w porównaniu z kłębkami przypadkowymi). Zaproponowali oni, że jest to skutkiem tego iż  $\alpha$ -helisa jest bardziej zsolwatowana przez wodę niż kłębek przypadkowy, a więc dodatek alkoholu przesuwa równowagę w kierunku większej stabilności konformacji helikalnej [172][169].  $\alpha$ -helisy poliserynowe są bardziej trwałe w glikolu niż w wodzie, co wynika z tego że wówczas cząsteczki glikolu działają jako mostki łączące ze sobą dwie grupy hydroksylowe łańcuchów bocznych, które to są stabilniejsze niż mostki składające się z dwóch cząsteczek wody [11]. Przejście pomiędzy strukturami  $\alpha$ -helikalnymi a  $\beta$ -harmonijkowatymi uważa się za warunek wstępny powstawania i wzrostu zarodków włóknistych, odpowiedzialnych za chorobotwórcze działanie peptydów polialaninowych [9][10]. Peptyd AcAla<sub>7</sub>NH<sub>2</sub> w trifluoroetanie (TFE) jest  $\alpha$ -helikalny potwierdzając, że ten rozpuszczalnik promuje strukturę helikalną, co przypisuje się wzmacnianiu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych w natywnej strukturze helikalnej oraz zaburzaniu oddziaływań hydrofobowych [161][142]. Inny pogląd, mówi, że TFE działa przez przerywanie struktur(y) rozpuszczalnika stabilizujących(-ej) konformacje niesfałdowane. Te dwa poglądy można pogodzić [161][A49], i wnioskować, że: TFE destabilizuje konformację PII i równocześnie sprzyja alternatywnym strukturom powiązanim wiązaniami wodorowymi –  $\gamma$ - i  $\beta$ -zwrotom w krótkich łańcuchach i  $\alpha$ -helisom w łańcuchach wystarczająco długich do nukleacji tej helisy. Badania

przeprowadzone przez Kallenbacha i wsp. [173] na pentapeptydzie  $\text{AcGly}_2\text{AlaGly}_2\text{NH}_2$  i 11-merowym peptydzie  $\text{AcOrn}_2\text{Ala}_7\text{Orn}_2\text{NH}_2$  ujawniły, że oba te peptydy chętnie przyjmują konformację PII w wodzie, jednak w obecności rozpuszczalnika organicznego TFE konformacja pentameru zmienia się z PII do powiązanych wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi  $\gamma$ - lub  $\beta$ -zwrotów, podczas gdy łańcuch z siedmioma resztami alaninowymi tworzy  $\alpha$ -helisę [173]. Z analizy NMR wynika, że struktura  $\text{AcGly}_2\text{AlaGly}_2\text{NH}_2$  w TFE jest zbliżona do do  **$\gamma$ -zwrotu** (w którym atomy  $\text{C}_\alpha$  dwóch reszt znajdujących się w niewielkiej odległości od siebie są oddzielone dwoma wiązaniami peptydowymi), który (na co wskazuje wiele obliczeń) w próżni jest stanem o najniższej energii [161]. Wśród  $\gamma$ -zwrotów wyróżnia się dwie kategorie:  **$\gamma$ -zwroty klasyczne** oraz  **$\gamma$ -zwroty odwrotne** [136]. Detergent dodecylosiarczan sodu (SDS) stabilizuje  $\alpha$ -helisę w  $\text{AcAla}_7\text{NH}_2$  natomiast ma niewielki wpływ na  $\text{AcGly}_2\text{AlaGly}_2\text{NH}_2$  przy podobnych stężeniach. Może to wynikać z powinowactwa SDS do ładunków dodatnich w tym pierwszym. Klasyczny denaturujący kosolwent chlorowodorek guanidyny  $\text{GuHCl}$  nie ma istotnego wpływu na konformację PII  $\text{AcGly}_2\text{AlaGly}_2\text{NH}_2$ . Natomiast konformacja PII peptydu  $\text{AcAla}_7\text{NH}_2$  może być stabilizowana przez dodatek  $\text{GuHCl}$  co wskazuje, że konformacje inne niż PII mogą przechodzić w PII potwierdzając, że jest to zasadnicza konformacja peptydów rozfałdowanych w niskich temperaturach [161]. Dla pentameru  $\text{AcGly}_2\text{AlaGly}_2\text{NH}_2$  zawartość **PII** zmniejsza się w szeregu woda>metanol>etanol>2-propanol liniowo w stosunku do empirycznych skal polarności rozpuszczalnika [173]. Wyniki opierające się na dynamice molekularnej pokazują, że poliglicyna tworzy upakowane, choć nieuporządkowane globule w wodzie i nieuporządkowane kłębki w 8M moczniku [174]. Potwierdzają to badania eksperymentalne Ohnishi'ego i wsp. [149], którzy stwierdzili, że łącznik poliglicynowy wstawiony w środek heksapeptydu, gdy jest dłuższy od 9 reszt powoduje, że peptyd ten tworzy nierozpuszczalne agregaty; gdy łączniki były krótsze peptydy przyjmowały konformację rozwiniętą. Stwierdzili oni, że pomimo tego, że glicyna na najwyższą entropię konformacyjną wśród aminokwasów to hydratacja i tworzenie wiązań wodorowych ze szkieletem peptydowym może tę swobodę ograniczać [149], a więc woda w temperaturach otoczenia jest **slabym rozpuszczalnikiem** dla szkieletu peptydowego [149][174]. Pokazuje to również, że woda nie jest konieczna dla powstawania takich konformacji jak  $\alpha$ -helisa.

Kuffel i Zielkiewicz [2] badali otoczkę solwacyjną poliglicyny (a więc de facto szkieletu peptydowego) przy użyciu dynamiki molekularnej. Przy wykorzystaniu parametrów uporządkowania opartych na dwucząstkowych funkcjach korelacji oszacowali oni, że I otoczka solwacyjna tego peptydu wnosi przynajmniej 95% z całkowitego uporządkowania cząsteczek wody względem peptydu. Badania te potwierdziły także, że konformacja PII w najmniejszym

stopniu zaburza strukturę wody. Ponieważ w symulacjach dynamiki molekularnej istnieje możliwość „wyłączenia” ładunków cząstkowych na peptydzie i uzyskania w ten sposób wysoce hydrofobowych peptydów, których właściwości można porównać z właściwościami peptydów „natywnych” doszli oni do wniosku, że ładunki cząstkowe na peptydzie w niewielkim stopniu wpływają na uporządkowanie cząsteczek wody względem łańcucha poliglicynowego. Zaobserwowali oni także spowolnienie ruchu postępowego (o ~30%) i obrotowego (o ~10%) cząsteczek wody wokół różnych konformacji tego peptydu w I warstwie solwatacyjnej. Spowolnieniu ruchu postępowego i obrotowego towarzyszyło wydłużenie czasów życia wiązań wodorowych i stałych czasowych opisujących zrywanie wiązania wodorowego. Ponadto autorzy stwierdzili, że woda tworzy strukturę na przekroju poprzecznym przypominającą „nimb” znajdujący się w pewnym oddaleniu od powierzchni peptydu [2]. Za wyjątkiem poliglicyny cząsteczki wody w polipeptydach charakteryzują się określonymi preferencjami jeśli chodzi o ich umiejscowienie względem peptydu w zależności od konformacji [6].

### 3.2.2. Charakterystyka białka sbwAFP

Nazwą **białka przeciwmroźniowe** (ang. *antifreeze protein*; **AFP**) określa się białka komórkowe posiadające zdolność obniżania temperatury krzepnięcia cieczy biologicznych. Ich działanie zazwyczaj tłumaczy się ich adsorpcją do powierzchni lodu, a więc ograniczają one wzrost frontu lodu do regionów pomiędzy zaadsorbowanymi cząsteczkami białka. Z tego powodu następujący potem wzrost kryształków lodu odbywa się na zakrzywionej powierzchni międzyfazowej, i przez to staje się mniej termodynamicznie korzystny z powodu tzw. **efektu Gibbsa-Thomsona** (polegającego na tym, że przy danym ciśnieniu niewielkie kryształki topią się w niższej temperaturze niż wielkie kryształy). Trzeba podkreślić, że białka AFP nie działają w sposób koligatywny jak np. glikol tzn. obniżenie temperatury krzepnięcia nie jest proporcjonalne do stężenia i ich działanie ma charakter kinetyczny, a nie termodynamiczny co przejawia się m. in. w tym że obniżają temperaturę krzepnięcia, ale nie topnienia powodując powstanie tzw. **histerezy zamarzania** (ang. *freezing hysteresis*). Z drugiej strony białka te powodują, że niewielkie kryształki lodu topią się w wyższej temperaturze niż czysty lód (a więc umożliwiają powstanie lodu przegrzanego), czyli podwyższają temperaturę topnienia tych kryształków co określa się jako **histereza topnienia** (ang. *melting hysteresis*). Obie histerezy są przykładami **histerezy termicznej** (ang. *thermal hysteresis*) [175]. Różnicę pomiędzy równowagową („normalną”) temperaturą przejścia fazowego, a tą indukowaną przez białko określa się jako **przedział histerezy** (ang. *hysteresis gap*). Białka AFP to grupa bardzo zróżnicowanych białek pochodzących z różnych organizmów i podobieństwa pomiędzy nimi są przede wszystkim wynikiem konwergencji, a nie radiacji („wyewoluowania” z jakiegoś „pierwotnego” białka AFP). Wśród różnych organizmów zawierających AFP możemy wyróżnić dwie grupy. **Organizmy unikające zamarzania wody** (ang. *freeze-avoidant species*) potrafią zapobiegać zamarzaniu ich organizmów, jednakże działanie (czy raczej „przeciwdziałanie”) AFP może przewyciężyć wystarczająco niska temperatura, co prowadzi do wzrostu kryształków lodu i śmierci. Drugą grupę stanowią **organizmy tolerujące zamarzanie** (ang. *freeze-tolerant species*), które są w stanie przetrwać zamarzanie cieczy biologicznych i niektóre z nich wykorzystują białka AFP jako **krioprotektanty** zapobiegające zniszczeniom powodowanym przez zamarzanie, ale nie samemu zamarzaniu. Takimi białkami są tzw. **białka AFP grupy V** charakteryzujące się bardzo wysoką wartością przedziału histerezy zamarzania ( $>6^{\circ}\text{C}$  przy stężeniach rzędu  $\mu\text{mol}$ ; stąd są one określane jako **hiperaktywne**); można je znaleźć w organizmach owadów. Ich maksymalna aktywność jest 3-4 razy większa niż w przypadku białek AFP pochodzących z ryb i skorupiaków (grupy I-IV; określane jako **umiarkowanie aktywne**;



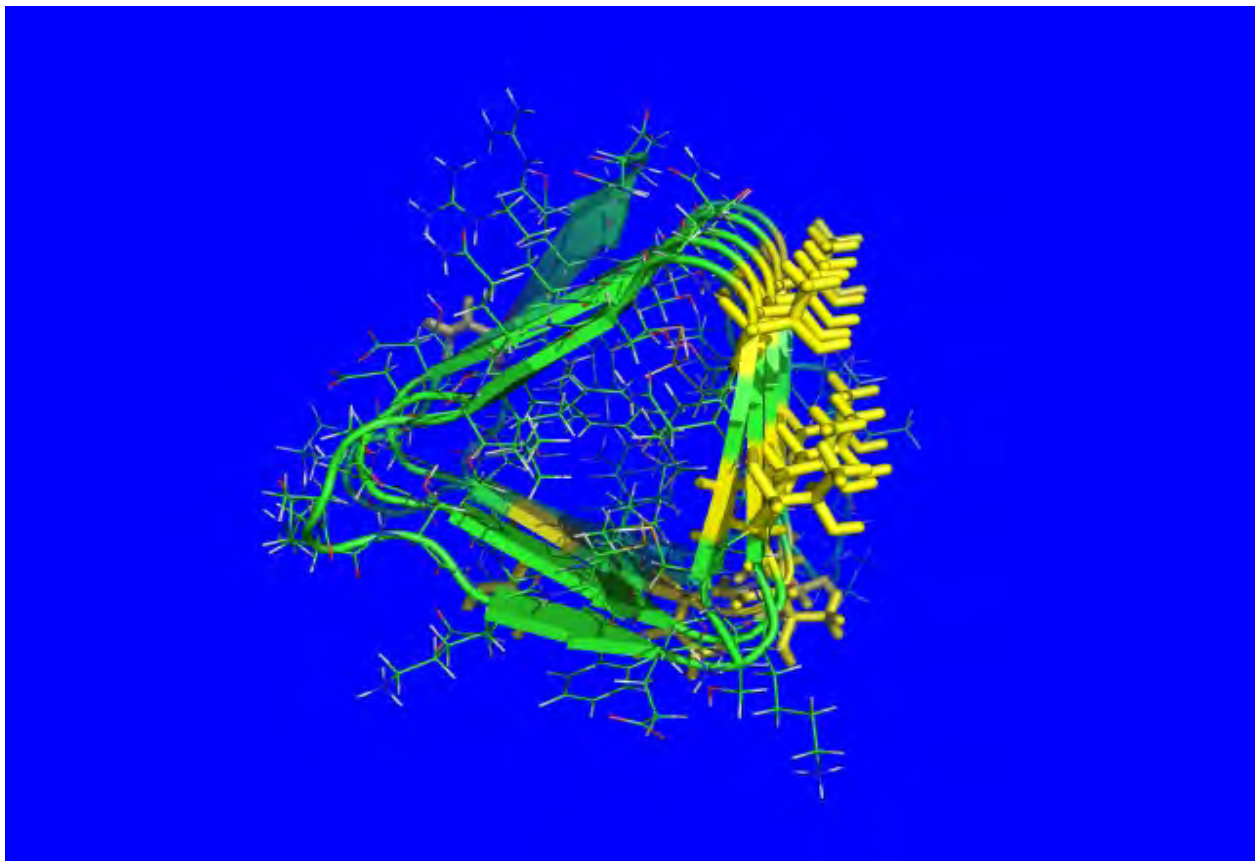
przedział histerezy zamarzania 0,5-1,0°C przy stężeniach rzędu  $\mu\text{mol}$ ) – w przypadku stężeń rzędu  $\mu\text{mol}$  ich aktywność może być 10-100 razy większa; nie mówiąc o aktywności względem AFP roślinnych [176]. W naszym zespole badałem białko zwane sbwAFP pochodzące z ćmy z rodziny zwójkowatych zwanej po łacinie *Choristoneura fumiferana* (ang. *eastern spruce budworm*). Cząsteczka ta o masie 9 kDa ma kształt pryzmy (Rys. 3.2.2.1) z trzema wyraźnymi powierzchniami [176]. W przypadku białek AFP przedział histerezy zamarzania jest większy niż przedział histerezy topnienia (co można wyjaśnić na gruncie efektu Gibbsa-Thomsona), przy czym przedział histerezy zamarzania jest generalnie szerszy w przypadku hiperaktywnych AFP (z grupy V) aniżeli w przypadku innych białek AFP. Jednakże w przypadku sbwAFP (pomimo znacznej szerokości przedziału histerezy zamarzania) mamy do czynienia z wartościami przedziału histerezy topnienia niewiele większymi od tych dla niehiperaktywnych AFP (stosunek przedziału histerezy topnienia do przedziału histerezy zamarzania wynosi dla tego białka 0,04°C/4,1°C; dla porównania wartość dla hiperaktywnego białka AFP z mącznika młynarka *Tenebrio molitor* wynosi 0,18°C/1,7°C, zaś dla typowego białka z grupy I 0,02°C/0,8°C) [175]. Pertaya i wsp. [177] eksperymentalnie stwierdzili, że sbwAFP doczepia się zarówno do **płaszczyzny bazalnej** (wzdłuż tzw. **osi c**; Rys. 3.2.2.2) jak i do **krawędzi pomiędzy płaszczyznami pryzmowymi** kryształów lodu Ih, co jest przyczyną hiperaktywności tego białka w porównaniu np. z białkami grupy III przyczepiających się wyłącznie do **płaszczyzny pryzmowej**. Prostokątne boki białka w kształcie pryzmy są utworzone z płaskich  $\beta$ -harmonijek stanowiących razem strukturę określaną jako **prawoskrętna  $\beta$ -helisa** [176][177], która to jest charakterystyczną konformacją białek AFP pochodzących z owadów [178]. Jedna z trzech płaszczyzn wiążąca się z powierzchnią lodu zawiera 9 z 14 powierzchniowych reszt treoninowych, zorganizowanych w regularny szereg motywów **Thr-X-Thr** (gdzie X oznacza aminokwas skierowany łańcuchem bocznym do wnętrza białka) [176]. Nutt i Smith [179] sugerują, że reszty treoninowe zapewniają „złoty środek” pomiędzy hydrofobowością i hydrofilowością umożliwiając efektywne wiązanie lodu. Oprócz tego struktura  $\beta$ -helisy jest stabilizowana przez trzy **mostki disiarczkowe** [176]. Wydaje się, że w pośredniczeniu w energetycznie korzystnym dołączeniu się do powierzchni bazalnej pośredniczą reszty treoninowe znajdujące się na powierzchni białka wiążącej się z lodem. Nie jest jasne czy takie dołączenie wynika z wiązań wodorowych, które tworzą grupy hydroksylowe reszt treoninowych czy też z komplementarności dwóch powierzchni: bazalnej powierzchni lodu i powierzchni białka sbwAFP wiążącej lód, czy też może przede wszystkim z indukowania silnie uporządkowanej wody, która w ten sposób determinuje korzystne miejsce dla wiązania się z lodem [177][180].

W I warstwie solwatacyjnej wokół powierzchni białka wiążącej się z lodem w temp. 250 K

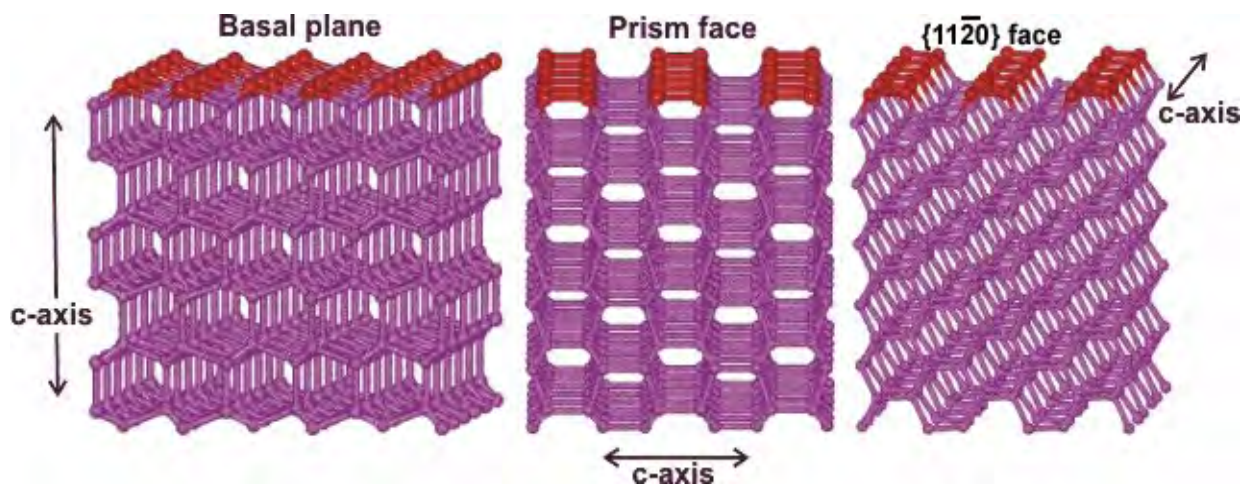
Nutt i Smith [179] zaobserwowali znaczne obniżenie ruchliwości cząsteczek wody; w I warstwie solwatacyjnej wokół pozostałych dwóch prostokątnych płaszczyzn obniżenie ruchliwości jest mniejsze i przypomina to w II warstwie wokół płaszczyzny białka wiążącej się z lodem. W temp. 300 K nie zaobserwowano znaczących różnic w dynamice wody pomiędzy trzema prostokątnymi płaszczyznami sbwAFP. Dwie pozostałe prostokątne powierzchnie, razem z obiema końcami pryzmy, tworzą region powierzchniowy zorientowany w kierunku ciekłej wody i jego rola nie jest jeszcze do końca jasna. Nutt i Smith [179] sugerują, że ten region odgrywa aktywną rolę w opóźnianiu zamrażania w jego sąsiedztwie poprzez przerywanie struktury wody i wymuszanie szybszych ruchów cząsteczek wody, co ma mieć na celu uniknięcie „pochłonięcia” białka przez rozrastający się lód. Z wyników NMR [wg 179] wynika, że szybsze ruchy cząsteczek wody wokół płaszczyzn białka niewiążących się z lodem są indukowane także przez szybsze ruchy łańcuchów bocznych aminokwasów.

Istnieją kontrowersje co do tego czy wiązanie się lodu do białka jest procesem odwracalnym, czy też nie [175]. Niektórzy uczeni np. Nutt i Smith [179] oraz Smolin i Daggett [180] uważają, że w trakcie tego (ich zdaniem nieodwracalnego) wiązania następuje ciągłe przejście pomiędzy wodą i lodem, na co ma wskazywać fakt, że powierzchnia białka wiążąca się z lodem jest w stanie organizować (uporządkowywać) cząsteczki wody wokół jej (na co wskazują wartości parametru uporządkowania  $S_g$  uzyskane z analizy wyników MD), a także to że ruchliwość cząsteczek wody wokół tej powierzchni jest obniżona [179][175]. Natomiast woda wokół dwóch pozostałych powierzchni charakteryzuje się (w temp. 250 K) wyraźnie obniżoną tetraedrycznością (mniejszym uporządkowaniem), aniżeli wokół powierzchni wiążącej się z lodem co pokazuje, że powierzchnie te zaburzają strukturę wody. Na powierzchniach niewiążących się z lodem mamy do czynienia ze znaczącą liczbą reszt hydrofilowych zmniejszających populację tetraedrycznie ułożonych cząsteczek wody [179]. McConkey i wsp. [181] oraz Nutt i Smith [179] podkreślają także rolę dopasowania geometrycznego pomiędzy tymi powierzchniami, zwłaszcza w końcowym etapie wiązania się tzn. po powstaniu silnie uporządkowanej wody. W przypadku płaszczyzny białka wiążącej się z lodem mamy też mniejszą liczbę cząsteczek wody w I warstwie solwatacyjnej wokół niej co także przypomina sytuację wokół kryształków lodu  $I_h$ . Natomiast w temperaturze pokojowej (300 K) różnice w tetraedryczności cząsteczek wody wokół trzech prostokątnych płaszczyzn białka sbwAFP są niewielkie. Analiza wykresu prawdopodobieństwa występowania określonych kątów  $\theta_{OOH}$  („najmniejszy kąt z czterech kątów wodór-tlen donorowy-tlen akceptorowy pomiędzy dwiema cząsteczkami wody oddalonymi co najwyżej o 0,4 nm”) charakteryzującego wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody wskazuje, że na bimodalnym wykresie (z

minimum przy wartościach kątów  $\sim 30^\circ$ ) niskie wartości tego kąta ( $\sim 10^\circ$ ) są indukowane przez grupy hydrofobowe, zaś wyższe wartości ( $\sim 48^\circ$ ) przez grupy hydrofilowe, przy czym różnice te są większe w 250 K niż w 300 K. Wokół strony białka wiążącej się z lodem mamy do czynienia ze znaczną populacją wiązań o niskiej wartości kąta  $\theta_{\text{OOH}}$ , natomiast wokół pozostałych dwóch stron mamy do czynienia ze zwiększoną populacją wiązań wodorowych o wyższych wartościach tego kąta [179]. Tak więc ta obserwacja potwierdza założenie, że cały obszar powierzchni cząsteczki sbwAFP można podzielić na dwa regiony, które wyraźnie różnią się funkcją, co implikuje wyraźne różnice we właściwościach wody solwatacyjnych w pobliżu tych dwóch regionów. To wszystko prowadzi do wniosku, że szczegółowy opis struktury wody solwatacyjnej jest kluczowy dla zrozumienia aktywności przeciwzmrozeniowej.



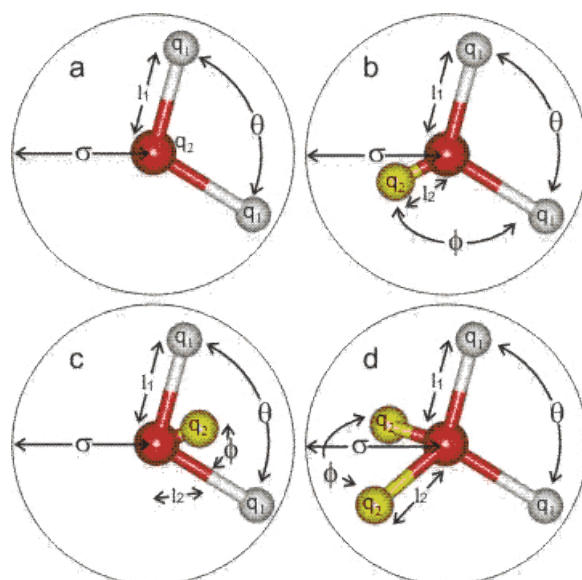
**Rys. 3.2.2.1.** Białko sbwAFP. Żółtym kolorem zaznaczono reszty treoninowe. [Rysunek wykonano przy użyciu programu PyMOL]



**Rys. 3.2.2.2.** Płaszczyzny istniejące w kryształach lodu Ih. Od lewej – płaszczyna bazalna (ang. *basal plane*), płaszczyna pryzmowa (ang. *prism face*), płaszczyna  $\{11\bar{2}0\}$  (ang.  $\{11\bar{2}0\}$  face). Zaznaczono także oś c (ang. *c-axis*). Rysunek pochodzi z [16].

### 3.3. Opis modelu wody TIP4P

Według ostatniego przeglądu obecnie mamy do czynienia z przynajmniej 46 modelami cząsteczek wody. To bogactwo wynika przede wszystkim z faktu, że nie istnieje model, który by dobrze odtwarzał WSZYSTKIE właściwości wody i modele są po prostu „projektowane” pod kątem określonych właściwości (np. funkcję rozkładu radialnego, diagram fazowy, parametry krytyczne). Żaden z tych modeli nie jest w stanie jednocześnie odtwarzać eksperymentalnej funkcji rozkładu radialnego i eksperymentalnej wartości energii wewnętrznej. Dopasowanie modelu do rzeczywistości zależy m. in. od ilości zmiennych uwzględnionych przy jego parametryzacji. Oddziaływania van der Waalsa są zazwyczaj odzwierciedlane poprzez potencjał Lennarda-Jonesa. Największy wpływ na gęstość mają wartości parametru  $\sigma$  oraz długości wiązania O-H, zaś właściwości termodynamiczne zależą w dużej mierze od oddziaływań odpychających van der Waalsa, oddziaływania kulombowskie krótkiego zasięgu oraz składowe potencjału odpowiadające za polaryzowalność (o ile w ogóle polaryzowalność jest uwzględniona). Trzeba mieć na uwadze, że w rzeczywistości cząsteczki wody nie są sobie równoważne co wynika z różnic w obsadzeniu orbitali cząsteczkowych, ich geometrii a także w częstotliwościach ich drgań wewnątrzcząsteczkowych. Wzięcie pod uwagę polaryzowalności pozwala uwzględnić w dużej mierze tę anizotropię, chociaż jak dotąd modele polaryzowalne wywodzące się z zazwyczaj stosowanych modeli niepolaryzowalnych nie charakteryzują się znacząco lepszą odtwarzalnością właściwości fizycznych. Pod tym względem dużo bardziej obiecujące wydają się modele z polaryzowalnym „rozsmarowanym” (zmieniającym efektywną wartość wraz z odległością) bądź poruszającym się ładunkiem w odróżnieniu od modeli z ustalonymi ładunkami punktowymi, aczkolwiek ich wykorzystanie jest jak dotąd w „powijakach” co wynika choćby ze znaczącego wydłużenia czasu obliczeniowego. W przypadku modeli niepolaryzowalnych mamy także do czynienia z pewną nadmierną stabilizacją dimeru wody, a także z niezdolnością do jednoczesnego przewidywania pewnych właściwości fizycznych takich jak temp. Maksymalnej gęstości czy temperatura topnienia. Widać więc wyraźnie, że woda – na pierwszy rzut oka bardzo prosta substancja – jest układem trudnym do odzwierciedlenia w symulacjach komputerowych, aczkolwiek dostarczają one zasadniczą pomoc w zrozumieniu zjawisk odpowiadających za strukturę i dynamikę tego związku [16].



**Rys. 3.3.1.** Schemat najpowszechniej stosowanych modeli wody. Modele **a** (np. modele SPC, SPC/E oraz TIP3P) , **b** (np. PPC) i **c** (np. TIP4P) są płaskie, natomiast model **d** (np. TIP5P) jest prawie tetraedryczny. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [16].

Model wody TIP4P (ang. *transferred intermolecular potential with 4 interaction sites*) to sztywny, niepolaryzowalny czteropunktowy model, z dwoma ładunkami  $q_H$  umieszczonymi na atomach wodoru, i jednym ładunkiem  $q_L$  umieszczonym w odległości  $b_{OL}$  od atomu tlenu (na tzw. pseudoatomie; ang. *extra-point*). Określenie „sztywny” oznacza, że zaniedbane zostają wewnątrzcząsteczkowe stopnie swobody; w odróżnieniu od modeli „giętkich”; nie pozwalając na wyliczenie widm odpowiadających za wewnętrzne drgania zginające i rozciągające cząsteczek. Geometria tego modelu opiera się na geometrii wody w stanie gazowym i jest nierealistyczna dla lodu, gdzie skoordynowanie cząsteczki wody z czterema sąsiednimi cząsteczkami wymaga wartości kąta HOH bliższej wartości kąta tetraedrycznego. To „niedoszacowanie” tetraedryczności odpowiada za zaniżoną wartość stałej dielektrycznej. Ponadto dla lodu odległość tlen-wodór powinna być większa z powodu znaczących efektów polaryzacyjnych w tej fazie. Model ten jest w stanie jakościowo opisywać diagram fazowy wody (poza zakresem wysokich ciśnień), aczkolwiek daje on zbyt niskie wartości temperatury topnienia, temperatury krytycznej, jak również temperatury maksymalnej gęstości [182] Dobrze odtwarza gęstość wody w temp. 298 K, pod ciśnieniem 1 atm, ciepło parowania w temp. 298 K, zawyża współczynnik autodyfuzji wody (298 K, 1 atm), dobrze odtwarza strukturalne właściwości wody wyrażane funkcjami rozkładu radialnego tlen-tlen, tlen-wodór, wodór-wodór; zawyża moment dipolowy [183]; entropia absolutna wody jest zbliżona do wartości eksperymentalnej. Parametry tego modelu w porównaniu z parametrami innych modeli dostępnych w polach siłowych Ambera zestawiono w Tabeli 3.3.1,

zaś porównanie odtwarzalności niektórych właściwości fizycznych przez model TIP4P w porównaniu z danymi eksperymentalnymi zestawiono w Tabeli 3.3.2. Wybór tego modelu był spowodowany następującymi czynnikami: dobrą odtwarzalnością właściwości fizycznych rzeczywistej wody, powszechnością stosowania w biosymulacjach oraz krótszym czasem obliczeń w porównaniu z modelem pięciopunktowym (TIP5P); trzeba bowiem pamiętać, że czas obliczeń jest w przybliżeniu proporcjonalny do kwadratu liczby atomów (w tym również pseudoatomów). Trzeba zaznaczyć, iż najpopularniejsze modele wody „pracują” w sposób porównywalny w zastosowaniach do układów biologicznych. Wybierając model pamiętałem o tym, że czas obliczeń jest proporcjonalny w przybliżeniu do pierwiastka kwadratowego z liczby atomów w układzie [185].

	SPC/E	TIP3P	TIP4P	TIP5P	TIP4P-EW	SPC/Fw	POL3
$b_{OH}$ (Å)	1,00	0,9572	0,9572	0,9572	0,9572	1,01	0,9572
$\theta_{HOH}$ (deg)	109,47	104,52	104,52	104,52	104,52	113,24	104,52
$b_{OL}$ (Å)	-	-	0,15	0,70	0,1250	-	0,21
$\theta_{LOL}$ (deg)	-	-	-	109,47	-	-	-
$q_O$ (e)	-0,8476	-0,834	0,00	0,00	0,00	-0,82	0,00
$q_H$ (e)	+0,4238	+0,417	+0,52	+0,241	+0,52422	+0,41	+0,5190
$q_L$ (e)	-	-	-1,04	-0,241	-1,04844	-	-1,0380
$\sigma_0$ (Å)	3,1656	3,15061	3,15365	3,12	3,16435	3,165492	3,2340
$\epsilon_0$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	0,155	0,1521	0,1550	0,16	0,162750	0,16	0,1825
$\alpha$ (Å <sup>3</sup> )	-	-	-	-	-	-	1,4440
$K^b$ (kcalmol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup> )	-	-	-	-	-	529,581	-
$K^0$ (kcalmol <sup>-1</sup> rad <sup>-2</sup> )	-	-	-	-	-	37,95	-
$K^{cub}$ (kcalmol <sup>-1</sup> Å <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	0	-

Objaśnienia symboli:

$b_{OH}$  - równowagowa długość wiązania OH w cząsteczce wody

$\theta_{HOH}$  - równowagowa wartość kąta HOH w cząsteczce wody

$b_{OL}$  - odległość między atomem O a pseudoatomem L

$\theta_{LOL}$  - w przypadku dwóch pseudoatomów wartość kąta LOL

$q_O$  - ładunek na atomie tlenu

$q_H$  - ładunek na atomie wodoru

$q_L$  - ładunek na pseudoatomie

$\epsilon_0$  - wartość minimum potencjału w równaniu Lennarda-Jonesa dla dwóch oddziałujących ze sobą cząsteczek wody

$\sigma_0$  - odległość przy której potencjał Lennarda-Jonesa osiąga wartość 0

$K^b$  - wartość stałej siłowej dla harmonicznym drgań rozciągających

$K^0$  - wartość stałej siłowej dla harmonicznym drgań zginających

$K^{cub}$  - wartość stałej siłowej dla aharmonicznym drgań rozciągających

$\alpha$  - polaryzowalność

<b>Tabela 3.3.2. Porównanie odtwarzalności niektórych właściwości fizycznych przez model TIP4P</b>		
	<b>TIP4P [186]</b>	<b>Wartość eksp. [16]</b>
$\rho$ (gcm <sup>-3</sup> ) <sup>**</sup>	1,001±0,001	0,997
T <sub>m</sub> (K) <sup>^</sup> [182]	232,5	273,15
T <sub>md</sub> (K) <sup>^</sup> [190]	248	277
T <sub>c</sub> (K)	558	647,1
$\rho_c$ (g cm <sup>-3</sup> )	0,313	0,322
p <sub>c</sub> (bar)	112,0	220,64
-E (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>**</sup>	10,06±0,01	9,92
$\Delta H_{vap}$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	10,65±0,01	10,51
C <sub>p</sub> (cal mol <sup>-1</sup> deg <sup>-1</sup> ) <sup>**</sup>	20,4±0,7	18,0
10 <sup>6</sup> $\kappa_T$ (atm <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	60±5	45,8
10 <sup>5</sup> $\alpha_p$ (deg <sup>-1</sup> ) <sup>^</sup>	44±8	25,3
< $\mu$ > (D) <sup>**</sup>	2,18	2,95±0,2
$\epsilon_0$ <sup>**</sup>	53 [191]	78,4
D (10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>**</sup>	2,8	2,27
S <sub>∞</sub> (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ) <sup>**</sup> [192]	72,40±0,02	69,95±0,03

\*) - 298 K, ^) 1 atm, #) dane pochodzące od różnych autorów

$\rho$  - gęstość

T<sub>md</sub> - temperatura maksymalnej gęstości cieczy

T<sub>m</sub> - temperatura topnienia

T<sub>c</sub> - temperatura krytyczna

p<sub>c</sub> - ciśnienie krytyczne

$\rho_c$  - gęstość w temperaturze krytycznej

$\epsilon_0$  - stała dielektryczna

E – średnia energia konfiguracyjna

$\Delta H_{vap}$  - ciepło parowania

C<sub>p</sub> - pojemność cieplna

$\kappa_T$  - ścisłość

$\alpha_p$  - współczynnik rozszerzalności cieplnej

D<sub>T</sub> - współczynnik autodyfuzji translacyjnej

< $\mu$ > - średni moment dipolowy

S<sub>∞</sub> - entropia całkowita



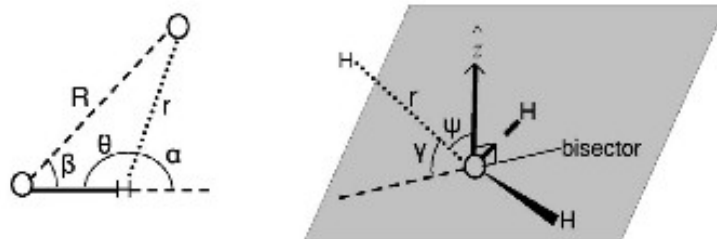
### 3.4. Definicja wiązania wodorowego

Bardzo często w naukach przyrodniczych operuje się pojęciem „wiązania wodorowego”, rzadko jednak przyrodnicy zastanawiają się nad ścisłą definicją tego typu oddziaływań. Jeśli chcemy analizować wyniki dynamiki molekularnej pod kątem analizy istniejących wiązań wodorowych potrzebujemy jednak ścisłej definicji. Niemal wszystkie powszechnie stosowane definicje charakteryzują się mniej lub bardziej arbitralnymi zakresami obciążenia które z kolei są przyczyną arbitralnej liczby nietkniętych i zerwanych wiązań wodorowych. W przypadku dimeru cząsteczek wody można uniknąć arbitralnego wyboru i można go postrzegać jako charakteryzujący się ciągłym oddziaływaniem w postaci wiąz. wodorowego rozciągającego się aż do nieskończonej odległości pomiędzy cząsteczkami. W tym wypadku wszystkie możliwe kryteria charakteryzujące wiązanie wodorowe charakteryzują się ciągłością, a więc jakkolwiek ostry zakres obciążenia oddzielający konfiguracje z wiąz. wodorowymi od konfiguracji nie stanowiących wiąz. wodorowych musi być arbitralny jednak potrzeba scharakteryzowania stanu ciekłego wymaga rozwoju i ewolucji definicji wiąz. wodorowego [17].

Najczęściej zakresy obciążenia odnoszą się do takich zmiennych jak energia potencjalna, geometria, gęstość ładunku, potencjał elektrostatyczny, lub też liczba donorów i akceptorów wiązania wodorowego. Jeśli jedna ze zmiennych wiązania wodorowego przesuwa się poza zakres obciążenia, wówczas rozważane wiązanie wodorowe przestaje istnieć. Zakresy obciążenia często znajdują się „w” lub „w pobliżu” minimum na rozkładzie rozważanej zmiennej, jednak wartość prawdopodobieństwa w tym minimum punkcie jest zwykle różna od zera. W ten sposób utworzone definicje są zbyt „prostackie” ograniczając w ten sposób zdolność zrozumienia różnorodności środowisk „wodnych”, charakteryzujących się pełną niuansów strukturą i dynamiką. Czasem są one zbyt ograniczające, „widząc” zerwane wiązanie wodorowe wówczas gdy „na zdrowy rozum” nie powinno ono istnieć, zaś w innych wypadkach są one zbyt hojne, prowadząc do tego że **rozwidłone wiązania wodorowe** są przydzielane do dwóch atomów tlenu i do artefaktu, określanego jako **„nadkoordynowany tlen”** (ang. *overcoordinated oxygen*). W obrębie danej symulacji można obliczyć rozkład energii wiązania dla wszystkich par cząsteczek w cieczy który to charakteryzuje się bimodalnością: pik przy niższych energiach odpowiada w większości bliskim sąsiadom, zaś pik przy wyższych energiach wiązania większej części par cząsteczek, które są przestrzennie odległe, i stąd mają słabe energie oddziaływań. Pozycja minimum w tym rozkładzie określa naturalny zakres obciążenia pomiędzy parami połączonymi wiąz. wodorowymi. (te z energiami w obrębie niższego

piku), i parami nie tworzącymi wiąź. wodorowego (te z energiami w obrębie wyższego piku), co stanowi istotę tzw. **definicji energetycznej** wiązania wodorowego. Niestety jak się można spodziewać, zakres obciążenia energii jest funkcją gęstości i temperatury, i dlatego też nie może być uważany za fundamentalną definicję wiąź. wodorowego. Niemniej, taki energetyczny zakres obciążenia stanowi stosunkowo ściśle i użyteczne kryterium dla wiąź. wodorowych w cieczy [17]. Przykładem często stosowanej definicji energetycznej może być definicja wykorzystująca zakres obciążenia dla energii wiązania wodorowego równy  $-10$  kJ/mol i dla odległości tlen-tlen równej  $0,35$  nm. Owa wartość energii jest powiązana z energią wymaganą dla zerwania wiązania wodorowego poprzez „szybki” ruch wahadłowy [94]. Wartość  $0,35$  nm znajduje uzasadnienie w funkcji rozkładu radialnego tlen-tlen (wartość leżąca w minimum tej funkcji za pierwszym pikiem).

**Kryteria geometryczne** dla wiązań wodorowych w ciekłej wodzie często są wykorzystywane przez badaczy korzystających z dynamiki molekularnej bądź symulacji Monte Carlo. Funkcja rozkładu radialnego O-O posiada pik przy niskich wartościach odległości tlen-tlen, minimum przy nieco większych odległościach, i następnie uwypuklenie odzwierciedlające uporządkowanie dla większych odległości. Tak więc jest czymś naturalnym wykorzystanie pozycji minimum jako zakresu obciążenia odległości, rozważając jakkolwiek parę cząsteczek z odległością tlen-tlen  $R_{OO}$  mniejszą niż zakres obciążenia aby było wiązanie wodorowe. Podobnie jak w przypadku **kryterium energetycznego**, ten zakres obciążenia jest zasadniczo zależny od temperatury i gęstości. Na dodatek, **definicja O-O** jest dosyć hojna, biorąc pod uwagę że według niej niektóre pary są powiązane wiąź. wodorowymi, choć intuicyjnie nie powinny. Istnieje jednak analogiczny zakres obciążenia odległości ale wykorzystujący funkcję rozkładu radialnego H-O. W tym wypadku dla pary powiązanej wiązaniem wodorowym atom wodoru na jednej cząsteczce i atom tlenu na innej cząsteczce muszą znajdować się względnie blisko. **Kryterium H-O**, oznaczające odległość  $r$  H-O jest więc bardziej restrykcyjne niż odległość O-O, i stąd prowadzi do mniejszej liczby wiązań wodorowych na cząsteczkę. Dla każdej takiej pary odległość-kąt można stworzyć metodę do określenia **zakresów obciążenia** (ang. *cutoffs*) wiązań wodorowych. Polega ona na konstrukcji 2-wymiarowych potencjałów średnich sił dla każdej pary odległość-kąt. **Zakres obciążenia** wiąź. wodorowego oddzielającego wiąź. wodorowe od konfiguracji nie stanowiących wiąź. wodorowych jest dany przez kontur o danej wartości energii potencjalnej (ekwipotencjalny), który przechodzi przez **punkt “siodłowy”**. Ten algorytm dla licznych par odległość-kąt daje wartości pomiędzy  $3,2$  a  $3,6$  wiąź. wodorowych na cząsteczkę. Kryterium odległościowe jest często poszerzane przez włączenie jednego lub więcej kątów odpowiadających geometrii dimeru. Kąty, które są wykorzystywane w definicjach zostały przedstawione na Rysunku 3.4.1.



**Rys. 3.4.1.** Kąty i odległości wykorzystywane w definicjach wiązania wodorowego. Rysunek pochodzi z [17].

W przypadku większości definicji bierze się pod uwagę kąty  $\theta$  i  $\beta_{\text{OOH}}$ , co prowadzi do czterech możliwych kombinacji odległość-kąt:  $R_{\text{OO}}$  i  $\beta_{\text{OOH}}$ ,  $R_{\text{OO}}$  i  $\theta$ ,  $d_{\text{OH}}$  i  $\beta_{\text{OOH}}$ ,  $d_{\text{OH}}$  i  $\theta$ . Obliczenia z różnymi modelami symulacyjnymi i technikami, przy użyciu różnych definicji wiąz. wodorowego, dostarczyły liczby wiązań wodorowych w zakresie pomiędzy 3 a 4 [17]. Do niedawna często stosowaną definicją geometryczną była definicja wykorzystująca zakres obcięcia dla kąta  $\theta$  równy  $30^\circ$  i jednocześnie odległość tlen-tlen równą 0,35 nm [94][193][109][194][195]. Owa wartość kąta znajduje uzasadnienie w pomiarach rozpraszania neutronów [196].

Istnieje dyskusja co do roli oddziaływań elektrostatycznych względem nakładania się orbitali w oddziaływaniu określanym jako wiązanie wodorowe. Niektórzy uważają, że przeniesienie elektronów z wolnej pary elektronowej na orbital antywiązący jest sednem wiązania wodorowego. Definicją wiąz. wodorowego opierająca się na strukturze elektronowej jest **definicja NBO Weinholda i wsp.** w której stopień istnienia wiąz. wodorowego pomiędzy dwoma cząsteczkami jest dany przez **stopień obsadzenia N** istotnego **orbitalu antywiązącego**  $\sigma^*_{\text{OH}}$  przez elektrony z orbitali wolnej pary elektronowej na atomie tlenu innej cząsteczki wody. Skinner i wsp. [17], pokazali, że to obsadzenie zależy niemal wyłącznie od jedynie dwóch (z sześciu możliwych) geometrycznych zmiennych tzn. od pary  $(d_{\text{OH}}, \psi)$ , co wskazuje na wartość definicji biorącej pod uwagę te kryteria i co wskazuje na to, że definicje oparte na strukturze elektronowej i na kryteriach geometrycznych mogą być ze sobą zgodne (kąt  $\psi$  oznacza kąt pomiędzy międzycząsteczkowym wektorem O-H a znajdującym się poza płaszczyzną Rys. 3.4.1. wektorem O----H wychodzącym od cząsteczki akceptorowej). Warto także podkreślić, że i ta definicja, mająca związek z elektronowymi właściwościami wiązania wodorowego podobnie jak inne definicje geometryczne, nie jest dobrze skorelowana z energetyką wiąz. wodorowego [17].

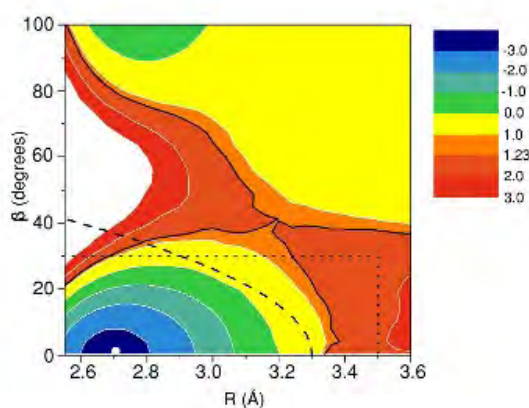
Poprzez powiązanie wiązania wodorowego z dobrze zdefiniowanym pojęciem jakim jest **minimum na powierzchni energii potencjalnej**, można uniknąć problemów będących wynikiem zastosowanej semantyki. Stąd Henchman i Irudayam [18] zaproponowali **definicję topologiczną**

wymagającą tego, aby tlen i wodór znajdowały się w jakimś **lokalnym minimum** (czym głębiej tym wiązanie jest silniejsze), niezależnie od odległości pomiędzy tymi atomami, co pozwala uniknąć arbitralnych parametrów, które można jednak wykorzystać do rozróżnienia **silnych wiązań wodorowych** od **słabych wiązań wodorowych**. Jeśli inny atom tlenu przybliży się do atomu wodorowego ów atom przelęcza swoje wiązanie i donuje do niego. W tej definicji zakłada się ponadto, że wodór jest donujący do jego najbliższego niekowalencyjnie związanego atomu tlenu tak długo jak ta odległość tlen-wodór (OH) jest najkrótszą odległością OH pomiędzy dwoma oddziałującymi ze sobą cząsteczkami eliminując możliwość dwóch wiązań wodorowych pomiędzy dwoma cząsteczkami co wiązałoby się ze znaczącymi naprężeniami wiązania wodorowego i wzmocnieniem jednego kosztem drugiego. Jednak to podejście jest wciąż przedmiotem trudności wynikających z określenia minimów w wielowymiarowych przestrzeniach współrzędnych [18].

W niniejszej pracy przyjąłem definicję geometryczną wiązania wodorowego zaczerpniętą z pracy Werneta i wsp. [30]. Jest to tzw. **definicja stożkowa wiązania wodorowego** określona na podstawie pomiarów absorpcji promieniowania rentgenowskiego [30][33]. Zgodnie z tą definicją wiązanie wodorowe pomiędzy dwoma cząsteczkami wody tworzy się wówczas gdy odległość tlen-tlen spełnia równość:

$$R_{OO} \leq -0,000044\beta_{OOH}^2 + 0,33 \text{ [nm]} \quad (4.3.3.1)$$

gdzie  $\beta_{OOH}$  oznacza wartość kąta OOH. Ponadto dodano warunek, aby całkowita energia oddziaływań  $E_{HB}$  pomiędzy dwoma cząsteczkami spełniającymi to kryterium była ujemna, co z grubsza można interpretować jako istnienie siły przyciągającej, a co wynika wprost z prawa Coulomba.



**Rys. 3.4.2.** Poziomicie wykresu potencjału średnich sił  $W(R_{OO}, \beta_{OOH})$  (dla 300 K). Poziomicie w legendzie różnią się wielkością o  $k_B T$ . Globalne minimum jest pokazane białą kropką. Poziomicie o wartości 1,23  $k_B T$  (czarna linia) przechodzi przez punkt siodłowy. Linia przerywaną oznaczono paraboliczny zakres obciążenia wiązania wodorowego według definicji Werneta i wsp. [30], zaś linią kropkowaną prostokątny zakres obciążenia według definicji Luzara i Chandlera. Rysunek i częściowo opis pochodzą z [17].

Definicja Werneta i wsp. [30] daje wartość 3,3 wiąz. wodorowego na cząsteczkę [17]. Używając tej samej pary zmiennych można jednak wiązanie wodorowe zdefiniować inaczej wykorzystując wartości potencjału średnich sił  $W(R_{OO},\beta_{OOH})=-k_B T g(R_{OO},\beta_{OOH})$ , gdzie  $g(R_{OO},\beta_{OOH})$  oznacza stosunek średniej liczby atomów tlenu w warstwie pomiędzy  $R_{OO}$  a  $R_{OO}+dR_{OO}$  w zakresie kątów pomiędzy  $\beta_{OOH}$  a  $\beta_{OOH}+d\beta_{OOH}$  do tej samej liczby dla przypadku gdyby cząsteczki wody nie oddziaływały ze sobą. Wówczas można określić zakres obciążenia dla cząsteczek wody tworzących wiązanie wodorowe od tych nietworzących poprzez wykreślenie linii najszybszego wzrostu wartości funkcji  $W(R_{OO},\beta_{OOH})$  wychodzącej z punktu siodłowego. Można też zdefiniować zakres obciążenia jako pierwszą krzywą obejmującą punkt siodłowy przy poruszaniu się od minimum globalnego funkcji do tego punktu siodłowego (czarna linia na Rys. 3.4.2). W tym wypadku liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wynosi 3,6, zaś ułamek podwójnych donorów wynosi 0,77. Luzar i Chandler [wg 17] zaproponowali bardziej „prostą” definicję w której obszar na wykresie  $(R_{OO},\beta_{OOH})$ , który uznaje się za obejmujący wiązania wodorowe jest ograniczony prostokątem (linie kropkowane na Rys. 3.4.2). Jak widać z Rys. 3.4.2. definicja Werneta i wsp. znacznie lepiej pokrywa się z definicją wynikającą z wartości potencjału średnich sił [17]. Warto zauważyć, że wszystkie definicje wiąz. wodorowego dają podobne czasy życia wiąz. wodorowego Jak się wydaje – w wielu zastosowaniach wybór definicji wiązania wodorowego ma znaczenie drugorzędne: np. opis dynamiki zrywania wiązań wodorowych nie zależy od wyboru definicji [195].

## 4. Metodyka obliczeń

### 4.1. Procedura symulacyjna

Wykonałem symulacje komputerowe metodą dynamiki molekularnej (MD) układów składających się z następujących polipeptydów: Ala<sub>15</sub>, Ser<sub>15</sub>, Gly<sub>15</sub> (zakończonych grupami w postaci nienaładowanej, tzn -NH<sub>2</sub> i -COOH) bądź białka sbwAFP oraz z wody TIP4P. W tym celu użyłem modułu Sander (z pakietu programów Amber 8) wykorzystując pole siłowe Amber03 (pole siłowe Duana i wsp. [197])

$U_N \equiv U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$  jest energią potencjalną układu złożonego z N atomów, zależną od położenia tych atomów (od ich wzajemnych odległości). Energia oddziaływań jest obliczana z użyciem półempirycznej funkcji [198]:

$$U_N \equiv U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N) = \sum_{b_{ij}} K_{ij}^b (b_{ij} - b_{ij}^0) + \sum_{\theta_{ijk}} K_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0) + \sum_{\phi_{ijkl}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos [n_{ijkl} \phi_{ijkl} - \gamma_{ijkl}]) + \sum_i \sum_{j>i}^N \left[ \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon r_{ij}} \right] \quad (4.1.1)$$

$K_b, K_\theta, V_n$  - stałe siłowe odpowiednio dla odkształceń dotyczących: długości, kąta między wiązaniami, kąta dwuściennego

$b, \theta, \phi$  - długość wiązania, kąt między wiązaniami, kąt dwuścienny; indeks zero oznacza wartość równowagową

$n, \gamma$  - stałe

$A_{ij}, B_{ij}$  - parametry Lennarda-Jonesa, określone wzorami:

$$A_{ij} = \sigma_{ij}^6 \epsilon_{ij}^{1/2} \quad (4.1.2a)$$

$$B_{ij} = \sigma_{ij}^3 (2 \epsilon_{ij})^{1/2} \quad (4.1.2b)$$

Parametry oddziaływań peptyd-woda zostały uzyskane z tych dla oddziaływań peptyd-peptyd oraz woda-woda poprzez zastosowanie następujących reguł mieszania parametrów Lennarda-Jonesa:

$$A_{pw} = \sqrt{A_{pp} A_{ww}} \quad (4.1.3a)$$

$$B_{pw} = \sqrt{B_{pp} B_{ww}} \quad (4.1.3b)$$

$q_i, q_j$  - ładunek cząstkowy atomu  $i$  i  $j$

$r_{ij}$  - odległość między atomami  $i$  i  $j$

$\epsilon$  - stała dielektryczna

Wartość siły  $\mathbf{f}_i$  działającej w chwili  $t$  na atom  $i$  o masie  $m_i$  znajdujący się w położeniu  $\mathbf{r}_i$  wynosi

$$\mathbf{f}_i \equiv -\nabla_{\mathbf{r}_i} U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (4.1.4)$$

W klasycznej symulacji metodą dynamiki molekularnej (jaką wykorzystywałem) ruch cząstki

opisuje prawo Newtona:

$$\mathbf{a}_i \equiv \ddot{\mathbf{r}}_i \equiv \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{f}_i}{m_i} \quad (4.1.5)$$

Aby rozwiązać to równanie, które jest po prostu równaniem różniczkowym zwyczajnym w module Sander wykorzystywany jest tzw. **algorytm "gry w klasy"** (ang. *'leap-frog' scheme*), który jest ulepszoną wersją algorytmu Verleta, według którego jeśli znane są pozycje  $\mathbf{r}_i(t)$ , prędkości  $\mathbf{v}_i(t)$  oraz przyspieszenia  $\mathbf{a}_i(t)$  każdego atomu w układzie w czasie  $t$ , wówczas pozycja atomu  $i$  po czasie  $\Delta t$  jest dana przez:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \mathbf{v}_i(t + \frac{1}{2} \Delta t) \quad (4.1.6)$$

zaś prędkość po czasie  $(1/2) \Delta t$  poprzez równanie:

$$\mathbf{v}_i(t + \frac{1}{2} \Delta t) = \mathbf{v}_i(t - \frac{1}{2} \Delta t) + \Delta t \mathbf{a}_i(t) \quad (4.1.7)$$

W zakresie krótkich odległości oddziaływania Lennarda-Jonesa są odpychające zapobiegając zapadnięciu się struktury wskutek oddziaływań elektrostatycznych, natomiast przy umiarkowanych odległościach mają one charakter przyciągający.

W czasie symulacji wykorzystywałem procedurę SHAKE. Rozmiar kroku czasowego pojedynczej iteracji MD jest określony przez najszybsze ruchy w układzie, którymi są ruchy rozciągające wiązania. SHAKE usuwa swobodę tych ruchów, i w konsekwencji pozwala na użycie dłuższego kroku czasowego. Procedurę zastosowałem zarówno w odniesieniu do cząsteczki peptydu, jak i do cząsteczki wody {NTC=NTF=3}. W przypadku cząsteczek wody jest stosowany specjalny algorytm „trypunktowy” [199][198].

Oddziaływania elektrostatyczne dalekiego zasięgu są regulowane przez procedurę **siatki cząstek Ewalda** (ang. *particle-mesh Ewald*, PME), natomiast dalekosiężne oddziaływania van der Waalsa są szacowane poprzez **model continuum** [198]. W PME, tak jak w przypadku normalnego sumowania Ewalda, z którego ta metoda się wywodzi **energię potencjalną oddziaływań elektrostatycznych**  $\phi(\mathbf{r})$  rozkłada się na dwa człony:

$$\phi(\mathbf{r}) \equiv \phi_{sr}(\mathbf{r}) + \phi_{lr}(\mathbf{r}) \quad (4.1.8)$$

Człon odpowiedzialny za oddziaływania o krótkim zasięgu  $\phi_{sr}(\mathbf{r})$  sumuje się szybko w przestrzeni rzeczywistej, natomiast człon odpowiedzialny za oddziaływania dalekosiężne  $\phi_{lr}(\mathbf{r})$  sumuje się szybko w przestrzeni Fouriera. Podstawowym założeniem metody PME jest zastąpienie

bezpośredniego sumowania energii oddziaływań pomiędzy punktowymi cząstkami, tj. liczenia wszystkiego zgodnie z prawem Coulomba, jak w pierwszej równości z poniższego równania

$$E_{TOT} = \sum_{i,j} \phi_{sr}(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i) = E_{sr} + E_{lr} \quad (4.1.9)$$

dwoma sumami; bezpośrednią sumą  $E_{sr}$  potencjału o krótkim zasięgu w przestrzeni rzeczywistej (zwaną też sumą z najbliższej przestrzeni, ang. *direct space sum*)

$$E_{sr} = \sum_{i,j} \phi(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_i) \quad (4.1.10)$$

która stanowi tzw. część cząstkową PME (ang. *particle part of PME*) oraz sumowaniem w przestrzeni Fouriera członu odpowiedzialnego za oddziaływania o dalekim zasięgu

$$E_{lr} = \sum_{\mathbf{k}} \tilde{\Phi}_{lr}(\mathbf{k}) |\tilde{\rho}(\mathbf{k})|^2 \quad (4.1.11)$$

gdzie:

$$\mathbf{k} = 2\pi\mathbf{n}; \text{ gdzie } \mathbf{n} = (n_x L_x, n_y L_y, n_z L_z); \quad n_x, n_y, n_z \in \mathbb{C}$$

$L_x, L_y, L_z$  - wymiary pudełka symulacyjnego

gdzie  $\tilde{\Phi}_{lr}$  oraz  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  reprezentują transformaty Fouriera potencjału oraz gęstości ładunkowej (ten człon jest nazywany częścią Ewalda; ang. *Ewald part*). Ponieważ oba sumowania zbiegają się szybko w ich odpowiednich przestrzeniach (rzeczywistej i Fouriera), mogą zostać ucięte w określonej odległości z niewielką utratą dokładności i ze znacznym zmniejszeniem wymaganego czasu obliczeń. Tak też jest w Amberze, gdzie zasięg w którym oddziaływania elektrostatyczne są liczone z prawa Coulomba (czyli najbliższa przestrzeń, ang. *direct space*) określa parametr zwany promieniem obcięcia (ang. *cutoff distance*) {CUT}. W przypadku moich obliczeń ustawiłem wartość {CUT} = 12 Å. Jest on wykorzystywany do ograniczenia sumy z najbliższej przestrzeni (ang. *direct space sum*) dla PME. {SKINNB} = 2 Å określa grubość tzw. "skóry" (ang. *skin*). Lista bezpośrednich sum oddziaływań niewiązących jest rozszerzona do {CUT} + {SKINNB}, zaś oddziaływania van der Waalsa (w postaci oddziaływań Lennarda-Jonesa) i bezpośrednio oddziaływania elektrostatyczne (Coulomba) są ucinane przy {CUT}. Lista oddziaływań niewiązących jest aktualizowana, kiedy tylko jakiś atom przekroczy połowę grubości „skóry” [198]. A więc przy ustawianiu tego parametru musiałem pamiętać o tym, że jego wartość nie może być większa od połowy najkrótszego boku prostopadłościennego pudełka [185]. W celu wydajnego wyliczenia transformaty Fouriera  $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$  pola gęstości ładunkowej, wykorzystuje się, tzw. szybką transformatę Fouriera, która wymaga aby pole gęstości ładunkowej zostało wyliczone względem dyskretnej siatki w przestrzeni (stad nazywana jest ona częścią siatkową; ang. *mesh part*).

Cząsteczkę polipeptydu zbudowano przy użyciu modułu tLeap z pakietu Amber8. Po



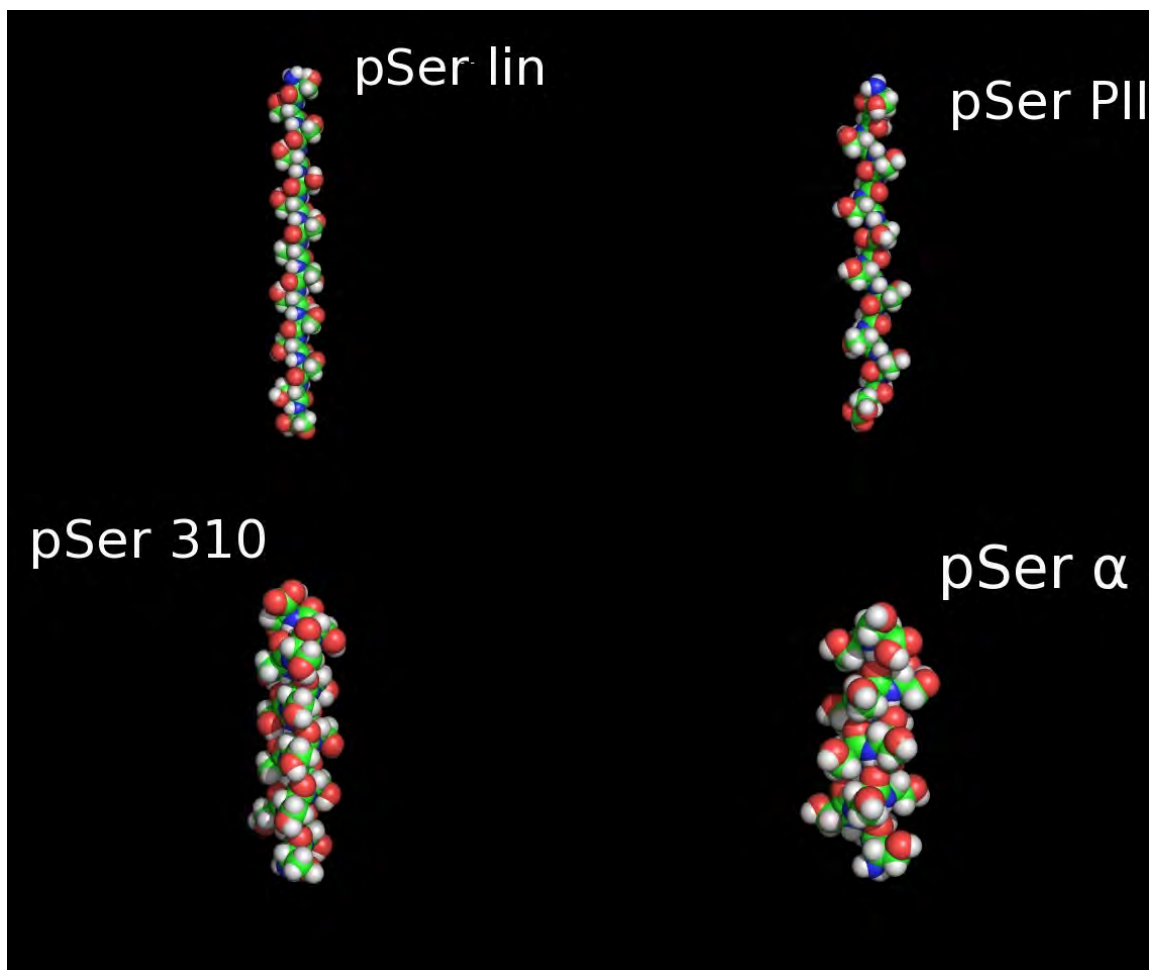
zbudowaniu cząsteczki polipeptydu łańcuch ułożyłem w czterech różnych konformacjach:

- 1)  $\alpha$ -helisy
- 2) helisy  $3_{10}$
- 3) helisy PII
- 4) rozciągniętej (liniowej)

W przypadku peptydów alaninowych stworzyłem dodatkowe układy w których sztucznie wyłączyłem oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy peptydem i wodą poprzez wyzerowanie ładunków cząstkowych na atomach peptydu w pliku z topologią otrzymując w ten sposób układy charakteryzujące się bardzo wysoką hydrofobowością. Aby zapobiec zmianie konformacji peptydu w trakcie symulacji, położenia atomów szkieletu peptydowego były utrzymywane w mniej więcej stałej pozycji w przestrzeni z użyciem harmonicznej siły ograniczającej; energia „sprężystości” tego ograniczenia jest dana w postaci  $k(\Delta r)^2$ , gdzie  $\Delta r$  jest różnicą pomiędzy współrzędnymi kartezjańskimi „przytrzymywanego” atomu, a jego pozycją równowagową, a  $k$  jest „stałą siłową”; ustawiono wartość  $\{\text{RESTRAINT\_WT}\} = k = 6 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ . Konformację szkieletu peptydu opisują kąty dwuosienne: kąt  $\phi$  i kąt  $\psi$ . Wartości jakie zostały przyjęte w mojej pracy podaje Tab. 4.1.1.

