



**Badanie, metodami dynamiki molekularnej,
hydratacji domeny katalitycznej cząsteczki kinezyiny
oraz wpływu efektów hydratacyjnych
na jej funkcjonalność motoryczną**

mgr. inż. Anna Kuffel

PROMOTOR:
dr hab. inż. Jan Zielkiewicz

GDAŃSK, 2012

Spis treści

1.	Wprowadzenie	7
2.	Cel pracy.....	8
3.	Przegląd literatury.....	9
3.1.	Budowa i mechanizm działania kinezyzny	9
3.1.1.	Kinezyzna jako przykład motoru molekularnego	9
3.1.2.	Ogólny schemat budowy kinezyzny	10
3.1.3.	Klasyfikacja kinezyzn.....	11
3.1.4.	Mikrotubule	15
3.1.5.	Sposób poruszania się kinezyzny.....	16
3.1.6.	Budowa domeny motorycznej w kontekście mechanizmu ruchu	21
3.1.7.	Rola N-końcowej części domeny motorycznej.....	33
3.1.8.	Kinezyzny niekonwencjonalne.....	36
3.1.9.	Rola mikrotubuli.....	38
3.1.10.	Znaczenie ruchów Browna	46
3.2.	Charakterystyka czystej wody.....	49
3.2.1.	Budowa cząsteczki wody	49
3.2.2.	Sposób przedstawiania wody w symulacjach komputerowych.....	50
3.2.3.	Definicje wiązania wodorowego	52
3.2.4.	Dynamika czystej wody	57
3.2.5.	Rearanżacja wiązań wodorowych	60
3.2.6.	Struktura czystej wody	63
3.2.7.	Miary stopnia uporządkowania strukturalnego wody ...	71
3.3.	Woda solwatacyjna białek.....	77
3.3.1.	Efekt hydrofobowy	77
3.3.2.	Rola wody w formowaniu i utrzymaniu struktury przestrzennej białek	82
3.3.3.	Dynamika wody solwatacyjnej.....	85
3.3.4.	Dynamika wewnętrznych ruchów białka i jej związek z ruchliwością rozpuszczalnika.....	90
3.3.5.	Struktura wody solwatacyjnej.....	94

3.3.6.	Woda pomiędzy dwoma białkami	96
4.	Opis metod obliczeniowych	100
4.1.	Dynamika molekularna	100
4.2.	Wybór modelu wody oraz przygotowanie układów do symulacji	106
4.3.	Przebieg symulacji.....	118
4.4.	Analiza wyników symulacji	120
4.4.1.	Zdefiniowanie granic poszczególnych warstw solwatacyjnych białka.....	124
4.4.2.	Funkcje rozkładu radialnego	125
4.4.3.	Wewnętrzny układ współrzędnych cząsteczki wody..	125
4.4.4.	Uwzględnienie asymetrii środowiska przy obliczaniu wartości parametrów charakteryzujących właściwości wody solwatacyjnej.....	126
4.4.5.	Analiza wiązań wodorowych woda-woda	128
4.4.6.	Współczynniki dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej.....	129
4.4.7.	Widmo mocy prędkości translacyjnej.....	131
4.4.8.	Parametry lokalnego uporządkowania oparte na dwucząstkowych funkcjach korelacji.....	132
4.4.9.	Podział przestrzeni na wielościany Voronoia	150
4.4.10.	Ruchliwość atomów białka i analiza głównych składowych	152
4.4.11.	Obliczenia średniego momentu dipolowego warstwy solwatacyjnej i natężenia pola elektrycznego	154
4.4.12.	Obliczenia siły generowanej przez szyjkę łącznikową	155
4.4.13.	Wartość maksymalnego przepływu	156
4.4.14.	Local Structure Index (LSI).....	157
4.5.	Możliwe źródła błędów wyznaczonych wielkości fizycznych	158
4.6.	Narzędzia – programy i komputery.....	158
5.	Wyniki i ich dyskusja.....	160
5.1.	Solvatacja pojedynczej domeny motorycznej kinezyiny ...	163
5.1.1.	Współczynniki dyfuzji.....	163
5.1.2.	Miara średniej hydrofobowości analizowanych obszarów białka	167

5.1.3.	Współczynnik lokalnego pofałdowania jako miara kształtu powierzchni	169
5.1.4.	Ruchliwość powierzchniowych atomów białka	174
5.1.5.	Geometria i energia wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody	182
5.1.6.	Wielościanny Voronia	189
5.1.7.	Parametry lokalnego uporządkowania	192
5.1.8.	Podsumowanie	198
5.2.	Woda solwatacyjna w obszarze pomiędzy domeną katalityczną kinezyiny a dimerem tubulinowym	199
5.2.1.	Współczynniki dyfuzji wody zawartej w warstwie solwatacyjnej	201
5.2.2.	Ruchliwość powierzchniowych atomów białka	207
5.2.3.	Geometria i energia wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy cząsteczkami wody	209
5.2.4.	Wartość maksymalnego przepływu	213
5.2.5.	Wielościanny Voronia	216
5.2.6.	Parametry lokalnego uporządkowania	217
5.2.7.	Model solwatacji makrocząsteczek proponujący mechanizm zmian gęstości wody solwatacyjnej	219
5.2.8.	Zastosowanie modelu solwatacji do opisu właściwości wody znajdującej się w obszarze pomiędzy białkami	244
5.2.9.	Średni moment dipolowy warstwy solwatacyjnej i natężenie pola elektrycznego	247
5.2.10.	Podsumowanie	248
5.3.	Rola efektów solwatacyjnych w procesie dokowania się szyjki łącznikowej	250
6.	Podsumowanie	254
7.	Streszczenie	257
8.	Summary	258
Dorobek naukowy		259
Publikacje		259
Konferencje		259
Staże		259
Granty		260
Bibliografia		261

Aneks	278
Woda solwacyjna pojedynczej domeny motorycznej.....	278
Woda solwacyjna pomiędzy domeną motoryczną i dimerem tubulinowym	291

1. Wprowadzenie

W funkcjonowaniu żywej komórki szczególną rolę pełni zbiór białek zwanych motorami molekularnymi. Są one zdolne do wykonywania pracy mechanicznej. Jednym z białek zaliczanych do tej grupy jest kinezyzna, która bierze udział między innymi w transportowaniu białek i organelli komórkowych. Potrafi ona wykonywać ukierunkowany ruch przypominający kroczenie, przemieszczając się po białkowej strukturze zwanej mikrotubulą.

Działanie motorów molekularnych – w tym także kinezyzny – jest w ostatnich latach przedmiotem bardzo wielu prac, zarówno o charakterze doświadczalnym, jak i teoretycznym. Pomimo ogromu włożonej pracy, wciąż nie ma pełnej jasności co do mechanizmu odpowiedzialnego za wysoce uporządkowany ruch kinezyzny.

Zarówno kinezyznę jak i mikrotubulę w normalnych warunkach ich pracy (tzn. w komórce) otaczają mniejsze cząsteczki, z których znaczącą większość stanowią cząsteczki wody. Woda solwatacyjna odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu białek. Nieodzowność wody w procesach życiowych wynika z tego, że nie stanowi ona biernego rozpuszczalnika, ale często bierze aktywny udział w samych reakcjach biochemicznych, przy czym aktywny udział niekoniecznie musi oznaczać jedynie pełnienie funkcji substratu.

Wyniki wielu eksperymentów i prac obliczeniowych dowodzą, że białko modyfikuje zarówno organizację strukturalną, jak i dynamikę sąsiadujących z nim cząsteczek wody (czyli tak zwanej otoczki solwatacyjnej). Tym samym otoczka solwatacyjna charakteryzuje się odmiennymi właściwościami fizycznymi w stosunku do rozpuszczalnika pozbawionego substancji rozpuszczonej (lub innymi słowy – w stosunku do rozpuszczalnika w nieskończonej odległości od cząsteczki białka). Białka nie spełniają swojej funkcji, jeżeli nie zostanie osiągnięty krytyczny stopień hydratacji. Dowodzi to, że znaczenie wody solwatacyjnej jest bardzo duże. Występuje ona nie tylko na powierzchni białek, ale nierzadko także wewnątrz. Stabilizując strukturę przestrzenną, stanowi tym samym integralny element tej struktury.

Badania eksperymentalne zachowania się samej otoczki solwatacyjnej są bardzo trudne. Z tego powodu ciągle rosnącym zainteresowaniem cieszą się symulacje komputerowe, które często stanowią jedyną realną metodę uzyskania wglądu w mikroskopową strukturę badanego układu, bowiem pozwalają na łatwe śledzenie zachowań pojedynczych cząsteczek i atomów. Oprócz naśladowania naturalnie występujących procesów, można z ich użyciem przeprowadzać eksperymenty w fizycznie nierealnych warunkach, co czasem pomaga zrozumieć mechanizm badanego zjawiska i poznać czynniki na nie wpływające. Co prawda, jak każda inna metoda badawcza, także i ta ma swoje ograniczenia, o których należy pamiętać. Po pierwsze, przy konstruowaniu symulowanych modeli są stosowane uproszczenia. Ponadto często podczas symulacji może się pojawić (i być badana) jedynie niewielka liczba możliwych konformacji układu.

2. Cel pracy

Bardzo wiele prób wyjaśnienia sposobu działania motorów molekularnych cechuje się „mechanistycznym” podejściem do opisu zjawiska: cząsteczkę białka rozważa się jako system dźwigni, zapadek, zatrasków i tym podobnych elementów, które, precyzyjnie współdziałając, są odpowiedzialne za ściśle ukierunkowany ruch całej molekuly. W przypadku kinezyne modele takie mogą dodatkowo uwzględniać zmiany konformacyjne zachodzące w podłożu, po którym wędruje głowica motoryczna (czyli w mikrotubuli), a także wpływ pola elektrycznego, pochodzącego od posiadających moment dipolowy cząsteczek tegoż podłoża. Tego rodzaju modele potrafią dać odpowiedź na wiele pytań dotyczących mechanizmu ruchu. Trudno jednak nie dostrzegać oczywistego faktu, że funkcjonowanie białek odbywa się w środowisku wodnym, zaś rola wody (a ściślej: efektów hydratacyjnych) jest powszechnie uznawana za znaczącą i – zwłaszcza w jej aspekcie dynamicznym, a przecież z takim właśnie mamy tu do czynienia – wydaje się być trudną do przecenienia. Za ilustrację służyć tu może praca dotycząca solwatacji białek przeciwdziałających zamarzaniu płynów komórkowych (1), której autorzy pokazują, że białko zdolne jest kontrolować właściwości otaczającej je wody tak, aby przyniosło to pożądane efekty (tu: obniżenie temperatury krzepnięcia). Tymczasem w wielkiej liczbie prac poświęconych badaniom motorów molekularnych ten aspekt zagadnienia jest praktycznie nieobecny. Jest to przyczyną, dla której w swej pracy zamierzam analizować efekty solwatacyjne (hydratacyjne) zarówno wokół różnych fragmentów domeny motorycznej cząsteczki kinezyne, jak i w obszarze zawartym pomiędzy tą domeną a współdziałającym z nią podczas pracy motoru podłożem (mikrotubulą, której obecność jest reprezentowana przez dimer tubulinowy). Obserwowane zmiany właściwości fizycznych wody solwatacyjnej zamierzam interpretować w kontekście ich ewentualnego wpływu na mechanizm ruchu motoru.

3. Przegląd literatury

W przeglądzie literatury postanowiłam poruszyć trzy główne tematy: budowę i mechanizm ruchu kinezyzny, charakterystykę właściwości czystej wody oraz charakterystykę wody solwatacyjnej białek. Każdy z tych tematów jest bardzo obszerny i nie sposób ich w tym miejscu wyczerpać, zatem z konieczności przedstawiłam tylko wybrane problemy.

W dyskusjach dotyczących mechanizmu pracy kinezyzny rola rozpuszczalnika nie jest wyeksponowana. Z tego powodu trudno było o zdecydowane wskazówki mogące na starcie ukierunkować przebieg badań. Rozpoczęcie pracy wymagało przede wszystkim zapoznania się z budową kinezyzny i zrozumienia sposobu jej poruszania się. Te zagadnienia zostaną przedstawione w poniższym podrozdziale. Uważam je za interesujące i postanowiłam omówić je w sposób być może bardziej dogłębny niż mogłoby to być konieczne z punktu widzenia metod użytych w pracy i jej zakresu tematycznego.

3.1. Budowa i mechanizm działania kinezyzny

3.1.1. Kinezyzna jako przykład motoru molekularnego

Biologiczne motory molekularne są białkowymi strukturami zdolnymi do przetwarzania różnych rodzajów energii (w szczególności chemicznej, pochodzącej z hydrolizy ATP) w pracę mechaniczną. Jako przykład podać można syntazę ATP, wykonującą ruch obrotowy, czy też helikazy, które przemieszczają się wzdłuż DNA i RNA. Pośród motorów molekularnych wyróżnia się grupa, na którą składają się białka wykonujące ruch z użyciem szlaków w postaci włókien białkowych znajdujących się w cytoplazmie - filamentów. Jak dotąd w komórkach eukariotycznych zidentyfikowano trzy rodzaje tych białek: miozyny, dyneiny i kinezyzny. Ich powinowactwo do filamentów zmienia się w odpowiedzi na przyłączenie i hydrolizę ATP. Motory cytoszkieletowe są zatem wyspecjalizowanymi ATPazami, które synchronizują hydrolizę ATP z wiązaniem się i poruszaniem wzdłuż wyznaczonych przez filamenty szlaków.

Większość białek motorycznych należy do nadrodziny NTPaz typu P. Nazwa NTPaz typu P pochodzi stąd, iż posiadają one domenę wiążącą i hydrolizującą trifosforany nukleozydów (ang. *nucleoside triphosphate*, NTP) oraz tak zwaną pętlę P, która oddziałuje z grupami fosforanowymi związanego nukleotydu. Powoduje to jej przemieszczenie, które jest przekładane na zmiany konformacyjne białka.

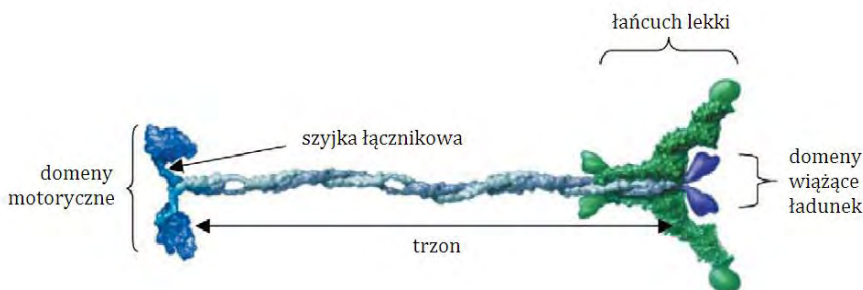
Miozyny współdziałają z filamentami aktynowymi. Spośród trzech wskazanych rodzajów motorów, zostały one scharakteryzowane jako pierwsze w związku z ich rolą w skurczu mięśni. Dyneiny i kinezyzny poruszają się po mikrotubulach (dyneiny w kierunku końca minus, a większość kinezyn w kierunku końca plus). Dyneina między innymi napędza ruch rzęsek i wici w

niektórych komórkach eukariotycznych. Kinezyne odgrywają rolę w transporcie białek, mRNA, pęcherzyków i organelli komórkowych, włączając w to segregację chromosomów (2). Białka te niezbędne są wszędzie tam, gdzie zachodzi potrzeba wykonywania ukierunkowanego ruchu i tam, gdzie podstawowy i najprostszy sposób transportu na poziomie komórkowym, to znaczy nieuporządkowane ruchy dyfuzyjne, nie jest wystarczająco efektywne.

Mając to na uwadze, nie jest zaskakujące, że kinezyne zostały odkryte w tkance nerwowej (3). Najbardziej charakterystyczny element neuronu stanowi długi akson, w którym nie jest przeprowadzana synteza białka, musi zatem być sprawnie zaopatrywany w odpowiednie składniki budulcowe. Każda komórka potrzebuje do prawidłowego funkcjonowania wielu różnych kinezyne. Ilość kinezyne znajdująca u różnych organizmów wiąże się z ich złożonością. U drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*) znajdujemy tylko 6 kinezyne (4), ale ludzki genom ma ponad 60 sekwencji kodujących kinezyne (4). Upośledzenie działania kinezyne może prowadzić do poważnych chorób, między innymi neurodegeneratywnych (5).

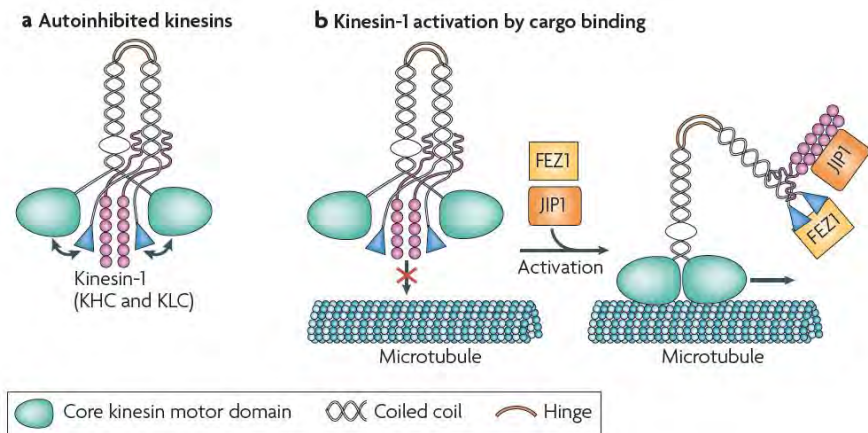
3.1.2. Ogólny schemat budowy kinezyne

Budowę tak zwanej kinezyne konwencjonalnej przedstawia **Rys. 3.1**. Jest ona tetramerem, na który składają się dwa takie same ciężkie łańcuchy (ang. *kinesin heavy chain*, KHC), którym zwykle towarzyszą dwa takie same lekkie łańcuchy (ang. *kinesin light chain*, KLC) (3) (nie ma ich konwencjonalna kinezyne grzybowa (6)). Każdy ciężki łańcuch tworzy globularną głowę (domenę katalityczną), która wraz z następującym po niej fragmentem zwanym szyjką łącznikową (ang. *neck linker*) formuje tak zwaną domenę motoryczną (ang. *motor domain*). Nazwa ta podkreśla fakt, iż ten element białka uważa się za kluczowy dla wykonywania ruchu przez kinezyne. Domena katalityczna wykazuje aktywność ATPazy, zawiera miejsce wiązania nukleotydu oraz miejsce wiązania z mikrotubulą. Buduje ją ok. 325 aminokwasów (7). Element strukturalny występujący zaraz za głową, wspomniana szyjka łącznikowa, ma długość około 15 aminokwasów (7).



Rys. 3.1. Budowa kinezyne konwencjonalnej (rysunek pochodzi z publikacji (8)).

Po szyjce łącznikowej następuje α -helikalna szyja (ang. *neck*), o długości około 30 aminokwasów (7), która przez zawias (ang. *hinge*) przechodzi w wydłużony (70 nm) helikalny trzon (ang. *stalk*), składający się z kilkuset aminokwasów. W tym miejscu dwa łańcuchy ciężkie są ze sobą splecione. Struktura helikalna przerywana jest zawiasami, ułatwiającymi zginanie cząsteczki i złożenie jej w nieaktywną postać, kiedy nie jest zaangażowana w transportowanie ładunku (**Rys. 3.2**), najprawdopodobniej w celu zapobieżenia niepotrzebnej hydrolizie ATP (8,9). Na drugim końcu łańcucha ciężkiego znajduje się globularna domena (50-130 aminokwasów) zaangażowana prawdopodobnie w wiązanie przenoszonego ładunku. Mniej więcej w tym miejscu wiążą się też łańcuchy lekkie.



Rys. 3.2. Autoinhibicja (a) i aktywacja (b) przez związanie z ładunkiem kinezyiny 1. Białka FEZ1 i JIP1, wiążąc się z kinezyną, przywracają jej zdolność do oddziaływania z mikrotubulą (rysunek pochodzi z publikacji (9)).

3.1.3. Klasyfikacja kinezyn

Obecnie znamy ponad 250 białek zaliczanych do grupy kinezyn (7). Cały zbiór białek zwanych kinezynami dzieli się na czternaście rodzin (10) (**Rys. 3.3**). Kinezyiny należące do różnych rodzin poruszają się z różną prędkością i procesywnością oraz w różnych kierunkach po mikrotubulach.

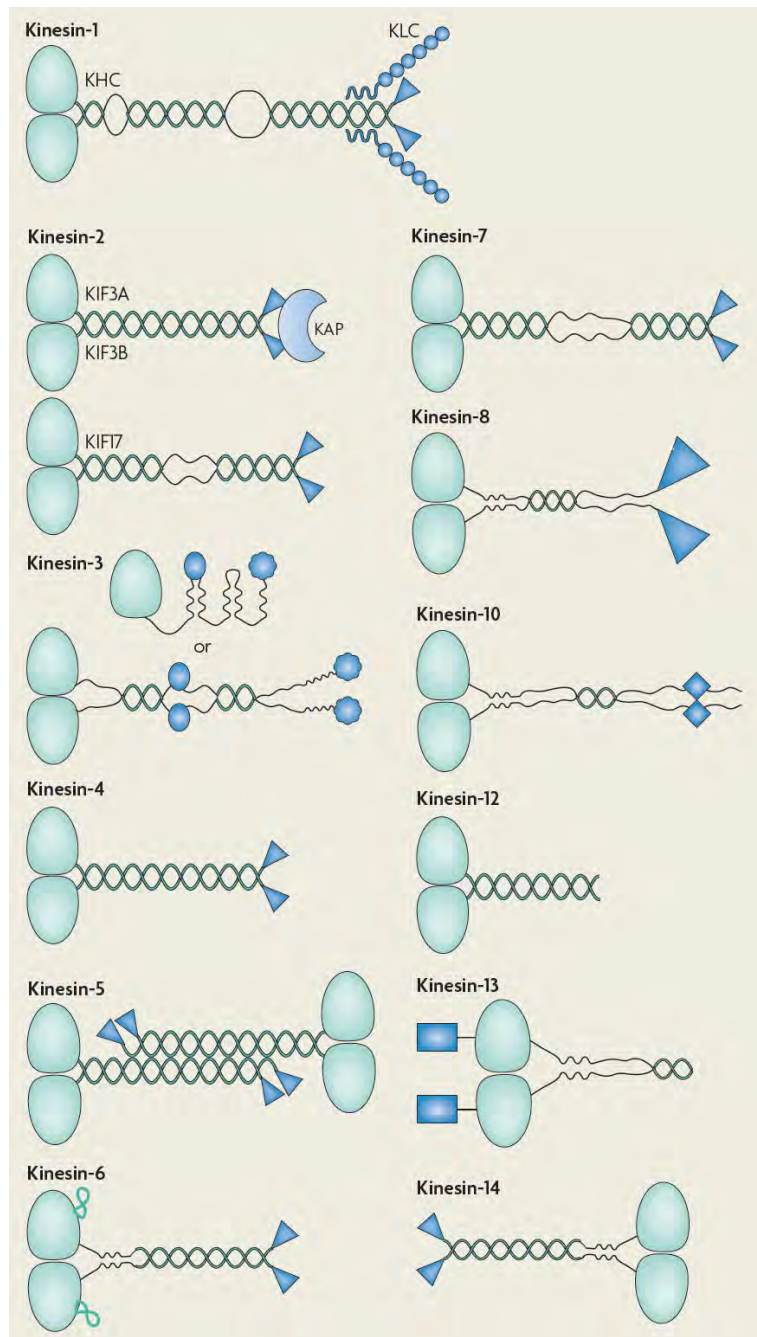
Do pierwszej rodziny należą między innymi konwencjonalne zwierzęce kinezyiny KHC, o budowie takiej jak na **Rys. 3.1**. Przykłady kinezyn zaklasyfikowanych do innych rodzin są podane na **Rys. 3.4**.

Łańcuchy ciężkie mogą, w przypadku różnych kinezyn, asocjować na różne sposoby i występować jako (**Rys. 3.3**):

- monomery (niektóre kinezyiny z rodziny 3);
- homodimery lub, dużo rzadziej, heterodimery (kinezyiny z rodzin 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14);

- homotetramery, utworzone przez połączenie dwóch homodimerów na sposób „głowa do ogona” (kinezy z rodziny 5).

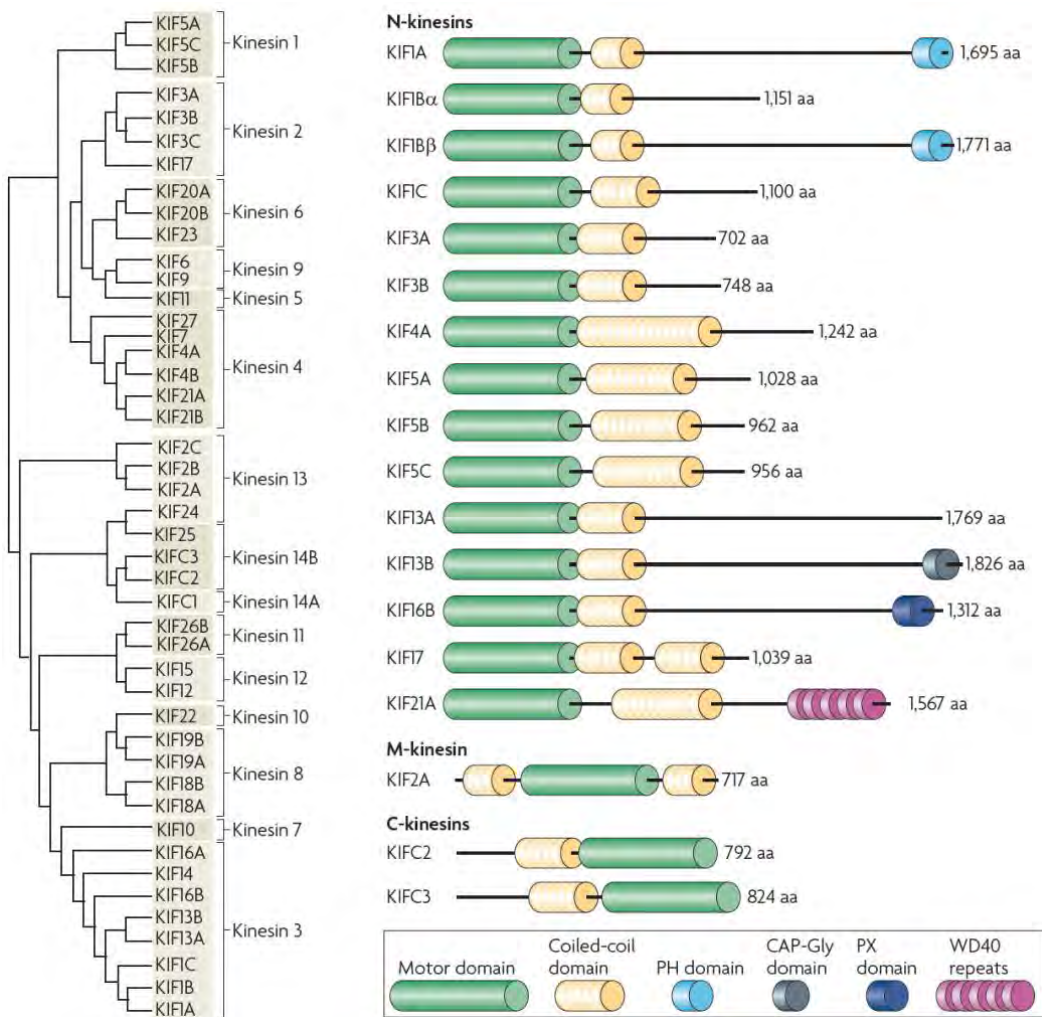
U większości kinezyn mamy do czynienia z występowaniem dwóch łańcuchów ciężkich (co oznacza obecność dwóch domen motorycznych).



Rys. 3.3. Różne rodziny kinezyn. KHC – łańcuch ciężki kinezyzny (ang. *kinesin heavy chain*); KLC – łańcuch lekki kinezyzny (ang. *kinesin light chain*); KAP – białko związane z kinezyną (ang. *kinesin-associated protein*) (rysunek pochodzi z publikacji (9)).

Ponadto kinezyzny zostały podzielone na trzy główne grupy ze względu na położenie domeny motorycznej w ciężkim łańcuchu białkowym (7) (Rys. 3.4):

- N-kinezyzny (z domeną motoryczną na końcu aminowym łańcucha),
- M-kinezyzny (z domeną motoryczną w środku łańcucha),
- C-kinezyzny (z domeną motoryczną na końcu karboksylowym łańcucha).



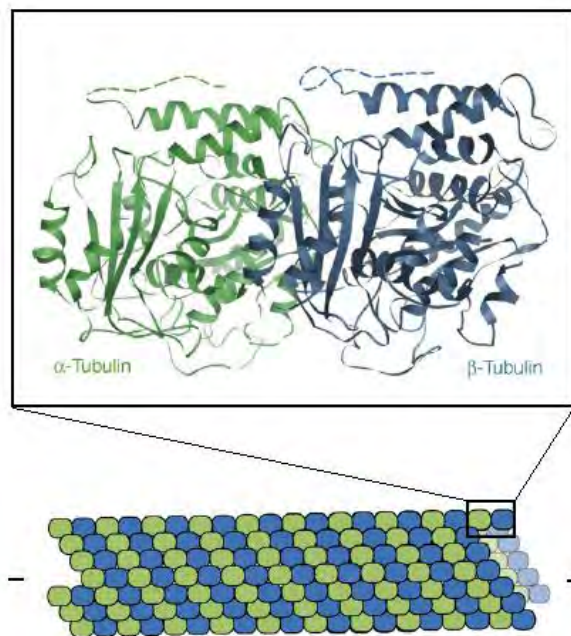
Rys. 3.4. Drzewo filogenetyczne i organizacja łańcucha ciężkiego u głównych kinezyzn znajdujących u myszy, podzielonych na rodziny od 1 do 14B (rysunek pochodzi z publikacji (2)).

Spośród kinezyzn obecnych u człowieka, trzy należą do C-kinezyzn, trzy do M-kinezyzn, a pozostałe są N-kinezyznami. Prawie wszystkie N-kinezyzny

poruszają się w kierunku plus po mikrotubuli, natomiast C-kinezyne poruszają się w kierunku minus. M-kinezyne nie są tak ruchliwe jak N- i C-kinezyne, i są używane na przykład do rozkładania filamentów mikrotubulowych (np. MCAK) (4). Istnieją też kinezyne, które łączą ze sobą i przesuwiają względem siebie mikrotubule podczas formowania wrzeciona mitotycznego w trakcie podziału komórki (np. kinezyne Eg5, która ma cztery identyczne domeny motoryczne (11)).

3.1.4. Mikrotubule

Mikrotubule są zbudowane z dwóch rodzajów homologicznych podjednostek: α -tubuliny oraz β -tubuliny, o masie 50 kDa każda. Układają się one naprzemiennie w heliakalną strukturę o kształcie wydrążonego cylindra o zewnętrznej średnicy 30 nm (Rys. 3.5). Mikrotubulę można też rozpatrywać jako strukturę złożoną z 13 protofilamentów, biegnących równolegle do jej osi. Jest to struktura biegunowa (koniec minus zakotwiczony jest blisko środka komórki, koniec plus skierowany jest ku powierzchni komórki). Koniec minus kończy się α -tubuliną, a koniec plus kończy się β -tubuliną (6).



Rys. 3.5. Schemat budowy mikrotubuli z zaznaczonymi końcami minus i plus. C-końcowe fragmenty α -tubuliny i β -tubuliny, niewidoczne w dostępnych strukturach krystalicznych, przedstawione są jako linie przerywane (rysunek pochodzi z publikacji (12)).

Aktyna również jest strukturą spolaryzowaną, ma ona tak zwany koniec haczykowany i koniec ostry. Filamenty pośrednie nie mają struktury biegunowej. Zapewne z tej przyczyny nie są znane żadne białka motoryczne poruszające się po nich (3). Mikrotubule, współtworząc tak zwany cytoszkielet, spełniają rolę w określaniu kształtu komórek, są też głównymi składnikami rzęsek i wici obecnych na powierzchni niektórych komórek eukariotycznych oraz uczestniczą w rozdzielaniu potomnych chromosomów w trakcie mitozy. Są zmiennymi strukturami, wydłużają się i skracają poprzez przyłączanie i odłączanie α - i β -tubuliny na końcu plus. Przyłączające się jednostki występują głównie w postaci GTP-tubuliny, która z czasem hydrolizuje do GDP-tubuliny. GDP-tubulina pozostaje stabilnie spolimeryzowana w mikrotubuli, jeżeli znajduje się wewnątrz struktury, jednak jeżeli znajduje się na końcu plus, to podjednostki te mają dużą tendencję do dysocjacji. W populacji mikrotubul niektóre ulegają skracaniu, a niektóre wydłużaniu, co jest rezultatem fluktuacji w liczbie GTP- i GDP-tubulin na końcu plus. Zjawisko to zwane jest dynamiczną niestabilnością.

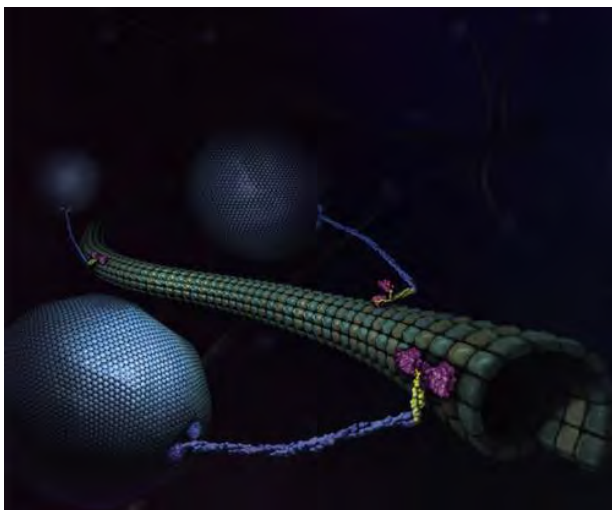
3.1.5. Sposób poruszania się kinezyzny

Ruch kinezyzny jest wysoce procesywny. Jednorazowo kinezyzna konwencjonalna potrafi wykonać około 100 kroków zanim odłączy się od mikrotubuli (13). Gdy jedna głowa związana jest ściśle z mikrotubułą, druga zostaje uwolniona i wykonuje ruch do następnego miejsca wiązania na mikrotubuli. Sposób poruszania się przypomina kroczenie. Każda domena motoryczna kinezyzny konwencjonalnej wiąże się do mikrotubuli w tej samej orientacji. Długość przeciętnego kroku wynosi ok. 8,2 nm (14), wartość ta odpowiada odległości pomiędzy kolejnymi podjednostkami α -tubuliny i β -tubuliny ułożonymi wzdłuż protofilamentu. Każdy krok wykonany pod małym obciążeniem wymaga hydrolizy jednej cząsteczki ATP. Wykonując ośmionanometrowe kroki przeciwko sile 7 pN, kinezyzna ma do dyspozycji 100 pN·nm energii z hydrolizy ATP, zatem wydajność procesu wynosi około 50% (15). W przybliżeniu prędkość ruchu kinezyzny wzdłuż mikrotubuli może osiągać 800 nm/s (8).

Wszystkie kinezyzny konwencjonalne (szczególnie dokładnie zbadane u *Drosophila*, szczura, człowieka) przemieszczają się w jednym kierunku: ze środka komórki do części peryferycznych, to znaczy w kierunku końca plus mikrotubuli. Jest to zrozumiałe zważywszy na podobieństwo ich sekwencji aminokwasowych. Istnieją jednak kinezyzny przemieszczające się w kierunku końca minus, wszystkie znane kinezyzny tego rodzaju należą do C-kinezyzn. Co więcej, wszystkie zbadane C-kinezyzny przemieszczają się w kierunku końca minus mikrotubuli (3). Najszerzej opisywanym przedstawicielem tej grupy jest białko Ncd *Drosophila*. W determinowaniu kierunku ruchu najprawdopodobniej dużą rolę odgrywa szyjka łącznikowa kinezyzny (7).

Carter i Cross (16) pokazali, iż pod wpływem działania dużej siły kinezyzna może zacząć przemieszczać się w kierunku przeciwnym do tego, który jest dla niej właściwy. Stosunek kroków wstecz i wprzód zwiększa się w miarę

zwiększania się siły. Wartość jeden osiąga przy sile równej 7 pN (czyli, wypadkowo, kinezyzna nie przemieszcza się po mikrotubuli).



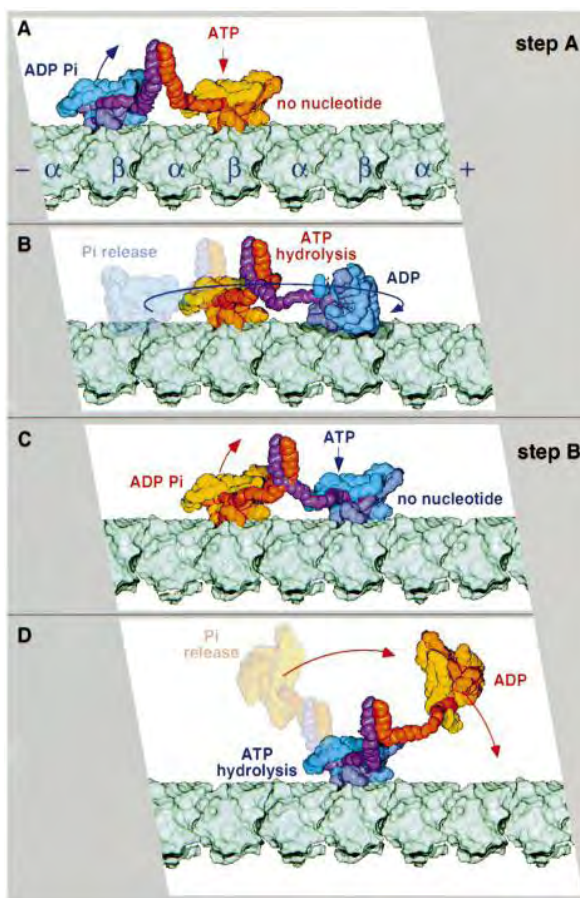
Rys. 3.6. Kinezyzna wędrująca po mikrotubuli wraz z transportowanym ładunkiem (z okładki *The Journal of Cell Biology*, Vol. 151, Nr 5, 27 listopada 2000).

Do niedawna rozpatrywano trzy główne modele poruszania się kinezyzny po mikrotubuli (17):

- Symetryczny model „noga-za-nogą” (ang. *symmetric hand-over-hand model*): Kinezyzna porusza się przed siebie tak, że przekłada naprzód raz jedną, raz drugą domenę motoryczną w ten sposób, że tylna głowa pokonuje odcinek o długości 16 nm, omijając przednią zawsze z tej samej strony. Skutkiem jest obrót całego trzonu o 180° w tę samą stronę podczas każdego kroku.
- Asymetryczny model „noga-za-nogą” (ang. *asymmetric hand-over-hand model*). Kinezyzna porusza się przed siebie tak, że przekłada naprzód raz jedną, raz drugą domenę motoryczną. Zamiana pozycji głów następuje w ten sposób, że tylna głowa pokonuje odcinek o długości 16 nm, omijając przednią raz z jednej, raz z drugiej strony. Wykonywane są zatem na przemian dwa rodzaje nierównoważnych sobie kroków (prawe i lewe). Jeżeli nawet podczas jednego kroku dochodzi do skręcenia względem stanu wyjściowego, to w kolejnym skręcenie to jest usuwane.
- Model ruchu gąsienicowatego (ang. *inchworm model*). Głowy co drugi krok zrównują swoje położenie na mikrotubuli. Jedna głowa wykonuje zawsze krok o długości 8 nm, wychodząc na prowadzenie, a druga w następnym kroku przemieszcza się o 8 nm, aby ją dogonić. Nie dochodzi do obrotu trzonu.

Obecnie ogólnie uznanym mechanizmem przemieszczania się kinezyzny po mikrotubuli jest asymetryczny model „noga-za-nogą” (18). Doświadczalnie stwierdzono, że domeny jednorazowo przemieszczają się o około 17 nm oraz że nie dochodzi do obracania trzonu kinezyzny (18). Ponadto pewne eksperymenty pokazują, że boczna siła spowalnia ruch kinezyzny w sposób niesymetryczny, co jest zgodne z modelem asymetrycznym (18).

Dodatkowym zagadnieniem związanym z tym modelem jest rozwiązanie problemu każdorazowego przemieszczania tylnej głowy do przodu bez powodowania obracania całego trzonu. Hoenger *et al.* (19) zaproponowali mechanizm, według którego w jednym kroku szyjka zawija się wokół trzonu, aby w następnym się odwinąć. W konsekwencji powinno to prowadzić do następowania po sobie wolnych (przy zawijaniu) i szybkich (przy odwijaniu) kroków (8). Schematycznie przedstawia to **Rys. 3.7**. Przeprowadzono eksperymenty, w których stwierdzono występowanie tego specyficznego „utykania”, przy czym kinezyzny ze sztucznie skróconym trzonem „utykały” bardziej. Rozważając ten mechanizm, należy pamiętać, że w przypadku homodimeru mamy do czynienia z dwiema identycznymi pod względem struktury i składu aminokwasowego domenami motorycznymi, które jednak potrafią wykonać w jednym przypadku prawy, a w innym lewy krok.