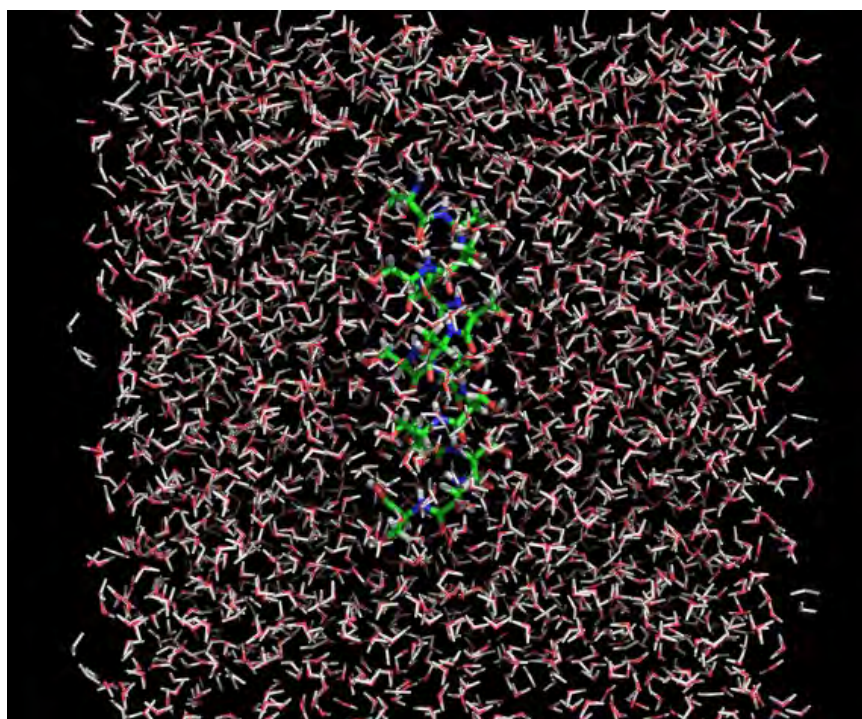
Tabela. 4.1.1. Charakterystyka badanych struktur drugorzędowych							
Lp.	Konformacja	Skretność	$\phi$ [deg]	$\psi$ [deg]	R [ $\text{\AA}$ ]	liczba reszt /zwrot	HB
1	$\alpha$ -helisa	prawo	-57	-47	2,3	3,6	$i, i+4$
2	helisa $3_{10}$	prawo	-49	-26	1,9	3,0	$i, i+3$
3	helisa PII	lewo	-75	150		3	brak
4	liniowa	-	180	180	-	-	brak

R - promień helisy



Rys. 4.1.1. Analizowane konformacje na przykładzie poliseryny. [Rysunki wykonane z użyciem programu PyMOL]

Następnie niezsolwutowany, „nieprzytrzymywany” polipeptyd poddałem krótkiej minimalizacji energii metodą najszybszego spadku (ang. *steepest descent method*), a następnie metodą zbieżnego gradientu (ang. *conjugate gradient method*), w celu relaksacji struktury łańcucha polipeptydowego (tj. usunięcia naprężeń w nim powstałych). Trzeba pamiętać, że minimalizacja energii nie prowadzi do znalezienia minimum globalnego energii potencjalnej, lecz jedynie jej minimum lokalnego. W następnym etapie umieściłem cząsteczkę polialaniny w prostopadłościennym pudełku symulacyjnym wypełnionym wodą TIP4P. Najmniejsza odległość pomiędzy ścianką pudełka a „bokiem” peptydu wynosiła 16 Å w przypadku formy liniowej, i 15 Å w przypadku helis. Jeśli chodzi natomiast o odległość pomiędzy podstawą „walca” tworzonego przez peptyd, a ścianką pudełka to wynosiła ona 10 Å. Liczbę cząsteczek wody podaje Tab. 4.1.2.



**Rys. 4.1.2.** Pudełko symulacyjne zawierające  $\alpha$ -helisę poliserynową oraz cząsteczki wody TIP4P. [Rysunek wykonano z użyciem programu PyMOL]

<b>Tabela. 4.1.2. Ilość cząsteczek wody w pudełku symulacyjnym</b>	
<b>Konformacja</b>	<b>Liczba cząsteczek wody</b>
Ala <sub>15</sub> $\alpha$ -helisa	2407 TIP4P
Ala <sub>15</sub> helisa 3 <sub>10</sub>	2566 TIP4P
Ala <sub>15</sub> helisa PII	3557 TIP4P
Ala <sub>15</sub> liniowa	3937 TIP4P
Ser <sub>15</sub> $\alpha$ -helisa	2796 TIP4P
Ser <sub>15</sub> helisa 3 <sub>10</sub>	3724 TIP4P
Ser <sub>15</sub> helisa PII	3680 TIP4P
Ser <sub>15</sub> liniowa	4036 TIP4P
Gly <sub>15</sub> $\alpha$ -helisa	2587 TIP4P
Gly <sub>15</sub> helisa 3 <sub>10</sub>	2685 TIP4P
Gly <sub>15</sub> helisa PII	3127 TIP4P
Gly <sub>15</sub> liniowa	3085 TIP4P
sbwAFP	3 Cl <sup>-</sup> + 12547 TIP5P
woda TIP4P	2410 TIP4P

W celu doprowadzenia każdego z układów do stanu równowagi, przeprowadziłem wstępną symulację (bez zapisywania trajektorii) w warunkach stałej temperatury i ciśnienia (NPT). W tych warunkach objętość każdego pudełka symulacyjnego jest regulowana (poprzez niewielkie zmiany w każdym kroku czasowym) tak, że osiągnięte ciśnienie osiąga wartość docelową równą ciśnieniu

atmosferycznemu {PRES0=1.0}. Zastosowałem tzw. izotropowe skalowanie ciśnienia {NTP=1} co oznacza, że ciśnienie ma jednakową wartość wzdłuż każdej osi. Układ był sprzężony z barostatem przy zastosowaniu algorytmu „słabego sprzężenia” (ang. *weak-coupling*). Czas relaksacji ciśnienia ustaliłem na 1 ps {TAUP=1.0}. Celem tej symulacji było doprowadzenie wody do odpowiedniej gęstości, w tym również usunięcie "bąbli" próżni [198]. Za ściśliwość układu, przyjąłem wartość dla wody TIP4P, która wynosi (w temp. 298 K)  $\kappa=60 \times 10^6 \text{ atm}^{-1}$  {COMP=60.0} (vide: Tab. 4.2.2). Zastosowano takie przybliżenie, gdyż objętość peptydu jest niewielka w porównaniu z objętością rozpuszczalnika, i stąd peptyd ma niewielki wpływ na ogólną ściśliwość. Temperaturę utrzymywałem na stałym poziomie przy zastosowaniu algorytmu słabego sprzężenia dla temperatury (ang. *weak-coupling algorithm*) {NTT=1}, analogicznego do tego co w przypadku ciśnienia. Współczynnik skalowania jest taki sam dla wszystkich atomów, co powoduje, że całkowita energia kinetyczna jest odpowiednia dla wymaganej temperatury; nie jest zapewniona natomiast równa dystrybucja temperatury na wszystkie części cząsteczek (-ki) [198]. Za temperaturę odniesienia przyjąłem temperaturę 298 K {TEMP0=298}. Za stałą czasową sprzężenia z termostatem wybrałem wartość 0,2 ps {TAUTP=0.2}. Zbyt duże wartości skutkowałyby znacznymi wahaniami energii kinetycznej, zaś zbyt małe zbyt dużymi fluktuacjami energii całkowitej [198]. Wybrana przeze mnie wartość powoduje, że zarówno fluktuacje energii kinetycznej, jak i całkowitej są stosunkowo niewielkie [200]. W przypadku, gdy rozpoczynałem dynamikę jedynie ze współrzędnych, nie mając na wejściu prędkości np. z poprzedniej dynamiki {NTX=1}, wówczas prędkości na wejściu brane były z rozkładu Maxwella dla  $T=298 \text{ K}$ . W przypadku gdy tworzyłem pliki dla powtórzenia obliczeń wówczas w celu uniknięcia sytuacji, że otrzyma się dokładnie takie same warunki dynamikę rozpoczynałem od ostatniego pliku ze współrzędnymi z poprzedniej symulacji, albo zaczynałem od tego samego pliku z tym, że prędkości wówczas przydzielano z rozkładu Maxwella dla temperatury 298 K {TEMPI = 298.0} przy wykorzystaniu pseudogenerators liczb losowych z jądrem (ang. *seed*) {IG}, innym dla każdej symulacji. Czas równoważenia w warunkach NPT wynosił 2 ns (1000 000 iteracji z krokiem czasowym 0,002 ps).

W czasie symulacji w warunkach NPT uzyskałem średnią objętość pudełka w czasie symulacji w warunkach NPT (z przedziału czasowego po wstępnym okresie równoważenia) stosując komendę {average} z modułu ptraj w pakiecie Amber 8, a następnie wykonałem symulację MD w warunkach stałej objętości i temperatury (NVT) {NTB=1}. Początkowo w tych warunkach wykonałem wstępną symulację (czas równoważenia w tych warunkach wynosił 0,3 ns; 150 000 iteracji z krokiem czasowym 0,002 ps) , a następnie rozpocząłem zapisywanie plików z trajektorią

w celu jej analizy. Symulacje przebiegały zasadniczo w takich samych warunkach jak opisana wyżej symulacja wstępna, różniły się ilością iteracji i krokiem czasowym. W rezultacie tych symulacji otrzymałem:

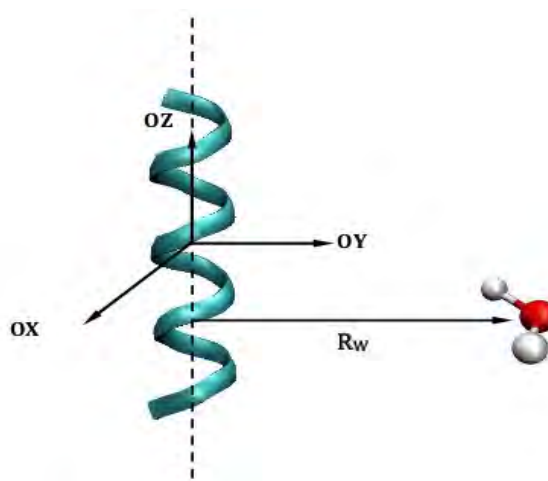
- ◆ Do obliczeń czasu życia wiązań wodorowych, funkcji autokorelacji prędkości, widm mocy prędkości i współczynników dyfuzji:  
200 plików, z których każdy zawierał 5000 następujących po sobie chwilowych konfiguracji układu (w postaci współrzędnych kartezjańskich wszystkich atomów), zapisywanych w odstępach czasowych 0,001 ps. Łączny czas symulacji wynosił 1 ns.
- ◆ Do obliczeń funkcji rozkładu gęstości, orientacji przestrzennej cząsteczek wody, energii i geometrii wiązań wodorowych:  
150 plików z zapisem trajektorii, z których każdy zawierał 5000 następujących po sobie chwilowych konfiguracji układu, zapisywanych w odstępach czasowych 0,002 ps. Łączny czas symulacji wynosił 1,5 ns.

Dla większości badanych układów zbieranie plików z zapisem trajektorii i obliczenia właściwości wody kilkakrotnie powtórzyłem w celu oszacowania rozrzutu wartości mierzonych wielkości fizycznych. Ponadto w celu uzyskania wartości gęstości wody z głębi roztworu (wody "bulk") przeprowadziłem symulację w warunkach NPT układu składającego się jedynie z 2410 cząsteczek wody TIP4P.

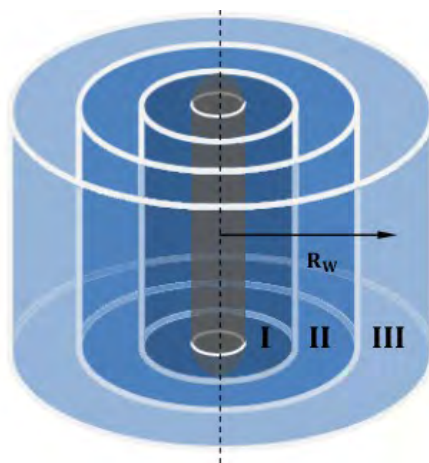
## 4.2. Analiza wyników symulacji

Poniżej omawiam sposób obliczania interesujących mnie właściwości fizycznych wody. Obliczenia te zrealizowałem dla każdego ze wspomnianych dwunastu układów. Założonym celem jest badanie właściwości otoczki solwatacyjnej wokół fragmentu cząsteczki o dobrze zdefiniowanej strukturze drugorzędowej. Zatem - w celu uniknięcia wpływu zakończeń łańcucha - w obliczeniach ograniczyłem się jedynie do wody otaczającej środkową część łańcucha ograniczoną przez współrzędne trzeciej i trzynastej reszty łańcucha składającego się z 15 aminokwasów. Zignorowałem te cząsteczki wody, których współrzędne wybiegają poza ten obszar. Dla uproszczenia cząsteczkę peptydu o zadanej konformacji potraktowałem jako walec posiadający pionową oś symetrii i stosownie do tego obliczyłem funkcję rozkładu gęstości cząsteczek wody.

Interesowały mnie zmiany właściwości fizycznych wody rozważane w funkcji odległości od osi peptydu (w kolejnych warstwach solwatacyjnych). Obliczenia rozpocząłem od wyznaczenia funkcji określającej zmiany gęstości wody w zależności od odległości od osi peptydu, dzięki czemu określiłem zasięg poszczególnych warstw hydratacyjnych poprzez położenia minimów na funkcji rozkładu radialnego.



Rys. 4.2.1. Sposób określania odległości cząsteczki wody od peptydu. [Rysunek dzięki uprzejmości Anny Kuffel]



Rys. 4.2.2. Sposób definiowania warstw solwatacji wokół cząsteczki peptydu. [Rysunek dzięki uprzejmości Anny Kuffel]

Jeżeli obliczenia badanej wielkości wymagały analizy zachowania się cząsteczki w czasie (na przykład badanie kinetyki zaniku wiązań wodorowych i współczynników dyfuzji), to molekułę przyporządkowywano do tej warstwy, w której przypadało jej średnie położenie w analizowanym odcinku czasowym.

#### 4.2.1. Funkcje rozkładu gęstości wody

Jak wspomniałem wyżej brałem pod uwagę tylko cząsteczki otaczające część środkową peptydu. Położenie cząsteczki wody w przestrzeni określiłem, podając współrzędne jej środka masy. Stosownie do założenia o walcowej symetrii cząsteczki polipeptydu zastosowałem swoisty cylindryczny układ współrzędnych, w którym zmienna  $r$  opisuje odległość wody od pionowej osi cząsteczki peptydu; wyrażenie  $g(r)2\pi r dr L$  oznacza prawdopodobieństwo znalezienia środka masy cząsteczki wody w obszarze  $dr$  dla tej odległości.

Wartość zmiennej  $r$  wyznaczamy, łącząc oś OZ peptydu ze środkiem masy cząsteczki wody wektorem  $\mathbf{R}_w$ , prostopadłym do osi OZ peptydu. Wówczas  $r=|\mathbf{R}_w|$  (Rys. 4.2.1.).

Funkcję rozkładu gęstości wody wyznaczyłem na podstawie wzoru:

$$g(r) = \frac{1}{\rho} \lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{\Delta N}{\Delta V} = \frac{1}{\rho} \frac{dN}{dV} \quad (4.2.1.1)$$

gdzie:

$\rho$  - gęstość czystej wody, wyznaczona w oddzielnej symulacji, wyrażona liczbą cząsteczek wody na jednostkę objętości

W praktyce wartość funkcji rozkładu gęstości wody wokół osi peptydu obliczyłem, używając poniższego wzoru:

$$g(r) = \frac{\langle \Delta N(r, \Delta r) \rangle}{\rho \pi h [(r + \Delta r)^2 - r^2]} \quad (4.2.1.2)$$

gdzie:

$\langle \Delta N(r, \Delta r) \rangle$  - średnia liczba cząsteczek wody zawarta w objętości  $\Delta V = \pi h [(r + \Delta r)^2 - r^2]$

L - wysokość walca

$\Delta r$  - krok obliczeń (w obliczeniach używałem kroku równego 0,005 nm)

Ponadto wyliczyłem „tradycyjne” (sferyczne) atomowe funkcje rozkładu radialnego atomów tlenu i wodoru cząsteczek wody wokół atomów tlenu karbonylowego, azotu oraz wodoru amidowego (w przypadku poliseryny także wokół tlenu hydroksylowego) korzystając ze wzoru:

$$g(r) = \frac{\langle \Delta N(r, \Delta r) \rangle}{\rho \frac{4}{3} \pi [(r + \Delta r)^3 - r^3]} \quad (4.2.1.3)$$

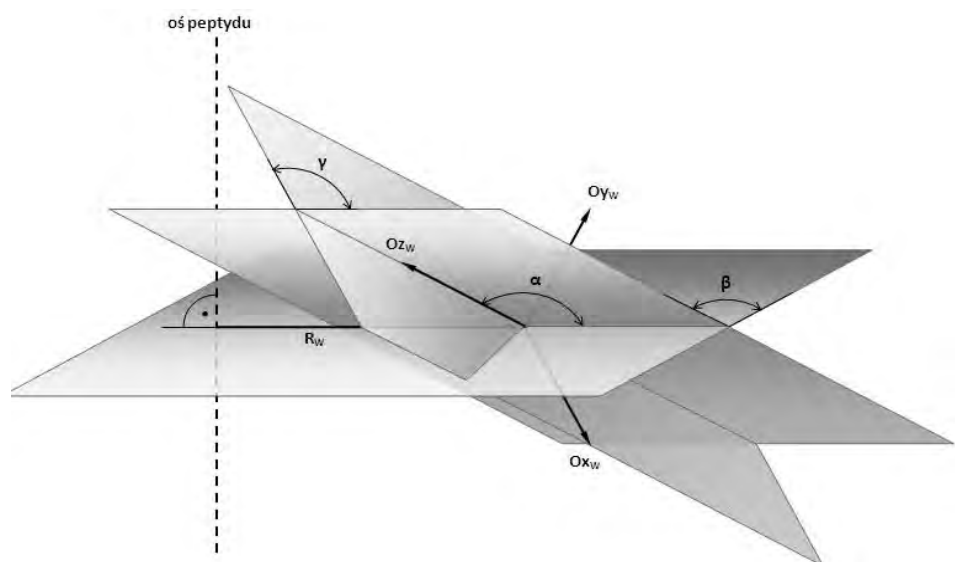
gdzie:

$\langle \Delta N(r, \Delta r) \rangle$  - średnia liczba cząsteczek wody zawarta w objętości  $\Delta V = (4/3)\pi[(r + \Delta r)^3 - r^3]$



## 4.2.2. Orientacja przestrzenna cząsteczek wody w stosunku do osi peptydu

W celu określenia orientacji przestrzennej cząsteczki wody w stosunku do osi peptydu, należało związać z każdą z nich jej własny, wewnętrzny układ współrzędnych. Układ ten skonstruowany został w następujący sposób (Rys. 4.2.2.1).



Rys. 4.2.2.1. Definicja kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . [Rysunek uzyskany dzięki uprzejmości A. Kuffel]

- 1) Początek układu pokrywa się ze środkiem masy cząsteczki wody.
- 2) Kierunki osi pokrywają się z kierunkami osi głównych tensora bezwładności i są ustawione tak, że:

$$I_x < I_y < I_z$$

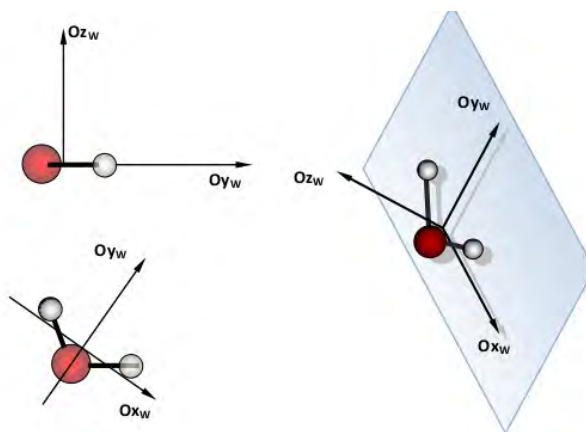
gdzie  $I_x$  oznacza moment bezwładności dla osi  $Ox_w$  cząsteczki wody,  $I_y$  dla osi  $Oy_w$ , zaś  $I_z$  dla osi  $Oz_w$  oraz układ osi jest prawoskrętny.

- 3) Jeżeli oś  $OZ$  peptydu połączymy ze środkiem masy cząsteczki wody wektorem  $\mathbf{R}_w$ , prostopadłym do osi  $OZ$  peptydu, to orientację przestrzenną cząsteczki wody w stosunku do osi peptydu będzie można określić z użyciem trzech kątów Eulera:  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$ . Zdefiniowane są one w następujący sposób (Rys. 4.2.2.1):

- ♦ Kąt  $\alpha$  – kąt pomiędzy wektorem  $\mathbf{R}_w$  a osią  $Oz_w$  cząsteczki wody. Zakres zmienności wynosi  $0^\circ \leq \alpha \leq 180^\circ$ .
- ♦ Kąt  $\beta$  – kąt pomiędzy płaszczyzną prostopadłą do osi peptydu a płaszczyzną, którą wyznaczają wektor  $\mathbf{R}_w$  i oś  $Oz_w$  cząsteczki wody. Dla  $\alpha=0^\circ$  lub  $\alpha=180^\circ$ , kąt jest

nieokreślony. Wówczas umownie przyjmujemy  $\beta=0^\circ$ . Zakres zmienności wynosi  $0^\circ \leq \beta \leq 360^\circ$ .

- ♦ Kąt  $\gamma$  – kąt pomiędzy płaszczyzną, którą wyznaczają wektor  $\mathbf{R}_w$  i oś  $Oz_w$  cząsteczki wody a płaszczyzną, którą wyznaczają osie  $Ox_w$  i  $Oz_w$  wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczki wody. Dla  $\alpha=0^\circ$  lub  $\alpha=180^\circ$ , kąt  $\gamma$  jest nieokreślony. Wówczas umownie przyjmujemy go jako kąt pomiędzy osi peptydu (czyli osią OZ) a osią  $Oy_w$  cząsteczki wody. Zakres zmienności wynosi  $0^\circ \leq \gamma \leq 360^\circ$ .



Rys. 4.2.2.2. Kierunki osi wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczki wody. [Rysunek dzięki uprzejmości A. Kuffel]

Z analizy trajektorii (rezultatów symulacji) wyznaczyłem znormalizowaną funkcję rozkładu gęstości prawdopodobieństwa  $g^{(2)}(r, \alpha, \beta, \gamma)$ , określającą względne prawdopodobieństwo (w stosunku do rozkładu przypadkowego), że cząsteczka wody znajdująca się w zadanej odległości  $r$  od osi peptydu przyjmie orientację określoną wartościami kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Pozwoliło to na określenie średniej orientacji przestrzennej cząsteczek wody w stosunku do osi peptydu w każdej warstwie solwacyjnej. Otrzymane histogramy zostały znormalizowane tak, aby - jeżeli wszystkie wartości kątów są jednakowo prawdopodobne – wszystkie wartości histogramu były równe jedności.

### 4.2.3. Miary uporządkowania wody – ich konstrukcja i implementacja

W 2006 r. zaproponowano [201] (idąc za pomysłem “diagramów uporządkowania” Torquato i wsp. [132] oraz Erringtona i Debenedettiego [131]) niekonfiguracyjną swoistą miarę dla scharakteryzowania stopnia uporządkowania strukturalnego wody TIP4P w celu określenia zmian w strukturze wody związanych z domniemanym istnieniem faz LDL oraz HDL dla różnych wartości ciśnienia i temperatury. Owa miara w odróżnieniu od innych uprzednio wykorzystywanych wielkości nie zależy od właściwości wybranej substancji, a więc jest pod względem jakościowym niezależna od uporządkowania (ang. *structurally unbiased*), co oznacza że za jej pomocą można porównywać układy zupełnie różniące się nie tylko stopniem ale i SPOSOBEM uporządkowania. To podejście wykorzystuje parę parametrów uporządkowania bazujących na dwucząstkowym wkładzie do entropii liczonych z wykorzystaniem funkcji rozkładu par cząstek (ang. *pair distribution function*). Taki wkład można bez przeszkód podzielić na część translacyjną i część orientacyjną, co umożliwia wykreślenie diagramu uporządkowania. W mojej pracy wykorzystałem te miary do określenia uporządkowania wody wokół prostych polipeptydów (Ala<sub>15</sub>, Gly<sub>15</sub>, Ser<sub>15</sub>) jak również do określenia uporządkowania wody wokół białka sbwAFP. Cel tego kryterium nie zależy od tetraedryczności układu i tak więc może to być wykorzystane dla bardziej ogólnych struktur układu. Niemniej te parametry uporządkowania są uzyskane startując od dwucząstkowych funkcji korelacji, co w niektórych przypadkach może stanowić problem. W przypadku wody funkcja rozkładu par cząsteczek jest funkcją odległości i pięciu kątów, co pozwala rozdzielić ją na dobrze znaną **radialną funkcję rozkładu** (ang. *radial distribution function*; RDF), która jest tylko funkcją odległości  $r$ ; **orientacyjną funkcję rozkładu** (ang. *orientational distribution function*; ODF), która w moim przypadku dla danej odległości  $r$  pomiędzy cząsteczkami określa rozmieszczenie tych cząsteczek względem siebie i jest funkcją trzech współrzędnych sferycznych ( $r$ ,  $\varphi$ ,  $\theta$ ) oraz **konfiguracyjną funkcję rozkładu** (ang. *configurational distribution function*, CDF), która określa ułożenie cząsteczki wody względem drugiej cząsteczki i która dla danych współrzędnych sferycznych ( $r$ ,  $\varphi$ ,  $\theta$ ) jest funkcją trzech kątów Eulera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) [202].

Jak wiadomo z termodynamiki statystycznej funkcja rozdziału zawiera całą informację potrzebną do określenia właściwości termodynamicznych układu niezależnych cząstek, w tym także entropii; jej otrzymanie nie jest jednak zazwyczaj sprawą prostą. Jednym z podejść jest wyrażenie, funkcji rozdziału, a przez to entropii poprzez  $n$ -cząstkowe funkcje korelacji. Zanim przejdę do omawiania badanych układów najpierw przedstawię sytuację w przypadku prostszych układów.

#### a) układ jednoskładnikowy; cząstki jednoatomowe

Rozważmy najpierw zespół kanoniczny zawierający N cząsteczek jednoatomowych w objętości V, z hamiltonianem  $H_N$  danym przez

$$H_N = \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m} + U_N \quad (4.2.3.1)$$

gdzie m jest masą cząstki,  $p_k$  oznacza ich pędy, zaś  $U_N$  jest całkowitą energią potencjalną układu.

W przypadku zespołu kanonicznego składającego się z JEDNEGO rodzaju cząstek JEDNOATOMOWYCH, kanoniczna funkcja prawdopodobieństwa jest dana następującą zależnością:

$$P_N = \frac{e^{-H_N/(k_B T)}}{Z_N} \quad (4.2.3.2)$$

$k_B$  - stała Boltzmana

T- temperatura

$Z_N$  - kanoniczna funkcja rozdziału, którą można wyrazić jako

$$Z_N = \frac{1}{h^{3N} N!} \int \dots \int e^{-H_N/(k_B T)} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{p}_1 \dots d\mathbf{r}_N d\mathbf{p}_N \quad (4.2.3.3a)$$

$$Z_N = \int e^{-H_N/kT} d\tilde{\Omega} = \frac{1}{N! h^{3N}} \int e^{-H_N/kT} d\mathbf{r} d\mathbf{p} \quad (4.2.3.3b)$$

gdzie:

$$d\tilde{\Omega} = \frac{1}{N! h^{3N}} d\mathbf{r} d\mathbf{p} = \frac{1}{N! h^{3N}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N d\mathbf{p}_1 d\mathbf{p}_2 \dots d\mathbf{p}_N \quad (4.2.3.3c)$$

h – stała Plancka

$N!$  - wynika z nierozróżnialności cząstek (permutacja), (gdyż jak już wspomniałem mamy do czynienia z układem jednoskładnikowym)

$$d\mathbf{r} = d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N$$

$$d\mathbf{p} = d\mathbf{p}_1 d\mathbf{p}_2 \dots d\mathbf{p}_N \quad (4.2.3.3d)$$

$$d\mathbf{r}_i = d x_i d y_i d z_i$$

$$d\mathbf{p}_i = d p_{x,i} d p_{y,i} d p_{z,i}$$

N – liczba cząstek w układzie

$$\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N - \text{współrzędne przestrzenne cząstek} \quad (4.2.3.3e)$$

$$\mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{p}_N - \text{pędy cząstek}$$

W przypadku zespołu kanonicznego entropię można powiązać z funkcją rozdziału poprzez następujące równanie:

$$S_N = -k_B \int P_N \ln P_N d\Omega \quad (4.2.3.4a)$$

$$S_N = \frac{-k_B}{h^{3N} N!} \int \dots \int P_N \ln P_N d\mathbf{r}_1 d\mathbf{p}_1 \dots d\mathbf{r}_N d\mathbf{p}_N \quad (4.2.3.4b)$$

Zanim przejdę do funkcji korelacji, na początek zdefiniujmy sobie równowagową gęstość prawdopodobieństwa dla nierozróżnialnych cząstek:

$f_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \mathbf{p}_n)$  jest gęstością prawdopodobieństwa zespołu, że punkt w przestrzeni fazowej  $\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \mathbf{p}_n$  jest zajęty (przez pewne  $n$  cząstek w pewnej konfiguracji).

Dla  $n=N$  gęstość prawdopodobieństwa wynosi

$$f_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{p}_N) = \frac{e^{-H_N/(k_B T)}}{h^{3N} Z_N} \quad (4.2.3.5)$$

i spełnia warunek normalizacyjny, który oznacza po prostu permutację uwzględniającą ilość cząstek i ich nierozróżnialność

$$\int \dots \int f_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{p}_N) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{p}_1 \dots d\mathbf{r}_N d\mathbf{p}_N = N! \quad (4.2.3.6)$$

Wstawienie równania (4.2.3.5) do równania (4.2.3.3) a następnie do równania (4.2.3.4) uzyskujemy następujący wzór na entropię:

$$S_N = -\frac{k_B}{N!} \int \dots \int f_N^{(N)} \ln h^{3N} f_N^{(N)} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{p}_1 \dots d\mathbf{r}_N d\mathbf{p}_N \quad (4.2.3.7)$$

Zastanówmy się jak obliczyć  $f_N^{(N)}$ . Dla  $n < N$  równowagowa gęstość prawdopodobieństwa wynosi

$$f_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \mathbf{p}_n) = \frac{1}{(N-n)!} \int \dots \int f_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{p}_N) d\mathbf{r}_{n+1} d\mathbf{p}_{n+1} \dots d\mathbf{r}_N d\mathbf{p}_N \quad (4.2.3.8)$$

Oznacza to, że  $N$ -cząstkową gęstość prawdopodobieństwa  $f_N^{(N)}$  z równania (4.2.3.5) można rozłożyć na iloczyn jednocząstkowych gęstości prawdopodobieństwa  $f_N^{(1)}$  oraz członu uwzględniającego geometryczne korelacje pomiędzy cząstkami:

$$f_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{p}_N) = f_N^{(1)}(\mathbf{p}_1) \dots f_N^{(1)}(\mathbf{p}_N) \times g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (4.2.3.9)$$

przy czym

$$f_N^{(1)}(\mathbf{p}) = \rho_N (2\pi m k_B T)^{-3/2} e^{-p^2/(2k_B T m)} \quad (4.2.3.10)$$

gdzie  $\rho_N = N/V$  jest równowagową gęstością (liczbową) cząstek.

Równanie (4.2.3.9) stanowi definicję funkcji korelacji  $N$  cząstek  $g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$  :

$$g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \equiv \frac{f_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_N, \mathbf{p}_N)}{f_N^{(1)}(\mathbf{p}_1) \times \dots \times f_N^{(1)}(\mathbf{p}_N)} \quad (4.2.3.11)$$

W ten sam sposób definiuje się funkcje korelacji  $n$  cząstek  $g_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)$  :

$$g_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) \equiv \frac{f_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{p}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \mathbf{p}_n)}{f_N^{(1)}(\mathbf{p}_1) \times \dots \times f_N^{(1)}(\mathbf{p}_n)} \quad (4.2.3.12)$$

z równań (4.2.3.8), (4.2.3.9), (4.2.3.10), (4.2.3.12) mamy

$$g_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) = \frac{\rho_N^{N-n}}{(N-n)!} \int \dots \int g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) d\mathbf{r}_{n+1} \dots d\mathbf{r}_N \quad (4.2.3.13)$$

W płynach rzeczywistych (w przeciwieństwie do gazu doskonałego) mamy do czynienia z oddziaływaniami pomiędzy cząstkami. W wyniku tego położenia cząstek zależą w pewien sposób od siebie, a więc ma miejsce korelacja położzeń. Jak można się spodziewać największy udział mają korelacje dwucząstkowe, mniejszy trójcząstkowe, jeszcze mniejszy czterocząstkowe itd. Dla zobrazowania istoty rzeczy pozostaną na razie przy przypadku, gdy mamy do czynienia z jednym rodzajem cząstek jednoatomowych (np. w przypadku gazów szlachetnych).

n-cząstkową funkcję korelacji  $g^{(n)}$  można powiązać z funkcją  $f^{(n)}$  gęstości prawdopodobieństwa znalezienia n-cząstek (jakichkolwiek i w dowolnej konfiguracji) w punktach o współrzędnych  $\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n$ , przy czym zarówno pędy tych cząstek jak i położenia oraz pędy pozostałych N-n cząsteczek są dowolne

$$f_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) = f_N^{(1)}(\mathbf{r}_1) \cdot \dots \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{r}_n) g_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) = \rho_N^n g_N^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n) \quad (4.2.3.14)$$

$g^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)$  - określa względne prawdopodobieństwo znalezienia dowolnej cząstki w punkcie  $\mathbf{r}_n$ , jeżeli wiadomo, że w punktach  $\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_{n-1}$  znajdują się już jakieś cząstki. W przypadku jednorodnej i izotropowej cieczy  $\rho_N = \text{const}$  i funkcja  $g^{(2)}$  jest zależna jedynie od odległości pomiędzy dwoma cząstkami i staje się po prostu funkcją rozkładu radialnego

$$g^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = g^{(2)}(r) \quad (4.2.3.15a)$$

$$r = |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2| \quad (4.2.3.15b)$$

Oczywiście mamy zawsze  $g^{(1)}=1$

Pomiędzy cząsteczkową funkcją rozdziału zespołu kanonicznego  $\rho$ , a N-cząstkową funkcją korelacji zachodzi następujący związek:

$$P_N = e^{-E_k/kT} \lambda_T^{3N} f^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \rho_d^N e^{-E_k/kT} \lambda_T^{3N} g^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (4.2.3.16)$$

Związek pomiędzy topologią i termodynamiką jest zresztą czymś czego można się intuicyjnie spodziewać, a więc to równanie jest tylko tego ucieleśnieniem.

Powstaje pytanie – jak obliczyć wartość  $g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$  ?

Wyobraźmy sobie, że mamy trzy punkty o współrzędnych odpowiednio  $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3$  wówczas zakładając, że jedna cząstka znajduje się w punkcie  $\mathbf{r}_1$  - prawdopodobieństwo znalezienia drugiej w  $\mathbf{r}_2$ , i jednocześnie trzeciej w  $\mathbf{r}_3$  będzie równe

$$g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_3) g_N^{(2)}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) \quad (4.2.3.17)$$

pod jednym wszakże istotnym warunkiem – prawdopodobieństwa  $g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$  i  $g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_3)$  opisują zdarzenie niezależne. Tak jednak w rzeczywistości nie jest, gdyż zaniedbują oddziaływania trójcząstkowe. Powyższe równanie będzie jednak prawdziwe gdy zapiszę je w następującej postaci:

$$g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) = g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_3) g_N^{(2)}(\mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) \delta g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) \quad (4.2.3.18)$$

Powyższe rozumowanie można przenieść na wyższe funkcje korelacji ostatecznie sprowadzając je do iloczynu funkcji dwucząstkowych z odpowiednią liczbą członów korekcyjnych  $\delta g^{(n)}$ ; w ogólnym przypadku (po zlogarytmowaniu obu stron) otrzymujemy:

$$\ln g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = \binom{N}{2} \ln g_N^{(2)} + \binom{N}{3} \ln \delta g_N^{(3)} + \binom{N}{4} \ln \delta g_N^{(4)} + \dots \quad (4.2.3.19)$$

$g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N)$  można rozłożyć następująco [203]:

$$g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) = g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \dots g_N^{(2)}(\mathbf{r}_{N-1}, \mathbf{r}_N) \delta g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) \dots \delta g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (4.2.3.20)$$

Wykorzystując (4.2.3.9), wyrażenie podcałkowe w (4.2.3.7) możemy zapisać jako:

$$\sum_{k=1}^N \ln h^3 f_N^{(1)}(\mathbf{p}_k) + \ln g_N^{(N)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (4.2.3.20B)$$

które to wykorzystując równanie (4.2.3.19) możemy przedstawić w postaci szeregu

$$N \ln h^3 f_N^{(1)}(\mathbf{p}) + \binom{N}{2} \ln g_N^{(2)} + \binom{N}{3} \ln \delta g_N^{(3)} + \binom{N}{4} \ln \delta g_N^{(4)} + \dots \quad (4.2.3.20C)$$

Wstawiając to równanie i równanie (4.2.3.9) do równania (2.11) i całkując z pomocą równania (4.2.3.13) entropię kanoniczną możemy wyrazić jako:

$$S_N = -\frac{N k_B}{\rho_N} \int f_N^{(1)}(\mathbf{p}) \ln h^3 f_N^{(1)}(\mathbf{p}) d\mathbf{p} - \frac{k_B \rho_N^2}{2!} \iint g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 - \frac{k_B \rho_N^3}{3!} \iiint g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) \delta g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 d\mathbf{r}_3 - \dots \quad (4.2.3.21)$$

W wyniku scałkowania pierwszego członu z wykorzystaniem równania (4.2.3.10) otrzymujemy jednocząstkowy wkład do entropii:

$$S_N^{(1)} = N k_B \left[ \frac{3}{2} - \ln \rho_N \lambda^3 \right] \quad (4.2.3.22)$$

gdzie  $\lambda = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k T}}$  jest długością cieplnej fali de Broglie'a cząsteczki

W rezultacie wyrażenie na entropię można przedstawić w postaci

$$\frac{S_N}{N k_B} = \left( \frac{3}{2} - \ln \rho_N \lambda^3 \right) - \frac{\rho_N^2}{2!} \iint g_N^{(2)} \ln g_N^{(2)} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 - \frac{\rho_N^3}{3!} \iiint g_N^{(3)} \ln \delta g_N^{(3)} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 d\mathbf{r}_3 - \dots$$

$$= \frac{S^{(1)} + S^{(2)} + S^{(3)} + S^{(4)} + \dots}{N k_B} \quad (4.2.3.23)$$

Pierwszy człon  $S^{(1)}$ ; w nawiasie z lewej strony) różni się nieco od entropii gazu doskonałego; kolejne człony pokazują kolejno wkłady pochodzące od oddziaływań dwucząstkowych, trójcząstkowych itd. Człon  $S^{(1)}$  ma nieco niższą wartość niż entropia gazu doskonałego  $S^{\text{id}}$  (o  $N$ ), co wynika z własności zespołu kanonicznego (entropia ta jest „ukryta” we wkładach wielocząstkowych), a więc suma wkładów wielocząstkowych w powyższym równaniu jest wyższa niż entropia nadmiarowa  $S^E$ , co oznacza jednocześnie, że wkłady wielocząstkowe mają w rzeczywistości niższą wartość [203]. Przyczyną tego jest zachowanie się funkcji  $g^{(n)}$  w granicach dużych odległości. W przypadku gazu doskonałego funkcje  $g^{(n)}$  rzeczywiście są stałe, lecz nie są równe jedności, lecz jedynie zbliżają się do tej wartości gdy  $N$  jest nieskończenie duże. Nie osiągnięcie wartości 1 powoduje, że wkład do poszczególnych całek pochodzi nie tylko od najbliższego otoczenia podukładu  $n$  cząstek, lecz od CAŁEJ objętości układu. W rezultacie poszczególne człony przyjmują postać [204][205]:

$$\begin{aligned} S^{(1)} &= N k_B \left( \frac{5}{2} - \ln \rho_N \lambda^3 \right) \\ S^{(2)} &= -\frac{1}{2!} N k_B \rho_N \int \int [g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) - g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1] d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\ S^{(3)} &= -\frac{1}{3!} N k_B \rho_N^2 \int \int \int \{g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) \ln \delta g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) - [g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3) - 3g_N^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_3) + 3g_N^{(3)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) - 1]\} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 d\mathbf{r}_3 \\ S^{(4)} &= \dots \end{aligned} \quad (4.2.3.24)$$

Problemu tego unika się gdy rozważa się wielki zespół kanoniczny. Formalna równoważność pomiędzy wyrażeniem dla zespołu kanonicznego i wielkiego zespołu kanonicznego została pokazana przez Baranyai'ego i Evansa [205]. Badania przeprowadzone przez Wallace'a [203] pokazały, że wkłady pochodzące od oddziaływań trójcząstkowych i wyższych wydają się zanedbywalne (obecnie uważa się, że warunkach niezbyt dużych gęstości oraz daleko od punktu krytycznego lub punktu zamarzania w przypadku prostych płynów, nie przekraczają one 15%) [205][192][203], zaś w przypadku wody TIP4P 20% [206][201]. To założenie jest podstawą PRZYBLIŻENIA DWUCZĄSTKOWEGO, czyli przybliżania nadmiarowej entropii mieszania  $S^E$  za pomocą  $S^{(2)}$  mającego wartość ujemną, którą oszacowano dla dość znaczącej liczby płynów modelowych oraz rzeczywistych [207][208][209]:

$$S^E = S^{(2)} + S^{(3)} + S^{(4)} + \dots \simeq S^{(2)} \quad (4.2.3.25)$$

Pozostała część szeregu zwana **resztkową entropią wielocząstkową** (ang. *residual multiparticle*



*entropy*) zawiera z definicji, kumulacyjny wkład wszystkich korelacji wklajających więcej niż dwie cząstki

$$\Delta S \equiv S^E - S^{(2)} \quad (4.2.3.26)$$

Pomimo mniejszego znaczenia pod względem ilościowym, ta część entropii zawiera informację o korelacjach wyższego rzędu, które można powiązać z JAKOŚCIOWYMI zmianami w uporządkowaniu cząsteczek [210][209][206]. Dwoma najbardziej widocznymi właściwościami  $\Delta S(\rho)$  jest przebieg niemonotoniczny i zmiana znaku, która następuje w pobliżu punktu zamarzania szacowanego przez obliczenia komputerowe [210]. Zerowa wartość  $\Delta S$  jest czułym zwiastunem – (w pobliskim zakresie gęstości i/lub temperatur) przejścia fazowego w pełni nieuporządkowanego płynu w bardziej uporządkowaną fazę [206]. Wielkość  $\Delta S(\rho)$  odzwierciedla poprzez zerowe wartości samej funkcji jak i jej pochodnych, wszystkie granice pomiędzy odmiennymi strukturalnymi i dynamicznymi reżimami wykazywanymi przez substancję. Rząd pochodnej, której wartość jest równa zero zmniejsza się wraz ze wzrostem gęstości – co wskazuje coraz wyraźniejszą zmianę struktury układu – aż funkcja osiąga wartość zero w pobliżu punktu zamarzania [210][209]. Trzeba jednak podkreślić, że zerowa wartość  $\Delta S$  niekoniecznie musi przypadać “dokładnie” w termodynamicznym progu przejścia fazowego, choć ma to miejsce w przypadku prostych układów np. składających się ze sztywnych kul [210], ale nie tylko [209][211][212][213][214][215][216][217][218][219]. Jako takie zero  $\Delta S$  sygnalizuje nastanie takiej zmiany w strukturze, który “zwiastuje” przejście fazowe, które przechodzi nieuporządkowana faza [220] np. w przypadku modelu wody TIP4P  $\Delta S=0$  bardzo blisko temp. maksymalnej gęstości [206].

Baranyai i Evans wykazali, że podobnie jak wkład dwucząstkowy  $S^{(2)}$ , wkład trójcząstkowy  $S^{(3)}$  ma wartość ujemną i jest (w danej temperaturze) monotonicznie malejącą funkcją gęstości [210][209]. Przy wysokich gęstościach, w pobliżu linii zamarzania, cząstkowa suma ( $S^{(2)} + S^{(3)}$ ) jest nieco bardziej ujemna aniżeli całkowita entropia nadmiarowa [210][209], co oznacza że na skalę lokalną powyżej tego progu strata entropii spowodowana lokalizacją ( $s_2 < 0$ ) jest znoszona przez zysk związany z uporządkowaniem płynu na skalę lokalną ( $\Delta S > 0$ ) [210].

Powyższe równania są słuszne w przypadku, gdy mamy do czynienia z jednym rodzajem cząstek; na dodatek składających się tylko z jednego atomu a więc takich jak np. argon. W przypadku, gdy mamy mieszaninę cząstek i/lub mamy do czynienia z cząsteczkami (składającymi się z wielu atomów), przybliżenie dwucząstkowe nadal jest do przyjęcia, aczkolwiek postać wyrażenia na entropię staje się bardziej zawiła.

## b) układ dwuskładnikowy; cząstki jednoatomowe

Postępując w sposób podobny do tego przedstawionego dla układu jednoskładnikowego otrzymano [221][217][218] następującą postać wyrażenia na entropię dla układu DWUSKŁADNIKOWEGO; przy czym, co trzeba zaznaczyć w poniższym równaniu oba składniki są złożone z cząstek JEDNOATOMOWYCH:

$$S = S^{(1)} + S^{(2)} + S^{(3)} + S^{(4)} + \dots \quad (4.2.3.27)$$

przy czym:

$$\begin{aligned} \frac{S^{(1)}}{k_B} &= N_A \left[ \frac{5}{2} - \ln x_A \rho_N \lambda_A^3 \right] + (N - N_A) \left[ \frac{5}{2} - \ln x_B \rho_N \lambda_B^3 \right] \\ \frac{S^{(2)}}{N k_B} &= -\frac{\rho_N x_A^2}{2!} \int \int \{ g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln [g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)] - g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1 \} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\ &\quad - \frac{\rho_N x_B^2}{2!} \int \int \{ g_{BB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln [g_{BB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)] - g_{BB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1 \} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\ &\quad - \rho_N x_A x_B \int \int \{ g_{AB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln [g_{AB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)] - g_{AB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1 \} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\ \frac{S^{(3)}}{k_B} &= \dots \end{aligned} \quad (4.2.3.28)$$

$$x_A = \frac{N_A}{N} \quad x_B = \frac{N_B}{N} = \frac{N - N_A}{N} \quad \rho = \frac{N}{V} = \frac{N_A + N_B}{V} \quad (4.2.3.29)$$

$N_A$  - liczba cząsteczek składnika A

$N_B = N - N_A$  - liczba cząsteczek składnika B

Entropię mieszania można obliczyć jako różnicę:

$$\Delta S = S - S_A - S_B \quad (4.2.3.30)$$

Ograniczenie się jedynie do wkładów jednocząstkowych prowadzi do znanego skądinąd wyrażenia na idealną entropię mieszania:

$$\begin{aligned} \frac{S_{mix}^{(1)}}{k_B} &= \frac{5}{2} (N_A + N_B) - N_A \ln \rho_A \lambda_A^3 - N_B \ln \rho_B \lambda_B^3 \\ \frac{S_A^{(1)}}{k_B} &= N_A \left[ \frac{5}{2} - \ln \rho_{0A} \lambda_A^3 \right] \quad \frac{S_B^{(1)}}{k_B} = N_B \left[ \frac{5}{2} - \ln \rho_{0B} \lambda_B^3 \right] \\ \frac{\Delta S_{id}}{k_B} &= \frac{S_{mix}^{(1)} - S_A^{(1)} - S_B^{(1)}}{k_B} = -N_A \ln \frac{\rho_A}{\rho_{0A}} - N_B \ln \frac{\rho_B}{\rho_{0B}} = -N_A \ln \frac{V_A}{V} - N_B \ln \frac{V_B}{V} \\ \frac{\Delta S_{id}}{N} &= -x_A \ln \frac{V_A}{V} - x_B \ln \frac{V_B}{V} \quad N = N_A + N_B \end{aligned} \quad (4.2.3.31)$$

$\rho_{0i}$  - gęstość (liczbowa) czystego składnika  $i$

Jeżeli nie ograniczymy się do wkładów jednocząstkowych, wówczas różnica  $\Delta S - \Delta S^{(1)}$  jest po prostu nadmiarową entropią mieszania  $S^E$ ; możemy wobec tego napisać:

$$S^E = \Delta S^{(2)} + \Delta S^{(3)} + \Delta S^{(4)} + \dots \quad (4.2.3.32)$$

zaś powyższa zależność pokazuje pochodzenie entropii nadmiarowej mieszania jako skutku sumy oddziaływań wielocząstkowych (dwucząstkowych, trójcząstkowych itd.) w roztworze. W wyniku ograniczenia się jedynie do członu dwucząstkowego otrzymamy

$$\begin{aligned} \frac{S^E}{N k_B} &= -\frac{\rho_N x_A^2}{2!} \int \int \{g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln[g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)] - g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1\} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\ &- \frac{\rho_N x_B^2}{2!} \int \int \{g_{BB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln[g_{BB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)] - g_{BB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1\} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \\ &- \rho_N x_A x_B \int \int \{g_{AB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) \ln[g_{AB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)] - g_{AB}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) + 1\} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \end{aligned} \quad (4.2.3.33)$$

Pozostaje jeszcze problem techniczny obliczenia powyższych całek. Mamy mianowicie

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_{12} &= \mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2 \quad r = |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2| \\ \int \int g^{(2)}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 &= \int \int g^{(2)}(r) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 = \int \left[ \int g^{(2)}(r) d\mathbf{r}_{12} \right] d\mathbf{r}_1 = \int d\mathbf{r}_1 \cdot \int g^{(2)}(r) d\mathbf{r}_{12} = \\ V \int g^{(2)}(r) d\mathbf{r}_{12} &= V \int g^{(2)}(r) 4\pi r^2 dr \end{aligned} \quad (4.2.3.34)$$

Ostatecznie więc wyrażenie określające nadmiarową entropię mieszania (dla cząstek o symetrii kulistej) w przybliżeniu dwucząstkowym przyjmuje postać

$$\begin{aligned} \frac{S^E}{N k_B} &= -2\pi\rho_N x_A^2 \int \{g_{AA}(r) \ln[g_{AA}(r)] - g_{AA}(r) + 1\} r^2 dr \\ &- 2\pi\rho_N (1 - x_A)^2 \int \{g_{BB}(r) \ln[g_{BB}(r)] - g_{BB}(r) + 1\} r^2 dr \\ &- 4\pi\rho_N x_A (1 - x_A) \int \{g_{AB}(r) \ln[g_{AB}(r)] - g_{AB}(r) + 1\} r^2 dr \end{aligned} \quad (4.2.3.35)$$

### c) układ jednoskładnikowy; cząsteczki (składające się z wielu atomów)

Zanim powrócę do mojego układu rozpatrzmy jeszcze układ jednoskładnikowy składający się z cząsteczek. W tym przypadku kanoniczną funkcję rozdziału  $p$  można zapisać jako:

$$P_N = \frac{e^{-H_N/(k_B T)}}{Z_N} \quad (4.2.3.36)$$

przy czym:

$$Z_N = \int e^{-H_N/(k_B T)} d\tilde{\Omega} = \frac{\int \int \int \int e^{-H_N/(k_B T)} d\mathbf{r} d\mathbf{p} d\boldsymbol{\omega} d\mathbf{J}}{N! h^{3N} \sigma^N}$$

$$d\tilde{\Omega} = \frac{1}{N! h^{sN} \sigma^N} d\mathbf{r} d\mathbf{p} d\bar{\omega} d\mathbf{J} \quad (4.2.3.37)$$

s – liczba stopni swobody (=5 dla cząstek liniowych; =6 dla cząstek nieliniowych)

$\sigma$  – liczba symetrii podająca ilość nieodróżnialnych orientacji cząsteczki (dla wody  $\sigma_w=2$ ; dla peptydu zazwyczaj  $\sigma_p=1$ )

W sytuacji gdy mamy do czynienia z płynem JEDNOSKŁADNIKOWYM n-cząstkowa funkcja korelacji przybiera następującą postać:

$$f^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \bar{\omega}_1, \dots, \bar{\omega}_n) = f^{(1)}(\mathbf{r}_1, \bar{\omega}_1) \cdot \dots \cdot f^{(1)}(\mathbf{r}_n, \bar{\omega}_n) \cdot g^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \bar{\omega}_1, \dots, \bar{\omega}_n) = \frac{\rho_d^n \sigma^n}{\Omega^n} g^{(n)}(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n, \bar{\omega}_1, \dots, \bar{\omega}_n) \quad (4.2.3.38a)$$

gdzie (w wyniku całkowania po kątach) mamy:

$$\Omega = \int d\bar{\omega} = 4\pi \quad (\text{dla cz. liniowych})$$

$$\Omega = \int d\bar{\omega} = 8\pi^2 \quad (\text{dla cz. nieliniowych}) \quad (4.2.3.38b)$$

Postępując analogicznie jak poprzednio tzn. wstawiając funkcję (4.2.3.38) (dla  $n=N$ ) do wyrażenia na funkcję rozdziału (4.2.3.36), a następnie z funkcji rozdziału licząc entropię; a także uwzględniając jak uprzednio poprawkę na zachowanie się n-cząstkowych funkcji korelacji w granicy dużych odległości wkład jednocząstkowy i dwucząstkowy do entropii możemy wyrazić jako:

$$S^{(1)} = N k_B \left[ \frac{s}{2} - \ln \left( \frac{\rho_d \sigma}{\Omega} \Xi \lambda^3 + 1 \right) \right] \quad (4.2.3.39b)$$

$$S^{(2)} = -\frac{1}{2!} N k_B \left( \frac{\rho_N}{\Omega} \right)^2 \int \int \int \int \{ g_N(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \omega_1, \omega_2) \ln [g_{AA}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \omega_1, \omega_2)] - g_N(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \omega_1, \omega_2) + 1 \} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 d\omega_1 d\omega_2 \quad (4.2.3.39c)$$

przy czym

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}} \quad \text{długość cieplnej fali de Broglie'a cząsteczki; m-masa cząstki} \quad (4.2.3.40a)$$

$$\Xi = \frac{h^3}{(2\pi I_x k_B T)^{1/2} (2\pi I_y k_B T)^{1/2} (2\pi I_z k_B T)^{1/2}} \quad (\text{dla cz. nieliniowych}) \quad (4.2.3.40b)$$

$$\Xi = \frac{h^2}{2\pi I_0 k_B T} \quad (\text{dla cz. liniowych}) \quad (4.2.3.40c)$$

$I_i$  – oznaczają momenty bezwładności

**d) Wykorzystanie przybliżenia dwucząstkowego do stworzenia miar uporządkowania wody wokół prostych polipeptydów**

W mojej pracy mam do czynienia z peptydem zanurzonym w wodzie, a więc mam dwa rodzaje cząsteczek, które na dodatek składają się z wielu atomów. W przypadku cząsteczek (molekuł) mamy do czynienia nie tylko z ruchem postępowym, ale także z obrotowym, a także ruchami drgającymi (zginającymi i rozciągającymi) wewnątrz cząsteczki. Ponieważ stosuję procedurę SHAKE, te ostatnie nie występują w analizowanych przeze mnie cząsteczkach wody, podobnie jest z rozważaną przeze mnie cząsteczką peptydu; więc zarówno peptyd jak i wodę mogę potraktować jako bryły sztywne. Potrzebuję więc jeszcze oprócz 3N współrzędnych położenia  $\mathbf{r}_i=(x_i, y_i, z_i)$  i 3N „współrzędnych” pędu  $\mathbf{p}_i=(p_{x,i}, p_{y,i}, p_{z,i})$  jeszcze dodatkowych 3N zmiennych opisujących orientację  $\bar{\omega}$  oraz 3N „współrzędnych” wektora momentu pędu  $\mathbf{J}_i=(J_{x,i}, J_{y,i}, J_{z,i})$ .

Dla dwuskładnikowej mieszaniny cząstek wieloatomowych można znaleźć wzór analogiczny do wzoru (4.2.3.29) korzystając z równania (4.2.3.39), ponadto odniosę się bezpośrednio do mojego układu, za jeden rodzaj cząsteczek uznając peptyd (P), zaś za drugi wodę (W). Biorąc to pod uwagę mogę napisać (stosując jednocześnie przybliżenie dwucząstkowe tzn. omijając funkcje korelacji  $g^{(n)}$  dla  $n>2$ ):

$$S^{(1)} = N_P k_B \left[ \frac{S_P}{2} - \ln \left( \frac{\rho_P \sigma_P}{\Omega} \lambda_P^3 \Xi_P \right) + 1 \right] + N_W k_B \left[ \frac{S_W}{2} - \ln \left( \frac{\rho_W \sigma_W}{\Omega} \lambda_W^3 \Xi_W \right) + 1 \right] \quad (4.2.3.41a)$$

$$\begin{aligned} \frac{S^{(2)}}{N k_B} &= -\frac{\rho_P^2}{2! \Omega^2} \int \int \int \int \{g_{PP}^{(2)}(\mathbf{r}_{P1}, \mathbf{r}_{P2}, \bar{\omega}_{P1}, \bar{\omega}_{P2}) \ln [g_{PP}^{(2)}(\mathbf{r}_{P1}, \mathbf{r}_{P2}, \bar{\omega}_{P1}, \bar{\omega}_{P2})] - g_{PP}^{(2)}(\mathbf{r}_{P1}, \mathbf{r}_{P2}, \bar{\omega}_{P1}, \bar{\omega}_{P2}) + 1\} d\mathbf{r}_{P1} d\mathbf{r}_{P2} d\bar{\omega}_{P1} d\bar{\omega}_{P2} \\ &- \frac{\rho_P \rho_W}{\Omega^2} \int \int \int \int \{g_{PW}^{(2)}(\mathbf{r}_P, \mathbf{r}_W, \bar{\omega}_P, \bar{\omega}_W) \ln [g_{PW}^{(2)}(\mathbf{r}_P, \mathbf{r}_W, \bar{\omega}_P, \bar{\omega}_W)] - g_{PW}^{(2)}(\mathbf{r}_P, \mathbf{r}_W, \bar{\omega}_P, \bar{\omega}_W) + 1\} d\mathbf{r}_P d\mathbf{r}_W d\bar{\omega}_P d\bar{\omega}_W \\ &- \frac{\rho_W^2}{2! \Omega^2} \int \int \int \int \{g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \bar{\omega}_{W1}, \bar{\omega}_{W2}) \ln [g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \bar{\omega}_{W1}, \bar{\omega}_{W2})] - g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \bar{\omega}_{W1}, \bar{\omega}_{W2}) + 1\} d\mathbf{r}_{W1} d\mathbf{r}_{W2} d\bar{\omega}_{W1} d\bar{\omega}_{W2} \\ &= S_{PP}^{(2)} + S_{PW}^{(2)} + S_{WW}^{(2)} \end{aligned} \quad (4.2.3.41b)$$

gdzie  $g^{(2)}$  symbolizuje dwucząstkową funkcję korelacji zależną od pozycji w przestrzeni  $\mathbf{r}$  i orientacji  $\bar{\omega}$ , zarówno cząsteczki peptydu jak i wody.

Ponieważ liczba stopni swobody  $s_P=s_W=6$ ,  $\sigma_W=2$ , a  $\sigma_P=1$ ; mogę przepisać wyrażenie (równe w przybliżeniu entropii gazu doskonałego) (4.2.3.41b) w postaci:

$$\frac{S^{(1)}}{k_B} = N_P \left[ 4 - \ln \left( \frac{\rho_P}{\Omega} \lambda_P^3 \Xi_P \right) \right] + N_W \left[ 4 - \ln \left( \frac{2\rho_W}{\Omega} \lambda_W^3 \Xi_W \right) \right] \quad (4.2.3.42)$$

Poszczególne składowe we wzorze (4.2.3.41b) mogą służyć jako miary lokalnego uporządkowania jeśli będziemy je całkować nie po całej przestrzeni, ale w określonym zakresie odległości  $r$ .

**e) Człon  $s_{PP}^{(2)}$**

Ponieważ pierwszy człon  $s_{PP}^{(2)}$  tego równania opisuje oddziaływania peptyd-peptyd, (a interesują mnie właściwości wody), dlatego też leży on poza moim zainteresowaniem.

**f) Człon  $s_{PW}^{(2)}$**

Zatrzymajmy się przy drugim członie  $s_{PW}^{(2)}$  opisującym oddziaływania peptyd-woda. Gdyby badany przeze mnie układ nie był jednorodny i izotropowy wówczas potrzebowałbym aż  $4 \times 3 = 12$  zmiennych do pełnego opisu tego członu (6 zmiennych opisujących pozycje i 6 zmiennych opisujących orientacje); na szczęście patrząc od strony cząsteczki peptydu mogę założyć, że tak nie jest - w rezultacie potrzebuję nie więcej niż sześciu zmiennych do opisu  $s_{PW}^{(2)}$ .

$$s_{PW}^{(2)} = -N_P k_B \frac{\rho_W}{\Omega} \int \int [g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) \ln g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) - g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) + 1] dr d\bar{\omega} \quad (4.2.3.42)$$

Orientację  $\bar{\omega}$  cząsteczki wody względem cząsteczki peptydu, można przedstawić w postaci trzech kątów Eulera  $(\alpha, \beta, \gamma)$ .

Ponadto zakładam, że badany peptyd ma symetrię walcową (w przypadku konformacji liniowej jest to nieco gorsze założenie niż w przypadku konformacji helikalnych). Stąd nie muszę podawać „bezwzględnej” pozycji cząsteczki wody w kartezjańskim układzie współrzędnych  $\mathbf{r} = (x, y, z)$ , a jedynie odległość  $r$  cząsteczki wody od osi walca tworzonego przez peptyd. Mam więc:

$$s_{PW}^{(2)} = -N_P k_B \frac{\rho_W}{\Omega} \int \int [g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) \ln g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) - g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) + 1] dr d\bar{\omega} \quad (4.2.3.43)$$

Funkcja  $g_{PW}^{(2)}$  zależy teraz tylko od czterech zmiennych:

$$g_{PW}^{(2)}(r, \bar{\omega}) = g_{PW}^{(2)}(r, \alpha, \beta, \gamma) = \frac{\Omega}{\rho_W} \frac{dN(r, \bar{\omega})}{dV d\bar{\omega}} = \frac{\Omega}{\rho_W} \frac{dN(r, \bar{\omega})}{2\pi rL dr d\bar{\omega}} \quad (4.2.3.44)$$

gdzie:

L- wysokość walca

$dN(r, \bar{\omega})$  - liczba cząsteczek wody, które znajdują się w zakresie odległości  $(r, r+dr)$  w warstewce o objętości  $dV$  wokół osi peptydu, i które przybierają orientację w obrębie przedziału  $(\bar{\omega}, \bar{\omega} + d\bar{\omega})$

Do powyższych wzorów stosują się relacje

$$d\bar{\omega} = \sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma, \quad \Omega = \int d\bar{\omega} = 8\pi^2$$

$$0 \leq \alpha < \pi, \quad 0 \leq \beta < 2\pi, \quad 0 \leq \gamma < 2\pi \quad (4.2.3.45)$$

wynikające z przyjętego przez mnie układu współrzędnych.

Funkcję  $g_{PW}^{(2)}$  można rozdzielić na składową zależną wyłącznie od odległości od osi peptydu, oraz na składową zależną od orientacji względem osi peptydu, dla danej odległości od peptydu. Rozkład ten można uczynić w następujący sposób:

$$g_{PW}^{(2)}(\bar{\omega}|r) = \frac{V\Omega}{N} \frac{dN(\bar{\omega}|r)}{dV d\bar{\omega}} = \frac{V}{N} \frac{dN(r)}{dV} \frac{\Omega}{dN(r)} \frac{dN(\bar{\omega}|r)}{d\bar{\omega}} = g(r) g_{orient}^{(2)}(r, \bar{\omega}) \quad (4.2.3.46)$$

gdzie:

$$g(r) = \frac{V}{N} \frac{dN(r)}{dV} = \frac{1}{\rho_w} \frac{dN(r)}{2\pi L r dr} \quad (4.2.3.47)$$

- człon radialny; jest to po prostu funkcja rozkładu radialnego cząsteczek wody wokół osi peptydu (określa prawdopodobieństwo  $dW(r)$  znalezienia cząsteczki wody w odległości  $r$  od osi peptydu)

$$g_{orient}^{(2)}(\bar{\omega}|r) = \frac{\Omega}{dN(r)} \frac{dN(\bar{\omega}|r)}{d\bar{\omega}} \quad (4.2.3.48)$$

- człon orientacyjny; określa prawdopodobieństwo  $dW'(r, \alpha, \beta, \gamma)$  znalezienia cząsteczki wody o określonej orientacji  $\omega = (\alpha, \beta, \gamma)$  względem peptydu przy założeniu, że te cząsteczki znajdują się w odległości  $r$  od osi walca reprezentującego ten peptyd: prawdopodobieństwo to określone jest w odniesieniu do sytuacji, gdy brak jest jakiegokolwiek korelacji orientacyjnej (czyli, gdy wszystkie orientacje względem osi peptydu są tak samo prawdopodobne)

$dN(r)$  – liczba cząsteczek wody znajdująca się w odległości  $r$  od osi peptydu

$dN(\omega|r)$  – liczba cząsteczek wody o orientacji  $(\omega) = (\alpha, \beta, \gamma)$  względem peptydu pod warunkiem, że znajdują się one w odległości  $r$  od niego.

Mogę więc napisać:

$$dW'(r, \alpha, \beta, \gamma) = g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r) dW(r) = g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r) g(r) \quad (4.2.3.49)$$

Włączenie równania (4.2.3.46) do równania (4.2.3.18), po znaczących przekształceniach algebraicznych prowadzi do wyrażenia

$$s_{PW}^{(2)} = -N_P k_B \rho_w \int (\zeta_{trans}(r) + \zeta_{orient}(r)) 2\pi L r dr = s_{PW,trans}^{(2)} + s_{PW,orient}^{(2)} \quad (4.2.3.50)$$

gdzie:

$$\zeta_{trans}(r) = g(r) \ln g(r) - g(r) + 1$$

$$\zeta_{orient}(r) = \frac{g(r)}{\Omega} \int g_{orient}^{(2)}(\bar{\omega}|r) \ln g_{orient}^{(2)}(\bar{\omega}|r) d\bar{\omega} \quad (4.2.3.51)$$

i

$$s_{PW,trans}^{(2)} = -N_P k_B \rho_W \int \zeta_{trans}(r) 2\pi L r dr = -2 N_P k_B \rho_W L \pi \int_0^{\infty} \zeta_{trans}(r) r dr$$

$$s_{PW,orient}^{(2)} = -N_P k_B \rho_W \int \zeta_{orient}(r) 2\pi L r dr = -2 N_P k_B \rho_W L \pi \int_0^{\infty} \zeta_{orient}(r) r dr \quad (4.2.3.52)$$

Wartość  $s_{PW}^{(2)}(r)$  może służyć [2] jako **miara uporządkowania cząsteczek wody względem osi peptydu**, dlatego też jeśli chcę ją wykorzystać to w równaniach (4.2.3.52) nie mogę całkować po całej przestrzeni (tj. od  $r=0$  do  $r=\infty$ ), tylko do wybranej przeze mnie wartości  $r$ , stąd też:

$$s_{PW,trans}^{(2)}(r) = -N_P k_B \rho_W \int_0^r \zeta_{trans}(r) 2\pi L r dr = -2 N_P k_B \rho_W L \pi \int_0^r \zeta_{trans}(r) r dr$$

$$s_{PW,orient}^{(2)}(r) = -N_P k_B \rho_W \int_0^r \zeta_{orient}(r) 2\pi L r dr = -2 N_P k_B \rho_W L \pi \int_0^r \zeta_{orient}(r) r dr \quad (4.2.3.53)$$

Wartości  $s_{PW,trans}^{(2)}(r)$  i  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  (w przeliczeniu na ilość cząsteczek wody) posłużyły mi jako miary, odpowiednio translacyjnego i orientacyjnego uporządkowania wody względem peptydu.

Za  $r$  przy numerycznym liczeniu powyższych całek przyjąłem odległość od osi peptydu do końca pierwszej ( $R_1$ ), a następnie drugiej ( $R_2$ ) warstwy solwatacyjnej wokół określonej konformacji peptydu. Wartość tą uzyskałem z odczytu wykresu funkcji rozkładu radialnego  $g(r)$ .

### g) Człon $s_{WW}^{(2)}$

Inną miarą lokalnego uporządkowania może być trzeci człon w równaniu (4.2.3.41b) -  $s_{WW}^{(2)}$ . Jak widać jego wartość zależy od  $4 \times 3 = 12$  zmiennych opisujących pozycje i orientacje cząsteczek wody względem siebie oraz względem peptydu; tak jak to miało miejsce w przypadku członu  $s_{PW}^{(2)}$  można jednak przyjąć kilka przybliżeń upraszczających obliczenia. Po pierwsze, biorę pod uwagę cząsteczki wody znajdujące się w określonym zakresie odległości od osi peptydu, odpowiadającym grubości otoczki solwatacyjnej. Ponadto zakładam, że region ten jest jednorodny (to akurat założenie jest dosyć kontrowersyjne!). Dwucząstkową funkcję korelacji  $g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{w1}, \mathbf{r}_{w2}, \bar{\omega}_{w1}, \bar{\omega}_{w2})$  mogę więc zastąpić funkcją  $g_{WW}^{(2)}(r, \omega_1, \omega_2)$ , gdzie:

$$\omega_1 = (\varphi, \theta) \quad \omega_2 = (\alpha, \beta, \gamma) \quad (4.2.3.54)$$

oznaczają odpowiednio: współrzędne katowe cząstki otoczenia w sferycznym układzie współrzędnych związanym z cząstką rozważaną (centralną)  $(\varphi, \theta)$  oraz trzy kąty Eulera  $(\alpha, \beta, \gamma)$



określające jej orientację przestrzenną w stosunku do cząstki centralnej; r jest odległością pomiędzy cząstkami.

Dwucząstkową funkcję korelacji  $g_{ww}^{(2)}(r, \omega_1, \omega_2)$  mogą rozłożyć na czynniki zależne od odległości, kątów sferycznych oraz od orientacji. Rozkład ten można uzyskać w następujący sposób:

$$\begin{aligned} g_{ww}^{(2)}(r, \omega_1, \omega_2) &= \frac{V \Omega_2}{N} \frac{dN(r, \omega_1, \omega_2)}{dV(r, \omega_1) d\omega_1 d\omega_2} = \frac{V \Omega_2}{N} \frac{dN(r, \omega_1, \omega_2)}{r^2 dr d\omega_1 d\omega_2} = \\ &= \left( \frac{V}{N} \frac{dN(r)}{\Omega_1 r^2 dr} \right) \left( \frac{\Omega_1}{dN(r)} \frac{dN(\omega_1|r)}{d\omega_1} \right) \left( \frac{\Omega_2}{dN(\omega_1|r)} \frac{dN(\omega_2|r, \omega_1)}{d\omega_2} \right) = \\ &= g_r(r) g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) g_{orient}^{(2)}(\omega_2|r, \omega_1) = g_r(r) g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r) g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \varphi, \theta) \end{aligned} \quad (4.2.3.55)$$

gdzie:

$dN(r)$  – liczba cząsteczek wody znajdująca się w odległości r od rozważanej cząsteczki (tzw. centralnej)

$dN(\omega_1|r)$  – liczba cząsteczek wody obserwowanych w kierunku  $(\omega_1)=(\varphi, \theta)$  względem cząsteczki centralnej pod warunkiem, że znajdują się one od niej w odległości r

$dN(\omega_2|\omega_1, r)$  – liczba cząsteczek wody przyjmująca orientację  $\omega_2$  względem cząstki centralnej pod warunkiem, że znajdują się one w odległości r i kierunku  $(\omega_1)=(\varphi, \theta)$  względem tej cząsteczki.

Objaśnienia poszczególnych członów z równania (4.2.3.55):

$g_r^{(2)}$  - **człon radialny**; jest to po prostu funkcja rozkładu radialnego (określa prawdopodobieństwo  $dw(r)$  znalezienia cząsteczki wody w odległości r od rozważanej (centralnej) cząsteczki wody)

$g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r)$  - **człon konfiguracyjny**; określa prawdopodobieństwo  $dw'(r, \varphi, \theta)$  znalezienia cząsteczki w „kierunku”  $\omega_1=(\varphi, \theta)$  obliczone w stosunku do sytuacji gdyby nie było korelacji położeń w zależności od tego kierunku

$g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \omega_1)$  - **człon orientacyjny**; określa prawdopodobieństwo  $dw''(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$  znalezienia cząstki o określonej orientacji  $\omega_2=(\alpha, \beta, \gamma)$  względem rozważanej cząsteczki wody: prawdopodobieństwo to określone jest w odniesieniu do sytuacji, gdy brak jest jakiegokolwiek korelacji orientacyjnej (czyli, gdy wszystkie orientacje względem osi peptydu są tak samo prawdopodobne).

Powyższe definicje można streścić równaniem:

$$\begin{aligned} dw''(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) &= g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \omega_1) dw'(r, \varphi, \theta) = g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \omega_1) g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r) dw(r) = \\ &= g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \omega_1) g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r) g_r^{(2)}(r) \end{aligned} \quad (4.2.3.56)$$

A więc po wykorzystaniu zależności (4.2.3.55) wkład dwucząstkowy do entropii zależy od

oddziaływań woda-woda  $s_{WW}^{(2)}$  z równania (4.2.3.41b) mogą przedstawić w postaci:

$$\begin{aligned}
\frac{s_{WW}^{(2)}}{k_B} &= -\frac{\rho_W^2}{2! \Omega^2} \int \int \int [g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \omega_{W1}, \omega_{W2}) \ln g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \omega_{W1}, \omega_{W2}) - g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \omega_{W1}, \omega_{W2}) + 1] d\mathbf{r}_{W1} d\mathbf{r}_{W2} d\omega_{W1} d\omega_{W2} = \\
&= -\frac{\rho_W N_W}{2! \Omega_2} \int \int \int [g_{WW}^{(2)}(r, \omega_1, \omega_2) \ln g_{WW}^{(2)}(r, \omega_1, \omega_2) - g_{WW}^{(2)}(r, \omega_1, \omega_2) + 1] r^2 dr d\omega_1 d\omega_2 = \\
&= -\frac{\rho_W N_W}{2! \Omega_2} \int \int \int [g_r^{(2)}(r) g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) g_{orient}^{(2)}(\omega_2|\omega_1, r)] [\ln [g_r^{(2)}(r) g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) g_{orient}^{(2)}(\omega_2|\omega_1, r)] - 1] + 1] r^2 dr d\omega_1 d\omega_2 = \\
&= -\frac{\rho_W N_W}{2} \int [g_r(r) \ln g_r(r) - g_r(r) + 1] 4\pi r^2 dr - \frac{\rho_W N_W}{2 \Omega_1} \int \int g_r(r) g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) \ln [g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r)] 4\pi r^2 dr d\omega_1 \\
&= -\frac{\rho_W N_W}{2 \Omega_1 \Omega_2} \int \int \int g_r^{(2)}(r) g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) g_{orient}^{(2)}(\omega_2|\omega_1, r) \ln [g_{orient}^{(2)}(\omega_2|\omega_1, r)] 4\pi r^2 dr d\omega_1 d\omega_2 = \\
&= -\frac{\rho_W N_W}{2} \int [\zeta_{trans} + \zeta_{conf} + \zeta_{orient}] 4\pi r^2 dr = \frac{s_{WW,trans}^{(2)} + s_{WW,conf}^{(2)} + s_{WW,orient}^{(2)}}{k_B} \quad (4.2.3.57)
\end{aligned}$$

gdzie oznaczyłem:

- człon TRANSLACYJNY [nomenklatura za 222]

$$\frac{s_{WW,trans}^{(2)}}{k_B} = -\frac{\rho_W N_W}{2!} \int \zeta_{trans}(r) dV = -\frac{\rho_W N_W}{2!} \int \zeta_{trans}(r) 4\pi r^2 dr \quad (4.2.3.58a)$$

$$\zeta_{trans} = g_r^{(2)}(r) \ln [g_r^{(2)}(r)] - g_r^{(2)}(r) + 1$$

- człon KONFIGURACYJNY

$$\frac{s_{WW,conf}^{(2)}}{k_B} = -\frac{\rho_W N_W}{2!} \int \zeta_{conf}(r) dV = -\frac{\rho_W N_W}{2!} \int \zeta_{conf}(r) 4\pi r^2 dr \quad (4.2.3.58b)$$

$$\zeta_{conf} = \frac{g_r^{(2)}(r)}{\Omega_1} \int g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) \ln [g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r)] d\omega_1$$

- człon ORIENTACYJNY

$$\frac{s_{WW,orient}^{(2)}}{k_B} = -\frac{\rho_W N_W}{2!} \int \zeta_{orient}(r) dV = -\frac{\rho_W N_W}{2!} \int \zeta_{orient}(r) 4\pi r^2 dr$$

$$\zeta_{orient} = \frac{-g_r^{(2)}(r)}{\Omega_1 \Omega_2} \int g_{conf}^{(2)}(\omega_1|r) g_{orient}^{(2)}(\omega_2|r, \omega_1) \ln [g_{orient}^{(2)}(\omega_2|r, \omega_1)] d\omega_1 d\omega_2 \quad (4.2.3.58c)$$

przy czym:

$$\Omega_1 = \int d\omega_1 = 4\pi \quad \Omega_2 = \int d\omega_2 = 8\pi^2 \quad (4.2.3.59)$$

$$d\omega_1 = d\varphi \sin\theta d\theta$$

$$d\omega_2 = \sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma$$

$$0 < \varphi < 2\pi; 0 < \theta < \pi$$

$$0 < \alpha < \pi; 0 < \beta < 2\pi; 0 < \gamma < 2\pi$$

Zarówno funkcja  $s_{WW}^{(2)}$  jak i powyższe jej składowe mogą stanowić **miarę średniego lokalnego**

**uporządkowania wody w otoczce solwatacyjnej peptydu** (przypominam, że w moich rozważaniach nie biorę pod uwagę dwóch reszt od C- i N-końca), jeśli podobnie jak to miało miejsce w przypadku funkcji  $s_{PW}^{(2)}$  ograniczymy całkowanie do pewnego zakresu odległości  $r$ . Powstaje pytanie o wartość tego zakresu. Z obliczeń J. Zielkiewicza [222] wynika, że (w czystej wodzie) zakres lokalnego uporządkowania nie przekracza 0,58 nm, podczas gdy pierwsza otoczka solwatacyjna dookoła cząsteczki wody (w odległości  $r < 0,35$  nm) wnosi około 70% do całkowitych efektów orientacyjnych. Stąd numeryczne całkowanie funkcji  $s_{WW}^{(2)}(r)$  oraz jej trzech członów:  $s_{WW,trans}^{(2)}(r)$ ,  $s_{WW,conf}^{(2)}(r)$ ,  $s_{WW,orient}^{(2)}(r)$  wykonałem dla dwóch zakresów odległości:  $s_{WW}^{(2)}(r=0,36\text{ nm})$  i  $s_{WW}^{(2)}(r=0,58\text{ nm})$ . Obliczenia wykonałem dla odległości 0,36 nm zamiast dla oszacowanej poprzednio [222] wartości 0,35 nm, ponieważ użyłem kroku całkowania  $\Delta r=0,02$  nm.

A więc podsumowując, wartość  $s_{WW}^{(2)}(r)$  mierzy – w danym  $r$  – lokalne uporządkowanie wody w odległości aż do  $r$ , podczas gdy  $s_{WW,trans}^{(2)}(r)$ ,  $s_{WW,conf}^{(2)}(r)$  i  $s_{WW,orient}^{(2)}(r)$  mierzą wkłady translacyjny, konfiguracyjny i orientacyjny do tego lokalnego uporządkowania. Następnie użyłem wartości

$$S(r) = s_{WW}^{id} + \frac{s_{WW}^{(2)}(r)}{N_W} \quad (4.2.3.60)$$

zamiast wartości  $s_{WW}^{(2)}(r)$ , gdzie  $s_{WW}^{id} = 137,06 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  dla modelu TIP4P.

Esposito i wsp. [201], postępując za pomysłem opisanym przez Debenedettiego i wsp. [133][131], zaproponowali użycie racjonalnych, opartych na entropii parametrów dla opisu termodynamicznego stanu układu, uzyskując dzięki temu ilościowy i głębszy (w porównaniu np. z parametrami tetraedrycznego uporządkowania) wgląd w strukturę wody. Tymi miarami mogą być: **parametr translacyjnego uporządkowania**, reprezentowany przez wielkość  $s_{WW,trans}^{(2)}(r)$ , oraz **parametr „sumarycznego” orientacyjnego uporządkowania** reprezentowany w mojej notacji poprzez sumę ( $s_{WW,conf}^{(2)}(r) + s_{WW,orient}^{(2)}(r)$ ). Ten pomysł wykorzystałem dla moich układów do stworzenia następujących miar uporządkowania:

$$s_{tra}(r) = \frac{s_{WW,trans}^{(2)}(r)}{N_W} \quad (4.2.3.61a)$$

$$s_{con}(r) = \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r)}{N_W} \quad (4.2.3.61b)$$

$$S_{ori}(r) = \frac{S_{WW, conf}^{(2)}(r) + S_{WW, orient}^{(2)}(r)}{N_W} \quad (4.2.3.61c)$$

obliczonych dla odległości:  $r=0,36$  nm i  $r=0,58$  nm. Reprezentują one odpowiednio **wkład translacyjny, konfiguracyjny i „sumaryczny” orientacyjny do całkowitego uporządkowania, przeliczone na jeden mol wody**. Te wyniki przedstawiłem w Tab. 5.1.6.2, i także graficznie na Rys. 5.1.6.1 oraz 5.1.6.S1 w formie diagramu uporządkowania.

Do numerycznego obliczenia całek w granicach aż do  $r$  przyjąłem następujące parametry i warunki:

krok całkowania (odległość)  $\Delta r=0,02$  nm,

krok całkowania (kąty)  $\Delta\alpha=\Delta\beta=\Delta\gamma=\Delta\theta=\Delta\phi=10^\circ$ .

całkowity czas symulacji dynamiki molekularnej dla tych obliczeń: 16-20 ns,

zapis trajektorii do pliku z odstępem czasowym 0,008 ps.

Wyniki dwucząstkowych wkładów do entropii obliczanych z zestawu trajektorii były zachowywane (jako funkcja czasu symulacji) po każdych 1,6 ns. Następnie te pośrednie wyniki były ekstrapolowane dla symulacji „nieskończenie długiej” przy użyciu następującej funkcji [192]:

$$S^{(2)}(t) = S_\infty - \frac{A}{B + \sqrt{t}(\ln t + C)} \quad (4.2.3.62)$$

W powyższym równaniu  $S_\infty$  oznacza entropię dla nieskończenie długiego czasu symulacji);  $S_\infty$ ,  $A$ ,  $B$  i  $C$  są dopasowywanymi parametrami określonymi przy użyciu metody najmniejszych kwadratów z modyfikacją Marquardta [wg 222].

## **h) Modyfikacja pomysłu parametru lokalnego uporządkowania w celu eliminacji efektu „wyłączonej objętości”**

W celu uzyskania parametrów opisujących wyłącznie strukturę wody solwatacyjnej przyjąłem następujący sposób postępowania. Oddzielnie rozważałem pudełko symulacyjne zawierające czystą wodę. Następnie umieściłem cząsteczkę peptydu w pudełku i usunąłem cząsteczki wody, których współrzędne znajdowały się w regionie zajęтым przez peptyd. Na koniec, sprawdziłem które cząsteczki „kończyły się” w obrębie otoczki solwatacyjnej otaczającej cząsteczkę białka. Innymi słowy, region w przestrzeni odpowiadający otoczce solwatacyjnej został wypełniony wodą niezaburzoną (*bulk*). Dla tego układu wykonałem ponownie obliczenia

parametrów  $s_{tra}(r)$  i  $s_{con}(r)$  oraz  $s_{ort}(r)$ ; dla  $r=0,36$  nm oraz dla  $r=0,58$  nm. W tym wypadku, struktura wody ściśle odpowiada strukturze czystej wody w wyniku czego uzyskałem „stan odniesienia” dla dalszej interpretacji zmian strukturalnych w otoczce solwatacyjnej wokół cząsteczki peptydu.

Następnie obliczyłem następujące parametry:

$$\begin{aligned}\Delta s_{tra}(0,36 \text{ nm}) &= [s_{tra}(0,36 \text{ nm})]_{solv} - [s_{tra}(0,36 \text{ nm})]_{bulk} \\ \Delta s_{con}(0,36 \text{ nm}) &= [s_{con}(0,36 \text{ nm})]_{solv} - [s_{con}(0,36 \text{ nm})]_{bulk} \\ \Delta s_{ort}(0,36 \text{ nm}) &= [s_{ort}(0,36 \text{ nm})]_{solv} - [s_{ort}(0,36 \text{ nm})]_{bulk} \\ \Delta s(0,36) &= \Delta s_{WW,tra}^{(2)}(0,36 \text{ nm}) + \Delta s_{WW,ort}^{(2)}(0,36 \text{ nm})\end{aligned}\quad (4.2.3.63a)$$

$$\begin{aligned}\Delta s_{tra}(0,58 \text{ nm}) &= [s_{tra}(0,58 \text{ nm})]_{solv} - [s_{tra}(0,58 \text{ nm})]_{bulk} \\ \Delta s_{con}(0,58 \text{ nm}) &= [s_{con}(0,58 \text{ nm})]_{solv} - [s_{con}(0,58 \text{ nm})]_{bulk} \\ \Delta s_{ort}(0,58 \text{ nm}) &= [s_{ort}(0,58 \text{ nm})]_{solv} - [s_{ort}(0,58 \text{ nm})]_{bulk} \\ \Delta s(0,58) &= \Delta s_{WW,tra}^{(2)}(0,58 \text{ nm}) + \Delta s_{WW,ort}^{(2)}(0,58 \text{ nm})\end{aligned}\quad (4.2.3.63b)$$

odzwierciedlające zmianę translacyjnego, konfiguracyjnego i orientacyjnego lokalnego uporządkowania wody solwatacyjnej w porównaniu z właściwościami czystej wody dla dwóch zakresów odległości –  $r=0,36$  nm oraz  $r=0,58$  nm;  $\Delta s(0,58 \text{ nm})$  mierzy całkowitą zmianę w ogólnym strukturalnym uporządkowaniu wody solwatacyjnej.

#### 4.2.4. Energia wiązania wodorowego

Wiązanie wodorowe można interpretować jako wynik zlokalizowanego przyciągania elektrostatycznego. W przypadku modelowej cząsteczki wody, ładunki na atomach tlenu i wodoru są tak dobrane, by umożliwić powstawanie tych wiązań. Przez energię wiązania wodorowego utworzonego pomiędzy dwiema cząsteczkami  $i$  i  $j$  rozumiemy sumę energii oddziaływań (typu Lennarda – Jonesa oraz elektrostatycznych) pomiędzy wszystkimi atomami tworzącymi te cząsteczki wody:

$$E_{HB} = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \left[ \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \frac{q_i q_j}{4 \pi \epsilon r_{ij}} \right] \quad (4.2.4.1)$$

Obliczyłem też średnią energię wiązania wodorowego tworzącego się pomiędzy parą cząsteczek wody. Wartość tej energii została wyznaczona w funkcji odległości związanej pary od osi peptydu.

#### 4.2.5. Geometria wiązania wodorowego

Do analizy geometrii wiązania wodorowego wykorzystywano następujące parametry:

- ♦ kąt  $\beta_{\text{OOH}}$  – najmniejszy z czterech kątów tlen-tlen-wodór pomiędzy dwiema cząsteczkami wody tworzącymi między sobą wiązanie wodorowe (Rys. 3.4.1),
- ♦ odległość tlen – tlen dwóch cząsteczek wody ( $R_{\text{OO}}$ ),
- ♦ odległość tlen akceptora wiązania – wodór donora wiązania ( $d_{\text{OH}}$ ), która może być nazwana długością wiązania wodorowego.

W funkcji odległości od osi peptydu obliczone zostały wartości średnie każdego z wymienionych parametrów, a także histogramy obrazujące prawdopodobieństwo wystąpienia określonej wartości kąta  $\beta_{\text{OOH}}$  oraz odległości  $R_{\text{OO}}$  i  $d_{\text{OH}}$ .

Poza tym wyznaczona została średnia liczba wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczkę wody z innymi cząsteczkami wody ( $n_{\text{HB}}$ ).

#### 4.2.6. Geometria sieci wiązań wodorowych

W celu opisu struktury sieci wiązań wodorowych, użyłem nieco zmodyfikowanego pomysłu Chaua i Hardwicka [1]. W celu opisu lokalnego uporządkowania, autorzy ci wprowadzili dobrze znany “parametr uporządkowania tetraedrycznego”: po wybraniu czterech najbliższych atomów tlenu, które otaczają ustaloną “centralną” cząsteczkę wody, obliczają oni sześć kątów pomiędzy wektorami, które łączą wybrane atomy z atomem tlenu centralnej cząsteczki wody. W mojej pracy ten pomysł jest zmodyfikowany następująco. Badając pojedynczą konfigurację z pliku trajektorii, biorę pod uwagę, dla ustalonej “centralnej” cząsteczki wody, wszystkich partnerów powiązanych (poprzez wiązanie wodorowe) z tą cząsteczką; liczba takich partnerów, oczywiście nie jest ustalona. Następnie obliczam podobnie jak Chau i Hardwick wszystkie kąty  $\theta_{\text{HB}}$  pomiędzy wektorami łączącymi atomy tlenu z jego partnerami. Stosując tą procedurę do wszystkich cząsteczek wody, i

powtarzając to względem całego pliku trajektorii, buduję histogram opisujący rozkład prawdopodobieństwa dla takich kątów. Uzyskany histogram został znormalizowany, zakładając całkowity obszar otoczony przez wykres za równy 100. Ten histogram odzwierciedla (geometryczną) strukturę sieci wiązań wodorowych.

#### 4.2.7. Kinetyka zaniku wiązań wodorowych

Czas życia poszczególnego wiązania wodorowego wyliczyłem z czasowej funkcji korelacji:

$$W(t) = \langle h(t_0)h(t_0 + t) \rangle \quad (4.2.7.1)$$

gdzie funkcja binarna (tj. funkcja, która może przyjmować tylko wartość 0 lub 1)  $h(t) = 1$  jeśli badane wiązanie wodorowe (pomiędzy dwoma cząsteczkami wody) istnieje nieprzerwanie w czasie od chwili  $t_0$  do chwili  $t_0 + t$  oraz  $h(t) = 0$  jeśli w tym przedziale czasowym ulegnie zerwaniu. W literaturze można się także spotkać z użyciem funkcji autokorelacji w której  $h(t)=1$  nawet jeśli wiązanie wodorowe w przedziale czasowym  $(t_0, t_0+t)$  ulegnie zerwaniu pod warunkiem, że w chwili  $t_0+t$  będzie odtworzone. Jednak w tym przypadku uzyskiwano zbyt duże wartości czasów życia wiązania wodorowego (rzędu 6,5 ps) [103].

Celem oceny szybkości zaniku wiązań wodorowych pomiędzy dwiema cząsteczkami wody, sporządzono histogram obrazujący spadek liczby wiązań wodorowych w czasie. Analizowałem proces zaniku wiązań wodorowych w czasie 1,2 ps od pewnego momentu początkowego. Znormalizowany histogram przedstawia prawdopodobieństwo zdarzenia, że wiązanie istniejące w chwili  $t=0$  będzie istnieć co najmniej do chwili  $t$ .

Otrzymane wartości histogramu przybliżane były następnie funkcją (przykład na Rys. 5.2.1), na którą składała się suma dwóch członów wykładniczych w postaci [103][2]:

$$W(t) = A_T e^{-t/\tau_T} + A_R e^{-t/\tau_R} \quad (4.2.7.2.)$$

W przypadku każdego z badanych układów (poza układami, w których wyzerowano ładunki cząstkowe na peptydzie), cząsteczki wody tworzyły wiązania wodorowe z atomem tlenu karbonylowego peptydu. Aby oszacować kinetykę procesu rozpadu tych wiązań wodorowych, przyjęto zgrubną definicję takiego wiązania: wiązanie wodorowe istnieje, jeżeli atom wodoru cząsteczki wody przebywa w odległości do 2,5 Å od atomu tlenu karbonylowego peptydu (położenie pierwszego minimum na funkcji rozkładu gęstości cząsteczek wody względem osi peptydu, Rys. 5.1.3.1). Analogicznie do funkcji dwuwykładniczej  $W(t)$  opisującej kinetykę wiązań

wodorowych tworzonych pomiędzy cząsteczkami wody analizowałem dwuwykładniczą funkcję  $P(t)$  dla opisu kinetyki wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody z atomami peptydu:

$$P(t) = A_{P,T} e^{-t/\tau_{P,T}} + A_{P,R} e^{-t/\tau_{P,R}} \quad (4.2.7.3)$$

poprzez dopasowanie do histogramu. Jako że w definicji zaniedbano kryterium kąta, to w tym przypadku *de facto* funkcja  $P(t)$  opisuje czas rezydencji atomów wodoru wody w odległości do 2,5 Å od atomów: tlenu karbonylowego (w przypadku wszystkich badanych peptydów) i tlenu hydroksylowego (dla poliseryny).

#### 4.2.8. Funkcje autokorelacji prędkości translacyjnej i rotacyjnej.

##### Współczynniki dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej

Prędkość translacyjną cząsteczki wody definiujemy jako prędkość jej środka masy. Prędkość translacyjną w chwili  $t$  wyznaczyłem, wykorzystując zmianę położenia środka masy cząsteczki  $\Delta \mathbf{r}$  po upływie odcinka czasowego  $\Delta t$ :

$$\mathbf{v} = \frac{\Delta \mathbf{r}(t)}{\Delta t} \quad (4.2.8.1)$$

Czasową funkcję autokorelacji prędkości translacyjnej (VACF; ang. *velocity autocorrelation function*) w stanie równowagi opisuje wzór:

$$VACF(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} \left( \frac{1}{T} \int_0^T \mathbf{v}(t') \mathbf{v}(t'+t) dt' \right) = \langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(t) \rangle \quad (4.2.8.2)$$

Wektory  $\mathbf{v}(0)$  i  $\mathbf{v}(t)$  symbolizują prędkości w chwili początkowej  $t=0$  i po upływie czasu  $t$ .

Aby wartość funkcji autokorelacji w chwili zero przyjmowała wartość równą jedności, stosuje się zabieg zwany normalizacją, który polega na podzieleniu wartości funkcji autokorelacji w chwili  $t$  przez wartość funkcji w chwili  $t=0$ , która jest równa średniemu kwadratowi prędkości początkowej (przy czwartej z poniższych równości została wykorzystana zasada ekwipartycji energii):

$$C_{TT}(t) = \frac{VACF(t)}{VACF(0)} = \frac{\langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(t) \rangle}{\langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(0) \rangle} = \frac{\frac{m}{2} \langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(t) \rangle}{\frac{m}{2} \langle \mathbf{v}^2(0) \rangle} = \frac{\frac{m}{2} \langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(t) \rangle}{\frac{3k_B T}{2}} = \frac{m}{3k_B T} VACF(t) \quad (4.2.8.3)$$



Wartości znormalizowanej funkcji autokorelacji prędkości obliczano w przedziale (0-1,5 ps) co 0,001 ps.

Powyższe wzory opisują funkcję autokorelacji prędkości translacyjnej. W przypadku funkcji autokorelacji prędkości rotacyjnej, czyli kątovej (RACF; ang. *rotational autocorrelation function*), wykorzystany został wektor  $\omega_R$  prędkości kątovej rotacji cząsteczki wokół jej środka masy w miejsce prędkości translacyjnej środka masy:

$$RACF(t) = \frac{1}{N_t N_w} \sum_{j=1}^{N_t} \sum_{i=1}^{N_w} \langle \omega_{ij}(0) \omega_{ij}(t) \rangle \quad (4.2.8.4)$$

$N_t$  - liczba zbadanych przedziałów czasowych o długości  $t$   
 $N_w$  - liczba cząsteczek wody

$$C_{RR}(t) = \frac{RACF(t)}{RACF(0)} = \frac{\langle \omega(0) \omega(t) \rangle}{\langle \omega(0) \omega(0) \rangle} \quad (4.2.8.5)$$

Współczynniki dyfuzji świadczą o swobodzie ruchu (translacji lub rotacji), dlatego stanowią dobrą miarę zmieniających się właściwości fizycznych wody w otoczeniu cząsteczki peptydu.

Współczynniki dyfuzji translacyjnej obliczyłem wykorzystując funkcję autokorelacji prędkości translacyjnej [223]:

$$D_T = \frac{1}{d} \lim_{t \rightarrow \infty} \left( \int_0^t \langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(t') \rangle dt' \right) = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \mathbf{v}(0) \mathbf{v}(t) \rangle dt = \frac{1}{3} \int_0^\infty VACF(t) dt \quad (4.2.8.6)$$

$d$  - wymiar przestrzeni

Podczas obliczania współczynnika dyfuzji translacyjnej, całkowanie odbywało się w granicach od 0 do 1,5 ps (funkcja autokorelacji VACF w praktyce osiąga wartość równą zero dla czasu rzędu 1 ps jak widać na Rys. 5.2.2).

Współczynniki dyfuzji rotacyjnej mogą zostać obliczone z użyciem funkcji autokorelacji prędkości rotacyjnej. Jeżeli cząstka obraca się z prędkością kątową  $\omega_R$ , to dyfuzję rotacyjną można zdefiniować wzorem analogicznym do powyższego:

$$D_R = \frac{1}{d} \lim_{t \rightarrow \infty} \left( \int_0^t \langle \omega(0) \omega(t') \rangle dt' \right) = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \omega(0) \omega(t) \rangle dt \quad (4.2.8.7)$$

Podczas obliczania współczynnika dyfuzji rotacyjnej, całkowanie odbywało się w granicach od 0 do 1,0 ps (funkcja autokorelacji RACF w praktyce osiąga wartość równą zero dla czasu rzędu 0,25 ps jak widać na Rys. 5.2.2).

Współczynniki dyfuzji (translacyjnej i rotacyjnej) były obliczane z wykorzystaniem funkcji autokorelacji, ponieważ metoda ta pozwala na obliczenie tych współczynników w krótkim przedziale czasowym (1,0-1,5 ps), dzięki czemu nie tracimy możliwości przyporządkowania cząsteczki do konkretnej warstwy solwatacyjnej.

Powyższe wzory dla wsp. dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej wynikają z zależności Greena – Kubo [223]:

$$\gamma = \int_0^{\infty} \left\langle \frac{dA(t)}{dt} \frac{dA(0)}{dt} \right\rangle dt \quad (4.2.8.8)$$

gdzie w ogólności  $A$  oznacza pewną wielkość mechaniczną, będącą funkcją położenia i prędkości cząsteczki, natomiast  $\gamma$  jest interesującą nas wielkością transportową. Funkcja podcałkowa jest przykładem nieznormalizowanej czasowo-zależnej funkcji korelacji. Jak już *implicite* nadmieniałem w praktyce górna granica całkowania jest określona nie przez nieskończoność, ale przez chwilę w której korelacja jest równa zero.

#### 4.2.9. Analiza Fouriera funkcji autokorelacji prędkości (translacyjnej i rotacyjnej)

**Cząsteczkowe widmo mocy**, zwane również **cząsteczkową funkcją gęstości stanów** pozwala na znalezienie preferowanych częstotliwości drgań harmonicznym wykonywanych przez cząsteczki. Widmo mocy prędkości translacyjnej uzyskałem z transformaty Fouriera funkcji autokorelacji prędkości.

Z twierdzenia Wienera-Chinczyna, (wiążącego ze sobą dwa pojęcia – gęstości stanów oraz pojęcie funkcji autokorelacji), wynika że cząsteczkowe widmo mocy  $s_j(\nu)$  jest po prostu transformatą Fouriera funkcji VACF(t)

$$\begin{aligned} s_j(\nu) &= \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{2\pi} \left| \int_{-\tau}^{\tau} |\mathbf{v}_j(t)| e^{-i2\pi\nu t} dt \right|^2 = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{2\tau} \int_{-\tau}^{\tau} \int_{-\tau}^{\tau} \mathbf{v}_j(t) \cdot \mathbf{v}_j(t+t') dt' e^{-i2\pi\nu t} dt \\ &= \lim_{\tau \rightarrow \infty} \int_{-\tau}^{\tau} VACF(t) e^{-i2\pi\nu t} dt \end{aligned} \quad (4.2.9.1)$$

gdzie:

$\tau$  – rozważany przedział czasowy  
 $\mathbf{v}_j$  – prędkość (translacyjna) środka masy cząsteczki  $j$   
 $t, t'$  – czas

W powyższym równaniu możemy wyróżnić amplitudę

$$A_j(\nu) = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \int_{-\tau}^{\tau} |\mathbf{v}_j(t)| e^{-i2\pi\nu t} dt \quad (4.2.9.2)$$

a więc równanie (4.2.9.1) możemy zapisać w postaci:

$$s_j(\nu) = \frac{\lim_{\tau \rightarrow \infty} \left| \int_{-\tau}^{\tau} |\mathbf{v}_j(t)| e^{-i2\pi\nu t} dt \right|^2}{\int_{-\tau}^{\tau} dt} = \frac{|A_j(\nu)|^2}{\lim_{\tau \rightarrow \infty} \int_{-\tau}^{\tau} dt} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{2\tau} \left| \int_{-\tau}^{\tau} |\mathbf{v}_j(t)| e^{-i2\pi\nu t} dt \right|^2 \quad (4.2.9.3)$$

Przedstawione powyżej równania pokazują ruch cząsteczki  $j$  jako złożenie drgań niezależnych oscylatorów harmonicznym o częstościach drgań  $2\pi\nu$  i amplitudach  $A_j(\nu)$ . Dominującym składowym harmonicznym przypisane będą duże wartości amplitud. Powyższe równania z użyciem liczb zespolonych są równoważne odpowiednim równaniom zapisanym przy użyciu funkcji trygonometrycznych. Zapis z użyciem liczb zespolonych jest bardziej zwięzły.

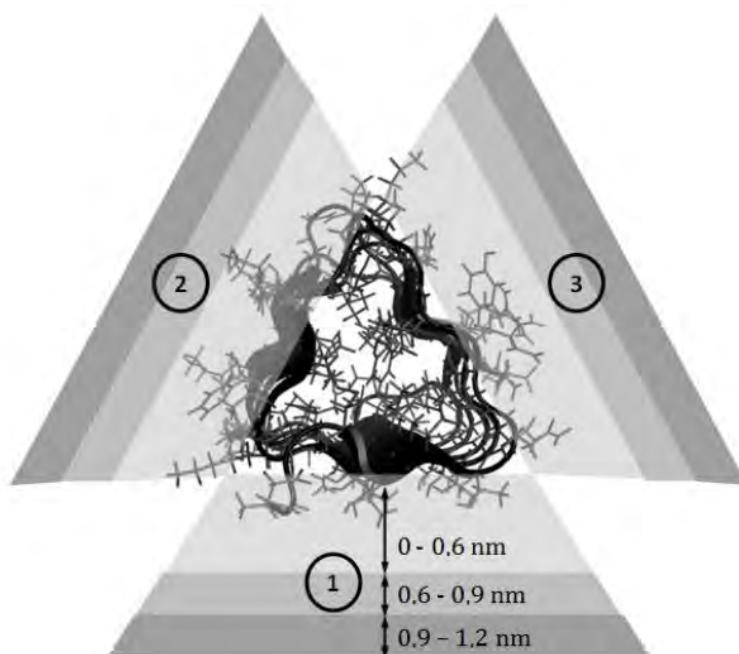
Ponieważ w układzie mamy  $N$  cząsteczek wody, a ponadto chcemy, aby wysokość najwyższego pików na widmach mocy była ustawiona jako równa jedności więc w rezultacie szukana przez nas funkcja ma postać:

$$S(\nu) = \frac{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N s_j(\nu)}{\max\left(\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N s_j(\nu)\right)} = \frac{\sum_{j=1}^N s_j(\nu)}{\max\left(\sum_{j=1}^N s_j(\nu)\right)} \quad (4.2.9.4)$$

Powyższe rozumowanie jest analogiczne dla widm prędkości rotacyjnej (kątovej) z tym, że wówczas w powyższych równaniach zamiast prędkości translacyjnej mamy oczywiście prędkość rotacyjną, zaś zamiast funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej używamy funkcji autokorelacji prędkości rotacyjnej RACF(t).

#### 4.2.10. Uwagi odnośnie analizy wody solwatacyjnej wokół białka sbwAFP

Plik ze współrzędnymi atomów dla białka sbwAFP uzyskałem z bazy PDB (Protein Data Bank).



**Rys. 4.2.10.1.** Definicja warstwy solwatacyjnej wokół badanej cząsteczki sbwAFP. [Rysunek dzięki uprzejmości A. Kuffel]

Funkcja rozkładu gęstości wody wokół białka AFP została wyznaczona w dwóch etapach. W pierwszym kroku, określiłem funkcję  $n_s(r)$ , która opisuje jak wiele cząsteczek wody jest obecnych w zakresie odległości  $(r, r+dr)$  od odpowiedniej „bazalnej” powierzchni cząsteczki białka. W drugim kroku, brałem pod uwagę oddzielnie pudełko symulacyjne zawierające wyłącznie czystą wodę. Włożyłem w to pudełko cząsteczkę białka, usuwając wszystkie cząsteczki wody, których współrzędne przypadają w przestrzeni zajmowanej przez cząsteczkę białka. Użyłem następującego kryterium dla tego usuwania: każda cząsteczka wody, której środek znajdował się w odległości 0,05 nm od jakiegokolwiek atomu białka została usunięta. Następnie, dla cząsteczek wody wybranych w taki sposób, określiłem funkcję  $n_w(r)$ , która określa jak wiele cząsteczek wody „bulk” jest obecnych w zakresie odległości  $(r, r+dr)$  od powierzchni. Funkcja rozkładu gęstości,  $g(r)$  jest obliczona jako iloraz  $g(r)=n_s(r)/n_w(r)$ .

Podobnie jak w przypadku prostych peptydów (poliglicynowych, poliserynowych oraz polialaninowych) użyłem parametrów  $stra(r)$ ,  $scon(r)$  oraz  $sort(r)$  wyliczonych dla odległości  $r=0,58$  nm od każdej z trzech płaszczyzn białka. Również dla tych płaszczyzn wykreśliłem diagram uporządkowania. Także w przypadku białka sbwAFP zaimplementowałem modyfikację parametru lokalnego uporządkowania polegającą na eliminacji efektu „wyłączonej objętości”. Choć zaprezentowany pomysł wydaje się być dość prosty, może on tutaj nasuwać pewne wątpliwości, bowiem powierzchnia białka nie jest gładka, a granica pomiędzy tą powierzchnią i otaczającą wodą solwacyjną charakteryzuje się złożonym kształtem. Podczas wykonywania procedury „wypełniania” zostały usunięte wszystkie cząsteczki wody których środki znajdowały się w obrębie pewnej odległości  $d_0$  od jakiegokolwiek atomu białka. Jeśli wybrana wartość  $d_0$  okazała się zbyt wielka lub zbyt mała, kształt granicy białko-woda może zostać zdeformowany i wyciągane wnioski będą niepoprawne. Stąd jestem świadom, że użycie jednej arbitralnej odległości  $d_0$  od jakiegokolwiek atomu białka jest uproszczeniem. Dlatego też uzyskane wyniki powinny być traktowane tylko jako „półilościowe”.

#### **4.2.11. Możliwe źródła błędów wyznaczonych wielkości fizycznych**

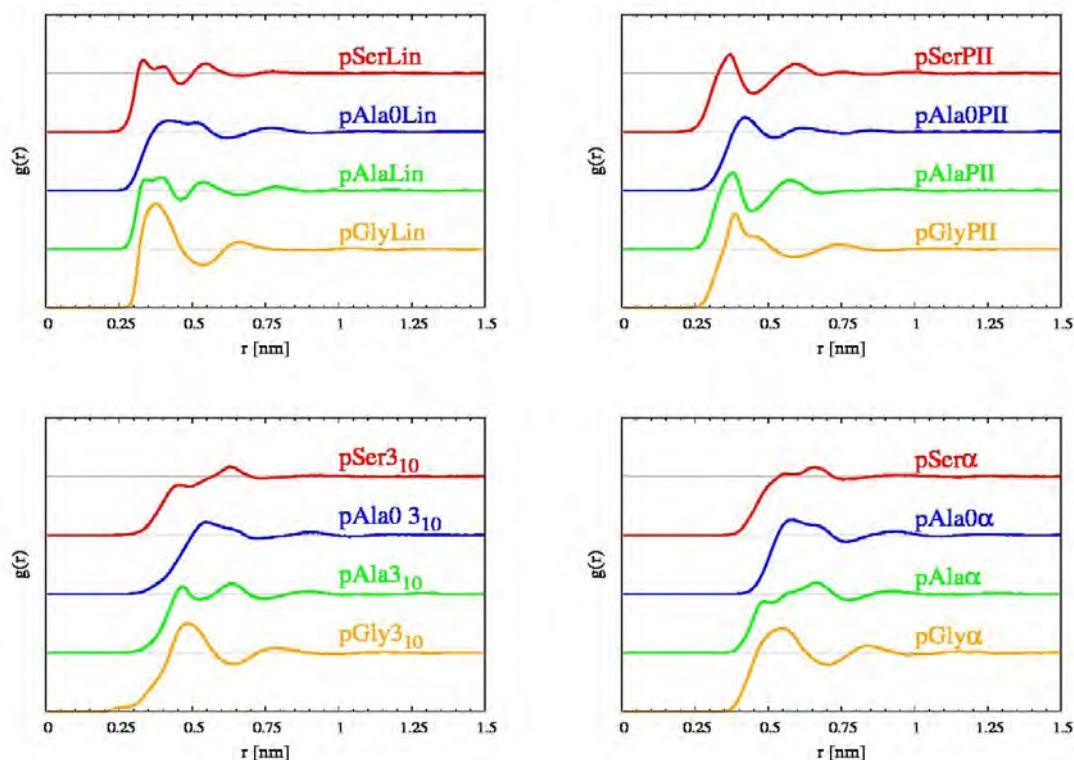
Najważniejszym źródłem błędów jest prawdopodobnie ograniczona i stosunkowo niewielka liczba cząsteczek - zwłaszcza w pierwszej warstwie solwacyjnej. Oznacza to uśrednianie rezultatów po stosunkowo mało licznej próbie. Z tego też względu obliczenia powtarzano po kilka razy. Podane w tabelach i analizowane przeze mnie rezultaty stanowią średnią z wielu powtórzeń.

## 5. Wyniki i ich dyskusja

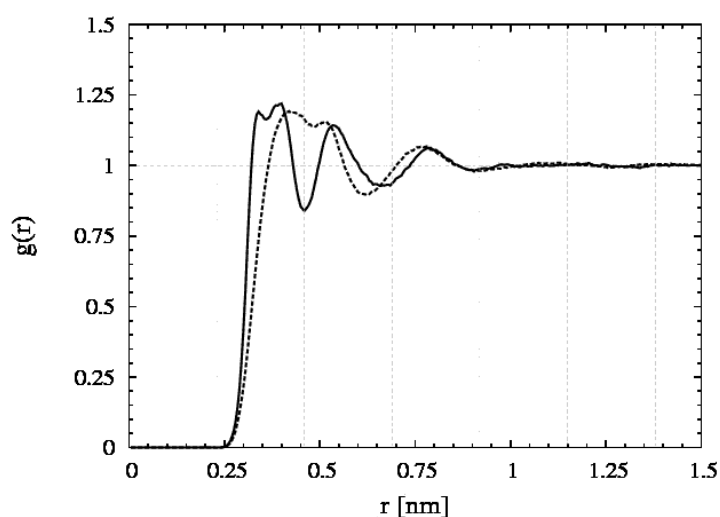
Na początek omówię własności strukturalne takie jak: funkcje rozkładu gęstości wody względem osi peptydu (co pozwoliło na zdefiniowanie warstw solwatacyjnych wokół peptydu i określenie zakresu zaburzeń spowodowanych obecnością peptydu), kąty Eulera opisujące ułożenie cząsteczek wody względem peptydu oraz funkcje rozkładu radialnego opisujące ułożenie się cząsteczek wody względem określonych atomów peptydu. Następnie zajmę się analizą geometrii i energii pojedynczego wiązania wodorowego, jak też i całej sieci wiązań wodorowych wokół peptydu. To wszystko pozwoli mi na ułatwienie interpretacji otrzymanych wartości parametrów uporządkowania wody względem peptydu, a następnie parametrów opisujących uporządkowanie samej wody w otoczce solwatacyjnej. Jednocześnie badane przeze mnie własności strukturalne pozwolą mi na weryfikację stworzonych miar uporządkowania. Po omówieniu parametrów uporządkowania przejdę do opisu własności dynamicznych, na które wpływ mają także własności strukturalne. Na końcu przedstawię podsumowanie uzyskanych wyników co powinno pozwolić mi na przedstawienie spójnego obrazu struktury i dynamiki wody w otoczce solwatacyjnej prostych polipeptydów, ale przede wszystkim roli i znaczenia zastosowanych parametrów uporządkowania w opisie struktury wody hydratacyjnej.

## 5.1. Struktura wody w otoczce solwatacyjnej

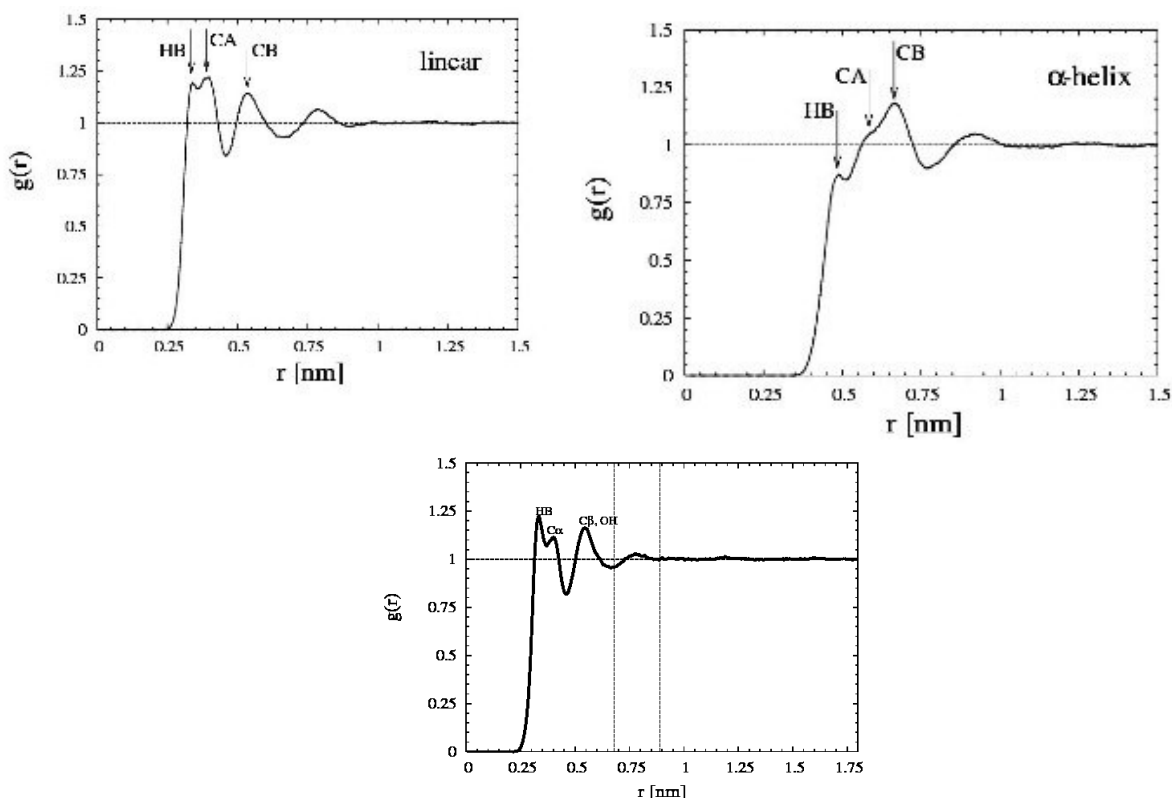
### 5.1.1. Funkcje rozkładu gęstości wody względem osi peptydu



Rys. 5.1.1.1. Funkcje rozkładu gęstości wody względem odległości  $r$  od osi peptydu określone dla czterech różnych konformacji poliseryny, polialaniny, polialaniny z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi oraz poliglicyny. Rozkłady tych funkcji zostały porzysowane pionowo dla lepszej przejrzystości.



Rys. 5.1.1.2. Funkcja rozkładu gęstości wody względem odległości  $r$  od osi konformacji liniowej „natywnej” (linia ciągła) i liniowej z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi (linia przerywana) polialaniny.



**Rys. 5.1.1.3.** Opis poszczególnych pików funkcji rozkładu gęstości wody względem odległości  $r$  od osi peptydu na przykładzie konformacji: a) liniowej łańcucha poliserynowego, b)  $\alpha$ -helikalnej polialaniny, c) liniowej łańcucha poliserynowego.

Funkcja rozkładu gęstości wody względem osi peptydu  $g(r)$  wiele mówi o zakresie zaburzeń, jakie wprowadza w strukturę wody obecność peptydu. Z uzyskanych wykresów (Rys. 5.1.1.1.) odczytałem zasięg pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej. Za granicę pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej wziąłem wartości odpowiednich minimów funkcji  $g(r)$ . Granicę pomiędzy pierwszą, a drugą warstwą solwatacyjną można uznać za umowną, ponieważ biorę pod uwagę jedynie odległość od osi peptydu. Z tego rysunku odczytałem też zakres zmian strukturalnych w wodzie indukowanych obecnością peptydu – nie przekracza on 1,15 nm od osi peptydu.

Na Rys. 5.1.1.1. przedstawiłem porównanie przebiegu funkcji  $g(r)$  dla poliseryny, polialaniny oraz polialaniny z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi („wysoco hydrofobowej”). Już na pierwszy rzut oka można zauważyć znaczne podobieństwo pomiędzy przebiegiem tych funkcji dla poliseryny i polialaniny, pomimo tego iż seryna jest uważana za aminokwas polarny, zaś alanina za aminokwas hydrofobowy. W przypadku łańcucha wyprostowanego (konformacji liniowej) nie widać żadnych większych różnic pomiędzy poliseryną, a polialaniną. W przypadku formy  $\alpha$ -helikalnej porównując polialaninę z poliseryną możemy zaobserwować w przypadku tej



drugiej zanik niewielkiego pików ( $\sim 0,47$  nm) związanego z tworzeniem się wiązań wodorowych pomiędzy szkieletem peptydowym, a wodą; w przypadku formy liniowej obu tych peptydów takiej różnicy nie obserwujemy, co można wytłumaczyć większą dostępnością atomu tlenu karbonylowego i azotu amidowego w przypadku konformacji liniowej; w przypadku konformacji helikalnych dostęp do tlenu karbonylowego poliseryny jest bardziej utrudniony niż do tlenu karbonylowego polialaniny.

Przebieg dla konformacji z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi pozwolił mi przede wszystkim na uwidocznienie wpływu wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody z tlenem karbonylowym i azotem amidowym szkieletu peptydowego. Co ciekawe można zaobserwować większe podobieństwo pomiędzy poliseryną i polialaniną „natywną” aniżeli pomiędzy polialaniną „natywną” i polialaniną „wysoco hydrofobową”. W przypadku form polialaniny z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi od razu rzuca się w oczy zanik „rozszczenia” pików (za wyjątkiem konformacji PII). Pokazuje to wagę oddziaływań elektrostatycznych nawet w przypadku peptydów uważanych za hydrofobowe. Wynika to z tego, że w przypadku peptydów z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi, nie mamy do czynienia z wiązaniami wodorowymi pomiędzy szkieletem peptydu (zwłaszcza atomami tlenu karbonylowego), a wodą z I otoczki solwatacyjnej. To, że „zanik rozszczenia” nie zachodzi w przypadku konformacji PII można wyjaśnić tym, że struktura ta jest ze swej natury bardziej „otwarta” niż pozostałe formy helikalne w wyniku czego umiejscowienie cząsteczki wody w jej wnętrzu nie jest kosztowne pod względem entropowym (cząsteczka wody ma nadal dość dużą swobodę ruchów).

Znaczenie poszczególnych pików zostało zobrazowane na Rys. 5.1.1.3. Pik odpowiadający wodzie znajdującej się wokół grup metylowych w przypadku poliseryny nie wynika wyłącznie z obecności wody wokół grupy metylowej, ale bierze pod uwagę również obecność wody wokół grupy hydroksylowej. Tłumaczy to również przesunięcie tego pików w kierunku większych wartości  $r$ , zwłaszcza w przypadku form: liniowej, PII i  $3_{10}$ , w mniejszym zakresie w przypadku konformacji  $\alpha$ -helikalnej. Widać wyraźnie że szczególnie dobrze wykształcone są piki odpowiadające I warstwie solwatacyjnej; pik odpowiadający II warstwie jest znacznie mniejszy co sugeruje, że wpływ peptydu ogranicza się tylko do cząsteczek wody bezpośrednio go otaczających. Piki odpowiadające I i II warstwie są oddzielone od siebie wyraźnym minimum. W przypadku helisy PII położenie maksimum niewiele odbiega od maksimum dla form liniowych, co jest skutkiem specyficznej, otwartej budowy tej helisy nie posiadającej wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych wskutek czego cząsteczki wody mogą w dużej mierze sięgać do „załomów” tej struktury; nie tworzy się

objętość wyłączona dal rozpuszczalnika w takim sensie w jakim jest ona obecna w przypadku pozostałych analizowanych przeze mnie helis.

Dla „natywnych” polipeptydów opartych na alaninie i serynie obserwuję piki wielokrotne („rozszczerzone”) w przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla poliglicyny, co jest wyraźną konsekwencją obecności bocznej grupy metylowej w reszcie alaninowej oraz grupy hydroksymetylowej w reszcie serynowej. Czym dana konformacja „natywna” jest bardziej rozciągnięta tym bardziej widoczne jest rozszczepienie pików, co może nawet złudnie wskazywać na istnienie 3 warstw solwatacyjnych. Oddziaływaniom wody ze szkieletem peptydu odpowiadają piki dla najmniejszych wartości  $r$  (Rys. 5.1.1.3.; dla konformacji liniowej i PII polialaniny są to piki mające maksimum przy  $r \sim 0,35$  nm; dla konformacji  $3_{10}$  pik mający maksimum przy  $\sim 0,45$  nm, zaś dla  $\alpha$ -helisy pik przy  $\sim 0,55$  nm). Można zauważyć, że im konformacja jest bardziej rozciągnięta, tym wartości tego maksimum są większe (zależność ta nie dotyczy konformacji PII, która ma nawet wyższe maksimum niż forma liniowa). Można to wytłumaczyć zwiększającą się trudnością w dostaniu się cząsteczki wody do szkieletu peptydu w przypadku form „kompaktowych” (w których tworzą się wiązania wodorowe pomiędzy tlenem karbonylowym jednej reszty, a wodorem amidowym innej reszty). To, że niewielkie rozszczepienie tego piku  $\sim 0,30$  nm jest najsilniej widoczne w przypadku konformacji liniowej tłumaczą tym, że w przypadku tej konformacji założenie o walcowym kształcie cząsteczki jest najmniej spełnione, przez co uwidaczniają się dwa „zębki” na piku, z których ten dla mniejszego  $r$  wynika z obecności wody wokół tlenu karbonylowego, zaś ten dla nieco większego  $r$  z hydratacji grup CH szkieletu. Niewielkie uwypuklenie odpowiadające hydratacji grup CH szkieletu jest także widoczne dla  $\alpha$ -helisy ( $\sim 0,55$  nm), przy czym tutaj zlewa się on z pikiem ( $\sim 0,65$  nm) odpowiadającym hydratacji bocznych grup metylowych. W przypadku pozostałych konformacji wypuklenia wynikające z hydratacji bocznych grup metylowych występują przy ( $\sim 0,55$  nm, helisa PII), ( $\sim 0,65$  nm; helisa  $3_{10}$ ), ( $\sim 0,65$  nm;  $\alpha$ -helisa).

Odległość przy jakiej obserwuję maksimum pierwszego piku zależy od szerokości struktury drugorzędowej. Można zauważyć przesuwanie się maksimum ku mniejszym wartościom wraz ze zmniejszaniem się średnicy struktury (Rys. 5.1.1.2.). W przypadku helisy PII położenie maksimum jest zbliżone do tego dla konformacji liniowej. Funkcja  $g(r)$  ma najbardziej złożony kształt w przypadku konformacji liniowej co jest skutkiem największej asymetryczności tego układu.

Przypominam, że przez „oś peptydu” rozumiem oś odpowiadającą najmniejszej wartości

momentu bezwładności peptydu, nie zaś geometryczną oś symetrii (lekko nachylona względem pierwszej). Może to mieć pewien niewielki wpływ na różnice w szerokości i kształcie pierwszego piku występujące pomiędzy układami.

### 5.1.2. Orientacja przestrzenna cząsteczek wody w stosunku do osi peptydu

W celu określenia orientacji cząsteczek wody względem osi peptydu wyznaczyłem rozkłady prawdopodobieństwa kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  (vide: Rozdz. 4.2.2.). Przykładowe rozkłady tych kątów przedstawiłem na Rysunku 5.1.2.1. Więcej rysunków zamieściłem w Suplemencie do tego rozdziału.

W przypadku  $\alpha$ -helisy (Rys. 5.1.2.S7) oraz helisy PII (Rys. 5.1.2.S3) polialaniny widać w najbliższym sąsiedztwie peptydu wyraźne preferencje dla kąta  $90^\circ$  co oznacza ustawienie cząsteczek wody płaszczyzną prostopadle do płaszczyzny peptydu. Dla konformacji liniowej (Rys. 5.1.2.S1) oraz helisy  $3_{10}$  (Rys. 5.1.2.S5) polialaniny widoczne jest preferowanie kąta  $0/180^\circ$ , który to oznacza ustawienie cząsteczek płaszczyzną równoległe do płaszczyzny peptydu; w przypadku helisy  $3_{10}$  mamy także do czynienia z mniejszą, ale widoczną preferencją dla kąta  $90^\circ$ . Jeśli spojrzymy na rozkłady kąta  $\alpha$  dla konformacji polialaniny z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi (Rys. 5.1.2.S2, Rys. 5.1.2.S4, Rys. 5.1.2.S6, Rys. 5.1.2.S8) widoczna jest w przypadku wszystkich konformacji preferencja kąta  $0/180^\circ$ , zaś minimum jest dla wartości kąta  $90^\circ$ . Z tego można wnioskować, że oddziaływania elektrostatyczne mają największy wpływ na kąt  $\alpha$  (ułożenie płaszczyzny cząsteczki wody względem powierzchni peptydu) w przypadku  $\alpha$ -helisy, helisy PII oraz helisy  $3_{10}$ , zaś najmniejszy w przypadku konformacji liniowej. To ostatnie można wytłumaczyć znaczną dostępnością szkieletu peptydowego.

Jeśli chodzi o poliserynę (Rys. 5.1.2.S9) to w najbliższym sąsiedztwie peptydu wyraźna jest preferencja dla ułożenia płaszczyzną cząsteczki wody równoległe do płaszczyzny peptydu (kąt  $\sim 0/180^\circ$ ) w przypadku konformacji liniowej, oraz helis:  $\alpha$  i  $3_{10}$ ; w przypadku helisy  $3_{10}$  mamy także do czynienia ze skłonnością do ustawienia się cząsteczek wody „pod skos” (kąty  $\sim 55^\circ$  i  $\sim 125^\circ$ ); natomiast cząsteczki wody wokół helisy PII faworyzują kąt  $\sim 90^\circ$  czyli układają się prostopadle do „walca” tworzonego przez peptyd. Generalnie w przypadku  $\alpha$ -helisy i helisy  $3_{10}$  tendencje do przyjmowania przez cząsteczki wody w I warstwie solwatacyjnej określonej wartości kąta  $\alpha$  są słabsze niż w przypadku dwóch pozostałych analizowanych konformacji poliseryny.

W przypadku wszystkich analizowanych konformacji poliglicyny A. Kuffel i J. Zielkiewicz [2] zaobserwowali w najbliższym sąsiedztwie peptydu preferencję dla kąta  $\alpha$  wynoszącego  $\sim 0/180^\circ$  czyli dla ułożenia cząsteczek wody równoległe względem płaszczyzny peptydu. Takie ułożenie w którym cząsteczki wody nie kierują atomu wodoru bądź tlenu wprost na peptyd ułatwia utrzymanie sieci wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami rozpuszczalnika w sytuacji gdy peptyd nie ma wystarczającej liczby akceptorów i donorów wiązań wodorowych zdolnych do kompensowania wszystkich wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki w czystej wodzie, a zwłaszcza w przypadku  $\alpha$ -helisy i helisy  $3_{10}$ , gdzie miejsca mogące tworzyć takie wiązania są zaangażowane w wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe stabilizujące strukturę helikalną. W przypadku poliglicyny utrzymanie integralności sieci wiązań wodorowych jest względnie łatwe z powodu braku łańcuchów bocznych mogących w pewnym stopniu „rozrywać” taką sieć jak w przypadku polialaniny i poliseryny.