Rys. 3.7. Asymetryczny model „noga-za-nogą”. Podczas ruchu kinezyzny występują dwa nierównoważne sobie kroki A i B. Podczas kroku A dochodzi do zawinięcia szyjki (kolor fioletowy), a podczas kroku B do jej odwinięcia (kolor pomarańczowy) (rysunek pochodzi z publikacji (19)).

Rozpatrując ruch domen motorycznych, nie należy pomijać roli szyi kinezyzny. Gutiérrez-Medina *et al.* (20) sugerują, że między innymi dzięki elastyczności zawiasów szyi chwilowe naprężenia, które powstają w motorze podczas wykonywania kolejnych kroków, mogą być w miarę potrzeb rozpraszane. Ponadto bardzo rzadko (w około 2% przypadków) obserwowali oni skręcenie trzonu kinezyzny o 180° podczas jej pracy. W związku z tym zaproponowali, by podstawowy mechanizm asymetryczny uzupełnić o okazjonalną możliwość następowania po sobie dwóch kolejnych prawych lub lewych kroków. W takim przypadku dotychczasowe role głów się odwracają: ta, która dotychczas wykonywała kroki prawe, zaczyna wykonywać kroki lewe i odwrotnie. Niewykluczone, że obrót taki może służyć niwelowaniu ewentualnego nagromadzonego przy transportowaniu ładunku naprężenia skręcającego.

Mechanistyczny model ruchu kinezyzny zakłada, że wiązanie i hydroliza ATP (obecność lub brak γ -fosforanu) powoduje zmiany konformacyjne w miejscu wiążącym nukleotydy, które następnie są przekazywane do innych miejsc kinezyzny i amplifikowane, czego kulminacją jest wygenerowanie mocy i wykonanie kroku naprzód (21).

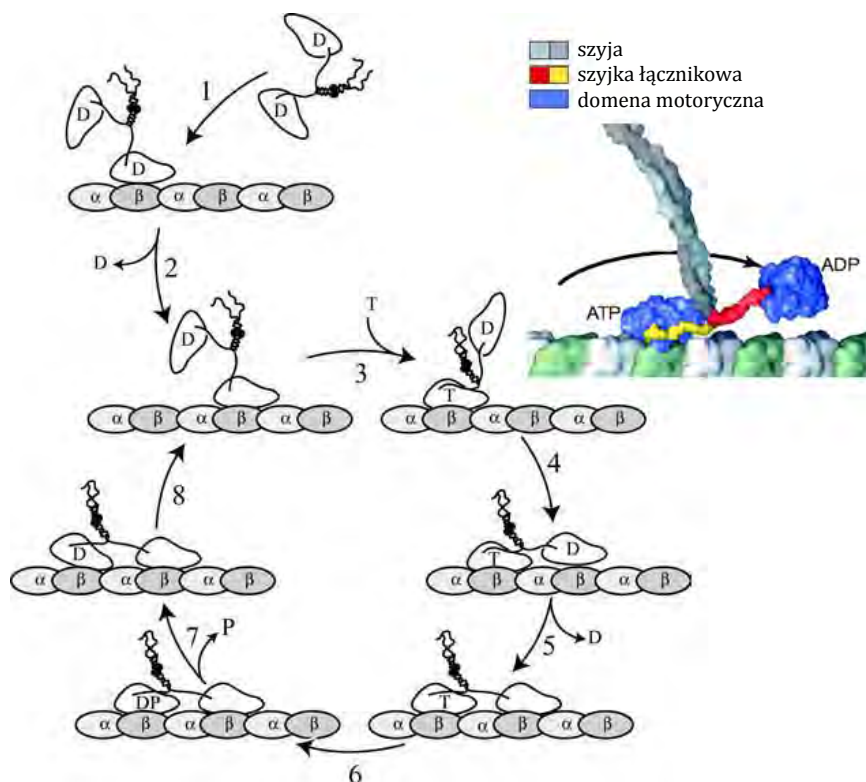
W modelu tym wyróżnia się trzy stany domeny motorycznej kinezyzny: związanej z ATP, związanej z ADP i bez związanego nukleotydu, które występują podczas następujących po sobie wydarzeń składających się na cykl pracy motoru: przyłączenia ATP, jego hydrolizy i uwolnienia produktów hydrolizy (najpierw fosforanu, w dalszej kolejności również ADP). Zmiany konformacyjne pomiędzy tymi stanami, jakie przypisuje się kinezyźnie na podstawie badań strukturalnych, nie są spektakularne. Stwierdzono, że kinezyzna bez nukleotydu lub związana z ATP wiąże się silniej do mikrotubul, a kinezyzna związana z ADP wiąże się słabiej lub nie wiąże się wcale. Największa zmiana konformacyjna dotyczy ułożenia szyjki łącznikowej.

Stąd wysunięto postulat, że to właśnie szyjka jest głównym elementem strukturalnym odpowiedzialnym za poruszanie się motoru. Według tej hipotezy, rola szyjki łącznikowej polega na tym, że zmienia ona swoje ułożenie przestrzenne w odpowiedzi na wiązanie nukleotydu. Mianowicie, pod wpływem przyłączenia ATP wiąże się ona w specyficzny sposób z domeną katalityczną kinezyzny, co może być czynnikiem powodującym pociągnięcie do przodu głowy tylnej (22). Czasem mówi się nawet, że szyjka jest w dużym stopniu odpowiedzialna za generowanie mocy (ang. *power stroke*), który to pogląd jest jednak często podawany w wątpliwość (więcej na ten temat w dalszej części).

Idea ruchu kinezyzny napędzanego hydrolizą ATP przedstawiona na

Rys. 3.8 jest następująca:

- Obie głowy kinezyzny wiążą ADP. Jedna z głów napotyka miejsce wiązania na mikrotubuli (etap 1).
- Szybko po tym traci ADP, co powoduje, że silniej wiąże się z mikrotubulą (etap 2).
- W pustym miejscu przyłącza się ATP, a następnie następuje zadokowanie szyjki łącznikowej do powierzchni głowy (etap 3).
- Druga z głów kieruje się ku następnemu miejscu wiązania na mikrotubuli w kierunku końca plus i po chwilowym dyfuzyjnym poszukiwaniu łączy się z nim (etap 4).
- Związanie głowy prowadzi do odłączenia od niej ADP i powstania w następstwie naprężenia, kiedy dwie głowy są związane z mikrotubulą. Naprężenie zapobiega związaniu ATP zanim nie nastąpi kolejny etap (etap 5).
- Głowa tylna przeprowadza hydrolizę ATP do ADP, co być może przyspieszane jest przez naprężenie pomiędzy głowami (etap 6).
- Uwalniany jest fosforan (etap 7).
- Osłabia się powinowactwo głowy do mikrotubuli, uwalnia się szyjka łącznikowa. Przyłączenie ATP do głowy prowadzącej da początek kolejnemu krokowi (etapy 8 i 3).



Rys. 3.8. Propozycja mechanizmu ruchu kinezyzny (rysunek pochodzi z publikacji (23) i (24)).

Jak to możliwe, że obecność jednej dodatkowej reszty fosforanowej może przyczyniać się do powstania tak znaczącej zmiany strukturalnej jak przyłączenie się szyjki łącznikowej do powierzchni domeny motorycznej? Mechanistyczny mechanizm ruchu, sugerowany na podstawie badań strukturalnych, próbuje wyjaśnić ten fenomen, odwołując się do konstrukcji domeny motorycznej, a szczególnie do elementów stanowiących otoczenie miejsca aktywnego.

3.1.6. Budowa domeny motorycznej w kontekście mechanizmu ruchu

Sposób zwinienia łańcucha w domenie motorycznej podobny jest u wszystkich znanych kinezyzn, czemu towarzyszy homologia sekwencji aminokwasowej (7). Budowę trzeciorzędową wraz z nazwami poszczególnych struktur przedstawia **Rys. 3.9**. Centralne osiem struktur tworzących β -kartkę ($\beta 1$ - $\beta 8$) otacza sześć α -helis ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), po trzy po każdej stronie. Włókna β są przestrzennie ułożone w kolejności: $\beta 2$, $\beta 1$, $\beta 8$, $\beta 3$, $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 4$, $\beta 5$, przy czym $\beta 5$ i $\beta 6$ biegają antyrównolegle w stosunku do pozostałych (6). Powierzchnia przez nie tworzona przypomina kształtem trójkąt. Odcinek $\beta 5$ jest przerwany przez

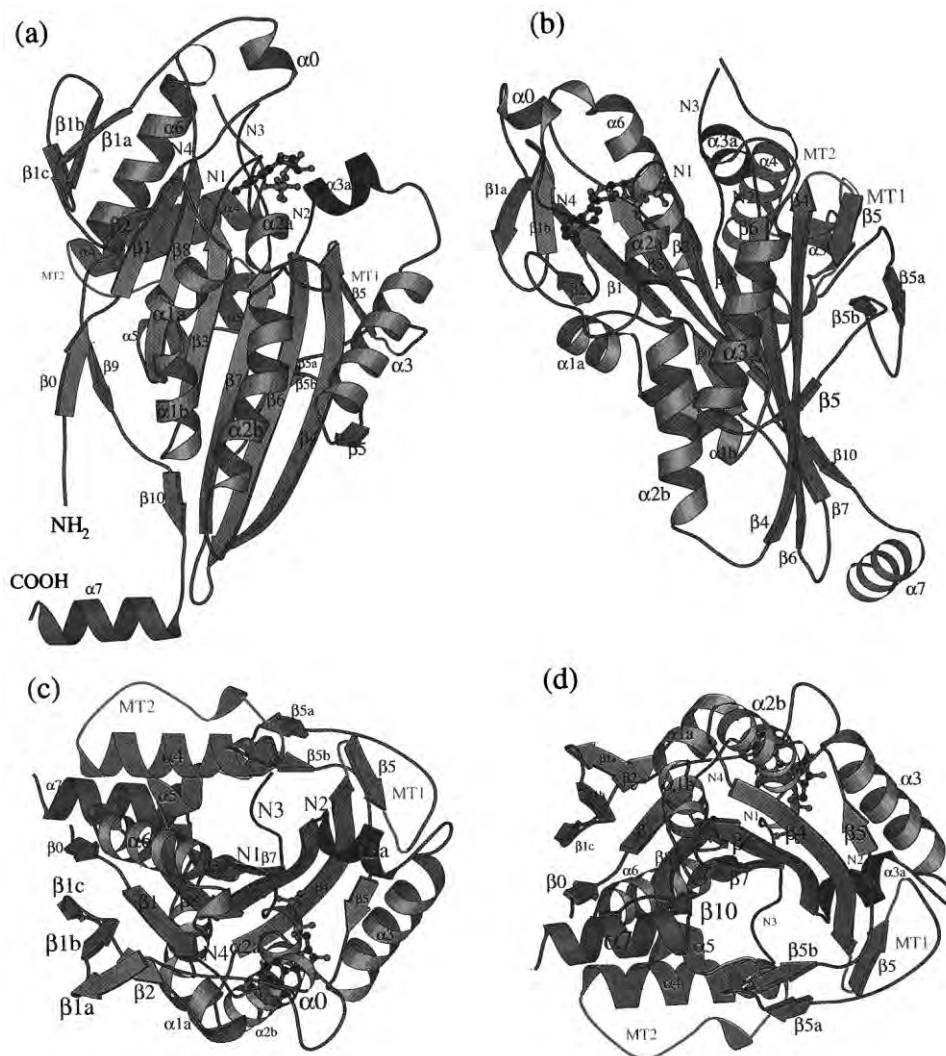
antyrownoległe struktury $\beta 5a$ i $\beta 5b$ oraz pętlę L8. Inne odgałęzienie ulokowane na obrzeżach centralnej β -kartki tworzy krótka helisa $\alpha 0$ wraz z włóknami $\beta 1a$, $\beta 1b$ oraz $\beta 1c$. W strukturze białka wyróżnia się też dość długa pętla L11, która jest niewidoczna w większości dostępnych struktur krystalicznych.

Obie powierzchnie centralnej β -kartki przykryte są przez helisy: $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ po jednej stronie, a $\alpha 4$, $\alpha 5$ i $\alpha 6$ – po stronie bezpośrednio oddziałującej z mikrotubulą (6). Całość nieco przypomina stożek, na którego czubku leży pętla L10 (pomiędzy strukturami $\beta 6$ i $\beta 7$) (6).

Szyjka łącznikowa znajduje się tuż za helisą $\alpha 6$. W stanie związanym z głową kinezyiny formuje struktury $\beta 9$ i $\beta 10$, które tworzą β -kartki odpowiednio z włóknem $\beta 0$ położonym przy końcu aminowym łańcucha białkowego i włóknem $\beta 7$ centralnej β -kartki (25). Koniec szyjki łącznikowej przy takim jej ułożeniu znajduje się blisko pętli L10, dalej szyjka łącznikowa przechodzi w szyję (jej początek widoczny jest na **Rys. 3.9** i nazwany helisą $\alpha 7$). Ten element struktury podlega dużym zmianom konformacyjnym podczas ruchu kinezyiny. W przypadku wielu dostępnych struktur krystalicznych jest on niewidoczny.

Można w tym miejscu dodać, że aminokwasy szyjki łącznikowej mają swój udział w stabilizowaniu helisy szyjnej (26). Natomiast same helisy szyjne są prawdopodobnie czymś więcej niż tylko pasywnym elementem, który wiąże ze sobą domeny motoryczne. Mutacje w ich regionie skutkują zmianami w charakterze ruchu kinezyiny (7).

Asocjacja dwóch domen motorycznych w funkcjonalny dimer może zajść, jeżeli obie cząsteczki będą zawierały odpowiedniej długości odcinki szyjne, które połączą się ze sobą. Kontakt pomiędzy samymi domenami katalitycznymi jest raczej nieduży. Otrzymano strukturę krystaliczną dimeru, gdzie oddziaływanie głów ograniczało się w zasadzie do kontaktu pomiędzy pętlą L8 jednej i pętlą L10 drugiej głowy (6).

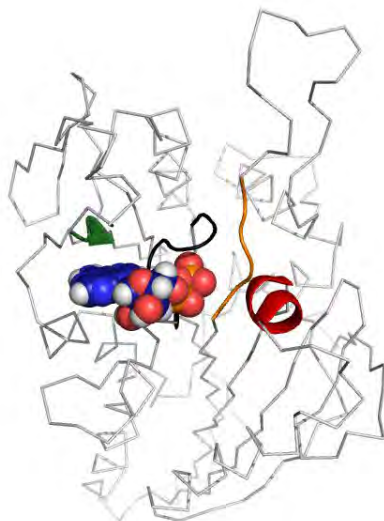


Rys. 3.9. Trzeciorzędowa budowa domeny motorycznej kinezy z fragmentem szyi, z czterech różnych punktów widzenia (rysunek pochodzi z publikacji (27)).

Centrum aktywne wiążące nukleotyd zawiera szereg zakonserwowanych ewolucyjnie elementów strukturalnych. Tworzą je cztery główne struktury, nazywane N1 (pętla P), N2 (przełącznik I), N3 (przełącznik II) i N4 (**Rys. 3.10**). Jak się przypuszcza, centrum aktywne i jego otoczenie odpowiadają zmianą konformacji na związanie nukleotydu i jego hydrolizę.

Numery i sekwencje aminokwasów, które będą podane w tej części, dotyczą konwencjonalnej kinezy ludzkiej o strukturze określonej przez Kull'a *et al.* (28), zapisanej w bazie Protein Data Bank jako 1BG2 (konstrukt znany pod

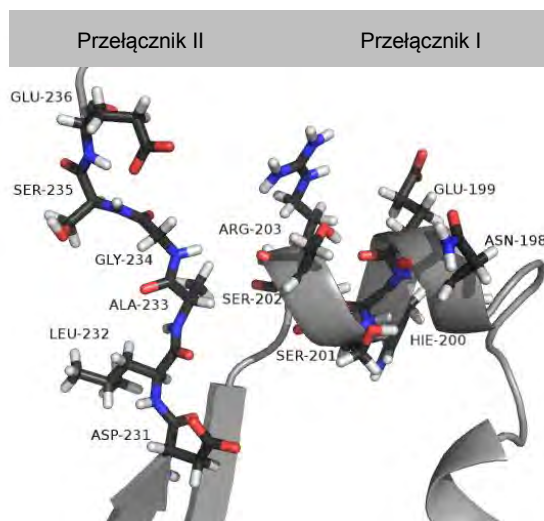
nazwą K349). Wyróżnienia ewolucyjnie zakonserwowanych aminokwasów wykonano według odnośnika (7).



Rys. 3.10. ADP (model sferyczny) w miejscu aktywnym zminimalizowanej struktury 1MKJ pobranej z Protein Data Bank. Pętla P – kolor czarny, przełącznik I – kolor czerwony, przełącznik II – kolor pomarańczowy, N4 – kolor zielony. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Pętla P (⁸⁵**GlyGlnThr**SerSer**GlyLysThr**⁹²) znajduje się tuż za włóknem β 3. Zadaniem jej jest związanie nukleotydu przez koordynację fosforanu β i γ (jeżeli jest obecny). Jest elementem strukturalnym powszechnie występującym w białkach wiążących mononukleotydy. Kluczowym elementem pętli P jest lizyna, która oddziałuje z ujemnie naładowanym fosforanem β . Obok niej występuje treonina lub seryna wiążąca kofaktor, jon Mg^{2+} (7). Tuż za pętlą P występuje histydyna H93, która oddziałuje z pierścieniem adozynowym (6).

Przełącznik I (¹⁹⁸**AsnGluHisSerSerArg**²⁰³) należy do helisy α 3a. Przełącznik II (²³¹**AspLeuAlaGlySerGlu**²³⁶) ułożony jest tuż za włóknem β 7, aminokwasy go tworzące należą w większości do pętli L11 (**Rys. 3.11**).



Rys. 3.11. Przełącznik I i II w zminimalizowanej strukturze 1MKJ pobranej z Protein Data Bank. Gdyby był obecny fosforan γ należący do ATP, to znajdowałby się tuż przed glicyną przełącznika II. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Element N4 ($^{14}\text{ArgPheArgPro}^{17}$) umiejscowiony jest tuż za włóknem $\beta 1$. Odpowiada on za wiązanie nukleotydu poprzez interakcje z jego fragmentem tworzonym przez zasadę, są to głównie oddziaływania hydrofobowe z pierścieniem adenozynowym.

Przełączniki I i II tworzą wiązania wodorowe z γ -fosforanem, układają w odpowiednim ułożeniu przestrzennym katalityczną wodę oraz posiadają grupy boczne ważne dla hydrolizy wiązania fosforanowego (24). Lokalne zmiany strukturalne przełączników zachodzące w wyniku odpowiedzi na obecność lub brak nukleotydu są amplifikowane przez elementy strukturalne w ich bliskim sąsiedztwie, zwane regionem przełącznika I i klastrem przełącznika II (ang. *switch I region*, *switch II cluster*).

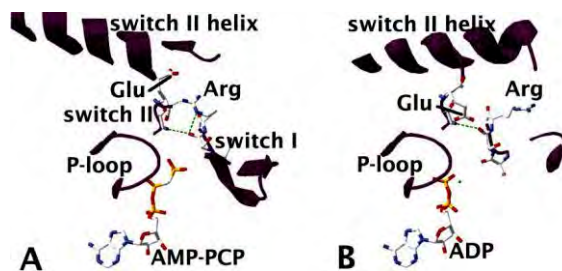
Na region przełącznika I składają się: helisa $\alpha 3$, pętla L9 oraz helisa $\alpha 3a$ (7). Położenie pętli L9 określa rozmiar kieszeni wiążącej nukleotyd (7). Elementy te położone są blisko struktury $\beta 5a$ -L8- $\beta 5b$, zatem mogą wpływać na wiązanie z mikrotubulą.

Na klaster przełącznika II składają się: helisa $\alpha 4$ (zwana czasem helisą przekaźnikową, ang. *relay helix*), pętla L12 i helisa $\alpha 5$ (6), a z przełącznikiem II połączony jest on poprzez aminokwasy pętli L11. Pętla ta, zwykle elastyczna, prawdopodobnie przyjmuje sztywną konformację, gdy kinezyzna połączona jest z mikrotubulą. Jako że klaster przełącznika II zawiera część elementów stanowiących miejsca oddziaływania kinezyzny z mikrotubulą, zatem należy się spodziewać, że zarówno związany nukleotyd może wpływać na oddziaływanie z mikrotubulą, jak i połączenie z mikrotubulą może spowodować przemieszczenie elementów odpowiadających za koordynowanie jonu magnezu i nukleotydu (29).

Pierwszego głębszego wglądu do natury zmian strukturalnych uważanych za kluczowe dla pracy białka, dostarczyły badania krystalograficzne monomerycznej kinezy KIF1A (29). Kinezyzna ta (jak zostanie jeszcze powiedziane niżej) ma pewne cechy odróżniające ją od kinezyn konwencjonalnych, ale generalnie dzieli z nimi bardzo podobną strukturę przestrzenną domeny motorycznej.

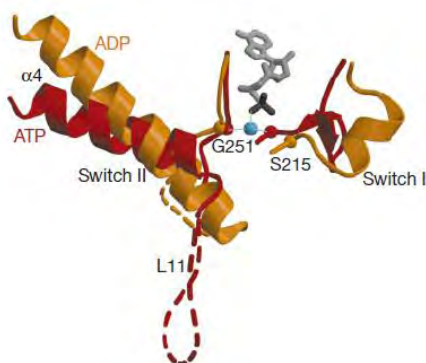
Należy zaznaczyć, że mechanizm ruchu i zmian konformacyjnych zaproponowany został na podstawie ograniczonej ilości dostępnych struktur, krystalizowanych w różnych warunkach i jako białka niezwiązane z mikrotubulami. Częściowo model mechanistyczny skonstruowany został na podstawie analogii z białkami G i miozynami. Możliwe na przykład, że prawdziwa konformacja kinezyzny w stanie związanej z ATP (taka, jaką ona jest podczas pracy, połączona z mikrotubulą) nie została jeszcze uzyskana (21).

Trzeba dodać, że dostępne struktury krystaliczne, które określa się jako „kinezyzna związana z ATP”, nie są tak naprawdę skompleksowane z ATP, ale z analogami ATP nieulegającymi hydrolizie. W takim znaczeniu używam tego określenia poniżej w odniesieniu do opisu zaobserwowanych zmian konformacyjnych.



Rys. 3.12. Porównanie struktury miejsca wiążącego analog ATP (A) i ADP (B) (rysunek pochodzi z publikacji (30)).

Uważa się, że w stanie związanej z ATP seryna przełącznika I i glicyna przełącznika II tworzą wiązania wodorowe z γ -fosforanem nukleotydu (Rys. 3.12). Przemieszczenie tych reszt uważane jest za pierwotną przyczynę przemieszczenia całych przełączników i utworzenia konformacji zamkniętej miejsca wiążącego nukleotyd. W stanie związanej z ADP brak γ -fosforanu skutkowałoł będzie otwartą konformacją miejsca wiążącego nukleotydu (31). Jak widać na Rys. 3.12 i Rys. 3.13, w stanie związanej z ADP znajdujący się w bezpośrednim sąsiedztwie nukleotydu fragment przełącznika I formuje helisę (α 3a), znajdującą się pomiędzy dwiema krótkimi pętelkami. W stanie związanej z ATP ten sam region tworzy krótką strukturę typu β -spinki, co powoduje zbliżenie się do nukleotydu i oddziaływanie z fosforanem γ z udziałem reszty serynowej.

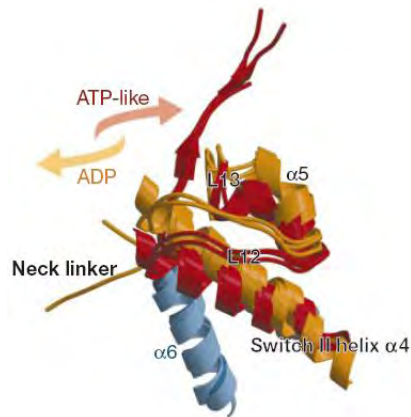


Rys. 3.13. Zmiany konformacyjne w przełączniku I i II (i okolicach) monomerycznej kinezyzny KIF1A w stanie związanym z ATP (kolor czerwony) i ADP (kolor żółty). Częsteczką wody tworząca mostek jest zaznaczona na niebiesko (rysunek pochodzi z publikacji (29)).

W przypadku pewnych wyznaczonych struktur kinezyzn odpowiadających stanowi ze związanym ATP, obserwuje się mostek solny pomiędzy łańcuchami bocznymi argininy z przełącznika I (AsnGluHisSerSerArg) i kwasu glutaminowego z przełącznika II (AspLeuAlaGlySerGlu) (**Rys. 3.12 A**), który z kolei nie występuje w stanie ADP (**Rys. 3.12 B**) (30). Uważa się, że mostek ten stabilizuje zamkniętą konformację miejsca aktywnego (21). Zamknięta konformacja jest niezbędna do przeprowadzenia hydrolizy ATP u miozyny, więc prawdopodobnie jest tak również w przypadku kinezyzny. Jednak jeżeli przyjąć, że układ przełączników u kinezyzny w stanie zdolnym do przeprowadzenia hydrolizy ATP jest taki sam jak u miozyny, to żadna z dostępnych struktur kinezyzn nie oddaje dokładnie tego stanu konformacyjnego (21).

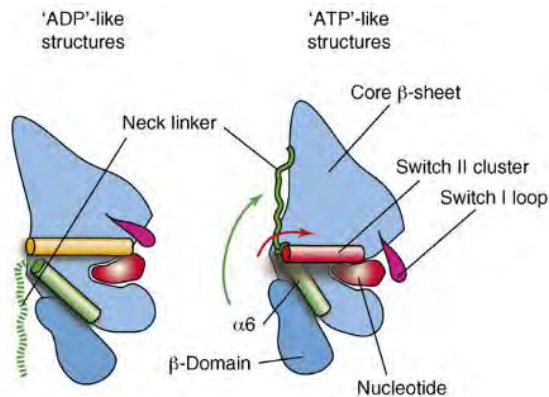
Kiedy w obecności ATP z γ -fosforanem zaczyna oddziaływać grupa amidowa glicyny z przełącznika II, ulega przegrupowaniu również cały klaster przełącznika II (**Rys. 3.13**).

Zaobserwowano, że w strukturach określanych jako odpowiadające kinezyźnie związanej z ATP wydłuża się pętla L11 kosztem skrócenia helisy przekątnikowej $\alpha 4$. Ponadto helisa $\alpha 4$ zostaje przesunięta ku nukleotydowi i przekręcona o około kilkanaście do dwudziestu stopni ku helisie $\alpha 6$. Pozostałe elementy przełącznika II podążają za tym ruchem (21).



Rys. 3.14. Zmiany konformacyjne w domenie motorycznej kinezyzny poruszającej się w kierunku plus mikrotubuli zależne od stanu związanego nukleotydu. Zaznaczona reorientacja szyjki łącznikowej; kolor czerwony – białko związane z ATP, kolor żółty – białko związane z ADP (rysunek pochodzi z publikacji (29)).

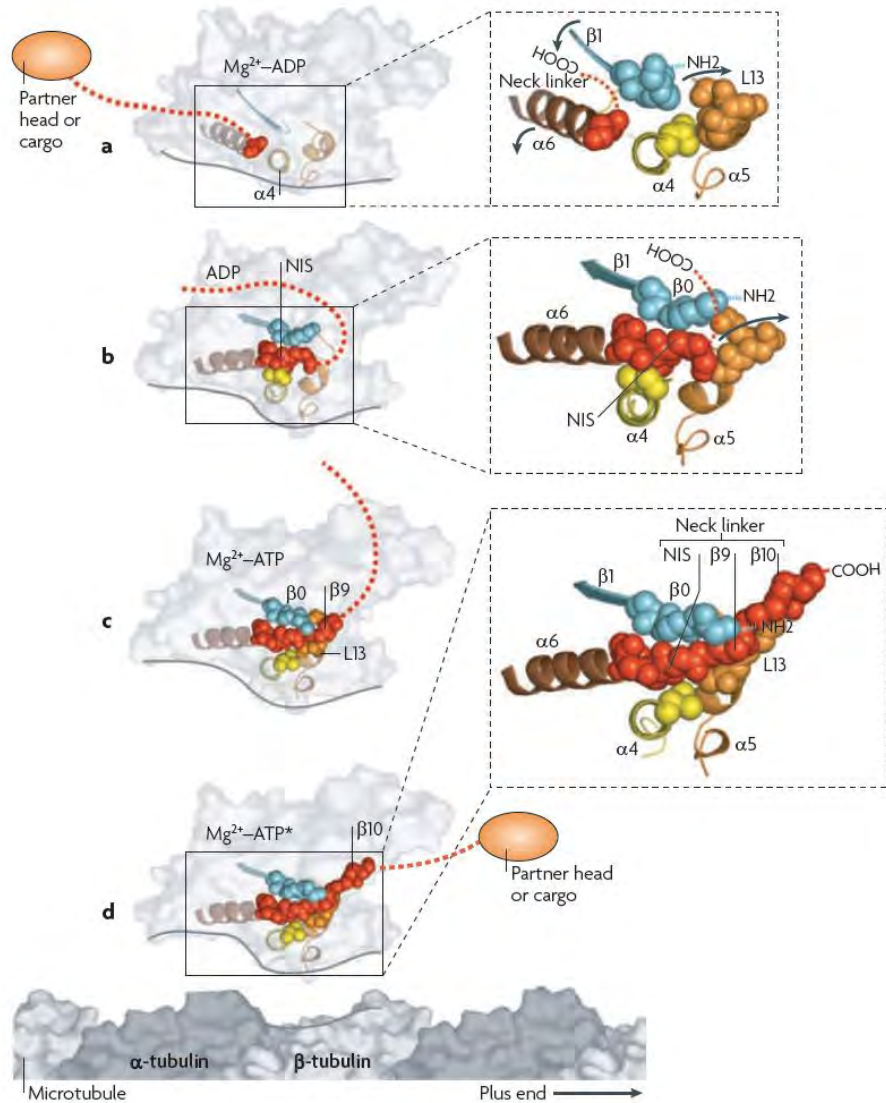
Dzięki tym przesunięciom, po przyłączeniu ATP do kinezyzny dochodzi do uwolnienia miejsca do zadokowania szyjki i umożliwiające jest jej związanie (**Rys. 3.14**, **Rys. 3.15**, **Rys. 3.16**), pierwszą resztą szyjki oddziałującą z domeną motoryczną jest Ile325.



Rys. 3.15. Schemat zmian w strukturze przestrzennej domeny motorycznej w stanie połączonym z ADP i ATP. W przypadku kinezyzny wiążącej ADP, przyłączenie szyjki jest utrudniane przez zawadę przestrzenną (rysunek pochodzi z publikacji (15)).

Yan-Bin *et al.* (32) twierdzą, iż cząsteczki wody mogą asystować w procesie dokowania się szyjki do domeny motorycznej poprzez tworzenie pośredniczących wiązań wodorowych tam, gdzie bezpośrednie związanie wiązaniami wodorowymi głowy i szyjki jest niemożliwe. Ponadto, tworząc sieć

wiązań wodorowych otaczających zakotwiczoną szyjkę, mogą przyczyniać się do stabilizowania oddziaływań o charakterze hydrofobowym pomiędzy szyjką i domeną katalityczną.



Rys. 3.16. Trójstopniowe dokowanie się szyjki łącznikowej u monomerycznej kinezy KIF1A. a) w stanie związanym z ADP i Mg^{2+} szyjka jest odłączona; b) po uwolnieniu jonu Mg^{2+} dokuje się początkowy odcinek szyjki łącznikowej; c) po wymianie ADP na ATP dokuje się odcinek $\beta 9$, łącząc się z N-końcowym fragmentem $\beta 0$ oraz pętlą L13; d) miejsce wiążące nukleotyd się zamyka, czemu towarzyszy przyłączenie się odcinka $\beta 10$ (rysunek pochodzi z publikacji (33)).

Przedstawiony mechanizm na pierwszy rzut oka może wydawać się spójny i przekonujący, ale pod pewnymi względami jest niepełny lub dyskusyjny.

Nie zostało ostatecznie rozstrzygnięte, w jaki właściwie sposób kinezyzna jest zdolna do procesywnego ruchu w jednym kierunku. Okazjonalnie wykonuje ona również ruchy do tyłu, ale bardzo rzadko, mniej więcej raz na 2000 kroków (34). Szybkość ruchu naprzód zmniejsza się ze zwiększeniem obciążenia, choć szybkość ruchu do tyłu nie rośnie (podnosi się bariera energetyczna dla kroku naprzód, ale w zasadzie nie zmienia dla kroku do tyłu) (35). W wyniku tego można obserwować względne zwiększenie ilości kroków do tyłu przy większym obciążeniu ładunkiem. W normalnych warunkach pracy, z ruchem do przodu związana jest mniejsza energia aktywacji niż z ruchem do tyłu. Różnica wynosi około $6k_B T$ (35). Modele, które całą siłę napędzającą motor wiąże z dokowaniem szyjki łącznikowej, budzą wiele zastrzeżeń. Otóż energia związana z oddziaływaniem polegającym na związaniu szyjki łącznikowej do domeny katalitycznej jest szacowana na około $1-2k_B T$ (34). Jest zatem zbyt mała, by wyjaśnić wspomnianą różnicę w barierze energetycznej. Biorąc pod uwagę także niewielkie rozmiary i stosunkowo dużą elastyczność szyjki łącznikowej, nie bardzo wiadomo, jak miałyby powodować tak silne szarpnięcie, które przemieściłoby drugą głowę na odległość 16 nm.

Taniguchi *et al.* (35) rozkładają entalpię swobodną aktywacji ΔG^* na dwie składowe: entalpową ΔH^* i entropową ΔS^* (jako że $\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^*$). Pokazują, na podstawie analizy kinetyki ruchu kinezyzny w zależności od temperatury, że właściwe ukierunkowanie ruchu wynika głównie z różnicy w entropii aktywacji pomiędzy krokami do przodu i do tyłu. Autorzy sugerują, że za ukierunkowany ruch odpowiadać może czynnik geometryczny i proponują w związku z tym następujący mechanizm: O ile związane szyjki łącznikowej zapewnia wkład do entalpii swobodnej na poziomie $1-2k_B T$, to pozostałe $4-5 k_B T$ ma podłoże entropowe i pochodzi od wzajemnego przestrzennego niedopasowania geometrii głowy kinezyzny i miejsca wiążącego na mikrotubuli. Ponieważ szyjka łącznikowa jest krótka, liczba możliwych sposobów ułożenia odłączonej głowy względem miejsca wiążącego na mikrotubuli jest różna dla ułożenia głowy w kierunku „naprzód” i „do tyłu” (odpowiadającemu wykonaniu kroku odpowiednio w kierunku końca plus i minus mikrotubuli). Autorzy sugerują, iż w przypadku pozycji „naprzód” najbardziej korzystna orientacja głowy pokrywa się z miejscem wiążącym na mikrotubuli, natomiast w przypadku pozycji „do tyłu” najpowszechniej reprezentowane w tym stanie konformacyjnym białka położenie głowy nie pokrywa się z miejscem wiążącym mikrotubuli. Dzięki temu mamy do czynienia z widocznym ukierunkowaniem ruchu.

Innym czynnikiem, o którym się mówi, że może dawać istotny wkład do entalpii swobodnej, jest uwolnienie nukleotydu zachodzące w następstwie przyłączenia domeny motorycznej do mikrotubuli w kolejnym miejscu wiążącym. (15).

Analizując skonstruowany przez siebie model kinezyzny, Czövek *et al.* (36) zawyrokowali, iż dokowanie się szyjki łącznikowej jest kluczowym etapem ruchu motoru. Co prawda ich model pozwalał kinezyźnie na wędrowkę po

mikrotubuli nawet bez dokowania szyjki, ale tylko bez obciążenia. Natomiast przy poruszaniu się przeciwko sile 7 pN, najlepszym rozwiązaniem według autorów jest posiadanie szyjki o długości około 13-14 aminokwasów, z których większość zdolna będzie do połączenia z domeną motoryczną (taka sytuacja zbliżona jest do tej, którą znamy ze zbadanych struktur kinezyń).

Hariharan i Hancock (37) przeanalizowali długości szyjek łącznikowych wśród wybranych rodzin kinezyń. U kinezyń z rodziny 1 była ona równa około 14, dłuższa występowała na przykład u kinezyń z rodziny 2, gdzie wynosiła około 17. Najdłuższa szyjka spośród przeanalizowanych rodzin występowała u rodziny 5 i 7. W przypadku rodzin 1, 2 i 5, wraz ze wzrostem długości szyjki mamy do czynienia ze zmniejszającą się procesywnością. Wyjątkiem jest rodzina 7, u której procesywność jest znacznie większa niż w rodzinie 5, za co prawdopodobnie odpowiadają występujące u kinezyń z rodziny 7 dodatnio naładowane aminokwasy obecne w odcinku szyjnym. Mierzyli oni również siły potrzebne do rozciągania szyjek. Szyjki są stosunkowo krótkie, a mimo to muszą połączyć ze sobą dwie domeny przyczepione do mikrotubuli. Według ich symulacji, siła potrzebna do rozciągnięcia szyjki na pożądaną długość (około 4 nm) była kilkakrotnie większa od tej, przeciw której pracę może wykonywać motor. Pytanie, jak może dochodzić do dyfuzji głowy do następnego miejsca wiązania na mikrotubuli przeciwko napięciu tego rzędu, pozostaje bez odpowiedzi. Można spekulować, że ewentualne częściowe rozwinięcie końcówki helisy $\alpha 6$ może wspomagać ten proces.

W pracy Shu *et al.* (38) została omówiona wyznaczona metodami obliczeniowymi zależność prędkości poruszania się kinezyń od długości szyjki. Stwierdzili oni, że prędkość równa maksymalnej prędkości konwencjonalnej kinezyń jest osiągnięta przy długości 14-16 aminokwasów. Odpowiada to długości szyjki znajdującej się w naturalnych kinezyń z rodziny 1 i wskazuje na to, że długość ich szyjek jest optymalnie dobrana w celu maksymalizacji prędkości.

Zważywszy na imponującą procesywność motoru, należy oczekiwać, że mamy do czynienia ze skutecznymi mechanizmami bramkowania, zapewniającymi efektywną koordynację pomiędzy głowami i zapobiegającymi wykonywaniu kroków do tyłu (39).

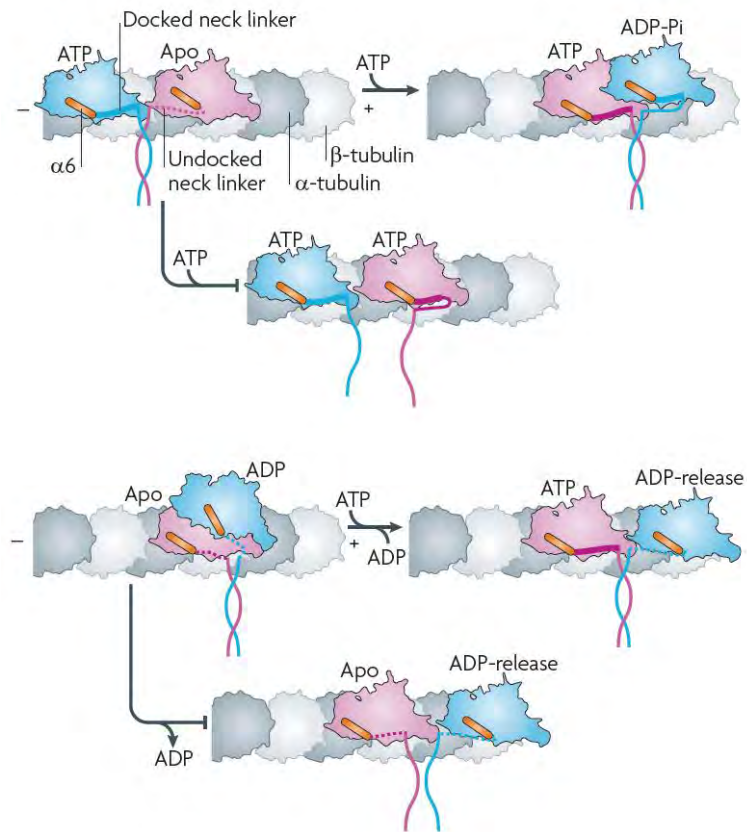
Jednym z ważnych problemów dotyczących mechanizmu ruchu jest utrzymanie obu głów enzymatycznie w innych fazach, aby nie doszło do symultanicznego odłączenia obu głów od mikrotubuli. Są podstawy, aby przypuszczać, że wewnętrzne naprężenia w motorze, powstające, gdy obie głowy są związane z mikrotubulą, są odpowiedzialne za procesywność ruchu. Zaproponowano, że naprężenie to działać może na dwa sposoby, które określa się bramkowaniem przez głowę tylną lub bramkowaniem przez głowę prowadzącą (ang. *rear-head gating*, *front-head gating*). Pierwszy postulowany sposób bramkowania polega na tym, że dzięki naprężeniu przyspieszane jest uwalnianie tylnej głowy po związaniu się przedniej, a drugi na tym, że hamowane jest przedwczesne wiązanie się ATP do głowy przedniej. Oba mechanizmy nie wykluczają się wzajemnie.