Generalnie w przypadku polialaniny dla kątów  $\alpha$  i  $\gamma$  można zaobserwować bardziej wyraźne preferencje, aniżeli dla kąta  $\beta$  (podobną sytuację stwierdzili A. Kuffel i J. Zielkiewicz [2] dla poliglicyny). Przyczyną może być to, że przy stałych wartościach kątów  $\alpha$  i  $\gamma$ , zmiana kąta  $\beta$  nieznacznie zmienia odległość atomów wodoru od cząsteczki peptydu. Ponadto gdy rozkład prawdopodobieństwa dla kąta  $\alpha$  ma maksimum przy  $\sim 0/180^\circ$  wówczas wektor  $Oz_w$  jest skierowany wprost na oś peptydu (lub występuje w orientacji przeciwnej), co implikuje to, że nawet duże zmiany kąta  $\beta$  są słabo widoczne w postaci zmiany ułożenia cząsteczki (w przeciwieństwie do sytuacji gdy kąt  $\alpha$  wynosi  $\sim 90^\circ$ ). Wokół wszystkich rozważanych konformacji można zaobserwować maksima przy wartości kąta  $\sim 90^\circ$  i  $\sim 270^\circ$ , a minimum w okolicach  $\sim 0/180^\circ$ . Wynika z tego, że cząsteczki rozpuszczalnika nie kierują atomu tlenu ani wodoru wprost na peptyd. Po części można to wytłumaczyć efektem hydrofobowym, który amfifilowy peptyd polialaninowy mniej lub bardziej wywołuje. Rozmiary peptydu są zbyt duże aby była możliwość swobodnego tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody w I warstwie solwatacyjnej; z drugiej strony nie zawsze jest możliwość tworzenia wiązań wodorowych ze szkieletem peptydu. Z podobnym przebiegiem rozkładu kątów  $\beta$  mamy do czynienia w przypadku peptydów poliserynowych (Rys. 5.1.2.S10). Na tym tle jednak wyróżnia się  $\alpha$ -helikalna poliseryna gdzie praktycznie wszystkie wartości kątów są równouprawnione oraz poliserynowa helisa PII gdzie preferencja dla kątów  $\sim 90^\circ$  i  $\sim 270^\circ$  „uległa rozszczepieniu” w wyniku czego mamy cztery piki. Z tego można wnioskować, iż w przypadku  $\alpha$ -helisy poliserynowej dostęp do szkieletu peptydu jest szczególnie utrudniony w wyniku czego cząsteczkom wody nie

pozostaje nic innego jak możliwość tworzenia wiązań wodorowych z grupami hydroksylowymi łańcuchów bocznych. W przypadku polialanin z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi przebieg wykresu jest podobny jak dla form „natywnych” z mniej wyrazistymi maksimami i minimami, co potwierdza, że 1) jest on determinowany w dużej mierze geometrią peptydu i efektem hydrofobowym, 2) w przypadku form „wysoce hydrofobowych” cząsteczki wody nie dostają się tak blisko „wnętrza” peptydu jak w przypadku form natywnych, gdyż została im odebrana możliwość tworzenia korzystnych pod względem energetycznych wiązań wodorowych ze szkieletem peptydu.

W przypadku poliglicyny A. Kuffel i J. Zielkiewicz [2] zaobserwowali we wszystkich analizowanych konformacjach preferencję dla kątów  $\sim 90^\circ$  i  $\sim 270^\circ$  (a minimum dla kątów  $\sim 0/360^\circ$  i  $\sim 180^\circ$ ), a więc dla sytuacji w której cząsteczki wody ustawiają się tak, że wektor  $Oz_w$  cząsteczki rozpuszczalnika nie odchyła się na boki względem osi peptydu.

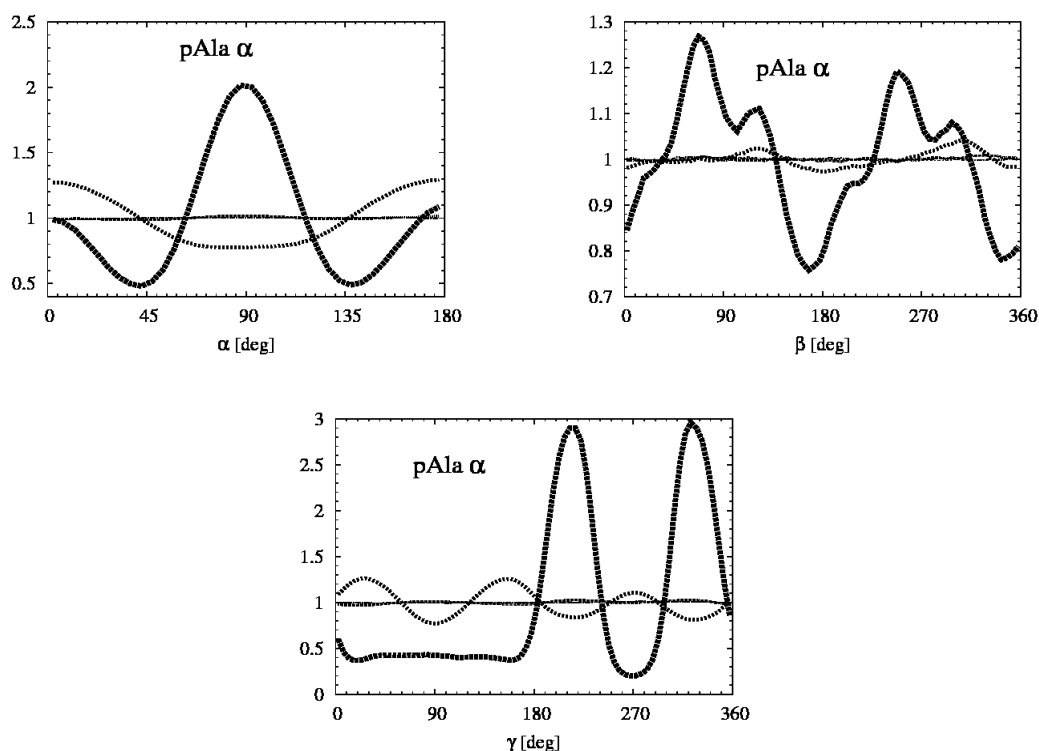
Kąt  $\gamma$  wykazuje znaczne preferencje do przyjmowania określonych wartości. Jego wartość można powiązać z mniej lub bardziej znaczącymi zmianami odległości pomiędzy atomami wodoru a peptydem (przy ustalonych wartościach kątów  $\alpha$  i  $\beta$ ). W przypadku konformacji liniowej polialaniny (Rys. 5.1.2.S1) widać wyraźną preferencję dla kąta  $\sim 90^\circ$ , co oznacza że atom tlenu cząsteczki wody jest zorientowany na peptyd, a oba atomy wodoru są z grubsza równo odległe od osi peptydu i kierują się ku zewnętrznej części otoczki solwatacyjnej. Generalnie w tym wypadku możemy wyróżnić preferowany zakres kątów w przedziale  $\sim 0-180^\circ$ , i niepreferowany w zakresie  $\sim 180-360^\circ$ ; a więc mamy do czynienia ze skłonnością cząsteczek wody do kierowania swoich wodorów w stronę głębi roztworu.  $\alpha$ -Helisa z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi (Rys. 5.1.2.S2) sprzyja kątom  $\gamma$  wynoszącym  $\sim 30^\circ$ ,  $\sim 150^\circ$  oraz  $\sim 270^\circ$ , zaś minima występują przy  $\sim 90^\circ$ ,  $\sim 210^\circ$  oraz  $\sim 330^\circ$ . W przypadku polialaninowej helisy PII (Rys. 5.1.2.S3) obok preferencji dla kąta  $\sim 90^\circ$  pojawia się skłonność do przyjmowania wartości  $\sim 210^\circ$  i  $\sim 330^\circ$ . Odpowiadają one takiemu ułożeniu cząsteczki, że jedno z wiązań O-H jest skierowane wprost na peptyd (przy zastrzeżeniu, że kąt  $\alpha$  nie jest bliski 0). Oznacza, to że w tym przypadku wiązanie to nie może służyć jako donor wiązania dla pozostałych cząsteczek wody, będzie mogło co najwyżej tworzyć wiązanie wodorowe z peptydem. Jeśli chodzi o formę „wysoce hydrofobową” (z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi) to w przypadku helisy PII (Rys. 5.1.2.S4) w najbliższym sąsiedztwie peptydu mamy do czynienia z antykorelacją preferencji pomiędzy tą formą a strukturą „natywną” (tam gdzie występują maksima w „natywnej”, tam w „wysoce hydrofobowej” mamy maksima i na odwrót). Dowodzi to istotnej roli wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody ze szkieletem helisy PII. W przypadku polialaninowej helisy  $3_{10}$  (Rys. 5.1.2.S5) wyraźna jest skłonność do

przyjmowania przez cząsteczki wody kątów  $\gamma$  o wartościach  $\sim 210^\circ$  i  $\sim 330^\circ$ , co oznacza że cząsteczki rozpuszczalnika w najbliższym sąsiedztwie tej helisy przynajmniej jedno z wiązań O-H kierują wprost na peptyd (przy założeniu, że kąt  $\alpha$  odbiega od 0). Oznacza to, że w tym przypadku możliwość utworzenia wiązania wodorowego z innymi cząsteczkami wody będzie utrudniona, znajdzie jednak możliwość utworzenia takiego wiązania z atomami peptydu. Jednocześnie w wypadku tej konformacji widać minimum przy  $\sim 270^\circ$ , co oznacza niechęć cząsteczek wody do kierowania swojego kąta rozwartego pomiędzy swoimi wiązaniami O-H na peptyd, czyli sytuacji w której oba atomy wodoru są mniej więcej równo odległe od osi peptydu. W przypadku „wysocę hydrofobowej” konformacji  $3_{10}$  (Rys. 5.1.2.S6) rozkład prawdopodobieństwa występowania określonych kątów  $\gamma$  przypomina ten dla form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi w przypadku formy liniowej i PII, można jednak zauważyć że dążność do przyjmowania kąta  $270^\circ$  (odpowiadającego sytuacji w której cząsteczki wody ustawiają się dwusieczną kąta HOH ku powierzchni peptydu) pojawia się dla cząsteczek wody bardziej oddalonych od osi peptydu. Generalnie skłonność cząsteczek wody do unikania kierowania „ramion” O-H na peptyd w przypadku form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi jest po prostu skutkiem efektu hydrofobowego, czyli m. in. swoistego dopasowania się cząsteczek wody do struktury peptydu w taki sposób aby była możliwość utworzenia korzystnych pod względem energetycznym wiązań wodorowych z sąsiednimi cząsteczkami wody. Bardzo wyraźna dążność do przyjmowania kątów  $210^\circ$  i  $330^\circ$  jest widoczna w najbliższym sąsiedztwie  $\alpha$ -helisy polialaninowej (Rys. 5.1.2.S7). Oznacza to, że w tym przypadku w najbliższym sąsiedztwie (0,35-0,51 nm od osi tej  $\alpha$ -helisy) mamy cząsteczki wody, które najczęściej kierują swoje wiązania O-H w kierunku peptydu. Jednak w przypadku cząsteczek wody znajdujących się nieco dalej (0,51-0,77 nm od osi peptydu) podobnie jak w przypadku większej odległości od helisy  $3_{10}$  (0,52-0,74 nm od osi peptydu) znajduje się więcej cząsteczek wody o preferencjach dla kątów  $\sim 30^\circ$ ,  $\sim 150^\circ$  oraz  $\sim 220^\circ$  (i minimach przy  $\sim 90^\circ$ ,  $\sim 210^\circ$ ,  $\sim 330^\circ$ ). W przypadku formy z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi (Rys. 5.1.2.S8) nie widać tak wyraźnych preferencji.

Jeśli chodzi o poliserynę (Rys. 5.1.2.S11) to w przypadku konformacji liniowej w najbliższym sąsiedztwie peptydu widać wyraźną preferencję dla kąta  $\sim 90^\circ$ , czyli dla sytuacji w której atom tlenu cząsteczki wody jest zorientowany na peptyd, a oba atomy wodoru są mniej więcej równo oddalone od osi peptydu kierując się w stronę głębi roztworu. W przypadku cząsteczek bardziej oddalonych preferowane stają się kąty  $\sim 210^\circ$  oraz  $\sim 330^\circ$  odpowiadające sytuacji, że jedno z „ramion” O-H kieruje się wprost na peptyd (dla kąta  $\alpha$  różnego od  $\sim 0$ ) co wskazuje na możliwość tworzenia się wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody, a

peptydem np. z grupami hydroksylowymi. Cząsteczki w najbliższym sąsiedztwie poliserynowej helisy PII także najchętniej przyjmują wartości kąta równe  $\sim 210^\circ$  i  $\sim 330^\circ$ , w mniejszym stopniu preferowany jest też kąt  $90^\circ$ . Cząsteczki wody wokół helisy  $3_{10}$  wykazują pewną niewielką preferencję dla wartości kąta  $\gamma$  równych  $210^\circ$  i  $330^\circ$ , zaś w przypadku poliserynowej  $\alpha$ -helisy podobnie jak w przypadku kątów  $\alpha$  i  $\beta$  ciężko mówić o jakichkolwiek preferowanych wartościach kątów  $\gamma$ . Oznacza to, że cząsteczki wody wokół tych helis możliwości tworzenia wiązań wodorowych praktycznie we wszystkich kierunkach.

W przypadku konformacji poliglicynowych zaobserwowano [2] sytuację w której na rozkładzie prawdopodobieństw kąta  $\gamma$  począwszy od  $\sim 30^\circ$  występują naprzemiennie maksima i minima niemal dokładnie co  $60^\circ$ . Dwa pierwsze piki przy  $\sim 30^\circ$  i  $\sim 150^\circ$  mają taką samą wysokość, trzeci ( $\sim 270^\circ$ ) jest niższy. Pierwsze minimum ( $\sim 90^\circ$ ) jest najgłębsze, dwa dalsze ( $\sim 210^\circ$  i  $\sim 330^\circ$ ) są płytsze. Pierwsze i drugie maksimum odpowiadają sytuacji w której cząsteczki wody orientują się w taki sposób, aby jedno z ich „ramion” O-H znajdowało się jak najdalej peptydu i było skierowane od peptydu w stronę głębi rozpuszczalnika w wyniku czego drugie „ramię” O-H nie jest także skierowane wprost na peptyd, ale znajduje się pod kątem umożliwiającym jego funkcjonowanie jako donoru wiązania dla innej cząsteczki rozpuszczalnika. Nieco niższe trzecie maksimum odzwierciedla cząsteczki wody, które kierują dwusieczną kąta pomiędzy „ramionami” wprost na peptyd z oba atomami wodoru mniej więcej równo odległymi od osi peptydu i w bliższej odległości aniżeli atom tlenu cząsteczki wody. Widać wyraźnie, że niezależnie od składu aminokwasowego i konformacji wyraźne maksima bądź minima dla rozkładu prawdopodobieństwa występowania określonego kąta  $\gamma$  mogą pojawiać się tylko w określonych miejscach na wykresie począwszy od wartości  $\sim 30^\circ$  co  $\sim 60^\circ$  czyli przy:  $\sim 30^\circ$ ,  $\sim 90^\circ$ ,  $\sim 150^\circ$ ,  $\sim 210^\circ$ ,  $\sim 270^\circ$ ,  $\sim 330^\circ$ .



**Rys. 5.1.2.1.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji  $\alpha$ ; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,35-0,51 nm, 0,51-0,77 nm, 0,77-1,04 nm, 1,04-1,41 nm, 1,41-1,98 nm od osi peptydu.

### 5.1.3. Oddziaływanie otoczki solwatacyjnej z atomami peptydu

Znacznie precyzyjniejszą miarą oddziaływań cząsteczek wody z atomami peptydu są funkcje rozkładu radialnego atomów wodoru i tlenu tych cząsteczek wokół wybranych atomów peptydu: tlenu karbonylowego (*vide*: Suplement; Rys. 5.1.3.S1), azotu amidowego (Rys. 5.1.3.S3), wodoru amidowego (Rys. 5.1.3.S2) - w przypadku wszystkich badanych konformacji oraz wokół tlenu hydroksylowego (w przypadku poliseryny; Rys. 5.1.3.S4).

W przypadku każdego z badanych układów na funkcji rozkładu radialnego atomów tlenu i wodoru cząsteczki wody wokół tlenu karbonylowego peptydu widoczny był najpierw pik odpowiadający atomowi wodoru, a następnie tlenu, co wskazuje na istnienie wiązania wodorowego (Rys. 5.1.3.1). W przypadku poliglicyny A. Kuffel i J. Zielkiewicz [2] zaobserwowali, że najlepiej wykształcone są piki dla helisy PII i konformacji liniowej, co jest skutkiem tego że w przypadku tych dwóch struktur dostęp cząsteczek rozpuszczalnika do tlenu karbonylowego był najłatwiejszy, gdyż nie jest on tutaj zaangażowany w wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Podobne zjawisko zaobserwowałem w przypadku konformacji polialaniny i poliseryny – tutaj również piki

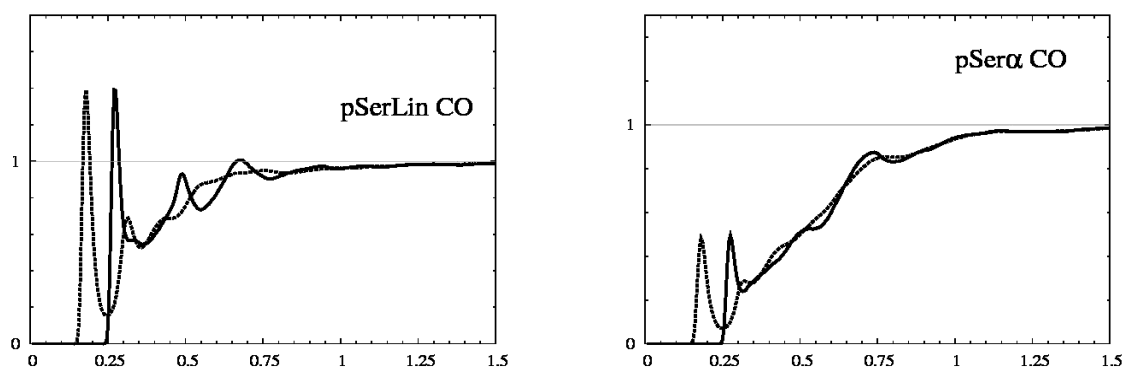


są dużo wyższe i ostrzejsze w przypadku dwóch wspomnianych konformacji. Zarówno w przypadku poliseryny jak i polialaniny najwyższe piki zaobserwowałem w przypadku konformacji PII, co jest zgodne z wynikami badań Mezei'a i wsp. [164], że helisa PII spośród konformacji polialaniny tworzy średnio najwięcej wiązań wodorowych z wodą w przeliczeniu na aminokwas. Jeśli chodzi o konformacje helikalne to piki odpowiadające hydratacji tlenów karbonylowych są wyższe w przypadku polialany aniżeli poliseryny, co jest oczywiście wynikiem większej dostępności tych akceptorów wiązań wodorowych w pierwszym przypadku.

Patrząc na funkcje rozkładu radialnego wokół wodoru amidowego oraz azotu amidowego wyraźnie widać, że zarówno w przypadku polialaniny jak i poliseryny o wiązaniach wodorowych w których atom wodoru amidowego jest donorem wiązania wodorowego możemy mówić tylko w przypadku łańcucha wyprostowanego i helisy PII. Wyraźnie wyróżnia to te dwie konformacje od helis z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi:  $\alpha$  i  $3_{10}$ . Podobne zjawisko zaobserwowała A. Kuffel [224] w przypadku poliglicyny. Różnice w przebiegu funkcji rozkładu radialnego wokół tlenu karbonylowego a azotu i wodoru amidowego potwierdzają potwierdzony eksperymentalnie przez Stangreta i wsp. [225] fakt, że cząsteczka wody oddziałuje silniej z tlenem karbonylowym aniżeli z wodorem grupy amidowej, gdyż wiązania wodorowe z tlenem karbonylowym tworzą się mniej lub bardziej w przypadku wszystkich analizowanych przez konformacji niezależnie od składu aminokwasowego.

Analizując funkcje rozkładu radialnego atomów tlenu i wodoru cząsteczek wody wokół tlenu hydroksylowego poliseryny nie obserwuję jakościowych różnic pomiędzy analizowanymi konformacjami. We wszystkich przypadkach widać wyraźnie ostre i znaczące piki obrazujące wiązania wodorowe tworzone pomiędzy rozpuszczalnikiem a łańcuchami bocznymi reszt serynowych. Ponownie najostrzejszy pik jest w przypadku helisy PII, co wspiera tezę, że helisa PII powoduje najmniejsze uporządkowanie przestrzenne cząsteczek wody i dobrze wpasowuje się w strukturę rozpuszczalnika nie tylko w przypadku polialaniny [164], czy poliglicyny [2], ale także w przypadku poliseryny.

Rys. 5.1.3.S4 potwierdza możliwość tworzenia się mostków wodnych pomiędzy grupami hydroksylowymi poliseryny. Na istnienie takich mostków wskazywał już Gomide Freitas i wsp. [11], zaś Doruker i Bahar [6] znaleźli, że najbardziej prawdopodobna wartość kąta tworzącego się pomiędzy wiązaniem kowalencyjnym  $C\beta-O\gamma$  i wiązaniem wodorowym  $O\gamma\cdots O(\text{woda})$  w przypadku  $\alpha$ -helisy poliserynowej wynosi  $105^\circ$ , co jest dość bliskie wartości kąta tetraedrycznego ( $109^\circ 28'$ ).



**Rys. 5.1.3.1.** Przykładowe funkcje rozkładu radialnego atomów wodoru (linia przerywana) i tlenu (linia ciągła) wokół tlenu karbonylowego peptydu w przypadku formy liniowej poliseryny (rysunek po lewej) i  $\alpha$ -helisy poliserynowej (rysunek po prawej stronie).

#### 5.1.4. Geometria i energia wiązań wodorowych. Geometria sieci wiązań wodorowych

W celu analizowania właściwości danego wiązania wodorowego biorę pod uwagę średnią liczbę wiązań wodorowych przypadających na cząsteczkę wody, średnią energię tego wiązania, i rozkłady prawdopodobieństwa następujących wielkości: kąta  $\beta_{\text{OOH}}$ , odległości tlen-tlen  $R_{\text{OO}}$ , długości wiązania wodorowego  $d_{\text{OH}}$  (*vide*: Rozdz. 4.2.5.). Wszystkie te właściwości określiłem oddzielnie dla pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej (i także oczywiście) dla czystej wody TIP4P. Wyniki zebrałem także w Tabeli 5.1.4.1. Określenie właściwości wiązania wodorowego jest o tyle istotne, że determinuje ono w olbrzymim stopniu właściwości strukturalne, jak i dynamiczne wody jak chociażby jej anomalie w porównaniu z innymi cieczami. Generalnie geometria wiązania wodorowego widoczna w pierwszej warstwie solwatacyjnej, zmienia się nieznacznie w porównaniu z tą dla czystej wody wspierając tezę o niewielkich zmianach struktury wody “solwatacyjnej”. W celu uzyskania bardziej szczegółowego opisu, można się zapytać jak rozkłady prawdopodobieństwa ( $\beta_{\text{HB}}$ ,  $R_{\text{OO}}$ ,  $d_{\text{OH}}$ ) w ramach warstwy solwatacyjnej odchodzą od wartości dla czystej wody. Rys. 5.1.4.1-4. uwidaczniają różnicę w rozkładach prawdopodobieństwa pomiędzy wodą z I warstwy solwatacyjnej a czystym rozpuszczalnikiem, w przypadku wspomnianych wielkości.

W przypadku poliseryny (Rys. 5.1.4.4) zaobserwowane różnice w wartościach  $\beta_{\text{OOH}}$ ,  $R_{\text{OO}}$ ,  $d_{\text{OH}}$  są podobnego rzędu jak w przypadku polialaniny (Rys. 5.1.4.2). Różnice te narastają wraz ze stopniem skręcenia peptydu – najmniejsze zmiany obserwowane są w przypadku konformacji liniowej, największe w przypadku  $\alpha$ -helisy. Patrząc na rozkłady prawdopodobieństw wartości  $\beta_{\text{OOH}}$ ,

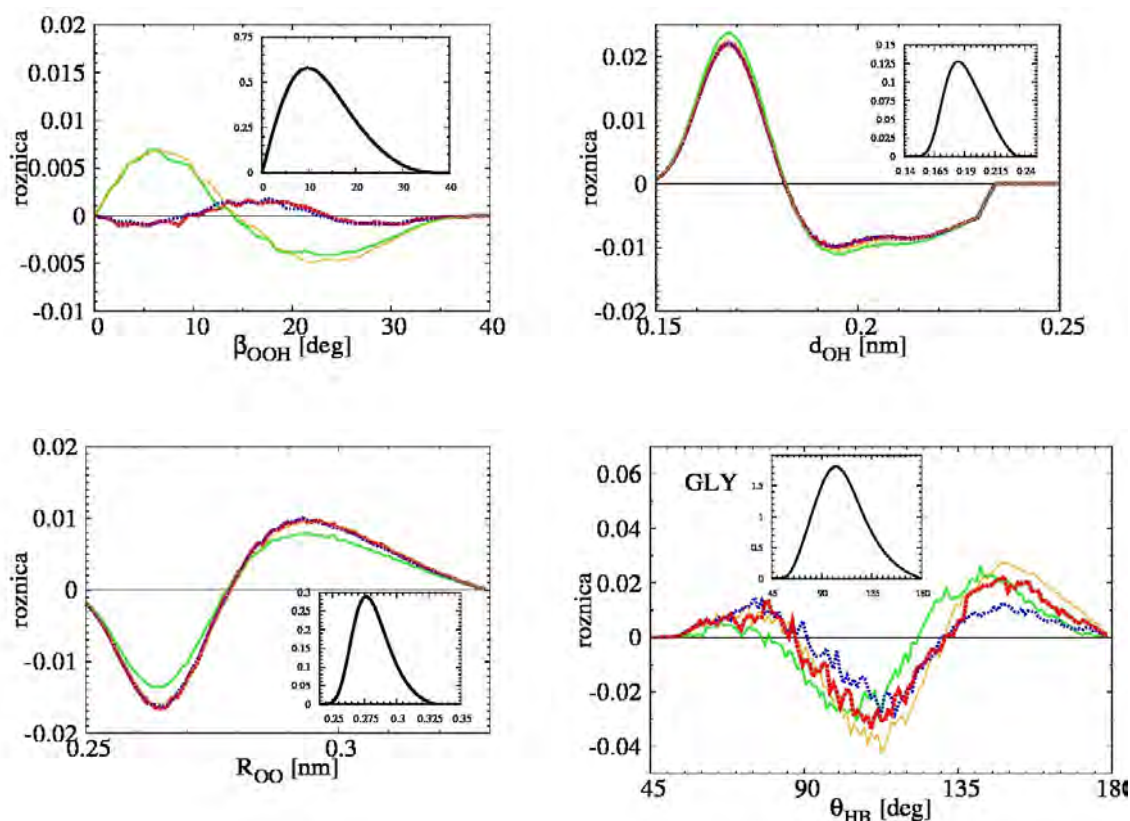
$R_{OO}$  i  $d_{OH}$  można zaobserwować, w przypadku I warstwy hydratacyjnej poliseryny wystrzające się piki, szczególnie w przypadku helisy. Jeśli chodzi o kąt  $\beta_{OOH}$ , widać wyraźną kolejność w wyostrzaniu się pików. Podobną tendencję jak i przebieg wspomnianych wielkości zaobserwowałem w przypadku polialaniny (Rys. 5.1.4.2) z tym, że tam nie widać istotniejszych różnic pomiędzy rozkładami dla łańcucha wyprostowanego a helisy PII. Generalnie zwiększanie się wartości kąta  $\beta_{OOH}$  wraz ze wzrostem średnicy peptydu wynika z tego, że większe struktury z powodu swojej geometrii bardziej zaburzają strukturę rozpuszczalnika w mniejszym stopniu umożliwiając tworzenie się liniowych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody, stymulując ich minimalne zginanie (co już po części dyskutowałem w Rozdz. 3.1. omawiając efekt hydrofobowy). Porównując helisę PII z formą liniową polialaniny nie obserwuję takiego zjawiska co jest spowodowane specyficznym kształtem helisy PII bardzo dobrze dopasowującej się do struktury wody.

Z porównania konformacji polialaninowych (Rys. 5.1.4.2) i poliserynowych (Rys. 5.1.4.4) wynika, iż grupy hydroksylowe łańcuchów bocznych reszt serynowych nie mają większego wpływu na geometrię wiązania wodorowego cząsteczek wody w I warstwie solwatacyjnej. Jednocześnie wskazuje to na rolę „ukształtowania powierzchni” łańcucha polipeptydowego.

Przyglądając się rozkładom prawdopodobieństw występowania wielkości:  $\beta_{HB}$ ,  $R_{OO}$ ,  $R_{OH}$ ,  $\theta_{HB}$  dla konformacji polialaniny „natywnej” (Rys. 5.1.4.2) można zauważyć ciekawe zachowanie się przebiegów tych funkcji w porównaniu z przebiegami dla konformacji w których „wyłączono” ładunki cząstkowe (Rys. 5.1.4.3). Jest to wyraźnie widoczne jeśli porównamy Rys. 5.1.4.2. z Rys. 5.1.4.3. Otóż im wyższe maksimum dla wiązań wodorowych wokół formy natywnej danej konformacji peptydu polialaninowego, tym głębsze minimum dla wiązań wodorowych wokół jej formy „hydrofobowej”.

**Tabela 5.1.4.1.** Strukturalne właściwości wiązań wodorowych woda-woda w obrębie pierwszej (I) i drugiej (II) otoczki solwatacyjnej dookoła różnych strukturalnych form poliglicyny, polialaniny i poliseryny.  $n_{HB}$ ,  $E_{HB}$ ,  $R_{OO}$  i  $\beta_{OOH}$  oznaczają odpowiednio średnią liczbę wiązań wodorowych na cząsteczkę wody, średnią energię tego wiązania, średnią odległość tlen-tlen i kąt OOH.

Konformacja	$n_{HB}$		$E_{HB}[\text{kJ mol}^{-1}]$		$R_{OO}[\text{nm}]$		$\beta_{OOH}[\text{deg}]$	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Gly <sub>15</sub> lin	2,86	3,07	18,53	18,30	0,2829	0,2830	12,75	12,77
Gly <sub>15</sub> PII	2,87	3,06	18,49	18,28	0,2827	0,2830	12,73	12,79
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	2,93	3,07	18,52	18,28	0,2829	0,2830	12,82	12,80
Gly <sub>15</sub> $\alpha$	2,93	3,06	18,53	18,27	0,2829	0,2830	12,82	12,80
Ala <sub>15</sub> lin	3,02	3,20	17,62	17,48	0,2818	0,2818	12,74	12,84
Ala <sub>15</sub> PII	3,02	3,21	17,65	17,50	0,2817	0,2818	12,66	12,81
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	3,05	3,21	17,73	17,48	0,2818	0,2819	12,66	12,82
Ala <sub>15</sub> $\alpha$	3,05	3,21	17,82	17,48	0,2818	0,2818	12,59	12,81
Ser <sub>15</sub> lin	2,94	3,20	17,52	17,48	0,2816	0,2818	12,82	12,84
Ser <sub>15</sub> PII	2,85	3,21	17,50	17,51	0,2815	0,2818	12,78	12,80
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	2,89	3,21	17,63	17,47	0,2815	0,2818	12,71	12,83
Ser <sub>15</sub> $\alpha$	2,88	3,22	17,62	17,49	0,2815	0,2818	12,69	12,80
Ala <sub>0</sub> 15lin	3,14	3,21	17,63	17,48	0,2821	0,2819	12,89	12,82
Ala <sub>0</sub> 15PII	3,14	3,21	17,60	17,48	0,2821	0,2819	12,88	12,81
Ala <sub>0</sub> 153 <sub>10</sub>	3,08	3,22	17,65	17,49	0,2822	0,2818	12,93	12,79
Ala <sub>0</sub> 15 $\alpha$	3,05	3,21	17,66	17,47	0,2822	0,2818	12,99	12,83
szacowana	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	$\pm 0,0001$	$\pm 0,0001$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$
granica błędu								
Woda TIP4P	3,21 $\pm$ 0,01		17,50 $\pm$ 0,01		0,2819 $\pm$ 0,0001		12,82 $\pm$ 0,01	



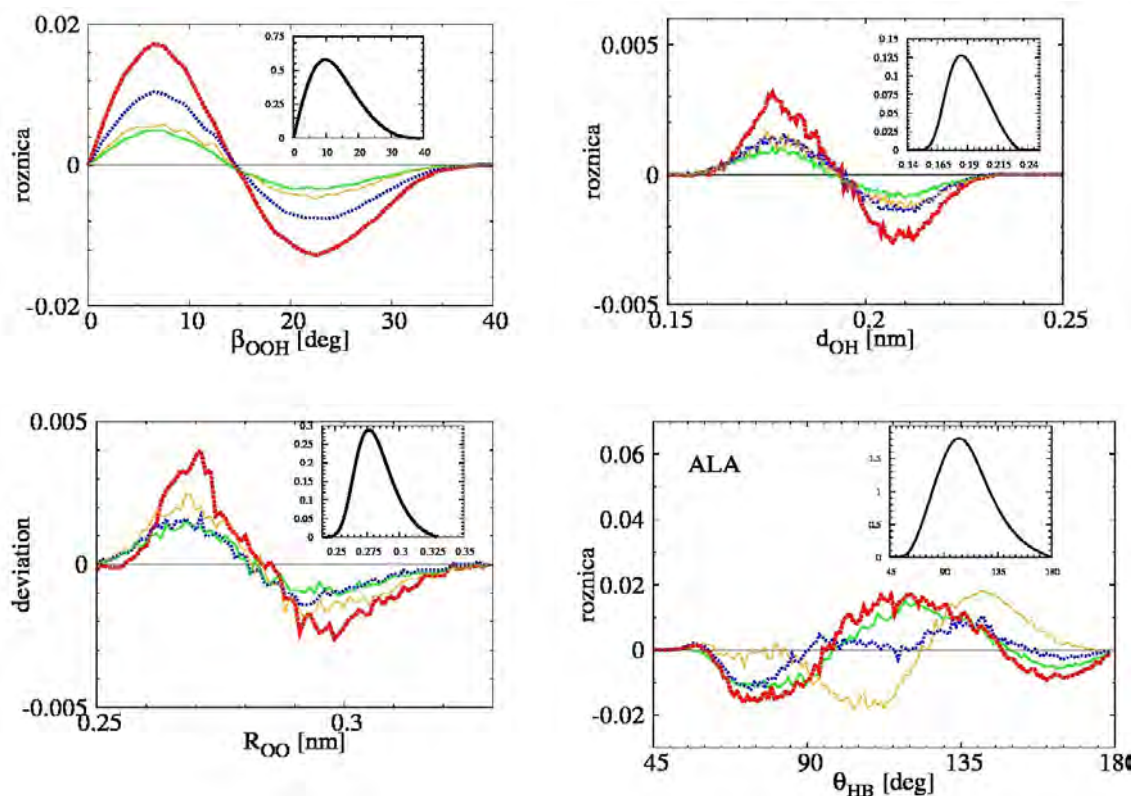
**Rys. 5.1.4.1.** Różnice w rozkładach prawdopodobieństwa ( $P_{solv} - P_{bulk}$ ) kąta wiązania wodorowego  $\beta_{OOH}$ , odległości tlen-tlen  $R_{OO}$ , odległości tlen akceptorowy-wodór donorowy  $d_{OH}$ , oraz kąta  $\theta_{HB}$  pomiędzy pierwszą warstwą solwatacyjną poliglicyny, a czystą wodą. W okienkach przedstawiono rozkłady prawdopodobieństwa dla czystej wody TIP4P. Kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa, kolor niebieski – helisa 3<sub>10</sub>, kolor zielony – helisa PII, kolor żółty – forma liniowa.

Oznacza to, że przebieg funkcji dla wiązań wodorowych w czystej wodzie ma charakter pośredni pomiędzy przebiegiem dla form natywnych polialaniny, a przebiegiem dla form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi. Można to wyjaśnić następująco. Otóż jak widać na Rys. 5.1.4.2. najwyższe maksimum (czyli najwęższy rozkład) można zaobserwować dla natywnej formy  $\alpha$ -helikalnej polialaniny, czyli formy gdzie wnęki tworzone przez grupy boczne peptydu są stosunkowo najmniejsze. Bowiem im mniejsza wnęka tym cząsteczka wody związana wiązaniem wodorowym ze szkieletem peptydu ma gorszą możliwość „wyboru” przyjmowanej orientacji względem innej cząsteczki wody potencjalnie mającej możliwość utworzenia z nią wiązania wodorowego. Natomiast, gdy mamy do czynienia z hydrofobowym odpowiednikiem danej konformacji polialaninowej to wówczas im mniejsza wnęka tym oczywiście mniejsze prawdopodobieństwo, że cząsteczka wody w ogóle się tam pojawi, co razem z powyższym stwierdzeniem implikuje największe różnice w wartościach maksimum pomiędzy formą natywną, a „hydrofobową”. Jeśli zaś chodzi o konformację PII to wartość maksimum przekraczająca nawet tą dla konformacji  $\alpha$ -helikalnej być może wynika z tworzących się mostków wodnych, które z jednej strony są bardzo korzystne pod względem energetycznym; z drugiej strony ograniczają geometrię wiązania wodorowego.

Patrząc na rozkłady wielkości  $\beta_{\text{OOH}}$ ,  $R_{\text{OO}}$ ,  $d_{\text{OH}}$  dla wody solwatacyjnej wokół peptydów opartych na glicynie (Rys. 5.1.4.1) możemy zauważyć, że: 1) długość wiązania wodorowego  $d_{\text{OH}}$  oraz odległość tlen-tlen  $R_{\text{OO}}$  niemal nie zależą od tego jaką konformację łańcucha poliglicynowego bierzemy pod uwagę. Jedynie konformacja PII odbiega w nikłym stopniu od pozostałych struktur; 2) w przypadku kąta  $\beta_{\text{OOH}}$  charakteryzującego wiązanie wodorowe wyraźnie widać dwie przeciwstawne tendencje: pierwszą (poliglicynowe helisy:  $\alpha$  i  $3_{10}$ ) przypominającą tą spotykaną w przypadku „natywnych” konformacji polialaninowych (Rys. 5.1.4.2) i poliserynowych (Rys. 5.1.4.4) i drugą (poliglicynowy łańcuch wyprostowany i helisa PII) preferującą nieco większe wartości kąta  $\beta_{\text{OOH}}$ , podobnie jak w przypadku konformacji polialaniny z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi (Rys. 5.1.4.3; z tym, że w przypadku poliglicyny skłonność ta jest o wiele słabsza). Ponieważ łańcuch poliglicynowy nie tworzy tak znaczących „wnęk” jak polialaninowy czy poliserynowy dlatego też, gdy cząsteczki wody wskutek zwinięcia łańcucha mają utrudniony dostęp do tlenu karbonylowego bądź wodoru amidowego, nadal posiadają dość spore „pole manewru” jeśli o możliwość utworzenia wiązań wodorowych z sąsiednimi cząsteczkami wody. Tłumaczy to niewielki zakres odchylenia wartości kąta  $\beta_{\text{OOH}}$  wokół poliglicynowej  $\alpha$ -helisy i helisy  $3_{10}$  względem czystej wody.

Jeśli spojrzymy na wartości odległości tlen-tlen  $R_{OO}$  to widać wyraźnie, iż w przypadku poliglicyny (Rys. 5.1.4.1) odchylenia od właściwości czystej wody zmierzają w tym samym kierunku jak w przypadku polialanin z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi (Rys. 5.1.4.3) tzn. w stronę preferowania nieco większych odległości tlen-tlen czyli inaczej niż względem polialanin „natywnych” (Rys. 5.1.4.2) i poliseryn (Rys. 5.1.4.4), gdzie pojawia się dążność do skracania tych odległości.

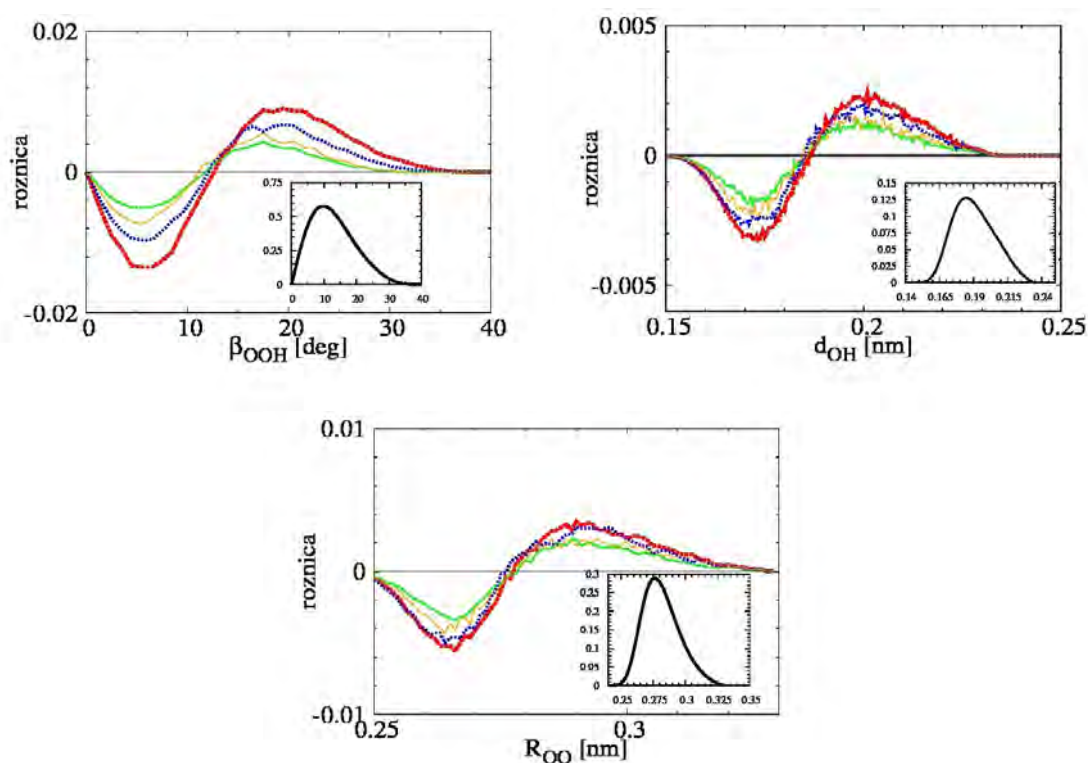
Natomiast jeśli analizujemy różnicowe wykresy dla długości wiązania wodorowego  $d_{OH}$  to z łatwością zauważymy, że tendencja w przypadku wszystkich „natywnych” peptydów (Gly<sub>15</sub>, pAla<sub>15</sub>, Ser<sub>15</sub>) jest podobna, a mianowicie w stronę skrócenia wiązania wodorowego (w porównaniu z czystą wodą); inna niż w przypadku polialaniny „wysoce hydrofobowej” (z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi), gdzie następuje wydłużenie wiązań. Wyraźnie wskazuje to na odpowiedzialność wiązań wodorowych tworzonych ze szkieletem peptydu za nieznaczne, ale zauważalne skrócenie wiązań pomiędzy cząsteczkami wody wskutek elektrostatycznego przyciągania najbliższych cząsteczek rozpuszczalnika przez tlen karbonylowy bądź wodór amidowy umieszczony na szkielecie peptydu i w rezultacie wzrost gęstości wody solwatacyjnej. Podobne zjawisko zostało już zaobserwowane przez A. Kuffel i J. Zielkiewicza [2] wokół konformacji poliglicynowych z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi.



**Rys. 5.1.4.2.** Różnice w rozkładach prawdopodobieństwa ( $P_{\text{sol}}-P_{\text{bulk}}$ ) kąta wiązania wodorowego  $\beta_{\text{OOH}}$ , odległości tlen-tlen  $R_{\text{OO}}$ , odległości tlen akceptorowy-wodór donorowy  $d_{\text{OH}}$ , oraz kąta  $\theta_{\text{HB}}$  pomiędzy pierwszą warstwą solwatacyjną polialanin „natywnych”, a czystą wodą. W okienkach przedstawiono rozkłady prawdopodobieństwa dla czystej wody TIP4P. Kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa, kolor niebieski – helisa  $3_{10}$ , kolor zielony – helisa PII, kolor żółty – forma liniowa.

Podobnie jak zaobserwowano uprzednio dla poliglicyny [2], w przypadku polialaniny można zauważyć wzrost średniej energii wiązania wodorowego (Tab. 5.1.4.1.) w obrębie pierwszej warstwy solwatacyjnej w porównaniu z wartością w czystej wodzie. W przypadku poliseryny także obserwujemy taki wzrost dla wszystkich konformacji z wyjątkiem PII; przy czym w przypadku formy liniowej wzrost ten jest niewielki, w granicach błędu (0,01 kJ/mol). Dla helis  $\alpha$  i  $3_{10}$  wzrost ten wynosi odpowiednio 0,12 i 0,13 kJ/mol. Widać tutaj interesującą korelację z obrazem pochodzącym z diagramu uporządkowania. W przypadku poliseryny (a w mniejszym stopniu także w przypadku polialaniny) względem średniej energii wiązania wodorowego można wyróżnić dwa zespoły: jeden zawierający formę PII i liniową, drugi zaś zawierający helisy tworzące wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Średnia geometria wiązania wodorowego, obserwowana w obrębie pierwszej warstwy solwatacyjnej poliseryny niewiele się zmienia w porównaniu z czystą wodą, co jest prawdą także w przypadku poliglicyny i polialaniny. W przypadku polialaniny największy wzrost średniej energii wiązania wodorowego pomiędzy cząsteczkami wody ma miejsce wokół  $\alpha$ -helisy, mniejszy wokół helisy  $3_{10}$ , zaś najmniejszy wokół helisy PII i łańcucha wyprostowanego. Energia wiązania wodorowego jest generalnie wyższa wokół konformacji polialaninowych niż poliserynowych co wynika z tego, że w przypadku tych drugich cząsteczki wody mają większą swobodę wyboru

partnera, co sugeruje słabsze uporządkowanie orientacyjne. Co ciekawe średnia energia wiązań wodorowych wokół form „hydrofobowych” polialaniny nie przekracza średniej energii wiązań wodorowych wokół form „natywnych”, co po raz kolejny przeczy tezie, że cząsteczki hydrofobowe powodują tworzenie jakichś „lodopodobnych” struktur jak to chcieli Frank i Evans.



**Rys. 5.1.4.3.** Różnice w rozkładach prawdopodobieństwa ( $P_{sol}-P_{bulk}$ ) kąta wiązania wodorowego  $\beta_{OOH}$ , odległości tlen-tlen  $R_{OO}$ , oraz odległości tlen akceptorowy-wodór donorowy  $d_{OH}$  pomiędzy pierwszą warstwą solwatacyjną polialanin z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi, a czystą wodą. W okienkach przedstawiono rozkłady prawdopodobieństwa dla czystej wody. Kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa, kolor niebieski – helisa  $3_{10}$ , kolor zielony – helisa PII, kolor żółty – forma liniowa.

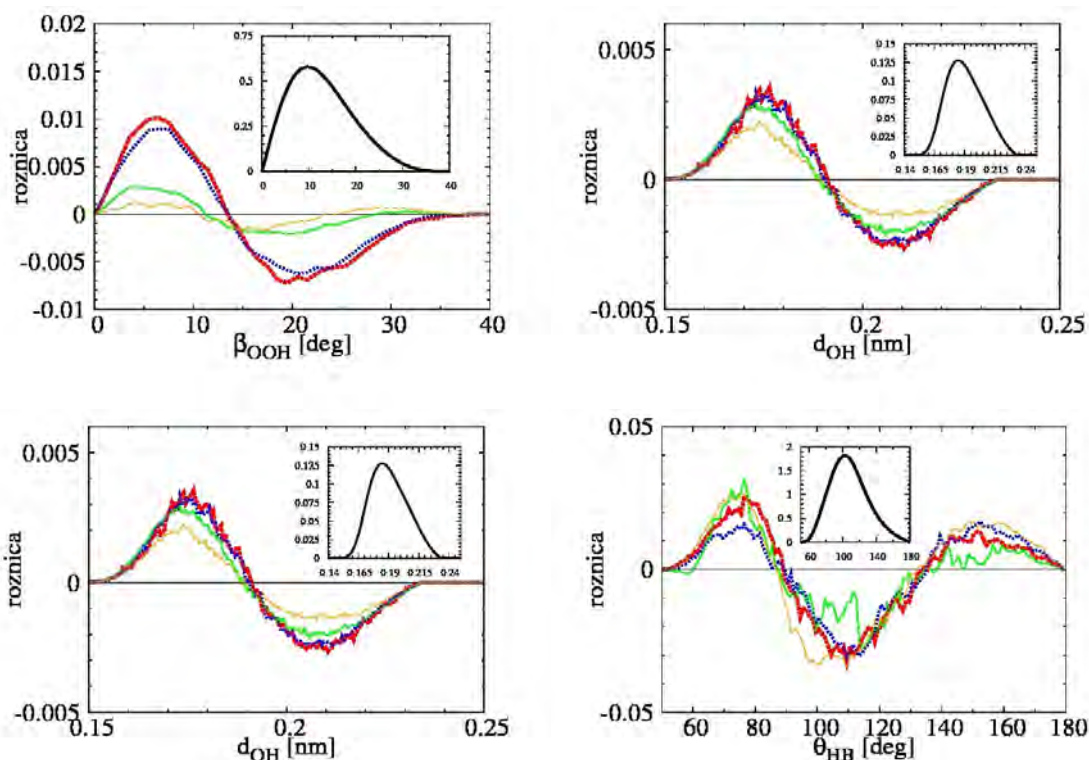
Zmniejszona średnia liczby wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy cząsteczkami wody w I warstwie solwatacyjnej poliseryny w porównaniu zarówno z czystym rozpuszczalnikiem jak i z wodą wokół konformacji polialaninowych [12] jest zrekompensowana zwiększoną liczbą wiązań wodorowych utworzonych z grupami hydroksylowymi łańcuchów bocznych. Pozbawienie atomów polialaniny ładunków cząstkowych prawie nie wpłynęło na ilość wiązań wodorowych w przypadku  $\alpha$ -helisy, za to zwiększyło ją w przypadku pozostałych konformacji, a szczególnie w przypadku helisy PII i formy liniowej. Cząsteczki wody w ten sposób kompensowały niemożność tworzenia wiązań wodorowych z peptydem, których istnienie w przypadku konformacji „natywnej” obniżało średnią ilość wiązań pomiędzy cząsteczkami wody. Takie zjawisko zostało już zaobserwowane przez Pizzituttiego i wsp. [81] badających białko pozbawione ładunku oraz A.



Kuffel i J. Zielkiewicza [2] badających pozbawioną ładunku poliglicynę. Ponieważ w przypadku  $\alpha$ -helisy wiązania peptyd-woda nie tworzą się tak łatwo, zatem wyłączenie oddziaływań kulombowskich przy zachowaniu geometrii nie wpływa w znaczący sposób na liczbę wiązań wodorowych.

Wykresy (Rys. 5.1.4.1, Rys. 5.1.4.2, Rys. 5.1.4.4) przedstawiające rozkłady różnic pomiędzy wartościami kąta  $\theta_{HB}$  (określające geometrię sieci wiązań wodorowych; *vide*: Rozdz. 4.2.6) dla wody solwatacyjnej i dla wody czystej przede wszystkim potwierdzają zasadniczo „tetraedryczną” strukturę nie tylko czystego rozpuszczalnika, ale i sieci wodnej wokół analizowanych przeze mnie peptydów. Różnice pomiędzy wartościami dla wody solwatacyjnej i wody czystej nie przekraczają kilku procent. Po raz kolejny potwierdza to, że struktura wody solwatacyjnej nie odbiega znacząco od struktury czystej wody. Widoczne są zasadnicze różnice pomiędzy peptydami opartymi na glicynie (Rys. 5.1.4.1) i alaninie (Rys. 5.1.4.2). Polialaniny zaburzają sieć wiązań wodorowych w odmienny sposób od poliglicyn. Jak widać dla wody wokół trzech helis polialaninowych histogram wskazuje zwiększające się uporządkowanie – kąt tetraedryczny ( $\sim 109^\circ$ ) jest nieco bardziej prawdopodobny, podczas gdy wokół konformacji poliglicynowych występuje on rzadziej. Co ciekawe, liniowa forma polialaniny zachowuje się podobnie jak poliglicyny.

Jeśli spojrzymy na rozkład prawdopodobieństwa kąta  $\theta_{HB}$  (Rys. 5.1.4.4) dla poliseryny mogą zaobserwować podobieństwo do rozkładu tego kąta dla konformacji poliglicynowych (Rys. 5.1.4.1), a także w mniejszym stopniu do konformacji liniowej polialaniny (Rys. 5.1.4.2). Taką zbieżność możemy powiązać z tym, że w przypadku tych wszystkich konformacji mogą tworzyć się mostki wodne podobnie wpływając na strukturę sieci wiązań wodorowych.



**Rys. 5.1.4.4.** Różnice ( $P_{\text{solv}} - P_{\text{bulk}}$ ) w rozkładach prawdopodobieństwa kąta wiązania wodorowego,  $\beta_{\text{OOH}}$ , odległości tlen-tlen,  $R_{\text{OO}}$ , długości wiązania wodorowego,  $d_{\text{OH}}$ , oraz kąta  $\theta_{\text{HB}}$  pomiędzy I warstwą solwatacyjną poliseryny a czystą wodą. W okienkach na wykresach załączyłem (dla celów porównawczych) histogramy dla czystej wody. Od najcieńszej do najgrubszej linii – wyniki kolejno dla konformacji liniowej, helisy PII, helisy  $3_{10}$  oraz  $\alpha$ -helisy.

### 5.1.5. Uporządkowanie cząsteczek wody względem peptydu

W celu opisu efektów orientacyjnych cząsteczek wody względem peptydu wykorzystałem człon określony przez równanie (4.2.3.43). W Tab. 5.1.5.1 przedstawiłem wartości parametru uporządkowania wody  $s_{PW}^{(2)}(r)$  względem peptydu (czterech konformacji poliglicyny, polialaniny i poliseryny) w zakresie I warstwy ( $r=R_1$ ) i całej otoczki solwatacyjnej ( $r=R_2$ ). Można powiedzieć, że wartości tego parametru są w ogólności podobne dla polialaniny, poliglicyny i poliseryny, zaś różnice odzwierciedlają obecność hydrofobowej grupy  $\text{CH}_3$  (w reszcie alaninowej) i amfifilowej grupy  $\text{CH}_2\text{OH}$  (w reszcie serynowej).

Pod względem uporządkowania cząsteczek wody względem peptydu badane przeze mnie konformacje o określonym składzie aminokwasowym można uszeregować następująco (im bardziej ujemna wartość  $s_{PW}^{(2)}(r)$  tym oczywiście silniejsze uporządkowanie):

pGly lin > pGly  $\alpha$  > pGly PII > pGly  $3_{10}$

pAla PII > pAla  $\alpha$  > pAla lin > pAla $3_{10}$

pSer PII > pSer lin > pSer 3<sub>10</sub> > pSer α

Jednak ponieważ parametr  $s_{PW}^{(2)}(r)$  jest sumą dwóch wkładów:  $s_{PW,trans}^{(2)}(r)$  i  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  opisujących odpowiednio uporządkowanie translacyjne i orientacyjne, dlatego też bardziej właściwe będzie oddzielne omówienie wartości tych składników.

Szereg opisujący uporządkowanie translacyjne  $s_{PW,trans}^{(2)}(r)$  układa się następująco:

pGly lin > pGly α > pGly PII > pGly 3<sub>10</sub>

pAla lin > pAla α > pAla 3<sub>10</sub> > pAla PII

pSer α > pSer lin > pSer 3<sub>10</sub> > pSer PII

Najwyższą wartość tego parametru w przypadku form liniowych poliglicyny i polialaniny wiąże z obecnością mostków wodnych (vide: Rozdz. 3.2.1.) zaobserwowanych przez Mezei'a i wsp. [164] w β-niciach, które to choć są entropowo niekorzystne stabilizują te konformacje pod względem energetycznym. W przypadku poliseryny widać wyraźnie, że woda względem α-helisy wykazuje większe uporządkowanie translacyjne aniżeli względem wyprostowanego łańcucha co można wytłumaczyć tym, że w przypadku α-helisy poliserynowej tworzą się mostki składające się z dwóch cząsteczek wody „spinające” ze sobą grupy hydroksylowe reszt serynowych, stabilizując pod względem energetycznym tą konformację [11][6]. Niskie wartości dla konformacji PII wszystkich trzech badanych peptydów mogą wynikać z faktu, że w tym przypadku z przyczyn geometrycznych mostki wodne się nie tworzą [164], za wyjątkiem helisy PII w przypadku poliglicyny [224] (stąd zapewne większa wartość uporządkowania względem helisy 3<sub>10</sub> w jej przypadku).

Natomiast jeśli wezmę pod uwagę parametr uporządkowania orientacyjnego  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  peptydy można uszeregować w następujący sposób:

pGly lin > pGly PII > Gly α > Gly 3<sub>10</sub>

pAla PII > pAla α > pAla lin > pAla 3<sub>10</sub>

pSer PII > pSer lin > pSer 3<sub>10</sub> > pSer α

Ponieważ miara uporządkowania orientacyjnego zależy od wartości kątów Eulera (α,β,γ) opisujących ułożenie cząsteczki wody względem „walca” tworzonego przez peptyd, stąd też określoną wartość miary  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  można powiązać z preferencjami do przyjmowania przez te kąty określonych wartości. Znaczące uporządkowanie orientacyjne cząsteczek wody wokół polialaninowej i poliserynowej helisy PII jest skutkiem opisywanych przeze mnie w Rozdz. 5.1.2.

wyraźnych preferencji dla wszystkich kątów Eulera w przypadku tej konformacji (Rys. 5.1.2.S3, Rys. 5.1.2.S9, Rys. 5.1.2.S10, Rys. 5.1.2.S11). Parametr  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  potwierdza więc, że cząsteczki wody wokół PII mają bardzo ograniczone „pole manewru” jeśli chodzi o ich orientację względem atomów peptydu, co w dużej mierze wynika z bardzo „kierunkowych” wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy wodą, a szkieletem tej konformacji. Ponieważ reszty glicynowe nie posiadają łańcucha bocznego, stąd też cząsteczki rozpuszczalnika wokół PII mają większą możliwość zmiany orientacji. Powoduje to, że w przypadku poliglicyny jeszcze większe uporządkowanie orientacyjne wody niż względem PII ma miejsce względem łańcucha wyprostowanego, gdzie też widać najsilniejsze preferencje do przyjmowania określonego kąta  $\gamma$  [2]. Ponieważ w przypadku łańcucha wyprostowanego poliglicyny „miejsca na peptydzie mogące służyć za akceptory lub donory dla wiązań wodorowych z cząsteczką wody znajdują się na przeciwległych krawędziach bocznych płaskiego w przybliżeniu łańcucha poliglicynowego”, w związku z czym „cząsteczki wody ustawiają się w nieco inny sposób” niż w przypadku innych konformacji poliglicynowych [224]. Z jednej strony mają wygodny dostęp do grup polarnych peptydu (wśród których są zarówno potencjalne akceptory (tleny karbonylowe), jak i donory (wodory amidowe) wiązań wodorowych; z drugiej jednak strony muszą „obchodzić” górną i dolną hydrofobową powierzchnię cząsteczki i nie tracić niepotrzebnie możliwości utworzenia wiązań z innymi cząsteczkami wody poprzez kierowanie na owe powierzchnie wiązań O-H [224].

Także wysoką wartość parametru uporządkowania orientacyjnego wody solwatacyjnej względem polialaninowej  $\alpha$ -helisy można powiązać z wyraźnymi preferencjami dla kątów  $\alpha, \beta, \gamma$  (Rys. 5.1.2.S7). I przeciwnie – niską wartość tego parametru w przypadku  $\alpha$ -helisy poliserynowej należy wiązać ze słabymi preferencjami dla wspomnianych kątów (Rys. 5.1.2.S9, Rys.5.1.2.S10, Rys. 5.1.2.S11), co jak już opisałem w Rozdz. 5.1.2. można łączyć ze sporym wyborem potencjalnych donorów i akceptorów dla cząsteczek wody w I warstwie solwatacyjnej, a więc z możliwością przyjmowania przez cząsteczki wody rozmaitych orientacji względem tego peptydu.

Warto zauważyć, że: 1) wartości parametru uporządkowania translacyjnego  $s_{PW,trans}^{(2)}(r)$  wody względem peptydów poliserynowych są z grubsza podobne jak względem konformacji polialaninowych i poliglicynowych, natomiast wartości parametru uporządkowania orientacyjnego wody względem peptydu  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  są znacząco mniejsze w przypadku wszystkich konformacji Ser<sub>15</sub> (w porównaniu do Ala<sub>15</sub> i Gly<sub>15</sub>) za wyjątkiem konformacji PII; 2) w przypadku konformacji PII wartości zarówno  $s_{PW,trans}^{(2)}(r)$  jak i  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  w przypadku poliseryny są niemal

identyczne jak wartości dla polialaniny. Można z tego wyciągnąć wniosek, że woda wokół poliseryny (za wyjątkiem konformacji PII) względem peptydu jest mniej uporządkowana aniżeli woda wokół łańcuchów polialaninowych. Musi to być oczywiście spowodowane obecnością grup hydroksylowych w przypadku poliseryny. Grupy OH w przypadku Ser<sub>15</sub> stwarzają cząsteczkom wody solwatacyjnej dodatkową możliwość tworzenia wiązań wodorowych. Takiej możliwości nie ma w przypadku polialaniny, co w jej przypadku ogranicza ilość orientacji jakie może przyjmować cząsteczka wody znajdująca się w pobliżu peptydu. Podobne wartości parametru uporządkowania w przypadku konformacji PII pomimo różnego składu aminokwasowego wspierają tezę o bardzo dobrym dopasowaniu się tej konformacji do struktury wody.

**Tabela 5.1.5.1.** Wartości parametrów  $s_{PW}^{(2)}(r)$ ,  $s_{PW,trans}^{(2)}(r)$ ,  $s_{PW,orient}^{(2)}(r)$  obliczone w granicach pierwszej ( $r=R_1$ ) i drugiej ( $r=R_2$ ) warstwy solwatacyjnej dookoła rdzenia peptydu. Wszystkie wartości są podane w  $\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ .

Konformacja	$R_1[\text{nm}]$	$s_{PW,trans}^{(2)}(R_1)$	$s_{PW,orient}^{(2)}(R_1)$	$s_{PW}^{(2)}(R_1)$	$R_2[\text{nm}]$	$s_{PW,trans}^{(2)}(R_2)$	$s_{PW,orient}^{(2)}(R_2)$	$s_{PW}^{(2)}(R_2)$
Ser <sub>15</sub> lin	0,68	-258,2	-97,1	-355,3	0,9	-258,3	-99,7	-358,0
Ser <sub>15</sub> PII	0,68	-218,3	-215,9	-434,2	1,12	-218,5	-222,1	-440,6
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,74	-240,4	-75,8	-316,2	1,06	-240,4	-79,8	-320,3
Ser <sub>15</sub> α	0,78	-264,2	-42,4	-306,6	1,16	-264,3	-47,6	-311,9
Ala <sub>15</sub> lin	0,64	-273,7	-131,6	-402,2	0,95	-274,9	-132,9	-403,7
Ala <sub>15</sub> PII	0,68	-241,6	-191,9	-433,5	0,90	-241,8	-193,7	-436,0
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,74	-255,6	-111,4	-368,2	1,05	-256,2	-112,2	-368,4
Ala <sub>15</sub> α	0,76	-265,4	-148,9	-416,5	1,10	-266,4	-151,9	-419,8
Gly <sub>15</sub> lin	0,54	-321,3	-122,6	-439,7	0,90	-325,2	-135,2	-455,4
Gly <sub>15</sub> PII	0,58	-230,2	-122,4	-352,6	0,86	-233,1	-127,0	-361,1
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,64	-206,8	-110,8	-317,6	0,97	-210,1	-115,0	-325,1
Gly <sub>15</sub> α	0,69	-254,5	-115,0	-369,5	1,00	-259,0	-120,2	-379,2

### 5.1.6. Lokalne uporządkowanie wody w otoczce solwatacyjnej

W Tabeli 5.1.6.1. znajdują się obliczone przeze mnie wartości parametru uporządkowania  $S(r)$  (zob. Równ. 4.2.3.60) dla  $r=0,36$  nm oraz  $r=0,58$  nm, które również w przypadku poliseryny (tak jak dla poliglicyny i polialaniny) zwiększają się (niewiele) w porównaniu z wartością dla czystej wody. To by oznaczało, że woda dookoła peptydu jest (lokalnie) nieco mniej uporządkowana w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem. Ponadto w Tabeli 5.1.6.2. zaprezentowałem dla dwóch powyższych odległości, wartości **miary uporządkowania translacyjnego**  $s_{tra}(r)$ , **miary uporządkowania konfiguracyjnego**  $s_{con}(r)$  i **miary całkowitego uporządkowania orientacyjnego**  $s_{ort}(r)$  (Równ. 4.2.3.61). Na tej podstawie wykreśliłem po dwa **diagramy uporządkowania** dla  $r=0,36$  nm oraz dla  $r=0,58$  nm: diagramy uporządkowania  $s_{ort}(r)$ - $s_{tra}(r)$  (Rys. 5.1.6.1) oraz diagram uporządkowania  $s_{con}(r)$ - $s_{tra}(r)$  (*vide*: Suplement, Rys. 5.1.6.S1).

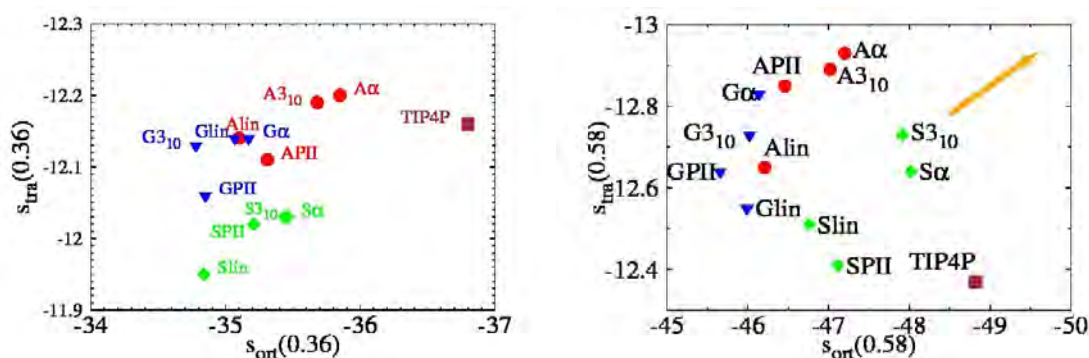
**Tabela 5.1.6.1.** Wartości  $S(r)$  (Równ. 4.2.3.60.) obliczone dla badanych układów.  $R_{sol}$  symbolizuje promień zewnętrzny obszaru dookoła rdzenia peptydu,  $N_w$  oznacza średnią liczbę cząsteczek wody w tym regionie.  $\Delta S$  opisuje odchylenie odpowiedniej wartości od wartości dla czystej wody (właściwości czystej wody są podane w ostatniej linii tabeli). Wszystkie wartości są podane w  $Jmol^{-1}K^{-1}$ .

Konformacja	$R_{sol}$ [nm]	$N_w$	$S(0,36)$	$S(0,58)$	$\Delta S(0,36)$	$\Delta S(0,58)$
Ser <sub>15</sub> lin	0,89	291,61	90,27	77,79	2,17	1,92
Ser <sub>15</sub> PII	1,14	420,71	89,83	77,53	1,73	1,66
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	1,05	220,88	89,59	76,41	1,49	0,54
Ser <sub>15</sub> $\alpha$	1,16	204,21	89,57	76,40	1,47	0,53
Ala <sub>15</sub> lin	0,95	334	89,91	78,20	1,72	1,84
Ala <sub>15</sub> PII	0,90	253	89,60	77,76	1,50	1,89
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	1,05	227	89,19	77,15	1,09	1,28
Ala <sub>15</sub> $\alpha$	1,10	193	89,01	76,91	0,91	1,06
Gly <sub>15</sub> lin	0,90	309	89,84	78,52	1,74	2,65
Gly <sub>15</sub> PII	0,86	232	90,17	78,75	2,07	2,88
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,97	196	89,92	78,32	1,82	2,45
Gly <sub>15</sub> $\alpha$	1,00	159	89,71	78,12	1,61	2,25
woda TIP4P	-	-	88,10	75,87	0,00	0

Diagramy te pokazują w przejrzysty sposób, strukturalne zmiany w wodzie hydratacyjnej; punkt reprezentujący właściwości czystej wody jest także umieszczony na tym wykresie. Warto zauważyć w przypadku tych diagramów następującą korelację - wszystkie punkty reprezentujące właściwości wody “solwatacyjnej” peptydów o danym składzie aminokwasowym leżą w określonym regionie diagramu nienakładającym się na region dla polipeptydu o innym składzie aminokwasowym.

**Tabela 5.1.6.2.** Wartości parametrów z równania (4.2.3.61) określone dla dwóch wartości  $r$ : 0,36 nm i 0,58 nm. Ostatnia linia tabeli zawiera wyniki dla czystej wody. Wszystkie wartości podane w  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

Konformacja	$r=0,36 \text{ nm}$			$r=0,58 \text{ nm}$		
	$s_{tra}(r)$ $= \frac{s_{WW,trans}^{(2)}(r)}{N_w}$	$s_{ort}(r)$ $= \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r) + s_{WW,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$		$s_{tra}(r)$ $= \frac{s_{WW,trans}^{(2)}(r)}{N_w}$	$s_{ort}(r)$ $= \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r) + s_{WW,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$	
		$s_{con}(r)$ $= \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r)}{N_w}$	$\frac{s_{WW,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$		$s_{con}(r)$ $= \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r)}{N_w}$	$\frac{s_{WW,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$
Ser <sub>15</sub> lin	-11,95	-10,81	-24,03	-12,51	-12,97	-33,79
Ser <sub>15</sub> P <sub>II</sub>	-12,02	-11,01	-24,20	-12,41	-13,21	-33,91
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	-12,03	-11,03	-24,41	-12,73	-13,18	-34,74
Ser <sub>15</sub> $\alpha$	-12,03	-10,98	-24,48	-12,64	-13,15	-34,87
Ala <sub>15</sub> lin	-12,14	-11,22	-23,88	-12,65	-13,41	-32,80
Ala <sub>15</sub> P <sub>II</sub>	-12,11	-11,24	-24,07	-12,85	-13,36	-33,10
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	-12,19	-11,33	-24,35	-12,89	-13,46	-33,56
Ala <sub>15</sub> $\alpha$	-12,20	-11,38	-24,47	-12,93	-13,51	-33,69
Gly <sub>15</sub> lin	-12,14	-11,14	-23,93	-12,55	-13,36	-32,63
Gly <sub>15</sub> P <sub>II</sub>	-12,06	-11,06	-23,79	-12,64	-13,23	-32,43
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	-12,13	-11,14	-23,64	-12,73	-13,31	-32,71
Gly <sub>15</sub> $\alpha$	-12,14	-11,16	-24,01	-12,83	-13,32	-32,82
woda TIP4P	-12,16	-11,31	-25,49	-12,37	-13,61	-35,21



**Rys. 5.1.6.1.** Diagramy uporządkowania wody w otocze solwatacyjnej analizowanych peptydów. Wykresy relacji:  $s_{tra}(0,36 \text{ nm})=f(s_{ort}(0,36 \text{ nm}))$  i  $s_{tra}(0,58 \text{ nm})=f(s_{con}(0,58 \text{ nm}))$ . Romby reprezentują poliserynę, koła polialaninę, trójkąty poliglicynę, zaś kwadrat symbolizuje uporządkowanie czystej wody TIP4P. Strzałka wskazuje kierunek wzrastającego uporządkowania. **UWAGA!!! Oś odciętych i rzędnych są w innej skali.**

J. Zielkiewicz [222] badając właściwości czystej wody, uzyskał niemal ściśle liniową korelację pomiędzy  $s_{con}$  i  $s_{ort}$ . Zależność pomiędzy dwoma wspomnianymi wielkościami nie jest jednak liniowa dla wody solwatacyjnej wokół badanych przez mnie polipeptydów, chociaż w przypadku poliglicyny i polialaniny można zaobserwować podobną tendencję, co mogłoby

sugerować użycie wartości  $s_{con}(r) = \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r)}{N_w}$  jako przybliżonej, jakościowej miary

orientacyjnego uporządkowania zamiast wielkości  $s_{ort}(r) = \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r) + s_{WW,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$  czyli

sumarycznego wkładu orientacyjnego. Jest to o tyle istotne, że wielkość  $s_{WW, conf}^{(2)}$  jest znacznie łatwiejsza (szybsza) do oszacowania aniżeli  $s_{WW, orient}^{(2)}$ . Jednakże w przypadku poliseryny nie obserwuję takiej korelacji pomiędzy całkowitym wkładem orientacyjnym  $s_{ort}(r)$  a wkładem konfiguracyjnym  $s_{con}(r)$  jak w przypadku polialaniny i poliglicyny [12]. Stąd też generalnie nie będę brał tego parametru pod uwagę w rozważaniach orientacyjnego uporządkowania wody w otoczce solwatacyjnej.

W celu lepszego zrozumienia struktury wody w otoczce solwatacyjnej dokonano modyfikacji parametrów opisujących stopień uporządkowania struktury wody w celu **eliminacji efektu „wylączonej objętości” spowodowanej obecnością peptydu**, co szczegółowo opisałem w Rozdz. 4.2.3h. Uzyskane w ten sposób różnice ( $\Delta s(r)$ ,  $\Delta s_{tra}(r)$ ,  $\Delta s_{con}(r)$  oraz  $\Delta s_{ort}(r)$ ; Tab.5.1.6.3 oraz Tab. 5.1.6.4) posłużyły mi jako wskaźniki zmian struktury wody solwatacyjnej względem czystej wody; parametry  $\Delta s_{tra}$ ,  $\Delta s_{con}$  oraz  $\Delta s_{ort}$  również wykorzystałem do wykreślenia **diagramów uporządkowania** (Rys. 5.1.6.2 oraz w Suplemencie Rys. 5.1.6.S2) cząsteczek wody względem wybranej (tzw. centralnej) cząsteczki wody w odległości 0,36 nm i 0,58 nm od jej środka masy. Jak już wspominałem w Rozdz. 4.2.3g. wartość 0,36 nm odpowiada w przybliżeniu warstwie cząsteczek wody bezpośrednio otaczającej centralną (tzn. wybraną) cząsteczkę wody, zaś odległość 0,58 nm odpowiada szacowanemu zakresowi lokalnego uporządkowania cząsteczek wody względem cząsteczki centralnej w czystym rozpuszczalniku.

Z Tabeli 5.1.6.3 i Rys. 5.1.6.2 widać wyraźnie, że uporządkowanie wody w pierwszej warstwie sąsiadów ( $r=0,36$  nm) dookoła wybranej cząsteczki wody z otoczki solwatacyjnej generalnie maleje wraz ze wzrostem średnicy peptydu:  $\alpha < 3_{10} < \text{PII} < \text{forma liniowa}$  (jedynie w przypadku poliseryny mamy załamanie tej tendencji i uporządkowanie wody wokół poliserynowej helisy  $3_{10}$  jest nieco większe niż wokół  $\alpha$ -helisy, zaś wokół helisy PII przekracza wartość względem wody wokół łańcucha wyprostowanego; być może można to wiązać z tym, że w przypadku poliseryny skutek obecności grup hydroksylowych mniejszą rolę odgrywa średnica peptydu).

W zakresie dwóch najbliższych warstw sąsiadów ( $r=0,58$  nm) wybranej cząsteczki wody z otoczki solwatacyjnej badanych peptydów najsilniejsze uporządkowanie orientacyjne wody obserwuję wokół konformacji poliglicynowych, słabsze dla polialaninowych i poliserynowych. Porównując ze sobą konformacje polialaninowe i poliserynowe nie widać w tym względzie tak znaczących różnic jak pomiędzy nimi, a konformacjami poliglicynowymi. Dla danej konformacji



nieco bardziej pod względem orientacyjnym uporządkowana jest zawsze woda wokół polialanin, aniżeli wokół poliseryn, co można wiązać z tym, że w przypadku poliseryn cząsteczki wody w warstwie solwatacyjnej wskutek możliwości tworzenia wiązań wodorowych z łańcuchami bocznymi reszt serynowych mogą przyjmować szerszy wachlarz korzystnych pod względem energetycznym orientacji zarówno względem peptydu jak i między sobą.

Z diagramów uporządkowania wody na Rys. 5.1.6.2. wynika, że wodą solwatacyjną najbardziej przypominającą pod względem uporządkowania wodę czystą (dla której z definicji  $\Delta_s=0$ ;  $\Delta_{s_{tra}}=0$ ;  $\Delta_{s_{ort}}=0$  – vide: Równ. 4.2.3.63) znajduje się wokół konformacji poliglicynowych; przede wszystkim wokół formy liniowej, a także helisy PII. Jest to skutkiem przede wszystkim mniejszej średnicy konformacji poliglicynowych względem polialaninowych i poliserynowych wskutek nieobecności grupy bocznej w reszcie glicynowej, co powoduje dyskutowane w rozdz. 5.1.4. względnie słabe naruszenie geometrii wiązania wodorowego pomiędzy cząsteczkami wody przez poliglicynowy łańcuch wyprostowany i poliglicynową helisę PII. Generalnie woda wokół helisy PII zwłaszcza dla wartości  $r=0,36$  nm charakteryzuje się wysokim uporządkowaniem w porównaniu z innymi konformacjami co jest skutkiem wspomnianego przeze mnie w Rozdz. 3.2.1., 4.1.2 oraz 4.1.4. dobrego dopasowania się tej helisy do struktury rozpuszczalnika jakim jest woda. W zakresie  $r=0,58$  nie widać większych różnic w uporządkowaniu orientacyjnym pomiędzy wodą wokół różnych struktur drugorzędowych poliglicyny.

Patrząc na skale diagramów uporządkowania jak też i dane w Tabeli 5.1.6.4 widać wyraźnie, że główną odpowiedzialność za różnice w uporządkowaniu wokół różnych konformacji ponoszą wkład orientacyjny i konfiguracyjny (dające razem sumaryczny wkład orientacyjny), a nie wkład translacyjny. Dane te potwierdzają także teorię o generalnie niewielkich zmianach wody w warstwie solwatacyjnej peptydów.

Spoglądając na diagram uporządkowania dla  $r=0,58$  nm na Rys. 5.6.2 można wyróżnić trzy zespoły:

- 1) na który składa się woda wokół wszystkich konformacji poliglicynowych; zespół ten jest w znaczącym oddaleniu od pozostałych; charakteryzuje się on największym uporządkowaniem wody wynikającym przede wszystkim z efektów orientacyjnych
- 2) składający się z wody wokół poliglicynowych i polialaninowych helisy PII i łańcuchów wyprostowanych; uporządkowanie wody wyraźnie mniejsze jak w zespole 1), ale większe niż w 3)

3) grupujący wodę wokół helis:  $\alpha$  i  $3_{10}$  poliseryny i polialaniny

Zespół 1) jest rezultatem względnie wysokiej dostępności szkieletu peptydowego w przypadku wszystkich konformacji poliglicyny z racji nieposiadania przez resztę Gly łańcucha bocznego

Zespół 2) wynika z tworzenia się licznych wiązań wodorowych ze szkieletem peptydu w przypadku konformacji liniowej i helisy PII, co indukuje podobne zmiany w wodzie solwatacyjnej (vide: Rozdz. 5.1.2., Rozdz. 5.1.3, Rozdz. 5.1.4.)

Zespół 3) jest wynikiem względnie niewielkich oddziaływań wody solwatacyjnej ze szkieletem helis nie tworzących wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych jak to pokazałem w Rozdz. 5.1.3.

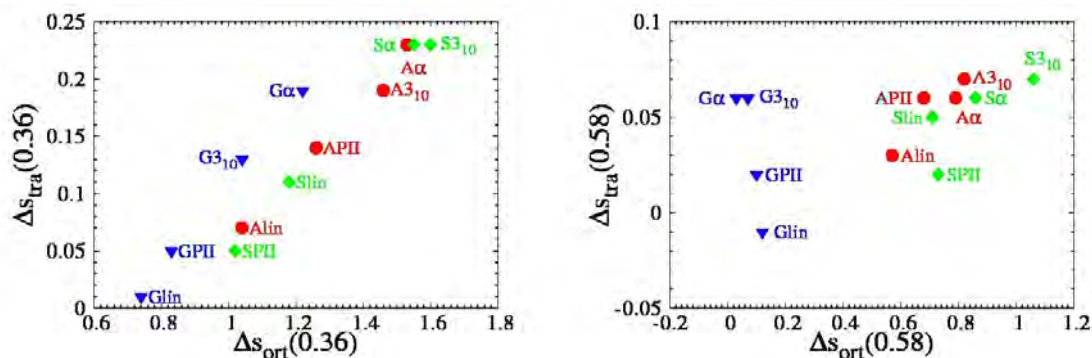
Jak widać wykreślony na Rys. 5.1.6.2 diagram uporządkowania bardzo dokładnie odzwierciedla zmiany struktury wody, a punkty na wykresie układają się w logiczny sposób.

**Tabela 5.1.6.3.** Wartości parametrów z równania (4.2.3.63) opisujących ogólne zmiany uporządkowania względem czystego rozpuszczalnika (uwzględniające efekt „wyłączonej objętości” spowodowany obecnością peptydu) określone dla dwóch wartości  $r$ : 0,36 nm i 0,58 nm. Ostatnia linia tabeli zawiera wyniki dla czystej wody. Wszystkie wartości podane w  $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

Peptyd	$\frac{\Delta s(0,36 \text{ nm})}{= \frac{\Delta s_{ww}^{(2)}(0,36 \text{ nm})}{N_w}}$	$\frac{\Delta s(0,58 \text{ nm})}{= \frac{\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58 \text{ nm})}{N_w}}$
Ser <sub>15</sub> lin	1,28	0,77
Ser <sub>15</sub> PII	1,08	0,75
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	1,83	1,12
Ser <sub>15</sub> $\alpha$	1,77	0,91
Ala <sub>15</sub> lin	1,12	0,61
Ala <sub>15</sub> PII	1,39	0,74
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	1,64	0,89
Ala <sub>15</sub> $\alpha$	1,75	0,84
Gly <sub>15</sub> lin	0,74	0,11
Gly <sub>15</sub> PII	0,88	0,13
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	1,17	0,13
Gly <sub>15</sub> $\alpha$	1,40	0,10
woda TIP4P	0,00	0,00

**Tabela 5.1.6.4.** Wartości parametrów z równania (4.2.3.63) określone dla dwóch wartości r: 0,36 nm i 0,58 nm. Ostatnia linia tabeli zawiera wyniki dla czystej wody. Wszystkie wartości podane w J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

Peptyd	r=0,36 nm			r=0,58 nm		
	$\frac{\Delta s(r)}{\Delta s_{ww}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{ww}^{(2)}(r)}{N_w}$			$\frac{\Delta s(r)}{\Delta s_{ww}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{ww}^{(2)}(r)}{N_w}$		
	$\frac{\Delta s_{tra}(r)}{\Delta s_{ww,trans}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{tra}(r)}{N_w}$	$\frac{\Delta s_{ort}(r)}{\Delta s_{ww,conf}^{(2)}(r) + \Delta s_{ww,orient}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{ort}(r)}{N_w}$		$\frac{\Delta s_{tra}(r)}{\Delta s_{ww,trans}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{tra}(r)}{N_w}$	$\frac{\Delta s_{ort}(r)}{\Delta s_{ww,conf}^{(2)}(r) + \Delta s_{ww,orient}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{ort}(r)}{N_w}$	
		$\frac{\Delta s_{con}(r)}{\Delta s_{ww,conf}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{con}(r)}{N_w}$	$\frac{\Delta s_{ww,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$		$\frac{\Delta s_{con}(r)}{\Delta s_{ww,conf}^{(2)}(r)} = \frac{\Delta s_{con}(r)}{N_w}$	$\frac{\Delta s_{ww,orient}^{(2)}(r)}{N_w}$
Ser <sub>15</sub> lin	0,11	0,22	0,96	0,05	0,28	0,43
Ser <sub>15</sub> P11	0,05	0,13	0,89	0,02	0,18	0,55
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,23	0,39	1,21	0,07	0,51	0,55
Ser <sub>15</sub> α	0,23	0,39	1,16	0,06	0,51	0,35
Ala <sub>15</sub> lin	0,07	0,17	0,87	0,03	0,22	0,35
Ala <sub>15</sub> P11	0,14	0,27	0,99	0,06	0,34	0,34
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,19	0,35	1,11	0,07	0,44	0,38
Ala <sub>15</sub> α	0,23	0,39	1,14	0,06	0,51	0,28
Gly <sub>15</sub> lin	0,01	0,08	0,66	-0,01	0,11	0,01
Gly <sub>15</sub> P11	0,05	0,13	0,70	0,02	0,17	-0,07
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	0,13	0,24	0,80	0,06	0,31	-0,24
Gly <sub>15</sub> α	0,19	0,34	0,88	0,06	0,43	-0,40
woda TIP4P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



**Rys. 5.1.6.2.** Diagramy uporządkowania wody w otocze solwatacyjnej analizowanych peptydów, uwzględniające efekt "wyłączonej objętości" spowodowanej obecnością peptydu. Wykresy relacji:  $\Delta s_{tra}(0,36 \text{ nm}) = f(\Delta s_{ort}(0,36 \text{ nm}))$  i  $\Delta s_{tra}(0,58 \text{ nm}) = f(\Delta s_{con}(0,58 \text{ nm}))$ . Romby reprezentują poliserynę, koła polialaninę, trójkąty poliglicynę. **Wartości parametrów** wzrastają wraz ze spadkiem uporządkowania wody. **UWAGA!!!** Ośie odciętych i rzędnych są w innej skali.

## 5.2. Dynamika cząsteczek wody w otoczce solwatacyjnej

Właściwości strukturalne wody siłą rzeczy wpływają na jej właściwości dynamiczne. Badałem więc takie własności jak współczynniki autodyfuzji (zarówno translacyjnej i rotacyjnej), stałe czasowe opisujące czas życia pojedynczego wiązania wodorowego, jak również czasy „rezydencji” atomów wodoru cząsteczek wody wokół atomów tlenu karbonylowego peptydu.

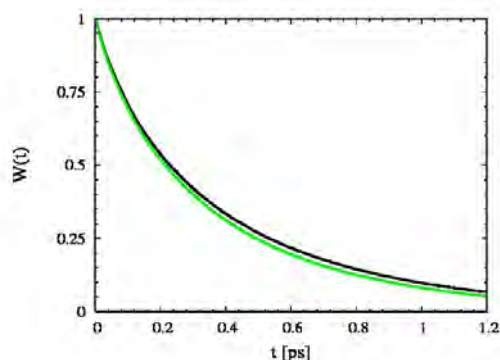
Wyniki zawarte w Tabeli 5.2.1. pokazują, że cząsteczki wody w warstwie solwatacyjnej poruszają się wolno; wartość współczynnika dyfuzji translacyjnej  $D_T$ , w obrębie pierwszej otoczki solwatacyjnej polialaniny jest znacząco mniejsza (aż do około 50%) od wartości dla czystej wody; w obrębie pierwszej otoczki solwatacyjnej poliseryny (do około 44%) w porównaniu z czystą wodą. Trzeba jednak pamiętać, że zaburzony ruch postępowy jest także wynikiem obecności cząsteczki peptydu, poprzez efekt „ściany”, natomiast zakłócony ruch obrotowy może być wynikiem wyłącznie opisanej w podrozdziale 5.1.4. wyższej energii wiązania wodorowego. Ponieważ ta energia ulega zwiększeniu w niewielkim stopniu, dlatego też dyfuzja rotacyjna ulega niewielkiemu spowolnieniu. Innymi słowy, z powyższej argumentacji wynika (zgodnie z sugestią Halle'go [97]), że współczynnik dyfuzji rotacyjnej  $D_R$ , może służyć jako bardziej odpowiednia miara lokalnych zmian dynamiki wody aniżeli  $D_T$ . Stąd, zaprezentowana stosunkowo niewielka różnica w wartościach rotacyjnego współczynnika dyfuzji  $D_R$  także wspiera twierdzenie, że struktura wody „solwatacyjnej” zmienia się w niewielkim stopniu w porównaniu z właściwościami czystej wody. Z tego też powodu ruch obrotowy (opisywany przez współczynnik  $D_R$ ) podobnie jak ruch postępowy (opisywany przez  $D_T$ ) w pierwszej warstwie solwatacyjnej polialaniny także jest wolniejsza, ale w znacząco mniejszym stopniu (o ~15-20%). W drugiej warstwie solwatacyjnej oba współczynniki dyfuzji  $D_T$  i  $D_R$  różnią się od wartości dla czystej wody jedynie o około kilka procent. Zauważmy, że spowolnienie zarówno ruchów postępowych jak i obrotowych jest bardziej widoczne dla polialaniny, aniżeli dla poliglicyny (*vide*: [2] dla porównania). Może to być spowodowane obecnością grup bocznych ( $\text{CH}_3$ ) [226].

W obrębie I warstwy solwatacyjnej poliseryny obserwuję spowolnienie ruchów obrotowych, dochodzące nawet do około 25% w przypadku konformacji  $\alpha$ -helikalnej i PII. Bardziej ruchliwa jest woda wokół poliserynowej helisy  $3_{10}$  (spowolnienie ruchów obrotowych o około 19%); zaś najbardziej wokół łańcucha wyprostowanego (spowolnienie tylko o około 14%). Porównując te

wartości z wartościami dla analogicznych konformacji polialaniny widać, że w przypadku poliserynowych  $\alpha$ -helisy i helisy PII, woda jest bardziej spowolniona niż w przypadku polialaniny, zaś w przypadku helisy  $3_{10}$  i konformacji liniowej bardziej ruchliwa. Generalnie większą ruchliwość rozpuszczalnika wokół poliseryn można tłumaczyć tym, że w ich przypadku w mniejszym zakresie zachodzi **efekt wyłączonej objętości stanu przejściowego** (ang. *transition state excluded volume*) [116] ograniczający cząsteczce wody wybór partnera do utworzenia z nim wiązania wodorowego poprzez kątowy przeskok. Trzeba też pamiętać, że sam amfifilowy charakter reszty alaninowej, gdzie mamy do czynienia z hydrofilowym szkieletem i hydrofobowym łańcuchem bocznym indukuje anormalny charakter dyfuzji i to również wpływa na spowolnienie ruchliwości wody wokół polialaniny w porównaniu z wodą wokół poliseryny. Efekt ten został zaobserwowany w przypadku różnych amfifilowych peptydów m. in. przez Head-Gordon i wsp. [227][98][105][104], Cannistraro i wsp. [80], Sterpone i wsp. [81]. Poruszanie się łańcuchów bocznych białka również ma wpływ na dynamikę wody w warstwie solwatacyjnej [80]; w przypadku poliseryny efekt ten jest z pewnością bardziej widoczny niż w przypadku polialaniny, z powodu obecności grup hydroksylowych które poprzez wiązania wodorowe „zahaczają cząsteczki wody” (musimy bowiem pamiętać, że łańcuchy boczne w przeciwieństwie do szkieletu peptydowego nie są „przytrzymywane” siłą harmoniczną).

Jak wiadomo prawdopodobieństwo istnienia wiązania wodorowego jako funkcja czasu  $t$  opada niewykładniczo (Rys. 5.2.1) [193][194]. Wartości stałych czasowych wiązania wodorowego skłaniają mnie ku podobnemu wnioskowi co analiza współczynników dyfuzji. A. Kuffel i J. Zielkiewicz [2] łączą spowolnienie zarówno ruchów postępowych jak i obrotowych) z wartościami dwóch stałych czasowych ( $\tau_T$  i  $\tau_R$ ) w Równ. 4.2.7.2, opisujących rozpad wiązania wodorowego (pomiędzy cząsteczkami wody) w czasie. Pomysł ten zakłada, że wiązanie wodorowe może ulec zerwaniu na dwa sposoby: poprzez ruch rozciągający lub zginający. Oba tymi mechanizmami – rozciąganiem i zginaniem - rządzi odpowiednio dyfuzja translacyjna i rotacyjna, i dlatego też, ich czasy relaksacji różnią się. Tak więc, zwiększenie wartości  $\tau_T$  odzwierciedla odpowiednią zmianę translacyjnego współczynnika dyfuzji  $D_T$ . Z drugiej strony, wartość  $\tau_R$  zmienia się nieznacznie, i odpowiada to drobnym zmianom współczynnika  $D_R$ . Ten mechanizm nie stoi w sprzeczności z mechanizmem rearanżacji Laage'a i Hynesa [113][114], którzy to zakładają zasadniczo niedyfuzyjny mechanizm zrywania-tworzenia wiązania wodorowego; ponieważ mimo, że samo zrywanie ma charakter raczej niedyfuzyjny, to jednak „dostarczanie” i „odbieranie” akceptorów wiązania wodorowego z warstwy cząsteczek wody gdzie zachodzi zrywanie wiązania wiąże się z dyfuzją translacyjną, natomiast sam przeskok i odpowiednia orientacja cząsteczek wody względem

siebie jest zależna od dyfuzji rotacyjnej.



**Rys. 5.2.1.** Wykres zależności  $W(t)$ ; kolor zielony – czysta woda, kolor czarny – woda w I warstwie solwatacyjnej wokół formy liniowej polialaniny

W przypadku I warstwy solwatacyjnej poliseryny wartość stałej rotacyjnej (związanej z obrotem cząsteczki w trakcie zrywania wiązania) jest większa aniżeli w przypadku czystej wody, natomiast w przypadku II warstwy solwatacyjnej poliseryny widzimy, że wartości stałej rotacyjnej są zależnie od konformacji odrobinę większe ( $\alpha$ , PII), równe ( $3_{10}$ ), a nawet nieco mniejsze (forma liniowa) od wartości dla czystej wody. Jednak tutaj (tzn. w przypadku II warstwy) jestem ostrożny z wyciąganiem wniosków, gdyż różnice w porównaniu z czystym rozpuszczalnikiem nie przekraczają wartości błędu.

Jak już wspomniałem wartości  $A_T$  i  $A_R$  (Tab. 5.2.1) mierzą udział obu wyżej wspomnianych sposobów rearanżacji wiązania wodorowego. W tym kontekście zwracam uwagę na drobne zmiany w wartościach amplitud  $A_T$  i  $A_R$  w pierwszej otoczce solwatacyjnej w porównaniu do tych w czystej wodzie. Te różnice można wytłumaczyć dwoma zjawiskami. Po pierwsze, wpływem efektu hydrofobowego na wydłużenie czasu życia wiązania wodorowego (ten efekt był badany szczegółowo przez Laage'a i wsp. [116]), a po drugie, oddziaływaniami hydrofilowymi pomiędzy wodą, a powierzchnią peptydu. Zaobserwowane zmiany w wartościach  $A_T$  i  $A_R$  sugerują, że mechanizm zrywania wiązania wodorowego może być zmodyfikowany w sąsiedztwie cząsteczki peptydu. Tą sugestią wspierają wyniki uzyskane przez Jana'ę i wsp. [119], którzy rozważali mechanizm rearanżacji wiązania wodorowego w obrębie pierwszej warstwy solwatacyjnej lizozymu. Pokazali oni, że w obrębie tej warstwy aż 20% przypadków zrywania wiązania wodorowego następuje poprzez nieco inny mechanizm aniżeli w czystej wodzie.

Wykres znormalizowanej funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej (VACF) dla wody

TIP4P przedstawiłem na Rys. 5.2.2. W przypadku tej funkcji można zauważyć wypukłość, a następnie część o ujemnym znaku. Przebieg tej funkcji jest typowy dla wielu cieczy, nie tylko wody. Ujemny znak funkcji świadczy o zmianie kierunku ruchu na przeciwny w wyniku odbicia od otaczających cząsteczek, które tworzą coś w rodzaju „klatki”. Można zauważyć różnicę przebiegu funkcji porównując zachowanie się czystego rozpuszczalnika, a wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej (*vide*: Suplement; Rys. 5.2.S1, Rys. 5.2.S17). Obserwowane głębsze minimum funkcji wskazuje na bardziej sprężyste odbicia od otoczenia, a co za tym idzie na większą sztywność wody znajdującej się w sąsiedztwie łańcucha peptydowego. Można zauważyć, że woda hydratacyjna ma najbardziej „sztywny” charakter w przypadku form „natywnych” polialaniny, zaś woda w otoczkach solwatacyjnych form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi nie odbiega znacząco od czystej wody. Można to wyjaśnić tym, że w przypadku form „natywnych” mamy do czynienia z wiązaniem się cząsteczek wody wiązaniami wodorowymi ze szkieletem peptydu, co oczywiście ma wpływ na usztywnienie struktury rozpuszczalnika. Ponadto powyższe obserwacje stanowią kolejne zaprzeczenie hipotezy „gór lodowych” (w kontekście zmian dynamiki wody) wokół cząsteczek hydrofobowych. W przypadku dalszych warstw nie można już dopatrzeć się różnic w zachowaniu się funkcji dotyczących wody solwatacyjnej i czystej. Zarówno obecność głębszego minimum (w porównaniu z VACF) jak i oscylacyjny charakter funkcji wskazują, że cząsteczka drga często zmieniając kierunki obrotu w wyniku oddziaływania z sąsiednimi cząsteczkami; co najwidoczniej zachodzi w największym stopniu wokół osi  $Ox_w$  wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczki wody (Rys.5.2.S2, 5.2.S3, 5.2.S4).

Wartości funkcji VACF osiągają zero w czasie  $\sim 1$  ps, natomiast funkcji RACF już przy  $\sim 0,3$  ps. Jak już wspomniałem, wpływ cząsteczki peptydu na ruch obrotowy cząsteczki wody jest słabszy, aniżeli na ruch postępowy co jest widoczne na wykresach funkcji autokorelacji prędkości rotacyjnej (RACF; Rys. 5.2.S5, Rys. 5.2.S6, Rys. 5.2.S7, Rys. 5.2.S8). Można to oczywiście powiązać z przeprowadzoną wcześniej analizą współczynników dyfuzji rotacyjnej oraz drugą ze stałych czasowych opisujących kinetykę wiązań wodorowych ( $\tau_R$ ), które w pierwszej warstwie solwatacyjnej różnią się niewiele od wartości obserwowanych dla czystego rozpuszczalnika.

Powyższe rozważania sugerują, że struktura wody w ramach otoczki solwatacyjnej może być sztywniejsza od struktury czystej wody, z powodu nieco wyższej energii wiązań wodorowych. Tą sugestię można potwierdzić poprzez analizę spektralną ruchów cząsteczek wody. Analiza transformaty Fouriera prędkości (translacyjnej i rotacyjnej; obliczonej z funkcji autokorelacji prędkości) pozwala uzyskać głębszy wgląd w dynamikę wody w ramach otoczki solwatacyjnej.

Transformata Fouriera prędkości pokrywa dwa główne regiony: (0-250)  $\text{cm}^{-1}$  i (200-800)  $\text{cm}^{-1}$ , i te regiony odpowiadają odpowiednio postępowym i obrotowym ruchom drgającym cząsteczki wody [228][229]. Transformaty Fouriera wyliczone w tej pracy dla polialaniny i poliseryny (Rys. 5.2.S9., Rys. 5.2.S10, Rys. 5.2.S11, Rys. 5.2.S12, Rys. 5.2.S13, Rys. 5.2.S14, Rys. 5.2.S15, Rys. 5.2.S16, Rys. 5.2.S17, Rys. 5.2.S20, Rys. 5.2.S21) są bardzo podobne do tych dla poliglicyny [2][224], wykazując charakterystyczne przemieszczenie głównego pików w translacyjnej części transformaty Fouriera w kierunku wyższych częstotliwości, o ok  $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ , co potwierdza wniosek, że struktura wody w sąsiedztwie rdzenia peptydowego jest sztywniejsza od struktury czystej wody. Potwierdzony zostaje też fakt, że zwiększona sztywność w obrębie I warstwy solwatacyjnej jest raczej ogólną właściwością, która pojawia się jako skutek efektów orientacyjnych cząsteczek wody w obrębie tej warstwy.

Dotychczas prezentowane wyniki pozwalają nam założyć, że cząsteczki wody tworzą pewną spójną strukturę dookoła rdzenia peptydu. Ten “nimb” jest zakotwiczony w rdzeniu peptydowym poprzez wiązania wodorowe pomiędzy tlenem karbonylowym a wodą, a także (słabsze) oddziaływania z wodorem amidowym (o czym już nadmieniałem w Rozdz. 5.1.3.)

Obliczyłem także stałe czasowe rezydencji atomów wodoru wody wokół tlenów karbonylowych. Uzyskane wyniki przedstawiłem w Tabeli 5.2.2. Najbardziej widocznym faktem jest wyraźne zwiększenie (niemal dwukrotne) zarówno wartości  $\tau_{P,T}$  jak i  $\tau_{P,R}$ , wokół tlenu karbonylowego dla polialaniny w porównaniu z wartościami dla poliglicyny. Wyjaśnienie tego jest bardzo podobne do tego prezentowanego poprzednio. Wielkość  $\tau_{P,T}$  odzwierciedla mechanizm translacyjny wymiany wiązania wodorowego, podczas gdy wielkość  $\tau_{P,R}$ , można łączyć z mechanizmem rotacyjnym. “Czasy rezydencji” określone dla polipeptydu opartego na glicynie są w przybliżeniu takie same jak czasy życia pojedynczego wiązania wodorowego pomiędzy dwoma cząsteczkami wody. Wnioskujemy, stąd, że w przypadku glicyny, warstwa solwatacyjna nie jest mocno związana z rdzeniem peptydu, i może się ślizgać (względnie łatwo) na powierzchni peptydu. Dla alaniny, jakkolwiek, stała czasowa  $\tau_{P,T}$  wyraźnie się zwiększa, co oznacza, że temu “ślizganiu” przeszkadza obecność grup bocznych ( $\text{CH}_3$ ). Ponieważ ślizganie się warstwy wody na powierzchni peptydu powoduje rotację cząsteczek związanych z tlenem peptydowym, więc jego rotacja jest także utrudniona. W rezultacie, stała czasowa  $\tau_{P,R}$  wyraźnie się zwiększa. Innymi słowy, cząsteczki wody są dodatkowo immobilizowane („wkleszczone”) w pobliżu powierzchni peptydu przez grupy boczne, co implikuje wydłużenie obu stałych czasowych  $\tau_{P,T}$  i  $\tau_{P,R}$ , (w porównaniu z wartościami dla glicyny) może służyć jako miara tego efektu. Porównując stałe czasowe rezydencji wokół



poliserynowego tlenu karbonylowego z wartościami uprzednio obliczonymi dla poliglicyny widzimy około dwukrotne zwiększenie wartości tych stałych (1,83x dla formy liniowej; 2,37x dla PII, 2,30x dla  $3_{10}$ ; 1,69 dla  $\alpha$ ), zaś w porównaniu z wartościami dla polialaniny zwiększenie wynosi 1,12x dla formy liniowej, 1,40x dla PII, 1,51x dla  $3_{10}$  i 1,02x dla  $\alpha$ ). Wskazuje to na to, że warstwa solwatacyjna wokół poliseryny jest jeszcze ściślej związana z rdzeniem peptydu, aniżeli w przypadku polialaniny, a zwłaszcza poliglicyny, co jeszcze bardziej utrudnia ślizganie się jej na powierzchni peptydu. Zwiększone wartości stałych „rezydencji” wokół tlenu karbonylowego wokół poliseryny względem peptydów badanych przeze mnie wcześniej można wytłumaczyć trudnościami w „wydostawaniu” się cząsteczek wody z wnętrza przy powierzchni peptydu. W żadnym wypadku nie świadczy to jednak o zwiększonej energii wiązania się ze szkieletem peptydu [97].

Niezależnie od składu aminokwasowego „wyróżniają się wartości stałych czasowych  $\tau_T$  jak i  $\tau_R$  w przypadku helisy PII, które są większe od wyników dla pozostałych konformacji, co wskazuje na trwalsze (pod względem kinetycznym) oddziaływanie z tlenem karbonylowym. „Na wyższą wartość stałych czasowych w porównaniu z innymi układami wpływa budowa helisy PII, w której grupy karbonyłowe nie są zaangażowane w wewnątrzcząsteczkowe wiązania” (w przeciwieństwie do helis:  $\alpha$  i  $3_{10}$ ), „a więc dostępne dla wody, która może przyjąć orientację pozwalającą na zaistnienie trwałego wiązania. Ponadto w przypadku peptydu liniowego grupy karbonyłowe znajdują się na bocznej powierzchni łańcucha, co jednej strony ułatwia kontakt, ale ułatwia też zakończenie oddziaływania. W przypadku helisy PII grupy są schowane w niewielkich zagłębieniach splotu helisy, co wpływa na szybkość opuszczania przez atomy wodoru sąsiedztwa atomów tlenu” (Rys. 3.2.1.2) [224].

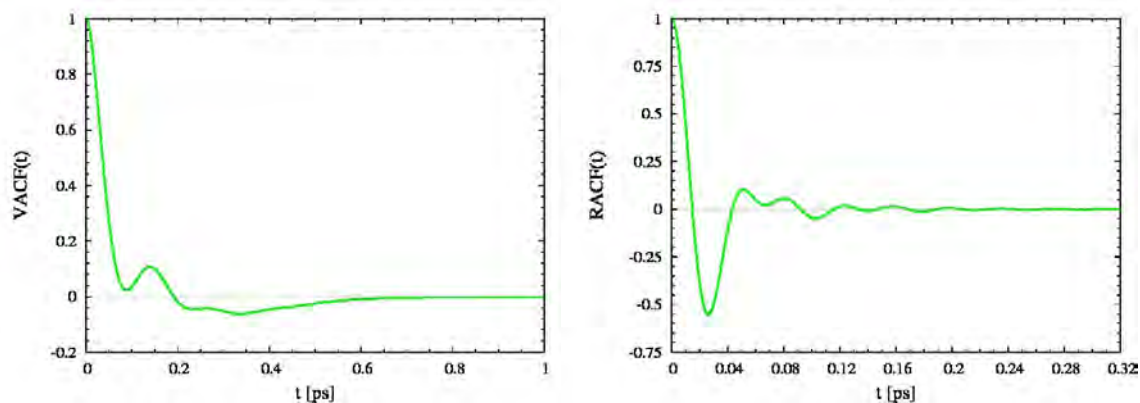
**Tabela 5.2.1.** Dynamiczne właściwości wody w obrębie pierwszej (I) i drugiej (II) otoczki solwatacyjnej.  $D_T$ ,  $D_R$  oznaczają odpowiednio translacyjny i rotacyjny współczynnik dyfuzji.  $A_i$  i  $\tau_i$  oznaczają parametry dwuwykładniczego przybliżenia funkcji  $W(t)$  (Równ. 4.2.7.2)

Konformacja	$10^9 D_T [m^2 s^{-1}]$		$10^{-11} D_R [rad^2 s^{-1}]$		$A_T$		$A_R$		$\tau_T [ps]$		$\tau_R [ps]$	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Ala <sub>15</sub> lin	2,12	3,25	2,45	2,91	0,74	0,75	0,25	0,24	0,50	0,46	0,11	0,11
Ala <sub>15</sub> PII	2,07	3,30	2,42	2,97	0,72	0,74	0,27	0,25	0,48	0,41	0,11	0,10
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	2,17	3,38	2,43	3,02	0,76	0,75	0,24	0,25	0,50	0,45	0,12	0,11
Ala <sub>15</sub> $\alpha$	1,95	3,35	2,39	2,81	0,74	0,76	0,25	0,24	0,50	0,44	0,12	0,10
Ala <sub>0</sub> lin	2,22	3,33	2,66	2,96	0,73	0,79	0,27	0,21	0,46	0,43	0,12	0,09
Ala <sub>0</sub> PII	2,55	3,47	2,83	2,96	0,76	0,77	0,24	0,23	0,45	0,44	0,11	0,10
Ala <sub>0</sub> 3 <sub>10</sub>	2,50	3,40	3,10	2,95	0,76	0,77	0,24	0,23	0,45	0,44	0,11	0,10
Ala <sub>0</sub> $\alpha$	2,48	3,42	3,08	2,99	0,76	0,78	0,23	0,22	0,44	0,43	0,10	0,10
Ser <sub>15</sub> lin	2,37	3,43	2,62	3,25	0,73	0,78	0,26	0,21	0,48	0,43	0,11	0,09
Ser <sub>15</sub> PII	2,12	3,26	2,31	3,07	0,73	0,75	0,26	0,24	0,48	0,44	0,12	0,11
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	2,11	3,35	2,49	3,04	0,73	0,77	0,26	0,23	0,51	0,43	0,12	0,10
Ser <sub>15</sub> $\alpha$	2,10	3,38	2,28	3,23	0,72	0,75	0,28	0,25	0,51	0,45	0,12	0,11
szacowany	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,05$	$\pm 0,03$	$\pm 0,05$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$	$\pm 0,02$	$\pm 0,01$
<b>błąd</b>												
TIP4P	3,76 $\pm 0,1$		3,06 $\pm 0,1$		0,77 $\pm 0,01$		0,23 $\pm 0,01$		0,43 $\pm 0,01$		0,10 $\pm 0,01$	

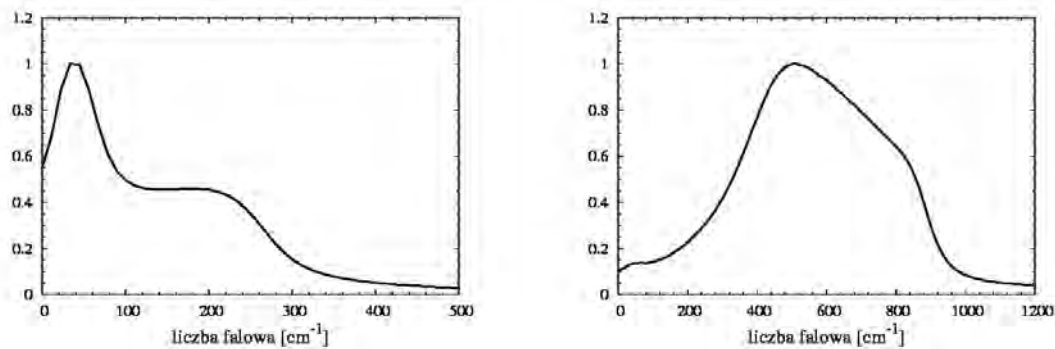
**Tabela 5.2.2.** Parametry funkcji opisującej czasy rezydencji atomów wodoru wody dookoła atomów tlenu karbonylowego i hydroksylowego łańcucha peptydowego.  $\tau_{P,T}$  oraz  $\tau_{P,R}$  oznaczają dwie stałe czasowe dwuwykładniczej aproksymacji funkcji  $P(t)$  (Równ. 4.2.7.3).

Konformacja	$\tau_T$ [ps]	$\tau_R$ [ps]
<b>wokół tlenu karbonylowego</b>		
Ala <sub>15</sub> lin	2,35±0,10	0,49±0,10
Ala <sub>15</sub> PII	3,00±0,10	0,66±0,10
Ala <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	2,49±0,10	0,47±0,10
Ala <sub>15</sub> α	2,49±0,10	0,56±0,10
Gly <sub>15</sub> lin	1,44±0,05	0,27±0,05
Gly <sub>15</sub> PII	1,78±0,05	0,41±0,05
Gly <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	1,64±0,05	0,27±0,05
Gly <sub>15</sub> α	1,50±0,05	0,29±0,05
Ser <sub>15</sub> lin	2,64±0,17	0,50±0,10
Ser <sub>15</sub> PII	4,21±0,13	0,80±0,17
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	3,77±0,26	0,68±0,21
Ser <sub>15</sub> α	2,54±0,31	0,45±0,09
<b>wokół tlenu hydroksylowego</b>		
Ser <sub>15</sub> lin	1,61±0,12	0,29±0,05
Ser <sub>15</sub> PII	1,75±0,12	0,34±0,06
Ser <sub>15</sub> 3 <sub>10</sub>	2,02±0,11	0,37±0,07
Ser <sub>15</sub> α	1,66±0,09	0,28±0,05
woda TIP4P <sup>a</sup>	2,36±0,02 <sup>a</sup>	0,51±0,02 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Wartości dla czystej wody TIP4P umieszczone w tej tabeli były liczone przy użyciu kryterium “odległości”  $d=0,25$  nm jako wartości ograniczającej odległość wodor-tlen.



**Rys. 5.2.2.** Przebieg funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej (VACF(t)) i rotacyjnej (RACF(t)) cząsteczek wody TIP4P w czystym rozpuszczalniku

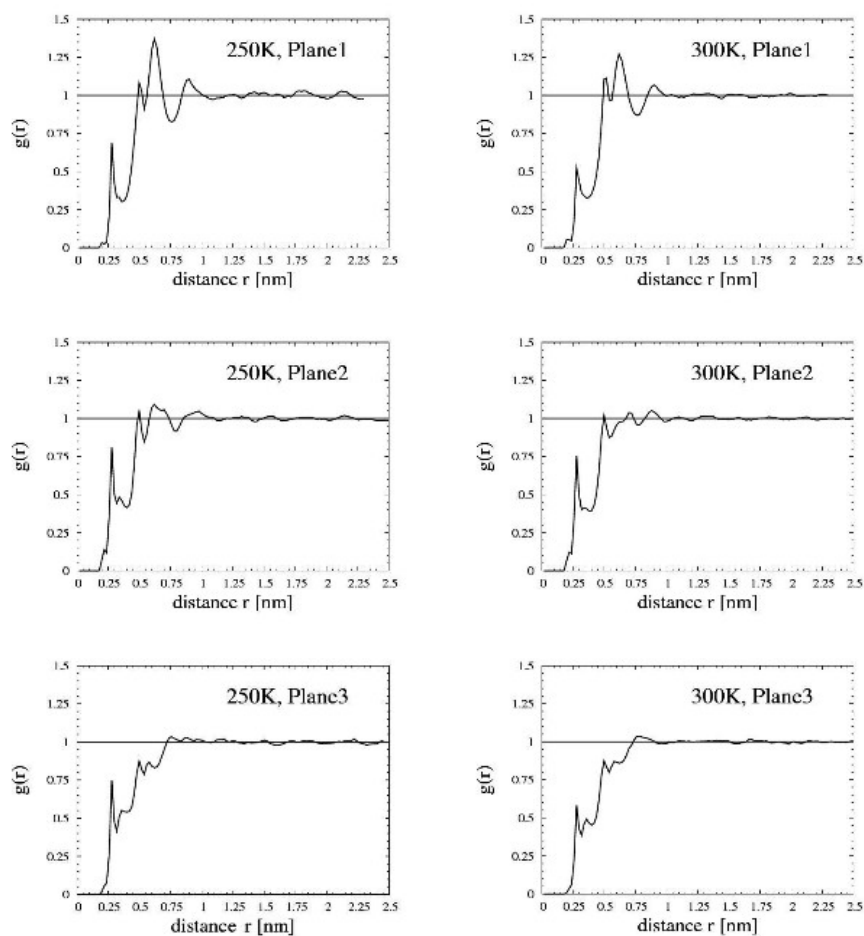


**Rys. 5.2.3.** Przebieg transformaty Fouriera funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej (VACF(t) – z lewej strony) i rotacyjnej (RACF(t) – z prawej strony) cząsteczek wody TIP4P w czystym rozpuszczalniku

## 5.3. Struktura wody solwatacyjnej wokół białka sbwAFP

### 5.3.1. Analiza funkcji rozkładu gęstości

Uzyskane funkcje rozkładu gęstości posłużyły jedynie do oszacowania zakresu warstwy solwatacyjnej. Przedstawiłem je na Rys. 5.3.1, wraz z ich zależnością temperaturową. Jak można zauważyć, ta zależność jest raczej słaba, i jest najbardziej wyraźna dla Płaszczyzny 1. Ponadto można zauważyć że odległość 1,2 nm jest górną granicą obserwowanych zmian gęstości; z tego też powodu wartość ta została wykorzystana jako grubość otoczki solwatacyjnej.

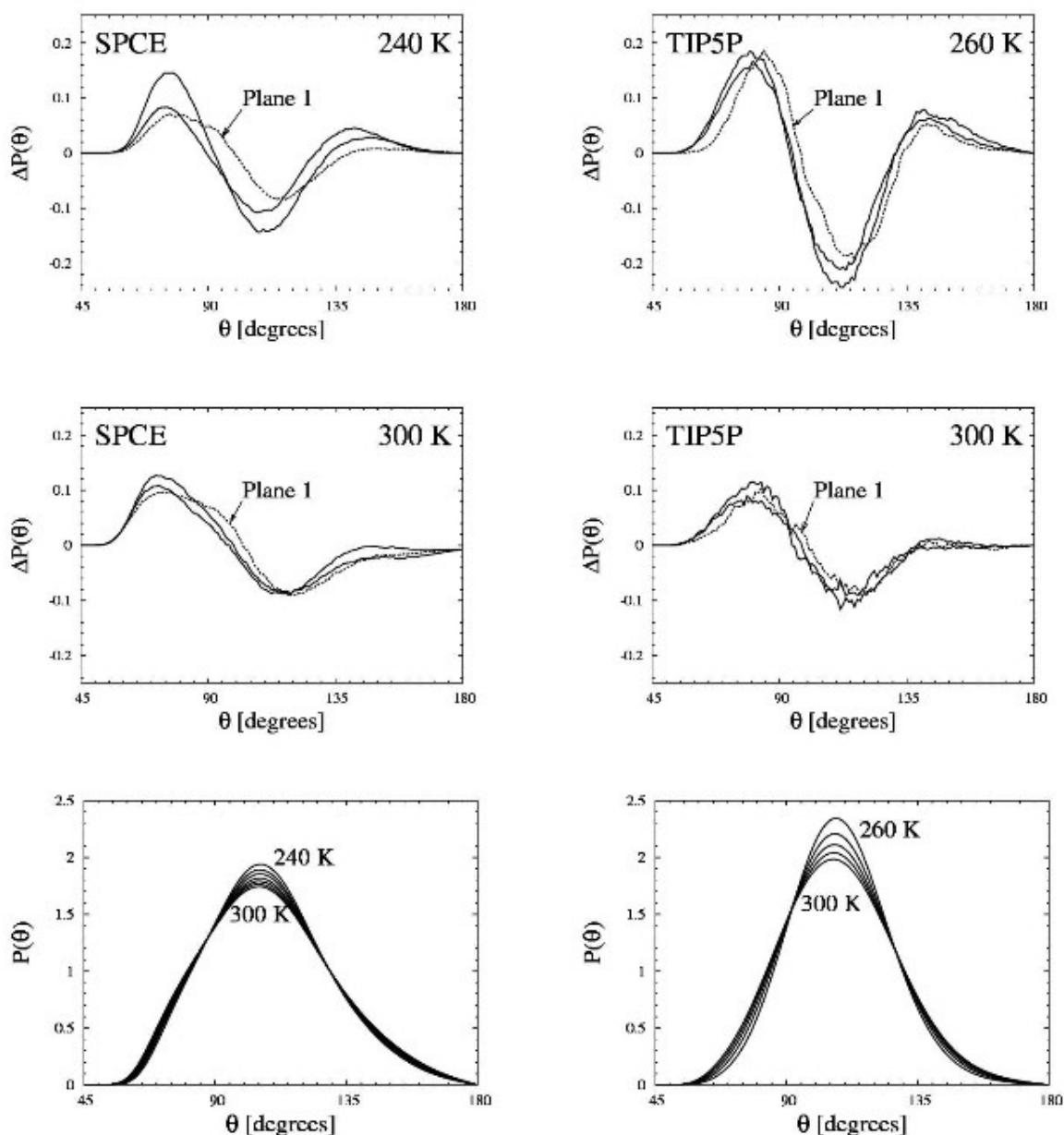


**Rys. 5.3.1.** Funkcja rozkładu gęstości, obliczona w obrębie otoczki solwatacyjnej dookoła trzech płaszczyzn białka sbwAFP dla dwóch temperatur (250 K i 300 K) i wody SPC/E.

### 5.3.2. Wykorzystanie skonstruowanych parametrów w celu określenia uporządkowania wody w otoczce solwatacyjnej białka sbwAFP

Tutaj także wykorzystałem pomysł dwucząstkowych funkcji korelacji do zdefiniowania miary uporządkowania strukturalnego. W celu określenia tej funkcji należy analizować wszystkie

możliwe pozycje i orientacje cząsteczek podczas trajektorii co czyni tą metodę pracochłonną. Wykorzystanie funkcji korelacji prowadzi jednak do użytecznego przybliżonego opisu struktury wody (solvacyjnej) gdyż podczas badania wszystkich możliwych pozycji i orientacji cząsteczek w układzie jestem świadom że niektóre z nich są bardziej prawdopodobne, podczas gdy inne są mniej prawdopodobne i stąd ich wkład do miary ogólnego uporządkowania staje się nieistotny. Innymi słowy, chociaż sondujemy całą przestrzeń konfiguracyjną, główne wkłady do ogólnego uporządkowania wynikają z najbardziej prawdopodobnych parametrów, co wydaje się być dosyć oczywiste. Można oczekiwać, że najbardziej prawdopodobne pozycje i orientacje cząsteczek ciekłej wody są określone, w znacznym zakresie, przez ich zdolność do tworzenia wiązań wodorowych. Jeśli biorę pod uwagę właściwości sieci wiązań wodorowych to rzeczywiście badam pewien wybrany region w przestrzeni konfiguracyjnej, który odzwierciedla najbardziej prawdopodobne konfiguracje układu przy pominięciu wszystkich pozostałych. Stąd, analiza właściwości sieci wiązań wodorowych wydaje się być rozsądnym wstępnym etapem w badaniach struktury wody solwacyjnej. Z tego powodu najpierw zajmę się analizą właściwości wiązania wodorowego w wodzie, podczas gdy zastosowanie parametru lokalnego uporządkowania przedyskutuję nieco później.



**Rys. 5.3.2.** Różnice,  $\Delta P(\theta_{HB}) = P_{\text{solv}}(\theta_{HB}) - P_{\text{bulk}}(\theta_{HB})$ , w rozkładach prawdopodobieństwa kąta  $\theta_{HB}$  (*vide*: Rozdz. 4.2.6) pomiędzy pierwszą warstwą solwatacyjną a czystą wodą, określony dla dwóch temperatur. Wyniki dla Płaszczyzny 1 są wskazane etykietą i są przedstawione linią kropkowaną. Ostatni rząd przedstawia temperaturową zależność kąta  $\theta_{HB}$  w czystej wodzie, określone zarówno dla modelu SPC/E jak i TIP5P.

### 5.3.3. Analiza właściwości wiązania wodorowego

W tym podrozdziale analizuję średnią geometrię pojedynczego wiązania i ogólną geometrię sieci wiązań wodorowych woda-woda.

W celu przeanalizowania właściwości pojedynczego wiązania wodorowego, rozważałem rozkłady prawdopodobieństwa następujących wielkości (Rozdz. 4.2.5); kąt  $\beta_{OOH}$  i odległość  $d_{OO}$ .

Podczas analizy ogólnych właściwości wiązania wodorowego badałem histogram opisujący rozkład prawdopodobieństwa kąta  $\theta_{HB}$  pomiędzy dwoma sąsiednimi wiązaniami wodorowymi utworzonymi przez rozważaną cząsteczkę wody. Wszystkie powyżej określone właściwości zostały określone oddzielnie dla trzech podwarstw otoczek solwatacyjnych. Oczywiście, różnią się one od właściwości czystej wody, ale różnice są najbardziej widoczne dla pierwszej podwarstwy solwatacyjnej, i praktycznie zanikają dla trzeciej.

Wyniki tych obliczeń pokazałem na Rys. 5.3.3; więcej szczegółów można znaleźć na Rysunkach 5.3.S1 i 5.3.S2. Pokazują one różnice pomiędzy wartościami histogramu wyliczonymi dla wody solwatacyjnej z pierwszej podwarstwy,  $P_{solv}$ , i wartości wyliczone dla czystej wody  $P_{bulk}$ .

Można wyciągnąć trzy istotne wnioski z zaprezentowanych wyników. **Po pierwsze**, średnia geometria pojedynczego wiązania wodorowego woda-woda, badana dla wody hydratacyjnej w pierwszej podwarstwie wody pozostaje niemal bez zmian w porównaniu z właściwościami czystej wody tzn. różnice są niewielkie i nie przekraczają one kilku procent (nie więcej niż 2%-3%) wartości histogramu. Warto zauważyć, że bardzo podobne zmiany obserwowałem dla prostych polipeptydów. **Drugim wnioskiem** jest to, że ogólna struktura sieci wiązania wodorowych w tej podwarstwie nie jest znacząco zmieniona. Można powiedzieć, że ta sieć jest względnie sztywna. Dla kątów  $\theta_{HB}$  wokół  $90^\circ$ , wartości histogramu nieco wzrastają w porównaniu z wartościami dla czystej wody, podczas gdy przy  $\sim 109^\circ$  („idealnym” kącie tetraedrycznym) ich wartości ulegają niewielkiemu zmniejszeniu. Warto zauważyć, że obserwowane zmiany są względnie małe tzn. różnice nie przekraczają kilku procent wartości histogramu dla modelu SPC/E, i są nieco wyższe dla modelu TIP5P; zob. Rys. 5.3.3, i dla bardziej szczegółowego opisu zależności temperaturowej zob. Rys. 5.3.S2.

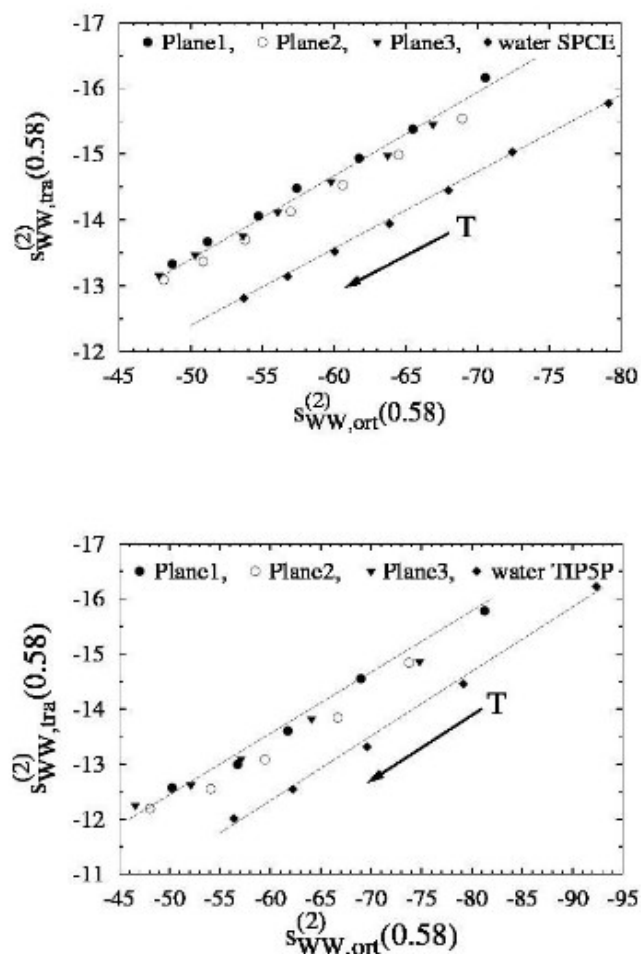
Chociaż powyżej określone odkrycia mogą się wydawać trochę niespodziewane, można je wesprzeć w następujący sposób. Zakładając wspomnianą sztywność sieci wiązań wodorowych, należy oczekiwać, że jej strukturalna sztywność wymaga obecności jakiejś liczby niezajętych miejsc wiązań wodorowych. Wyniki opublikowane ostatnio przez Perera'ę i wsp. [230] pokazują, że takie „dyndające” wiązania wodorowe wokół rozpuszczonych grup niepolarnych rzeczywiście istnieją.

**Trzeci wniosek** jest taki, że właściwości wody wokół Płaszczyzny 1 różnią się nieco od dwóch pozostałych płaszczyzn; w tym szczególnym przypadku, odchylenie od struktury

tetraedrycznej jest nieco mniejsze. Warto zauważyć, że ten efekt jest bardziej widoczny w niskich temperaturach (zob. Rys. 5.3.3, i Rys. 5.3.S2). Różnica w lokalnej tetraedryczności pomiędzy Płaszczyzną 1 a dwoma pozostałymi płaszczyznami została także zaobserwowana przez Nutta i Smitha [179], którzy użyli zmodyfikowanego przez nich parametru tetraedryczności Chaua i Hardwicka [1]. Nutt i Smith interpretowali to odkrycie jako zwiększenie ilości mniej tetraedrycznie uporządkowanej wody wokół Płaszczyzn 2 i 3, i zwiększenie ilości bardziej tetraedrycznie uporządkowanej wody wokół Płaszczyzny 1. Aczkolwiek patrząc na przedstawione przeze mnie wyniki widać wyraźnie, że struktura sieci wiązań wodorowych (tworzonych wyłącznie przez wiązania wodorowe woda-woda) w pobliżu powierzchni białka jest zawsze mniej tetraedryczna w porównaniu z właściwościami czystej wody; jest to prawdą dla wszystkich trzech płaszczyzn białka. Rozróżnienie pomiędzy płaszczyznami polega jedynie na niewielkiej różnicy w zakresie tych zmian.

Porównując modele wody SPC/E i TIP5P możemy dostrzec, że odchylenia od właściwości czystej wody są podobne pod względem jakościowym. Niemniej niektóre różnice pod względem ilościowym są także widoczne. Jak widać (zob. Rys. 5.3.S2) dla modelu TIP5P w temperaturach poniżej 273 K te odchylenia szybko wzrastają, podczas gdy dla wody SPC/E we wszystkich temperaturach (i także dla wody TIP5P w temperaturach powyżej 270 K) są one w niewielkim stopniu zależne od temperatury. Jedynym możliwym wyjaśnieniem jest to, że temperatura zamarzania dla tych modeli wody jest różna (niższa dla modelu SPC/E). W przeciwieństwie do sugestii wyrażonej przez Nutta i Smitha [179], model TIP5P w niskich temperaturach nie pozwala na jednoznaczne i lepsze rozróżnienie pomiędzy trzema badanymi płaszczyznami. Stąd można sądzić, iż nie ma żadnych znaczących różnic pomiędzy obydwoma modelami w w badanym zakresie temperatur.