Rosenfeld *et al.* (40) skłaniają się do stwierdzenia, że naprężenie to utrudnia wiązanie i hydrolizę ATP przez prowadzącą głowę, zanim tylna nie

przeprowadzi hydrolizy i nie odłączy się od mikrotubuli (etapy 6, 7 i 8 na **Rys. 3.8**). Wtedy ATP szybko przyłączy się do prowadzącej głowy, a tylna skieruje się ku następnemu miejscu wiązania.

Na rolę naprężenia w ruchu kinezyzny wskazali także Miyazono *et al.* (41). Skonstruowali oni hybrydy kinezyzny z DNA, co umożliwiło precyzyjną kontrolę odległości pomiędzy głowami. Badania te potwierdziły, że napięcie pomiędzy głowami jest niezbędne do komunikacji pomiędzy głowami i efektywnego ruchu. Autorzy są bliżej uznania bramkowania przez głowę prowadzącą jako mechanizmu koordynującego ruch. Spekulują, że wiązanie ATP jest w odpowiednim czasie blokowane, ale nie przypuszczają, żeby sama aktywność ATPazy była upośledzana.

Według Hirokawy (33) koordynację pomiędzy głowami zapewniają dwa czynniki: po pierwsze wiązanie ATP do głowy prowadzącej jest wstrzymane do chwili przeprowadzenia hydrolizy w głowie tylnej; po drugie uwalnianie ADP z głowy znajdującej się z przodu nie zachodzi tak długo, jak długo do głowy tylnej nie zostanie przyłączone ATP. Regulacja odbywałaby się dzięki naprężeniu szyjek łącznikowych. Ich ograniczona długość nie pozwala na silne związanie się głowy prowadzącej z mikrotubulą zanim tylna głowa nie przeprowadzi hydrolizy ATP i nie odłączy się od mikrotubuli (**Rys. 3.17**).



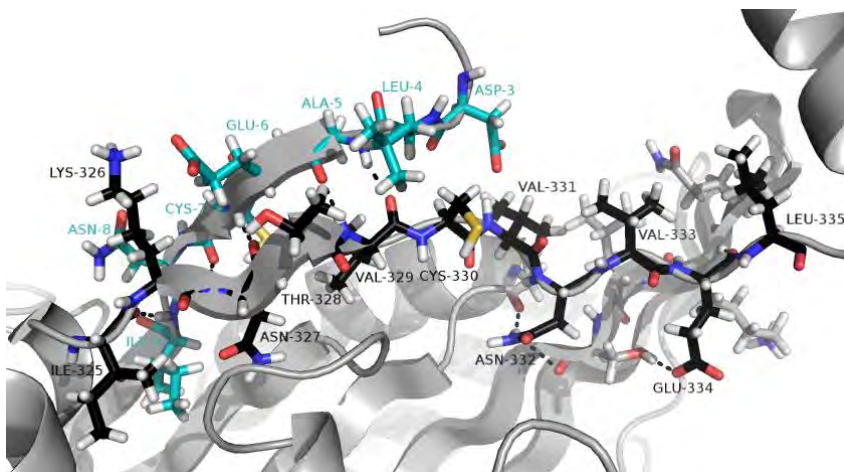
Rys. 3.17. Bramkowanie w przypadku dwugłowej kinezy. U góry: Szyjki łącznikowe są za krótkie, aby dwie głowy mogły znaleźć się w konformacji charakterystycznej dla związanego ATP (to znaczy przyłączone do powierzchni domen katalitycznych). Głowa różowa, bez związanego nukleotydu, nie przyłączy ATP dopóki głowa tylna nie odłączy się od mikrotubuli. Na dole: Ograniczona długość szyjki łącznikowej nie pozwala silnie połączyć się odłączonej głowie z mikrotubulą (i uwolnić ADP) zanim do głowy związanej z mikrotubulą nie przyłączy się ATP (rysunek pochodzi z publikacji (33)).

Clancy *et al.* (13) wydłużyli szyjkę łącznikową kinezy, obserwując, że spowodowało to zmienienie motoryki. Stwierdzili oni, że wydłużenie to pozwoliło obu głowom kinezy jednocześnie związać się stabilnie z mikrotubulą. Zaproponowali też mechanizm bramkowania, który niekoniecznie wymagał naprężenia pomiędzy głowami, związany z orientacją szyjki łącznikowej.

3.1.7. Rola N-końcowej części domeny motorycznej

Okazuje się, że w postaci zadokowanej pierwsza i druga połowa szyjki łącznikowej (β_9 i β_{10}) oddziałują z domeną katalityczną na nieco inny sposób

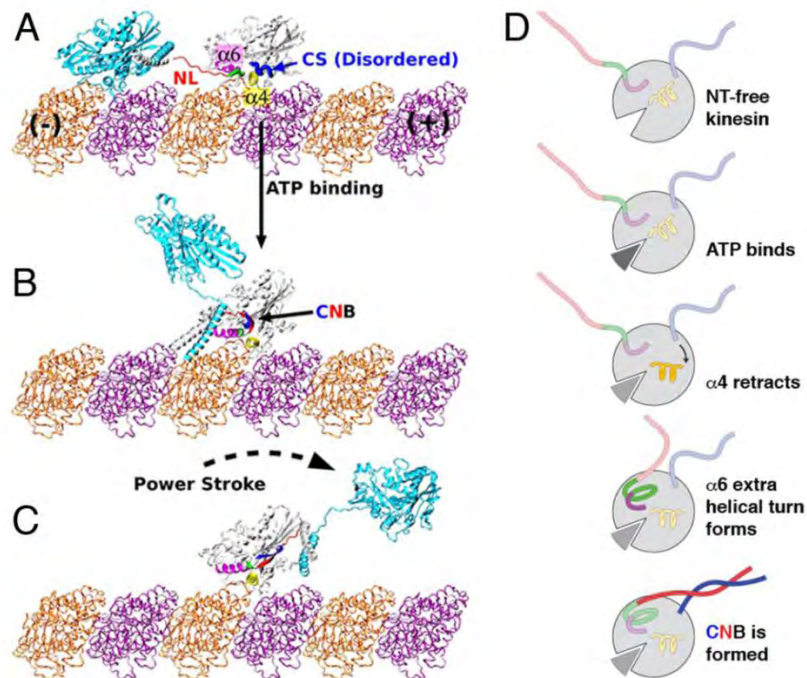
(25) (**Rys. 3.18**). Otóż oddziaływanie włókna $\beta 9$ z samą głową jest stosunkowo słabe (z głównym wyjątkiem początkowego aminokwasu szyjki Ile325), zamiast tego element ten oddziałuje z włóknem $\beta 0$. Struktura $\beta 0$ jest tworzona przez N-końcową, około dziewięćaminokwasową część łańcucha ciężkiego (ang. *cover strand*, CS). Pierwsze główne oddziaływanie pomiędzy szyjką a głową ma miejsce pomiędzy resztą Asn332, umiejscowioną pomiędzy $\beta 9$ i $\beta 10$, która tworzy wiązania wodorowe z Gly76 (głównie) i Ser224. Natomiast struktura $\beta 10$ jest częścią małej β -karkki tworzonyj z włóknem $\beta 7$ głowy. Jak pokazuje porównanie struktur 1BG2 i 1MKJ (różniących się położeniem szyjki łącznikowej), położenia zarówno Gly76 jak i $\beta 7$ niewiele się zmieniają, zatem raczej nie mogą bezpośrednio kontrolować dokowania się szyjki łącznikowej pod wpływem ATP. Opierając się na wynikach symulacji, Hwang *et al.* (25) postulują, że współdziałanie początkowego odcinka szyjki łącznikowej połączonego wraz z włóknem $\beta 0$ w β -karkkę (struktura zwana z angielskiego *cover neck bundle*, CNB) prowadzi do wygenerowania większej siły od tej, którą byłaby w stanie wygenerować sama szyjka i jest właściwym czynnikiem wymuszającym dokowanie się całej szyjki. Co ciekawe, siły które zmierzli, różniły się w przypadku symulacji z uwzględnieniem cząsteczek wody i bez ich jawnego uwzględniania.



Rys. 3.18. Szyjka łącznikowa (atomy węgla koloru czarnego) tworząca strukturę CNB z N-końcowym fragmentem łańcucha ciężkiego (atomy węgla koloru niebieskiego) w zminimalizowanej strukturze 1MKJ pobranej z Protein Data Bank. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Przywołałam chwilę wcześniej pewne eksperymenty, które wskazują na to, że szyjka łącznikowa nie jest zaangażowana jedynie w umożliwianie ruchu i określanie jego kierunku, ale również ma znaczenie dla jego szybkości. Różne kinezy, pomimo podobieństwa budowy, mogą poruszać się z różną prędkością. Nie ma do tej pory kompleksowego i satysfakcjonującego wyjaśnienia tego zjawiska. Kalchishkova i Böhm (42) przeprowadzili

eksperymenty, podczas których dokonali wymiany szyjek łącznikowych i szyj dwóch kinezyń, z których jedna (KIF5A) porusza się 25 razy szybciej niż druga (Eg5). Wymiana ta spowodowała, że początkowo szybka kinezyzna KIF5A utraciła zdolność poruszania, a powolna Eg5 zaczęła się poruszać z większą prędkością. Jeżeli kinezyzie KIF5A pozostawić tylko jej pierwszą połowę szyjki łącznikowej (tę, która tworzy β -kartkę wraz z włóknem β), a pozostałą część dostawić z kinezyzny Eg5, zdolność poruszania się zostanie przywrócona. Najwyraźniej szyjka kinezyzny Eg5 nie potrafi utworzyć β -kartki z włóknem β kinezyzny KIF5A. Przesłanki te skłaniają do rozważenia ewentualnego uwzględnienia w modelu poruszania się kinezyzny etapu tworzenia się i zrywania CNB podczas dokowania i odłączania się szyjki z powierzchni domeny motorycznej.



Rys. 3.19. Model generowania mocy przez kinezyne z udziałem CNB. A) Szyjka łącznikowa i N-końcowy odcinek łańcucha ciężkiego są rozłączone. B) Przyłączenie ATP, wycofanie helisy α_4 , utworzenie dodatkowego skrętu w helisie α_6 , utworzenie CNB. C) Generacja mocy i przrzućenie tylnej głowy do przodu (rysunek pochodzi z publikacji (43)).

Khalil *et al.* (43) zbadali dwa mutanty, z których jeden pozbawiony został możliwości tworzenia CNB poprzez wycięcie odpowiedniego odcinka łańcucha białkowego, u drugiego natomiast CNB mógł się utworzyć, ale był bardziej giętki z powodu zmiany dwóch aminokwasów na glicyny. Mutacje

spowodowały zmiany w zachowaniu się kinezyzny w porównaniu z formą naturalną. Większa elastyczność doprowadziła do tego, że struktura mogła wygenerować mniejszą siłę, ale mogła działać szybciej. Natomiast delecja skutkowałą dużym upośledzeniem ruchu białka: procesywność uległa znacznemu pogorszeniu. W tym przypadku dopiero wprowadzenie pomocniczej siły asystującej (1,5 pN) spowodowało polepszenie charakterystyk ruchu motoru. Zdaniem autorów w przypadku, gdy nie tworzy się struktura CNB, ruch tylnej głowy do przodu i poszukiwanie miejsca wiązania na mikrotubuli będzie głównie powodowany fluktuacjami termicznymi. Przez to proces ten będzie bardziej powolny niż gdybyśmy mieli do czynienia z aktywnym ukierunkowaniem głowy w kierunku do przodu przez generację siły. Być może to właśnie jest przyczyną małej procesywności: głowa połączona z mikrotubulą zdąży przeprowadzić hydrolizę ATP i odłączyć się od mikrotubuli zanim druga się przyłączy. Postulowany przez autorów mechanizm generacji mocy wspomagany przez tworzenie CNB przedstawia się następująco (**Rys. 3.19**):

A) Szyjka łącznikowa i N-końcowy odcinek łańcucha ciężkiego są rozłączone.

B) Przyłączenie ATP skutkuje wycofaniem helisy $\alpha 4$ oraz utworzeniem dodatkowego skrętu w helisie $\alpha 6$, co pozwala na zbliżenie szyjki łącznikowej i CS, aby utworzyć CNB.

C) Następuje generacja mocy i przerzucenie tylnej głowy do przodu, szyjka łącznikowa zakotwicza się na domenie katalitycznej.

3.1.8. Kinezyzny niekonwencjonalne

Kinezyzny mają zróżnicowaną strukturę i mogą funkcjonować w komórce jako monomery, dimery i tetramery. Mechanizm ruchu odmiennie zbudowanych kinezyzn nie został jednak tak dokładnie przestudiowany jak w przypadku kinezyzn konwencjonalnych.

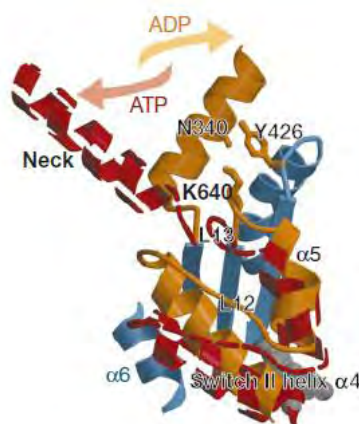
Przykładem monomerycznej struktury, w przypadku której doniesiono o jej umiejętności poruszania się wzdłuż mikrotubul (aczkolwiek powolnego), jest białko KIF1A (44). Długość jej kroku nie jest tak ściśle zdeterminowana jak w przypadku kinezyzny konwencjonalnej i potrafi ona wykonywać pracę przeciwko mniejszej sile (45). Model poruszania się monomeru przewiduje, że w stanie wyjściowym kinezyzna jest skierowana w stronę plus mikrotubuli i związana z nią oddziaływaniami elektrostatycznymi. Następnie przyłączenie i hydroliza ATP powodują zmianę oddziaływania z mikrotubulą i zmiany konformacyjne, po których następuje dyfuzyjne przesunięcie wzdłuż mikrotubuli.

Kluczem do procesywnego ruchu jest prawdopodobnie tak zwana pętla K (znajdująca się w rejonie pętli L12), która zawiera dodatnio naładowane aminokwasy (lizyny), oddziałujące z hakiem E na mikrotubuli, naładowanym ujemnie. Zapewnia to punkt zaczepu do mikrotubuli podczas oddysocjowania związanego z cyklem hydrolizy ATP (7). Kinezyzna ta porusza się bardziej beładnie od zwykłej, niemniej wypadkowy efekt to ruch w kierunku końca plus mikrotubuli. Badania wskazują, że hydroliza ATP i ruch są w przypadku tego białka słabo sprzężone (7).

Nie jest jednak wykluczone, że monomery mogą przenosić swój ładunek w komórce jedynie współdziałając ze sobą, a nie jako pojedyncze struktury (8).

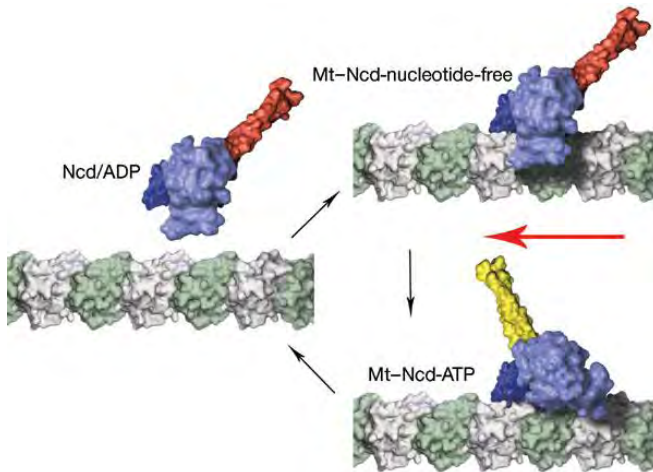
Innym przykładem nieco odmiennego mechanizmu ruchu jest już wspomniane białko Ncd. Ncd jest wyposażone w dwie głowy, tak jak konwencjonalna kinezyzna, ale w przeciwieństwie do niej nie jest motorem procesywnym, co najwyraźniej wiąże się z jego rolą w komórce. Ncd jest zaangażowane w podziały komórkowe, kiedy wiele białek współuczestniczy w tworzeniu i „obsłudze” wrzeciona mitotycznego (7).

Podczas gdy wiązanie ATP przez kinezyznę standardową prowadzi do związania szyjki łącznikowej, to związanie ATP przez białko Ncd powoduje ruch szyjnego regionu heliakalnego (helisy α , która w pewnym sensie zastępuje szyjkę łącznikową, nie występującą u białka Ncd). Ruch ten (**Rys. 3.20**) umożliwia połączenie z kolejnym miejscem wiążącym na mikrotubuli w kierunku jej końca minus.



Rys. 3.20. Zmiany konformacyjne domeny motorycznej białka Ncd. Na czerwono oznaczono stan związany z ATP, a na żółto – stan związany z ADP (rysunek pochodzi z publikacji (29)).

Jak przedstawia **Rys. 3.20**, w stanie zwiazanym z ADP helisa szyjna jest związana z częścią globularną. Związanie to jest stabilizowane przez specyficzne oddziaływania z rejonem przełącznika II (29). W stanie zwiazanym z ATP omawiane połączenie zostanie przerwane, powodując oddalenie się helisy szyjnej.



Rys. 3.21. Model ruchu białka Ncd: połączenie Ncd i tubuliny; uwolnienie ADP; przyłączenie ATP i rotacja szyi (rysunek pochodzi z publikacji (46)).

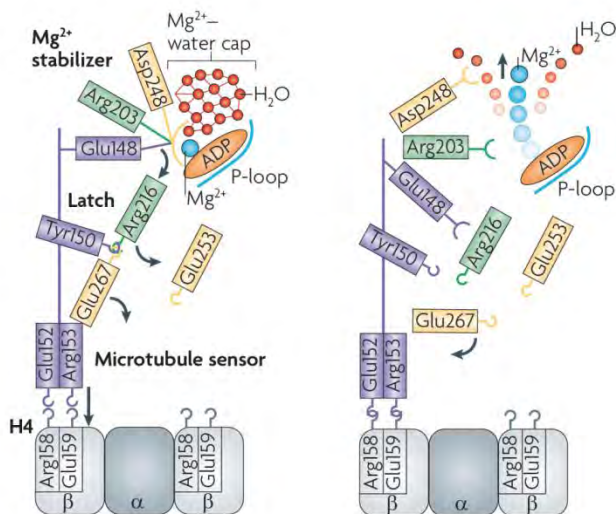
Jedną z propozycji mechanizmu ruchu białka Ncd ilustruje **Rys. 3.21**. W pierwszym etapie Ncd (w stanie związanym z ADP) napotyka mikrotubulę i wiąże się z nią jedną głową, co prowadzi do uwolnienia ADP. Nie jest to związane ze znaczącą zmianą konformacyjną. Dopiero przyłączenie ATP powoduje rotację szyi o 70° , co prowadzi do przemieszczenia w kierunku końca minus mikrotubuli. Na koniec dochodzi do oddysocjowania fosforanu pochodzącego z hydrolizy ATP, połączonego z odłączeniem się głowy od mikrotubuli. Mechanizm ten przypomina sposób działania miozyny. Autorzy pracy (46) argumentują, iż Ncd nie jest motorem procesywnym, ponieważ wyewoluowało jako białko mające sprzęgać mikrotubule i wytwarzać napięcie we wrzecionach mitotycznych i meiotycznych. Z tego powodu jego sposób działania może bardziej przypominać miozynę, która również pracuje nieprocesywnie, służy do generowania napięcia mięśni, używa mechanizmu dźwigni i oddziałuje z filamentem aktynowym za pomocą jednej głowy.

3.1.9. Rola mikrotubuli

Mikrotubule długo były uważane za bierny szlak dla białek motorycznych. Najwyraźniej jednak odgrywają one w tym duecie aktywną rolę (15). Związanie z mikrotubulą wpływa na konformację kinezy, uwalnianie ADP i hydrolizę ATP.

Postulowano dwa główne modele dokowania się kinezy do powierzchni mikrotubuli, zwane modelami Hoengera i Kikkawy (6). W obu przypadkach mówi się, że kinezy łączy się głównie z jedną podjednostką tubulinową, zachodząc częściowo na sąsiednią w kierunku końca minus (u Hoengera jest to β -tubulina, a u Kikkawy: α -tubulina). Wydaje się, że bliższy prawdzie był model Hoengera (19), co oznacza, że kinezy łączy się raczej z β -tubuliną. Stosunkowo niedawno Uchimura *et al.* (47) badali oddziaływanie pomiędzy kinezyną i mikrotubulą. Sugerują oni, że zachodzi ono w dwóch

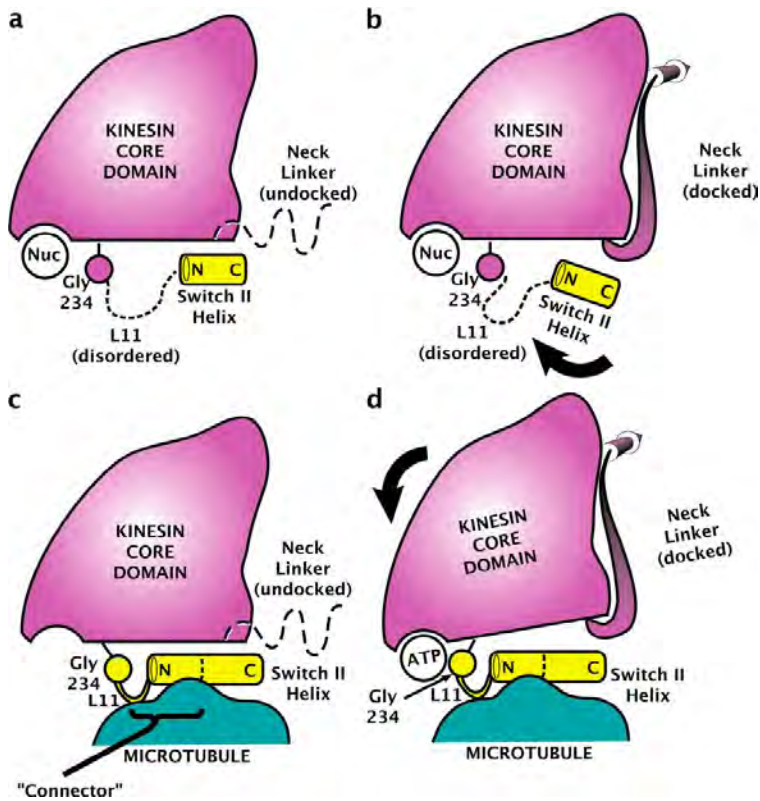
krokach: najpierw związanie z α -tubuliną prowadzi do uwolnienia ADP, a następnie związanie z α i β -tubuliną zakotwicza kinezyne na mikrotubuli.



Rys. 3.22. Stan przed i po uwolnieniu jonu Mg^{2+} u kinezyne KIF1A. Reszty Glu152 i Arg153 z pętli L7 działają jako sensor mikrotubuli. Ich pociągnięcie w dół w wyniku oddziaływania z mikrotubulą powoduje rozpad struktury stabilizującej wiązanie jonu Mg^{2+} . W dalszej kolejności otwiera to możliwość wymiany ADP na ATP (rysunek pochodzi z publikacji (33)).

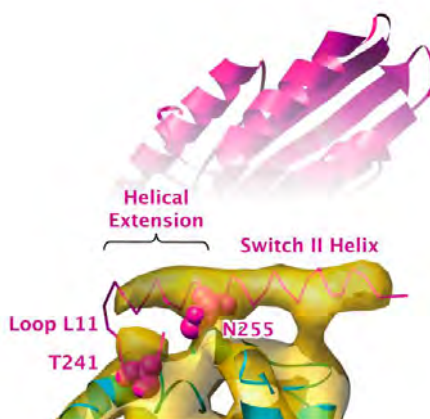
Proponuje się, że pewne aminokwasy kinezyne mogą działać jako sensor mikrotubuli (**Rys. 3.22**). Połączenie z nią prowadzi do zmian w ułożeniu i wzajemnym oddziaływaniu aminokwasów, w rezultacie czego następuje uwolnienie jonu Mg^{2+} , a następnie ADP, które zostanie wymienione na ATP (33).

Elementy strukturalne kinezyne swobodnej nie są prawdopodobnie sztywno ustawione w zależności od związanego nukleotydu. Kiedy nie mamy do czynienia ze stanem związanym z mikrotubulą – istnieje pewna dynamiczna równowaga. Z uwagi na niedużą barierę energetyczną, można zaobserwować struktury zarówno z przyłączonymi jak i uwolnionymi szybkami łącznikowymi. Związanie z mikrotubulą może przesuwać ten stan równowagi w kierunku dokładniej określonej struktury (24). Według modelu Sindelara i Downinga (48) (**Rys. 3.23**) reszta Gly234, należąca do przełącznika II, reaguje wraz z przełącznikiem I na obecność ATP dopiero wtedy, gdy struktura pętli L11 zostanie usztywniona w wyniku oddziaływania z mikrotubulą (**Rys. 3.23 c,d**).



Rys. 3.23. Zależne od mikrotubuli rozpoznanie rodzaju związanego nukleotydu przez kinezyne. Jeżeli brak jest oddziaływań z mikrotubulą, położenie Gly234 nie jest skorelowane z rodzajem związanego nukleotydu (a, b). Oddziaływanie z mikrotubulą powoduje, że konformacja staje się zależna od związanego nukleotydu (c, d) (rysunek pochodzi z publikacji (48)).

Podczas wiązania z mikrotubulą pętla L11 nieco się skraca, za to wydłuża się jej kosztem helisa przekątnikowa $\alpha 4$. Szczególną rolę w oddziaływaniu z mikrotubulą pełnią zakonserwowane ewolucyjnie aminokwasy o objętościowych łańcuchach bocznych: Asn255 ($\alpha 4$) i Thr241 (L11) (**Rys. 3.24**).

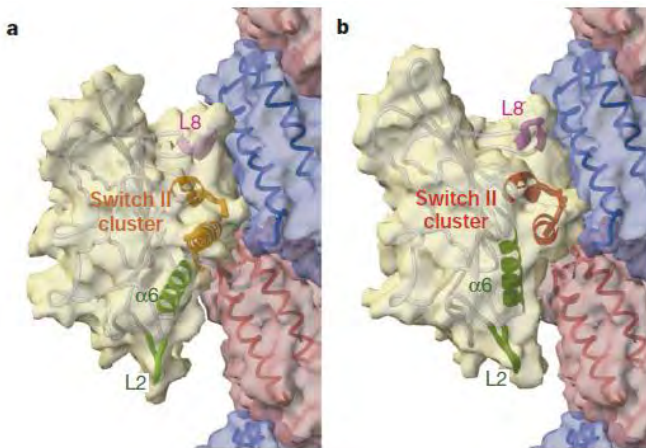


Rys. 3.24. Helisa $\alpha 4$ i pętla L11 na powierzchni mikrotubuli (rysunek pochodzi z publikacji (48)).

Pewne dostępne dane doświadczalne wskazują, iż kinezy poruszające się w kierunku końca plus mikrotubuli układają się na niej na dwa sposoby, w zależności od tego, z jakim nukleotydem są związane. Jeżeli jest to ADP lub nie ma żadnego nukleotydu, to centralna β -kartka jest skręcona względem mikrotubuli o mniej więcej kilkanaście stopni (15). Jeżeli natomiast jest to ATP, to nie obserwuje się skręcenia. Ponadto jeśli głowa kinezy związana z mikrotubulą jest bez nukleotydu lub występuje ze związanym ADP (czyli jest skręcona), miejsce przyłączające nukleotyd jest otwarte (nieblokowane przez pętlę przełącznika I), natomiast jest ono zamknięte, jeżeli znajduje się tam ATP. Może to wskazywać na rolę mikrotubuli w katalizowaniu wymiany nukleotydów.

Przekręcenie to jest związane z przekręceniem helisy przekąźnikowej $\alpha 4$, wspomnianym przy okazji omawiania przemieszczania się przełączników. Sam klaster przełącznika II nie zmienia znacznie swego położenia względem mikrotubuli w stanie związanym z ATP i ADP. Jednak w związku z zachodzeniem rotacji helisy względem pozostałej części domeny motorycznej, domena ta zostanie obrócona względem filamentu (29).

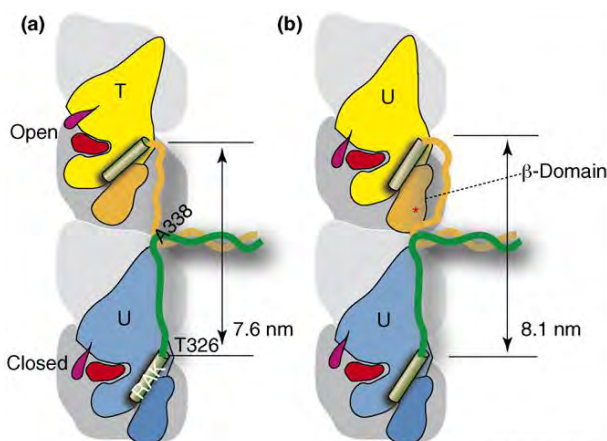
Na **Rys. 3.25** można zaobserwować, że miejsce wiązania na mikrotubuli jest nieco wklęsłe. Pozycja helisy $\alpha 6$ u kinezy KIF1A w stanie związanym z ATP przeszkadza helisie $\alpha 4$ wejść w zagłębienie. Natomiast w stanie związanym z ATP helisa $\alpha 4$ wślizguje się do środka (29).



Rys. 3.25. Oddziaływania KIF1A z mikrotubulą: a) stan ze związanym ADP; b) stan ze związanym ATP (rysunek pochodzi z publikacji (29)).

Procesywny ruch wymaga dobrej koordynacji pomiędzy domenami motorycznymi. Głowy kinezy wciągają się kolejno do następujących po sobie dimerów tubuliny leżących wzdłuż jednego protofilamentu. Jeżeli dwie głowy są związane, to para szyjek łącznikowych o długości około 13 aminokwasów rozciąga się na dystansie równym mniej więcej 8,1 nm. Każdy aminokwas rozciągnięty jest więc na około 0,31 nm, a stan taki bliski jest konformacji w pełni wyprostowanej. Pojawia się w związku z tym pewne naprężenie, połączone z niekorzystnym spadkiem entropii układu. Proponuje się zatem model, w którym zmniejszenie tego naprężenia następuje w wyniku tego, iż głowa prowadząca jest skręcona względem mikrotubuli, a tylna ułożona prosto. W takim ułożeniu odległość pomiędzy początkami szyjek łącznikowych jest najmniejsza (15) (**Rys. 3.26**).

Stwierdzono, że w przypadku mutantów o sztucznie wydłużonej szyjce następował spadek procesywności. Być może w tych okolicznościach obie głowy mogły przyjąć taką konformację, że nie występowało skręcenie względem mikrotubuli, obie przeprowadziły hydrolizę ATP i następnie oderwały się od mikrotubuli.



Rys. 3.26. Różnica w odległości początków szyjek łącznikowych w dwóch przypadkach: a) jedna głowa skrzycona (T), druga ułożona prosto (U); b) obie głowy ułożone prosto (U) (rysunek pochodzi z publikacji (15)).

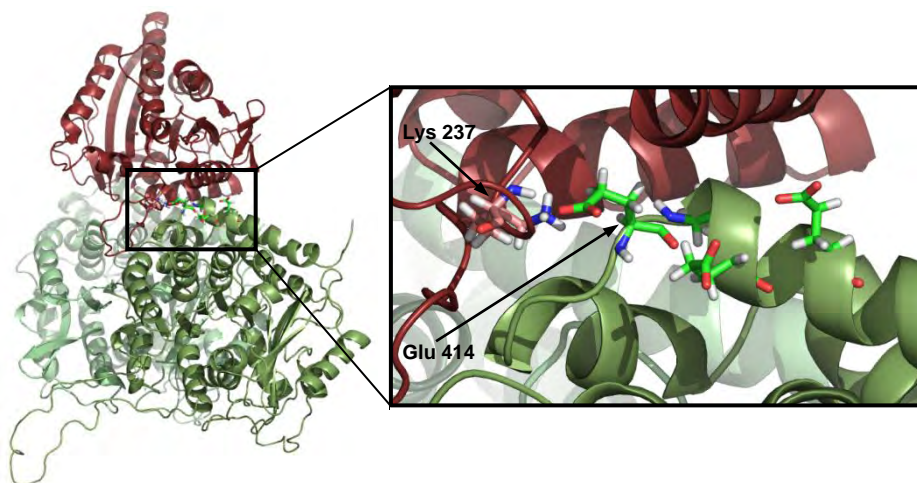
Mikrotubula oddziałuje z kinezyzną na dwa sposoby. Powinowactwo kinezyzny do niektórych miejsc wiązania jest zależne od związanego z nią nukleotydu (ang. *nucleotide-dependent binding site*, NDBS), a do innych – niezależne (ang. *nucleotide-independent binding site*, NIBS) (49).

Jeżeli chodzi o miejsca NDBS, to oddziaływanie z mikrotubulą angażuje głównie trzy rejony domeny motorycznej: $\beta 5a$ -L8- $\beta 5b$, klaster przełącznika II ($\alpha 4$, L12, $\alpha 5$) i pętlę L11 (6).

Kontrola oddziaływania z mikrotubulą za pośrednictwem ADP i ATP może się odbywać na parę sposobów: zmiany strukturalne na powierzchni cząsteczki kinezyzny mogą prowadzić do zmian oddziaływań elektrostatycznych; poza tym inny kształt powierzchni wiążącej może zmniejszać lub zwiększać jej dostępność dla drugiego białka.

Klaster przełącznika II oraz rejon $\beta 5a$ -L8- $\beta 5b$ oddziałuje głównie z helisą H12 β -tubuliny. Pętla L11 zbliża się do helisy H12 α -tubuliny (6). Najważniejsze dla tych oddziaływań reszty są przeważnie obdarzone ładunkiem. Ponieważ na powierzchni mikrotubuli obecne są liczne aminokwasy ujemnie naładowane (zarówno pętla poprzedzająca helisę H12, jak i sama helisa zawiera ich wiele), w regulowaniu powinowactwa kinezyzny do mikrotubuli mają duży udział zasadowe reszty aminokwasowe kinezyzny. Reszty te zgrupowane są głównie w dwóch obszarach: pętlach L7 i L8 (z których pierwsza leży w pobliżu regionu przełącznika I) oraz w rejonie L11/ $\alpha 4$ i L12/ $\alpha 5$ (49).

Uchimura *et al.* (47) badali, które z aminokwasów ze strony mikrotubuli są kluczowe dla wzajemnego oddziaływania białek. Najistotniejsze są tu helisy H11 i H12 obu tubulin oraz fragment łańcucha białkowego znajdującego się pomiędzy nimi. Autorzy wskazali na ważną rolę ujemnie naładowanych reszt kwasu glutaminowego tubuliny α o numerach 415, 416, 418 i 421 (w użytym przeze mnie modelu tubuliny reszty te mają numery 414, 415, 417 i 420) oraz kwasu glutaminowego 410 i kwasu asparaginowego 417 tubuliny β (**Rys. 3.27**).



Rys. 3.27. Kompleks kinezy i dimeru tubulinowego (zminimalizowana struktura 2P4N pobrana z Protein Data Bank). Zaznaczone aminokwasy Lys 237 kinezy (atomy węgla koloru jasnoczerwonego) oraz Glu 414, 415, 417 i 420 α -tubuliny (atomy węgla koloru jasnozielonego). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Jeśli połączenie z mikrotubulą może wyzwać u kinezy zmiany konformacyjne prowadzące do uwolnienia ADP czy przyspieszenia hydrolizy, to niewykluczone, że kinezy również w jakiś sposób może spowodować zmiany w strukturze tubuliny (49).

Jeżeli chodzi o miejsca NIBS, to nie jest na razie dostępna ich wyczerpująca charakterystyka. Oddziaływania w miejscach NIBS wydają się w większości natury elektrostatycznej (49). Pierwszym opisanym miejscem tego typu był N-końcowy region białka Ncd. Podobnie, oddziaływania o charakterze przyciągającym pomiędzy trzonem kinezy HsKID i mikrotubulą mogą promować wiązanie się motoru. Niektóre z NIBS są też ulokowane blisko domeny motorycznej, a ich rolą jest zwiększanie powinowactwa do mikrotubuli, bez wpływu na szybkość przeprowadzania reakcji hydrolizy ATP (49). Do NIBS zalicza się też pętlę K kinezy KIF1A (49).

Szczególnym fragmentem tubuliny, z którym oddziałują kinezy, jest tak zwany hak E, nazywany też skrótowo CTT (ang. *C-terminal tail*). Formuje go C-końcowy fragment łańcucha tubuliny. Tworzy go około kilkunastu aminokwasów, ze znacznym udziałem reszt o łańcuchach bocznych ujemnie naładowanych (Asp, Glu). Odcinki te są niewidoczne w przypadku dostępnych struktur krystalicznych, zatem zakłada się, że charakteryzują się dużą elastycznością. *In vitro* wykazywać mogą słabą tendencję do przyjmowania konformacji helikalnej. Pseudoprocesywny ruch monomerycznej kinezy KIF1A jest powstrzymywany zarówno przez usunięcie pętli K kinezy jak i C-końcowych fragmentów mikrotubul. Ponadto usunięcie haków E prowadziło do

obniżonej szybkości i procesywności ruchu konwencjonalnej kinezy. Prawdopodobnie oddziałują one z domeną motoryczną kinezy, choć pojawiały się też sugestie, że miejscem oddziaływania jest odcinek szyjny (49).

Skiniotis *et al.* (50) porównywali struktury kompleksów kinezyn (związanych z różnymi nukleotydami) i mikrotubuli w formie natywnej oraz pozbawionej C-końców. Stwierdzili, że ich usunięcie zwiększa stabilność wiązania kinezy do mikrotubuli. Efekt ten najbardziej widoczny był w przypadku kinezy związanej z ADP, o której wiadomo, że do mikrotubul w formie natywnej wiąże się raczej słabo, natomiast do mikrotubul pozbawionych C-końców wiązała się silnie. Autorzy przypuszczają, że to zjawisko odpowiada za stwierdzone wcześniej upośledzenie ruchu kinezy w nieobecności haków E. Ogólnie okazuje się, że C-końce mikrotubul raczej osłabiają, a nie zwiększają siłę oddziaływań kinezy z powierzchnią mikrotubuli (dotyczy to kinezy związanej z ADP i ATP, na wiązanie kinezy bez nukleotydu C-końce nie mają większego wpływu). Dzięki temu mogą ułatwiać szybki ruch motoru, kiedy przyłączenie i odłączenie domeny motorycznej musi zachodzić z dużą częstością. Wydaje się, że najbardziej użyteczne są w dwóch fazach ruchu: zapobiegają wiązaniu drugiej głowy, zanim pierwsza, wiążąca się z mikrotubulą, nie przyłączy ATP oraz ułatwiają uwalnianie domeny motorycznej po hydrolizie ATP. Według propozycji autorów, miejscami na kinezy, z którymi haki E wchodzi w interakcje, są region przełącznika II oraz być może szyja, która znajduje się blisko C-końca α -tubuliny.

Lakämper i Meyhöfer (23) zaobserwowali zmniejszenie szybkości ruchu i procesywności kinezy grzybowej, jeżeli mikrotubule pozbawić haków E. Według autorów nie oddziałują one z szyją, ale z głową kinezy.

Furuta i Toyoshima (51) pokazali, że przy małej sile jonowej kinezy Ncd jest zdolna do procesywnego ruchu dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym ogona tej kinezy i haków E. Powinowactwo ogona Ncd do haków E ma prawdopodobnie znaczenie dla funkcji tego białka: obsługi wrzeciona mitotycznego.

Dokładny mechanizm oddziaływania haka E i kinezy nie jest znany. Ten fragment mikrotubuli podlega także wielu modyfikacjom potranslacyjnym, które mają znaczenie dla funkcji kinezy, oraz potrafi znacząco się różnić pomiędzy poszczególnymi izoformami tubuliny.

O znaczeniu mikrotubuli w przemieszczaniu się kinezy mówi się jeszcze w innych kontekstach. Na przykład istnieją przesłanki do twierdzenia, że zmiany w konformacji samej tubuliny mogą rozciągać się poza miejsce wiązania z kinezy i w ten sposób wpływać na powstanie asymetrycznego potencjału, „popychającego” cząsteczkę w jednym kierunku.