### 5.3.4. Analiza parametrów uporządkowania



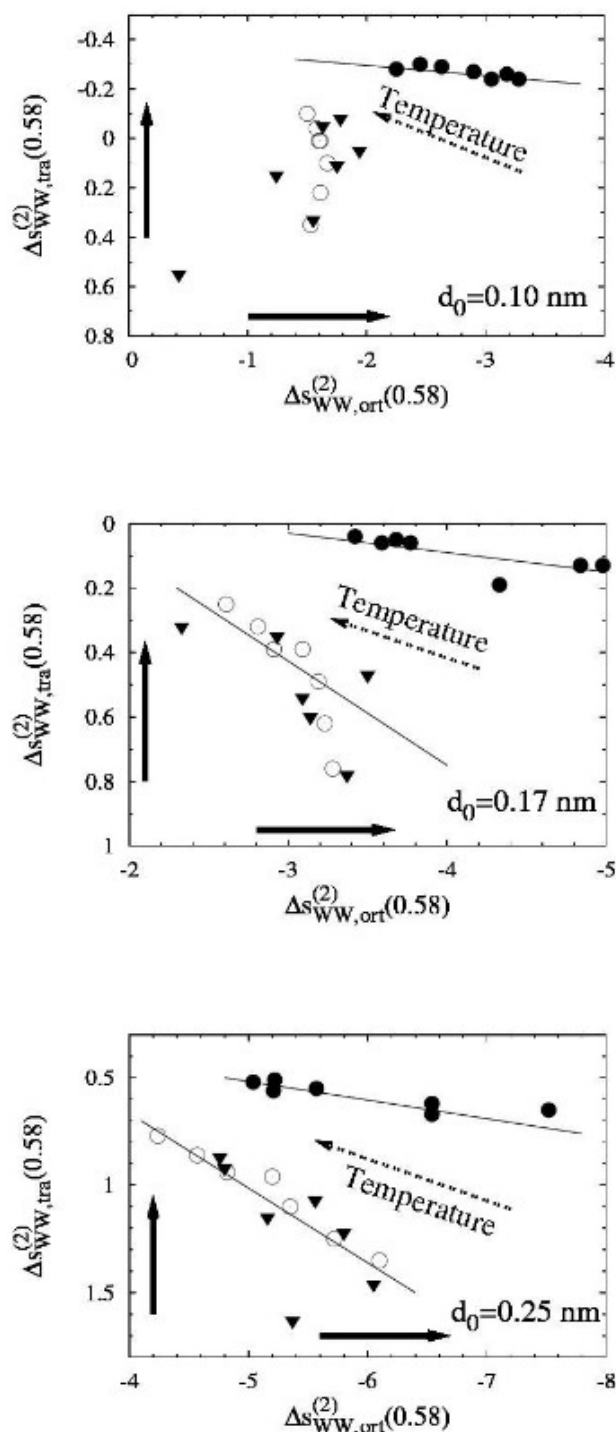
**Rys 5.3.4.** Diagram uporządkowania – zależność temperaturowa relacji  $s_{WW,trans}^{(2)}(0,58)=f(s_{WW,ort}^{(2)}(0,58))$ , określonej dla wody solwatacyjnej wokół trzech płaszczyzn białka AFP, i dla dwóch modeli wody: SPC/E i TIP5P. Strzałki wskazują kierunek wzrastającej temperatury. Przerywane proste linie zostały pokazane dla przejrzystości rysunku.

Jak już nadmieniałem w Rozdz. 4.2.3 parametr lokalnego uporządkowania,  $s_{WW}^{(2)}(0,58)$  można rozłożyć na trzy człony; określam je jako składową translacyjną  $s_{WW,tra}^{(2)}(0,58)$ , konfiguracyjną  $s_{WW,conf}^{(2)}(0,58)$  i orientacyjną  $s_{WW,orient}^{(2)}(0,58)$ . Gdy wykorzystuję ten podział i wykreślam „diagram uporządkowania” przy użyciu wartości  $s_{WW,tra}^{(2)}(0,58)$  i  $s_{WW,ort}^{(2)}(0,58)=s_{WW,conf}^{(2)}(0,58)+s_{WW,orient}^{(2)}(0,58)$ , mam możliwość dokładnego określenia struktury wody w otoczce solwatacyjnej. Warto zauważyć, że tutaj nie wykonałem podziału otoczki solwatacyjnej na warstwy wokół każdej z trzech płaszczyzn badanego białka. Wyniki obliczeń zarówno dla modelu SPC/E jak i TIP5P pokazałem na Rys. 5.3.4 (dla celów porównawczych zawarłem także na tym rysunku punkty dla czystej wody). Widać wyraźnie, że wartości parametru obliczone dla wody solwatacyjnej wokół Płaszczyzny 1 jednoznacznie odbiegają od wartości dla Płaszczyzn 2 i 3. Najbardziej widoczny jest znaczący wzrost absolutnych wartości parametru  $s_{WW,ort}^{(2)}(0,58)$  dla wody wokół Płaszczyzny 1 w porównaniu do tej dla dwóch pozostałych płaszczyzn.



Wartości  $s_{\text{WW,tra}}^{(2)}(0,58)$  i  $s_{\text{WW,ort}}^{(2)}(0,58)$  w otoczce solwatacyjnej odbiegają znacząco od wartości dla czystej cieczy. Różnica jest spowodowana dwoma głównymi przyczynami. Pierwszym jest **efekt „wyłączonej objętości”** tzn. pewna część przestrzeni dookoła rozważanej cząsteczki wody jest zajęta przez białko, i w tym regionie nie jest obecna żadna inna cząsteczka wody. To oczywiście wpływa na dwucząstkową funkcję korelacji – i stąd także na wszystkie badane parametry – które w swoisty sposób zależą od kształtu powierzchni międzyfazowej woda-białko. Drugim powodem jest możliwa **modyfikacja międzycząsteczkowych odległości woda-woda** jak również **modyfikacja wzajemnej orientacji cząsteczek wody** w otoczce solwatacyjnej (w porównaniu z właściwościami czystej wody). Te zmiany także wpływają na dwucząstkową funkcję korelacji i mogą być one spowodowane wieloma czynnikami takimi jak **kształt powierzchni międzyfazowej białko-woda** i **hydrofobowy/hydrofilowy charakter powierzchni białkowej**. Aby uniemożliwić wyciąganie błędnych wniosków, chciałbym wyjaśnić, że termin **„struktura wody”** będę używał od teraz w odniesieniu do wzajemnej orientacji cząsteczek wody i odległości pomiędzy nimi, a nie w celu opisu częściowego bądź całkowitego braku cząsteczek wody z powodu „efektu wyłączonej objętości”. Poniżej opisałem metodę pomiaru zmian strukturalnych w wodzie solwatacyjnej przez porównanie z właściwościami czystej wody.

### 5.3.5. Analiza wyników uzyskanych dzięki modyfikacji parametru lokalnego uporządkowania w celu eliminacji efektu „wylączonej objętości”



**Rys. 5.3.5.** Zmodyfikowana postać diagramu uporządkowania pokazująca temperaturową zależność relacji  $\Delta s_{WW,trans}^{(2)}(0.58) = f(\Delta s_{WW,ort}^{(2)}(0.58))$ , określonej dla wody solwacyjnej dookoła trzech płaszczyzn białka sbwAFP, i przy użyciu dwóch odległości  $d_0$ . Rysunek pokazuje wyniki dla modelu wody SPC/E. Strzałki wskazują kierunek wzrastającego uporządkowania w porównaniu z właściwościami czystej wody. Symbole punktowe odnoszą się do poszczególnych płaszczyzn w analogiczny sposób jak na Rys. 5.3.4. Ciągłe linie proste zostały przedstawione jedynie dla przejrzystości rysunku.

Na początek określiłem w jaki sposób wybór wartości  $d_0$  (tzn. odległość od powierzchni białka poniżej której cząsteczki wody zostały usunięte; zob. Rozdz. 4.2.3h.) znajdujące się ma wpływ na wartości wszystkich analizowanych parametrów, stąd obliczenia wykonano przy użyciu trzech różnych wartości odległości  $d_0$ : 0,10; 0,17 i 0,25 nm. Uzyskane wyniki zaprezentowałem (dla modelu SPC/E) na Rys. 5.3.5, na którym jest pokazany „diagram uporządkowania” utworzony przy użyciu parametrów  $s_{ww,tra}^{(2)}(0,58)$  i  $s_{ww,ort}^{(2)}(0,58)$ . Uzyskane wartości parametru  $s_{ww}(0,58)$  są następujące:

przy użyciu  $d_0=0,25$  nm

Płaszczyzna 1:  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)=-6,9$  J/(mol K) w 240 K, i  $s_{ww}^{(2)}(0,58)=-4,5$  J/(mol K) w 300 K

Płaszczyzna 2 i 3:  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)=-4,7$  J/(mol K) w 240 K, i  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)=-3,4$  J/(mol K) w 300 K

przy użyciu  $d_0=0,17$  nm

Płaszczyzna 1:  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)=-4,9$  J/(mol K) w 240 K, i  $s_{ww}^{(2)}(0,58)=-3,4$  J/(mol K) w 300 K

Płaszczyzna 2 i 3: w przybliżeniu  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)=-2,5$  J/(mol K)

przy użyciu  $d_0=0,10$  nm

Płaszczyzna 1:  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)=-3,5$  J/(mol K) w 240 K, i  $s_{ww}^{(2)}(0,58)=-2,5$  J/(mol K) w 300 K

W przypadku Płaszczyzny 2 i 3 parametr znajduje się w zakresie (-1,1) - (-1,5) J/(mol K)

Jak widać odległość  $d_0=0,25$  nm jest nieco za duża, podczas gdy  $d_0=0,10$  nm jest wyraźnie za mała. Mimo tego, we wszystkich przypadkach można zauważyć podobną tendencję tzn. woda solwacyjna dookoła wszystkich płaszczyzn jest zawsze bardziej uporządkowana niż czysta woda (wartości  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)$  są zawsze ujemne) i woda wokół Płaszczyzny 1 jest znaczaco bardziej uporządkowana od wody wokół Płaszczyzny 2 i 3. Warto zauważyć, że struktura solwacyjnej wokół zarówno Płaszczyzny 2 jak i Płaszczyzny 3 jest niemal nie do odróżnienia przy użyciu przyjętych tutaj metod (włączając w to analizę wiązania wodorowego). Ogólne strukturalne uporządkowanie wokół wszystkich płaszczyzn wzrasta wraz ze spadkiem temperatury, ale wokół Płaszczyzny 1 ten wzrost lokalnego uporządkowania jest wyraźnie większy. We wszystkich wypadkach, efekty orientacyjne są kluczowe dla określenia ogólnego strukturalnego uporządkowania wody w otoczce solwacyjnej (zob. Rys. 5.3.5).

Powyżej zaprezentowane wartości  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)$  są równe kilku J/(mol K), stąd pojawia się następujące pytanie: jest to wartość duża czy mała? Jako wartość odniesienia można użyć całkowity dwucząstkowy wkład do entropii równy -93,3 J/(mol K) w 240 K, i -66,5 J/(mol K) w 300 K dla wody SPC/E. A więc, zaobserwowane wartości  $\Delta s_{ww}^{(2)}(0,58)$  nie wydają się być bardzo duże. Warto zauważyć, że wynikają one przede wszystkim z efektów orientacyjnych.

Drugi wniosek jest taki, że oba modele cząsteczek wody tj. SPC/E i TIP4P zachowują się w bardzo podobny sposób (zob. porównanie wyników pokazanych na Rys. 5.3.4).

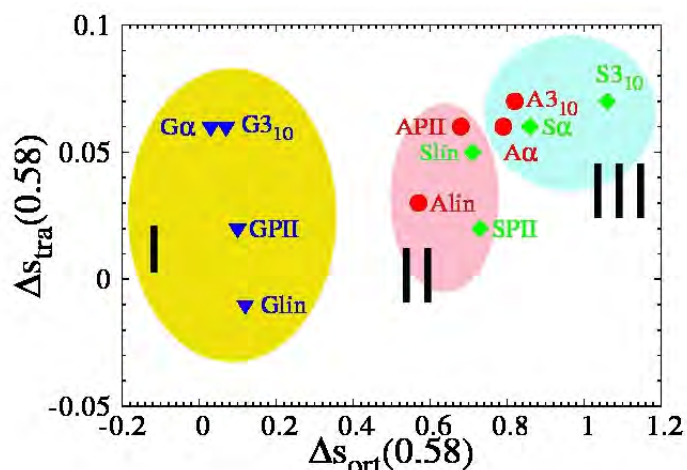
## 5.4. Podsumowanie wyników

Z funkcji rozkładu gęstości wody wynika, że zakres zmian strukturalnych w wodzie indukowanych obecnością peptydu nie przekracza wartości 0,75 nm od powierzchni peptydu; czyli nie przekracza zakresu dwóch warstw cząsteczek wody, przy czym zdecydowana większość zmian gęstości obserwowana jest w I warstwie. Dzięki porównaniu przebiegów dla form „natywnych” i form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi wiemy, że za pojawienie się dodatkowych pików w przebiegu funkcji rozkładu gęstości w zakresie I warstwy solwatacyjnej w dużej mierze odpowiedzialne są oddziaływania elektrostatyczne ze szkieletem peptydu, a w przypadku polialaniny i poliseryny także obecność łańcucha bocznego w reszcie aminokwasowej.

Analiza kątów Eulera opisujących orientację cząsteczek wody względem „walca” utworzonego przez peptyd oraz funkcji rozkładów radialnego wokół wybranych atomów peptydu pozwoliła mi na łatwiejszą interpretację parametrów uporządkowania i będących składnikami członu, a opisujących odpowiednio translacyjne i orientacyjne uporządkowanie cząsteczek wody względem peptydu. Patrząc na wartości tych parametrów generalnie można wyróżnić dwie skrajności: wodę wyróżniającą się stopniem uporządkowania translacyjnego wokół konformacji liniowej (ze względu na tworzące się wokół niej mostki wodne) oraz wodę o wysokim stopniu uporządkowania orientacyjnego wokół helisy PII (co jest skutkiem bardzo „kierunkowych” wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy wodą a szkieletem tej konformacji). Obecność hydroksymetylowych grup bocznych w przypadku peptydu opartego na serynie (a właściwie dodatkowa możliwość jaką stwarza tworzenie z nimi wiązań wodorowych) jest odpowiedzialna za niską wartość uporządkowania orientacyjnego względem  $\alpha$ -helisy poliserynowej w porównaniu z uporządkowaniem względem  $\alpha$ -helisy polialaninowej i poliglicynowej. Jest to też przyczyną generalnie niższego uporządkowania wody względem tego peptydu w porównaniu z uporządkowaniem wody względem konformacji polialaninowych i poliglicynowych. Pr

Zaprezentowane w mojej pracy użycie miary opartej na dwucząstkowych funkcjach korelacji przy jednoczesnej eliminacji efektu „wyłączonej objętości” spowodowanej obecnością peptydu w celu opisanego strukturalnego uporządkowania rozpuszczalnika w obrębie otoczki solwatacyjnej jest pierwszym tego typu podejściem i stanowi istotny postęp w porównaniu z parametrami uporządkowania Chaua i Hardwicka [1]. Analiza uzyskanych w ten sposób parametrów uporządkowania wody solwatacyjnej wykazała zdecydowany udział efektów orientacyjnych w zmianie stopnia uporządkowania względem czystej wody. Analiza tych

parametrów pozwala na następującą klasyfikację wody solwatacyjnej (Rys. 5.4.1):



Rys. 5.4.1. Kategorie wody solwatacyjnej. Opis w tekście

I) największym uporządkowaniem zbliżonym do uporządkowania czystej wody (ale mniejszym od niego) charakteryzuje się woda solwatacyjna wokół konformacji poliglicynowych. Jest to skutek względnie wysokiej dostępności szkieletu peptydowego w przypadku poliglicyny, co też ułatwia energetycznie korzystne (choć entropowo niekorzystne) wiązania wodorowe z tlenem karbonylowym i wodorem amidowym.

Wyraźnie mniejsze uporządkowanie jest widoczne wokół konformacji polialaninowych i poliserynowych przy czym tutaj możemy wyróżnić dwa zespoły:

II) charakteryzujący się większym uporządkowaniem na który składa się woda wokół PII i łańcuchów wyprostowanych; jest on wynikiem tworzenia się licznych wiązań wodorowych ze szkieletem peptydu w przypadku tych konformacji co indukuje podobne zmiany w wodzie solwatacyjnej. To, że woda wokół poliglicynowej formy liniowej i poliglicynowej helisy PII charakteryzuje się silniejszym uporządkowaniem i nie wchodzi w skład tego zespołu wynika z nieobecności w przypadku tych dwóch konformacji grup bocznych, które dodatkowo zaburzają strukturę wody wpływając na orientacje i pozycje cząsteczek rozpuszczalnika;

III) charakteryzujący się najmniejszym uporządkowaniem na który składa się woda wokół helisy  $\alpha$  i  $3_{10}$ . Jest on wynikiem braku silnych oddziaływań ze szkieletem helisy jakieg są obecne w przypadku formy liniowej i helisy PII.

Różnice pomiędzy dwoma ostatnimi zespołami potwierdzają dane zgromadzone w Rozdz. 5.1.3 i Rozdz. 5.1.4. W Rozdz. 5.1.3 pokazałem, że polialaninowe i poliserynowe helisy  $3_{10}$  i  $\alpha$  charakteryzujące się słabszymi oddziaływaniami z tlenem karbonylowym, a zwłaszcza znacznie słabszymi oddziaływaniami z wodorem amidowym, zaś w Rozdz. 5.1.4. pokazałem, że najmniejsze odchylenia od geometrii wiązania wodorowego w czystej wodzie (co jest widoczne zwłaszcza w przypadku kąta  $\beta_{OOH}$  mają miejsce w przypadku wody wokół formy liniowej i helisy PII. Porównując ze sobą peptydy polialaninowe i poliserynowe o tej samej konformacji widoczne jest nieco większy stopień uporządkowania wody wokół polialanin, niż wokół poliseryn, co można wiązać z tym, że w przypadku poliseryn cząsteczki wody w otoczce solwatacyjnej wskutek możliwości tworzenia wiązań wodorowych z łańcuchami bocznymi reszt serynowych mogą przyjmować szerszy wachlarz orientacji zarówno względem peptydu jak i między sobą. W przypadku średniej energii wiązania wodorowego (Rozdz. 5.1.4) obserwujemy podobne dwa zespoły jak przy parametrze uporządkowania dla polialanin i poliseryn tzn. obserwujemy wzrost średniej energii wiązania wodorowego w przypadku helis:  $\alpha$  i  $3_{10}$ , zaś praktycznie nie obserwujemy w przypadku dwóch pozostałych konformacji. Bowiem cząsteczki wody mając w przypadku tych dwóch konformacji bardziej ograniczoną możliwość tworzenia wiązania wodorowego ze szkieletem peptydowym tworzą za to silniejsze wiązania wodorowe wewnątrz warstwy. Można więc powiedzieć, że dwie formy:  $\alpha$ -helisa i helisa  $3_{10}$  są dla cząsteczek wody bardziej hydrofobowe niż helisa PII i forma liniowa), mimo tego że wszystkie badane konformacje mają grupy hydroksylowe na łańcuchach bocznych). To tłumaczy dlaczego  $\alpha$ -helisa ma w roztworze wodnym tendencję do samorzutnego rozwijania się. Z drugiej strony w przypadku poliseryn obecność grup hydroksylowych spowalnia proces rozwijania względem próżni (w przeciwieństwie do polialaniny), co już zauważyli i wyjaśnili Doruker i Bahar [6].

Lokalna struktura wody jest bardziej uporządkowana wokół peptydów opartych na glicynie niż w sąsiedztwie peptydów alaninowych. Ta ważna informacja jest warta specjalnej uwagi i głębszej analizy. Jak wiadomo alanina jest znacznie lepszym „kreatorem” helisy aniżeli glicyna [169]. W celu opisanie tej skłonności ilościowo López-Llano i wsp. [150] badali wpływ różnych fizycznych czynników na stabilizację  $\alpha$ -helisy tworzonej przez zarówno peptydy oparte na alaninie jak i glicynie. Znaleźli oni, że różnica w entropii szkieletu wnosi jedynie 15% do całkowitej stabilizacji  $\alpha$ -helisy przez polipeptyd alaninowy względem polipeptydu glicynowego. Duża część (35%) pochodzi ze zwiększonego efektu hydrofobowego alaniny w porównaniu z glicyną, podczas gdy pozostałe 50% pochodzi z sumy efektów entalpowych. Innymi słowy, wpływ efektów

solwatacyjnych jest bardzo duży, wręcz dominujący. Można wysunąć tezę, że istnieje korelacja pomiędzy stabilnością polialaninowych  $\alpha$ -helis względem poliglicynowych wynikającą z efektu hydrofobowego (35%), a uporządkowaniem wody w otoczce solwatacyjnej. W czasie fałdowania poliglicyny uporządkowanie wody solwatacyjnej wokół poliglicyny właściwie się nie zmienia, natomiast w przypadku wody wokół polialaniny bądź poliseryny ma miejsce „przejście” wody z zespołu charakteryzującego się silniejszym uporządkowaniem (zespół II) do zespołu charakteryzującego się słabszym uporządkowaniem (zespół III) wody, co jest oczywiście entropowo korzystne.

Wiele danych literaturowych [157][158][162][167][231] wskazuje, że w roztworze wodnym preferowana jest polialaninowa helisa PII w porównaniu z rozciągniętą strukturą  $\beta$ . Ponadto pokazano [157][158], że woda jest najmniej zmieniona przez helisę PII w porównaniu z formą liniową; zauważmy, że podobny wniosek został wyprowadzony dla poliglicyny [2]. Jest to spowodowane obecnością wokół formy liniowej wspomnianych mostków wodnych, zaobserwowanych przez Mezei'a i wsp. [164], podczas gdy bardziej eksponowana struktura helisy PII ułatwia jej „wbudowanie” do istniejącej struktury otaczającej wody [158]. Pozycja punktów na diagramie uporządkowania reprezentujących wodę wokół konformacji liniowej peptydów Ala<sub>15</sub> i Ser<sub>15</sub> wskazująca na większe lokalne uporządkowanie wokół tej formy aniżeli wokół helisy PII jest zgodna z powyższymi wnioskami (a jednocześnie powyższe wnioski wspierają wiarygodność tego parametru).

Tran i wsp. [174] pokazali, że w roztworze wodnym poliglicyna tworzy związłe, chociaż nieuporządkowane globule. Stąd, pomijając powyżej wspomniane porównanie zarówno formy liniowej jak i formy PII poliglicyny, trudno jest jednoznacznie sądzić o względnej stabilności poszczególnej struktury drugorzędowej tego peptydu. Zgadza się to ze stwierdzonym przeze mnie brakiem wyraźnych różnic w uporządkowaniu wody wokół różnych konformacji poliglicynowych.

Moje powyżej wyrażone przypuszczenie, że lokalne strukturalne uporządkowanie koreluje ze stabilnością poszczególnej struktury w roztworze wodnym może zostać także wsparte jeszcze jedną obserwacją. Patrząc na diagram uporządkowania na Rys. 5.4.1 widać wyraźnie, że konformacją z grupy II, która najbardziej przypomina pod względem uporządkowania wody wokół nich poliglicynowe konformacje z grupy I jest polialaninowy łańcuch wyprostowany. Znajduje to potwierdzenie na wykresie różnicowym (Rys. 5.1.4.2) kąta O-O-O ( $\theta_{HB}$ ) w sieci wiązań wodorowych, gdzie widzimy (porównując to z wykresem różnicowym dla tego kąta na Rys.

5.1.4.1), że histogram dla tej konformacji jest bardzo zbliżony do tego dla konformacji poliglicynowych, a inny od tego dla pozostałych konformacji polialaninowych. Koreluje to, że względnie słabą stabilnością (w przypadku polialaniny) struktur  $\beta$ .

Pewne interesujące wnioski o właściwościach wody „solwatacyjnej” mogą zostać także uzyskane z analizy właściwości dynamicznych. Ze szczegółowej analizy funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej (VACF) i rotacyjnej (RACF) wynika, że woda w warstwie solwatacyjnej stanowi (w porównaniu z czystą wodą) względnie sztywną strukturę. Łącząc ten fakt z pozostałymi wynikami, można powiedzieć że woda otaczająca rdzeń peptydowy tworzy „nimb” wokół niego. Ten „nimb” jest stabilizowany przez nieco wyższą energię wiązań wodorowych: w obrębie tego „nimbu” średni czas życia wiązań wodorowych jest dłuższy w porównaniu z czasem życia w czystej wodzie. Ponadto, niektóre z uzyskanych wyników pokazują, że dynamika wiązania wodorowego w sąsiedztwie rdzenia polialaniny różni się od tej w czystej wodzie i przypuszczam, że ta różnica może być spowodowana modyfikacją mechanizmu przeskoku wiązania wodorowego. Sztywność wody wokół konformacji poliserynowych jest zbliżona do sztywności wody wokół polialaniny, jest więc ona większa od sztywności czystej wody. Wskazują na to uzyskane przeze mnie rezultaty analizy fourierowskiej funkcji autokorelacji prędkości, jak również spowolnienie ruchów postępowych i obrotowych w I warstwie solwatacyjnej oraz wydłużenie stałych czasowych opisujących czas życia wiązania wodorowych. Co ciekawe stałe czasowe opisujące trwałość wiązania wodorowego wokół form hydrofobowych są mniejsze niż wokół form „natywnych” i są tylko odrobinę większe od tych dla czystej wody, co również podważa teorię „gór lodowych” (w kontekście dynamicznym).

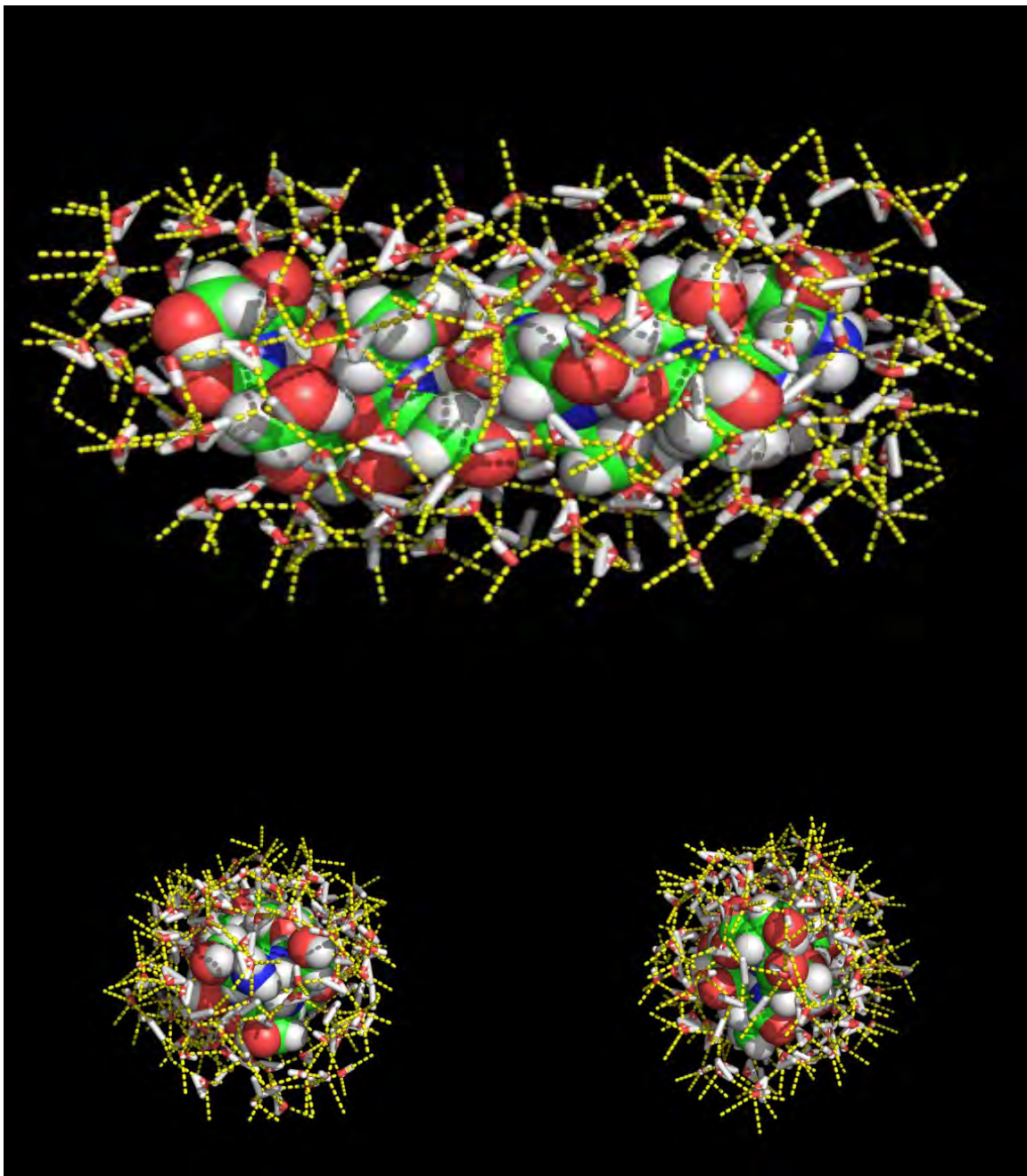
Z analizy stałych czasowych opisujących rezydencję cząsteczek wody w pobliżu powierzchni peptydu wynika także, że warstwa solwatacyjna oddziałuje z powierzchnią peptydu na dwa sposoby. Po pierwsze, tworzy wiązania wodorowe, głównie z atomami tlenu grup karbonylowych, ale te tworzone z atomami wodoru grup aminowych są także obecne (jest to zwłaszcza widoczne dla konformacji liniowej). Po drugie, oddziałuje z pojemnymi grupami bocznymi ( $\text{CH}_3$ ) polialaniny - w przypadku polipeptydów opartych na glicynie ta warstwa ślizga się względnie swobodnie na powierzchni peptydu, natomiast w przypadku polialaniny i poliseryny, jakkolwiek to ślizganie jest mocno powstrzymywane przez obecność grup metylowych ( $\text{Ala}_{15}$ ) bądź hydroksymetylowych ( $\text{Ser}_{15}$ ); ten efekt jest dodatkowo wzmocniony wzrostem sztywności warstwy solwatacyjnej. A więc, taka analiza pozwala nam dostrzec i wyjaśnić odmienne różnice w zachowaniu się wody w otocze solwatacyjnej wokół peptydów różniących się składem



aminokwasowym. Przykładowy fragment sieci wiązań wodorowych otaczających peptyd na przykładzie  $\alpha$ -helisy poliserynowej przedstawiłem na Rys. 5.4.2 (więcej rysunków można znaleźć w Suplemencie).

Zaprezentowane powyżej porównanie uporządkowania wody solwatacyjnej z innymi danymi opisującymi jej strukturę, a także w konfrontacji z danymi literaturowymi (Rozdz. 3.2.1) określającymi względną stabilność określonych konfrontacji peptydów w wodzie stanowią pozytywną weryfikację skonstruowanych parametrów. Jednak tutaj mógłby pojawić się zarzut, że owe parametry mogą jedynie znaleźć zastosowanie dla wody wokół prostych homogenicznych peptydów, a nie już np. dla wody wokół białek. Aby odeprzeć ten możliwy zarzut określiłem za pomocą skonstruowanych parametrów uporządkowanie wody wokół 3 płaszczyzn antyzmrozeniowego białka sbwAFP. Uzyskane wyniki dla wody wokół tego białka tworzą spójny obraz nie stojący w zasadniczej sprzeczności z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Wskazują one, iż woda solwatacyjna wokół tego białka jest zawsze nieco bardziej uporządkowana niż woda czysta. Ponadto potwierdzają one, że struktura wody w pobliżu płaszczyzny 1 jest wyraźnie odmienna od struktury wody wokół Płaszczyzn 2 i 3. Bardzo podobne uporządkowanie wody wokół Płaszczyzn 2 i 3 jest zgodne z wielkościami opisującymi geometrię pojedynczego wiązania i geometrię sieci wiązań wodorowych.

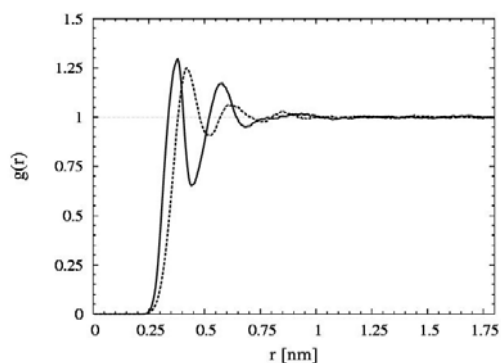
Podsumowując mogę więc stwierdzić, że opracowane przeze mnie i zaprezentowane w niniejszej pracy parametry uporządkowania wody solwatacyjnej okazują się być bardzo użyteczne w opisie struktury wody solwatacyjnej i pozwalają one na bardzo precyzyjny pomiar zmian stopnia uporządkowania wody w warstwie solwatacyjnej, co skądinąd jest bardzo trudnym zadaniem.



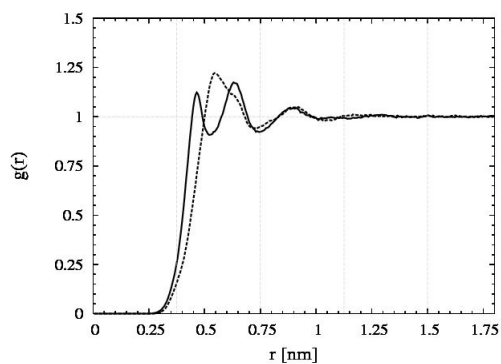
Rys. 5.4.2. Fragment sieci wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody wokół  $\alpha$ -helisy poliserynowej.  
[Rysunek wykonano przy użyciu programu PyMOL]

## 6. Supplement

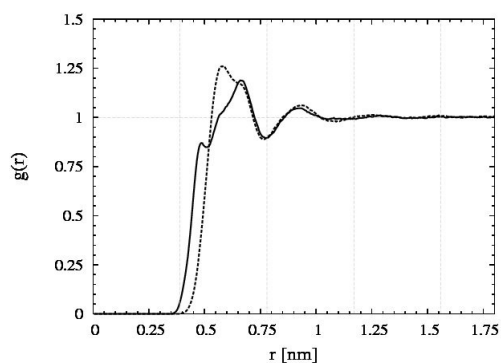
### Do Rozdz. 5.1.1.



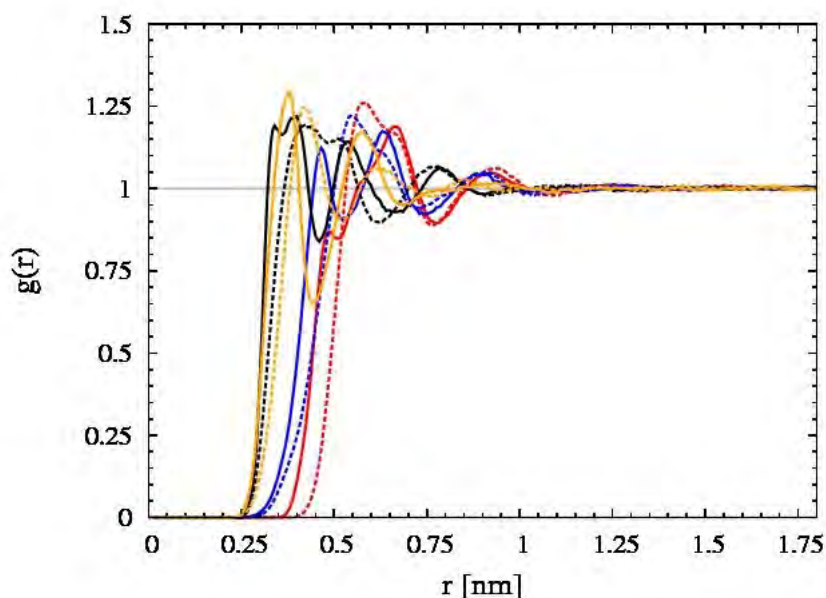
**Rys. 5.1.1.S1.** Funkcja rozkładu radialnego wokół konformacji PII (linia ciągła) i PII\_0 (z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi; linia przerywana) polialaniny



**Rys. 5.1.1.S2.** Funkcja rozkładu radialnego wokół konformacji  $3_{10}$  (linia ciągła) i  $3_{10}_0$  (z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi; linia przerywana) polialaniny

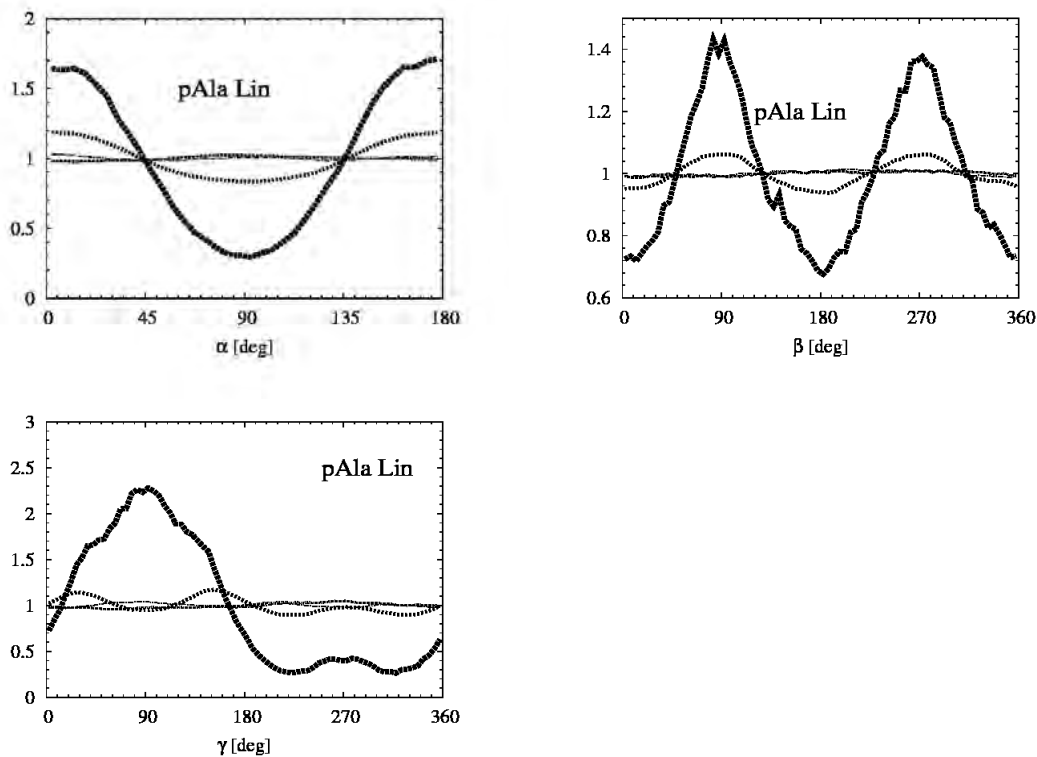


**Rys. 5.1.1.S3.** Funkcja rozkładu radialnego wokół konformacji  $\alpha$ -helikalnej (linia ciągła) i  $\alpha$ -helikalnej0 (linia przerywana) polialaniny

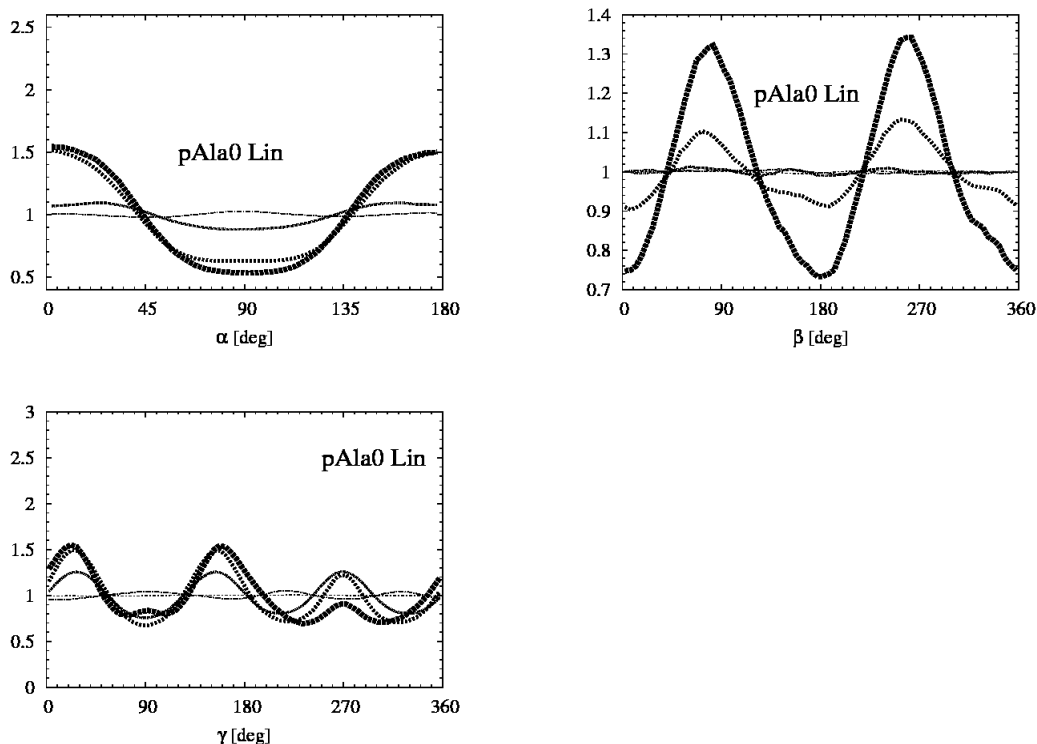


**Rys. 5.1.1.S4.** Zestawienie funkcji rozkładu radialnego dla różnych konformacji polialaniny; kolor czarny – konformacja liniowa; kolor pomarańczowy – konformacja PII; kolor niebieski – konformacja  $3_{10}$ ; kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa. Linią ciągłą zaznaczono funkcje rozkładu radialnego dla form „natywnych”; linią przerywaną dla form z wyzerowanymi ładunkami czastkowymi.

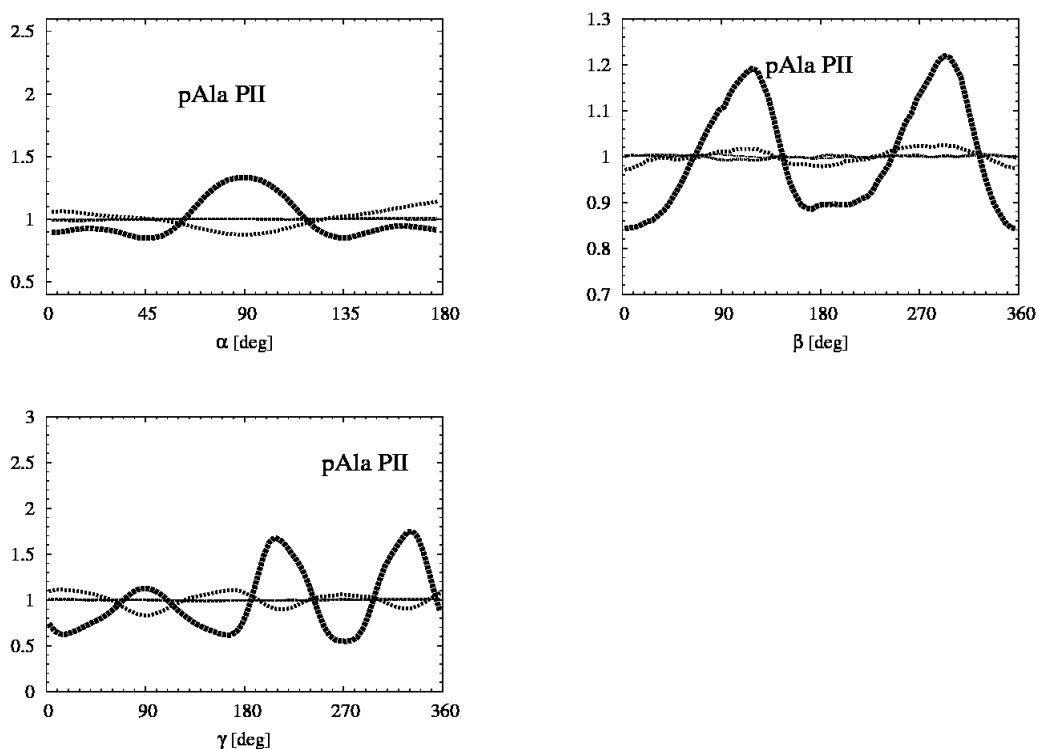
## Do Rozdz. 5.1.2



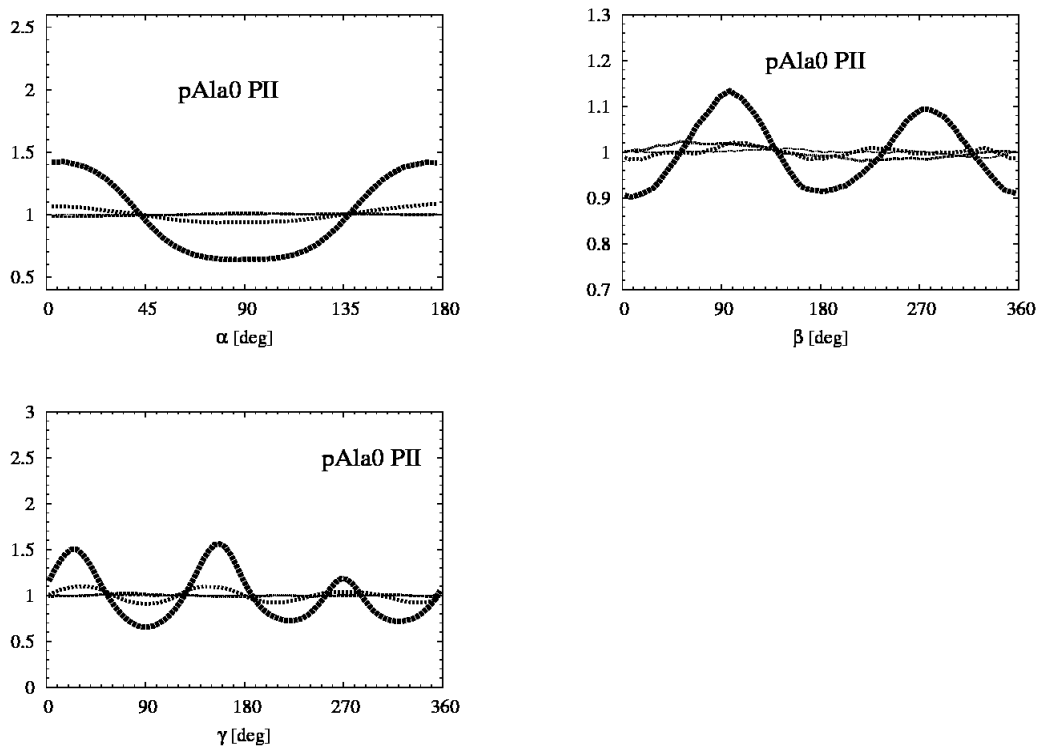
**Rys. 5.1.2.S1.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji liniowej; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,00-0,30 nm, 0,30-0,58 nm, 0,58-0,74 nm, 0,74-0,89 nm, 0,89-1,10 nm, 1,10-1,99 nm od osi peptydu.



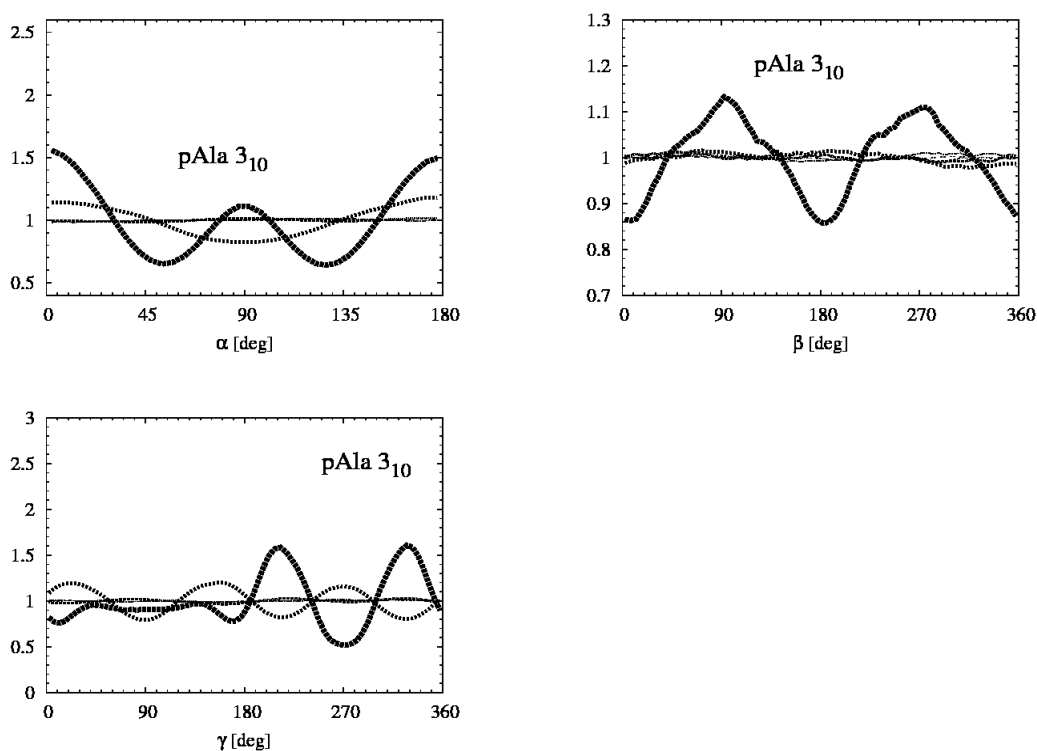
**Rys. 5.1.2.S2.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji liniowej z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,00-0,36 nm, 0,36-0,46 nm, 0,46-0,66 nm, 0,66-0,90 nm, 0,90-1,33 nm, 1,33-1,99 nm od osi peptydu.



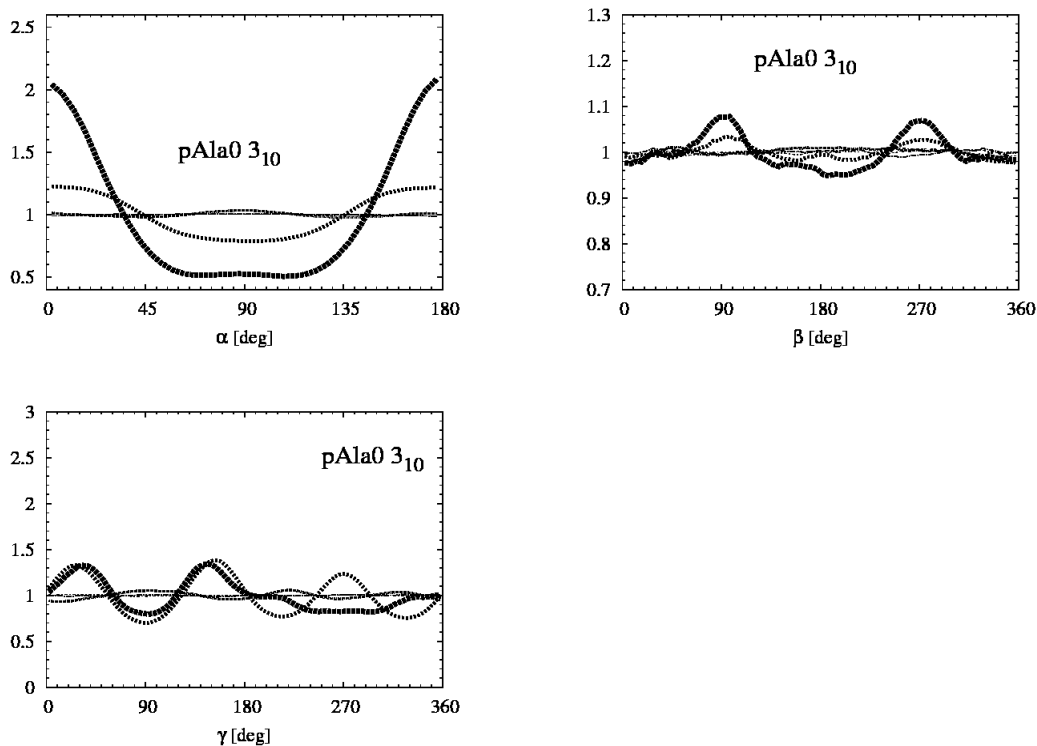
**Rys. 5.1.2.S3.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji PII; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,00-0,36 nm, 0,36-0,46 nm, 0,46-0,66 nm, 0,66-0,90 nm, 0,90-1,33 nm od osi peptydu.



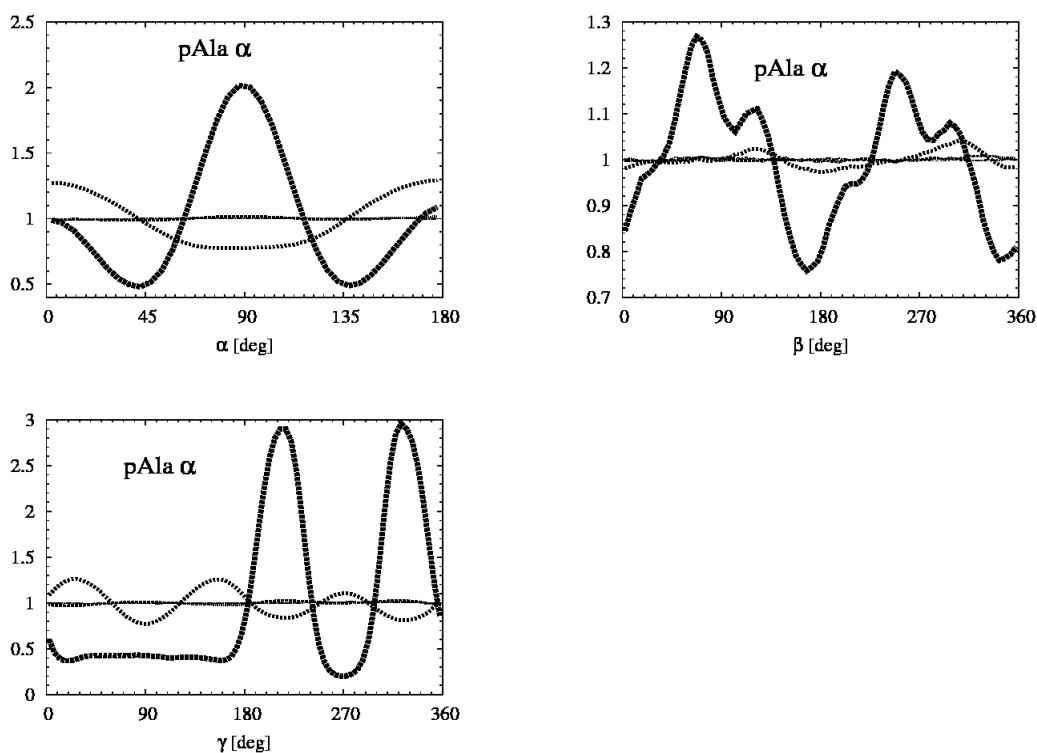
**Rys. 5.1.2.S4.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji PII z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,00-0,52 nm, 0,52-0,75 nm, 0,75—1,05 nm, 1,05-1,37 nm, 1,37-2,02 nm od osi peptydu.



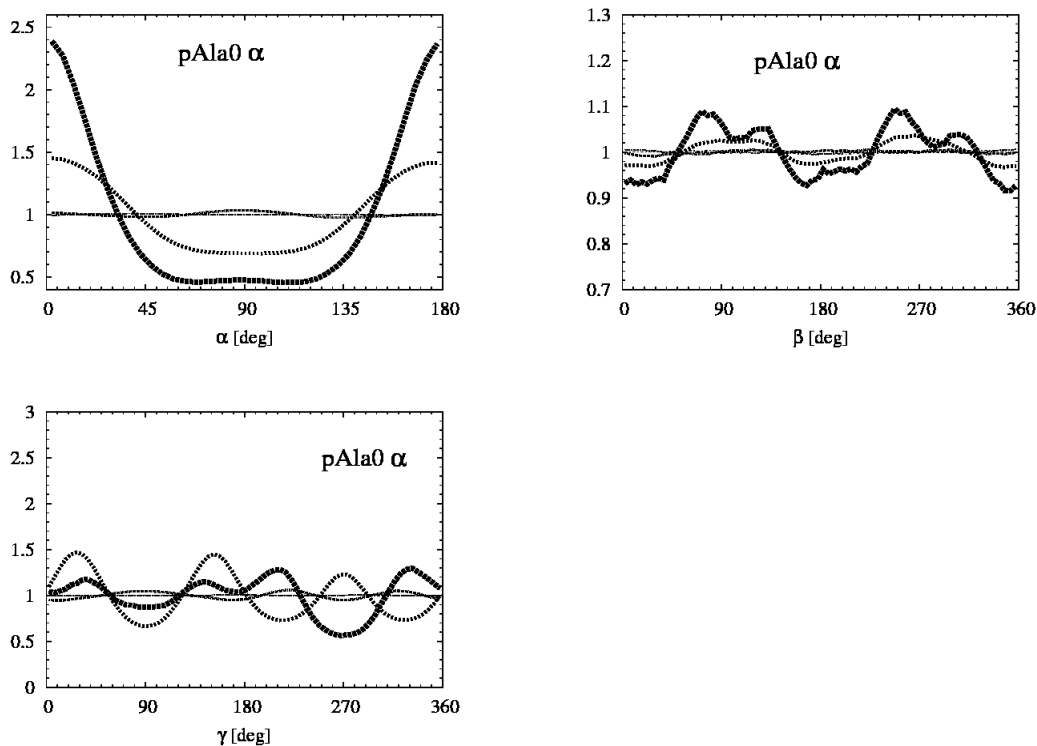
**Rys. 5.1.2.S5.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji  $3_{10}$ ; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,00-0,52 nm, 0,52-0,74 nm, 0,74-1,00 nm, 1,00-1,25 nm, 1,25-1,50 nm od osi peptydu.



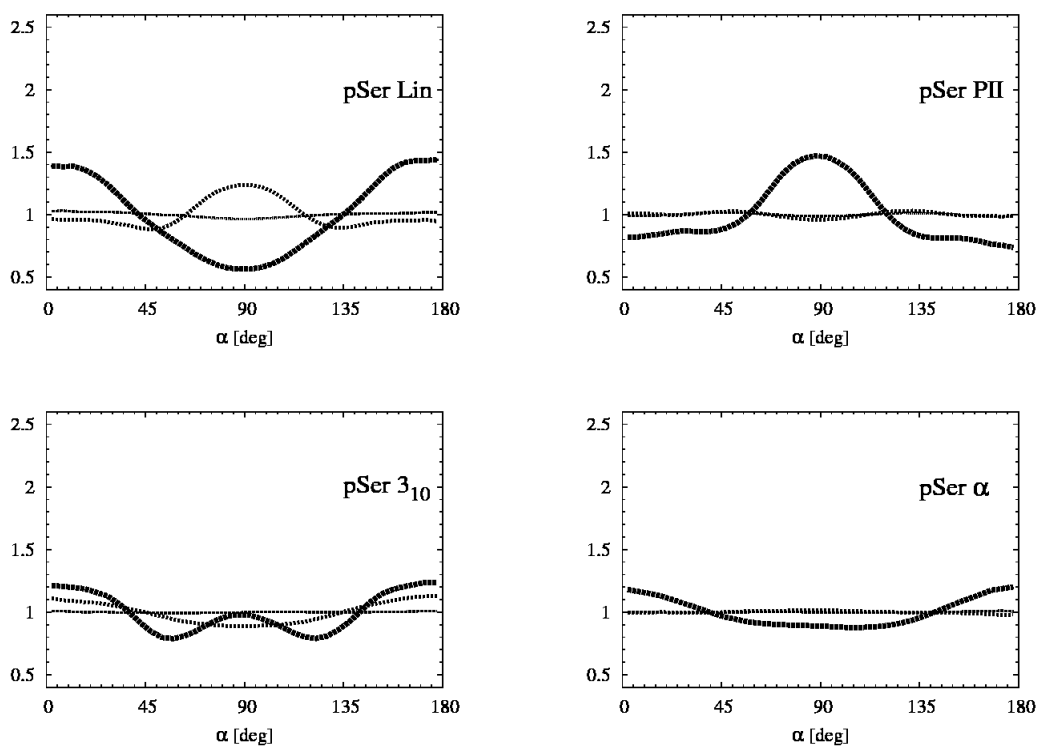
**Rys. 5.1.2.S6.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji  $3_{10}$  z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,00-0,52 nm, 0,52-0,74 nm, 0,74-1,00 nm, 1,00-1,25 nm, 1,25-1,50 nm od osi peptydu.



**Rys. 5.1.2.S7.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji  $\alpha$ ; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,35-0,51 nm, 0,51-0,77 nm, 0,77-1,04 nm, 1,04-1,41 nm, 1,41-1,98 nm od osi peptydu.

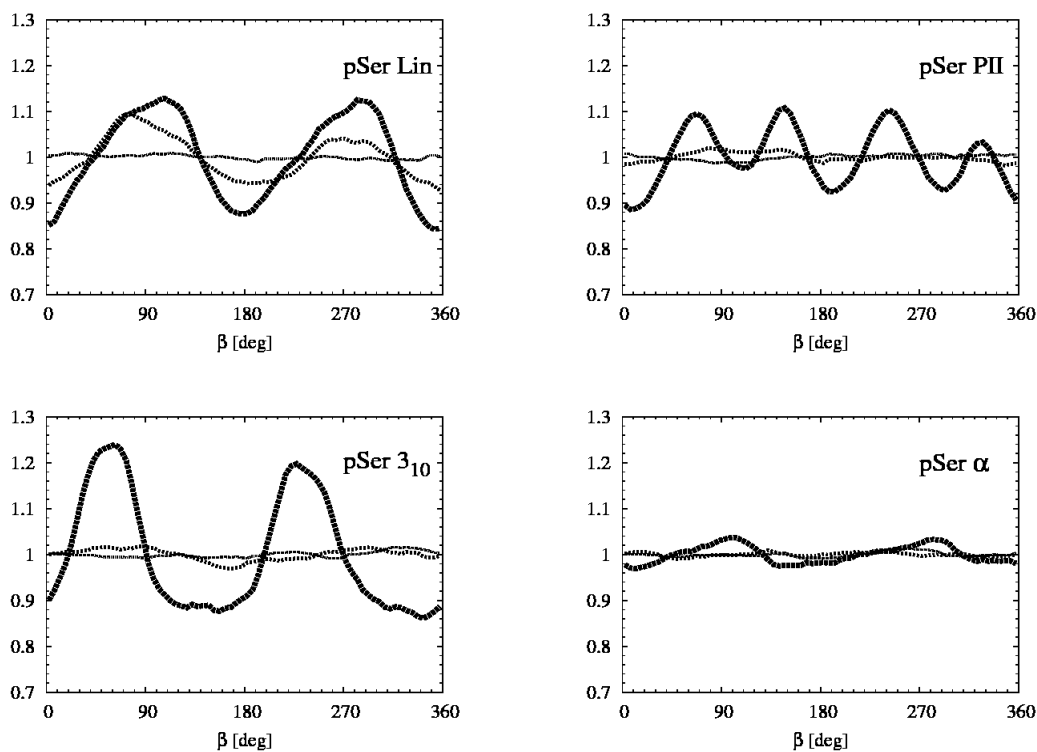


**Rys. 5.1.2.S8.** Rozkład wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  dla kolejnych przedziałów odległości od osi peptydu polialaninowego o konformacji  $\alpha$  z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejno przedziały: 0,35-0,51 nm, 0,51-0,77 nm, 0,77-1,04 nm, 1,04-1,41 nm, 1,41-1,98 nm od osi peptydu.