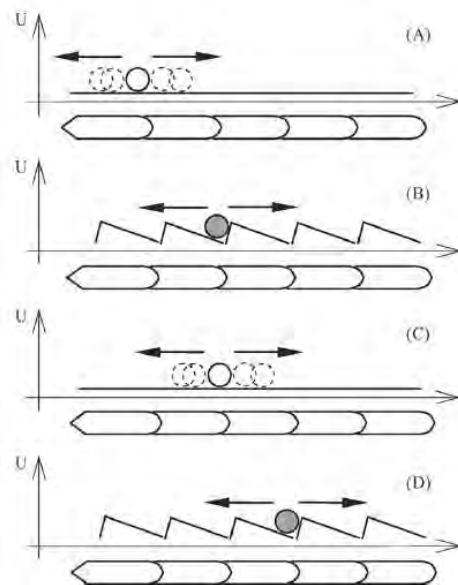
Masuda (52) do opisu ruchu kinezy postanowił zaadoptować stosowany uprzednio do opisu mechanizmu działania miozyny model nazywany „napędzaniem przez oderwanie” (ang. *Driven-by-Detachment*). W modelu tym ważną rolę pełni oddziaływanie kinezy z mikrotubulą. Głównym źródłem energii napędzającej jest w tym podejściu energia wydzielona podczas przyłączenia domeny motorycznej kinezy do mikrotubuli. Natomiast energia dostarczana przez ATP nie jest bezpośrednio używana do generacji mocy, ale do

wyprowadzenia motoru ze stanu związania z mikrotubulą poprzez osłabienie oddziaływania motoru ze szlakiem.

3.1.10. Znaczenie ruchów Browna

Na znaczenie potencjału oddziaływań pomiędzy mikrotubulą a kinezyną zwracają uwagę także zwolennicy modelu przemieszczania się kinezyny opartego na ruchach Browna.

Tradycyjne modele wyjaśniające ruch kinezyny kładły nacisk na zmiany konformacyjne białka wynikające ze związania i hydrolizy ATP, nie uwzględniając ruchów Browna. Modele wykorzystujące ruchy Browna używają pojęcia zapadki, która nieuporządkowane fluktuacje termiczne może przekształcać w zorganizowany ruch całego mechanizmu z użyciem bariery „filtrującej” ruch. Może nią być na przykład wiązanie ATP. Biorąc pod uwagę stosunkowo nieduże rozmiary kinezyny i sporą długość kroku, dyfuzja prawdopodobnie odgrywa dużą rolę w przemieszczaniu się domeny motorycznej pomiędzy miejscami wiążącymi na mikrotubuli (53). Należy też pamiętać, że w każdej chwili cząsteczka kinezyny doświadcza ogromnej ilości zderzeń z otaczającymi cząsteczkami wody.



Rys. 3.28. Mechanizm ruchu motoru molekularnego (na przykład kinezyny), wykorzystujący model zapadki brownowskiej. Wykresy przedstawiają energię potencjalną U w funkcji zmiennej określającej położenie na mikrotubuli (rysunek pochodzi z publikacji (54)).

Przeciwnicy czysto mechanistycznych modeli, które rozpatrują ruch kinezyn jako niezwykle precyzyjny mechanizm polegający na systemie

subtelnych zmian strukturalnych i skomplikowanych przełączników, wskazują, że modele te często nie dyskutują faktu, że energia hydrolizy ATP, która ma być odpowiedzialna za generację mocy, jest większa tylko o rząd wielkości od średniej energii ruchów termicznych (a samo wiązanie ATP, którego znaczenie jest podkreślane w niektórych modelach, zapewnia jeszcze mniejszą ilość energii) (54). Ponadto energia pochodząca od ATP ma być przenoszona przez system dźwigni i przenośników, podczas gdy siła niekowalencyjnych oddziaływań odpowiedzialnych za istnienie i zmiany położenia tych struktur jest rzędu wielkości średniej energii ruchów termicznych w środowisku, w którym białka się znajdują. Poza tym, jak wskazują dane uzyskane z symulacji komputerowych, cząsteczka białka nie jest strukturą sztywną, ale wykazuje częściowo właściwości podobne do płynu. Zarówno wewnętrzne fluktuacje termiczne jak i bombardowanie sąsiadującymi cząsteczkami (w tym cząsteczkami wody) może łatwo prowadzić do rozproszenia wszelkiej energii mechanicznej.

Mechanizm ruchu kinezyzny wyjaśniony z użyciem pojęcia zapadki brownowskiej zakłada, że kinezyzna występuje naprzemiennie w konformacjach, które charakteryzują się odmiennymi profilami energii potencjalnej, kiedy białko oddziałuje z mikrotubulą (**Rys. 3.28**). W jednej konformacji profil ten jest płaski, a białko, podlegając termicznym fluktuacjom, może przesuwac się wzdłuż mikrotubuli w obie strony (A i C). W innej konformacji profil energetyczny ma kształt zębów piły (B i D). W tej sytuacji cząsteczka będzie miała silną tendencję do przesuwania się w kierunku minimum energii. Pozostanie w nim, chyba że przyjmie znowu konformację zmieniającą profil energetyczny na płaski albo zdarzy się wyjątkowo duża (a zatem rzadko występująca) termiczna fluktuacja, zdolna przerzucić białko do sąsiedniego minimum. Połączenie dwóch chaotycznych procesów: przełączania pomiędzy konformacjami sprzężonego z hydrolizą ATP oraz fluktuacji termicznych, prowadzi w rezultacie do wypadkowego ruchu w jednym kierunku. Podczas tego ruchu, który jest stochastyczny z natury, występować mogą od czasu do czasu kroki w tył.

Model czysto stochastyczny, nieuwzględniający obecności dwóch głów i koordynacji między nimi, wydaje się pod pewnymi względami zbyt uproszczony. Najrozsądniej jest przyjąć, że zarówno zmiany strukturalne, generacja mocy przez mechaniczne elementy białka jak i ruchy Browna oczyszczone mechanizmem zapadkowym przyczyniają się do kierunkowości ruchu kinezyzny (55). Związanie szyjki łącznikowej odpowiada jedynie za niewielkie przesunięcie w kierunku końca plus, być może rzędu 1-2 nm. Najprawdopodobniej w dalszej kolejności wolna głowa na drodze dyfuzyjnej poszukuje kolejnego miejsca wiązania. Oba procesy zachodzą bardzo szybko, w czasie poniżej 100 μ s (53).

W modelu zaproponowanym przez Xie (45,56), oddziaływanie mikrotubuli z głową kinezyzny w stanie bez związanego nukleotydu oraz w stanie ATP/ADP·P_i może być opisane przez piłokształtny potencjał ze stosunkowo głębokim minimum. Natychmiast po uwolnieniu fosforanu, powinowactwo głowy do mikrotubuli w tym miejscu zmniejsza się i staje się nawet mniejsze niż w miejscach sąsiadujących z powodu zmian

konformacyjnych. Po pewnym niedługim czasie potencjał oddziaływania powraca do normalnej postaci, przybierając kształt piły (minimum może odpowiadać jednak miejscu na mikrotubuli nieznacznie przesuniętemu i być płytsze niż dla stanu pustego lub związanego z ATP/ADP·P_i). Przyczynę tej zmiany potencjału upatruje się w tym, że silne wiązanie kinezy w stanie bez nukleotydu lub z ATP/ADP·P_i powoduje lokalną zmianę w rozkładzie ładunku na powierzchni tubuliny. W rezultacie po uwolnieniu fosforanu i przejściu głowy w stan ADP osłabione są oddziaływania z opuszczonym przed chwilą miejscem wiązania. Po chwili jednak miejsce to powraca do normalnej konformacji i wówczas także potencjał oddziaływania staje się znowu piłokształtny. W tym modelu uwzględnione jest także bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy głowami, które ma swój wkład w ukierunkowywaniu do przodu ruchu głowy tylnej (zagadnienie to jest często pomijane w rozważaniu ruchu kinezy). Tylna głowa po oddysocjowaniu od mikrotubuli podąża do głowy przedniej wiedziona ich wzajemnym powinowactwem. Następnie dyfunduje do następnego miejsca wiązania na mikrotubuli.

Interesujące podejście zaproponowali Mather i Fox (57). W skrócie przedstawia się ono następująco. Prawdopodobieństwo wykonania przez kinezynę kroku do przodu lub do tyłu jest ściśle związane z prawdopodobieństwem związania się w odpowiednim miejscu na mikrotubuli. Pomiedzy głowami kinezy występuje naprężenie, ponieważ łączą je krótkie szyjki łącznikowe, a prawdopodobieństwo odwiedzenia określonego miejsca w przestrzeni zależy wykładniczo od odległości między głowami. Jeżeli zadokowanie szyjki łącznikowej spowoduje choćby niewielkie przesunięcie rozkładu gęstości prawdopodobieństwa w kierunku końca plus mikrotubuli, to rezultatem będzie odpowiedni wykładniczy wzrost ilości kroków w kierunku końca plus. Takie podejście przewiduje wykorzystanie ruchów termicznych do przemieszczania się i nie wymaga od szyjki łącznikowej wygenerowania znacznej siły podczas przyłączania się do głowy.

Na znaczenie oddziaływań elektrostatycznych w ruchu kinezy zwrócili uwagę Ciudad *et al.* (58). Kierunkowy ruch kinezy wyjaśniają, rozpatrując mikrotubulę jako obdarzony ładunkiem szlak dla kinezy. Okazuje się, że tubuliny charakteryzują się trwałym momentem dipolowym, o niezerowej składowej równoległej do protofilamentu i skierowanej w kierunku końca minus mikrotubuli. Kluczowe dla tego modelu są zmiany rozkładu ładunku na kinezy podczas cyklu hydrolizy ATP. Według niego, kinezy ma trzy miejsca naładowane o podstawowym znaczeniu dla ruchu: po jednym na każdej z głów (zależnym od obecności nukleotydu – w stanie bez związanego nukleotydu +2e, w stanie z ATP -2e, w stanie z ADP -1e) oraz jedno w rejonie szyjki łącznikowej (o ładunku specyficznym dla konkretnego białka, którego znak: dodatni lub ujemny, wpływa na kierunek poruszania się kinezy).

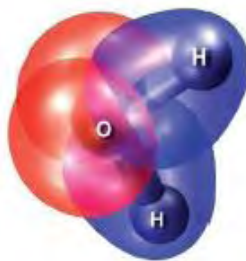
3.2. Charakterystyka czystej wody

Chcąc analizować zmiany zachodzące we właściwościach wody znajdującej się blisko powierzchni makromolekuły, należy najpierw poznać właściwości wody czystej. Poniższy podrozdział zostanie poświęcony wybranym zagadnieniom z tego zakresu.

Ze względu na powszechne występowanie i pierwszorzędą rolę w przyrodzie, woda jest najczęściej badaną za pomocą metod numerycznych płynem od chwili powstania odpowiednich narzędzi w postaci symulacji komputerowych w latach sześćdziesiątych (59). Mimo to nie jest ciągle zrozumiana do końca (60). Dogłębne poznanie zachowania się wody istotne jest na przykład w przypadku procesów przemysłowych, w naukach środowiskowych (np. badanie rozpuszczalności gazów atmosferycznych w wodzie morskiej, złóż hydratów zawierających metan), geologii (np. zagadnienie roli wody we właściwościach reologicznych magmy i erupcjach wulkanicznych), astronomii (woda w odmiennych od ziemskich warunkach ciśnienia i temperatury znajdująca jest na Marsie, Uranie, Neptunie, księżycach Jowisza Europe i Ganimedesie) oraz, naturalnie, w naukach biologicznych (59). Wyjątkowe na tle innych cieczy właściwości wody od dawna intrygowały naukowców. Są one bezpośrednim skutkiem specyficznej budowy jej cząsteczki.

3.2.1. Budowa cząsteczki wody

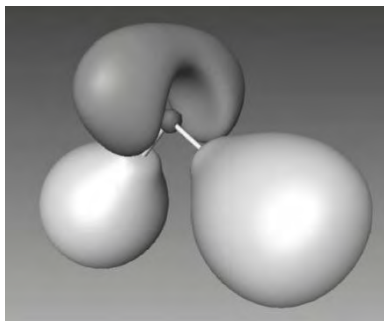
Cząsteczka wody charakteryzuje się trzema głównymi cechami, które razem zebrane wyróżniają ją spośród innych powszechnie występujących w przyrodzie związków chemicznych. Są to: małe rozmiary, tetraedryczna budowa (Rys. 3.29; dwa naroża tetraedru wyznaczone przez dwie wolne pary elektronowe atomu tlenu, dwa naroża wyznaczone przez dwa związane kowalencyjnie atomy wodoru) i nierównomierny rozkład ładunku na cząsteczce (trwały moment dipolowy). Nierównomierny rozkład ładunku na cząsteczce jest rezultatem połączenia silnie elektroujemnego atomu tlenu i dwóch słabo elektrododatnich atomów wodoru.



Rys. 3.29. Budowa cząsteczki wody (rysunek pochodzi z publikacji (61)).

Tetraedryczna budowa cząsteczki w praktyce nie jest tak wyraźnie zdefiniowana, ponieważ wolne pary elektronowe na atomie tlenu są w

znacznym stopniu zdelokalizowane (62) (**Rys. 3.30**), dzięki czemu nie są nałożone tak ściśle geometryczne ograniczenia na akceptowanie wiązań wodorowych przez atom tlenu (63).



Rys. 3.30. Rozkład elektronów zdelokalizowanych wolnych par elektronowych atomu tlenu (kolor ciemnoszary). Kulką oznaczony jest środek atomu tlenu (rysunek pochodzi z publikacji (63)).

Do metod eksperymentalnych pozwalających poznać właściwości wody zaliczamy między innymi: spektroskopię rozpraszania neutronów (ang. *neutron scattering*), spektroskopię Ramana (ang. *Raman scattering*), spektroskopię światła depolaryzowanego (ang. *depolarized light scattering*), spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. *nuclear magnetic resonance*, NMR), ultraszybką spektroskopię w podczerwieni (ang. *ultrafast IR spectroscopy*) (64). Symulacje komputerowe pomagają interpretować wyniki doświadczeń i dostarczyć informacji o strukturze układu na poziomie atomowym.

3.2.2. Sposób przedstawiania wody w symulacjach komputerowych

Pierwsze prace na temat symulacji komputerowych ciekłej wody opublikowane zostały na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych (59). Obecnie komputery pozwalają na prowadzenie symulacji *ab initio*. W przypadku metody *ab initio*, oblicza się siły potrzebne do dynamiki na bieżąco (w każdym kroku czasowym) ze struktury elektronowej symulowanego systemu. Pozwala to na przykład na modelowanie zachodzenia reakcji chemicznych. Ponieważ symulacje *ab initio* są kosztowne jeżeli chodzi o zapotrzebowanie na moc obliczeniową, w praktyce częściej stosuje się modele będące mniejszymi lub większymi przybliżeniami sytuacji rzeczywistej. W przypadku symulowania dużych układów, stosowanie modeli przybliżonych jest obecnie w zasadzie nieuniknione.

Przydatność modelu determinuje to, czy oddaje on w zadowalający sposób właściwości wody w stanie gazowym, ciekłym lub stałym zmierzone eksperymentalnie (gęstość, ciepło parowania, współczynnik samodyfuzji, struktura przestrzenna - funkcje rozkładu radialnego, gęstość maksymalna,

diagram fazowy i parametry krytyczne, stała dielektryczna i moment dipolowy, energia wiązania wodorowego).

Aktualnie mamy do dyspozycji wiele modeli (kilkadziesiąt głównych i ich modyfikacje) (59). Przykłady kilku popularnych modeli zawarte są w tabeli poniżej (**Tabela 3.1**). Fakt, że modeli jest tak wiele, najlepiej ilustruje napotykanie podczas ich konstruowania trudności. Żaden z istniejących modeli nie reprodukuje wiernie wszystkich właściwości wody zmierzonych eksperymentalnie. Występują także trudności z przenoszeniem modelu, którego parametryzacja rozwinięta została dla środowiska czystej wody i zastosowaniem go w innym środowisku, np. w mieszaninie, roztworze.

Znacząca liczba modeli to tak zwane modele sztywne, które nie pozwalają na oscylacje długości wiązań tlen-wodór ani na zmianę kąta pomiędzy tymi wiązaniami (np. SPC, SPC/E, TIP3P, TIP4P). Opracowano jednak i takie, które dzięki wprowadzeniu giętkości cząsteczki umożliwiły symulowanie drgań wewnątrzcząsteczkowych (np. CF).

Nierównomierny rozkład ładunku na cząsteczce wody zwykle oddany jest poprzez umieszczenie ładunków punktowych na jądrach atomów - dodatnich na atomach wodoru, ujemnych na atomie tlenu (np. model SPC i SPC/E). Spotykamy jednak także modele, w których dodano fikcyjne miejsce oddziaływania w płaszczyźnie cząsteczki (np. BF, TIP4P) lub poza nią (mające reprezentować wolne pary elektronowe, np. w modelach BNS, ST2, TIP5P) (59). Czasem wprowadza się możliwość uwzględniania zmiany rozkładu ładunku w cząsteczce pod wpływem oddziaływania z polem elektrycznym wytwarzanym przez inne cząsteczki - polaryzowalność (np. POL3). Oddziaływania van der Waalsa zwykle reprezentowane są przez potencjał Lennarda-Jonesa. Charakterystyka kilku popularnych modeli sztywnych zawarta jest w tabeli poniżej (**Tabela 3.1**).

	SPC/E (65)	SPC (65)	TIP3P (66)	TIP4P (65)	TIP5P (66)
r_{O-H} [nm]	0,100	0,100	0,09572	0,09572	0,09572
r_{O-L} [nm]	-	-	-	0,015	0,070
θ_{HOH} [deg]	109,47	109,47	104,52	104,52	104,52
θ_{LOL} [deg]	-	-	-	-	109,47
q_O [e]	-0,8476	-0,820	-0,8340	0,00	0,00
q_H [e]	+0,4238	+0,410	+0,4170	+0,52	+0,241
q_L [e]	-	-	-	-1,04	-0,241
σ_O [nm]	0,31656	0,31656	0,31506	0,31536	0,312
ϵ_O [kJ/mol]	0,65017	0,65017	0,6364	0,64895	0,66989
μ [D]	2,351 (67)	2,274 (67)	2,347 (67)	2,18 (68)	2,29 (66)

Tabela 3.1. Charakterystyka kilku popularnych modeli sztywnych, w tym SPC/E.

r_{O-H} - długość wiązania pomiędzy atomem tlenu i wodoru
 r_{O-L} - długość wiązania pomiędzy atomem tlenu i pseudoatomem L
 θ_{HOH} - kąt pomiędzy wiązaniami łączącymi atom tlenu z atomami wodoru
 θ_{LOL} - kąt pomiędzy wiązaniami łączącymi atom tlenu z dwoma pseudoatomami
 q_O - ładunek cząstkowy na atomie tlenu
 q_H - ładunek cząstkowy na atomie wodoru
 q_L - ładunek cząstkowy na pseudoatomie
 σ_O , ϵ_O - parametry Lennarda-Jonesa dla atomu tlenu
 μ - moment dipolowy

W tej pracy zdecydowałam się na wybór modelu SPC/E. Uzasadnienie podane jest w rozdziale poświęconym metodom obliczeniowym.

3.2.3. Definicje wiązania wodorowego

Porównywanie wyników z różnych prac dotyczących wody utrudnione jest przez fakt, że w zasadzie nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czym jest wiązanie wodorowe. Nie istnieje jedno, stosowane we wszystkich przypadkach kryterium, a używanie odmiennych definicji przez różnych autorów prowadzi do liczbowo różniących się rezultatów.

Według rekomendacji IUPAC z roku 2011 (69), definicja wiązania wodorowego w angielskiej wersji językowej przedstawia się następująco: *The hydrogen bond is an attractive interaction between a hydrogen atom from a molecule or a molecular fragment X-H in which X is more electronegative than H, and an atom or a group of atoms in the same or a different molecule, in which there is evidence of bond formation.* Dowód na istnienie wiązania może być otrzymany zarówno na drodze eksperymentalnej jak i teoretycznej. Podano też parę cech charakterystycznych tych wiązań.

Wiązanie X-H...Y-Z jest zwykle liniowe (180°); im bliżej do ułożenia liniowego, tym wiązanie jest silniejsze a odległość pomiędzy atomami H i Y jest mniejsza. Długość wiązania X-H zwykle się zwiększa w następstwie utworzenia

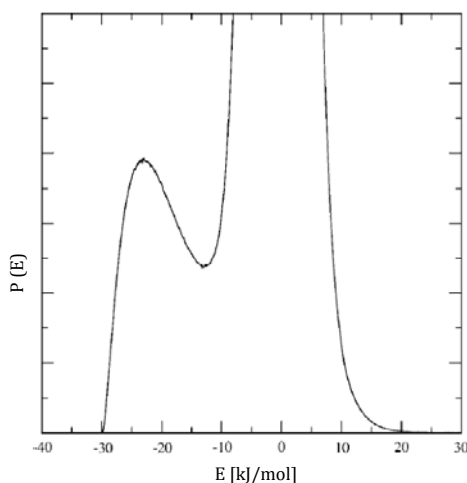
wiązania wodorowego, co powoduje zmiany w widmie absorpcji promieniowania podczerwonego (przesunięcie ku czerwieni). Im większe jest wydłużenie wiązania X–H, tym silniejsze jest wiązanie wodorowe. Wiązanie jest też widoczne w spektroskopii NMR. Ponadto: wiązania wodorowe są zaangażowane w transportowanie protonów; sieci wiązań wodorowych mogą charakteryzować się kooperatywnością; wiązania wodorowe wykazują preferencje kierunkowe oraz wpływają na strukturę kryształów.

Stosowanych jest parę rodzajów definicji wiązań wodorowych. Większość powszechnie stosowanych używa różnych parametrów odcięcia. Dobiera się je zwykle, znajdując minimum w rozkładzie wartości wybranych wielkości charakteryzujących wodę. Problemem może być to, że wartość rozkładu w minimum przeważnie jest niezerowa. Nieznaczne przekroczenie wartości parametru odcięcia powoduje, że wiązanie uważane jest za zerwane, co nie zawsze wydaje się rozsądne z fizycznego punktu widzenia.

Fakt, że nie istnieje w tej materii konsensus co do najlepszej, odpowiedniej w każdej sytuacji definicji, oddaje trudności ze znalezieniem idealnej propozycji, która nie będzie prowadziła ani do sztucznego zaniżenia, ani do zawyżenia liczby wiązań w układzie.

Jako przykłady definicji wiązania wodorowego proponowanych w celu analizy rezultatów symulacji komputerowych można wskazać następujące z nich:

- definicja energetyczna – W swej podstawowej formie, definicja ta mówi, że dwie cząsteczki są powiązane wiązaniami wodorowymi, jeżeli ich energia wzajemnego oddziaływania jest mniejsza od pewnej wartości progowej. Ustalając graniczną wartość energii można, na wzór funkcji rozkładu radialnego, sporządzić funkcję rozkładu energii potencjalnej oddziaływań między parami cząsteczek. Energię odpowiadającą minimum można przyjąć za wartość graniczną. Na przykład Kumar *et al.* (70), wykorzystując model SPC/E, sporządzili rozkład energii potencjalnej oddziaływań pomiędzy parami cząsteczek wody w temperaturze 300 K, znajdując minimum przy wartości $-12,9$ kJ/mol (Rys. 3.31).



Rys. 3.31. Rozkład energii potencjalnej oddziaływań pomiędzy parami cząsteczek wody (model SPC/E, temperatura 300K) (rysunek pochodzi z publikacji (70)).

Zaletą tego rozwiązania jest uwzględnianie faktu, iż powstanie wiązania wodorowego wiąże się z obniżeniem energii potencjalnej układu. Niestety, nie bierze ono pod uwagę, że ważną cechą tego typu wiązań jest kierunkowość (wiązanie charakteryzuje się specyficzną geometrią).

- definicja geometryczna „odległość” – Definicja zakłada, że dwie cząsteczki wody są związane wiązaniem wodorowym, jeżeli odległość pomiędzy atomami tlenu i wodoru wynosi mniej niż pewna wartość graniczna. Buch (71), ustalając graniczną odległość tlen – wodór na 2,3 Å, kierował się wyznaczoną przez siebie funkcją rozkładu radialnego tlen – wodór i położeniem minimum.
- definicja geometryczna „odległość – kąt” – Definicja zakłada, że dwie cząsteczki wody są związane wiązaniem wodorowym, jeżeli odległość atomów tlenu (lub tlenu i wodoru) wynosi mniej niż pewna odległość graniczna, a kąt wiązania $H_1-O_1\cdots O_2$ jest mniejszy od przyjętej wartości progowej. Luzar i Chandler (72) przyjęli wartości równe 3,5 Å i 30°.

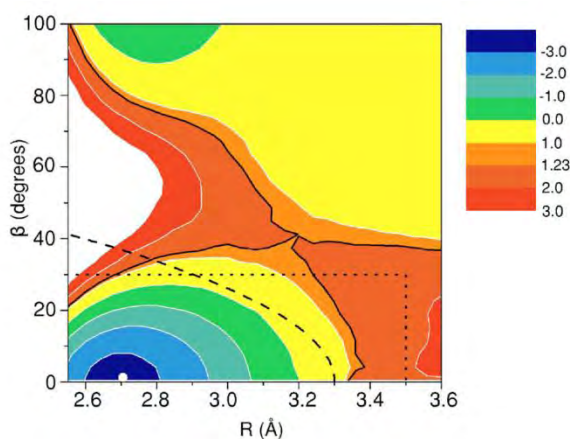
Ustalając graniczną odległość atomów tlenu w tej definicji, kierować się można funkcją rozkładu radialnego tlen – tlen. Odległość ta byłaby równa w tym przypadku wartości promienia odpowiadającej położeniu pierwszego minimum tej funkcji. Wskazówką dla doboru granicznej wartości kąta może być wykres średniej liczby wiązań wodorowych w funkcji kąta pomiędzy odpowiednimi atomami dwóch cząsteczek (73). Na potwierdzenie zasadności wyboru granicznej wartości kąta, można odwołać się do rezultatów eksperymentów z zastosowaniem spektrometrii rozpraszania neutronów, które pokazują,

że jeżeli wiązanie odgina się o więcej niż 30° od liniowości, to jest ono zrywane (74).

Zaletą tego rozwiązania jest to, że uwzględnia charakterystyczną, w przybliżeniu tetraedryczną geometrię, a wadą, iż nie bierze pod uwagę energii oddziaływań. Tak zdefiniowane wiązanie jest bardzo wrażliwe na wszelki ruch obrotowy cząsteczek je tworzących. Poza tym wybór kąta wydaje się mimo wszystko decyzją w pewnym stopniu arbitralną.

Odmianą definicji geometrycznej „odległość - kąt” jest definicja zaproponowana w pracy Werneta *et al.* (75). W tym przypadku zdefiniowana została funkcja, określająca czy wiązanie jest utworzone czy nie. Zależy ona od dwóch zmiennych, mianowicie od kąta wiązania oraz od odległości pomiędzy atomami tlenu dwóch cząsteczek wody. Zastosowana ona została w tej pracy (w lekko zmodyfikowanej formie). Szczegółowy jej opis podano w rozdziale dotyczącym metod obliczeniowych.

Za ilustrację faktu, że różne definicje geometryczne obejmują odmienne zakresy odległości i orientacji cząsteczek, nie zawsze całkowicie zgodne z najpowszechniej reprezentowanymi w wodzie konfiguracjami, może służyć wykres sporządzony przez Kumara *et al.* (70) (**Rys. 3.32**). Na trójwymiarowym wykresie, który zawiera informację o powszechności występowania w danej odległości od centralnej cząsteczki wody określonych kątów β ($H_1O_1O_2$) opisujących wzajemną orientację dwóch cząsteczek, zaznaczono linie odcięcia wyznaczone przez dwie geometryczne definicje wiązań wodorowych: Luzar i Chandler'a (72,76) oraz Wernet'a *et al.* (75).



Rys. 3.32. Wykres funkcji $W(R, \beta) = -kT \ln g(R, \beta)$ w jednostkach kT , gdzie $g(R, \beta)$ jest stosunkiem dwóch wielkości. Pierwsza to średnia liczba atomów tlenu znajdujących w odległości od R do $R+dR$ od atomu tlenu cząsteczki centralnej przy założeniu, że kąt beta mieści się w przedziale od β do $\beta+d\beta$. Druga to liczba atomów tlenu, które byłyby obecne w danym przedziale odległości i kątów, gdyby cząsteczki wody nie oddziaływały ze sobą (tzn. gdyby układały się przypadkowo). Linia kropkowaną pokazany jest zakres wiązania wodorowego przewidziany definicją Luzar i Chandler'a (72) (76), a linią przerywaną zakres wiązania wodorowego przewidziany definicją Werneta *et al.* (75) (temperatura 300 K, woda SPC/E). Biała kropka – globalne minimum, czarna linia ciągła dla $1,23kT$ przechodzi przez punkty siodłowe i uważana jest przez Kumara *et al.* (70) za dobrą granicę dla definicji wiązania wodorowego (rysunek pochodzi z publikacji (70)).

Definicja Werneta *et al.* (75) nie najgorzej się zatem pokrywa z sugerowanym przez Kumara *et al.* (70) zakresem istnienia wiązania wodorowego.

- definicja „blisko sąsiadujące atomy H i O” (ang. *near-neighbor H and O*) – Według tej definicji, zaproponowanej przez Hammerich'a i Buch'a (77), cząsteczki A i B są połączone wiązaniem wodorowym, jeżeli odległości międzyatomowe spełniają dwa warunki: atom tlenu cząsteczki A jest najbliższym (niepołączonym wiązaniem kowalencyjnym) sąsiadem atomu wodoru cząsteczki B oraz atom wodoru cząsteczki B jest pierwszym lub drugim spośród najbliższych sąsiadów atomu tlenu cząsteczki A. Dzięki temu unikamy używania z góry określonych promieni odcięcia, ale mimo to uwzględniamy fakt, że preferencję do tworzenia wiązania mają cząsteczki wzajemnie najbliżej ze sobą sąsiadujące. Definicja ogranicza liczbę wiązań akceptowanych przez atom tlenu do dwóch.
- definicja dynamiczna (czasowa) – Według tej definicji wiązanie można nazwać trwałym, jeżeli istnieje dłużej niż wynosi okres drgań

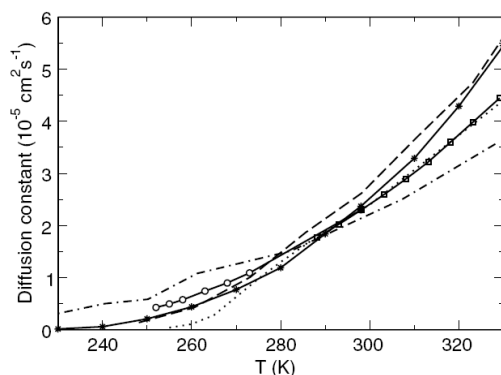
wibracyjnych (78). Za progową wartość można przyjąć na przykład 0,3 ps (72).

- definicja topologiczna – Jest to stosunkowo nowa propozycja Henchman'a i Irudayam'a (79). Przyjmuje się, że wiązanie jest utworzone pomiędzy atomem wodoru i najbliższym jemu atomem tlenu (niepołączonym kowalencyjnie), jeżeli odległość tlen-wodór jest najbliższą odległością tlen-wodór, jaką można zmierzyć pomiędzy tymi dwiema cząsteczkami. Jeżeli ta odległość nie jest najmniejsza, to przyjmuje się, że wiązanie nie jest utworzone. Definicja nie dopuszcza tworzenia się dwóch wiązań pomiędzy cząsteczkami.

Przyjęta definicja wiązania wodorowego będzie oczywiście wpływała na opis struktury sieci wiązań sporządzony z jej użyciem, ale także na opis dynamiki wiązań. Opisy dynamiki wiązań wodorowych najbardziej wrażliwe są na przyjętą definicję w bardzo krótkich przedziałach czasowych, natomiast mniej w nieco dłuższym przedziale czasowym. Ponadto, jeżeli opis dynamiki dopuszcza możliwość odtworzenia wiązania po chwilowym zerwaniu, to zastosowanie odmiennych definicji doprowadzi do mniejszych różnic niż w przypadku, gdy nie bierzemy pod uwagę ponownego połączenia molekuł wiązaniem (72). Poza krótkim, pierwszym okresem (około 0,3 ps), kiedy zachodzi najwięcej zdarzeń w postaci zerwań i odtworzeń wiązań, opis zachowania układu jest generalnie niezależny od definicji wiązania (jeżeli jest ona fizycznie racjonalna). W owym pierwszym okresie zaobserwowano (przy geometrycznej definicji wiązania), iż w przedziale czasu do około 0,1 ps występują ruchy wahadłowe cząsteczki wody, a w przedziale 0,1 – 0,2 ps następują drgania rozciągające tlen – tlen; oba mechanizmy doprowadzają do szybkiego zrywania i odtwarzania się wiązań (72,76).

3.2.4. Dynamika czystej wody

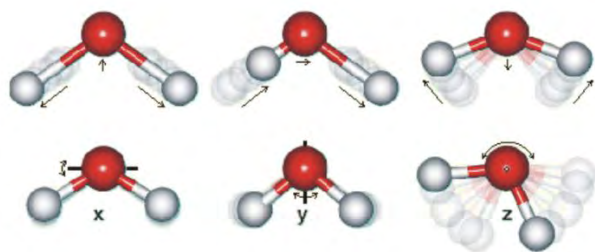
Podstawową wielkością służącą do opisu dynamiki wody jest współczynnik samodyfuzji. Rośnie on wraz ze wzrostem temperatury (**Rys. 3.33**).



Rys. 3.33. Zmiany współczynnika dyfuzji translacyjnej wody wraz z temperaturą dla dwóch zestawów danych eksperymentalnych (białe kółka i kwadraty) oraz dla czterech modeli wody: TIP5P (linia przerywana), ST2 (linia kropkowana), SPC/E (kropka-kreska), SSD1 (czarne gwiazdki) (rysunek pochodzi z publikacji (80)).

Ruchy wibracyjne cząsteczki wody mogą być różnej natury. Cząsteczka charakteryzuje się trzema wewnątrzcząsteczkowymi drganiami normalnymi (symetryczne rozciągające, asymetryczne rozciągające, zginające) (**Rys. 3.34**), które z oczywistych względów nie mogą być badane podczas symulacji komputerowej z użyciem modeli sztywnych. Naturalnie, można jednak rejestrować drgania cząsteczki jako całości.

Cząsteczka wody ma bardzo małe moment bezwładności względem osi głównych ($1.0220 \cdot 10^{-40}$ g·cm²; $2.9376 \cdot 10^{-40}$ g·cm²; $1.9187 \cdot 10^{-40}$ g·cm²), co teoretycznie oznacza dużą swobodę obracania się we wszystkich kierunkach. Jednakże w cieczy ruchy rotacyjne są powstrzymywane przez istnienie wiązań wodorowych, co prowadzi do libracji (przyhamowywanych ruchów rotacyjnych) (**Rys. 3.34**). Zatem zbadanie charakteru ruchów rotacyjnych może dostarczyć informacji o oddziaływaniach cząsteczki z pozostałymi składnikami układu i jej zachowaniu jako elementu płynnego środowiska.



Rys. 3.34. Ruchy wibracyjne cząsteczki wody. U góry: drgania symetryczne rozciągające, asymetryczne rozciągające, zginające. Na dole: libracje względem osi wyznaczonych przez trzy główne momenty bezwładności (<http://www.lsbu.ac.uk/water/vibrat.html>, dn. 26.05.2012).

Informacji o drganiach cząsteczek może dostarczyć widmo mocy prędkości, które otrzymać można w wyniku transformacji Fouriera funkcji autokorelacji prędkości. W zakresie niskich częstości można zaobserwować trzy główne pasma: w okolicach 50, 200 i 600 cm^{-1} (81). Pierwszy z tych pików wiąże się z utrudnieniem ruchów translacyjnych w wyniku uwięzienia w „klatce” z sąsiednich cząsteczek. Pierwszy pik bywa też interpretowany jako drgania zginające $\text{O}\cdots\text{O}\cdots\text{O}$ trójki cząsteczek połączonych wiązaniem wodorowym (82) (83). Drugie pasmo przypisuje się drganiom związanym z obecnością wiązań wodorowych. Wykształcenie się wiązania wodorowego powoduje zwiększenie siły oddziaływania cząsteczki z otoczeniem, dlatego pasmo położone jest przy większych wartościach liczby falowej. Trzecie pasmo w okolicach 600 cm^{-1} przypisywane jest oscylacjom rotacyjnym (81) - ruchom libracyjnym (83). Ponadto mówi się, że drgania w zakresie od 300 do 400 cm^{-1} dotyczą cząsteczek, które posiadają wolne miejsca do utworzenia wiązań wodorowych (83).

Wielu autorów uważa, że ruchy cząsteczek wody mają charakter kolektywny i związane są z przearanżowaniem sieci wiązań wodorowych (84) (85). Aby zaszła dyfuzja translacyjna, może być wymagane więcej niż tylko zerwanie jednego wiązania wodorowego (63). Ohmine i Saito (83) zwrócili uwagę na to, że skala czasowa i przestrzenna tego typu przegrupowań na większą skalę, którą określili jako mieszczącą się w przedziale czasowym 0,1-10 ps i przestrzennym wynoszącym około 10 Å, pokrywa się z zakresem, który jest istotny z punktu widzenia zachodzenia reakcji chemicznych. Powierzchnia energii potencjalnej cieczy jest pofałdowana, a w wyniku ruchu angażującego kilkadziesiąt sąsiadujących cząsteczek następuje przeskok z jednego lokalnego minimum do innego, związany ze znaczną fluktuacją energii (86).

Ze wzrostem temperatury rośnie współczynnik dyfuzji wody, a czas życia wiązania wodorowego staje się krótszy. Starr *et al.* (87) na podstawie symulacji komputerowych stwierdzili, iż zależność można przybliżyć znanym równaniem Arrheniusa, w którym energia aktywacji interpretowana jest jako energia potrzebna do zerwania wiązania poprzez ruch drgający cząsteczki, a jej wartość wyznaczona eksperymentalnie wynosi $10,8 \pm 1,0$ kJ/mol (87). Według Smitha *et al.* (88), potrzeba około 1,5 kcal/mol ($\pm 0,5$ kcal/mol) energii, aby nastąpiło przejście od uporządkowanej konfiguracji tetraedrycznej do konfiguracji zaburzonej z uwolnionym wiązaniem O-H, co proponują utożsamiać ze średnią energią zerwania wiązania wodorowego w układzie tetraedrycznym.

Symulacje komputerowe pokazały, że rozpatrując kinetykę wiązań wodorowych w długich przedziałach czasowych można stwierdzić, iż dynamika ich zaniku nie daje się opisać pojedynczą funkcją wykładniczą (76). Sugeruje to, że tworzenie i zrywanie wiązania nie są prostymi procesami opisywanymi przez konkretne stałe szybkości. Luzar i Chandler (72,76) stwierdzili, że specyficzna kinetyka nie wynika z korelacji pomiędzy wiązaniem istniejącym między dwiema cząsteczkami a wiązaniami sąsiednimi (nie zaobserwowali występowania efektu kooperatywności tworzenia i zrywania wiązań), ale wyjaśniają jej charakter tym, że jest sprzężona ze zjawiskiem dyfuzji. Dwie cząsteczki mogą oddalić się od siebie poprzez ruch dyfuzyjny dopiero, jeżeli

wiązanie wodorowe pomiędzy nimi pęknie. Z drugiej strony zerwane wiązanie może zostać odtworzone, jeżeli cząsteczka zmieni kierunek swego ruchu i przybliży się z powrotem do swego partnera.

Niedawne obserwacje cząsteczek wody z użyciem techniki 2D IR (ang. *two-dimensional infrared spectroscopy*) pokazały, że wśród tych cząsteczek wody, które zdawały się niezwiązane wiązaniem wodorowym, wszystkie odtwarzały wiązanie w przeciągu 150 fs (78). Prowadzi to do wniosku, że ciekła woda jako taka nie posiada „zwisających” swobodnie wiązań, ale że ich pojawienie się jest krótkim stanem przejściowym. Struktura płynu zmienia się poprzez nagłe „przerzucenie” wiązania od jednego partnera do drugiego. Dodając do tego informację, że czas życia tego wiązania jest rzędu tylko około 1 ps (89), pojawi się obraz płynnej wody, która nie tworzy stabilnych, podobnych do lodu struktur (pomimo silnych oddziaływań między cząsteczkami), ale dynamiczny układ.

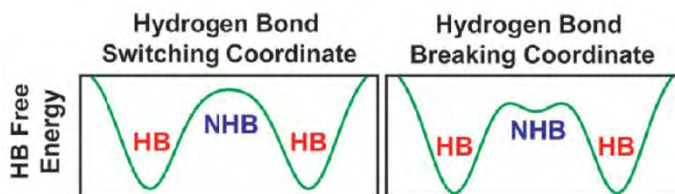
Zrywanie i wymiana partnerów wiązań wodorowych odgrywa ważną rolę w dynamicznym przegrupowywaniu się cząsteczek wody. Budowa cząsteczki wody i rozkład ładunku mają znaczenie dla przebiegu tego procesu. Dzięki rozmyciu ładunku ujemnego na atomie tlenu, ułatwione jest chociażby przełączenie wiązania pomiędzy jedną a drugą wolną parą elektronową (63).

Molekularny mechanizm rearanżacji wiązań jest przedmiotem debaty.