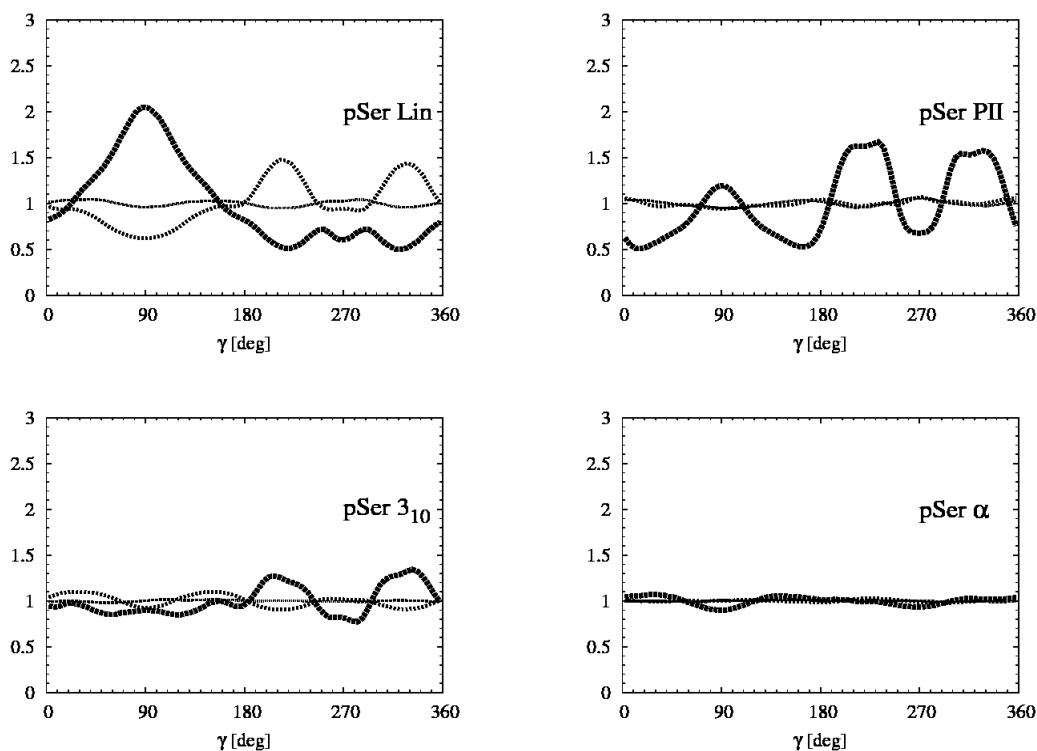


**Rys. 5.1.2.S9.** Rozkład wartości kąta  $\alpha$  dla kolejnych warstw solwacyjnych wokół konformacji poliserynowych; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejne warstwy solwacyjne



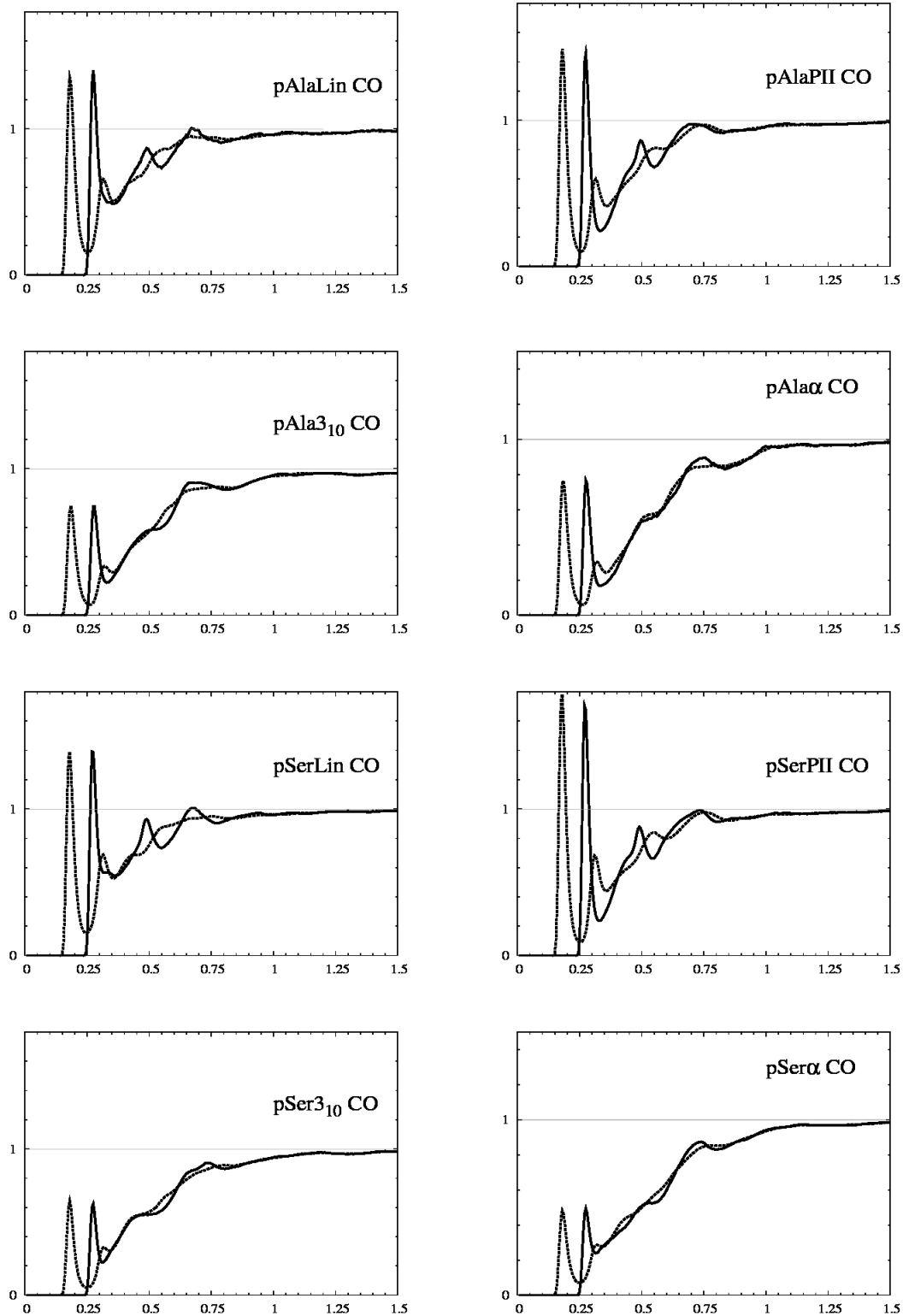


**Rys. 5.1.2.S10.** Rozkład wartości kąta  $\beta$  dla kolejnych warstw solwacyjnych wokół konformacji poliserynowych; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejne warstwy solwacyjne

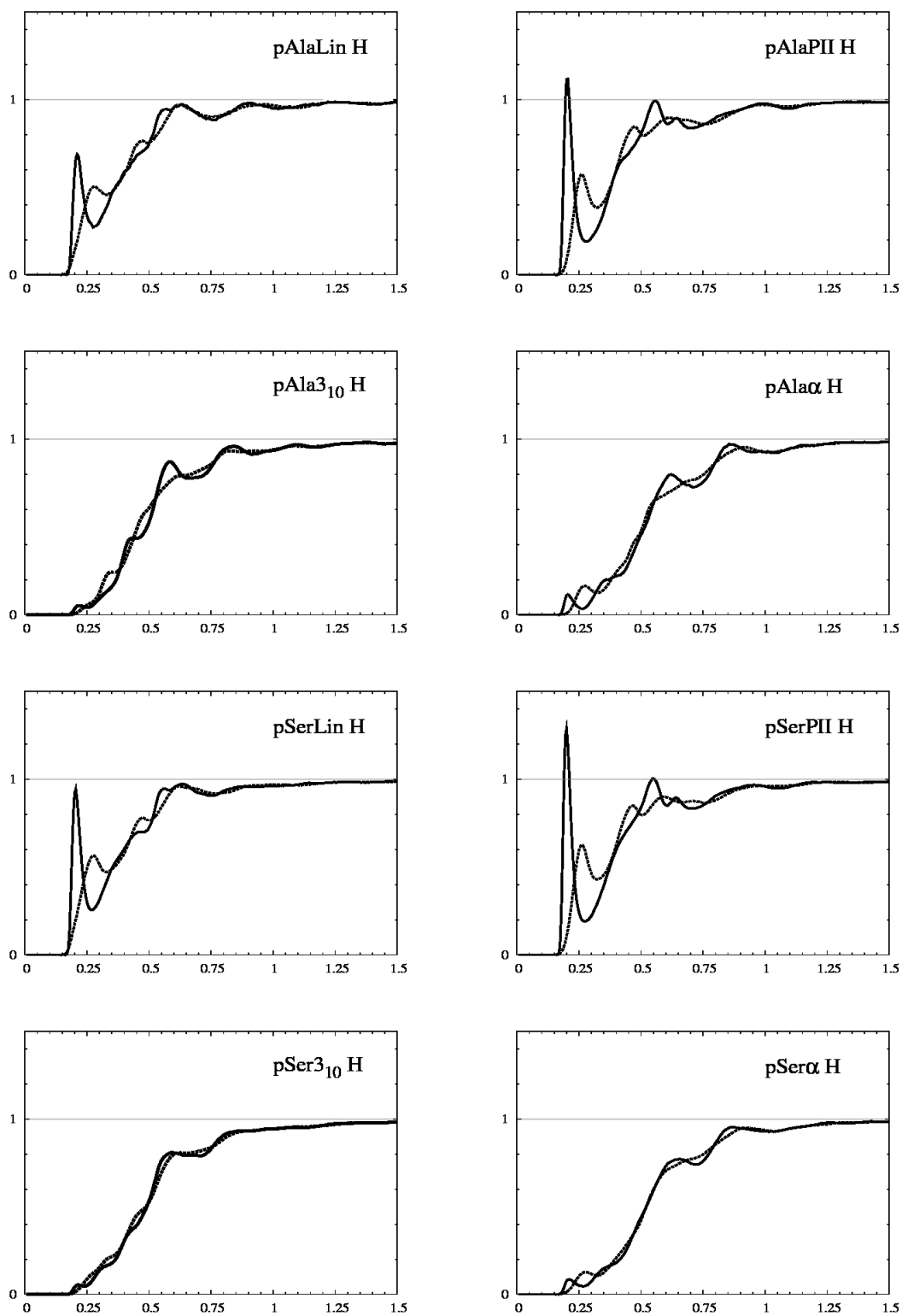


**Rys. 5.1.2.S11.** Rozkład wartości kąta  $\gamma$  dla kolejnych warstw solwacyjnych wokół konformacji poliserynowych; od najgrubszej do najcieńszej linii kolejne warstwy solwacyjne

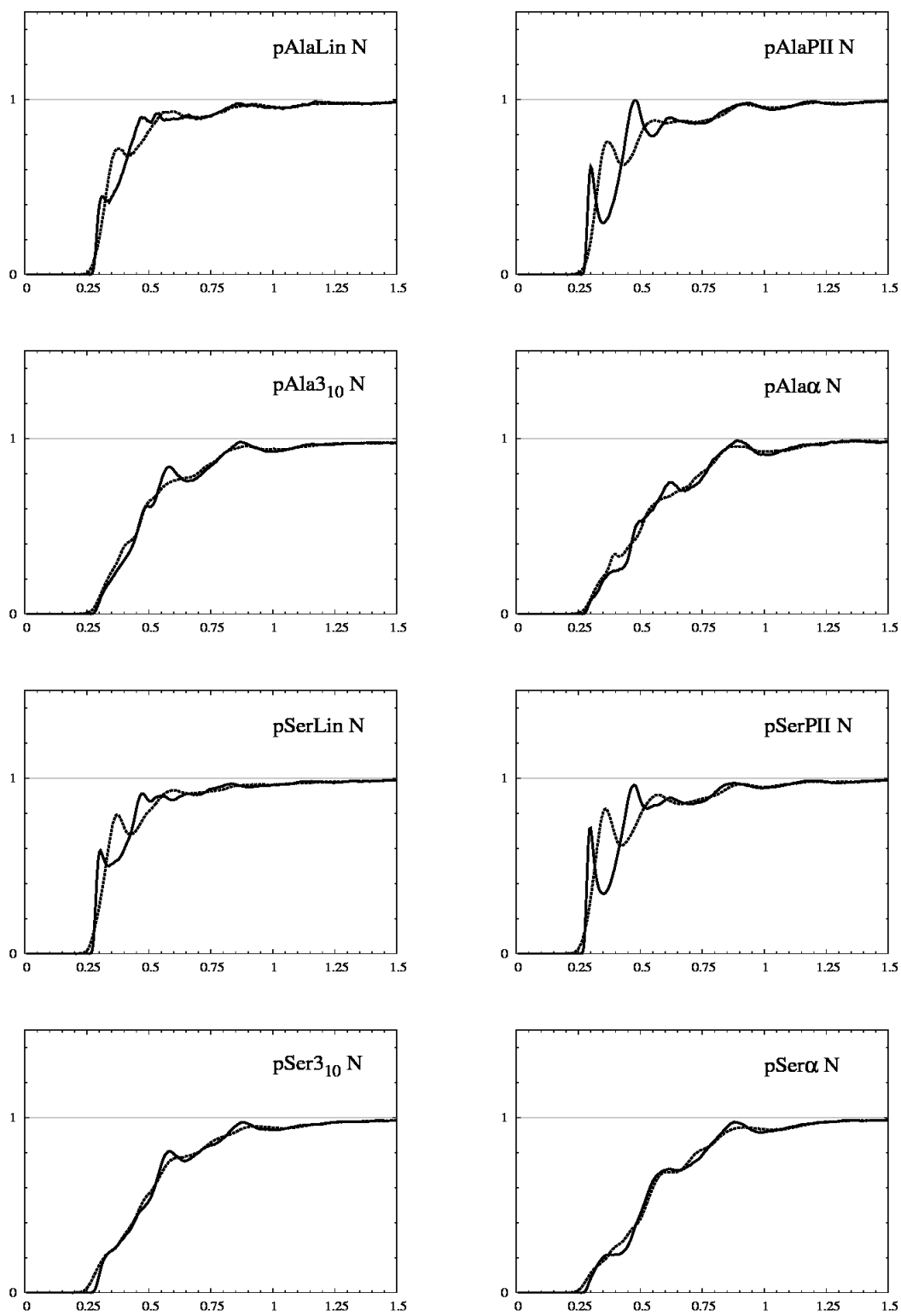
## Do Rozdz. 5.1.3



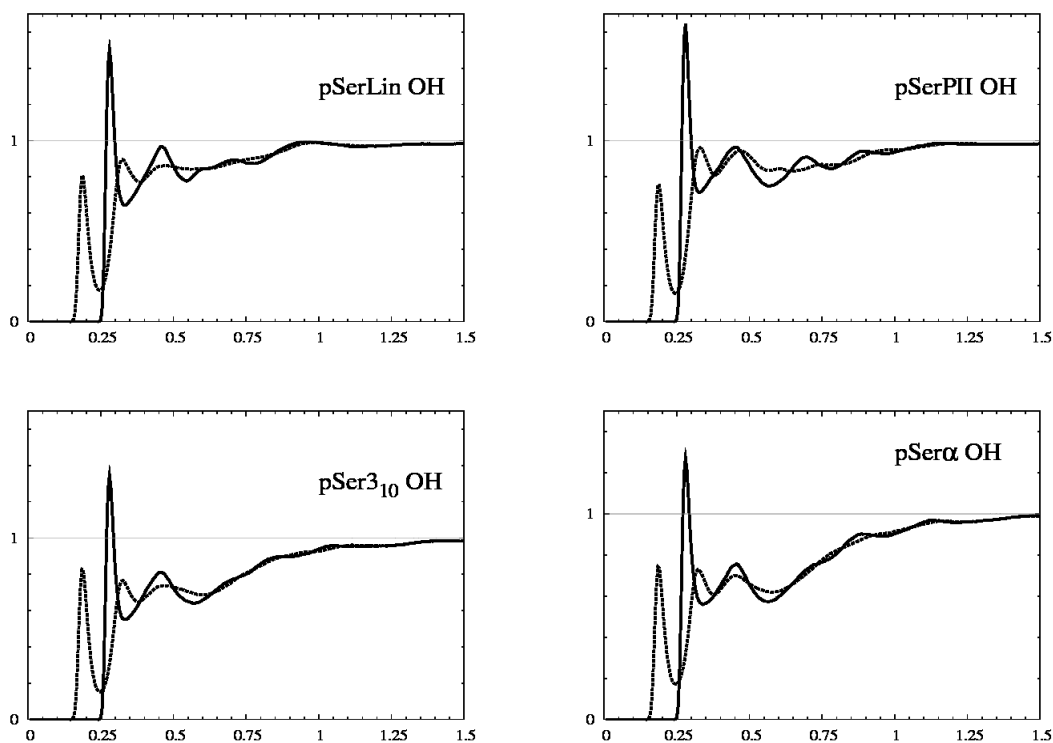
**Rys. 5.1.3.S1.** Funkcja rozkładu radialnego atomów tlenu (linia przerywana) i wodoru (linia ciągła) wokół atomów tlenu karbonyłowego określonych konformacji.



Rys. 5.1.3.S2. Funkcja rozkładu radialnego atomów tlenu (linia przerywana) i wodoru (linia ciągła) wokół atomów wodoru amidowego określonych konformacji.

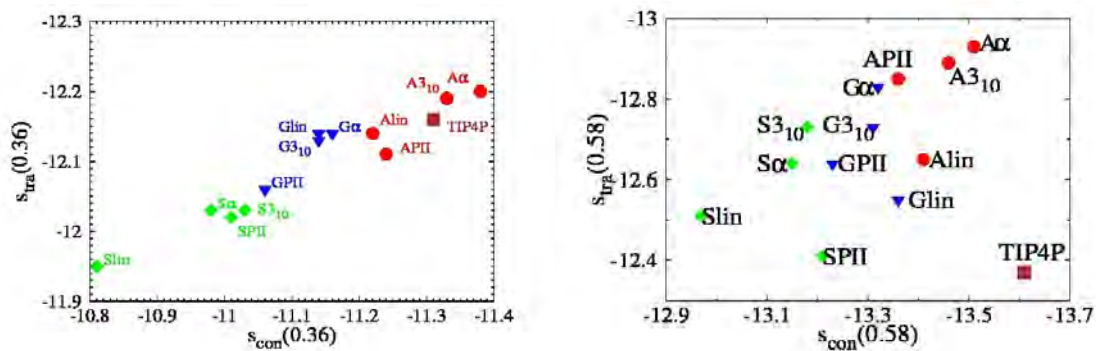


Rys. 5.1.3.S3. Funkcja rozkładu radialnego atomów tlenu (linia przerywana) i wodoru (linia ciągła) wokół atomów azotu amidowego określonych konformacji.

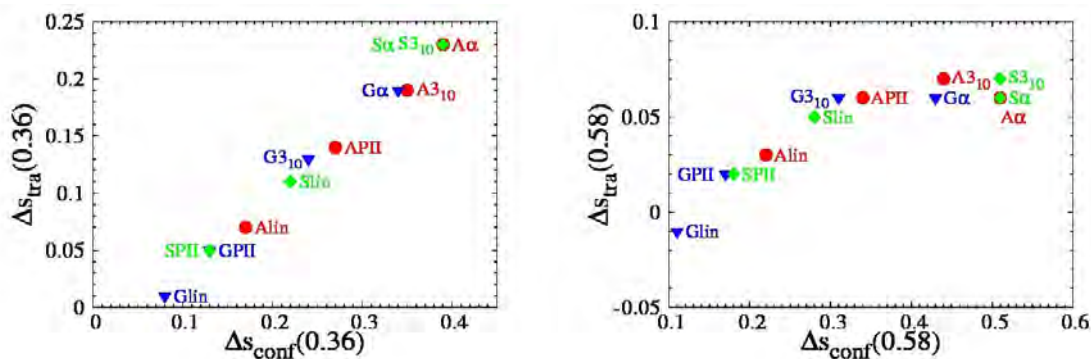


Rys. 5.1.3.S4. Funkcja rozkładu radialnego atomów tlenu (linia przerywana) i wodoru (linia ciągła) wokół atomów tlenu hydroksylowego określonych konformacji poliseryny.

## Do Rozdz. 5.1.6.

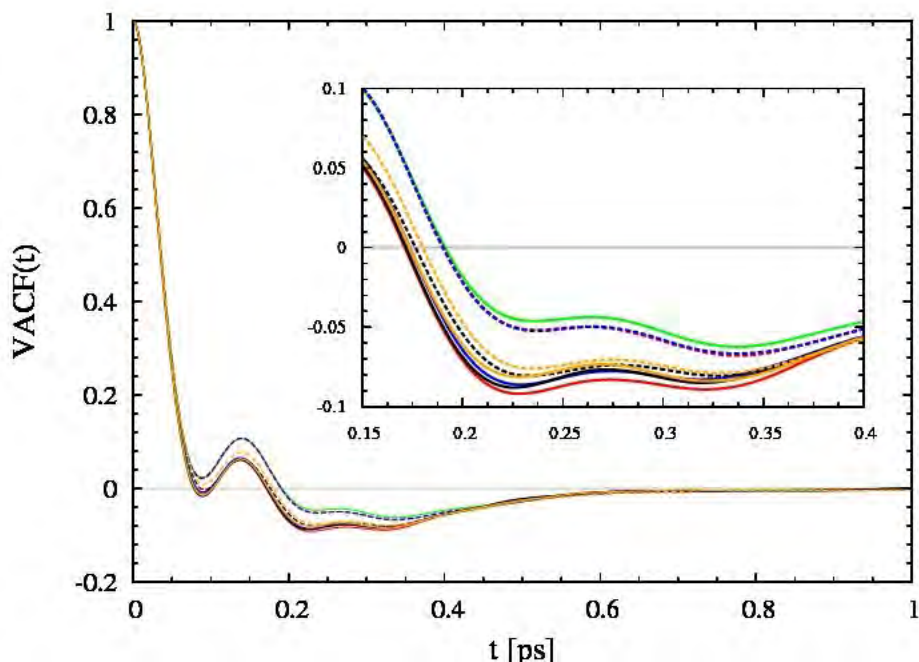


Rys. 5.1.6.S1. Wykresy relacji:  $s_{tra}(0,36 \text{ nm})=f(s_{con}(0,36 \text{ nm}))$  i  $s_{tra}(0,58 \text{ nm})=f(s_{con}(0,58 \text{ nm}))$ . Romby reprezentują poliserynę, koła polialaninę, trójkąty poliglicynę, zaś kwadrat symbolizuje uporządkowanie czystej wody TIP4P. UWAGA!!! Ośie odciętych i rzędnych są w innej skali.

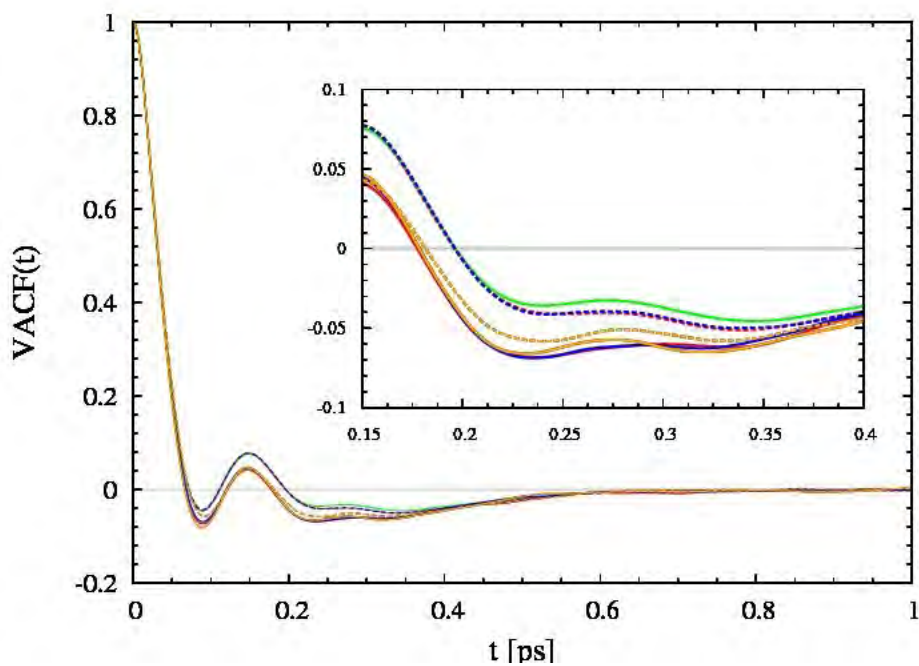


**Rys. 5.1.6.S2.** Wykresy relacji:  $\Delta s_{tra}(0,36 \text{ nm})=f(s_{conf}(0,36 \text{ nm}))$  i  $\Delta s_{tra}(0,58 \text{ nm})=f(\Delta s_{conf}(0,58 \text{ nm}))$ . Romby reprezentują poliserynę, koła polialaninę, trójkąty poliglicynę. **Wartości parametrów wzrastają wraz ze spadkiem uporządkowania wody. UWAGA!!! Osie odciętych i rzędnych są w innej skali.**

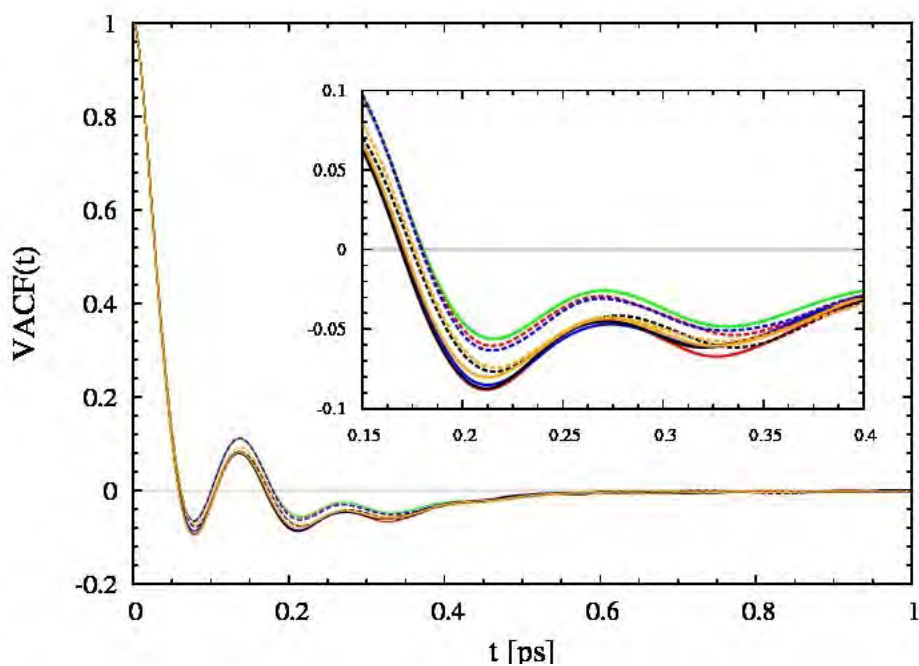
## Do Rozdz. 5.2.



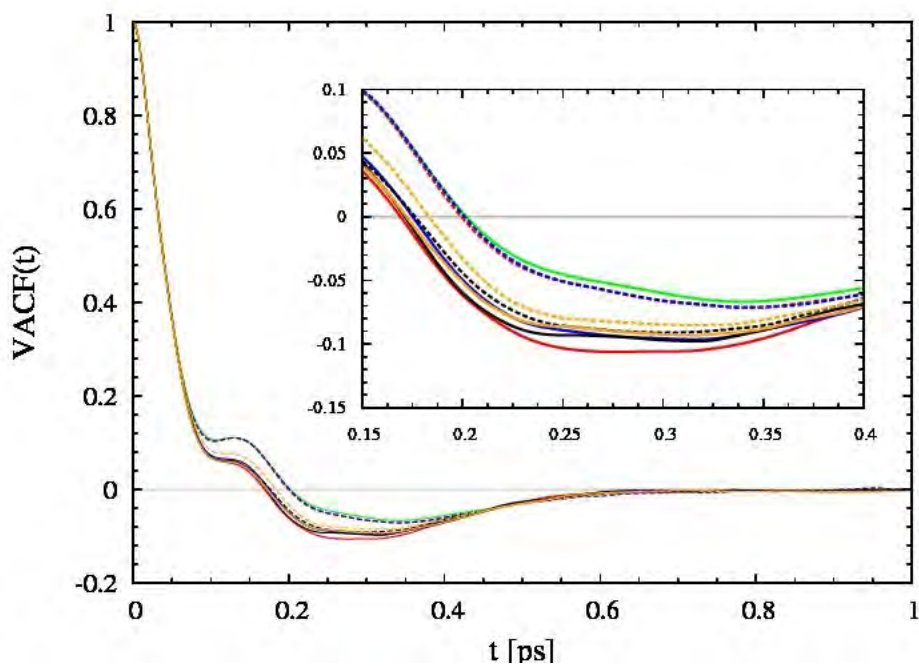
**Rys. 5.2.S1.** Znormalizowana funkcja autokorelacji prędkości translacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej dla różnych konformacji polialaniny; kolor czarny – konformacja liniowa; kolor pomarańczowy – konformacja PII; kolor niebieski – konformacja  $3_{10}$ ; kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa. Linia ciągłą zaznaczono przebieg dla form „natywnych”; linią przerywaną dla form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi. Kolorem zielonym oznaczono rozkład dla czystej wody.



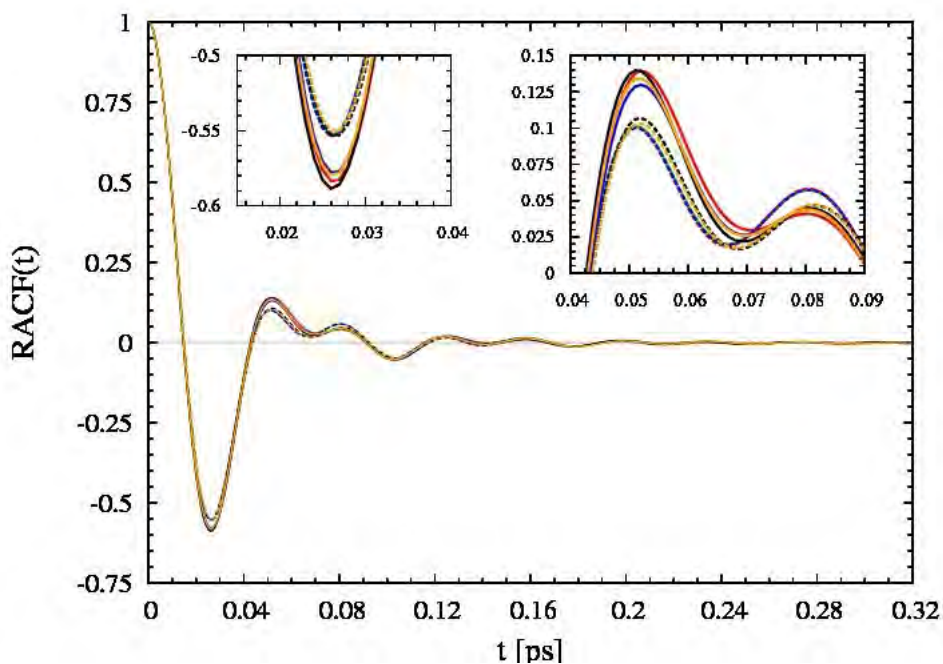
**Rys. 5.2.S2.** Znormalizowana funkcja autokorelacji składowej prędkości translacyjnej wzdłuż osi x wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwacyjnej dla różnych konformacji polianiliny. Oznaczenia linii j.w.



**Rys. 5.2.S3.** Znormalizowana funkcja autokorelacji składowej prędkości translacyjnej wzdłuż osi y wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwacyjnej dla różnych konformacji polianiliny. Oznaczenia linii j.w.

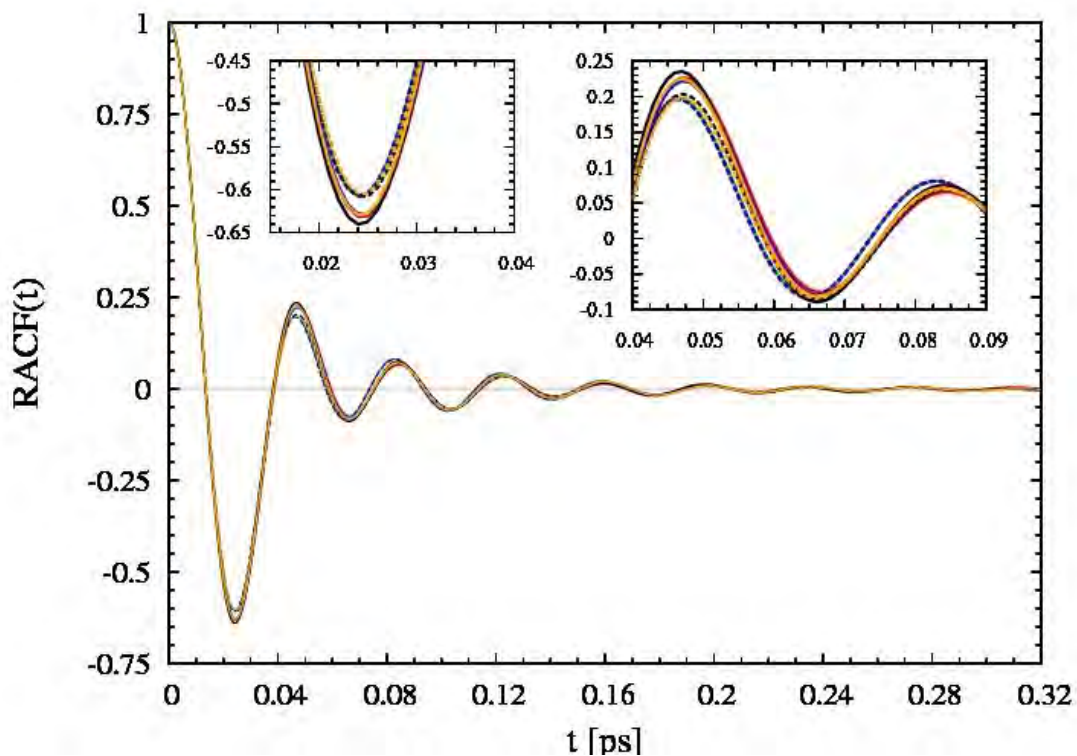


**Rys. 5.2.S4.** Znormalizowana funkcja autokorelacji składowej prędkości translacyjnej wzdłuż osi z wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwacyjnej dla różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia linii j.w.

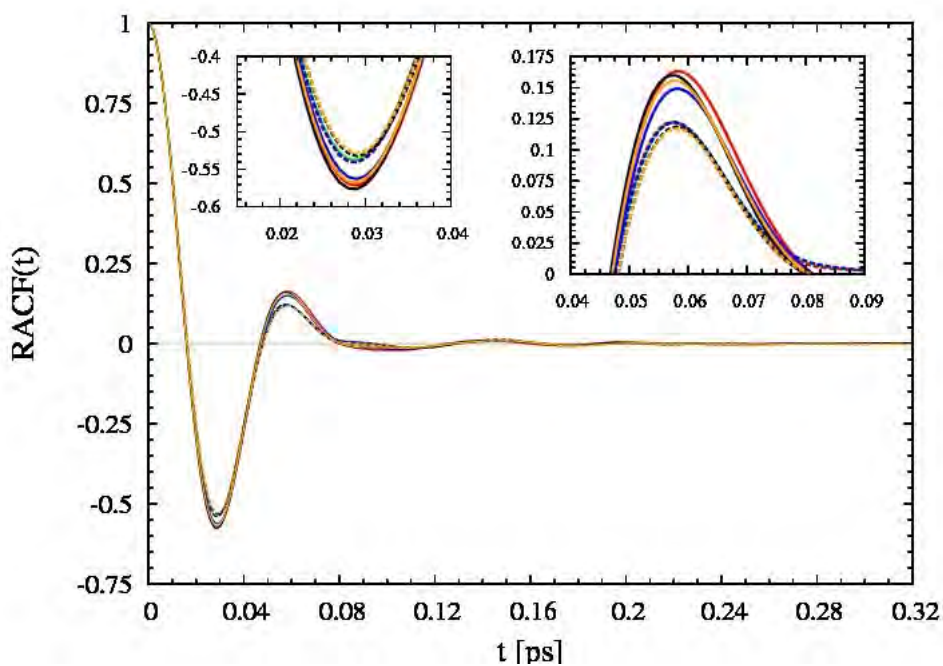


**Rys. 5.2.S5.** Znormalizowana funkcja autokorelacji prędkości rotacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwacyjnej dla różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia linii j.w.

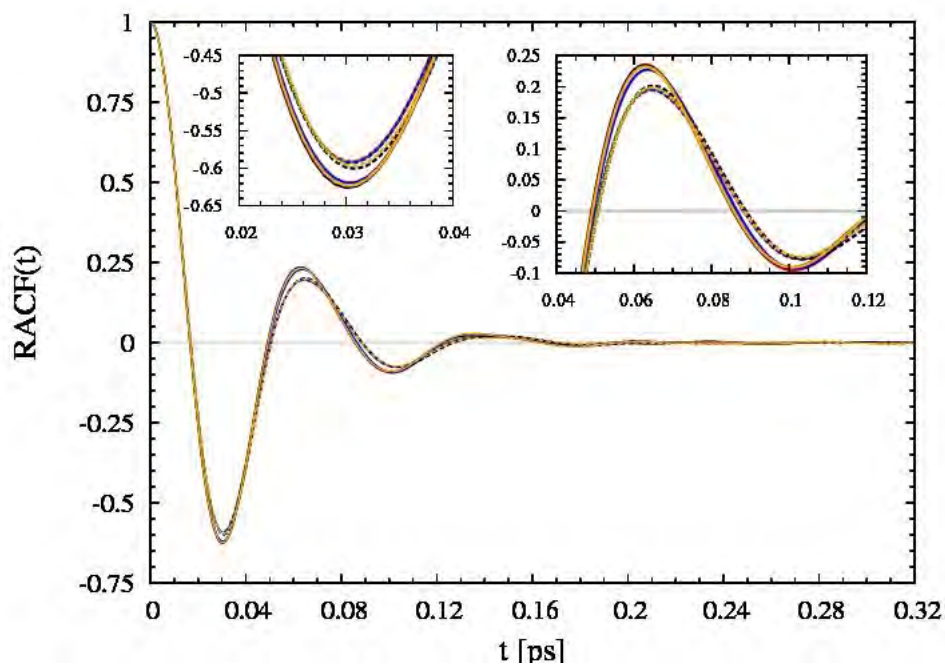




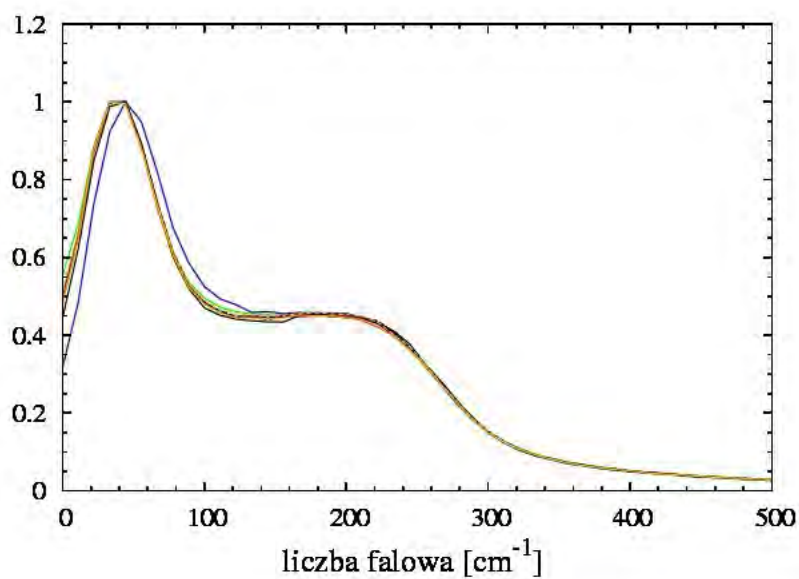
**Rys. 5.2.S6.** Znormalizowana funkcja autokorelacji składowej prędkości rotacyjnej wzdłuż osi x wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej dla różnych konformacji polianiliny. Oznaczenia linii j.w.



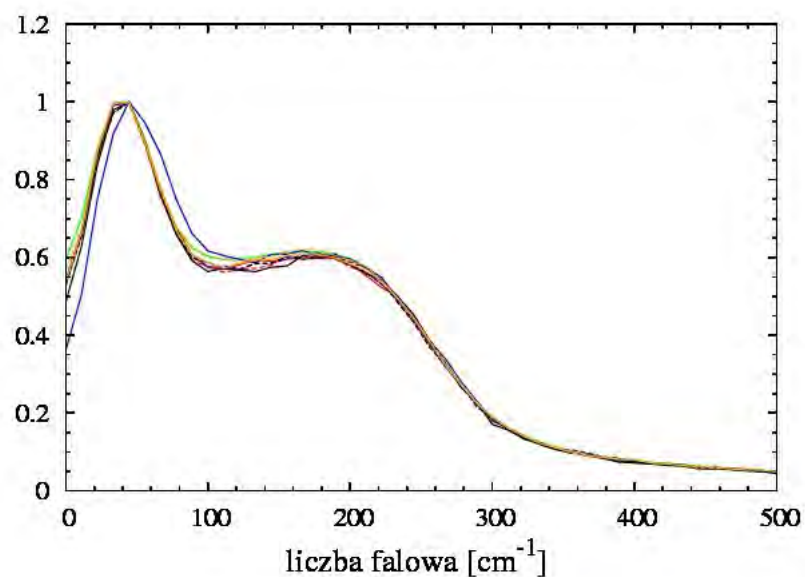
**Rys. 5.2.S7.** Znormalizowana funkcja autokorelacji składowej prędkości rotacyjnej wzdłuż osi y wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej dla różnych konformacji polianiliny. Oznaczenia linii j.w.



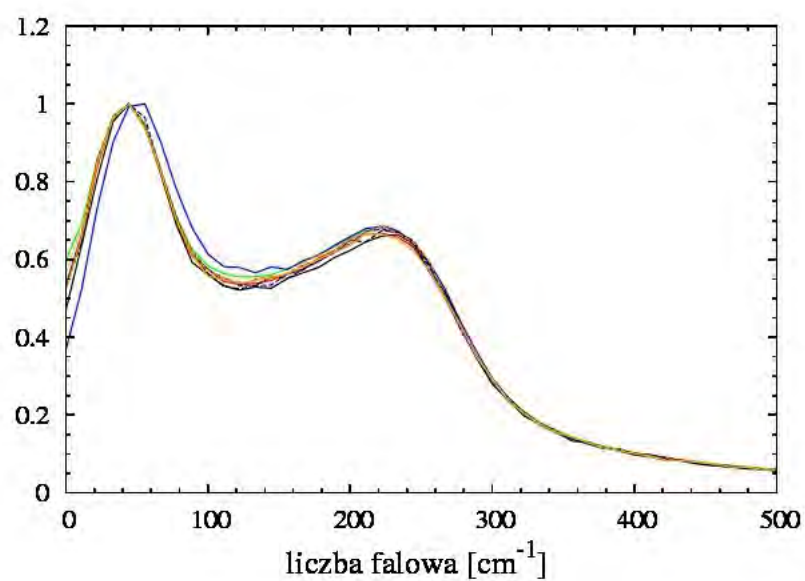
**Rys. 5.2.S8.** Znormalizowana funkcja autokorelacji składowej prędkości rotacyjnej wzdłuż osi z wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej dla różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia linii j.w.



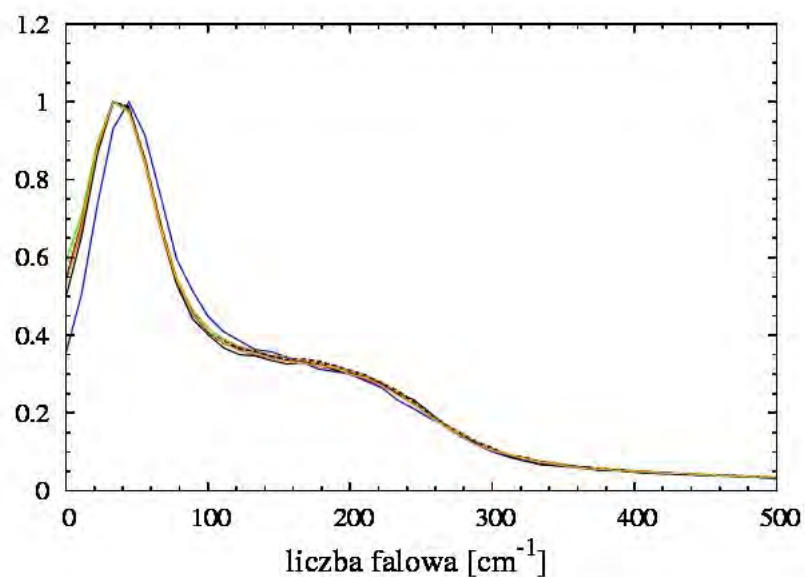
**Rys. 5.2.S9.** Transformata Fouriera prędkości translacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.



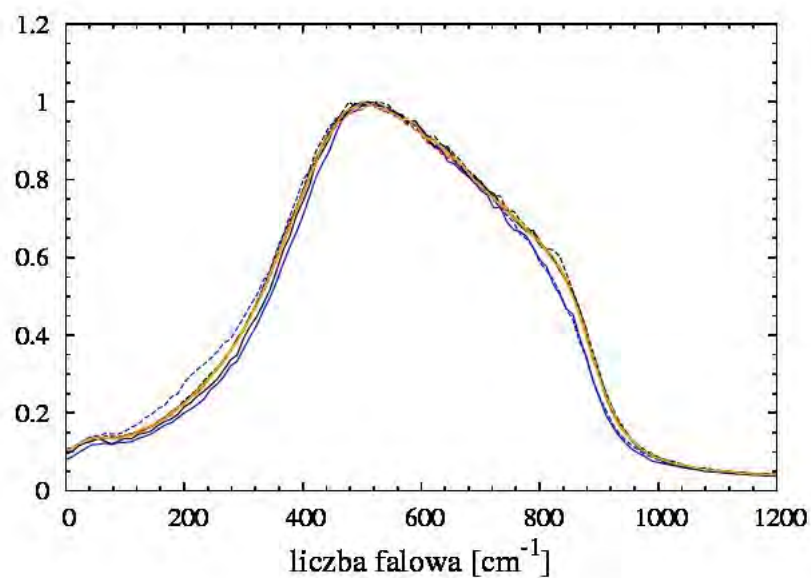
**Rys. 5.2.S10.** Transformata Fouriera prędkości translacyjnej wzdłuż osi x wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.



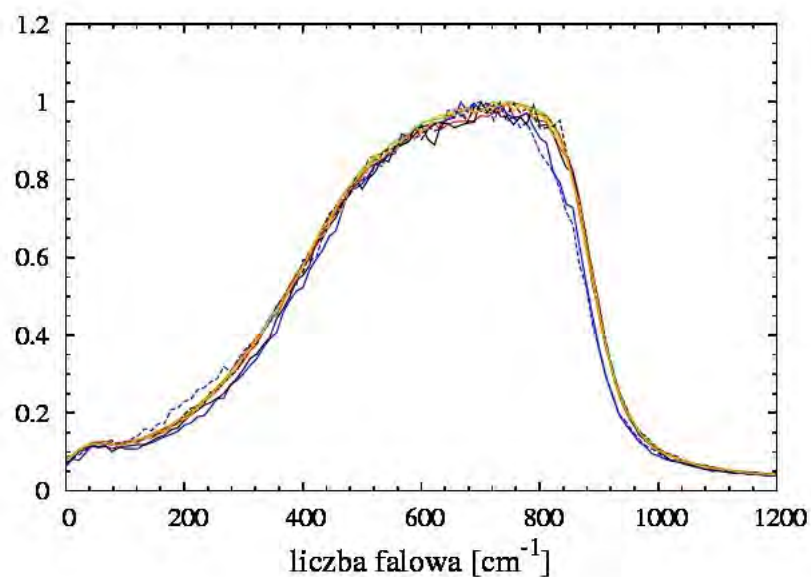
**Rys. 5.2.S11.** Transformata Fouriera prędkości translacyjnej wzdłuż osi y wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.



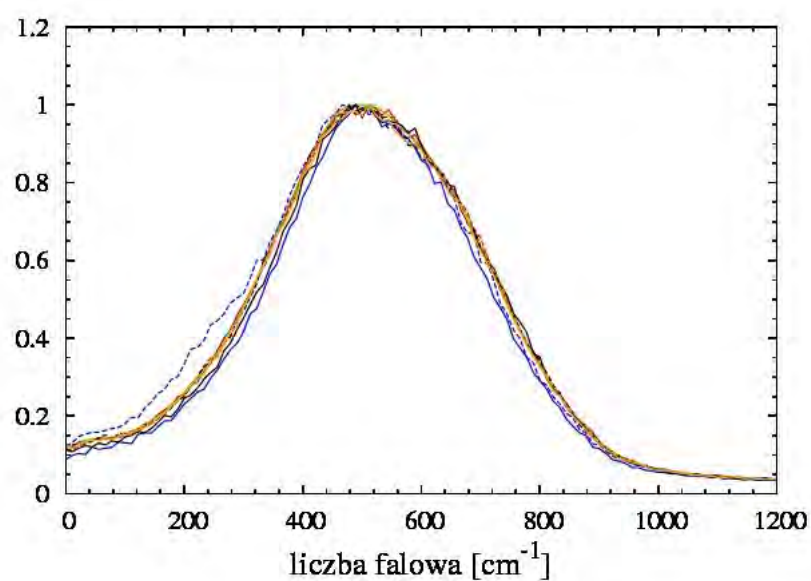
**Rys. 5.2.S12.** Transformata Fouriera prędkości translacyjnej wzdłuż osi z wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.



**Rys. 5.2.S13.** Transformata Fouriera prędkości rotacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.

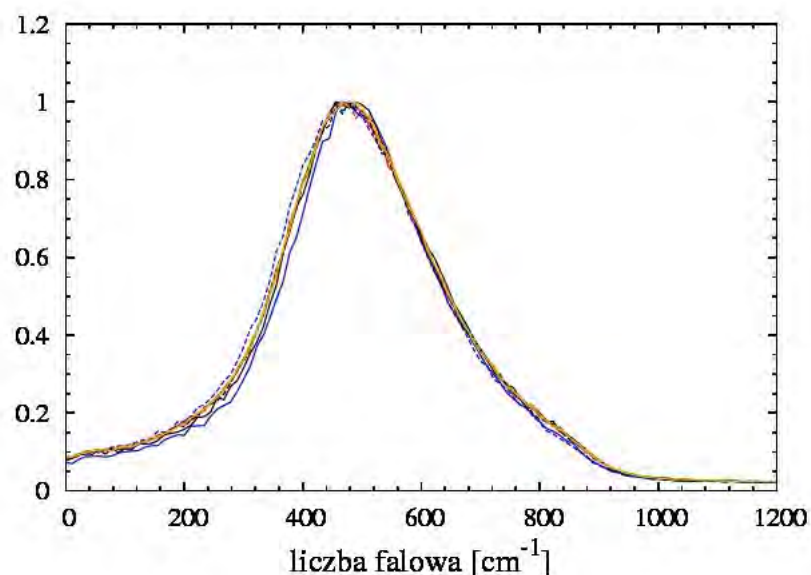


**Rys. 5.2.S14.** Transformata Fouriera prędkości rotacyjnej względem osi x wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.

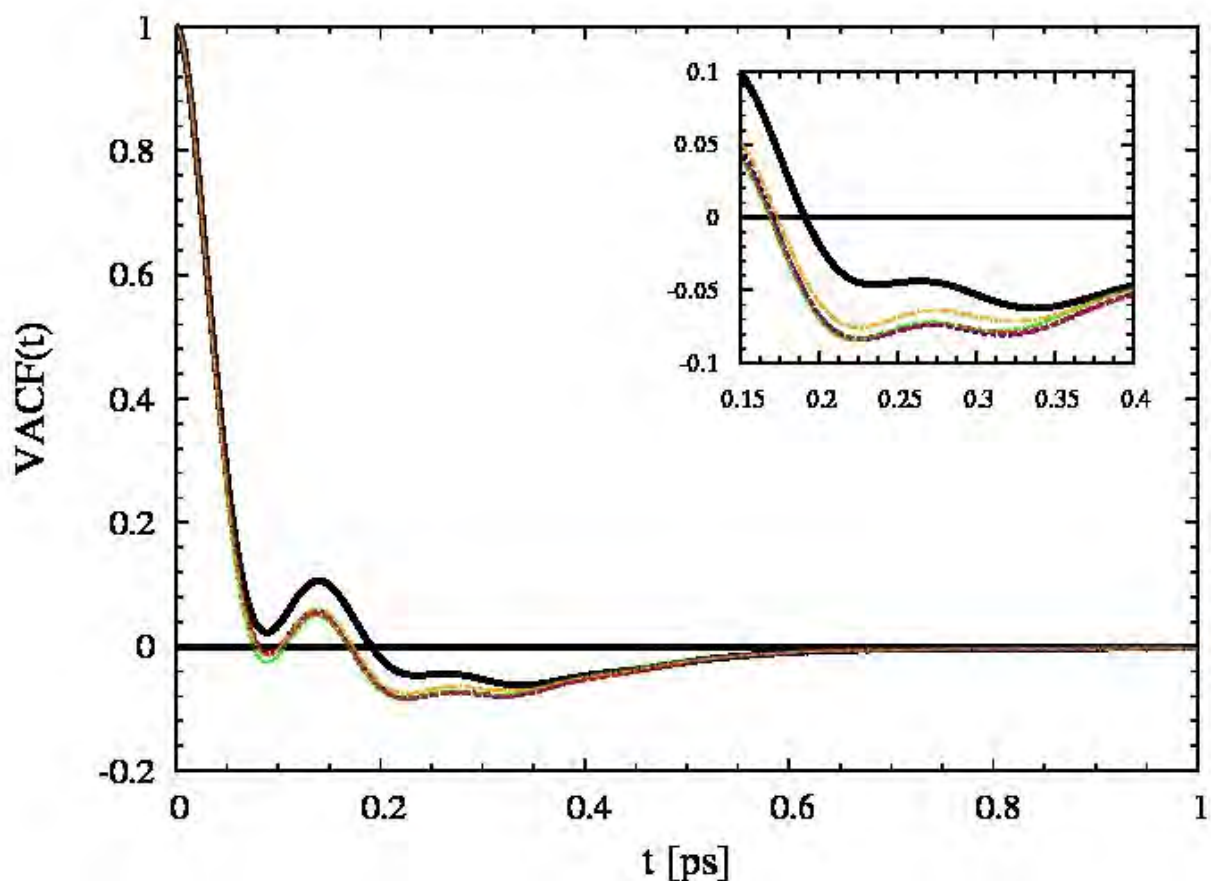


**Rys. 5.2.S15.** Transformata Fouriera prędkości rotacyjnej względem osi y wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.

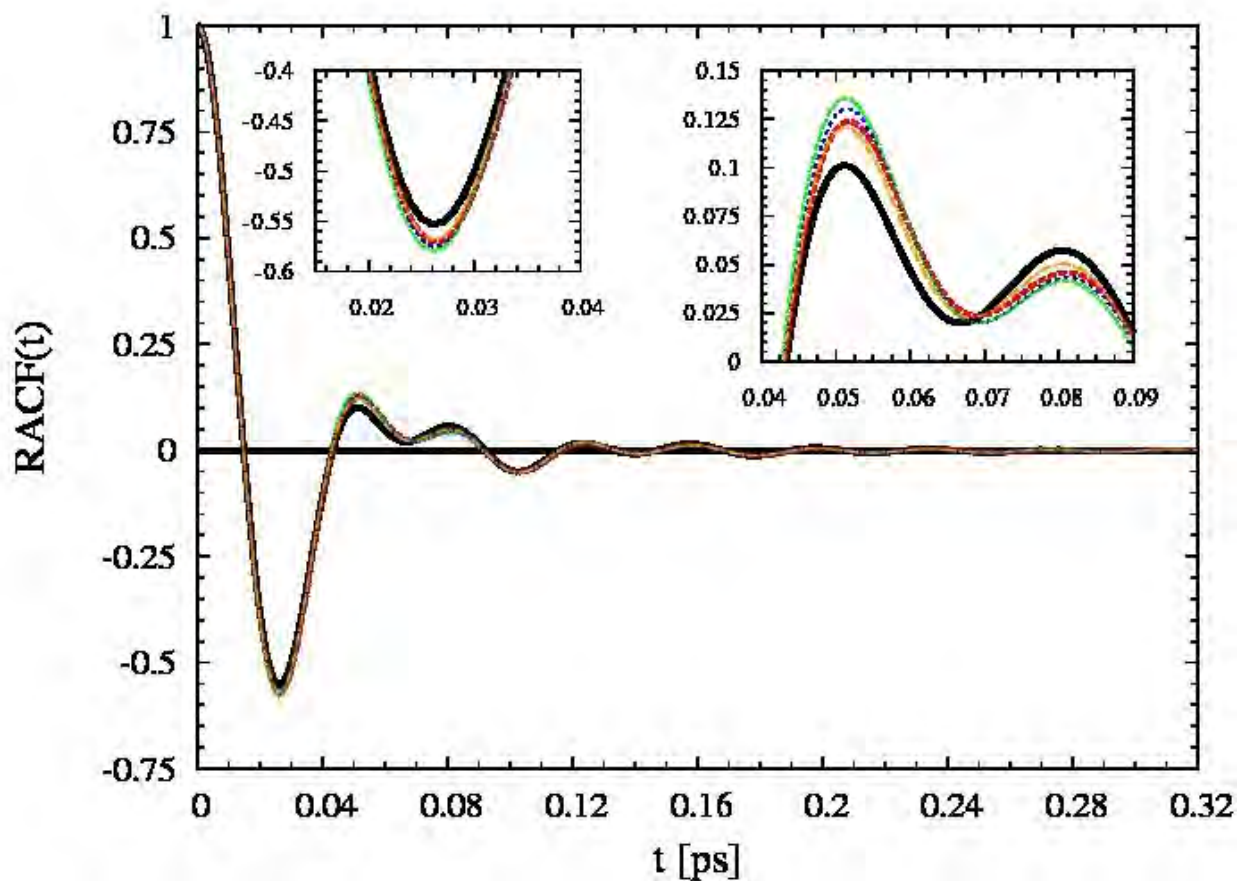




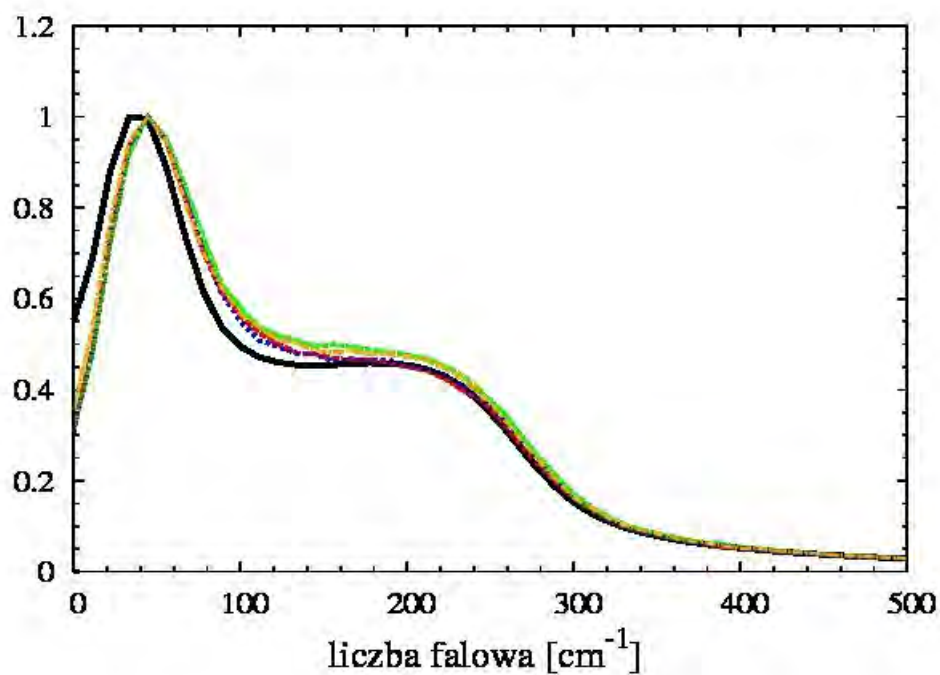
**Rys. 5.2.S16.** Transformata Fouriera prędkości rotacyjnej względem osi z wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej różnych konformacji polialaniny. Oznaczenia j.w.



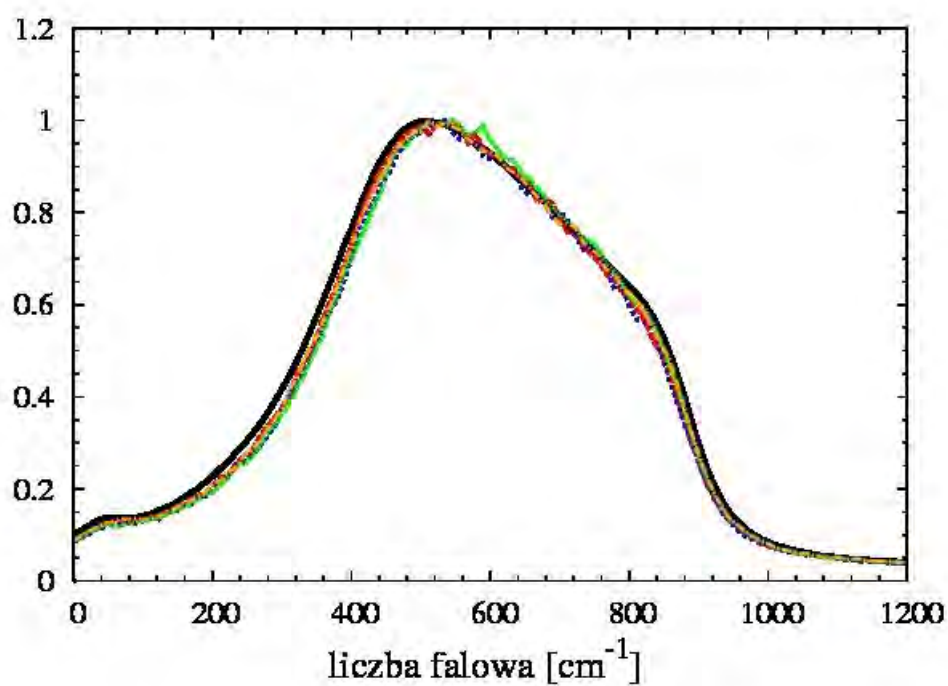
**Rys. 5.2.S17.** Znormalizowana funkcja autokorelacji prędkości translacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej wokół różnych konformacji poliseryny; kolor pomarańczowy – konformacja liniowa; kolor zielony – konformacja PII; kolor niebieski – konformacja 3<sub>10</sub>; kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa. Linia ciągłą zaznaczono przebieg dla form „natywnej”; linią przerywaną dla form z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi. Kolorem czarnym oznaczono przebieg dla czystej wody.



**Rys. 5.2.S18.** Znormalizowana funkcja autokorelacji prędkości rotacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej wokół różnych konformacji poliseryny; kolor pomarańczowy – konformacja liniowa; kolor zielony – konformacja PII; kolor niebieski – konformacja  $3_{10}$ ; kolor czerwony –  $\alpha$ -helisa. Linią ciągłą zaznaczono przebieg dla form „natywnych”; linią przerywaną dla form z wyzerowanymi ładunkami czastkowymi. Kolorem czarnym oznaczono przebieg dla czystej wody.



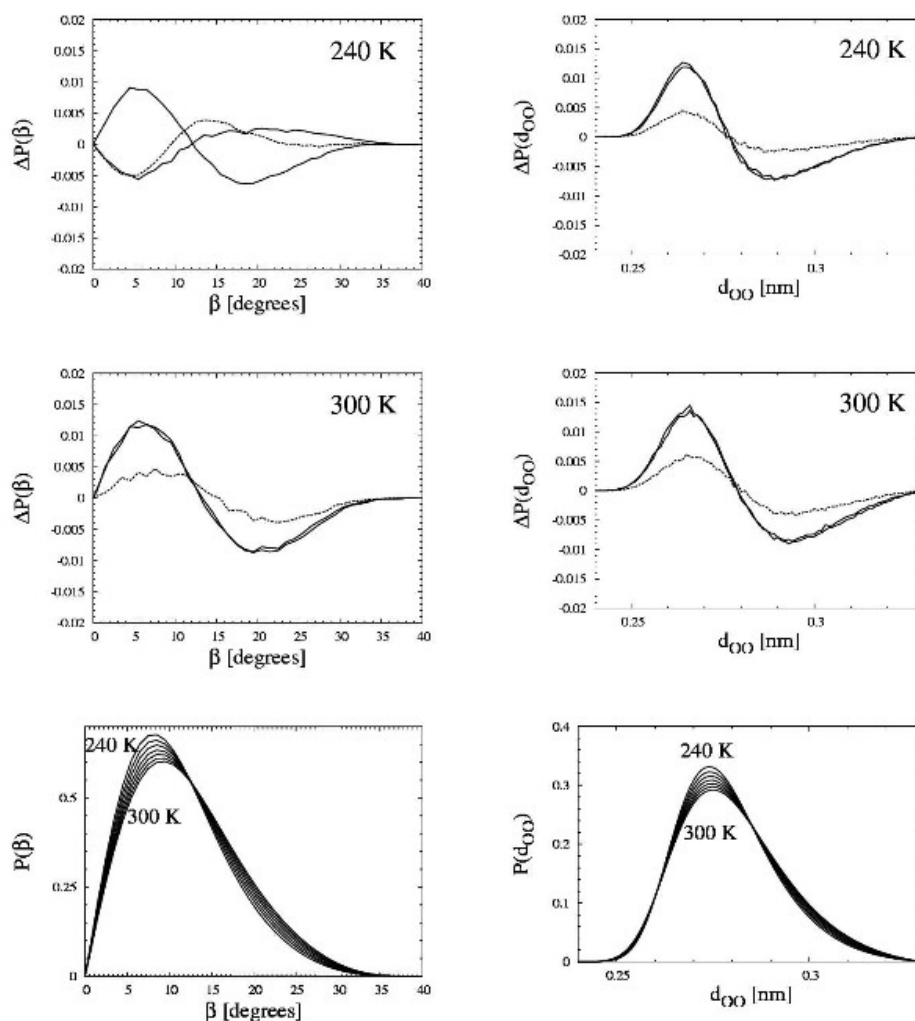
**Rys. 5.2.S19.** Transformata Fouriera prędkości translacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej wokół różnych konformacji poliseryny. Oznaczenia linii j.w.