3.2.5. Rearanżacja wiązań wodorowych

Można wyobrazić sobie dwa różne scenariusze prowadzące do zmiany partnera wiązania wodorowego (90). Pierwszy z nich będzie polegał na pierwotnym zerwaniu wiązania w wyniku fluktuacji termicznych, przy czym nowy akceptor wiązania niekoniecznie będzie od razu dostępny. Takie niezajęte wiązanie jest stabilizowane entropowo do chwili, aż fluktuacje dostarczą nowego akceptora wiązania wodorowego. Konfiguracja powiązana wiązaniami wodorowymi i niepowiązana wiązaniami wodorowymi zajmują minima na powierzchni energii swobodnej. Drugi scenariusz polega na tym, że atom wodoru zmienia akceptory wiązania wodorowego w jednym kroku, w który zaangażowany jest zarazem nowy i stary akceptor wiązania. Konfiguracja z zerwanym wiązaniem jest nietrwała i ma jedynie charakter przejściowy (**Rys. 3.35**).

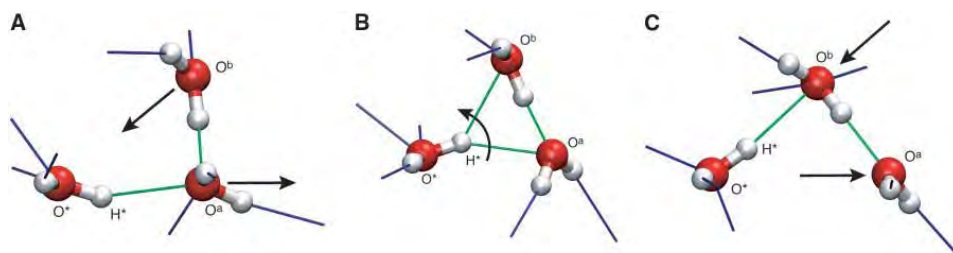
Pytanie to związane jest z kwestią, czy w wodzie istnieje tylko jedna stabilna struktura (tetraedryczna), czy też możliwe są również inne stabilne stany (79). Jeżeli tylko struktura tetraedryczna miałaby być stabilna, to puste miejsca wiązania i zdeformowane tetraedry należałoby uważać za stany przejściowe.



Rys. 3.35. Zmiany energii swobodnej dla dwóch scenariuszy zmiany partnera wiązania wodorowego. Z lewej: Przełączenie wiązania poprzez symultaniczne zerwanie wiązania ze starym akceptorem i utworzenie wiązania z nowym akceptorem. Z prawej: Przejście poprzez stan wolnego, zerwanego wiązania (rysunek pochodzi z publikacji (90)).

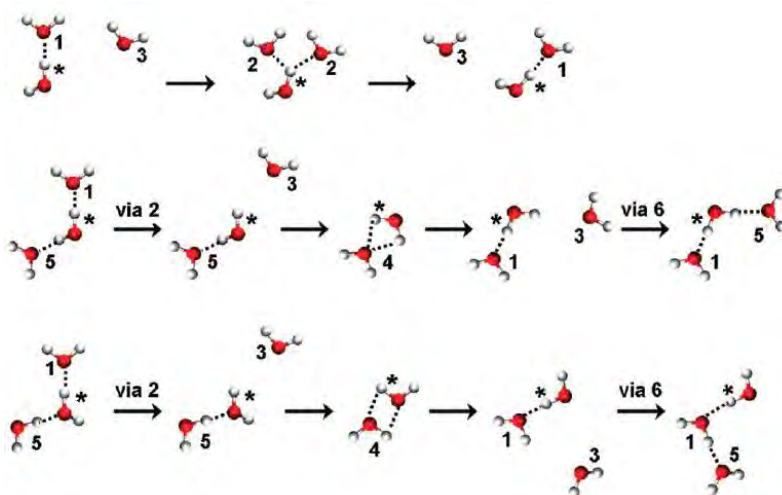
Zmiana partnerów wiązania wodorowego zachodzi najprawdopodobniej poprzez krótkotrwały stan przejściowy w postaci rozwidlonego wiązania, kiedy atom wodoru łączy się z dwiema sąsiednimi cząsteczkami naraz (90,91). Czasem mówi się, że zmiana partnera wiązania jest skorelowana z ruchem innych cząsteczek (90).

Laage i Hynes (92,93) przedstawili interesującą propozycję mechanizmu reorientacji cząsteczki wody, podczas której dochodzi do zmiany partnerów wiązania wodorowego. Według tego mechanizmu (**Rys. 3.36**), reorientacja odbywa się poprzez szybki obrót wiązania O^*-H^* o średnio około 60° w kierunku nowego akceptora. Obrót ten jest połączony z zerwaniem wiązania wodorowego tworzonego przez pierwotny akceptor (który doświadcza chwilowego stanu, w którym tworzy za dużo wiązań wodorowych) i utworzeniem wiązania z aktualnie mającą niedobór partnerów cząsteczką nadchodzącą z drugiej warstwy solwatacyjnej. Pierwotnie atom wodoru H^* jest związany wiązaniem z atomem tlenu O^a , podczas gdy z drugiej warstwy solwatacyjnej zbliża się nowa cząsteczka, zawierająca atom O^b . Dochodzi do sytuacji, w której oba atomy tlenu O^a i O^b są równo odległe od atomu O^* cząsteczki centralnej (w stanie przejściowym, wiązanie wodorowe donora istnieje pomiędzy nowym i starym akceptorem jednocześnie). Wówczas atom H^* zmienia partnera wiązania - przeskakuje od atomu O^a do atomu O^b . Następnie cząsteczka zawierająca tlen O^a opuszcza pierwszą warstwę solwatacyjną cząsteczki centralnej. Ten mechanizm nie przewiduje istnienia w czystej wodzie swobodnych wiązań O^*-H^* . Ponadto koszt energetyczny wymiany partnerów wiązania jest mniejszy, niż gdyby najpierw musiało dojść do zerwania wiązania, a dopiero potem do jego odtworzenia. W tym przypadku oba te procesy zachodzą równocześnie. Dzięki temu może dochodzić do szybkich zmian strukturalnych.



Rys. 3.36. Mechanizm reorientacji cząsteczki wody, połączonej ze zmianą partnerów wiązania wodorowego zaproponowany przez Laage i Hynes'a. Atom tlenu H^* zmienia partnerującego mu akceptora wiązania z O^a (A) na O^b . (C) poprzez szybki obrót wiązania O^*-H^* i stadium podwójnego wiązania wodorowego, tworzonego ze starym i nowym akceptorem jednocześnie (B) (rysunek pochodzi z publikacji (92)).

Henchman i Irudayam (79) zaproponowali kilka mechanizmów przełączania wiązania wodorowego: przełączenie pojedyncze, podwójne i odwrócone (ang. *single, double, reverse switch*). Również według nich, wiązania przełączają się przeważnie bez przechodzenia przez etap wiązania zerwanego.



Rys. 3.37. Mechanizmy przełączania wiązania wodorowego zaproponowane przez Henchman'a i Irudayam'a. U góry: przełączenie pojedyncze, nie zachodzi poprzez etap zerwanego wiązania. W środku: przełączenie podwójne zachodzące poprzez etap, gdzie atom tlenu tworzy dwa wiązania wodorowe z sąsiednią cząsteczką (możliwy jest powrót do oryginalnej konfiguracji). Na dole: przełączenie podwójne zachodzące poprzez cykliczny dimer (możliwy jest powrót do oryginalnej konfiguracji) (rysunek pochodzi z publikacji (79)).

Według nich, przełączenie pojedyncze jest najpowszechniejsze (78%), a odwrócone najrzadsze. Przełączenie podwójne zachodzi poprzez 2 etapy

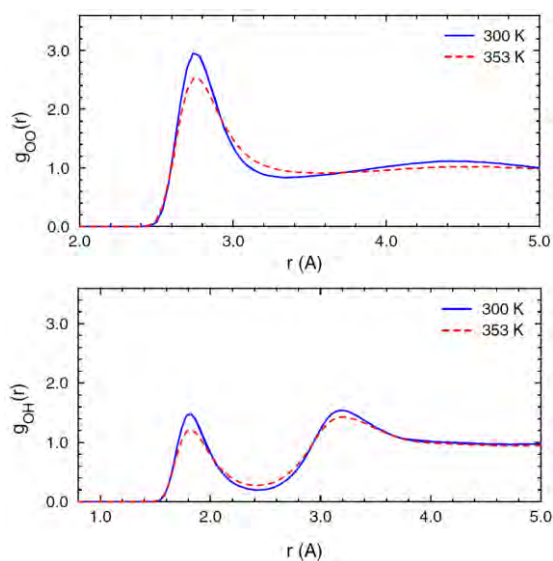
zerwanego wiązania. Przełączenie odwrócone przypomina podwójne, ale donor powraca do starego układu i nie zmienia akceptora. Przewaga przełączeń pojedynczych pokazuje, że jest to zapewne mechanizm korzystniejszy energetycznie i wymaga mniejszego przekręcenia cząsteczki oraz mniejszej liczby etapów pośrednich niż przełączenie podwójne i odwrócone.

Jeżeli chodzi o problem korelacji w tworzeniu i zrywaniu wiązań, to autorzy zaznaczyli, że choć oczywiście żadna cząsteczka w cieczy nie może poruszać się całkowicie niezależnie od pozostałych, to przeważający mechanizm przełączenia wiązania, tzn. przełączenie pojedyncze, nie wymaga jednoczesnego wystąpienia innych przełączeń. Mniej powszechne przełączenie podwójne wymaga wystąpienia kilku przełączeń wiązań następujących tuż po sobie. Ponieważ w umożliwienie zajścia przełączenia podwójnego są zaangażowane dwa przełączenia pojedyncze, tylko około połowa pojedynczych przełączeń jest niezależna.

3.2.6. Struktura czystej wody

Wiązania wodorowe silnie wpływają na strukturę wody. Jakkolwiek wiązanie wodorowe w lodzie może mieć częściowy charakter kowalencyjny, to jednak na szczęście (dla prowadzenia symulacji komputerowych z użyciem uproszczonych modeli) w wodzie ciekłej efekt ten można zaniedbać (59). Eksperymentalnie wyznaczona średnia energia tego wiązania w temperaturze pokojowej wynosi około 16,7 kJ/mol (94), a przykładowa wartość wyznaczona podczas symulacji w 298 K dla modelu SPC/E to około 20,4 kJ/mol (65). Widać zatem, że wiązania te są wielokrotnie słabsze od wiązań kowalencyjnych, ale jednak są na tyle silne i jest ich tak dużo, że wywierają ogromny wpływ na właściwości wody.

Skutki istnienia wiązań wodorowych zaobserwować można na funkcjach rozkładu radialnego. Funkcja rozkładu radialnego określa względne prawdopodobieństwo znalezienia się cząstki w danej odległości od wybranego punktu odniesienia (w stosunku do rozkładu losowego). Atomowe funkcje rozkładu radialnego tlen-tlen, tlen-wodór i wodór-wodór są powszechnie używane do opisywania struktury ciekłej wody (**Rys. 3.38**).



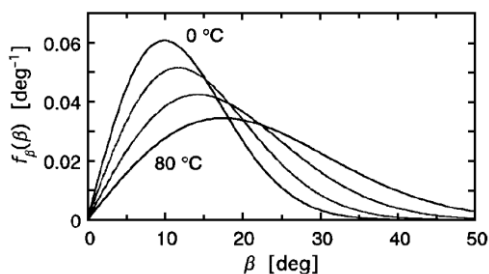
Rys. 3.38. U góry: Eksperymentalnie wyznaczona funkcja rozkładu radialnego tlen – tlen dla wody. Na dole: Eksperymentalnie wyznaczona funkcja rozkładu radialnego tlen – wodór dla wody z pominięciem piku pochodzącego od wewnątrzcząsteczkowego wodoru (rysunek pochodzi z publikacji (95)).

Funkcja wygładza się ze wzrostem temperatury i następuje nieznaczne przesunięcie pierwszego maksimum ku większym wartościom (95). Na odległość, przy jakiej położone jest pierwsze maksimum, wpływają wiązania wodorowe.

Wiązanie wodorowe może zostać utworzone, kiedy wolna para elektronowa jednej cząsteczki (miejsce akceptorowe wiązania) spotka się z atomem wodoru drugiej cząsteczki (miejsce donorowe wiązania). Zatem każda cząsteczka może uczestniczyć w czterech wiązaniach jednocześnie. Dzięki temu tworzy się trójwymiarowa sieć, występująca zarówno w każdej z wielu odmian polimorficznych lodu, jak i w wodzie ciekłej (61). Konsekwencją specyficznej geometrii wiązań jest fakt, że forma krystaliczna wody charakteryzuje się mniejszą gęstością od cieczy. Wiązania wodorowe w wodzie ciekłej nie są idealnie liniowe, a przedział ich długości jest względnie szeroki w porównaniu z wodą w stanie stałym. Odstępstwa od liniowości można opisać za pomocą kąta wiązania, zdefiniowanego jako kąt pomiędzy odcinkiem łączącym dwa atomy tlenu cząsteczek tworzących wiązanie wodorowe oraz wiązaniem O-H, którego wodór uczestniczy w wiązaniu wodorowym. Rozkład prawdopodobieństwa wystąpienia określonej wartości kąta został określony eksperymentalnie (**Rys. 3.39**).

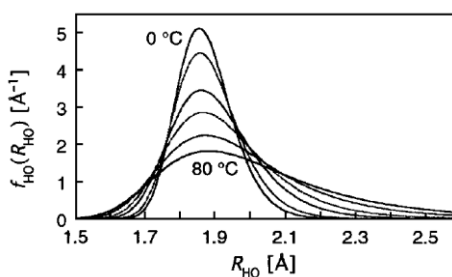
Wyniki uzyskane przy użyciu modeli używanych w symulacjach komputerowych różnią się od siebie i zależą od rodzaju modelu (szczególnie znaczenie ma sposób rozmieszczenia ładunku, np. w modelach TIP4P i TIP5P). Najbardziej prawdopodobna wartość kąta wiązania wynosi w temperaturze

pokojoyej około 10° (95). Wraz ze wzrostem temperatury, następuje rozszerzenie rozkładu połączone z przesunięciem maksimum ku większym wartościom kąta.



Rys. 3.39. Eksperymentalnie wyznaczony rozkład prawdopodobieństwa wystąpienia określonej wartości kąta wiązania wodorowego β (rysunek pochodzi z publikacji (96)).

Rozkład długości wiązań także znacząco zmienia się z temperaturą. W niższej temperaturze następuje znaczne jego zwężenie i lekkie przesunięcie maksimum ku mniejszym wartościom (**Rys. 3.40**).



Rys. 3.40. Eksperymentalnie wyznaczony rozkład prawdopodobieństwa wystąpienia określonej długości wiązania wodorowego R_{HO} (rysunek pochodzi z publikacji (96)).

Hakala *et al.* (97) donoszą o istnieniu korelacji pomiędzy kątem i długością wiązania w ciekłej wodzie.

Można napotkać różne oszacowania, ile wiązań wodorowych tworzy jedna cząsteczka w stanie ciekłym. Ball (89) pisze, że eksperymenty z zastosowaniem spektroskopii rozpraszania neutronów wraz z symulacjami komputerowymi prowadzą do wniosku, że jest ich około 3,5 (w temperaturze pokojowej). Artykuł Werneta *et al.* (75), który dostarczył definicji wiązania wodorowego wykorzystywanej w tej pracy, podaje eksperymentalnie wyznaczoną przez autorów liczbę wiązań wodorowych: wynosi ona w temperaturze 298 K $2,2 \pm 0,5$ wiązań na cząsteczkę, a więc mniej niż można się

spodziewać. Podczas symulacji wody SPC w tej samej temperaturze i przy tym samym kryterium wiązania, autorzy stwierdzili, że tworzy ona 3,34 wiązań wodorowych na cząsteczkę. Sugerują oni, że w wodzie ciekłej mogą występować dwa silne wiązania: jedno donorowe, drugie akceptorowe, a cząsteczki połączone są nimi w łańcuchy i pierścienie, które z kolei między sobą łączą się słabymi wiązaniami wodorowymi. Obraz ten był kontrowersyjny, ponieważ różnił się od powszechnego opisu wody jako tetraedrycznej sieci. Nie jest wobec tego zaskakujące, że spotkał się z polemiką, na przykład ze strony Head-Gordon i Johnson (98).

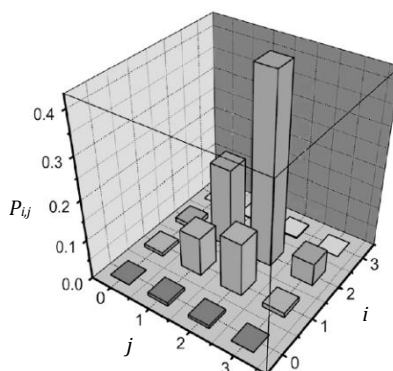
Jednak nawet jeżeli uznamy, że woda charakteryzuje się konfiguracją tetraedryczną, to należy uznać, że ma ona defekty. Choć lokalna struktura rzeczywiście może być w znacznym stopniu tetraedryczna, to uporządkowanie to szybko zanika w miarę przesuwania się w głąb cieczy (63).



Rys. 3.41. Przestrzenna gęstość rozkładu atomów tlenu (kolor czerwony) i wodoru (kolor biały) w pierwszej otoczce solwacyjnej cząsteczki wody (model kulkowy) otrzymana w wyniku symulacji kwantowej ciekłej wody w temperaturze 298,15 K (rysunek pochodzi z publikacji (99)).

Na rysunku powyżej (**Rys. 3.41**) można zaobserwować odchylenia od tetraedryczności zilustrowane za pomocą przestrzennej funkcji rozkładu. Powyżej dwóch atomów wodoru cząsteczki centralnej, obserwujemy dwa niezbyt rozległe obszary odpowiadające atomom tlenu sąsiadujących. Poniżej atomu tlenu cząsteczki centralnej, obserwujemy długi pas odpowiadający atomom wodoru, które umiejscawiają się w okolicach zdelokalizowanych wolnych par elektronowych (63).

Istnienie defektów w tetraedrycznej sieci znajduje dodatkowe potwierdzenie po obliczeniu prawdopodobieństwa tworzenia przez cząsteczkę wody jednocześnie i wiązań wodorowych oraz j wiązań akceptorowych (**Rys. 3.42**). Najwyższy pik odpowiada symetrii tetraedrycznej (dwa wiązania donorowe i dwa akceptorowe), a drugi z kolei może odpowiadać symetrii trygonalnej (dwa wiązania donorowe i jedno akceptorowe) (63).



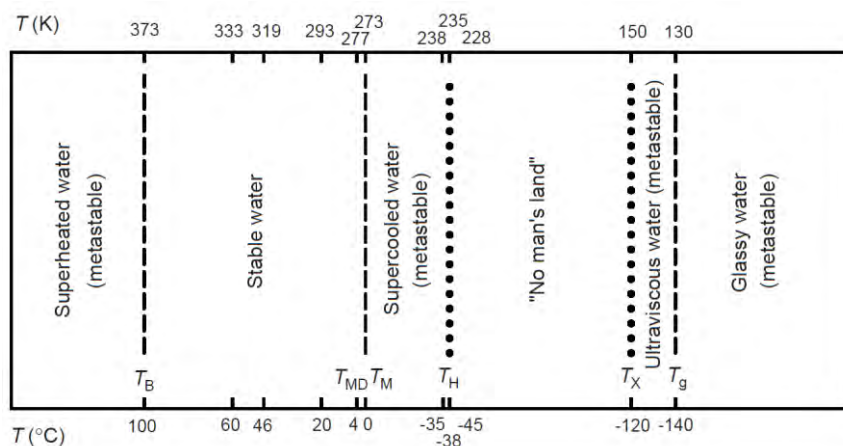
Rys. 3.42. Prawdopodobieństwo, P_{ij} , że cząsteczka wody tworzy i wiązań wodorowych jako donor i j jako akceptor. Obliczenia przeprowadzone w temperaturze 300 K z zastosowaniem polaryzowalnego modelu wody AMOEBA. Jeżeli $i=3$, oznacza to rozwidlane wiązanie wodorowe tworzone przez jeden atom wodoru z dwoma akceptorami. Jeżeli $j=3$, wówczas tlen akceptuje trzy wiązania wodorowe (rysunek pochodzi z publikacji (63)).

Poruszonym już z dynamicznego punktu widzenia tematem jest problem ewentualnego istnienia w wodzie cząsteczek w stanie z niezajętym miejscem na utworzenie wiązania wodorowego. Loparo *et al.* (100), wykorzystując dane eksperymentalne, stwierdzili, że stany z zerwanym wiązaniem wodorowym są krótkotrwałe (czas rzędu 150 fs) i pojawiają się przejściowo w wyniku dużych fluktuacji wokół pojedynczego wiązania albo podczas zmiany partnerów wiązania wodorowego. Niezgodny z ich wynikami jest zarówno obraz swobodnych, stabilizowanych entropowo wiązań jak i model wody rozważanej jako mieszanina układów o różnej sile wiązań wodorowych, które oddziela bariera energetyczna większa od kT .

Analizując literaturę, można się spotkać z dwoma głównymi punktami widzenia na strukturę ciekłej wody. Według pierwszego z nich, woda ma strukturę jednorodną, natomiast według drugiego na wodę składa się mieszanina dwóch rodzajów struktur.

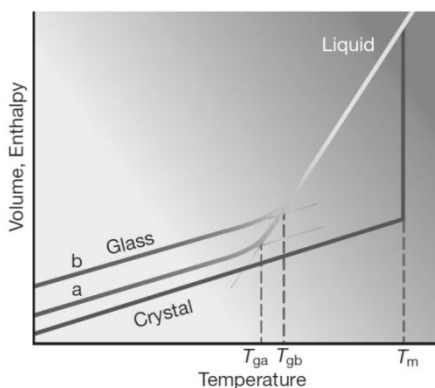
Niektóre wnioski dotyczące struktury wody ciekłej w temperaturze pokojowej zostały sformułowane na podstawie analizy struktury wody w niskich temperaturach (przy założeniu, że jej charakterystyczne cechy ulegają wtedy uwypukleniu). Na **Rys. 3.43** przedstawione są stabilne i metastabilne stany wody w różnych temperaturach pod ciśnieniem atmosferycznym.

Woda ciekła może występować jako ciecz przechłodzona w temperaturze dużo niższej od jej temperatury topnienia (aż do około 232 K pod ciśnieniem atmosferycznym (101)). Poniżej temperatury około 130 K (temperatura przejścia szklistego), woda może występować w postaci szkła (102). W przedziale temperatur poniżej T_H (temperatura homogenicznej (spontanicznej) nukleacji) aż do temperatury T_X mamy obszar, dla którego aktualnie nie ma żadnych wyników eksperymentalnych dotyczących fazy ciekłej w wodzie czystej (101,103).



Rys. 3.43. Stabilne i metastabilne stany wody pod ciśnieniem atmosferycznym. T_B – temperatura wrzenia; T_{MD} – temperatura maksymalnej gęstości; T_M – temperatura topnienia; T_H – temperatura homologicznej nukleacji; T_g – temperatura przejścia szklistego (rysunek pochodzi z publikacji (102), został częściowo zmodyfikowany).

Najprostszy sposób otrzymania stanu szklistego to na tyle szybkie chłodzenie cieczy, aby uniknąć jej krystalizacji (104) (**Rys. 3.44**). Powierzchnia energii potencjalnej wody ciekłej zawiera wiele lokalnych minimów. Przy dostatecznie szybkim ochładzaniu, woda może zostać uwięziona w jednym z nich, tworząc stałą strukturę amorficzną.



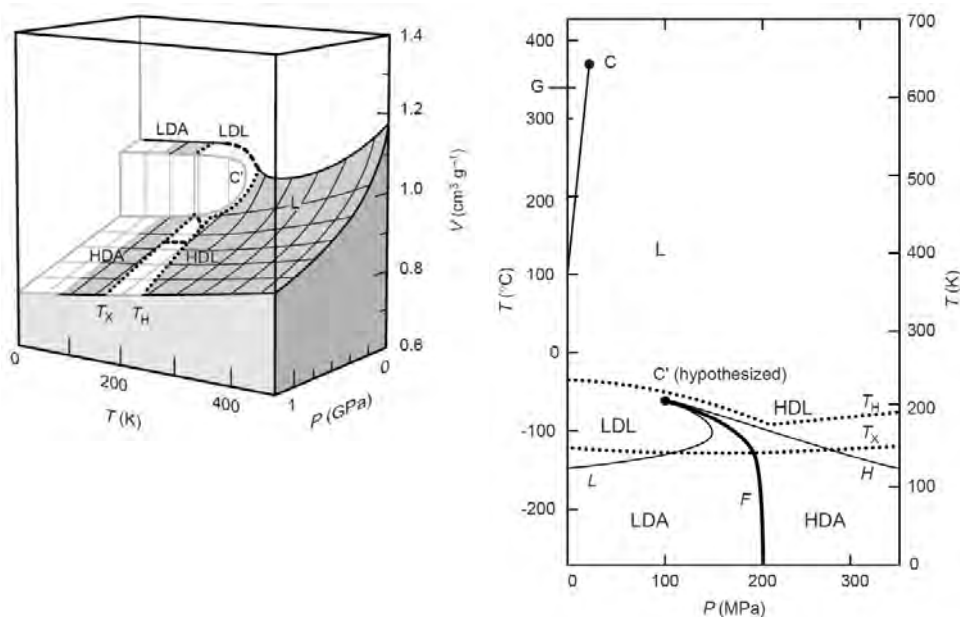
Rys. 3.44. Zależność objętości v lub entalpii h cieczy od temperatury przy stałym ciśnieniu. T_m oznacza temperaturę topnienia. Wolniejsze chłodzenie prowadzi do przejścia szklistego w temperaturze T_{ga} , a szybsze w T_{gb} (rysunek pochodzi z publikacji (104)).

Woda w stanie szklistym, zwana także lodem amorficznym, jest ciałem stałym, ale charakteryzuje ją to, że obecny jest w niej pewien poziom

nieuporządkowania charakterystyczny dla stanu ciekłego. W wodzie w stanie szklistym współistnieć mogą dwie fazy: amorficzna faza o niskiej gęstości (ang. *low-density amorphous*, LDA) i amorficzna faza o wysokiej gęstości (ang. *high density amorphous*, HDA) (102) (tzw. poliamorfizm).

Mówi się, że obecność dwóch faz w szkle jest odbiciem i kontynuacją stanu, który ma miejsce w wodzie ciekłej. Zatem w wodzie istnieć powinny dwa rodzaje struktur: jedną z nich byłby płyn o niskiej gęstości (ang. *low-density liquid*, LDL), a drugą płyn o wysokiej gęstości (ang. *high-density liquid*, HDL) (105).

Według hipotezy przejścia fazowego woda-woda, istnieje drugi punkt krytyczny, punkt krytyczny ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid critical point*, LLCP). Poniżej znanego punktu krytycznego ciecz-gaz o współrzędnych $T_c = 647$ K, $P_c = 22$ MPa, płyn rozdziela się na dwie fazy: gazową o małej gęstości i ciekłą o większej gęstości, w temperaturze zależnej od ciśnienia. Analogicznie, poniżej postulowanego drugiego punktu krytycznego o współrzędnych $T_c = 220$ K, $P_c = 100$ MPa, woda ciekła rozdziela się na dwie fazy ciekłe: o niskiej gęstości (LDL) i wysokiej gęstości (HDL), również w temperaturze zależnej od ciśnienia. Woda w punkcie krytycznym to mieszanina, w której można znaleźć struktury przypominających zarówno fazę LDL jak i HDL (102) (**Rys. 3.45**).



Rys. 3.45. Z prawej: Termodynamiczne zachowanie się wody według teorii przejścia fazowego ciec-ciecz. Powierzchnia określająca zależność równowagowej objętości $V=V(P,T)$ od ciśnienia P i temperatury T , określona przez równanie stanu. C' to postulowany drugi punkt krytyczny. LDL i HDL to fazy o niskiej i wysokiej gęstości, które istnieją w cieczy poniżej C' . LDA i HDA to fazy o niskiej i wysokiej gęstości istniejące w amorficznym stanie stałym.

Z lewej: Rzut na płaszczyznę PT wartości równowagowej $V=V(P,T)$. Zaznaczone fazy LDL, HDL, LDA i HDA. C to punkt krytyczny, C' to postulowany drugi punkt krytyczny. G i L to gaz i ciecz, fazy o niskiej i wysokiej gęstości, które istnieją poniżej C . F jest linią przejścia fazowego pierwszego rodzaju, która ma swój początek w C' i oddziela od siebie fazy o niskiej i wysokiej gęstości występujące poniżej temperatury T_c . L i H są liniami granicznymi dla występowania metastabilnych faz LDA i HDA (rysunek pochodzi z publikacji (102)).

Strukturę LDL opisuje się jako zawierającą ułożone teraedrycznie na podobieństwo lodu wiązania wodorowe. W przypadku HDL mamy do czynienia z zaburzeniem tej struktury (105). Analizując rezultaty dynamiki molekularnej, Siratani i Sasai (106) stwierdzili, że cząsteczki o dobrze ustrukturyzowanym otoczeniu i nieustrukturyzowane mają tendencję do łączenia się w klastry, a każda cząsteczka co jakiś czas przechodzi ze stanu ustrukturyzowanego do nieuporządkowanego.

Huang *et al.* (107), opierając się na wynikach eksperymentalnych, twierdzą, że struktury analogiczne do struktur HDL i LDL obecnych w przechłodzonej wodzie występują także w zwykłych warunkach ciśnienia i temperatury. Opisują oni strukturę wody jako fluktuującą pomiędzy tetraedrycznymi i zaburzonymi konfiguracjami, co jest wynikiem

przeciwstawnych dążeń do zminimalizowania entalpii (do czego prowadzi łącznie się cząsteczek silnymi wiązaniami w tetraedrycznej konfiguracji) oraz zmaksymalizowania entropii (nieuporządkowane wiązania i zaburzenia sieci).

Również Nilsson i Pettersson (108) opisują ciekłą wodę jako składającą się z dwóch rodzajów struktur. Swoistą bazę stanowi struktura HDL o zaburzonej geometrii wiązań wodorowych, bez wykształconej drugiej otoczki solwatacyjnej i o sieci wiązań, która zawiera ubytki (na przykład cząsteczki tworzą tylko dwa wiązania wodorowe, co przywodzi na myśl łańcuchy wspomniane przez Werneta *et al.* (75)). Każdą cząsteczkę wody otacza wiele innych cząsteczek, ale rozmieszczonych w różnych odległościach. W tej cieczy pojawiają się lokalne fluktuacje prowadzące do struktury LDL.

Interesujące podejście do zagadnienia współistnienia dwóch typów struktur w wodzie zaproponował Tanaka (109-112). Według jego modelu, w płynie znaleźć można dwa rodzaje struktur. Pierwszy z nich to struktury o dobrze zdefiniowanej konstrukcji i niskiej energii, stabilizowane przez wiązania wodorowe, w których przypadku występuje efekt wyłączonej objętości. Model nie wymaga, by ich geometria była znana i ściśle zdefiniowana. Tanaka jako prawdopodobne przykłady takich struktur podaje połączone wiązaniami wodorowymi jednostki oktameryczne lub pierścienie sześciocłonowe podobne do tych znajdujących w lodzie heksagonalnym. Liczba tych struktur będzie zależała od temperatury płynu i może być opisana rozkładem Boltzmanna. Struktury uporządkowane wyłaniają się spośród wielu nieuporządkowanych struktur o nieokreślonej geometrii i większej gęstości (mniejszej objętości właściwej). Struktura wody, która ustala się w danej temperaturze, jest wynikiem ustalenia się równowagi pomiędzy tymi dwiema współzawodniczącymi formami (tworzenie pierwszej prowadzi do optymalizacji układu wiązań wodorowych pod względem energetycznym, a drugiej do wzrostu gęstości). Rozważając proces kształtowania się struktury uporządkowanej z nieuporządkowanej jako hipotetyczne przejście fazowe związane z pewną zmianą energii i objętości, potrafił on wytłumaczyć szereg anomalnych właściwości wody, w tym maksimum gęstości w temperaturze 4°C.

Należy podkreślić, iż opisywanie ciekłej wody jako struktury polimorficznej nie jest jednomyślnie akceptowanym punktem widzenia. Na przykład Limmer i Chandler (113) na podstawie symulacji komputerowych przekonują iż to, co bywało przypisywane przejściu fazowemu woda-woda w przechłodzonej cieczy, jest w istocie przejściem pomiędzy wodą i stanem stałym.

3.2.7. Miary stopnia uporządkowania strukturalnego wody

Problem opisu struktury cieczy jest często poruszany w literaturze, jednak jak dotąd nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jak należy rozumieć to pojęcie i jakimi parametrami najlepiej je opisywać. Z drugiej strony, zagadnienie to jest tak istotne, zwłaszcza gdy mówimy o zmianach strukturalnych dotyczących wody w warstwie solwatacyjnej, że wciąż podejmowane są rozliczne próby jego racjonalizacji.

Dlatego chciałabym w tym miejscu opisać parę parametrów i konceptów stosowanych w celu opisu struktury wody czystej (a czasem i solwatacyjnej), istotnych z punktu widzenia tej pracy. Będą to w szczególności dwucząstkowe funkcje korelacji, podział na komórki Voronoia i przedstawienie wody w postaci grafu.

Koncepcja map uporządkowania

Truskett *et al.* (114) analizowali układy składające się ze sztywnych kul. Opisywali je za pomocą wybranych przez siebie parametrów uporządkowania translacyjnego i orientacyjnego. Rezultaty obliczeń przedstawili na dwuwymiarowych diagramach uporządkowania, zaznaczając położenia stanów ciekłego, krystalicznego i szklanego, z których każdy zajmował sobie właściwe miejsce na mapie. Jedną z osi wykresu była oś, na której odkładana była wartość parametru uporządkowania orientacyjnego, a na drugiej osi odkładana była wartość parametru uporządkowania translacyjnego.

Z kolei strukturę wody analizowali Errington i Debenedetti (115), również stosując parametry uporządkowania translacyjnego i orientacyjnego. Pierwszy z nich był miarą skłonności dwóch cząsteczek do ustawiania się w określonej odległości od siebie i był zmodyfikowaną wersją parametru zastosowanego przez Truskett'a *et al.* (114). Drugi natomiast był miarą tego, w jakim stopniu cząsteczka centralna wraz ze swoimi czterema najbliższymi sąsiadami tworzy konfigurację tetraedryczną i był oparty na znanym parametrze tetraedryczności wprowadzonym pierwotnie przez Chau i Hardwick'a (116). Autorzy omawianej publikacji obserwowali zmiany w wartości parametrów następujące wraz ze zmianą temperatury i gęstości symulowanej wody oraz wzajemne korelacje pomiędzy ich wartościami. Stwierdzili też, że w pewnych warunkach wiązania wodorowe silnie determinują zarówno orientację cząsteczek, jak i ich wzajemną odległość.

Do koncepcji map uporządkowania odwoływali się też Giovambattista *et al.* (117). Wykorzystując te same parametry uporządkowania co Errington i Debenedetti, skonstruowali mapy uporządkowania dotyczące wody SPC/E, schładzanej do stanu szklanego.

Entropia i dwucząstkowe funkcje korelacji

Najbardziej naturalną i pożądaną z fizycznego punktu widzenia miarą nieuporządkowania byłaby entropia układu. Ewentualne zmiany struktury wody związane z procesem solwatacji białek powinny się uwidocznić w zmianie entropii. Obliczenia entropii są jednak trudnym zadaniem. Jednym z przykładów prób obliczenia lokalnych zmian entropii jest praca autorstwa Jana *et al.* (118). Zastosowali oni przybliżoną metodę obliczeń entropii z zastosowaniem modelu dwufazowego do wody solwatacyjnej w małym i dużym rowku DNA. Zaobserwowali, że entropia wody solwatacyjnej jest znacząco mniejsza niż wody czystej.

W stosunkowo niedawno opublikowanej pracy (119), Henchman zaproponował metodę obliczenia entropii wody opartą na modelu oscylatora harmonicznego. Wartości entropii wody, które otrzymał, były bliskie lub prawie równe wartości eksperymentalnej (równej $69,9 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), zależnie od użytego

modelu wody, np. dla SPC 70,1 JK⁻¹mol⁻¹, a dla SPC/E 66,6 JK⁻¹mol⁻¹. Metoda została użyta do badania solwatacji hydrofobowej (120). Wydaje się jednak, że do wyników otrzymanych tą metodą należy podchodzić z pewną ostrożnością. Na przykład okazuje się, że metoda ta sprawdza się gorzej w niskich temperaturach (121).

Rozłożenie całkowitej entropii na sumę wkładów pochodzących od oddziaływań *n*-cząstkowych zostało po raz pierwszy zaproponowane przez Green'a (122).

Obliczenia entropii z zastosowaniem dwucząstkowych funkcji korelacji w odniesieniu do układu zawierającego wodę i cząsteczkę metanu zaproponowali Lazaridis i Paulaitis (123). Podzielili też wkład do entropii mieszania pochodzący od oddziaływań dwucząstkowych na część translacyjną i orientacyjną i stwierdzili, że obie maleją ze wzrostem temperatury. Zaznaczyli przy tym, że chociaż znaczący wpływ na entropię mieszania ma część związana z efektami orientacyjnymi, które są skutkiem obecności cząsteczki rozpuszczonej w wodzie, to stwierdzenie, że entropia wody solwatacyjnej jest mniejsza niż entropia wody czystej jest w tym przypadku nieuprawnione. Zdefiniowana przez autorów entropia orientacyjna odnosi się do korelacji pomiędzy cząsteczką substancji rozpuszczonej i wodą, zatem nie można na jej podstawie wyciągać wniosków dotyczących samej wody. Ponadto należy pamiętać, że woda w otocze solwatacyjnej innej cząsteczki wody również wykazuje duże preferencje orientacyjne. Sama obecność efektów orientacyjnych nie oznacza jeszcze większego uporządkowania wody.

Lazaridis i Karplus (124) przeprowadzili obliczenia nadmiarowej entropii wody w przybliżeniu dwucząstkowym. Człon dwucząstkowy został podzielony na część translacyjną i orientacyjną, zależną od pięciu kątów i wyznaczoną po wprowadzeniu pewnych przybliżeń w celu uproszczenia obliczeń. Stwierdzili oni, że zdecydowana większość orientacyjnego wkładu do nadmiarowej entropii pochodzi od korelacji obecnych w pierwszej warstwie solwatacyjnej cząsteczki wody. Ponadto zaobserwowali, że wysokie ciśnienie powoduje zmniejszenie korelacji orientacyjnych.

Saija *et al.* (125) pokazali, że wkład do entropii pochodzący od oddziaływań dwucząstkowych stanowi zdecydowaną większość w całej nadmiarowej entropii, przy czym udział ten zmienia się w pewnym stopniu z temperaturą. Przy temperaturze w okolicach 270 K obie wartości są praktycznie sobie równe, w wyższej temperaturze występuje niedoszacowanie całkowitej nadmiarowej entropii przez wkład dwucząstkowy, które zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury (na przykład w temperaturze 300 K wkład dwucząstkowy stanowi około 90%).

Zawarte w pracy (65) obliczenia entropii wody z zastosowaniem przybliżenia dwucząstkowego z podziałem na część translacyjną i orientacyjną zostały dokonane bez przybliżeń obecnych w poprzednich publikacjach. Wyniki pokazują, że udział translacyjny w całkowitym wkładzie do entropii pochodzącym od oddziaływań dwucząstkowych jest nieduży (w przeciwieństwie do orientacyjnego) i pochodzi prawie w całości od cząsteczek obecnych w pierwszej warstwie solwatacyjnej. Na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że udział korelacji dwucząstkowych w

całkowitej entropii układu pochodzi głównie od pierwszej warstwy solwatacyjnej, dla drugiej jest już ponad cztery razy mniejszy, a dla trzeciej zupełnie niewielki. Oznacza to, że cząsteczki wody są znacząco uporządkowane z punktu widzenia cząsteczki centralnej do odległości około 0,55-0,60 nm, a dalej uporządkowanie zanika.

Esposito *et al.* (126) również wykorzystali wkład do entropii pochodzący od oddziaływań dwucząstkowych, aby skonstruować dwuwymiarową mapę uporządkowania, tym razem jednak po raz pierwszy wykorzystane zostały do tego celu części translacyjna i orientacyjna dwucząstkowego wkładu do entropii jako parametrów uporządkowania. Opisali oni ich zmiany zachodzące wraz z temperaturą, i ciśnieniem. W zależności od tego, jaka jest temperatura i gęstość układu, uporządkowanie translacyjne i rotacyjne może wzrastać lub maleć podczas sprężania.

Zielkiewicz (127) podzielił wkład do entropii pochodzący od oddziaływań dwucząstkowych na trzy części, nazwane translacyjną, konfiguracyjną i orientacyjną. W takim znaczeniu nazwy te są używane w sekcji dotyczącej metod obliczeniowych. Całość efektów orientacyjnych w cieczy obejmuje suma członów konfiguracyjnego i orientacyjnego. Okazuje się, że w czystej wodzie występuje liniowa zależność pomiędzy sumą członu konfiguracyjnego i orientacyjnego a samym członem konfiguracyjnym. Sugeruje to możliwość użycia samego członu konfiguracyjnego jako miary całościowego uporządkowania orientacyjnego.

Idea podziału na człony translacyjny, konfiguracyjny i orientacyjny (oraz możliwość rozłożenia wkładu do entropii pochodzącego od oddziaływań dwucząstkowych na trzy części: zależną od oddziaływań białko-białko, białko-woda oraz woda-woda) została wykorzystana w pracach (128) i (129) dotyczących układów składających się z polipeptydów i wody. Zostały tam użyte parametry uporządkowania oparte na dwucząstkowych funkcjach korelacji.

Wielościanny Voronoia

Podział przestrzeni na wielościanny Voronoia pozwala ocenić, jaką objętość zajmują atomy lub grupy atomów w cieczy lub ciele stałym. Sposób ich wyznaczenia został przedstawiony w rozdziale dotyczącym metod obliczeniowych.

Wielościanny Voronoia zostały wprowadzone przez Voronoia w 1908 roku. Bernal i Finney (130) używali ich w latach sześćdziesiątych do opisu struktury cieczy. Richards (131) zastosował tę metodę do białek.

Od czasu gdy Procacci i Scateni (132) posłużyli się nią do analizy rezultatów symulacji mioglobiny w wodzie, była wykorzystywana szerzej. Dokonywali oni między innymi pomiarów objętości komórek Voronoia związanych z ciężkimi atomami mioglobiny (białko było nieruchome podczas symulacji, cząsteczki wody mogły się poruszać). Ze zmniejszenia się objętości zajmowanej przez aminokwasy znajdujące się na powierzchni białka wnioskowali, że woda solwatacyjna tworzy warstwę ściśle przylegającą do białka, a z wielkości fluktuacji objętości w czasie – które regiony białka są otoczone ruchliwymi cząsteczkami wody.

Zarówno podział Voronoia, jak i koncepcyjnie pochodne metody, wykorzystywane były do badania białek nie raz, na przykład w celu oszacowania ich gęstości, stopnia homogeniczności, analizy zagłębień w strukturze cząsteczki, kompleksów białek z ligandami. Przegląd tych zagadnień można znaleźć na przykład w pracy (133). Tutaj podam jeszcze kilka przykładów zastosowania tej metody w odniesieniu do właściwości cieczy.

Ruocco *et al.* (134) wprowadzili wielkość, którą nazwali asferycznością (definicja podana w rozdziale dotyczącym metod obliczeniowych). Analizowali oni czystą wodę oraz siarkowodor w różnych temperaturach. Obliczyli parametry charakteryzujące średnią geometrię pojedynczego wielościanu Voronoia oraz rozkłady tych parametrów w całym układzie. Stwierdzili, że zarówno całkowita powierzchnia, jak i objętość wielościanu używane samodzielnie nie są najlepszymi miernikami właściwości układu. Natomiast parametr asferyczności wykazuje większą wrażliwość na rodzaj płynu i temperaturę. W miarę wzrostu temperatury, rozkład wartości parametru asferyczności charakterystyczny dla wody zaczyna przypominać coraz bardziej rozkład dla siarkowodoru, wskazując na bardziej regularny, bliższy sferycznemu kształt komórek. W dotyczącej ciekłej wody pracy (135) rozkład objętości komórek Voronoia oraz rozkład wartości parametrów asferyczności był (poza innymi parametrami) używany do oceny stopnia niejednorodności cieczy o różnej gęstości i w różnych temperaturach; na niejednorodność wskazywać może rozkład szeroki i asymetryczny. Shih *et al.* (136) również podjęli temat struktury ciekłej wody. Wykorzystując zwłaszcza parameter asferyczności, wyrazili przypuszczenie, że w wodzie istnieje tendencja do powstawania skupisk wysoko ustrukturyzowanych oraz nisko ustrukturyzowanych cząsteczek wody, z których pierwsze charakteryzują się dużą wartością parametru asferyczności, a drugie niską.

Chang *et al.* (137) zauważyli, że asferyczność jako parametr charakteryzujący strukturę wody powiązany jest z ruchami rotacyjnymi cząsteczki. U cząsteczek, dla których wartość parametru asferyczności jest duża, jednocześnie ruchy rotacyjne są powstrzymywane. Natomiast cząsteczki o małej wartości parametru asferyczności wykazują skłonność do swobodniejszych rotacji. Duża wartość parametru asferyczności generalnie oznacza występowanie struktury tetraedrycznej, kiedy cząsteczka tworzy cztery wiązania wodorowe. W przypadku małych wartości asferyczności występuje większe zróżnicowanie lokalnej konfiguracji wiązań wodorowych, z pewną przewagą sytuacji, kiedy jedno wiązanie tworzone jest przez atom tlenu, a jedno tworzone jest przez atom wodoru. Okazuje się, że na ruch rotacyjny wpływa raczej to, ile cząsteczka tworzy wiązań wodorowych jako donator, a nie jako akceptor.

Ciekawym zastosowaniem metody Voronoia było jej użycie w przypadku symulacji układu dwufazowego, w celu identyfikacji każdej z faz (138,139). Zostały do tego wykorzystane obliczenia objętości wielościanów Voronoia.

Przykłady wykorzystania teorii grafów w analizie ciekłej wody

Cząsteczki wody połączone wiązaniami wodorowymi można przedstawić w postaci grafu skierowanego lub nieskierowanego. Każda cząsteczka może zostać zastąpiona wierzchołkiem, który można połączyć krawędziami z innymi wierzchołkami, jeżeli pomiędzy cząsteczkami są wiązania wodorowe. Miyake i Aida (140) zastosowali grafy w celu symbolicznego przedstawienia klastrów wody $(\text{H}_2\text{O})_n$ ($n \leq 4$). Analizowane były też większe klastry, na przykład $(\text{H}_2\text{O})_8$ i $(\text{H}_2\text{O})_{20}$ w pracy (141). Matsumoto i Ohmine (142) przedstawili sieć wiązań wodorowych w przechłodzonej wodzie jako graf, uwzględniając rzeczywiste i zdefiniowane przez siebie „wirtualne” wiązania wodorowe. Wykorzystując reprezentację w postaci grafu zdefiniowali także defekty sieci. Bergman (143) przedstawił sieć wiązań wodorowych w wodzie o temperaturze 300 K w postaci grafu skierowanego. Posłużyło to do analizy korelacji wiązań wodorowych oraz do scharakteryzowania topologicznego znalezionych łańcuchów i pętli utworzonych z cząsteczek wody połączonych wiązaniami wodorowymi.

Ohmine i Saito (83) użyli grafu skierowanego, aby analizować zmiany w sieci wiązań wodorowych w czasie, stwierdzając, że kolektywne ruchy cząsteczek wody są związane z przearanżowaniem tej sieci.

Niedawno opublikowaną pracę Ahmad *et al.* (144) poświęcili właściwościom wody znajdującej się pomiędzy dwoma asocjującymi białkami. Stwierdzili, że woda ta tworzy pomiędzy powierzchniami białek przyczepną sieć, która stabilizuje stany pośrednie, zanim dochodzi do bezpośredniego kontaktu. Ponadto zaobserwowali oni anizotropię właściwości dielektrycznych wody w tym obszarze. Do scharakteryzowania pośredniczonej przez wodę łączności pomiędzy białkami użyli znanego z teorii grafów pojęcia maksymalnego przepływu. Utworzyli oni graf, wykorzystując jako wierzchołki wszystkie atomy białka, które mogą służyć jako donory lub akceptory wiązań wodorowych oraz atomy tlenu cząsteczek wody znajdujących się w odległości do 0,5 nm od obu powierzchni. Wierzchołki połączono krawędziami, jeżeli pomiędzy cząsteczkami wody lub pomiędzy cząsteczkami wody i powierzchnią białka istniały wiązania wodorowe. Każdej krawędzi przypisano przepustowość odpowiadającą energii wiązania wodorowego. Ponadto dodano wirtualny wierzchołek będący źródłem, który połączono krawędziami o nieskończonej przepustowości ze wszystkimi donorami lub akceptorami wiązań wodorowych na jednej powierzchni oraz wirtualny wierzchołek będący ujściem, który połączono krawędziami o nieskończonej przepustowości ze wszystkimi donorami lub akceptorami wiązań wodorowych na drugiej powierzchni. W miarę postępu procesu asocjacji, przepływ rósł znacząco, co było przez autorów interpretowane jako wzrost stopnia pośredniczonego przez wodę połączenia.

3.3. Woda solwacyjna białek

Rozważając rolę wody jako rozpuszczalnika, zwłaszcza w kontekście biologicznym, jednym z kluczowych pytań jest, jak na opisane jej właściwości wpływa obecność molekuly białkowej.

Wiadomo, że woda pełni ważną rolę w kontrolowaniu funkcjonalności białek (145). Jej zachowanie w otoczkach solwacyjnych różni się od zachowania wody czystej (146,147). W miarę zwiększania się odległości od powierzchni białka, właściwości wody zaczynają przypominać te, które charakteryzują wodę czystą. Największe efekty obserwowane są w pierwszej warstwie solwacyjnej. Zaburzenie właściwości wody wokół białka może sięgać do około 1 nm (147).

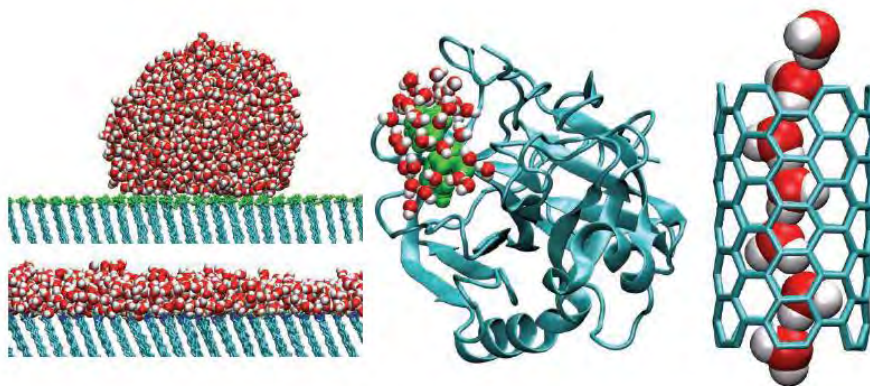
Specyficzne właściwości wody w otocze solwacyjnej nie są wciąż poznane do końca. Częsteczki wody w roztworze zawierającym białko podzielić można na trzy kategorie: woda znajdująca się wewnątrz cząsteczki białka, woda oddziałująca z powierzchnią białka oraz woda pozostała. Naturalnie, wymienione kategorie wody pozostają ze sobą w dynamicznej równowadze i trwa ciągła wymiana cząsteczek pomiędzy warstwami hydratacyjnymi, a nawet tych znajdujących się w zagłębieniach i wewnątrz makromolekuly (147).

Badania eksperymentalne zachowania się wody w samej otocze solwacyjnej są bardzo trudne. Stosuje się wiele metod eksperymentalnych (148), przy czym żadna zastosowana pojedynczo nie jest w stanie zapewnić kompleksowej informacji o strukturze i dynamice wody. Do metod tych należą na przykład: spektroskopia dielektryczna (ang. *dielectric spectroscopy*), która pozwala badać właściwości dielektryczne materiału w funkcji częstotliwości oraz amplitudy przyłożonego pola elektrycznego (była to jedna z pierwszych metod wykorzystywanych do analizy wody solwacyjnej (149-151)); spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance, NMR*); kwazielastyczne rozpraszanie neutronów (ang. *Quasielastic Neutron Scattering, QENS*); spektroskopia w podczerwieni (ang. *infrared spectroscopy, IR*); spektroskopia fluorescencyjna (ang. *Time Dependent Fluorescence Stokes Shift Spectroscopy, TDFSS*).

Jednym z efektów powszechnie dyskutowanych w kontekście właściwości wody solwacyjnej jest tak zwany efekt hydrofobowy.

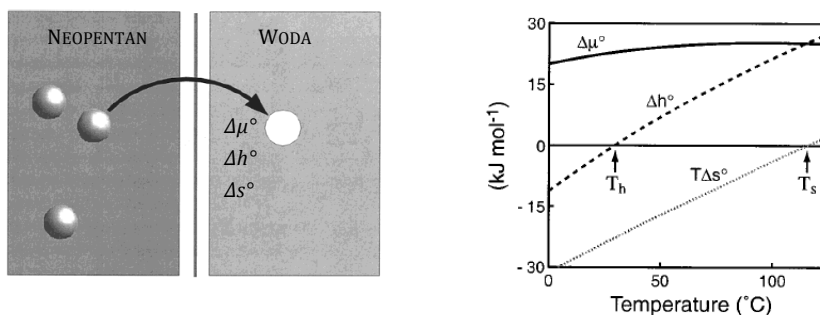
3.3.1. Efekt hydrofobowy

Efekt hydrofobowy już kilkadziesiąt lat odgrywa pierwszorzędową rolę w myśleniu o oddziaływaniach biochemicznych na poziomie molekularnym. Wskazuje się, że ma on znaczenie w niezliczonej liczbie procesów biologicznych takich jak: organizowanie się cząsteczek kwasów nukleinowych w trzeciorzędowe struktury, formowanie się błon komórkowych, oddziaływanie białko – białko oraz białko – inne cząsteczki. Różne jego manifestacje przedstawia **Rys. 3.46**.



Rys. 3.46. Cząsteczki wody przy różnych hydrofobowych strukturach. Z lewej: Kąt zwilżania dla powierzchni pokrytej jednorodnie grupami $-CF_3$ jest wysoki, a dla powierzchni pokrytej grupami $-OH$ jest równy zero. W środku: Hydrofobowość grupy aminokwasów na powierzchni α -chymotrypsyny (kolor zielony) jest mniejsza niż powierzchni po lewej. Ponadto powierzchnia jest zakrzywiona. Dlatego tendencja do odwadniania jest dużo słabsza - woda otacza hydrofobową łatkę (choć może charakteryzować się występowaniem większych lokalnych fluktuacji niż w przypadku łatek hydrofilowych). Po prawej: Woda wypełnia węglową nanorurkę, formując liniowe, połączone wiązaniami wodorowymi włókno. Tendencja do odwadniania powoduje, że płynie przez środek nanorurki w zasadzie bez tarcia (rysunek pochodzi z publikacji (152)).

Terminem tym określa się charakterystyczny sposób zachowania się układu złożonego z wody i pewnych rodzajów substancji - najczęściej związków organicznych posiadających krótsze lub dłuższe łańcuchy węglowodorowe. Procesy asocjacji niepolarnych cząsteczek w środowisku wodnym nazywa się oddziaływaniami hydrofobowymi. Asocjacja ta oraz oddzielanie się niepolarnych substancji od wody nie wynika z tego, że między cząsteczkami wody i substancji hydrofobowych dochodzi do działania siły odpychającej (jest wprost przeciwnie), ale jest rezultatem szczególnie silnego oddziaływania między cząsteczkami wody (wiązania wodorowe) (153). W przypadku wody w temperaturze pokojowej, wprowadzenie substancji hydrofobowej skutkuje spadkiem entropii oraz wzrostem pojemności cieplnej. Zależność temperaturowa zmian molowej entropii, entalpii i potencjału chemicznego związane z przeniesieniem cząsteczki hydrofobowej z fazy organicznej do wodnej przedstawione są na **Rys. 3.47**.



Rys. 3.47. Termodynamiczna charakterystyka tak zwanego efektu hydrofobowego. Zależność temperaturowa molowej entalpii Δh° , entropii Δs° i potencjału chemicznego $\Delta\mu^\circ$ ($\Delta\mu^\circ = \Delta h^\circ - T\Delta s^\circ$) przeniesienia neopentanu z czystej fazy neopentanowej do wody. T_s oznacza temperaturę, w której entropia przeniesienia jest równa zero, a T_h oznacza temperaturę, w której entalpia przeniesienia jest równa zero. $\Delta\mu^\circ$ ma zawsze wysoką, dodatnią wartość ($\Delta\mu^\circ \gg 0$). W zimnej wodzie (około temperatury pokojowej) brak powinowactwa ma głównie podłoże entropowe ($-T\Delta s^\circ \gg 0$, $\Delta h^\circ \approx 0$). W gorącej wodzie (w okolicy temperatury wrzenia) brak powinowactwa ma podłoże entalpowe ($\Delta h^\circ \gg 0$, $-T\Delta s^\circ \approx 0$) (rysunek pochodzi z publikacji (154), został częściowo zmodyfikowany).

Zrozumienie tego zjawiska na elementarnym poziomie ciągle nie jest dogłębne (155). Żaden z istniejących obecnie modeli nie wyjaśnia kompleksowo oddziaływań hydrofobowych w całym zakresie odległości, stopnia hydrofobowości cząstek, kształtu powierzchni itd., w jakich są obserwowane (156).

Jednymi z pierwszych prac zajmujących się tym zjawiskiem były prace Franka i Evansa (którzy zaproponowali model zwany modelem „góry lodowej”) oraz Kauzmana. Tradycyjny punkt widzenia przedstawia się następująco: jeżeli mała hydrofobowa cząsteczka dostanie się do wody, to aby uniknąć sytuacji, w której dojdzie do zmniejszenia liczby tworzonych przez wodę wiązań wodorowych, cząsteczki ustawiają się wokół molekuly substancji rozpuszczonej, tworząc rodzaj klatki (woda staje się zatem bardziej ustrukturyzowana, podobna do lodu), przez co zmniejsza się entropia. Jeżeli dwie molekuly hydrofobowe zetkną się razem, to część bardziej ustrukturyzowanej wody zostanie uwolniona, ponieważ objętość warstwy hydratacyjnej dwóch cząsteczek w bliskim kontakcie będzie mniejsza niż objętość dwóch warstw wokół dwóch rozdzielonych cząsteczkami wody molekuł.

Nowsze badania nie wspierają poglądu na szczególnie znaczące uporządkowanie cząsteczek wody w sąsiedztwie cząsteczki hydrofobowej w porównaniu z wodą czystą. Choć można mówić o preferencji w ustawianiu wiązań O-H stycznie do powierzchni rozpuszczonej molekuly, to niekoniecznie świadczy to o większym uporządkowaniu, bo w wodzie czystej występują także preferencje orientacyjne sąsiednich cząsteczek względem siebie (89). Finney *et*

al. (155) skłaniają się do twierdzenia, że efekt hydrofobowy widoczny jest raczej w drugiej (a nie w pierwszej) warstwie hydratacyjnej w postaci jej ściętnienia i większego uporządkowania cząsteczek (efekt taki zaobserwowano na przykład dla t-butanolu). Na przekór hipotezie gór lodowych stają też wyniki eksperymentów świadczące o istnieniu w otoczkach solwatacyjnych hydrofobowych grup wiązań O-H cząsteczek wody niezaangażowanych w tworzenie wiązania wodorowego (157,158), które mogą pozostawać takimi dłużej niż w czystej wodzie (158).

Kierunkowością wiązań wodorowych Xu i Dill (159) wyjaśniają zmiany entropii solwatacji niepolarnych cząsteczek z temperaturą. W wysokiej temperaturze przesunięcie hydrofobowej cząsteczki do wody prowadzi do wzrostu entropii (**Rys. 3.47**), a w zimnej do jej spadku. Najwyraźniej w zimnej wodzie swoboda orientacji cząsteczki wody jest bardziej ograniczana przez wprowadzoną cząsteczkę hydrofobową niż przez inne cząsteczki wody. W wodzie gorącej musi być zatem bardziej ograniczana przez cząsteczki wody niż przez cząsteczkę hydrofobową. Zimna woda ma tendencję do tworzenia dużej liczby wiązań wodorowych (kosztem spadku entropii), a gorąca do ich zrywania (dzięki czemu entropia rośnie). Cząsteczka hydrofobowej substancji rozpuszczonej nie może służyć za partnera do utworzenia wiązania. Dlatego, wypierając część cząsteczek wody z otoczki hydratacyjnej wody solwatacyjnej, w wodzie zimnej będzie zmniejszała przyległej cząsteczce wody swobodę tworzenia wiązania z innymi cząsteczkami wody i wymiany partnera, natomiast w wodzie gorącej będzie zmniejszała liczbę sąsiadujących cząsteczek wody ograniczających jej swobodę silnymi oddziaływaniami. W ogólnym przypadku roztworu składającego się z rozpuszczalnika o silnych oddziałyvaniach międzycząsteczkowych i substancji rozpuszczonej słabo oddziałującej z rozpuszczalnikiem, wprowadzenie substancji rozpuszczonej uwalnia częściowo rozpuszczalnik od ograniczeń, u których podłoża leżą inne jego cząsteczki. Entropia solwatacji jest dodatnia. Jednakże kiedy oddziaływania pomiędzy cząsteczkami rozpuszczalnika są kierunkowe, rozpuszczalnik może zawrzeć cząsteczkę substancji rozpuszczonej w swojej strukturze prawie nie zmniejszając wzajemnych oddziaływań dzięki przyjęciu pewnych orientacji. Entropia solwatacji jest ujemna. Ponieważ w wysokich temperaturach znaczenie kierunkowości oddziaływań maleje, entropia solwatacji staje się dodatnia, jak w przypadku rozpuszczalnika nie oddziałującego w sposób kierunkowy.

Madan i Sharp (160) na podstawie rozkładu wartości kąta wiązania wodorowego stwierdzili znaczny wzrost uporządkowania rozpuszczalnika w warstwie solwatacyjnej. Według Rashke i Levitta (161) cząsteczki wody z pierwszej warstwy solwatacyjnej mają silnie rozwiniętą strukturę wiązań wodorowych, ale pierwsza i druga otoczka solwatacyjna łączą się stosunkowo słabo. W pracy tej, dotyczącej solwatacji benzenu i cykloheksanu, autorzy stwierdzają występowanie wyraźnych preferencji orientacyjnych w warstwie solwatacyjnej benzenu, ale słabszych w warstwie solwatacyjnej cykloheksanu. Wokół cykloheksanu i przy zewnętrznym obwodzie benzenu mamy do czynienia z tendencją orientowania jednego z wiązań O-H w przybliżeniu stycznie do powierzchni cząsteczki hydrofobowej, aby nie stracić możliwości wiązania się wiązaniami wodorowymi z pozostałymi cząsteczkami wody.

Natomiast inaczej orientują się cząsteczki oddziałujące z powierzchnią pierścienia aromatycznego. Uwidacznia to rolę oddziaływań pomiędzy wodą a cząsteczką substancji rozpuszczonej w kształtowaniu zachowania się wody solwatacyjnej.

W pracy Rezusa i Bakker (162) znajdujemy sugestię, iż grupę metylową otaczają cztery w wysokim stopniu immobilizowane wiązania O-H cząsteczki wody. Jest to rezultat wspierający teorię gór lodowych nie ze strukturalnego, ale z dynamicznego punktu widzenia. Silvestrelli (163) nie zgadza się jednak z tymi wnioskami pisząc, iż hydrofobowe grupy zmniejszają nieco ruchliwość wielu cząsteczek wody w swym sąsiedztwie, a nie bardzo znacznie i tylko kilku najbliższych grupie metylowej. Z wynikami Rezusa i Bakker polemizują także Laage *et al.* (164), którzy obserwowali umiarkowane spowolnienie rotacji cząsteczek wody przy powierzchni grupy hydrofobowej i przypisali je utrudnionemu procesowi wymiany partnerów wiązań wodorowych w wyniku zmniejszenia się liczby najbliższych sąsiadów cząsteczki wody znajdującej się w otoczce solwatacyjnej. Mechanizm spowalniania dynamiki wiązań wodorowych dyskutują Bakulin *et al.* (165). Według nich, cząsteczka hydrofobowa, dla której cząsteczki wody tworzą miejsce w sieci wiązań wodorowych, utrudnia swoją obecnością wykształcenie się rozwidlonego wiązania wodorowego, łączącego donor z dwoma akceptorami jednocześnie, a taka struktura tworzy się, kiedy cząsteczka wody wymienia partnera wiązania, co powiązane jest z jej rotacją. Zagadnieniem dynamiki wody sąsiadującej z cząsteczkami hydrofobowymi zajmowali się także Qvist i Halle (166). Ich zdaniem woda ta mniej przypomina lód niż woda czysta. Wskazują też, że o ile pozbawienie cząsteczki wody części potencjalnych partnerów do tworzenia wiązania wodorowego powoduje spowolnienie rotacji, to usunięcie wszystkich znacznie rotację przyspieszy. Zaobserwowali ponadto, że poniżej 237 K woda w otoczkach solwatacyjnych rotuje nawet szybciej niż woda czysta. Tłumaczą to tym, że struktura wody solwatacyjnej zmienia się w wyniku obniżania temperatury mniej niż struktura wody czystej z powodu geometrycznych ograniczeń związanych z obecnością powierzchni hydrofobowej, co wpływa na właściwości dynamiczne wody.

Co więcej, sposób, w jaki efekt hydrofobowy manifestuje się w wodzie, zależy od wielkości cząstki stykającej się z wodą (167) oraz od kształtu jej powierzchni (168). W przypadku niedużej cząsteczki hydrofobowej sieć wiązań wodorowych obchodzi cząsteczkę dookoła – liczba możliwych ułożeń wiązań jest mniejsza, ale ich liczba pozostaje generalnie taka sama (główny wkład do niekorzystnej entalpii swobodnej hydratacji to koszt entropowy, entalpia swobodna jest proporcjonalna do objętości). Jeżeli natomiast mamy do czynienia z większymi powierzchniami, wówczas nie wszystkie wiązania wodorowe mogą istnieć w ich pobliżu (koszt entalpowy, a entalpia swobodna jest proporcjonalna do powierzchni). Granica wielkości pomiędzy tymi dwoma mechanizmami hydratacji to około 1 nanometr (153). W przypadku oddziaływań z rozwiniętymi powierzchniami wysunięto postulat, że może dochodzić do czegoś w rodzaju wysychania przez utworzenie cienkiej warstwy „pary” na granicy (89,169). Warstwa ta charakteryzuje się występowaniem fluktuacji gęstości wody (170). Cząsteczki wody odsuwają się od powierzchni

hydrofobowych (171,172), a odległość pomiędzy powierzchnią hydrofobową a wodą solwatacyjną zależy od siły oddziaływań przyciągających pomiędzy cząstką rozpuszczoną i wodą (171). W przypadku dwóch hydrofobowych powierzchni, może dochodzić do zmniejszenia gęstości wody pomiędzy nimi, czego skrajnym przypadkiem jest całkowite wysuszenie tego obszaru (173). Proces tworzenia się pary i ucieczki cząsteczek wody spomiędzy hydrofobowych powierzchni zależy od temperatury i ciśnienia (174).

Chandler (175) wskazuje, że w temperaturze pokojowej i pod ciśnieniem atmosferycznym ciekła woda i para wodna prawie współistnieją (występuje niewielka różnica potencjału pomiędzy tymi fazami), dzięki czemu powierzchnia hydrofobowa jest w stanie wywołać powstanie przypominającej parę powierzchni granicznej. Agregacja cząstek hydrofobowych w większe skupiska powoduje zmiany w charakterze ich oddziaływań z wodą. Ciecze są prawie nieściśliwe i w zasadzie nie występują w nich fluktuacje gęstości potrzebne do tego, aby uformować pustą przestrzeń zdolną przyjąć cząsteczkę substancji rozpuszczonej (zwłaszcza w wodzie, której cząsteczki są bardzo małe). Ta niesprzyjająca okoliczność może zostać skompensowana przez bardzo silne oddziaływania rozpuszczalnika z cząsteczką substancji rozpuszczonej, zdolne konkurować z wiązaniami wodorowymi pomiędzy samą wodą, ale takowe nie występują w przypadku substancji hydrofobowych. Jeżeli cząsteczki zbiorą się w odpowiednio duże skupisko, reorganizacja struktury rozpuszczalnika będzie mniej kosztowna z punktu widzenia entalpii swobodnej.

3.3.2. Rola wody w formowaniu i utrzymaniu struktury przestrzennej białek

Przeprowadzono wiele eksperymentów, które pokazały, że sekwencja aminokwasowa określa budowę przestrzenną białka, a prawidłowa budowa przestrzenna odpowiada za funkcjonalność, przy czym właściwe ułożenie łańcucha polipeptydowego może zostać osiągnięte w odpowiednim środowisku. Zwijanie się białka to wynik złożonych oddziaływań, w które cząsteczki wody są silnie zaangażowane.

Rola wody jako rozpuszczalnika w procesie formowania drugo- i trzeciorzędowej struktury polimerów aminokwasowych jest od wielu lat przedmiotem intensywnych badań. Wiadomo, że chcąc uzyskać realistyczną (tzn. możliwą do zaadaptowania do naturalnie występujących warunków) symulację zwijania się peptydu, nie powinno się stosować podejścia zwanego *implicit solvent*, które udaje obecność rozpuszczalnika w postaci potencjału średnich sił, ani tym bardziej przeprowadzać obliczeń w próżni, ale uwzględnić cząsteczki rozpuszczalnika w sposób jawny (ang. *explicit solvent*) (176). Znaczenie obecności cząsteczek wody podkreśla fakt, że aby białko globularne pełniło swoją funkcję, musi zostać osiągnięty pewien krytyczny poziom hydratacji (około 0,40 grama wody na gram białka) (146).

Bogactwo struktur przestrzennych, jakie obserwujemy w przypadku białek, jest bardzo duże. Dwadzieścia podstawowych aminokwasów może występować w różnej kolejności i w różnych ilościach w każdym łańcuchu, co w połączeniu ze znaczną giętkością łańcucha peptydowego pozwala na otrzymanie

niezliczonej mnogości struktur, różniących się zarówno składem (liczbą i rodzajem aminokwasów) jak i konformacją (sposobem przestrzennego ułożenia łańcucha). Stabilność cząsteczki białka to wynik oddziaływań pomiędzy aminokwasami je tworzącymi oraz pomiędzy tymi aminokwasami a wodą (pomijając dodatkowe czynniki takie jak oddziaływania z innymi cząsteczkami, jonami metali itp.). Oddziaływania te w swej istocie mają podłoże elektrostatyczne, zwyczajowo dzielimy je na: oddziaływania van der Waalsa (zawsze obecne), oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy grupami naładowanymi (mostki solne) lub obdarzonymi trwałym momentem dipolowym (w tym wiązania wodorowe), oddziaływania hydrofobowe oraz mostki disiarczkowe (będące wiązaniami kowalencyjnymi). Przy braku mostków disiarczkowych, decydującą rolę w utrzymaniu struktury białka odgrywa różnica w sile oddziaływań aminokwasów między sobą a aminokwasów z wodą, która jest raczej mała dla oddziaływań van der Waalsa, ale może być znacząca w pozostałych przypadkach.

Podczas zwijania makromolekuły białkowej dochodzi do zmniejszenia powierzchni białka oddziałującej z wodą. Proces tworzenia się zorganizowanej struktury białka często próbuje się wyjaśnić z punktu widzenia oddziaływań hydrofobowych.

Uważa się, że mają one duży udział w zwijaniu się białek, będąc siłą napędową tworzenia „kompaktowej” struktury, a wiązania wodorowe przyczyniają się do utworzenia i stabilizacji specyficznej konformacji typu helisy czy β -kartki. Biorąc pod uwagę rodzaj oddziaływań, w jakich aminokwasy mogą uczestniczyć, podzielono je na dwie grupy: hydrofilowe (polarne) i hydrofobowe (niepolarne). Łańcuchy boczne aminokwasów zwanych polarnymi mogą tworzyć mostki solne lub wiązania wodorowe, ponieważ obdarzone są zjonizowaną lub posiadającą trwały moment dipolowy grupą funkcyjną. Aminokwasy zwane niepolarnymi posiadają łańcuch boczny niezdolny do tego rodzaju oddziaływań.

Zwijanie się białek wyjaśnione na gruncie teorii oddziaływań hydrofobowych zakłada, że aminokwasy hydrofobowe (alanina, walina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, metionina) powodują niekorzystne entropowo uporządkowanie cząsteczek wody, które nie potrafią utworzyć z nimi wiązań wodorowych, a zatem preferowane jest ich zgrupowanie wewnątrz białka. W ten sposób formuje się hydrofobowy rdzeń i wystawiona na działanie wody powierzchnia, tworzona przez aminokwasy o naładowanych lub polarnych łańcuchach bocznych. Trzeba jednak powiedzieć, że zarówno powierzchnia białek jak i wewnątrz białka są przeważnie utworzone przez aminokwasy o różnym charakterze chemicznym: średnio 83% niepolarnych aminokwasów znajduje się we wnętrzu cząsteczki białka, ale także 63% polarnych i 54% naładowanych (89). Niektórzy argumentują, że fałdowaniu białek sprzyja raczej oddziaływanie wody z hydrofilowymi resztami, gdzie możemy zaobserwować zysk entalpowy w postaci silnych wiązań wodorowych (mimo kosztu entropowego, gdyż cząsteczki wody będą przytrzymywane na powierzchni) (89).

Zwijanie się białka oznacza duży spadek entropii konformacyjnej cząsteczki. Harano i Kinoshita (177) zadali pytanie, jaki czynnik może

skompensować ten spadek, dając w rezultacie ujemną wartość entalpii swobodnej procesu. Jako modelu użyli układu składającego się z rozpuszczalnika w postaci twardych kul, a białka/peptydy modelowane były w postaci połączonych twardych kul, oddających kształt szkieletu i łańcuchów bocznych. Argumentowali, że efekt hydrofobowy w przypadku białek działa znacznie mniej efektywnie niż dla np. miceli, jako że schowanie we wnętrzu cząsteczki białka aminokwasów niepolarnych wiąże się też często z usunięciem ze środowiska wodnego aminokwasów polarnych. Z drugiej strony obecność grup polarnych we wnętrzu białka może bardziej przyczyniać się do utrzymania jego stabilności niż w przypadku grup hydrofobowych poprzez tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych i mostków solnych (przy czym wymaga to najpierw ich dehydratacji). Autorzy argumentują, że jeżeli liczba aminokwasów jest wystarczająco duża, to kompensować spadek entropii konformacyjnej łańcucha polipeptydowego w największym stopniu może zysk entropii translacyjnej wody. Zatem duże cząsteczki zwijają się, by zwiększyć entropię translacyjną rozpuszczalnika - wody. Wśród badanych konformacji, entropia translacyjna rozpuszczalnika dla konformacji natywnej okazała się największa. Zdarzało się, że istniały konformacje białkowe o korzystniejszej (niższej) energii oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych niż natywna, ale żadna z nich nie dała większego niż ona zysku entropii translacyjnej.

Aminokwasowy skład białek został w procesie ewolucji tak dobrany, by zapewnić odpowiednie zwinięcie w przeznaczonym dla nich miejscu działania w komórce. Widać to wyraźnie, gdy porówna się powierzchnię białek występujących w postaci rozpuszczonej w cytoplazmie z białkami transbłonowymi, które posiadają na swej przecinającej błonę komórkową powierzchni wyraźne zgrupowania aminokwasów o charakterze hydrofobowym. Zmiana warunków środowiska, która skutkuje zmianą charakteru oddziaływań stabilizujących strukturę białka, ma natychmiastowy wpływ na jego aktywność biologiczną. Szczególnie łatwo można zaobserwować ten efekt w przypadku enzymów, kiedy manipulacja siłą jonową roztworu, pH, temperaturą, ciśnieniem itd. odbija się na ich aktywności katalitycznej. Spektakularnym zobrazowaniem skutków, jakie przynosi zmiana rozpuszczalnika, jest denaturacja pod wpływem etanolu lub innych rozpuszczalników organicznych. Zaburzają one struktury IV-, III- a także II-rzędowe, znacząco zmieniając skłonności aminokwasów do tworzenia różnego rodzaju konstrukcji w postaci helis, harmonijek, zwrotów.

Na podstawie analizy białek o znanej budowie przestrzennej, udało się ustalić względny udział poszczególnych reszt aminokwasowych w najważniejszych strukturach drugorzędowych. Jednak przewidywanie konformacji na podstawie sekwencji tylko w 70% jest uwieńczone sukcesem. Metody statystyczne uśredniają różnorodne środowiska, w jakich znajduje się określony aminokwas, a są one odmienne w różnych miejscach tej samej cząsteczki i mają duży wpływ na lokalne strukturalne preferencje.

Cząsteczki wody znajdujące się nie tylko na powierzchni białka, ale także nierzadko w głębi struktury, stanowiąc tym samym jej integralny element. Pewna część cząsteczek wody pozostaje w charakterystycznych miejscach cząsteczek białka nawet po przeniesieniu ich do rozpuszczalnika organicznego

lub w próżni czy w wysuszonym proszku (stanowiąc około 10% „suchej” masy) (89).

Wewnętrzne cząsteczki wody unikają zwykle miejsc w pobliżu struktur drugorzędowych typu α -helis i β -kartek, preferując fragmenty, w których atomy szkieletu nie są zaangażowane w wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe (147). Jeżeli cząsteczki takie mogą utworzyć stabilne wiązania wodorowe, wtedy stabilizowane są entalpowo. Zdarza się też, że cząsteczki wody obecne są w zagłębieniach o charakterze hydrofobowym. Wówczas możemy mieć do czynienia z sytuacją, że przestrzeń dostępna dla pojedynczej cząsteczki będzie większa niż w przypadku roztworu na zewnątrz i odnotujemy zysk entropowy (147).

3.3.3. Dynamika wody solwacyjnej

Powierzchnia białka jest dynamiczna i może się w zauważalnym stopniu zmieniać. Związane to jest z ruchami rotacyjnymi i translacyjnymi otaczającej je wody. Zmiany strukturalne białka sprzężone są z przegrupowaniami cząsteczek w warstwie solwacyjnej. Zarówno obniżenie temperatury środowiska, jak i dehydratacja, mogą znacząco spowolnić dynamikę białka (146).

Pokazano eksperymentalnie i z zastosowaniem symulacji, że ruchliwość cząsteczek rozpuszczalnika znajdujących się w pierwszej warstwie hydratacyjnej jest w jakiś sposób ograniczona. Cząsteczki te wykazują zwykle zwolnione ruchy translacyjne i rotacyjne (147). Jest to efekt podobny do obniżenia temperatury wody. Nadając otaczającej wodzie pseudoszklisty charakter, białka mogą zapobiegać jej krystalizacji w niskich temperaturach (1,89). Nie istnieje jednak jedna uniwersalna stała czasowa opisująca to zjawisko, bowiem woda w sąsiedztwie białka może zachowywać się w różny sposób: od stanu, w którym pozostaje silnie związana i co za tym idzie unieruchomiona, do ruchliwej (146).

W drugiej otoczce solwacyjnej ruchy rotacyjne zwykle przypominają już te w czystej wodzie, translacyjne zaś mogą być ciągle nieco opóźnione. Odnotowano też ciekawy efekt polegający na tym, że jeżeli rozłożymy współczynnik dyfuzji na dwie składowe, równoległą i prostopadłą do powierzchni peptydu, to prostopadła jest wolniejsza, a równoległa szybsza (146).

Ruchy rotacyjne i translacyjne, poza tym, że są zwykle wolniejsze, wykazują dodatkowo inną zależność od czasu niż w wodzie czystej. Na przykład zaobserwowano, że zastosowanie wzoru Einsteina (rozdz. 4.4) do obliczeń współczynników dyfuzji w roztworach białkowych może prowadzić do niepoprawnych, zależnych od czasu wartości współczynnika dyfuzji, ponieważ kwadrat średniego przesunięcia niekoniecznie będzie liniową funkcją czasu. Cząsteczki migrują po heterogenicznej powierzchni i mogą doświadczać różnych oddziaływań, co zaburza oczekiwany (gaussowski) rozkład położeń po czasie (146).

Ze względu na heterogeniczną powierzchnię białka, woda w jego sąsiedztwie może zachowywać się w różny sposób: od stanu, w którym

pozostaje silnie związana i co za tym idzie - unieruchomiona, do ruchliwej (146). W zależności od miejscowych potrzeb, cząsteczki w sąsiedztwie pewnych regionów na powierzchni białka mogą być silnie przytrzymywane, a w innych miejscach bardziej ruchliwe. Najczęściej obserwuje się wymianę cząsteczek wody pomiędzy warstwą solwatacyjną i wodą spoza warstwy solwatacyjnej, a w drugiej kolejności mogą występować wymiany cząsteczek pomiędzy różnymi fragmentami warstwy solwatacyjnej tego samego białka (178).

To zróżnicowanie zachowania wody przypisuje się złożonej budowie geometrycznej powierzchni białka, którą do pewnego stopnia można traktować jak fraktal, lub też efektem energetycznym - zróżnicowanej chemicznie powierzchni i istnieniu wielu różnych minimów energetycznych.