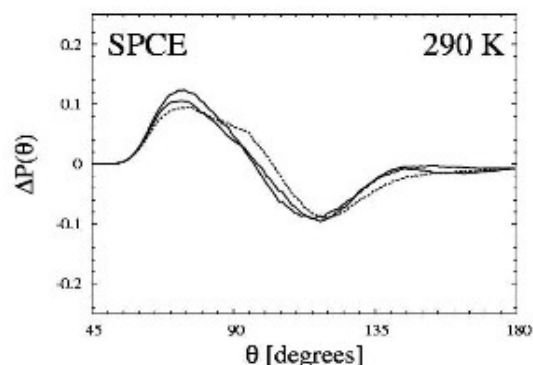
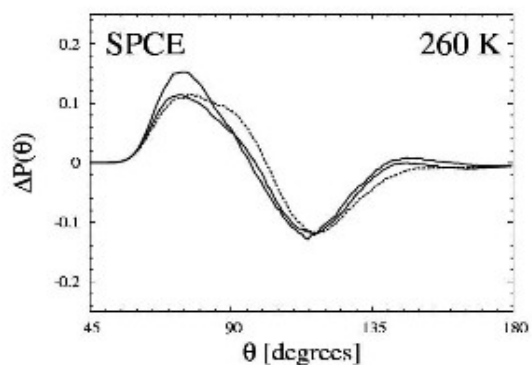
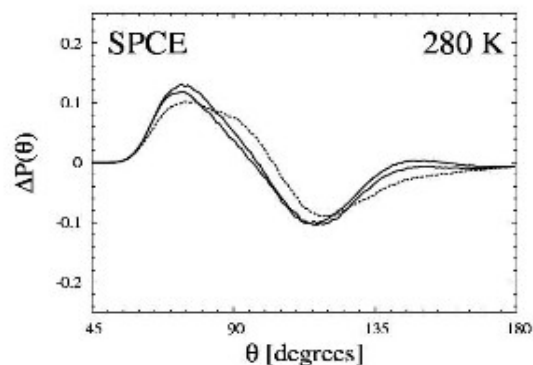
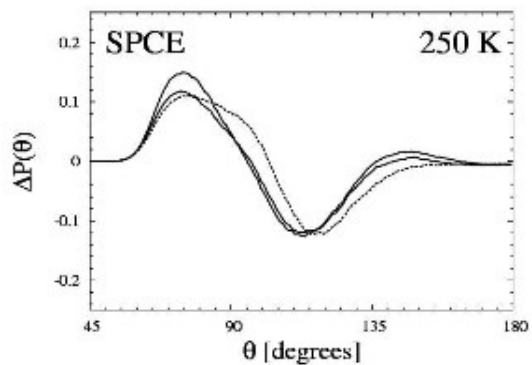
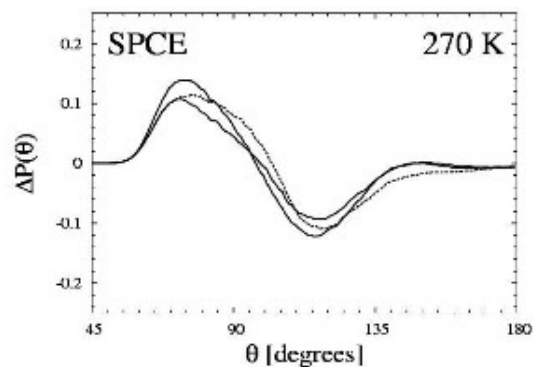
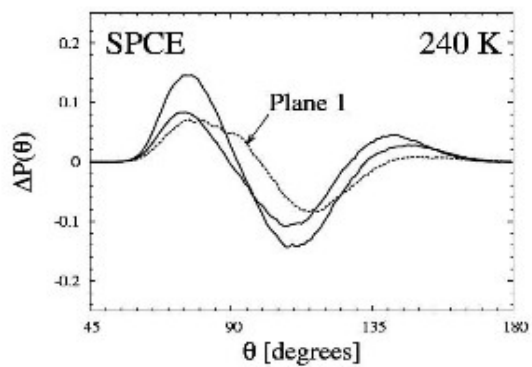
**Rys. 5.2.S20.** Transformata Fouriera prędkości rotacyjnej cząsteczek wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej wokół różnych konformacji poliseryny. Oznaczenia linii j.w.

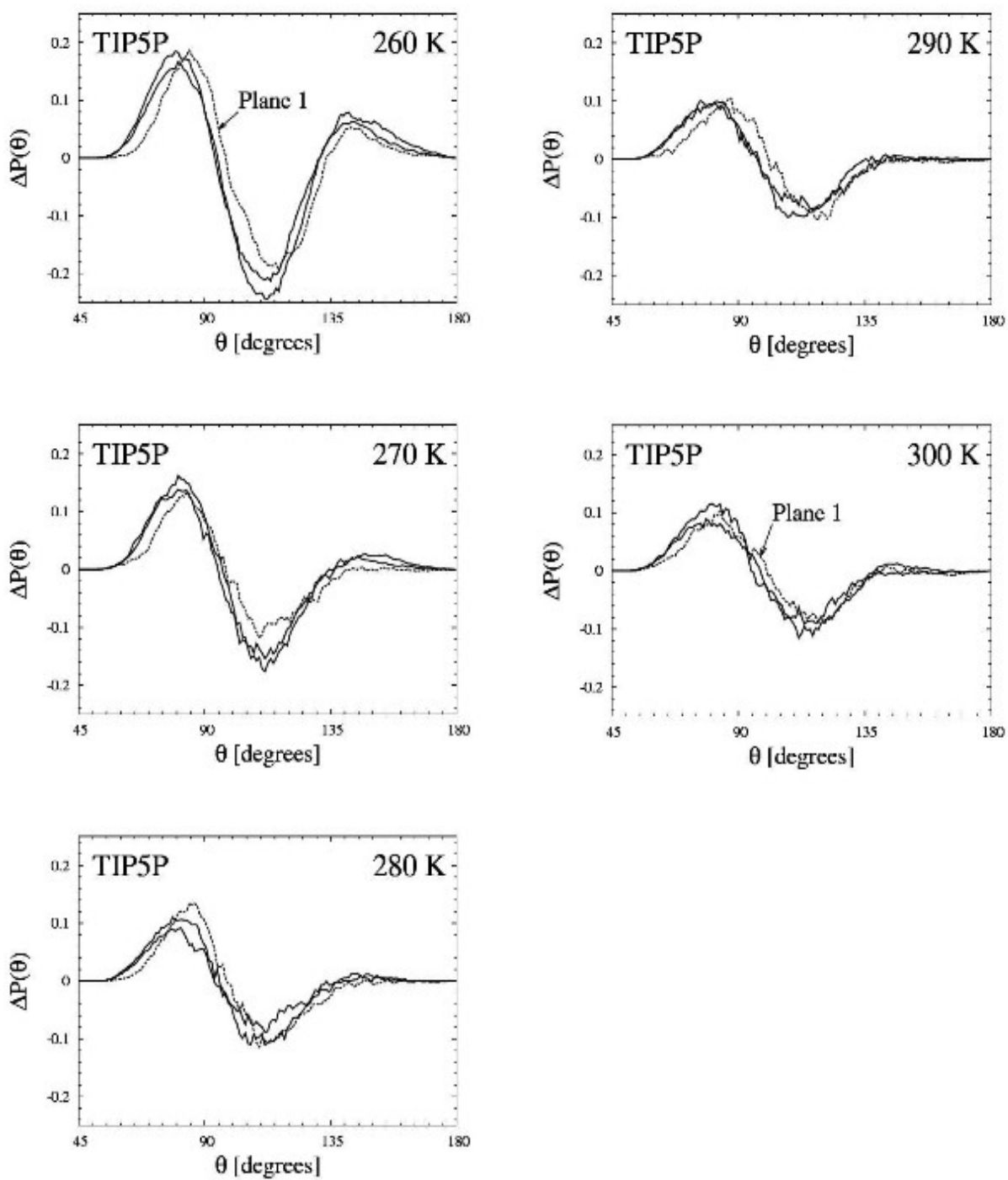


## Do Rozdz. 5.3

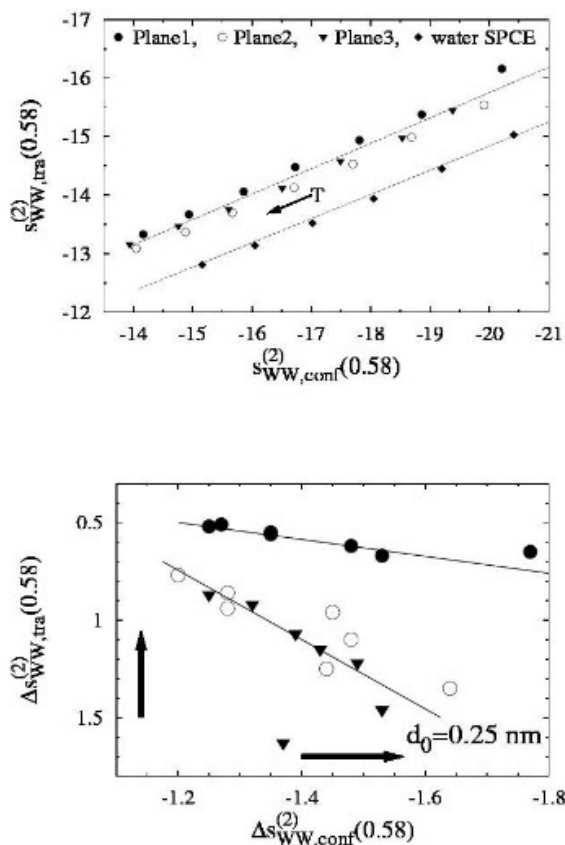


**Rys. 5.3.S1.** Różnice ( $\Delta P = P_{\text{solv}} - P_{\text{bulk}}$ ) w rozkładach prawdopodobieństwa pomiędzy pierwszą otoczką solwacyjną i czystą wodą dla dwóch badanych wielkości, określone dla dwóch temperatur: 240 K i 300 K. Dwie kolumny reprezentują różnice dla: kąta wiązania wodorowego,  $\beta_{\text{OOH}}$  (z lewej), i odległości tlen-tlen,  $R_{\text{OO}}$  (z prawej). Linia przerywana prezentuje wyniki dla płaszczyzny I. Ostatni rząd pokazuje zależność temperaturową rozkładów prawdopodobieństwa dla kąta  $\beta_{\text{OOH}}$ , i dla odległości tlen-tlen,  $R_{\text{OO}}$  dla czystej wody. Wszystkie wyniki zostały uzyskane z wykorzystaniem modelu SPC/E.



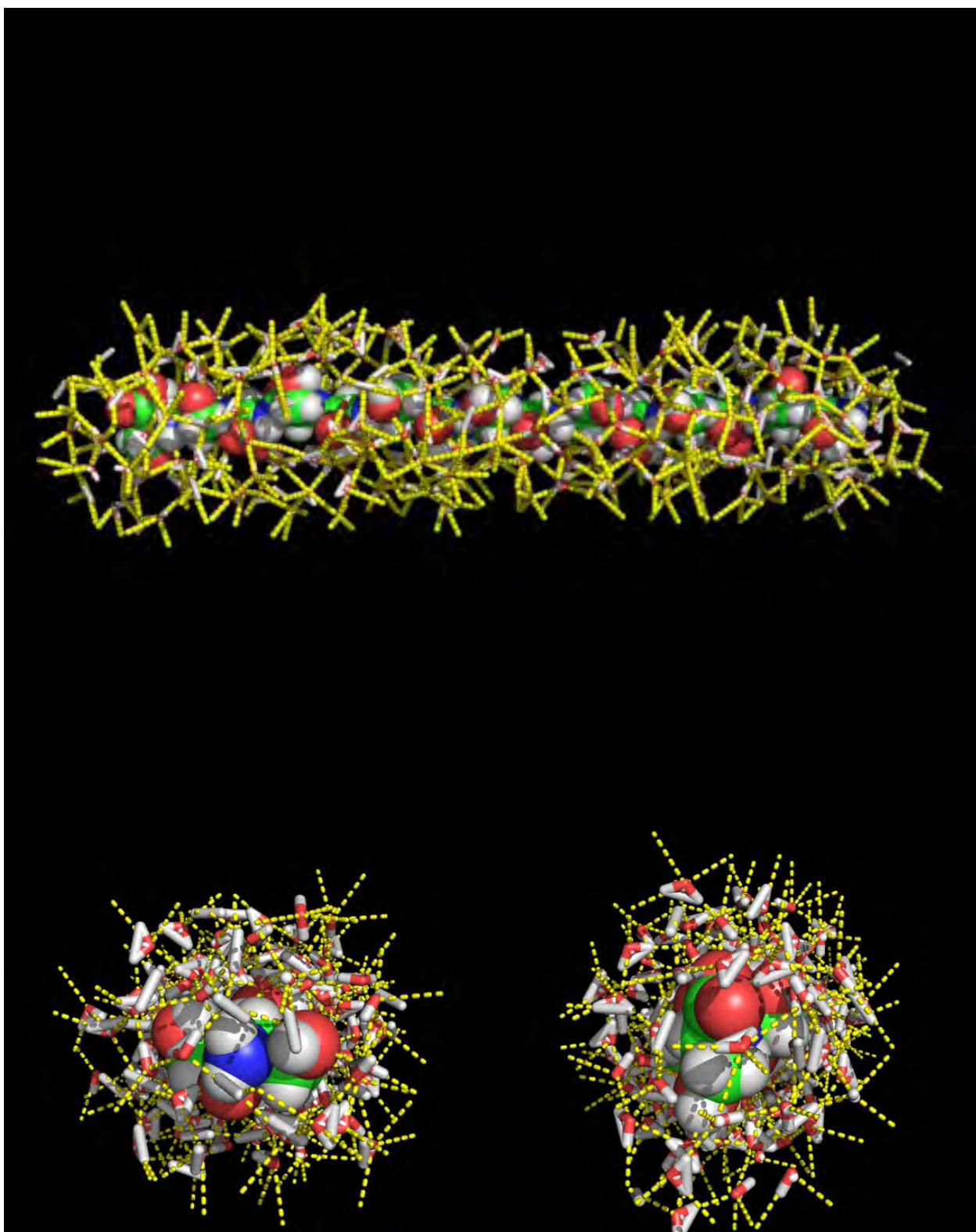


**Rys. 5.3.S2.** Różnice ( $\Delta P = P_{\text{solv}} - P_{\text{bulk}}$ ) w rozkładach prawdopodobieństwa pomiędzy pierwszą warstwą solwacyjną a czystą wodą, opisujących zmiany w geometrii sieci wiązań wodorowych w porównaniu z właściwościami czystej wody. Linia przerywana obrazuje wyniki dla Płaszczyzny 1. Pokazano wyniki dla dwóch modeli wody (SPC/E i TIP5P) i dla różnych temperatur.

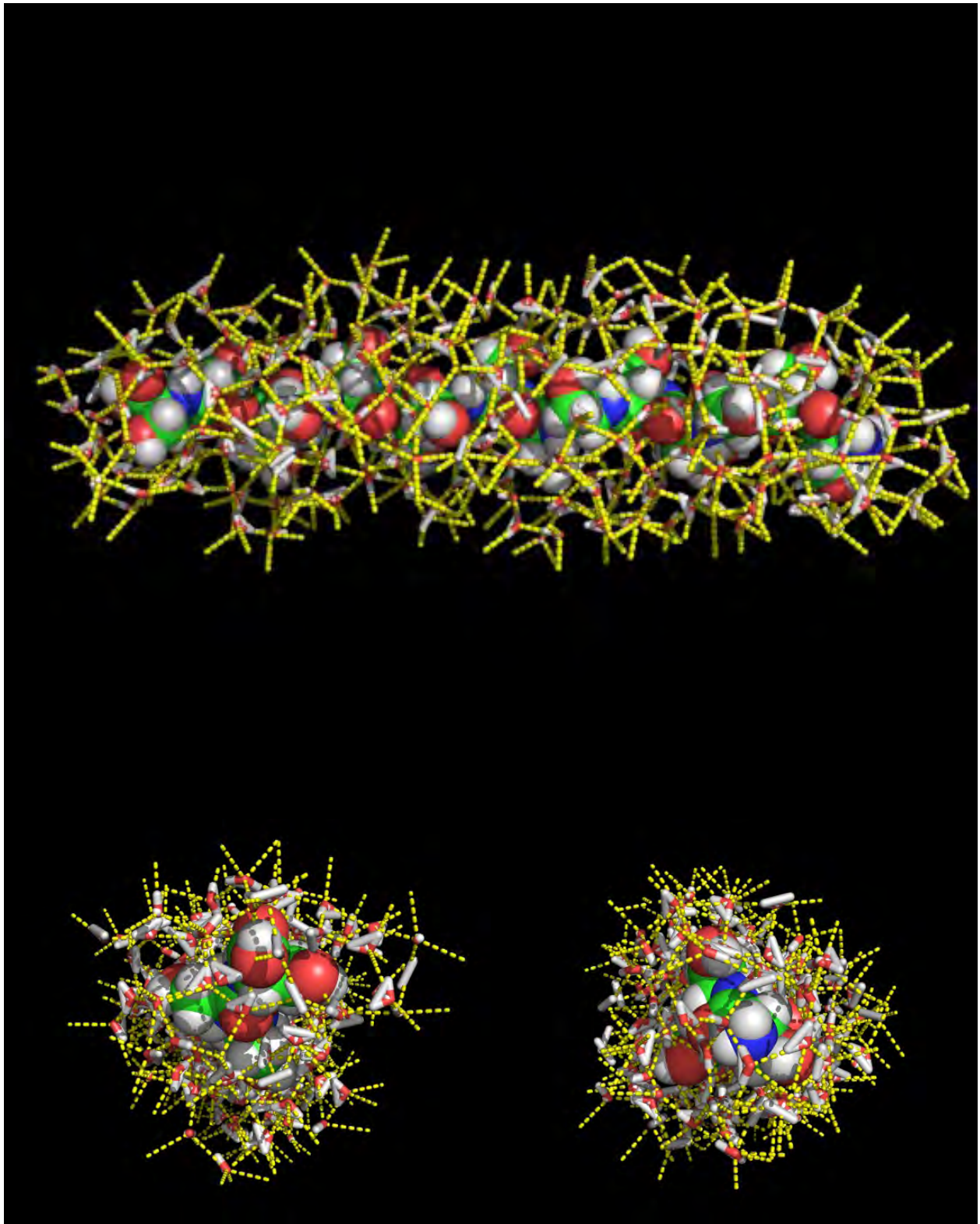


Rys. 5.3.S3. Diagram uporządkowania narysowany z użyciem wielkości  $\Delta s_{WW,tra}^{(2)}$  oraz  $\Delta s_{WW,conf}^{(2)}$  (zamiast  $\Delta s_{WW,tra}^{(2)}$  i  $\Delta s_{WW,conf}^{(2)}$ ) określone dla wody solwatacyjnej wokół trzech płaszczyzn cząsteczki sbwAFP, i przy użyciu odległości  $d_0=0,25$  nm. Ten rysunek pokazuje wyniki dla modelu wody SPC/E. Strzałka na górnym rysunku wskazuje kierunek wzrastającej temperatury, podczas gdy strzałka na dolnym rysunku wskazuje kierunek wzrastającego uporządkowania w porównaniu z własnościami czystej wody. Linie proste zostały wykreślone wyłącznie dla przejrzystości.

Do Rozdz. 5.4.

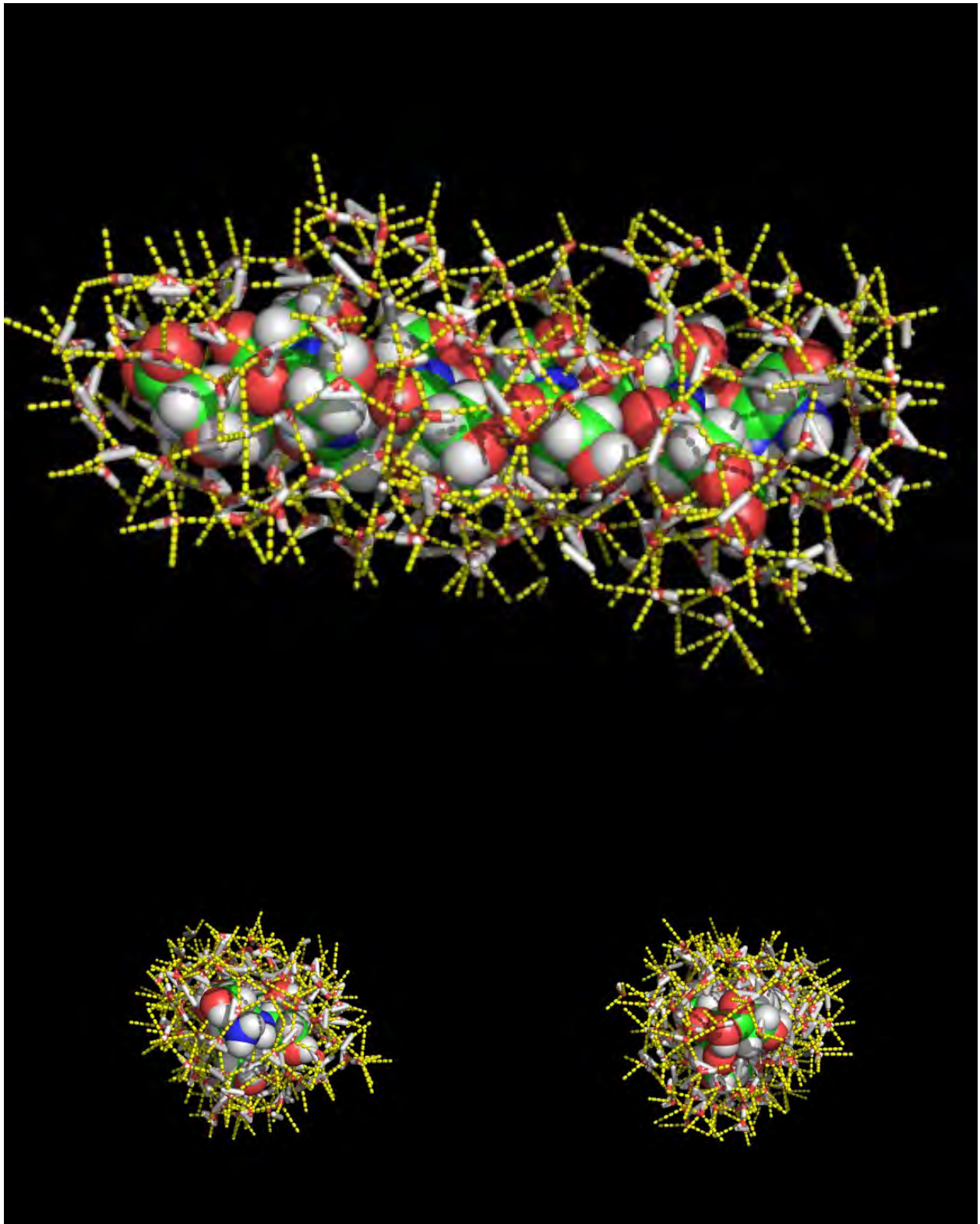


Rys. 5.4.S1. Fragment sieci wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody wokół konformacji liniowej poliseryny



Rys. 5.4.S2. Fragment sieci wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody wokół poliserynowej helisy PII





Rys. 5.4.S3. Fragment sieci wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczki wody wokół poliserynowej helisy PII

## 7. Podziękowania

1. Przede wszystkim chciałbym podziękować promotorowi tej pracy dr hab. inż. Janowi Zielkiewiczowi za poświęcony czas i cierpliwość
2. mgr inż. Annie Kuffel dziękuję za udostępnione rysunki
3. dr S. Prestipino Giaritta z Uniwersytetu w Messynie (Sycylia) dziękuję za uwagi odnośnie metodyki obliczeń
4. Centrum obliczeniowemu TASK w Gdańsku dziękuję za udostępnienie klastru obliczeniowego Galera na którym wykonywałem symulacje dynamiki molekularnej
5. Część obliczeń została wykonana na stacji roboczej zakupionej dzięki otrzymanemu grantowi promotorskiemu (Umowa nr 1182/B/H03/2010/38 do wniosku nr N N204 118238)
6. Sylwii i rodzicom dziękuję za wsparcie



## 8. Literatura

- [1] Chau P.-L., Hardwick A. J., A new order parameter for tetrahedral configurations, *Mol. Phys.*, 1998, 93, No. 3, 511-518
- [2] Kuffel, A.; Zielkiewicz J., Structural and Dynamic Properties of Water within the Solvation Layer around Various Conformations of the Glycine-based Polypeptide, *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 15503.
- [3] Prabhu N., Sharp K., Protein-Solvent Interactions, *Chem. Rev.*, 2006, 106, No. 5, 1616-1623
- [4] Ball Ph., Water as an Active Constituent in Cell Biology, *Chem. Rev.*, 2008, 108, No. 1, 74-108
- [5] Levy, Y.; Onuchic J. N., Water Mediation in Protein Folding and Molecular Recognition, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006, 35, 389-415
- [6] Doruker P., Bahar I., Role of Water on Unfolding Kinetics of Helical Peptides Studied by Molecular Dynamics Simulations, *Biophys. J.*, 1997, 72, 2445-2456
- [7] Pace C. N., Scholtz J. M., A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins, *Biophys J.*, 1998, 75, 422-427
- [8] Leitgeb B., Kerényi Á., Bogár F., Paragi G., Penke B., Rákhely G., Studying the structural properties of polyalanine and polyglutamine peptides, *J. Mol. Model.*, 2007, 13, 1141-1150
- [9] Nguyen H. D., Marchut A. J., Hall C. K., Solvent effects on the conformational transition of a model polyalanine peptide, *Protein Sci.*, 2004, 13, 2909-2924
- [10] Messaed C., Rouleau G. A., Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases, *Neurobiology of Disease*, 2009, 34, 397-405
- [11] de Oliveira O. V., de Moura A. F., Freitas L. C. G., A mechanism for the stabilization of the secondary structure of a peptide by liquid ethylene glycol and its aqueous solutions, *J. Mol. Struct.*, 2007, 808, 93-96
- [12] Czapiewski D., Zielkiewicz J., Structural Properties of Hydration Shell Around Various Conformations of Simple Polypeptides, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 13, 4536-4550
- [13] Chaplin M., Do we underestimate the importance of water in cell biology?, *Nature Rev.*, 2006, 7, 861-866
- [14] Purkiss A., Skoulakis S., Goodfellow J. M., The protein-solvent interface: a big splash, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 2001, 359, 1515-1527
- [15] Finney J. L., Water? What's so special about it?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1145-1165
- [16] Chaplin M., Water Structure and Science, [www.lsbu.ac.uk/water/](http://www.lsbu.ac.uk/water/); ostatnia aktualizacja strony: 26.07.2011
- [17] Kumar R., Schmidt J. R., Skinner J. L., Hydrogen bonding definitions and dynamics in liquid water, *J. Chem. Phys.*, 2007, 126, 204107
- [18] Henchman R. H., Irudayam Sh. J., Topological Hydrogen-Bond Definition to Characterize the Structure and Dynamics of Liquid Water, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 50, 16792-16810
- [19] Franzese G., Bianco V., Iskrov S., Water at interface with proteins, *Food Biophys.*, 2011, 186, 6
- [20] Giuffré E., Pair correlations and entropy of TIP4P water: a numerical simulation study, *Praca doktorska (promotor: L. Torisi, opiekun: P. V. Giaquinta)*
- [21] Xu L., Mallamace F., Yan Zh., Starr F. W., Buldyrev S. V., Stanley H. E., Appearance of a fractional Stokes-Einstein relation in water and a structural interpretation of its onset, *Nature Physics*, 2009, 5, 565-569
- [22] Sharp K. A., Vanderkooi J. M., Water in the Half Shell: Structure of Water, Focusing on Angular Structure and Solvation, *Acc. Chem. Res.*, 2010, 43, No. 2, 231-239
- [23] Smith J. D., Cappa C. D., Wilson K. R., Cohen R. C., Geissler Ph. L., Saykally R. J., Unified description of temperature-dependent hydrogen-bond rearrangements in liquid water, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, No. 40, 14171-14174
- [24] Mallamace F., The liquid water polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, No. 36, 15097-15098
- [25] Banerjee D., Bhat S. N., Bhat S. V., Leporini D., ESR evidence for 2 coexisting liquid phases in deeply supercooled bulk water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, No. 28, 11448-11453
- [26] Mallamace F., Broccio M., Corsaro C., Faraone A., Majolino D., Venuti V., Liu L., Mou Ch.-Y., Chen S.-H., Evidence of the existence of the low-density liquid phase in supercooled, confined water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, 424-428
- [27] Brovchenko I., Oleinikova A., Multiple Phases of Liquid Water, *ChemPhysChem*, 2008, 9, 2660-2675
- [28] Rao F., Garrett-Roe S., Hamm P., Structural Inhomogeneity of Water by Complex Network Analysis, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 47, 15598-15604
- [29] Huang C., Wikfeldt K. T., Tokushima T., Nordlund D., Harada Y., Bergmann U., Niebuhr M., Weiss T. M., Horikawa Y., Leetmaa M., Ljungberg M. P., Takahashi O., Lenz A., Ojamäe L., Lyubartsev A. P., Shin S., Pettersson L. G. M., Nilsson A., The inhomogeneous structure of water at ambient conditions, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, No. 36, 15214-15218
- [30] Wernet Ph., Nordlund D., Bergmann U., Cavalleri M., Odelius M., Ogasawara H., Näslund L. Å., Hirsch T. K., Ojamäe L., Glatzel P., Pettersson L. G. M., Nilsson A., The Structure of the First Coordination Shell in Liquid Water, *Science*, 2004, 304, 995-999

- [31] Smith J. D., Cappa Ch. D., Wilson K. R., Messer B. M., Cohen R. C., Saykally R. J., Energetics of Hydrogen Bond Network Rearrangements in Liquid Water, *Science*, 2004, 306, 851-853
- [32] Head-Gordon T., Johnson M. E., Tetrahedral structure or chains for liquid water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, No. 21, 7973-7977
- [33] Odellius M., Cavalleri M., Nilsson A., Pettersson L. G. M., The X-ray Absorption Spectrum of Liquid Water: Asymmetric Model, 2006, 73, 024205
- [34] Hakala M., Nygård K., Manninen S., Huotari S., Buslaps T., Nilsson A., Pettersson L. G. M., Hämäläinen K., Correlation of hydrogen bond lengths and angles in liquid water based on Compton scattering, *J. Chem. Phys.*, 2006, 125, 084504
- [35] Lilley T. H., So, why is water biologically important?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1321-1322
- [36] Nakasako M., Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1191-1206
- [37] Xu H., Dill K. A., Water's Hydrogen Bonds in the Hydrophobic Effect: A Simple Model, *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, No. 49, 23611-23617
- [38] Huque E. M., The Hydrophobic Effect, *J. Chem. Educ.*, 1989, 66, No. 7, 581-585
- [39] Lazaridis Th., Solvent Size vs Cohesive Energy as the Origin of Hydrophobicity, *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34, No. 12, 931-937
- [40] Southall N. T., Dill K. A., Haymet A. D. J., A View of the Hydrophobic Effect, *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, No. 3, 521-533
- [41] Pratt L. R., Molecular Theory of Hydrophobic Effects: "She is too mean to have her name repeated.", *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2002, 53, 409-436
- [42] Finney J. L., Bowron D. T., Daniel R. M., Timmins P. A., Roberts M. A., Molecular and mesoscale structures in hydrophobically driven aqueous solutions, *Biophys. Chem.*, 2003, 105, 391-409
- [43] Bowron D. T., Structure and interactions in simple solutions, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1167-1180
- [44] Ashbaugh H. S., Pratt L. R., Colloquium: Scaled particle theory and the length scales of hydrophobicity, *Rev. Mod. Phys.*, 2006, 78, No. 1, 159-178
- [45] Willard A. P., Chandler D., Coarse-grained modeling of the interface between water and heterogeneous surfaces, *Faraday Discuss.*, 2009, 141, 209-220
- [46] Kornyshev A., Lilley T. H., Engberts J. B. F. N., Stoneham M., Alexander A. J., Franks F., Halling P., Daniel R. M., Clark D. S., Ball P., Halle B., Purkiss A., Dordick J. S., Ho M. W., Zaccai G., Finney J. L., Tarek M., Nicholls P., Transcript of final discussion session, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1323-1328
- [47] Ben-Amotz D., Underwood R., Unraveling Water's Entropic Mysteries: A Unified View of Nonpolar, Polar and Ionic Hydration, *Acc. Chem. Res.*, 41, No. 8, 957-967
- [48] Chandler D., Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly, *Nature*, 2005, 437, 640-647
- [49] Chandler D., Oil on troubled waters, *Nature*, 2007, 445, 831-832
- [50] Bymaster A., Dominik A., Chapman W. G., Hydration structure and Interfacial Properties of Water near a Hydrophobic Solute from a Fundamental Measure Density Functional Theory, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, No. 43, 15823-15831
- [51] Makowski M., Czaplowski C., Liwo A., Scheraga H. A., Potential of Mean Force of Association of Large Hydrophobic Particles: Toward the Nanoscale Limit, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 2, 993-1003
- [52] Lum K., Chandler D., Weeks J. D., Hydrophobicity at Small and Large Length Scales, *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103, No. 22, 4570-4577
- [53] Choudhury N., Montgomery Pettitt B., On the Mechanism of Hydrophobic Association of Nanoscopic Solutes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, No. 10, 3556-3567
- [54] Choudhury N., Montgomery Pettitt B., The Dewetting Transition and the Hydrophobic Effect, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, No. 15, 4847-4852
- [55] Xu L., Molinero V., Liquid-Vapor Oscillations of Water Nanoconfined between Hydrophobic Disks: Thermodynamics and Kinetics, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 21, 7320-7328
- [56] *Faraday Discuss.*, 2009, 141, 309-346
- [57] Fan Y., Chen X., Yang L., Cremer P. S., Gao Y. Q., On the Structure of Water at the Aqueous/Air Interface, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 34, 11672-11679
- [58] Sendner Ch., Horinek D., Bocquet L., Netz R. R., Interfacial Water at Hydrophobic and Hydrophilic Surfaces: Slip, Viscosity, and Diffusion, *Langmuir*, 2009, 25, No. 18, 10768-10781
- [59] Giovambattista N., Debenedetti P. G., Rossky P. J., Hydration Behavior under Confinement by Nanoscale Surfaces with Patterned Hydrophobicity and Hydrophilicity, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, No. 3, 1323-1332
- [60] Giovambattista N., Rossky P. J., Debenedetti P. G., Effect of temperature on the structure and Phase Behavior of Water Confined by Hydrophobic, Hydrophilic, and Heterogeneous Surfaces, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 42, 13723-13734
- [61] Grigera J. R., McCarthy A. N., The Behavior of the Hydrophobic Effect under Pressure and Protein Denaturation, *Biophys. J.*, 2010, 98, No. 8, 1626-1631

- [62] ten Wolde P. R., Chandler D., Drying-induced hydrophobic polymer collapse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, No. 10, 6539-6543
- [63] Liu P., Huang X., Zhou R., Berne B. J., Observation of a dewetting transition in the collapse of the melittin tetramer, *Nature*, 2005, 437, 159-162
- [64] Hua L., Huang X., Liu P., Zhou R., Berne B. J., Nanoscale Dewetting Transition in Protein Complex Folding, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111, No. 30, 9069-9077
- [65] MacCallum J. L., Moghaddam M. S., Chan H. S., Tieleman D. P., Hydrophobic association of  $\alpha$ -helices, steric dewetting, and enthalpic barriers to protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104, No. 15, 6206-6210
- [66] Raschke T. M., Water structure and interactions with protein surfaces, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2006, 16, 152-159
- [67] Ball Ph., Water as a Biomolecule, *ChemPhysChem*, 2008, 9, 2677-2685
- [68] Rand R. P., Probing the role of water in protein conformation and function, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1277-1285
- [69] Matsuoka D., Nakasako M., Probability Distributions of Hydration Water Molecules around Polar Protein Atoms Obtained by a Database Analysis. *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 32, 11274-11292
- [70] Brovchenko I., Oleinikova A., Which Properties of a Spanning Network of Hydration Water Enable Biological Functions ?, *ChemPhysChem*, 2008, 9, 2695-2702
- [71] Helms V., Protein dynamics Tightly Connected to the Dynamics of Surrounding and Internal Water Molecules, *ChemPhysChem*, 2007, 8, 23-33
- [72] Smith J. C., Merzel F., Bondar A.-N. Tournier A., Fischer S., Structure, dynamics and reactions of protein hydration water, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1181-1190
- [73] Halling P. J. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media ?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1287-1297
- [74] Oleinikova A., Smolin N., Brovchenko I., Influence of Water Clustering on the Dynamics of Hydration Water at the Surface of a Lysozyme, *Biophys. J.*, 2007, 93, No. 9, 2986-3000
- [75] Oleinikova A., Brovchenko I., Singh G., The temperature dependence of the heat capacity of hydration water near biosurfaces from molecular simulations, *EPL*, 2010, 90, 36001
- [76] Russo D., Baglioni P., Peroni E., Teixeira J., Hydration water dynamics of a completely hydrophobic oligopeptide, *Chem. Phys.*, 2003, 292, 235-245
- [77] Merzel F., Smith J. C., Is the first hydration shell of lysozyme of higher density than bulk water?, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, No. 8, 5378-5383
- [78] Merzel F., Smith J. C., High-Density Hydration Layer of Lysozymes: Molecular Dynamics Decomposition of Solution Scattering Data, *J. Chem. Inf. Model.*, 2005, 45, No. 6, 1593-1599
- [79] Matsuoka D., Nakasako M., Prediction of Hydration Structures around Hydrophilic Surfaces of Proteins by Using the Empirical Hydration Distribution Functions from a Database Analysis, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 13, 4652-4663
- [80] Bizzarri A. R., Cannistraro S., Molecular Dynamics at the Protein-Solvent Interface, *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, No. 26, 6617-6633
- [81] Pizzitutti F., Marchi M., Sterpone F., Rossky P. J., How Protein Surfaces Induce Anomalous Dynamics of Hydration Water, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111, 26, 7584-7590
- [82] Yu H., Rick S. W., Free Energy, Entropy, and Enthalpy of a Water Molecule in Various Protein Environments, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 35, 11552-11560
- [83] Vitkup D., Ringe D., Petsko G. A., Karplus M., Solvent mobility and the protein 'glass' transition, 2000, 7, No. 1, 34-38
- [84] Shenogina N., Koblinski P., Garde Sh., Strong frequency dependence of dynamical coupling between protein and water, *J. Chem. Phys.*, 2008, 129, 155105
- [85] Wood K., Frölich A., Paciaroni A., Moulin M., Härtlein M., Zaccai G., Tobias D. J., Weik M., Coincidence of Dynamical Transitions in a soluble Protein and Its Hydration Water: Direct Measurements by Neutron scattering and MD Simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, No. 14, 4586-4587
- [86] Frauenfelder H., Chen G., Berendzen J., Fenimore P. W., Jansson H., McMahon B. H., Stroe I. R., Swenson J., Young R. D., A unified model of protein dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, No. 13, 5129-5134
- [87] Vogel M., Temperature-Dependent Mechanisms for the Dynamics of Protein-Hydration Waters: A Molecular Dynamics Simulation Study, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 28, 9386-9392
- [88] Bandyopadhyay S., Chakraborty S., Balasubramanian S., Pal S., Bagchi B., Atomistic Simulation Study of the Coupled Motion of Amino Acid Residues and Water Molecules around Protein HP-36: Fluctuations at and around the Active Sites, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, No. 33, 12608-12616
- [89] Sinha S. K., Chakraborty S., Bandyopadhyay S., *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 27, 8203-8209
- [90] Born B., Kim S. J., Ebbinghaus S., Gruebele M., Havenith M., The terahertz dance of water with the proteins: the effect of protein flexibility on the dynamical hydration shell of ubiquitin, *Faraday discuss.*, 2009, 141, 161-173
- [91] Chen X., Weber I., Harrison R. W., Hydration Water and Bulk Water in Proteins Have distinct Properties in Radial Distributions Calculated from 105 Atomic Resolution Crystal Structures, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 38, 12073-

- [92] Zaccai G., The effect of water on protein dynamics, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1269-1275
- [93] Chu X.-Q., Faraone A., Kim Ch., Fratini E., Baglioni P., Leao J. B., Chen S.-H., Proteins Remain Soft at Lower Temperatures under Pressure, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 15, 5001-5006
- [94] Starr F. W., Nielsen J. K., Stanley H. E., Fast and Slow Dynamics of Hydrogen Bonds in Liquid Water, *Phys. Rev. Lett.*, 1999, 82, No. 11, 2294-2297
- [95] Lusceac S. A., Vogel M., <sup>2</sup>H NMR Study of the Water Dynamics in Hydrated Myoglobin, *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114, No. 31, 10209-10216
- [96] Fenimore P. W., Frauenfelder H., McMahon B. H., Young R. D., Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to  $\alpha$ - and  $\beta$ -fluctuations in glasses, control protein motions and functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, No. 40, 14408-14413
- [97] Halle B., Protein hydration dynamics in solution: a critical survey, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1207-1224
- [98] Russo D., Murarka R. K., Copley J. R. D., Head-Gordon T., Molecular View of Water Dynamics near Model Peptides, *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109, No. 26, 12966-12975
- [99] Qvist J., Persson E., Mattea C., Halle B., Time scales of water dynamics at biological interfaces: peptides, proteins and cells, *Faraday Discuss.*, 2009, 141, 131-144
- [100] Murarka R. K., Head-Gordon T., Dielectric Relaxation of Aqueous Solutions of Hydrophilic versus Amphiphilic Peptides, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 1, 179-186
- [101] Halle B., Nilsson L., Does the Dynamic Stokes Shift Report on Slow Protein Hydration Dynamics?, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 24, 8210-8213
- [102] Modig K., Liepinsh E., Otting G., Halle B., Dynamics of Protein and Peptide Hydration, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, No. 1, 102-114
- [103] Bagchi B., Water Dynamics in the Hydration Layer around Proteins and Micelles, *Chem. Rev.*, 2005, 105, No. 9, 3197-3219
- [104] Russo D., Hura G., Head-Gordon T., Hydration Dynamics Near a Model Protein Surface, *Biophys. J.*, 2004, 86, 1852-1862
- [105] Russo D., Murarka R. K., Hura G., Verschell E., Copley J. R. D., Head-Gordon T., Evidence for Anomalous Hydration Dynamics near a Model Hydrophobic Peptide, *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, No. 51, 19885-19893
- [106] Hilser V. J., Finding the wet spots, *Nature*, 2011, 469, 166-167
- [107] Tarek M., Tobias D. J., Role of Protein-Water Hydrogen Bond Dynamics in the Protein Dynamical Transition, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, 88, No. 13, 13810
- [108] Lau E. Y., Krishnan V. V., Temperature dependence of protein-hydration hydrodynamics by molecular dynamics simulations, *Biophys. Chem.*, 2007, 130, 55-64
- [109] Starr F. W., Nielsen J. K., Stanley H. E., Hydrogen-bond dynamics for the extended simple point-charge model of water, *Phys. Rev. E*, 2000, No. 1, 579-587
- [110] Steinel T., Asbury J. B., Zheng J., Fayer M. D., Watching Hydrogen Bonds Break: A Transient Absorption Study of Water, *J. Phys. Chem. A*, 108, No. 50, 10957-10964
- [111] Bandyopadhyay S., Chakraborty S., Bagchi B., Secondary Structure Sensitivity of Hydrogen Bond Lifetime Dynamics in the Protein Hydration Layer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, No. 47, 16660-16667
- [112] Modig K., Pfrommer B. G., Halle B., Temperature-Dependent Hydrogen-Bond Geometry in Liquid Water, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, 90, No. 7, 075502
- [113] Laage D., Hynes J. T., A Molecular Jump Mechanism of Water Reorientation, *Science*, 311, 832-835
- [114] Laage D., Hynes J. T., On the Molecular Mechanism of Water Reorientation, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 45, 14230-14242
- [115] Laage D., Hynes J. T., Do more strongly hydrogen-bonded water molecules reorient more slowly ?, *Chem. Phys. Lett.*, 2006, 433, 80-85
- [116] Laage D., Stirnemann G., Hynes J. T., Why Water Reorientation Slows without Iceberg Formation around Hydrophobic Solutes, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 8, 2428-2435
- [117] Rezus Y. L. A., Bakker H. J., Observation of Immobilized Water Molecules around Hydrophobic Groups, *Phys. Rev. Lett.*, 2007, 99, 148301
- [118] Laage D., Reinterpretation of the Liquid Water Quasi-Elastic Neutron Scattering Spectra Based on a Nondiffusive Jump Reorientation Mechanism, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 9, 2684-2687
- [119] Jana B., Pal S., Bagchi B., Hydrogen Bond Breaking Mechanism and Water Reorientational Dynamics in the Hydration Layer of Lysozyme, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 30, 9112-9117
- [120] Rose G. D., Fleming P. J., Banavar J. R., Maritan A., A backbone-based theory of protein folding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, No. 45, 16623-16633
- [121] Pace C. N., Treviño S., Prabhakaran E., Scholtz J. M., Protein structure, stability and solubility in water and other solvents, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 2004, 359, 1225-1235
- [122] Itoh K., Sasai M., Multidimensional theory of protein folding, *J. Chem. Phys.*, 130, No. 14, 145104

- [123] Harano Y., Kinoshita M., Translational-Entropy Gain of Solvent upon Protein Folding, *Biophys. J.*, 2005, 89, No. 4, 2701-2710
- [124] Harano Y., Kinoshita M., Crucial importance of translational entropy of water in pressure denaturation of proteins, *J. Chem. Phys.*, 2006, 125, 024910
- [125] Dougan L., Sri Rama Koti A., Genchev G., Lu H., Fernandez J. M., a Single-Molecule Perspective on the Role of Solvent Hydrogen Bonds in Protein Folding and Chemical Reactions, *ChemPhysChem*, 2008, 9, 2836-2847
- [126] Kohtani M., Jones Th. C., Schneider J. E., Jarrold M. F., Extreme stability of an Unsolvated  $\alpha$ -Helix, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, No. 24, 7420-7421
- [127] Kohtani M., Jarrold M. F., Water Molecule Adsorption on Short Alanine Peptides: How Short Is the Shortest Gas-Phase Alanine-Based Helix?, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, No. 27, 8454-8458
- [128] Lindorff-Larsen K., Røgen P., Paci E., Vendruscolo M., Dobson C. M., Protein folding and the organization of the protein topology universe, *Trends Biochem. Sci.*, 2005, 30, No. 1, 13-18
- [129] Ferguson A., Liu Zh., Chan H. S., Desolvation Barrier Effects Are a Likely Contributor to the Remarkable Diversity in the Folding Rates of Small Proteins, *J. Mol. Biol.*, 2009, 389, 619-636
- [130] Costas M., Rodrigues-Larrea D., De Maria L., Borchert T. V., Gómez-Puyou A., Sanchez-Ruiz J. M., Between-Species Variation in the Kinetic Stability of TIM Proteins Linked to Solvation-Barrier Free Energies, *J. Mol. Biol.*, 2009, 385, 924-937
- [131] Errington J. R., DeBenedetti P. G., Relationship between structural order and the anomalies of liquid water, *Nature*, 2001, 409, 318-321
- [132] Torquato S., Truskett T. M., DeBenedetti P. G., Is Random Close Packing of Spheres Well Defined?, *Phys. Rev. Lett.*, 2000, 84, No. 10, 2064-2067
- [133] Truskett T. M., Torquato S., DeBenedetti P. G., Towards a quantification of disorder in materials: Distinguishing equilibrium and glassy sphere packings, *Phys. Rev. E*, 2000, 62, No. 1, 993-1001
- [134] Ireta J., Neugebauer J., Scheffler M., Rojo A., Galván M., Structural Transitions in the Polyalanine  $\alpha$ -Helix under Uniaxial Strain, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, No. 49, 17241-17244
- [135] Sorin E. J., Rhee Y. M., Shirts M. R., Pande V. S., The Solvation Interface is a Determining Factor in Peptide conformational Preferences, *J. Mol. Biol.*, 2006, 356, 248-256
- [136] Offmann B., Tyagi M., de Brevern A. G., Local Protein Structures, *Curr. Bioinform.*, 2007, 2, 165-202
- [137] Son. H. S., Hong B. H., Lee Ch.-W., Yun S., Kim K. S., A New Type of Helix Pattern in Polyalanine Peptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, No. 3, 514-515
- [138] Salvador P., Asensio A., Dannenberg J. J., The Effect of Aqueous Solvation upon  $\alpha$ -Helix Formation for Polyalanines, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 111, No. 25, 7462-7466
- [139] Moreau R. J., Schubert Ch. R., Nasr Kh. A., Török M., Miller J. S., Kennedy R. J., Kemp D. S., Context-Independent, Temperature-Dependent Helical Propensities for Amino Acid Residues, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, No. 36, 13107-13116
- [140] Baldwin R. L., Relation between peptide backbone solvation and the energetics of peptide hydrogen bonds, *Biophys. Chem.*, 2002, 101-102, 203-210
- [141] Couch V. A., Cheng N., Nambiar K., Fink W., Structural Characterization of  $\alpha$ -Helices of Implicitly Solvated Poly-Alanine, *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110, No. 7, 3410-3419
- [142] Osterhout J. J., Understanding Protein Folding Through Peptide Models, *Protein and Peptide Letters*, 2005, 12, No. 2, 159-164
- [143] Park Ch., Goddard III W. A., Stabilization of  $\alpha$ -Helices by Dipole-Dipole Interactions within  $\alpha$ -Helices, *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, No. 32, 7784-7789
- [144] Kaleta D. T., Jarrold M. F., Disrupting Helix Formation in Unsolvated Peptides, *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, No. 19, 4436-4440
- [145] Doig A. J., Recent advances in helix-coil theory, *Biophys. Chem.*, 2002, 101-102, 281-293
- [146] Doig A. J., Baldwin R. L., N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in  $\alpha$ -helical peptides, *Protein Sci.*, 1995, 4, 1325-1336
- [147] Jha A. K., Colubri A., Zaman M. H., Koide Sh., Sosnick T. R., Freed K. F., Helix, Sheet, and Polyproline II Frequencies and Strong Nearest Neighbor Effects in a Restricted Coil Library, *Biochem.*, 2005, 44, No. 28, 9691-9702
- [148] Lin J. C., Barua B., Andersen N. H., The Helical Alanine Controversy: An (Ala)<sub>6</sub> Insertion Dramatically Increases Helicity, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, No. 42, 13679-13684
- [149] Scheraga H. A., Vila J. A., Ripoll D. R., Helix-coil transitions re-visited, *Biophys. Chem.*, 2002, 101-102, 255-265
- [150] López-Llano J., Campos L. A., Sancho J.,  $\alpha$ -Helix Stabilization by Alanine Relative to Glycine: Roles of Polar and Apolar Solvent Exposures and of Backbone Entropy, *Proteins*, 2006, 64, 769-778
- [151] Lewis R. N. A. H., Zhang Y.-P., Hodges R. S., Subczynski W. K., Kusumi A., Flach C. R., Mendelsohn R., McElhaney R. N., A Polyalanine-Based Peptide Cannot Form a Stable Transmembrane  $\alpha$ -Helix in Fully Hydrated Phospholipid Bilayers, *Biochemistry*, 2001, 40, No. 40, 12103-12111
- [152] Counterman A. E., Clemmer D. E., Gas Phase Polyalanine: Assessment of  $i \rightarrow i+3$  and  $i \rightarrow i+4$  Helical Turns in

- [Ala<sub>n</sub>+4H]<sup>4+</sup> (n=29-49) Ion, *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, No. 46, 12045-12051
- [153] Topol I. A., Burt S. K., Deretey E., Tang T.-H., Perczel A., Rashin A., Csizmadia I. G.,  $\alpha$ - and  $3_{10}$ -Helix Interconversion: A Quantum-Chemical study on Polyalanine systems in the Gas Phase and in Aqueous Solvent, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, No. 25, 6054-6060
- [154] Bogár F., Szekeres Zs., Bartha F., Penke B., Ladik J., Density functional study of infinite polyserine chain, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, 7, 2965-2969
- [155] Sheu Sh.-Y., Yang D.-Y., Selzle H. L., Schlag E. W., Energetics of hydrogen bonds in peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, No. 22, 12683-12687
- [156] Fitzkee N. C., Rose G. D., Steric restrictions in protein folding: An  $\alpha$ -helix cannot be followed by a contiguous  $\beta$ -strand, *Protein Sci.*, 2004, 13, 633-639
- [157] Fleming P. J., Fitzkee N. C., Mezei M., Srinivasan R., Rose G. D., A novel method reveals that solvent water favors polyproline II over  $\beta$ -strand conformation in peptides and unfolded proteins: conditional hydrophobic accessible surface area (CHASA), *Protein Science*, 2005, 14, 111-118
- [158] Kentsis A., Mezei M., Osman R., Origin of the Sequence-Dependent Polyproline II Structure in Unfolded Peptides, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2005, 61, 769-776
- [159] Rath A., Davidson A. R., Deber Ch. M., The Structure of „Unstructured” Regions in Peptides and Proteins: Role of the Polyproline II Helix in Protein Folding and Recognition, *Biopolymers*, 2005, 80, 179-185
- [160] Bochicchio B., Tamburro A. M., Polyproline II Structure in Proteins: Identification by Chiroptical Spectroscopies, Stability and Functions, *Chirality*, 2002, 14, 782-792
- [161] Liu Zh., Chen K., Ng A., Shi Zh., Woody R. W., Kallenbach N. R., Solvent Dependence of PII Conformation in Model Alanine Peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, No. 46, 15141-15150
- [162] Chen K., Liu Zh., Kallenbach N. R., The polyproline II conformation in short alanine peptides is noncooperative, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, No. 43, 15352-15357
- [163] Shi Zh., Olson C. A., Rose G. D., Baldwin R. L., Kallenbach N. R., Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, No. 14, 9190-9195
- [164] Mezei M., Fleming P. J., Srinivasan R., Rose G. D., Polyproline II Helix Is the Preferred Conformation for Unfolded Polyalanine in Water, *Proteins*, 2004, 55, 502-507
- [165] Pappu R. V., Rose G. D., A simple model for polyproline II structure in unfolded states of alanine-based peptides, *Protein Sci.*, 2002, 11, 2437-2455
- [166] Ascitutto E. K., Mikhonin A. V., Asher S. A., Madura J. D., Computational and Experimental Determination of the  $\alpha$ -Helix Unfolding Reaction Coordinate, *Biochemistry*, 2008, 47, No. 7, 2046-2050
- [167] Shi Zh., Chen K., Liu Zh., Sosnick T. R., Kallenbach N. R., PII Structure in the Model Peptides for Unfolded Proteins: Studies on Ubiquitin Fragments and Several Alanine-Rich Peptides Containing QQQ, SSS, FFF, and VVV, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2006, 63, 312-321
- [168] Shi Zh., Chen K., Liu Zh., Ng A., Bracken W. C., Kallenbach N. R., Polyproline II propensities from GGXGG peptides reveal an anticorrelation with  $\beta$ -sheet scales, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, No. 50, 17964-17968
- [169] Krittanaï Ch., Johnson W. C. (Jr.), The Relative Order of Helical Propensity of Amino Acids Changes With Solvent Environment, *Proteins*, 2000, 39, 132-141
- [170] Daggett V., Protein Folding-Simulation, *Chem. Rev.*, 2006, 106, No. 5., 1898-1916
- [171] Levy Y., Jortner J., Becker O. M., Solvent effects on the energy landscapes and folding kinetics of polyalanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 98, No. 5, 2188-2193
- [172] Park Ch., Carlson M. J., Goddard W. A., Solvent Effects on the secondary Structures of Proteins, *J. Phys. Chem. A*, 2000, 104, No. 11, 2498-2503
- [173] Liu Zh., Chen K., Ng A., Shi Zh., Woody R. W., Kallenbach N. R., Solvent Dependence of PII Conformation in Model Alanine Peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, No. 46, 15141-15150
- [174] Tran H. T., Mao A., Pappu R. V., Role of Backbone-Solvent Interactions in Determining Conformational Equilibria of Intrinsically Disordered Proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, No. 23, 7380-7392
- [175] Celik Y., Graham L. A., Mok Y.-F., Bar M., Davies P. L., Braslavsky I., Superheating of ice crystals in antifreeze protein solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, 107, No. 12, 5423-5428
- [176] Graether S. P., Kulper M. J., Gagné S. M., Walker V. K., Jia Z., Sykes B. D., Davies P. L.,  $\beta$ -Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect, *Nature*, 2000, 406, 325-328
- [177] Pertaya N., Marshall Ch. B., Celik Y., Davies P. L., Braslavsky I., Direct Visualization of Spruce Budworm Antifreeze Protein Interacting with Ice Crystals: Basal Plane Affinity Confers Hyperactivity, *Biophys. J.*, 2008, 95, No. 1, 333-341
- [178] Liou Y.-Ch., Tocilj A., Davies P. L., Jia Z., Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a  $\beta$ -helix antifreeze protein, *Nature*, 2000, 406, 322-324
- [179] Nutt D. R., Smith J. C., Dual Function of the Hydration Layer around the Antifreeze Protein Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, No. 39, 13066-13073
- [180] Smolin N., Daggett V., Formation of Ice-like Water Structure on the Surface of an Antifreeze Protein, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 19, 6193-6202

- [181] Doxey A. C., Yaish M. W., Griffith M., McConkey B. J., Ordered surface carbons distinguish antifreeze proteins and their ice-binding regions, *Nature Biotech.*, 2005, 24, no. 7, 852-855
- [182] Vega C., Abascal J. L. F., Nezbeda I, Vapor-liquid equilibria from the triple point up to the critical point for the new generation of TIP4P-like models: TIP4P/Ew, TIP4P/2005, and TIP4P/ice, *J. Chem. Phys.*, 2006, 125, No. 3, 034503
- [183] Guillot B., A reappraisal of what we have learnt during three decades of computer simulations on water, *J. Mol. Liq.*, 2002, 101, No. 1-3, 219-260
- [184] Fisenko A. I., Malomuzh N. P., To What Extent Is Water Responsible for the Maintenance of the Life for Warm-Blooded Organisms, *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10, 2383-2411
- [185] Allen M. P., Tildesley D. J., *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon Press, Oxford 1987
- [186] Mahoney M. W. , Jorgensen W. L. , A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions, *J. Chem. Phys.*, 112, No. 20, 8910-8922
- [187] Horn H. W., Swope W. C., Pitner J. W., Madura J. D., Dick Th. J., Hura G. L., Head-Gordon T., Development of an improved four-site water model for biomolecular simulations: TIP4P-Ew, *J. Chem. Phys.*, 2004, 120, No. 20, 9665-9678
- [188] Raschke TM, Levitt M. Nonpolar solutes enhance water structure within hydration shells, while reducing interactions between them. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 2005, 102, 6777-6782
- [189] Dang L. X., Chang T.-M., Molecular dynamics study of water clusters, liquid, and liquid-vapor interface of water with many-body potentials, *J. Chem. Phys.*, 106, No. 19, 8149-8162
- [190] Tan M.-L., Fischer J. T., Chandra A., Brooks B. R., Ichiye T., A temperature of maximum density in soft sticky dipole water, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, 376, 646-652
- [191] Jorgensen W. L., Jenson C., Temperature Dependence of TIP3P, SPC, and TIP4P Water from NPT Monte Carlo Simulations: Seeking Temperatures of Maximum Density, *J. Comp. Chem.*, 1998, 19, No. 10, 1179-1186
- [192] Zielkiewicz J., Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water, *J. Chem. Phys.*, 2005, 123, 104501
- [193] Luzar A., Chandler D., Hydrogen bond-kinetics in liquid water, *Nature*, 1996, 379, 55-57
- [194] Luzar A., Chandler D., Effect of Environment of Hydrogen Bond Dynamics in Liquid Water, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, 76, No. 6, 928-931
- [195] Luzar A., Resolving the hydrogen bond dynamics conundrum, *J. Chem. Phys.*, 2000, 113, No. 23, 10663-10675
- [196] Teixeira J., Bellissent-Funel, Chen S.-H., Dynamics of water studied by neutron scattering, *J. Phys. Condens. Matter*, 1990, 2, SA105-SA108
- [197] Duan Y., Wu C., Chowdhury S., Lee M. C., Xiong G., Zhang W., Yang R., Cieplak P., Luo R., Lee T., A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins, *J. Comput. Chem.*, 2003, 24, 1999-2012
- [198] *Amber 8 Users' Manual*, 2004
- [199] Miyamoto S., Kollman P. A., SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, 1992, 13, No. 8, 952-962
- [200] Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., DiNola A., Haak J. R., Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.*, 81, No. 8, 3684-3690
- [201] Esposito R., Saija F., Saitta A. M., Giaquinta P. V., Entropy-based measure of structural order in water, *Phys. Rev. E*, 2006, 73, No. 4, 040502
- [202] Giuffr e E., Prestipino S., Saija F., Saitta A. M., Giaquinta P. V., Entropy from Correlations in TIP4P Water, *J. Chem. Theory Comput.*, 2010, 6, No. 3, 625-636
- [203] Wallace D. C., On the role of density fluctuations in the entropy of a fluid, *J. Chem. Phys.*, 1987, 87, No. 4, 2282-2284
- [204] Laird B. B., Haymet A. D. J., Calculation of the entropy from multiparticle correlation functions, *Phys. Rev. A*, 1992, 45, No. 8, 5680-5689
- [205] Baranyai A., Evans D. J., Direct entropy calculation from computer simulation of liquids, *Phys. Rev. A*, 1989, 40, No. 7, 3817-3822
- [206] Saija F., Saitta A. M., Giaquinta P. V., Statistical entropy and density maximum anomaly in liquid water, *J. Chem. Phys.*, 2003, 119, No. 7, 3587-3589
- [207] Vega C., Sanz E., Abascal J. L. F., Noya E. G., Determination of phase diagrams via computer simulation: methodology and applications to water, electrolytes and proteins, *J. Phys. Condens. Matter.*, 2008, 20, 153101
- [208] Jakse N., Charpentier I., Direct excess entropy calculation for a Lennard-Jones fluid by the integral equation method, *Phys. Rev. E*, 2003, 67, 061203
- [209] Giaquinta P. V., Giunta G., Prestipino Giaritta S., Entropy and the freezing of simple liquids, *Phys. Rev. A*, 1992, 45, No. 10, R6966-R6968
- [210] Giaquinta P. V., Giunta G., About entropy and correlations in a fluid of hard spheres, *Physica A*, 1992, 187, 145-158
- [211] Caccamo C., Giaquinta P. V., Giunta G., Phase Diagram of simple fluids: a comprehensive theoretical approach, *J. Phys. Condens. Matter*, 1993, 5, B75-B82

- [212] Giaquinta P. V., Giunta G., Malescio G., Entropy versus correlations in simple fluids: The gas-liquid and freezing transitions, *Physica A*, 1998, 250, 91-102
- [213] Saija F., Prestipino S., Giaquinta P. V., Scaling of local density correlations in a fluid close to freezing, *J. Chem. Phys.*, 2001, 115, No. 16, 7586-7591
- [214] Giaquinta P. V., Saija F., Re-entrant Melting in the Gaussian-Core Model: The Entropy Imprint, *ChemPhysChem*, 2005, 6, 1768-1771
- [215] Prestipino S., Saija F., Giaquinta P. V., Phase diagram of the Gaussian-core model, *Phys. Rev. E*, 2005, 71, 050102
- [216] Saija F., Prestipino S., Giaquinta P. V., Entropy, correlations, and ordering in two dimensions, *J. Chem. Phys.*, 2000, 113, No. 7, 2806-2813
- [217] Saija F., Giaquinta P. V., Giunta G., Prestipino S., On entropy and ordering in binary hard-sphere mixtures, *J. Phys. Condens. Matter*, 1994, 6, 9853-9865
- [218] Saija F., Giaquinta P. V., Statistical entropy of a binary hard-sphere mixture: the low-density limit, *J. Phys. Condens. Matter*, 1996, 8, 8137-8144
- [219] Saija F., Pastore G., Giaquinta P. V., Entropy and Fluid-Fluid Separation in Nonadditive Hard-Sphere Mixtures, *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, No. 50, 10368-10371
- [220] Costa D., Saija F., Giaquinta P. V., Angular correlations and statistical entropy of hard spherocylinders: the isotropic-nematic transition, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, 283, 86-90; *Chem. Phys. Lett.*, 1999, 299, 252
- [221] Lazaridis Th., Paulaitis M. E., Entropy of Hydrophobic Hydration: A New Statistical Mechanical Formulation, *J. Phys. Chem.*, 1992, 96, No. 9, 3847-3855
- [222] Zielkiewicz J., Two-Particle Entropy and Structural Ordering in Liquid Water, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 7810-7815
- [223] Lamperski S., Symulacje komputerowe w chemii, Wydział Chemii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, Poznań 2006
- [224] Kuffel A., Strukturalne i dynamiczne właściwości wody w otoczce solwatacyjnej wokół wybranych konformacji poliglicyny, Praca magisterska (promotor: dr hab. inż. J. Zielkiewicz), Gdańsk 2008
- [225] Panuszko A., Gojło E., Zielkiewicz J., Śmiechowski M., Krakowiak J., Stangret J., Hydration of Simple Amides. FTIR Spectra of HDO and Theoretical Studies, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, No. 8, 2483-2493
- [226] Xantheas S. S., Voth G. A., Aqueous solutions and Their Interfaces, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 13, 3997-3999
- [227] Johnson M. E., Malardier-Jugroot C., Murarka R. K., Head-Gordon T., Hydration Water Dynamics Near Biological Interfaces, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, No. 13, 4082-4092
- [228] Idrissi A., Sokolić F., Perera A., A molecular dynamics study of the urea/water mixture, *J. Chem. Phys.*, 2000, 112, No. 21, 9479
- [229] Idrissi A., Damay P., Interpretation of the low frequency response of aqueous solutions: A molecular dynamics analysis, *J. Non-Cry. Sol.*, 2006, 352, 4486-4489
- [230] Perera P. N., Fega K. R., Lawrence C., Sundstrom E. J., Tomlinson-Philips J., Ben-Amotz D., Observation of water dangling OH bonds around dissolved nonpolar groups, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, No. 30, 12230-12234
- [231] Shi Zh., Olson C. A., Rose G. D., Baldwin R. L., Kallenbach N. R., Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, No. 14, 9190-9195
- [232] Nakagawa H., Kataoka M., Percolation of Hydration Water as a Control of Protein Dynamics, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 2010, 79, No. 8, 083801
- [233] Doster W., The protein-solvent glass-transition, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1804, 3-14
- [234] Debenedetti P. G., Stillinger F. H., Supercooled liquids and the glass transition, *Nature*, 2001, 410, 259-267
- [235] Fenimore P. W., Frauenfelder H., McMahon B. H., Parak F. G., Slaving: Solvent fluctuations dominate protein dynamics and functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, No. 25, 16047-16051
- [236] Ngai K. L., *Relaxation and Diffusion in Complex Systems*, Springer, New York Dordrecht Heidelberg London, 2011
- [237] Khodadadi S., Roh J. H., Kisliuk A., Mamontov E., Tyagi M., Woodson S. A., Briber R. M., Sokolov A. P., Dynamics of Biological Macromolecules: Not a Simple Slaving by Hydration Water, *Biophys. J.*, 2010, 98, No. 7, 1321-1326