Na spowolnienie dyfuzji wody w otocze solwatacyjnej przede wszystkim wpływa to, że w sąsiedztwie znajduje się mniej ruchliwa cząsteczka białka. Aby zaszła dyfuzja translacyjna, cząsteczka wody musi znaleźć sobie nowe miejsce, zwolnione uprzednio przez inne cząsteczki wody lub atomy białka, a atomy białka będą ustępowały miejsca mniej chętnie. Ponadto do spowolnienia ruchów mogą się przyczynić silne oddziaływania elektrostatyczne z białkiem, w tym wiązania wodorowe. Nie należy też pomijać wiązań wodorowych pomiędzy samymi cząsteczkami wody. Według Pizzutti'ego *et al.* (179), cząsteczka białka opleciona jest strukturą przypominającą dużą sieć, tworzoną przez połączone wiązaniami wodorowymi cząsteczki wody. Jak pokazuje ich praca, kiedy powierzchnia białka posiada miejsca, do których może przyłączać się cząsteczka wody (polarne/obdarzone ładunkiem), to sieć wiązań wodorowych powierzchniowej wody rozciąga się po całej powierzchni białka, powstrzymując dyfuzję. Sieć ta jest elastyczna i przegrupowuje się wraz z ruchami białka bez drastycznego rozrywania.

W celu określenia, który z mechanizmów powstrzymywania dyfuzji odgrywa główną rolę, Pizzitutti *et al.* (179) przeprowadzili symulacje cząsteczki lizozymu w wodzie w trzech postaciach: ruchomej cząsteczki, unieruchomionej cząsteczki oraz unieruchomionej cząsteczki pozbawionej zdolności elektrostatycznego oddziaływania z rozpuszczalnikiem (w celu zbadania wpływu geometrii, bez uwzględniania wpływu polarnych reszt). Zajmowali się oni co prawda otoczką solwatacyjną białka jako całością, ale sformułowali kilka wniosków, które można odnieść także do analizy różnic pomiędzy właściwościami wody w otoczeniu wybranych fragmentów powierzchni makromolekuły. Stwierdzili, że w przypadku nieruchomego białka w postaci „naturalnej”, oba efekty (topologia i energia oddziaływania z powierzchnią białka) przyczyniały się do zwolnienia ruchów dyfuzyjnych cząsteczki wody. Po zezwoleniu cząsteczce białka na ruch, nastąpiło przyspieszenie dynamiki cząsteczek wody, ale ciągle była ona zwolniona w porównaniu z wodą czystą. Ruchy rotacyjne w przypadku nieruchomej cząsteczki również były wolniejsze (według autorów z powodu większej energii aktywacji przejścia ze stanu związanego z powierzchnią białka do niezwiązanego). W przypadku unieruchomionego białka pozbawionego zdolności oddziaływań elektrostatycznych, ruchy dyfuzyjne (translacyjne i rotacyjne) cząsteczek wody były szybsze niż w przypadku białka nieruchomego z normalnym ładunkiem. Wykres kwadratu średniego przesunięcia wody w funkcji czasu był

porównywalny ze zwykłym, poruszającym się białkiem, co pokazuje duży wpływ geometrii na zachowanie się rozpuszczalnika. Natomiast na ruchy rotacyjne wpływ wydaje się mieć tylko czynnik energetyczny. Kiedy wyłączono oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy wodą a białkiem, cząsteczki wody wykazywały nawet szybsze ruchy rotacyjne niż w czystej wodzie.

Podobne pytanie - co determinuje czas rezydencji cząsteczek wody w określonym miejscu białka: czy jest to charakter chemiczny aminokwasów, czy liczba wiązań wodorowych, jakie mogą się tworzyć w danym miejscu z cząsteczką białka, czy geometria określonego miejsca - postawili Makarov *et al.* (180). Przeprowadzili symulację i zbadali czasy rezydencji cząsteczek wody w wybranych miejscach mioglobiny. Zaobserwowali, że ruch cząsteczek może być zwolniony w stosunku do wody czystej, ale tylko te cząsteczki znajdujące się w zagłębieniach i bruzdach wykazują wyjątkowo długie czasy rezydencji. Cząsteczki położone w sąsiedztwie wypukłych części białka charakteryzowały się większą mobilnością. Główną rolę odgrywała zatem geometria, a nie hydrofobowość czy wiązania wodorowe - one też mogą modyfikować dynamikę wody, ale nie aż na tak dużą skalę czasową, w związku z czym według autorów względnie największy wpływ będą wywierały w miejscach odsłoniętych.

Dyskutując wpływ rodzaju aminokwasów na właściwości dynamiczne otaczającej wody wskazuje się, iż czasy rezydencji cząsteczek wody przy aminokwasach o łańcuchach bocznych hydrofilowych (w tym obdarzonych ładunkiem) i hydrofobowych układają się generalnie w następujący szereg (146):

$$\tau_{\text{naładowane}} \geq \tau_{\text{polarne}} > \tau_{\text{niepolarne}} \approx \tau_{\text{woda czysta}}$$

Zmniejszenie się ruchliwości cząsteczek wody znajdujących się przy polarnych/obdarzonych ładunkiem resztach aminokwasowych tłumaczy się tym, że z niektórymi aminokwasami woda potrafi tworzyć silne wiązania wodorowe, o dłuższym czasie życia niż czas życia wiązań pomiędzy cząsteczkami wody. Dodatkowo naładowane aminokwasy tworzą silniejsze i trwalsze wiązania niż ujemnie naładowane (64). Wyznaczone przy użyciu symulacji czasy życia wiązania wodorowego pomiędzy białkiem a wodą mieszczą się w szerokim przedziale 0,5-50 ps lub nawet więcej (146).

Henchman i McCammon (178) wskazują na trudności w określaniu wpływu charakteru chemicznego reszt aminokwasowych na ruchliwość wody, wynikające z paru powodów. Po pierwsze dystrybucja aminokwasów w białku jest niejednorodna - wyeksponowanych na powierzchni jest więcej polarnych, a schowanych w zagłębieniach jest więcej hydrofobowych. Po drugie cząsteczki wody solwatacyjnej sąsiadują jednocześnie z wieloma aminokwasami o różnym charakterze chemicznym, z których każdy może wpływać na ich zachowanie. Ponadto aminokwasy mogą być mniej lub bardziej mobilne, niezależnie od charakteru chemicznego.

Z tych wszystkich powodów najlepiej rozpatrywać właściwości motoryczne wody jako cechę lokalną przy pewnym wybranym obszarze białka, jako że jego powierzchnia jest tak różnorodna (178).

Zwolnionym ruchom dyfuzyjnym towarzyszy zwolniona kinetyka tworzenia i rozrywania wiązań między samymi cząsteczkami wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej polipeptydu w porównaniu z wodą czystą. Czas życia

wiązania wodorowego wody w otoczce solwatacyjnej może być dłuższy niż w czystej wodzie (64). Może się również wydłużyć okres szybkiego spadku liczby wiązań na skutek ruchów wibracyjnych i wahadłowych z powodu ich zwolnienia. Szybkość zrywania wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody dla cząsteczek, które są związane wiązaniem wodorowym z białkiem (głównie w pobliżu reszt hydrofilowych) jest mniejsza niż dla pozostałych również obecnych w warstwie solwatacyjnej, ale niezwiązanych z białkiem (głównie w pobliżu reszt hydrofobowych). Sieć wiązań wodorowych obejmująca białko jest szczególnie stabilna przy hydrofilowych łańkach, gdzie na jej utrwalenie wpływają oddziaływania elektrostatyczne (181). W pracy Jana *et al.* (181) ustalono, że mechanizm rozrywania się i tworzenia nowych wiązań wodorowych w otoczce solwatacyjnej lizozymu może być nieco odmienny w sąsiedztwie hydrofilowych i hydrofobowych reszt aminokwasowych. Praca była oparta na omówionym wyżej modelu rearanżacji wiązań wodorowych Laage i Hynes'a (92). W warstwie solwatacyjnej autorzy wyróżnili trzy mechanizmy tworzenia i rozrywania wiązań:

- Obie cząsteczki – stary i nowy akceptor wiązania pochodzą z pierwszej warstwy solwatacyjnej donora wiązania i pozostają tam po wymianie partnerów wiązania. Ten mechanizm przeważa w warstwie solwatacyjnej (około 80% wszystkich zdarzeń wymiany wiązania wodorowego). Jest on konsekwencją istnienia sieci wiązań oplatającej białko, która utrudnia zarówno oddalenie się cząsteczki jak i zbliżenie się nowej, co w każdym przypadku wymagałoby znacznego przeorganizowania struktury.
- Nowy akceptor wiązania przychodzi z drugiej warstwy solwatacyjnej donora wiązania, ale stary pozostaje w pierwszej warstwie solwatacyjnej po wymianie wiązania.
- Oba akceptory wiązania pochodzą z pierwszej warstwy solwatacyjnej donora wiązania, ale stary opuszcza ją po wymianie wiązania.

Przeskok o znaczny kąt jest wspólny dla wszystkich opisywanych mechanizmów. Z trzech mechanizmów rozrywania i tworzenia wiązań, pierwszy dotyczy bardziej wody w pobliżu miejsc o charakterze hydrofilowym, a drugi i trzeci bardziej otoczenia miejsc hydrofobowych.

To, czy woda na powierzchni jest bardziej czy mniej ruchliwa, może zależeć nie tylko od charakteru chemicznego aminokwasów, ale też od tego, czy posiadają one ruchliwe łańcuchy boczne (182).

Cząsteczki wody szczególnie ważne dla utrzymania prawidłowej struktury białka mogą być mocno przytrzymywane przez białko i tym samym w znacznym stopniu unieruchomione. Przy czym, jak pokazują rezultaty dynamiki molekularnej pewnego białka zaliczanego do prionów (183), efekt ten działa w dwie strony: na przykład reszty aminokwasowe połączone mostkiem wodnym są również przytrzymywane i zachowują swoje właściwe położenie, natomiast usunięcie tej cząsteczki spowoduje, że lokalna struktura białka stanie się bardziej niestabilna.

Zhang *et al.* (184) eksperymentalnie, z użyciem sondy tryptofanowej, badali otoczkę solwatacyjną mioglobiny. Zaobserwowali, że dynamika odznacza

się dwoma charakterystycznymi odcinkami czasowymi, jednym rzędu kilku (1-8), a drugim rzędu kilkudziesięciu-kilkuset (20-200) pikosekund. Dynamika w krótszej i dłuższej skali czasowej okazała się być powiązana z lokalnymi właściwościami białka. Krótszy czas odpowiada miejscowym ruchom cząsteczki wody, głównie wahadłowemu i rotacyjnemu i skorelowany jest z miejscowymi oddziaływaniami elektrostatycznymi z białkiem a także z jego strukturą, na przykład cząsteczki obok odsłoniętych pętli są bardziej ruchliwe. W dłuższej skali czasowej zachodzi kolektywne przegrupowanie sieci cząsteczek wody, sprzężone z lokalnymi ruchami cząsteczki białka i powiązane z wymianą niektórych cząsteczek wody w warstwie solwatacyjnej. Głównymi czynnikami odpowiadającymi za szybkość tego zjawiska są lokalna sztywność struktury białka oraz występowanie w pobliżu silnie naładowanych aminokwasów (zarówno sztywna struktura jak i duży miejscowy ładunek opóźniają przegrupowania cząsteczek).

Jak pokazuje przypadek włókna aktynowego i miozyny, woda w otocze solwatacyjnej białek związanych z transportem może mieć wyjątkowe właściwości. Podczas gdy woda solwatacyjna białek zwykle wykazuje zwolnioną dynamikę, w sąsiedztwie aktyny stwierdzono występowanie hipermobilnej wody, której objętość wzrasta po przyłączeniu do aktyny domeny motorycznej miozyny (185). Autorzy tłumaczą to tym, że aktyna ma na powierzchni naładowane ujemnie miejsca, które zaburzają naturalną sieć wiązań wodorowych i sprzyjają zwiększeniu ruchliwości cząsteczek. Przyłączenie miozyny w jakiś sposób potęguje ten efekt. Autorzy sugerują, iż asymetryczny rozkład lepkości, jaki się w tym przypadku pojawia, może być jednym z czynników umożliwiających wydajną pracę motoru i ułatwiającym przemieszczanie się miozyny.

Występowanie ruchliwej wody w otocze solwatacyjnej stwierdzono niedawno z zastosowaniem metod dynamiki molekularnej w przypadku białek przeciwdziałających zamarzaniu płynów komórkowych (1). W budowie tych białek wskazać można trzy powierzchnie: powierzchnię o charakterze bardziej hydrofobowym, wiążącą się do lodu, oraz dwie powierzchnie o charakterze hydrofilowym. Jak pokazały symulacje w obniżonej temperaturze, w sąsiedztwie powierzchni wiążącej się z lodem woda wykazuje większe ustrukturyzowanie i mniejszą ruchliwość niż woda pozostała. Według modelu zaproponowanego przez autorów, białko, wiążąc się z lodem, nie pozbywa się swojej otoczki solwatacyjnej sąsiadującej z powierzchnią skierowaną ku powierzchni lodu, ale zostaje ona włączona w kryształek lodu. Pozostałe dwie powierzchnie wyewoluowały, aby zapobiec obudowaniu białka lodem, co osiągnęły, zaburzając strukturę otaczającej je wody. Cząsteczki wody z pierwszej warstwy solwatacyjnej wiążą się silnie do hydrofilowej powierzchni białka i ich ruchliwość jest ograniczona a struktura zaburzona. W następstwie powoduje to, że nie potrafią tworzyć silnych wiązań wodorowych z cząsteczkami wody z kolejnej warstwy solwatacyjnej. Dzięki temu zwiększa ruchliwość tych cząsteczek.

Innym przykładem powiązania funkcjonowania białka w określonych warunkach środowiska z właściwościami wody solwatacyjnej może być enzym α -chymotrypsyna (186). Jest ona enzymem proteolitycznym, działającym w pH

lekkim zasadowym. Nieaktywność enzymu w obniżonym pH jest powszechnie wiązana ze sprotonowaniem triady katalitycznej, na którą składają się seryna, histydylna i kwas asparaginowy, podczas gdy ogólna struktura oraz budowa miejsca wiążącego substrat pozostają niezmiennymi. Może być jednak jeszcze dodatkową przyczyną obniżenia aktywności enzymu w niskim pH. W pH kwaśnym woda solwacyjna wykazuje spowolnioną dynamikę w porównaniu z pH bliskim obojętnemu. W niskim pH następowało sprotonowanie grup aminowych w badanym przez autorów miejscu białka, co najprawdopodobniej powodowało silniejsze oddziaływanie z cząsteczkami wody. Silnie związana woda solwacyjna może utrudniać funkcjonowanie enzymu, wpływać na szybkość dehydratacji i proces wiązania substratu.

Zaangażowanie wody w pracę enzymów, w tym motorów molekularnych, może też dotyczyć specyficznej solwatacji okolicy miejsc aktywnych, która wpływa na wiązanie substratów. Bandyopadhyay *et al.* (64), zauważając różnice w zachowaniu wody wokół trzech różnych helis białka, spekulują, że w sąsiedztwie miejsca aktywnego woda może być bardziej mobilna (i mniej ustrukturyzowana) niż w innych miejscach.

Symulacje komputerowe wody w miejscu aktywnym acetylocholinesterazy (187) pokazały, iż istnieją tam regiony, które są otoczone przez mobilne cząsteczki wody, szczególnie przy wejściu do miejsca aktywnego oraz w sąsiedztwie rejonu wiążącego naturalny substrat - acetylocholiny. Bardziej ruchliwa i mniej ustrukturyzowana woda pozwala na szybszą dyfuzję ligandu, a wymiana takiej niestabilnej wody na ligand może być dodatkowym czynnikiem sprzyjającym wiązaniu i utrwalającemu je. Powstawaniu ruchliwej wody w miejscu aktywnym sprzyjać może obecność aminokwasów hydrofobowych, z którymi cząsteczki nie będą potrafiły tworzyć wiązań wodorowych oraz specyficzne ograniczenia geometryczne miejsca aktywnego, utrudniające im wiązanie się również między sobą. Jeżeli miejsce takie zostanie zajęte przez ligand, to związane to będzie ze znacznym zyskiem entalpowym.

Powyższe przykłady pokazują, że uprawnione jest stwierdzenie, że białko może kontrolować właściwości wody w taki sposób, aby przyniosło to konkretne efekty i że czasem białko nie działa bezpośrednio, ale za pośrednictwem wody solwacyjnej.

3.3.4. Dynamika wewnętrznych ruchów białka i jej związek z ruchliwością rozpuszczalnika

Zarówno obniżenie temperatury środowiska, jak i dehydratacja, mogą prowadzić do znaczącego spowolnienia dynamiki białka (146). Uważa się, że dynamika wody solwacyjnej i białka stanowią pewną nierozzerwalną całość (89).

Właściwe funkcjonowanie białka jest w niezliczonych przypadkach ściśle powiązane z przemieszczaniem się atomów białka względem siebie. Dynamika cząsteczki białka charakteryzuje się występowaniem różnorodnych ruchów o skali czasowej od femtosekund do godzin (188). Dla wykonywania przez białko określonych zadań jest ona nie mniej ważna od samej struktury (189). Wśród wewnętrznych ruchów cząsteczki białka wyróżnić można lokalne

wibracje grup atomów powiązanych ze sobą wiązaniami, niewielkie przemieszczenia fragmentów cząsteczki oraz duże zmiany konformacyjne. W zależności od przeznaczenia białka, dla wykonywania specyficznej funkcji znaczenie mogą mieć zarówno ruchy o małej amplitudzie i zachodzące w stosunkowo krótkiej skali czasowej (pikosekundy, nanosekundy) jak i te zachodzące w dłuższej skali czasowej.

Procesom modyfikowania ułożenia atomów sprzyja łatwość zmian kątów dwuściennych w łańcuchu powiązanych wiązaniami peptydowymi oraz wielość oddziaływań o charakterze niewiążącym pomiędzy aminokwasami oraz pomiędzy aminokwasami i środowiskiem.

Wewnętrzne ruchy cząsteczki białka oczywiście zależą od temperatury. Wskazuje się na istnienie specyficznego przejścia dynamicznego białka, zwanego przejściem szklistym, które występuje w temperaturze około 200 K i jest związane z pojawieniem się anharmonicznych ruchów cząsteczki (190).

Szczególną rolę w kształtowaniu dynamiki białka przypisuje się wodzie. Problem wzajemnego powiązania ruchów białka i wody jest intensywnie badanym, lecz nie do końca rozstrzygniętym zagadnieniem. Vitkup *et al.* (191) przeprowadzili serię symulacji, podczas których termostatowali białko i wodę w różnej temperaturze, 180 lub 300 K. Okazało się, że symulacja z białkiem utrzymywanym w 180 K i wodą w 300 K dała w rezultacie porównywalne fluktuacje atomów jak symulacja w przypadku której całość układu była utrzymywana w 300 K. Z drugiej strony symulacja z białkiem utrzymywanym w temperaturze 300 K i wodą w 180 K dała prawie takie same rezultaty jak symulacja białka i wody w temperaturze 180 K. Pomysł z wykorzystaniem dwóch termostatów wykorzystany został również w opublikowanej później pracy (192), która dotyczyła procesu przejścia szklistego. Autorom udało się odtworzyć charakterystyczny przebieg krzywej obrazującej średnią fluktuację kwadratową atomów białka w funkcji temperatury, z załamaniem nieco powyżej temperatury 200 K, jeżeli białko było utrzymywane w 300 K, a temperatura wody była sukcesywnie zmieniana w zakresie od 80 do 300 K. Podobnego rezultatu nie przyniosła symulacja sytuacji odwrotnej, z utrzymywaniem stałej temperatury rozpuszczalnika równej 300 K i zmienianiem temperatury białka. Wnioskiem autorów było, że to rozpuszczalnik odpowiada za pojawienie się efektu przejścia szklistego, oddziałując głównie z atomami łańcuchów bocznych aminokwasów znajdujących się na powierzchni białka.

Istnieje pojęcie krytycznego stopnia hydratacji, poniżej którego białka nie spełniają swojej funkcji (147). Nakagawa i Kataoka (193) wskazują na rolę zjawiska perkolacji, zachodzącego w sieci wiązań wodorowych wody hydratacyjnej, w tym procesie. Stwierdzili oni, że przy poziomie hydratacji równym około 0,4 gramy wody na gram białka woda hydratacyjna zaczyna tworzyć pojedynczy klaster otaczający całą cząsteczkę białka. Poniżej tego poziomu na powierzchni białka występują pojedyncze cząsteczki wody lub mniejsze i większe odosobnione klastry cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi. Okazało się również, że wpływ stopnia hydratacji na ruchy białka jest zależny od charakteru tych ruchów. Wyniki autorów wskazywały na to, że w temperaturze 150 K, w której ruch białka można uważać za harmoniczny,

stopień hydratacji słabo wpływał na ruchliwość, zauważono jedynie, że większa ilość wody solwatacyjnej powodowała nieco większą sztywność białka. Inaczej było natomiast w przypadku temperatury 240 K, kiedy można było wskazać próg hydratacji, powyżej którego ruchliwość białka znacząco wzrastała. Poniżej krytycznego poziomu hydratacji, cząsteczki wody są silnie związane z powierzchnią białka i ich ruchliwość jest prawie taka sama jak samego białka, dopiero wykształcenie się pełnej otoczki hydratacyjnej pozwala na szybsze ruchy cząsteczek wody i ułatwia anharmoniczne ruchy białka, kluczowe dla jego pracy.

Frauenfelder i Fenimore ze współpracownikami przeprowadzili wiele badań eksperymentalnych, głównie nad mioglobina, wykazując ścisły związek pomiędzy dynamiką drgań białka a dynamiką wody (194-197). Rozróżnili oni trzy rodzaje procesów dynamicznych zachodzących w białkach: podległe fluktuacjom rozpuszczalnika (ruchy w dużej skali, związane ze zmianą kształtu białka), podległe fluktuacjom wody w warstwie solwatacyjnej (na przykład ruchy łańcuchów bocznych aminokwasów i wewnętrzne przesunięcia w mniejszej skali) oraz niepodlegające bezpośrednio ruchom rozpuszczalnika (195). Zarówno pierwszy, jak i drugi rodzaj ruchów będzie nieobecny w przypadku białka dehydratowanego. Pierwszy rodzaj ruchów kontrolowany jest lepkością rozpuszczalnika i nie zachodzi wówczas, jeżeli białko jest uwięzione w stałym ośrodku. Drugi rodzaj ruchów może ciągle zachodzić nawet jeżeli białko znajduje się w stałym ośrodku, dopóki jest zachowana jego otoczka hydratacyjna. Autorzy stwierdzają, że z uwagi na ustrukturyzowanie i heterogeniczność otoczki solwatacyjnej białka w komórce, pojawia się możliwość wpływania na wewnętrzne ruchy białka przez modyfikację właściwości otoczki solwatacyjnej. Przykładem pracy opisującej zmiany w procesach dynamicznych zachodzących w białku w zależności od składu rozpuszczalnika jest artykuł (198). Autorzy badali białko w mieszaninie wody i metanolu stwierdzając, że zmiana składu roztworu ma wyraźny wpływ na dynamiczne zachowanie białka.

Trzeba jednak zaznaczyć, że sformułowanie, iż ruchy makrocząsteczek są podległe ruchom wody, budzi czasem kontrowersje (199-201). Doster i Settles (199) twierdzą, że nie można mówić o nadrzędnej roli któregoś składnika układu, a jedynie o silnym wzajemnym powiązaniu dynamiki białka i wody, które wpływa zarówno na zachowanie wody, jak i na zachowanie białka.

Kontynuując poprzednie badania dynamiki białka i wody solwatacyjnej mioglobiny z użyciem sondy tryptofanowej (184), Zhang *et al.* (202) poczynili dodatkowe obserwacje dotyczące dwóch rodzajów procesów relaksacyjnych sieci tworzonej przez wodę solwatacyjną. Pierwszy, szybszy, opisali jako przegrupowanie sieci wiązań wodorowych. Drugi, wolniejszy, powiązali ze sprzężeniem ruchów wody i białka. Stwierdzili, że lokalne ruchy białka są niezbędne do zachodzenia tego typu długookresowej relaksacji. Te lokalne ruchy ułatwiane są przez szybsze fluktuacje cząsteczek wody, co z kolei prowadzi do dalszego przegrupowywania w otocze solwatacyjnej. Stwierdzili, że szczególnie silne sprzężenie zachodzi w przypadku obecności aminokwasów obdarzonych ładunkiem, z powodu silnych oddziaływań elektrostatycznych. Charakter wspólnego ruchu wody i białka zależy ponadto od lokalnej geometrii i

oddziaływań pomiędzy samymi aminokwasami. Dodatkowo zaobserwowali, że otoczka solwacyjna może sięgać ponad 10 Å, jeżeli bierzemy pod uwagę właściwości dynamiczne.

Tego rodzaju rezultaty otrzymane za pomocą pomiarów fluorescencyjnych i pokazujące znaczne spowolnienie ruchów wody w otoczce solwacyjnej wzbudzają czasem wątpliwości. Halle i Nilsson (203) argumentują, że długie stałe czasowe odzwierciedlają raczej fluktuacje białka, a nie wody hydratacyjnej. Według ich modelu ruchy białka i wody zachodzą w zupełnie różnych skalach czasowych, są statystycznie niezależne i nie mogą wykazywać dynamicznego sprzężenia.

Na różną ruchliwość poszczególnych fragmentów cząsteczki białka zwrócili też uwagę Sinha i Bandyopadhyay (204). Przeprowadzili oni symulacje lizozymu metodą dynamiki molekularnej. Ruch o największej amplitudzie był ruchem pętli (ruchliwość α -helis i β -kartek była mniejsza).

Ruchy wykonywane przez białka są bardzo złożone, charakteryzują się bardzo dużą liczbą stopni swobody i pozornie mogą wydawać się chaotyczne. W celu zredukowania złożoności opisu tych procesów zaproponowano szereg metod, w tym analizę quasi-harmoniczną (ang. *quasi-harmonic analysis*, QHA) (205), analizę modów normalnych (ang. *normal mode analysis*, NMA) (206,207) i analizę głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA) (208). Metoda analizy głównych składowych nie wymaga uczynienia założenia o harmoniczności ruchów.

Wielorakość procesów dynamicznych w białkach prowokowała do zadania pytania o to, czy wszystkie rodzaje ruchów są tak samo istotne dla wykonywania specyficznych zadań w komórce. Amadei *et al.* (209) wysunęli twierdzenie, że w całej przestrzeni konfiguracyjnej eksplorowanej przez białko można wskazać podprzestrzeń o niewielkiej liczbie stopni swobody, która obejmuje anharmoniczne ruchy, według autorów kluczowe dla funkcji białka. Szybsze ruchy o niewielkiej amplitudzie i charakteryzujące się rozkładem gaussowskim zostały zaklasyfikowane jako szum bez większego znaczenia.

Według niektórych, spośród wielu tysięcy modów drgań cząsteczki białka, już niewielka liczba (kilkanaście do kilkudziesięciu) tych najwolniejszych jest w stanie wychwycić i opisać główne aspekty dynamiki białka i tym samym uważane są one za decydujące dla aktywności biologicznej. Ramanathan i Agarwal (210), badając ubikwitynę, stwierdzili, że jedynie 10 najwolniejszych modów uzyskanych metodą QHA oddaje 78% całego ruchu. Ponadto udało im się powiązać mody odpowiadające najwolniejszym drganiom z ruchliwością tych elementów struktury, które są ważne dla funkcjonowania białka.

W przeciwieństwie do tych rezultatów, praca Petrone i Pande (207) wskazuje na to, że znaczenie mogą mieć nie tylko najbardziej rzucające się w oczy, ale też subtelniejsze procesy dynamiczne. Zanalizowali oni cztery powszechnie występujące białka, które przechodzą zmiany konformacyjne podczas pracy. Stwierdzili, że pierwszych dwadzieścia modów normalnych (uzyskanych dzięki metodzie NMA) oddaje jedynie 50 % lub mniej całości zmian konformacyjnych białek.

Podsumowując, jest szereg dowodów na istotną rolę efektów solwatacyjnych w kształtowaniu dynamiki (a tym samym funkcjonalności) białek.

3.3.5. Struktura wody solwatacyjnej

Jak wspomniałam, badanie właściwości strukturalnych czystej wody nastrocza wiele problemów, a zagadnienie staje się jeszcze bardziej skomplikowane, kiedy przedmiotem zainteresowania jest woda solwatacyjna. Zapewne to jest przyczyną, dla której czasem można się w literaturze natknąć na rozbieżne doniesienia na ten temat.

Podobnie jak w wodzie czystej, tak i w wodzie solwatacyjnej ważną rolę w determinowaniu struktury odgrywają wiązania wodorowe. Wiązania wodorowe tworzone z powierzchnią białka widać na funkcji rozkładu radialnego tlen wody - najbliższy atom białka. Generalnie ma ona dwa piki. Za pierwszy (w odległości 1,5-2 Å) odpowiadają silne oddziaływania tlen wody - donor wiązania wodorowego na powierzchni białka, a za drugi (w odległości 2,5-3,5 Å) odpowiadają oddziaływania woda - akceptor wiązania wodorowego na powierzchni białka (146).

Wiązania z powierzchnią białka są preferencyjnie tworzone przez atomy wodoru wody jako donory wiązania (146), ale również atomy tlenu tworzą z nią wiązania. Choć niektóre z cząsteczek wody mogą się wiązać silnymi wiązaniami wodorowymi z polarnymi aminokwasami, to wiele powierzchniowych cząsteczek wody nie jest związanych takimi wiązaniami z powierzchnią białka. W wyniku symulacji ustalono, że w przypadku lizozymu około 30% cząsteczek z warstwy solwatacyjnej wiąże się wiązaniami wodorowymi z polarnymi grupami szkieletu białkowego lub łańcuchów bocznych (181). W otocze solwatacyjnej spotyka się cząsteczki wody tworzące wiązania wodorowe tylko między sobą, tylko z białkiem i wszystkie sytuacje pośrednie (178).

Jak pokazuje wspomniana wyżej praca Pizzutti'ego *et al.* (179), kiedy powierzchnia białka posiada miejsca, do których może przyłączać się cząsteczka wody (polarne/naładowane), to układ wiązań wodorowych wody solwatacyjnej rozciąga się po całej powierzchni białka. Natomiast kiedy oddziaływania elektrostatyczne woda - białko były wyłączone, to sieć okazała się być zdecydowanie mniejsza. Jeżeli zabrakło rusztowań w postaci miejsc przyczepu do powierzchni makromolekuły, to nie obejmowała ona całego białka, pomimo że liczba wiązań wodorowych tworzona przez cząsteczki wody między sobą była nieco większa w przypadku cząsteczki nieruchomej pozbawionej możliwości elektrostatycznego oddziaływania z rozpuszczalnikiem niż w przypadku cząsteczki nieruchomej w postaci „naturalnej” (był to efekt kompensacji niemożności utworzenia wiązań z białkiem).

Ponieważ mówi się, że polarne substancje rozpuszczone zwiększają populację zgiętych wiązań wodorowych, natomiast niepolarne mogą działać przeciwnie (211), zatem właściwości strukturalne wody solwatacyjnej mogą zależeć od charakteru chemicznego aminokwasów. Ponadto, podobnie jak było to w przypadku współczynników dyfuzji, niektórzy sugerują, że strukturalne

właściwości wody zależą od stopnia wyeksponowania danego fragmentu cząsteczki białka ku głębi rozpuszczalnika. Sinha i Bandyopadhyay (204) twierdzą, że wzmocniona struktura wody solwatacyjnej występuje zwłaszcza w sąsiedztwie wystających pętli. Ponadto, według ich obliczeń, tetraedryczność wody solwatacyjnej w bliskiej odległości od cząsteczki białka (0,2 - 0,3 nm) wzrasta pod wpływem silnych oddziaływań z powierzchnią białka. Ze wzrostem odległości od powierzchni białka najpierw następuje zmniejszenie tetraedryczności, zanim przybierze ona wartości charakterystyczne dla czystej wody.

Przypadek białka hydrofobowego może być zupełnie inny. Kovacs *et al.* (212), opisując rezultaty symulacji, wnioskuje, że struktura wody solwatacyjnej hydrofobowej powierzchni białka jest zaburzona i brak jest korelacji położenia już poza pierwszą otoczką hydratacyjną cząsteczki wody.

Warto też przypomnieć białko przeciwdziałające zamarzaniu płynów komórkowych badane przez Nutta i Smitha (1). Modyfikuje ono strukturę wody wokół siebie w sposób niejednorodny. Podobieństwo strukturalne otoczki solwatacyjnej jednej z jego powierzchni do struktury powierzchni lodu sprzyja wzajemnemu rozpoznaniu i minimalizuje spadek entropii podczas wiązania z lodem. Taka struktura wody solwatacyjnej osiągnięta jest dzięki współdziałaniu polarnych i niepolarnych grup na powierzchni białka, ułożonych w regularny sposób. Zaburzenie struktury wody przy pozostałych powierzchniach białka zapobiega wbudowaniu go w lód.

Inną właściwością wody, która przy różnych obszarach cząsteczki białka może się zmieniać, jest gęstość. Zmiana gęstości jest odbiciem zmian w strukturze wody. Zakres (a czasem i kierunek) zmian gęstości wody solwatacyjnej jest przedmiotem dyskusji. Na przykład Svergun *et al.* (213) donoszą o dziesięcioprocentowym wzroście gęstości wody, natomiast według Smolina i Wintera (214) efekt ten jest minimalny, mniejszy niż jeden procent.

Wzrost gęstości wody solwatacyjnej nie dotyczy tylko białek. Obserwowany był także dla małych cząsteczek, w tym hydrofobowych (215,216).

Jak można wnioskować z rezultatów Zhou *et al.* (173), gęstość wody solwatacyjnej białka zależy znacznie od oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy białkiem i wodą. Nie stwierdzili oni wzrostu gęstości w otocze solwatacyjnej hydrofobowego białka, ale po wyłączeniu oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy białkiem i wodą gęstość wody w pobliżu białka znacznie się zmniejszyła (o około 10%).

Merzel i Smith (217) z zastosowaniem symulacji próbowali wyjaśnić efekt zwiększenia gęstości wody solwatacyjnej lizozymu (o 15%), który występuje w warstwie wody o grubości 3 Å znajdującej się na powierzchni tego białka i na który wskazują wyniki symulacji i eksperymentów. Ustalili, że przyczyniają się do tego w dwóch trzecich względy geometryczne wynikające ze sposobu określania powierzchni białka, które byłyby również obecne nawet, gdyby struktura wody w niczym nie różniła się od wody czystej. Jednak w jednej trzeciej efekt pochodzi od zmienionej struktury i dynamiki wody: skraca się średnia odległość tlen-tlen w warstwie solwatacyjnej oraz zwiększa liczba

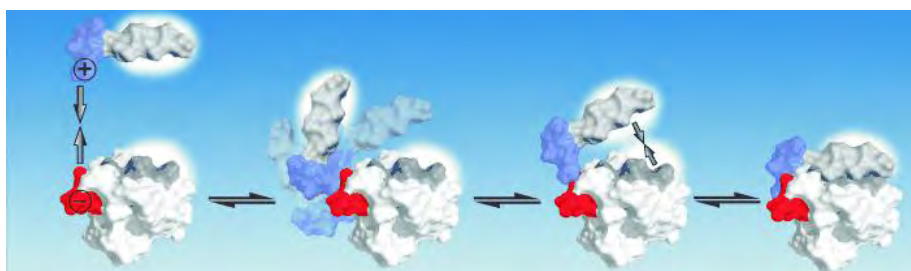
koordynacyjna. Zatem faktyczny przyrost gęstości wynosi około kilka procent. Jeżeli chodzi o charakter chemiczny powierzchni, nie stwierdzono wyraźnego związku pomiędzy hydrofobowością i hydrofilowością a gęstością. Natomiast woda w zagłębieniach jest zwykle gęstsza, przy czym według autorów mamy tu do czynienia z wpływem pola elektrycznego. W zagłębieniach cząsteczki mają większą tendencję do układania się zgodnie z liniami pola elektrycznego generowanego przez atomy białka. Są tam one nieco chronione przed wpływem pozostałych cząsteczek i dzięki temu mogą układać się bardziej stycznie do powierzchni białka i bardziej równoległe do siebie nawzajem.

Nierównomierny rozkład gęstości wokół białka obserwują też Sinha i Bandyopadhyay (204). Twierdzą, że gęstość wody solwatacyjnej najpierw rośnie, a potem maleje, po czym osiąga wartość równą gęstości wody czystej w miarę zwiększania się odległości od białka.

3.3.6. Woda pomiędzy dwoma białkami

Kinezyiny, wykonując pracę, przyłączają kolejno swoje domeny motoryczne do mikrotubuli. Wykonanie każdego kroku wymaga zatem następujących po sobie procesów asocjacji i dysocjacji. W każdym z tych procesów będzie również uczestniczyła woda, gdyż asocjacja będzie wymagała usuwania wody solwatacyjnej (przynajmniej częściowego), a dysocjacja połączona będzie z ponownym pełnym solwatowaniem domeny motorycznej. Można tu zauważyć analogie do asocjacji podjednostek białkowych, która zachodzi w celu utworzenia funkcjonalnego holoenzymu.

Na wczesnych etapach formowania się kompleksów białkowych, znaczną rolę odgrywają oddziaływania elektrostatyczne białek. Ahmad *et al.* (218) analizowali rozpoznawanie sekwencji bogatych w prolinę przez domenę SH3. Stwierdzili, że uformowanie kompleksu składa się z trzech głównych etapów. Po fazie dyfuzyjnej, powstają różne elektrostatycznie stabilizowane stany przejściowe, które mogą się przekształcić w pełen kompleks, co jest poprzedzone zmniejszeniem gęstości wody pomiędzy łączącymi się powierzchniami (Rys. 3.48).



Rys. 3.48. Proces łączenia się powierzchni białkowych. Reszty obdarzone ładunkiem dodatnim i ujemnym są koloru czerwonego i niebieskiego. Powierzchnie hydrofobowe są zaznaczone na szaro. Białe obszary przy powierzchniach białek symbolicznie przedstawiają odwadnianie (rysunek pochodzi z publikacji (218)).

Woda znajdująca się na powierzchni oddziaływania dwóch biomolekuł (na przykład dwóch białek lub białek i kwasów nukleinowych) może odgrywać ważną rolę asystując w trwałym wiązaniu ich ze sobą. Na najwcześniejszych etapach asocjacji, może brać udział we wzajemnym rozpoznaniu poprzez stopniowe redukcowanie warstw solwatacyjnych. Na dalszych etapach pośredniczyć może w selektywnym oddziaływaniu, tworząc różnego rodzaju mostki z jednymi łańcuchami bocznymi aminokwasów oraz przysłaniając inne reszty przed niepożądanymi oddziaływaniami (219). W przypadku nieobecności wody, oddziaływania sprzęgające ze sobą cząsteczki często nie byłyby tak korzystne. Tego rodzaju efekty uważane są generalnie za korzystnie entalpowo, ale w pewnych przypadkach mogą też występować efekty wzrostu entropii, jeżeli cząsteczka znajdzie się we wnętrzu hydrofobowej wnęki. Powierzchnie oddziaływania dwóch białek zawierają różną ilość cząsteczek wody, zależną od charakteru chemicznego reszt aminokwasowych i lokalnej geometrii. Nie mogą one być uważane jedynie za wypełniacz pustej przestrzeni.

Wykorzystując metody dynamiki molekularnej, obserwowano proces łączenia się dwóch domen białkowych enzymu BphC (173). Łączące się ze sobą powierzchnie tego enzymu mają charakter hydrofobowy. Po zbliżeniu się podjednostek na wystarczająco małą odległość, zaobserwowano pewne zmniejszenie się gęstości wody pomiędzy powierzchniami i połączenie się domen. Proces następuje w czasie rzędu nanosekund. Początkowo po zbliżeniu się podjednostek ciągle znajdują się między nimi cząsteczki wody w znaczącej ilości. Woda ta ma gęstość o około 10-15 % mniejszą niż woda czysta. Domeny białkowe początkowo zbliżają się do siebie szybko, po czym zwalniają, kiedy ich odległość zmaleje do około 1,2 Å. Pozostała pomiędzy nimi woda staje się coraz trudniejsza do usunięcia, w miarę jak kolejne drogi wyjścia zostają zablokowane. Szczególnie trudno jest uciec tym cząsteczkom, które znajdują się w hydrofobowych zagłębieniach. Po około 5 ns tylko nieliczne cząsteczki pozostają w przestrzeni między domenami. Proces asocjacji podjednostek białkowych przebiega inaczej niż proces asocjacji modelowych powierzchni hydrofobowych. Kinetyka procesu i stopień usunięcia wody z rejonu oddziaływania między domenami zależy od siły oddziaływań elektrostatycznych wody z powierzchnią białka.

Ponadto, jak pokazuje praca autorstwa Hua *et al.* (220), właściwości wody zlokalizowanej w przestrzeni pomiędzy tymi asocjującymi powierzchniami białkowymi znacząco różnią od właściwości wody czystej. W przypadku domen odległych o 4, 12 i 20 Å, tylko dla odległości 20 Å zaobserwowano, że w środkowej części przestrzeni pomiędzy domenami właściwości wody przypominają właściwości wody czystej. W pobliżu obu powierzchni zaobserwowano znaczące spowolnienie dyfuzji i wydłużenie się czasów życia wiązań wodorowych. Co więcej, w przypadku badanego układu woda zachowywała się inaczej w otocze solwatacyjnej jednego i drugiego białka – przy jednej z powierzchni była ona spowolniona bardziej niż przy drugiej. Autorzy tłumaczą to tym, że na czas przebywania cząsteczki wody w określonym miejscu znaczący wpływ wywiera geometria – we wklęsłych częściach białka jest on znacznie dłuższy niż w sąsiedztwie miejsc wypukłych. Ponadto cząsteczki przy rejonach hydrofilowych białka charakteryzują się

średnio dłuższym czasem przebywania niż przy rejonach hydrofobowych. Także obecność drugiej powierzchni w niedużej odległości od pierwszej wpływa na zwiększenie się „trwałości” otoczki solwatacyjnej pomiędzy domenami w porównaniu z pojedynczą powierzchnią białkową. Wydaje się też, że obecność dwóch powierzchni wpływa na zwiększenie odległości od białka, przy jakiej cząsteczki wody tracą specyficzne, odmienne od wody czystej właściwości fizyczne (następuje pogrubienie otoczki solwatacyjnej).

Pomimo tego, że pomiędzy domenami enzymu BphC zaobserwowano spadek gęstości wody (173), to jednak nie stwierdzono całkowitego wysychania, o którym się mówi w przypadku modelowego układu składającego się z asocjujących hydrofobowych płytek. Okazuje się jednak, że z ucieczką cząsteczek wody możemy mieć do czynienia także w przypadku agregatów białek naturalnych. Liu *et al.* (221) przeprowadzili symulacje melityny, białka wchodzącego w skład jadu pszczelego, które często łączy się w tetramery. Okazało się, że kanał utworzony w wyniku uformowania się tetrameru jest pozbawiony cząsteczek wody. Wielkość tego kanału wynosi około dwutrzykrotność średnicy cząsteczek wody, a charakter chemiczny znajdujących tam aminokwasów jest bardzo hydrofobowy. Całość jest jednak bardzo wrażliwa na mutacje. Już dobrze dobrana zamiana jednego aminokwasu na mniej hydrofobowy może zapobiec ucieczce cząsteczek wody. Do podobnych wniosków doszli Giovambattista *et al.* (222). Liu *et al.* (221) wskazują, że przyczyną odmiennego zachowania wody w przypadku BphC i tetrameru melityny może być fakt, że cząsteczki wody pomiędzy domenami BphC układają się na kształt płacka, natomiast wypełniając kanał melityny formowałyby rurkę (a zrywanie wiązań wodorowych w przypadku takiego ułożenia przestrzennego jest bardziej sprzyjające termodynamicznie). Ponadto nieregularności w powierzchni w postaci łańcuchów bocznych izoleucyny mogą wpływać na destabilizację wiązań, zaburzając geometrię sieci.

Mówi się, że im większy byłby stopień uwięzienia wody i odcięcia jej od pozostałego rozpuszczalnika, tym większe odwodnienie byłoby obserwowane. Yang *et al.* (223) zanalizowali wpływ wzajemnego ułożenia dwóch β -kardek na ucieczkę cząsteczek wody z obszaru pomiędzy nimi. W jednym przypadku woda mogła wypełniać kanał pomiędzy białkami, natomiast w drugim tworzyła płaską warstwę. Okazało się, że większe wysychanie obserwowano w drugim przypadku (inaczej, niż można by się spodziewać analizując przypadek melityny). Wyniki wskazują na rolę szorstkości powierzchni i ich wzajemnego przestrzennego dopasowania w regulowaniu zachowania się wody.

Wiele wskazuje na to, że nierzadko woda solwatacyjna asocjujących cząsteczek biologicznych oscyluje na granicy przejścia fazowego, a jej zachowanie może być dzięki temu efektywnie regulowane poprzez małe zmiany strukturalne lub zmiany charakteru chemicznego powierzchni (224,225).

Ahmad *et al.* (144) postanowili przestudiować przypadek asocjacji białek o powierzchniach nie hydrofobowych, lecz hydrofilowych. Jest to zagadnienie, któremu w literaturze poświęcano stosunkowo mniej uwagi niż asocjacji hydrofobowej. W przeciwieństwie do przypadku wyżej opisanego łączenia się domen enzymu BphC (173), nie zaobserwowali oni uciekania cząsteczek wody z obszaru pomiędzy białkami, a nawet stwierdzili, że przy

bliskiej odległości obu białek gęstość wody pomiędzy nimi wzrosła powyżej wartości charakteryzującej wodę czystą. Opisują, iż proces asocjacji zaczyna się od połączenia otoczek solwatacyjnych, które pośredniczą we wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy białkami zanim dojdzie do bezpośredniego kontaktu.

Wysychania obszaru pomiędzy białkami nie zaobserwowali także Chong i Ham (226). Według nich, woda działa raczej miejscowo, zmniejszając strukturę oraz ułatwiając utworzenie ścisłego kontaktu i wzajemne dopasowanie się białek, zamiast tworzyć pustą przestrzeń napędzając tym samym zetknięcie się powierzchni.

W kontekście powyższych uwag, dotyczących zachowania się wody w warstwie pomiędzy dwoma białkami, interesująco przedstawia się wpływ ciśnienia na sprawność poruszania się kinezyiny po mikrotubuli. Okazuje się, że wysokie ciśnienie, podobnie jak siła działająca przeciwnie do kierunku ruchu, powoduje odwracalne spowolnienie szybkości ruchu kinezyiny (227), ale nie poprzez utrudnienie przyłączania ATP, ale raczej przez wpływanie na proces osiadania kinezyiny na mikrotubuli. Proponowane są dwa mechanizmy, które mogą za to odpowiadać. Z jednej strony ciśnienie generalnie zwiększa fluktuacje strukturalne białek. Może to albo zaburzać konieczne do wykonywania kolejnych kroków zmiany konformacyjne motoru albo utrudniać wiązanie z mikrotubulą. Z drugiej strony ciśnienie zwiększa „obciążenie” powierzchni białka cząsteczkami wody, które mogą w tej sytuacji tworzyć warstwę uniemożliwiającą efektywne oddziaływanie pomiędzy kinezyną i jej szlakiem. Jest to jeszcze jedna przesłanka wskazująca na duże znaczenie interakcji z cząsteczkami wody.

To, co wiemy na temat struktury wody czystej oraz w roztworze zawierającym białka, niekoniecznie jednak znajdzie bezpośrednie zastosowanie do opisu zachowania się wody w cytoplazmie, gdyż warunki w niej panujące nie przypominają modelowych układów badawczych. Zawiera ona przeciętnie do 400 g/dm³ makromolekuł, które mogą zajmować od 5 do 40% objętości komórki, co tworzy zatłoczone środowisko, w którym cząsteczki są oddzielone warstwą od 1 do 2 nm (pomijając obecność jonów i małych cząsteczek) (89). Harada *et al.* (228) stwierdzili, że zwiększająca się zawartość białka wywiera wyraźny wpływ na dynamiczne i strukturalne właściwości wody.

4. Opis metod obliczeniowych

4.1. Dynamika molekularna

Symulacje były przeprowadzone metodą dynamiki molekularnej. Używałam pakietu programów Amber10 i pola siłowego ff03 (Duan *et al.*) (229), odpowiedniego do symulacji białek.

Symulacje komputerowe, przy wzrastającej mocy obliczeniowej komputerów, cieszą się coraz większym zainteresowaniem. Często stanowią one jedyną realną metodę uzyskania wglądu w mikroskopową strukturę badanego układu, pozwalając na łatwe śledzenie zachowania pojedynczych cząsteczek i atomów.

W klasycznej symulacji metodą dynamiki molekularnej ruch cząstki opisuje prawo Newtona:

$$\frac{d^2\mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} \quad (4.1)$$

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

$$\mathbf{F}_i \equiv - \frac{\partial U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N)}{\partial \mathbf{r}_i} \quad (4.2)$$

$U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N)$ jest energią potencjalną układu złożonego z N atomów, zależną od położenia tych atomów (od ich wzajemnej odległości).

Na energię tę składa się suma członów, określających poszczególne rodzaje oddziaływań obecne w układzie:

$$U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N) = E_b + E_\theta + E_\phi + E_\omega + E_{vdW} + E_{el} + E_c \quad (4.3)$$

Wyrażenie na energię zawiera człony odnoszące się do naprężeń wewnątrzcząsteczkowych związanych z odkształceniami geometrycznymi, są to tak zwane oddziaływania wiążące:

- E_b – człon związany z rozciąganiem lub skracaniem wiązań, często przybliżany przez potencjał harmoniczny
- E_θ – człon związany z zginaniem kątów obecnych pomiędzy dwoma sąsiednimi wiązaniami, również często przybliżany przez potencjał harmoniczny
- E_ϕ – człon związany ze zmianą kątów torsyjnych, zależny od typów dwóch atomów połączonych wiązaniem, wokół którego zachodzi rotacja
- E_ω – człon związany z odkształcaniem niewłaściwych kątów torsyjnych, wprowadzanych do specjalnych zastosowań, takich jak zachowanie płaskiej geometrii wiązań o hybrydyzacji sp^2 czy właściwej konfiguracji centrów stereochemicznych

Poza tym wyrażenie zawiera człony opisujące energię oddziaływań niewiązących, obecnych pomiędzy niezwiązanymi bezpośrednio atomami:

- E_{vdW} – człon związany z oddziaływaniami van der Waalsa, najczęściej opisywany przez potencjał Lennarda-Jonesa

E_{el} – człon związany z oddziaływaniami o charakterze elektrostatycznym, w którego przypadku najczęściej stosuje się równanie Coulomba

Może też być obecny dodatkowy człon:

E_c – człon związany z dodatkowymi więzami nałożonymi na układ, na przykład sztuczne ograniczenie ruchu wybranych atomów z użyciem potencjału harmonicznego przytrzymującego je w miejscu

Energia oddziaływań w przypadku zastosowanego w tej pracy pola siłowego jest obliczana z użyciem następującej empirycznej funkcji (229):

$$\begin{aligned}
 U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_i, \dots, \mathbf{r}_N) = & \sum_{b_{ij}} K_{ij}^b (b_{ij} - b_{ij}^0)^2 + \\
 & + \sum_{\theta_{ijk}} K_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 + \sum_{\varphi_{ijkl}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\varphi_{ijkl} - \gamma_n)] + \\
 & + \sum_i^N \sum_{j>i}^N \left\{ 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \right\} \quad (4.4)
 \end{aligned}$$

K^b, K^θ, V_n – stałe siłowe odpowiednio dla odkształceń dotyczących: długości wiązania, kąta między wiązaniami, kąta dwuściennego

b, θ, ϕ – długość wiązania, kąt między wiązaniami, kąt dwuścienny; indeks górny równy zero oznacza wartość równowagową

n – stała

γ_n – kąt fazowy, przybiera wartości 0° lub 180°

$\varepsilon_{ij}, \sigma_{ij}$ – parametry Lennarda-Jonesa

q_i, q_j – ładunek cząstkowy atomu i i j

r_{ij} – odległość między atomami i i j

ε – stała dielektryczna, zwykle równa 1 jeżeli rozpuszczalnik reprezentowany jest jawnie

Ta postać wyrażenia na energię układu nie bierze pod uwagę obecności elektronów, ale przedstawia energię potencjalną jedynie jako funkcję położeń środków mas atomów.

W przypadku symulacji *ab initio* nie stosuje się zdefiniowanego pola siłowego, ale oblicza siły potrzebne do prowadzenia dynamiki na bieżąco (w każdym kroku czasowym), ze struktury elektronowej symulowanego systemu. Podejście to wymaga zastosowania metod fizyki i chemii kwantowej i pozwala na przykład na symulowanie zachodzenia reakcji chemicznych. W obecnej chwili jednak niemożliwe jest zastosowanie symulacji *ab initio* do większych układów z uwagi na fakt, że jest to metoda bardzo kosztowna obliczeniowo.

Energia oddziaływań niewiązanych jest obliczana normalnie dla tych par atomów, które są oddzielone przez więcej niż trzy wiązania lub nie są połączone wiązaniami w ogóle. Dla atomów oddzielonych trzema wiązaniami siła oddziaływań elektrostatycznych i Lennarda-Jonesa obliczana według wzoru 4.4 zmniejszana jest o kilkadziesiąt procent (są to tak zwane oddziaływania 1-4,

które oddają naprężenia steryczne). W tym przypadku oddziaływania elektrostatyczne dzielone są przez czynnik równy 1,2, natomiast Lennarda-Jonesa przez czynnik równy 2.

W celu zminimalizowania wpływu efektów brzegowych, wprowadzono symulacje z wykorzystaniem periodycznych warunków brzegowych, gdzie pudełko symulacyjne jest powielane we wszystkich kierunkach, tworząc rodzaj siatki. Chcąc ściśle określić energię oddziaływań elektrostatycznych takiego układu, należałoby zastosować równanie Coulomba do wszystkich cząstek w pudełku oraz do wszystkich cząstek stanowiących obrazy pudełka. W praktyce często stosuje się tak zwane promienie odcięcia, które określają zasięg obliczania oddziaływań. Jednak całkowite zaniedbanie oddziaływań dalekiego zasięgu, wybiegających poza promień obcięcia, może powodować błędy i sztuczne zachowanie się układu. Obliczanie oddziaływań niewiążących jest bardzo wymagające jeżeli chodzi o zapotrzebowanie mocy obliczeniowej, a jednocześnie ma duże znaczenie dla właściwego odwzorowania zmian konformacyjnych układu. W związku z tym zaproponowano różne metody dla racjonalnego, a jednocześnie możliwie szybkiego szacowania tych oddziaływań. Wkład pochodzący od oddziaływań o krótkim zasięgu (do zadanego promienia obcięcia) szacowany jest normalnie, natomiast w celu obliczenia wkładu pochodzącego od oddziaływań o dłuższym zasięgu korzysta się ze specjalnych metod.

Oddziaływania van der Waalsa dalekiego zasięgu są w przypadku zastosowanej metody symulacji szacowane poprzez model kontinuum (230).

Jeżeli chodzi o oddziaływania elektrostatyczne obecne w symulowanych układach, to rozwinięto różne metody ich obliczania. Jedną z tych metod jest metoda sumowania Ewalda. Pozwala ona oszacować energie oddziaływań w układach o charakterze periodycznym, a takim układem jest na przykład kryształ lub też układ symulowany z zastosowaniem periodycznych warunków brzegowych, powielany w nieskończoność. Założenie o okresowości jest konieczne, ponieważ metoda korzysta z transformacji Fouriera. Oryginalnie była ona rozwinięta dla kryształów jonowych (231).

Dla elektrostatycznie obojętnego układu składającego się z N cząstek, równanie na kulombowski wkład do energii całkowitej przedstawia się w ten sposób (232):

$$E_{el} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N q_i \phi(\mathbf{r}_i) \quad (4.5)$$

Występujący w tym równaniu potencjał elektrostatyczny $\phi(\mathbf{r}_i)$ w punkcie \mathbf{r}_i odpowiadającym położeniu cząstki i o ładunku q_i wyznaczamy następująco:

$$\phi(\mathbf{r}_i) = \sum'_{j,n} \frac{q_j}{|\mathbf{r}_{ij} + \mathbf{n}L|} \quad (4.6)$$

Sumowanie odbywa się po wszystkich \mathbf{n} obrazach cząstek i oraz po wszystkich cząstkach j poza $j=i$ dla $\mathbf{n}=0$ (cząstka i oddziałuje ze wszystkimi innymi cząstkami i ich obrazami oraz wszystkimi swoimi obrazami, ale nie sama

ze sobą). Równanie to nie nadaje się jednak do używania podczas symulacji, ponieważ suma ta jest słabo i warunkowo zbieżna.

Metoda Ewalda wykorzystywana przy obliczaniu całkowitej kulombowskiej energii potencjalnej kryształu polega na podziale sumy sieciowej na dwie szybkozbieżne części. Pierwsza z nich ma charakter krótkozasięgowy i jest szybkozbieżna w przestrzeni zwykłej, a druga ma charakter długozasięgowy i jest szybkozbieżna w przestrzeni odwrotnej.

W celu obliczenia pierwszej sumy, każdy z ładunków punktowych q_i jest otaczany chmurą rozmytego ładunku o rozkładzie Gaussa, o przeciwnym znaku. Całkowity ładunek tej chmury jest co do bezwzględnej wartości równy q_i . Powoduje to przysłanianie sąsiadujących ze sobą ładunków punktowych i praktycznie ogranicza te oddziaływania do krótkiego zasięgu. Przy większych odległościach odpowiednie składniki sumy dążą do zera. Dzięki temu szereg sumujący oddziaływania po wszystkich atomach obdarzonych ładunkiem i ich obrazach szybko się zbiega. W razie potrzeby obliczenia mogą zostać ucięte w pewnej odległości bez znacznej straty dokładności, za to z korzyścią dla czasu obliczeń.

Aby zneutralizować poprzednio wprowadzone rozmyte chmury ładunku, wprowadza się kolejne chmury ładunku o rozkładzie Gaussa, identyczne do poprzednich, ale o przeciwnym znaku niż one (a więc o znaku takim, jaki mają ładunki punktowe obecne w układzie). Dzięki warunkom periodycznym, rozkład tego ładunku kompensacyjnego jest okresowy. Tę funkcję okresową przedstawić można jako szereg Fouriera. Tym razem sumowanie jest przeprowadzane w przestrzeni odwrotnej i wykorzystuje transformację Fouriera.

Modyfikacją metody Ewalda jest algorytm PME (ang. *Particle-Mesh Ewald*), stosowany także w pakiecie Amber (230). W przypadku tego podejścia również dzielimy elektrostatyczną energię potencjalną na dwie sumy, jak w metodzie Ewalda. Suma w przestrzeni rzeczywistej obliczana jest z użyciem określonego promienia obcięcia. Suma w przestrzeni odwrotnej szacowana jest przy pomocy szybkiej transformacji Fouriera (ang. *Fast Fourier Transform, FFT*), a rozkład ładunku jest przybliżany poprzez przypisanie ładunków oczkom pewnej dyskretnej sieci rozciągającej się w przestrzeni – potencjał jest obliczany dla każdego z tych oczek.

Do odległości nieprzekraczającej promienia obcięcia (tu: 12 Å) obliczane są oddziaływania elektrostatyczne ściśle ze wzoru Coulomba. Promień ten zwiększa się o pewną wartość (tu: 2 Å), która określa, do jakiej odległości obliczane są oddziaływania elektrostatyczne metodą Ewalda dla sumy w przestrzeni rzeczywistej.

W celu zaoszczędzenia czasu obliczeń stosuje się listę atomów z najbliższej przestrzeni wokół atomu, dla którego obliczana jest energia oddziaływań niewiążących. W tym przypadku lista ta jest aktualizowana, gdy jakiś atom przesunie się od czasu ostatniej aktualizacji listy o odległość większą niż połowa wartości zwiększenia promienia obcięcia.

Równanie 4.1 jest równaniem różniczkowym. Aby rozwiązać je numerycznie, należy posłużyć się różnicami skończonymi i przyjąć pewien mały

krok czasowy Δt . Prawdopodobnie najpowszechniej używanym sposobem całkowania równań ruchu jest metoda rozwinięta przez Verlet'a. Równanie wyznaczające położenie \mathbf{r}_i atomu i w kolejnym kroku symulacji $t + \Delta t$ przedstawia się następująco (231):

$$\begin{aligned}\mathbf{r}_i(t + \Delta t) &= 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \Delta t^2 \mathbf{a}_i(t) = \\ &= 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \Delta t^2 \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i}\end{aligned}\quad (4.7)$$

Jak widać, do wyznaczenia $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ niezbędna jest znajomość położeń w dwóch poprzednich krokach czasowych: $\mathbf{r}_i(t)$ i $\mathbf{r}_i(t - \Delta t)$. Prędkości można wyznaczyć ze wzoru:

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t}\quad (4.8)$$

Udoskonalona wersja tego algorytmu zwana jest *leap-frog* (231). Aby obliczyć położenie $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ w następnym kroku czasowym, należy znać aktualne położenie $\mathbf{r}_i(t)$, przyspieszenie $\mathbf{a}_i(t) = \mathbf{F}_i(t)/m_i$ oraz prędkość w chwili przypadającej w połowie poprzedniego kroku $\mathbf{v}_i(t - 1/2 \Delta t)$. Wówczas prędkość $\mathbf{v}_i(t + 1/2 \Delta t)$ cząstki i w chwili przypadającej w połowie następnego kroku jest równa:

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right) = \mathbf{v}_i\left(t - \frac{1}{2}\Delta t\right) + \Delta t \mathbf{a}_i(t)\quad (4.9)$$

Natomiast położenie $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ cząstki i w następnym kroku czasowym:

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \mathbf{v}_i\left(t + \frac{1}{2}\Delta t\right)\quad (4.10)$$

W czasie symulacji użyłam procedury SHAKE. Procedura ta wymusza stałe długości wiązań kowalencyjnych oraz (opcjonalnie) stałe wartości kątów pomiędzy dwoma kolejnymi wiązaniami w każdym kroku iteracyjnym. Pozwala to na skrócenie czasu obliczeń, gdyż w równaniu 4.4 można opuścić pierwszy lub pierwszy i drugi człon. Procedurę zastosowałam do wszystkich wiązań, które współtworzy atom wodoru, z tolerancją 0,00001 Å.

Cząsteczka wody traktowana była jako bryła sztywne i do obliczenia energii oddziaływań pomiędzy atomami cząsteczek wody stosowano tylko człony Lennarda - Jonesa i kulombowski. Do zachowania geometrii cząsteczek wody stosowany był algorytm SETTLE, który można wykorzystać do cząsteczek trójatomowych. W przypadku tego algorytmu znane jest analityczne rozwiązanie układu nieliniowych równań opisujących więzy, algorytm jest nieiteracyjny.

Najpowszechniej spotykane sposoby prowadzenia symulacji to symulacje w warunkach: NPT (stała liczba atomów, ciśnienie i temperatura), NVT (stała liczba atomów, objętość i temperatura), a nieco rzadziej spotyka się warunki NVE (stała liczba atomów, objętość i energia).

Tutaj zastosowałam warunki NPT. Zastosowanie warunków stałego ciśnienia wydawało się bardziej realistyczne fizycznie niż warunki izochoryczne.

Temperatura symulacji

Wszystkie symulacje przebiegały w temperaturze 298 K.

Prostą metodą utrzymywania symulowanego układu w stałej temperaturze jest metoda słabego sprzężenia (ang. *weak-coupling method*) (233). Temperatura kinetyczna $T(t)$ układu w chwili t może być wyznaczona ze wzoru:

$$T(t) = \frac{1}{N_{df} k_B} \sum_{i=1}^N m_i \mathbf{v}_i^2(t) \quad (4.11)$$

N_{df} - liczba stopni swobody układu

k_B - stała Boltzmanna

m_i - masa atomu i

\mathbf{v}_i - wektor prędkości atomu i

N - liczba wszystkich atomów

Stała temperatura utrzymywana jest dzięki skalowaniu prędkości atomów za pomocą czynnika $\lambda(t)$:

$$\lambda(t) = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_t} \left(\frac{T_0}{T(t)} - 1 \right)} \quad (4.12)$$

Przeskalowanie prędkości za pomocą czynnika $\lambda(t)$ w każdym kroku czasowym powoduje, że temperatura $T(t)$ będzie się zbliżała do T_0 , czyli pożądanej temperatury symulacji. Siła sprzężenia regulowana jest przez parametr τ_t . Jego wartość powinna być wystarczająco mała (silne sprzężenie), aby zapewnić odpowiednią średnią temperaturę, ale i wystarczająco duża (słabe sprzężenie), aby uniknąć znaczącego zaburzenia właściwości układu. Przyjęto domyślną wartość proponowaną przez podręcznik użytkownika pakietu Amber równą 1,0 ps.

Ciśnienie symulacji

Symulacje były prowadzone pod ciśnieniem 1 bara.

Metody służące do utrzymania stałego ciśnienia są analogiczne do tych służących do utrzymania stałej temperatury, przy czym nie są skalowane prędkości, ale położenia atomów.

Barostat Berendsen'a *et al.* jest najszerzej używanym w symulacjach biomolekuł. Ciśnienie hydrostatyczne $P(t)$ obliczane jest w każdym kroku czasowym z użyciem energii kinetycznej układu $E_{kin}(t)$ i wielkości $\mathcal{E}(t)$ zwanej wirialem (233):

$$P(t) = \frac{2}{3V(t)} [E_{kin}(t) - \mathcal{E}(t)] \quad (4.13)$$

V - objętość boku symulacyjnego

E_{kin} - energia kinetyczna układu

\mathcal{E} - wiriał

Wiriał $\mathcal{E}(t)$ wyznacza się z zależności:

$$\vec{\varepsilon}(t) = -\frac{1}{2} \sum_{\alpha < \beta}^{N_M} \mathbf{r}_{\alpha\beta}(t) \mathbf{F}_{\alpha\beta}(t) \quad (4.14)$$

$\mathbf{r}_{\alpha\beta}$ – odległość środków mas cząsteczek

$\mathbf{F}_{\alpha\beta}$ – siła działająca na cząsteczkę α , wywierana przez cząsteczkę β

N_M – liczba cząsteczek

Ponieważ siły wewnątrzcząsteczkowe nie wnoszą wkładu do ciśnienia, powyższa suma często liczona jest po kolejnych cząsteczkach N_M w układzie, a siły są siłami działającymi na ich środki mas.

Rozmiary boku l i współrzędne x, y, z środków mas cząsteczek są następnie skalowane w każdym kroku czasowym tak, że $l \rightarrow \mu l$, $x \rightarrow \mu x$ itd.. Skalowanie jest w tym przypadku izotropowe (jednakowe w każdym kierunku). Czynniki skalujące $\mu(t)$ wyraża się wzorem:

$$\mu(t) = \left[1 - \kappa \frac{\Delta t}{\tau_p} [P_0 - P(t)] \right]^{1/3} \quad (4.15)$$

P_0 – ciśnienie pożądane

P – ciśnienie chwilowe

κ – ściśliwość izotermiczna

τ_p – stała sprężenia

Wartość ściśliwości może nie być dokładnie znana, ale tak czy inaczej występująca w równaniu wielkość τ_p jest parametrem zmiennym. Można pójść za sugestią podręcznika do symulacji pakietu GROMOS (233) i oszacować wartość ściśliwości na podstawie faktu, że ściśliwość białek jest równa 10÷20% ściśliwości wody.

Siła sprężenia z barostatem nie powinna być większa niż dla sprężenia z termostatem ($\tau_p \geq \tau_t$), jako że definicja ciśnienia zależy od energii kinetycznej. Tu przyjęto domyślną wartość proponowaną przez podręcznik użytkownika pakietu Amber równą 1,0 ps.

4.2. Wybór modelu wody oraz przygotowanie układów do symulacji

W toku pracy skonstruowałam kilkanaście różnych układów, których główną część stanowiła cząsteczka (lub cząsteczki) białka. Analizę rozpoczęłam od domeny motorycznej kinezyiny zanurzonej w wodzie SPC/E. W miarę postępu badań, pojawiały się potrzeby konstruowania kolejnych układów, zawierających białko z odciągniętą szyjką łącznikową, wyłączonymi oddziaływaniami elektrostatycznymi, w próżni lub w wodzie o zmodyfikowanej parametryzacji. Celowość i znaczenie tych modyfikacji będzie omówione przy okazji dyskusji wyników. Do wykorzystanych układów należały:

- układ 1BG2, zawierający domenę katalityczną kinezyiny bez szyjki łącznikowej (1BG2) ze związanym ADP i jonem Mg^{2+} ;

- układ 1MKJ, zawierający domenę katalityczną kinezyiny z zadokowaną szyjką łącznikową (1MKJ) ze związanym ADP i jonem Mg^{2+} ;
- układ 1MKJ_0, utworzony z układu 1MKJ, w którym ładunki cząstkowe wszystkich atomów białka (oraz związanych z białkiem ADP i Mg^{2+}) zostały wyzerowane;
- układy zawierające domenę katalityczną kinezyiny (1MKJ), związany ADP i jon Mg^{2+} ze sztucznie odciągniętą na różną odległość szyjką łącznikową;
- układ 1JFF, zawierający dimer tubulinowy (1JFF) wraz ze związanymi GDP, GTP i jonem Mg^{2+} ;
- układy 1BG2_1JFF, zawierające dimer tubulinowy (1JFF) oraz domenę katalityczną kinezyiny bez szyjki łącznikowej (1BG2) znajdujące się w różnych odległościach od siebie.

Współrzędne białka zostały pobrane z Protein Data Bank (wykorzystałam układy o nazwach 1BG2 (28), 1MKJ (234), 1JFF (235), 2P4N (236)).

Wybór modelu wody

W przeglądzie literatury wspomniałam o mnogości stosowanych w dynamice molekularnej modeli wody, z których żaden nie jest doskonały. Przez to sprawa wyboru modelu może być nieoczywista. Wstępnie postanowiłam zawężyć zbiór kandydatów jedynie do modeli trójpunktowych. W tych modelach cząsteczkę wody reprezentują trzy ułożone w odpowiedniej orientacji punkty (trzy miejsca oddziaływania), którym przypisane są odpowiednie ładunki i wartości parametrów Lennarda – Jonesa. Amber pozwala również na symulację z użyciem modeli czteropunktowych i pięciopunktowych (takich jak TIP4P i TIP5P), jednak nie były one brane pod uwagę ze względu na to, że solwatacja wybranych do symulacji białek wymagała użycia dużej liczby cząsteczek wody. W takiej sytuacji zastosowanie modelu pięciopunktowego spowodowałoby znaczne wydłużenie czasu obliczeń w połączeniu z dużym powiększeniem objętości wynikowych plików z trajektorią.

W trakcie oceny jednej z poprzednich prac przygotowywanych do druku, jej recenzenci zwrócili uwagę na zastosowanie w pracy prostego sztywnego modelu wody (był to wówczas model SPC), podkreślając przy tym znaczenie efektów polaryzacyjnych w procesie solwatacji. Uwaga ta nie była pozbawiona słuszności. Powszechnie stosowane modele zostały opracowane pod kątem możliwie najlepszego odtwarzania właściwości czystej wody – tak, w wyniku dopasowania, ustala się wartości podstawowych parametrów danego modelu (rozkład przestrzenny i wartości ładunków cząstkowych oraz wartości parametrów Lennarda-Jonesa). Wobec tego parametry konkretnego modelu zależą od wybranego zbioru właściwości fizycznych, których wartości pragniemy odtwarzać – stąd, między innymi, bierze się znaczna różnorodność tych modeli. W konsekwencji, dany model uwzględnia również (co prawda jedynie *implicit* i w sposób czysto empiryczny) zjawisko polaryzacji elektrycznej cząsteczki wody, czyli efekt zmiany rozkładu gęstości elektronowej w tej cząsteczce, wywołany obecnością innych ją otaczających. Niewygodnym

tego następstwem jest fakt, że wybrany model użyty do symulacji zachowania się wody ciekłej, może całkiem dobrze odtwarzać szereg jej właściwości w pewnym zakresie temperatur i ciśnień, lecz zupełnie nie będzie się nadawać na przykład do badania zachowania się tejże wody w fazie gazowej (tzn. pary wodnej). Jeżeli więc zamierzamy badać właściwości wody solwatacyjnej wokół białka, to trzeba oczywiście mieć na uwadze, że każda z jej cząsteczek znajdować się będzie w silnie anizotropowym otoczeniu, sąsiadując zarówno z innymi cząsteczkami wody, jak i z różnymi atomami znajdującymi się na powierzchni tego białka. Trudno jest więc zakładać *a priori*, że model, który opracowany został z myślą o możliwie najlepszym odtwarzaniu właściwości wody czystej, będzie równie poprawnie odtwarzać właściwości wody solwatacyjnej. Ta właśnie myśl leżała u podstaw wspomnianej na wstępie uwagi recenzenta. Zamierzam obecnie odnieść się do poruszonego zagadnienia, gdyż ewentualne potwierdzenie wyrażonych powyżej zastrzeżeń mogłoby rzutować na otrzymane przeze mnie wnioski. Powierzchnia białka jest z natury rzeczy bardzo niejednorodna pod względem chemicznym. Ponadto, jak opisałam to w przeglądzie literatury, oddziaływania elektrostatyczne grają znaczną rolę w mechanizmie ruchu motoru, zaś wedle niektórych modeli ich rola jest nawet decydująca (58), co także sugeruje obecność stosunkowo silnego pola elektrycznego w przestrzeni otaczającej cząsteczkę białka (kinezyny lub dimeru tubulinowego).

Tak więc, na samym początku mojej pracy, postanowiłam sprawdzić, czy zastosowanie modelu polaryzowalnego wody (który pozwala na zachodzenie zmian w rozkładzie ładunków cząstkowych i momentu dipolowego cząsteczki wody) zamiast najprostszego modelu sztywnego ze stałym rozkładem ładunku może wpłynąć w istotny sposób na badane przeze mnie właściwości strukturalne wody solwatacyjnej. Ponieważ jednak użycie modelu polaryzowalnego wiąże się ze znacznie większym kosztem obliczeń, przejawiającym się wielokrotnym wydłużeniem czasu ich trwania (blisko dziesięciokrotnym), więc – zamiast symulować bardzo duże układy zawierające białko – postanowiłam na początek zbadać proces solwatacji mniejszych cząsteczek. Wybór mój padł na grupę małych cząsteczek z grupy tak zwanych osmolitów i wybrałam spośród nich cztery następujące: mocznik (U), tetrametylomocznik (TMU), N-metyloacetamid (NMA) oraz N-tlenek trimetyloaminy (TMAO). Użyte przeze mnie cząsteczki reprezentują taki zakres zmienności sposobu ich oddziaływania z otaczającą wodą, który, moim zdaniem, powinien choć w części odzwierciedlać różnorodny charakter oddziaływań pomiędzy wodą a różnymi grupami funkcyjnymi na powierzchni białka. Wyniki tego testu zostały częściowo opublikowane (237) i wskazują w sposób nie budzący wątpliwości na to, że użycie modelu prostszego jest w pełni zasadne i usprawiedliwione. Dlatego też, mając na uwadze przede wszystkim oszczędność czasu obliczeń (co w efekcie pozwoliło mi na otrzymanie w tym samym czasie znacznie większej liczby danych), zdecydowałam się na wykorzystanie modelu sztywnego ze stałym rozkładem ładunku.

Ostatecznie wybór padł na model SPC/E (Simple Point Charge/Extended) (238). W przypadku tego modelu, parametry Lennarda-Jonesa dotyczą tylko atomu tlenu, dla atomów wodoru są równe zeru. Ładunki

zlokalizowane są w centrach atomów: jeden ujemny przypisany jest atomowi tlenu, dwa dodatnie atomom wodoru. Geometrię modelu opisują dwie wielkości: długość wiązania łączącego atom tlenu z atomem wodoru (0,1 nm) oraz kąt pomiędzy dwoma wiązaniami O-H, równy kątowi tetraedrycznemu (wszystkie parametry w tabeli w przeglądzie literatury (**Tabela 3.1**)).

Biorąc pod uwagę mnogość modeli i fakt, że żaden z nich nie jest doskonały, decyzja nie była łatwa i na pewno nie można jej uznać za jedynie właściwą. Ważkimi argumentami za użyciem modelu SPC/E mogą być powszechność jego stosowania (co oznacza, że został wypróbowany w wielu warunkach) oraz fakt, że model bardzo korzystnie wypada na tle innych niepolaryzowalnych modeli wody, dając dobrą zgodność z danymi eksperymentalnymi (238,239). Model generalnie poprawnie odtwarza przebieg funkcji rozkładu radialnego w temperaturze 298 K, choć maksima dla funkcji tlen-tlen i tlen-wodór mogą być nieco przesunięte w kierunku mniejszych odległości niż wyznaczone eksperymentalnie (67). Model nieźle oddaje współczynnik samodyfuzji, stałą dielektryczną czy też gęstość wody w warunkach normalnych, ale na przykład charakteryzuje się znacząco niższą temperaturą topnienia (**Tabela 4.1**). Ta niedoskonałość nie ma jednak w naszym przypadku znaczenia, ponieważ symulacje będą prowadzone w temperaturach dalekich od temperatury krzepnięcia. Ponieważ interesują mnie właściwości dynamiczne wody, sprzyjającą okolicznością jest fakt, że model SPC/E ma współczynnik dyfuzji stosunkowo bliski współczynnikowi dyfuzji czystej wody, zwłaszcza na tle domyślnego w Amberze modelu wody TIP3P, który znacząco go przeszacowuje.

	Model SPC/E	Dane eksperymentalne
ρ [kg/m ³] 298 K, 1 atm	998,9 (68)	997,2 (68)
$T_{\max d}$ [K]	241 (240)	277 (240)
T_m [K]	215 (241)	273,15 (241)
κ_T [GPa ⁻¹]	0,46 (68)	0,468 (68)
ϵ_r	71 (68)	78 (68)
D [10 ⁻⁹ m ² /s] 298 K, 1 atm	2,8 (67)	2,3 (59)
S_∞ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	66,45 (65)	69,95 (65)

Tabela 4.1. Porównanie wybranych właściwości wody z właściwościami modelu SPC/E.

ρ - gęstość

$T_{\max d}$ - temperatura maksymalnej gęstości cieczy

T_m - temperatura topnienia

κ_T - ścisłość izotermiczna

ϵ_r - stała dielektryczna

D - współczynnik samodyfuzji

S_∞ - entropia całkowita

Za wyróżniające wyniki modelu SPC/E odpowiadać może między innymi korekcja uwzględniająca polaryzowalność, prowadząca do tego, że model ten ma większy moment dipolowy od innych popularnych modeli takich jak TIP3P, TIP4P i SPC (239).

Ten czynnik może jednak jednocześnie odpowiadać za to, że rezultaty analiz porównawczych zachowania się modelu SPC/E w przypadku solwatacji innych cząsteczek bywają niejednoznaczne (239). Na przykład Tieleman *et al.* (242) polecają raczej model SPC a nie SPC/E do symulacji dwuwarstwy fosfolipidowej. Cerutti *et al.* (243) wskazują z kolei, że wybór modelu wody miał dla ich wyników drugorzędne znaczenie w porównaniu z wyborem modelu białka. Natomiast według Hess'a i van der Vegt'a (68) model SPC/E dobrze współpracuje z popularnymi polami siłowymi (wliczając w to pole Ambera). Porównywali oni entropie, entalpie i pojemności cieplne hydratacji wybranych analogów łańcuchów bocznych aminokwasów i zaobserwowali, że różnice w poprawności odwzorowania danych eksperymentalnych pomiędzy polami siłowymi nie są duże oraz że spośród kilku zbadanych popularnych modeli wody, model SPC/E zachowuje się stosunkowo najlepiej.

Także ruch symulowanego białka zanurzonego w wodzie będzie zależał od wybranego modelu. Poprawne oddanie współczynnika dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej cząsteczki białka ma znaczenie zwłaszcza przy symulacjach asocjacji białka z białkiem lub innym biopolimerem. Jak pokazują Takemura i Kitao (244), z użyciem modelu SPC/E można uzyskać współczynniki dyfuzji białka (rotacyjne i translacyjne) bliższe rzeczywistym niż z użyciem modelu TIP3P czy SPC.

Modyfikacja parametrów cząsteczek wody

Model SPC/E został zmodyfikowany w sposób zainspirowany pracą Sorina *et al.* (277). Zmodyfikowane zostały parametry ϵ i σ występujące w formule na potencjał Lennarda-Jonesa. Zmiana tych parametrów została przeprowadzona w ten sposób, że gęstość wody pozostała z grubsza niezmienną. Parametry zmodyfikowanych modeli wody zawarte są w tabeli poniżej (**Tabela 4.2**).

Model	ϵ [kJ·mol ⁻¹] ([kcal·mol ⁻¹])	σ [nm]	ρ [g·cm ⁻³]
mod10	0.41840 (0.10)	0.32277	0.999
mod20	0.83680 (0.20)	0.31431	0.998
mod25	1.04600 (0.25)	0.31313	0.999

Tabela 4.2. Parametry ϵ i σ występujące w formule na potencjał Lennarda-Jonesa dla zmodyfikowanych modeli wody mod10, mod20 i mod25.

Przygotowanie układów zawierających jedynie cząsteczki wody

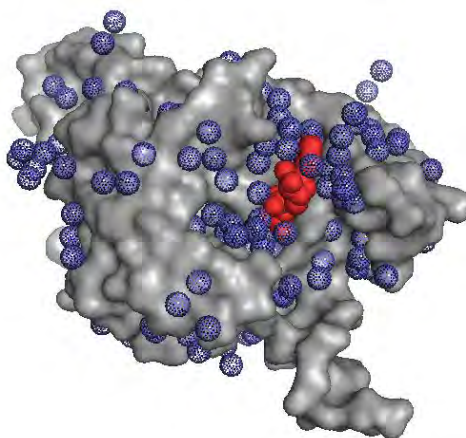
Aby dokonać analizy porównawczej, oprócz obliczeń dla wody solwatacyjnej należało również przeprowadzić obliczenia dla wody czystej. W tym celu potrzebne były układy zawierające tylko wodę. Dlatego skonstruowałam prostopadłościenne pudełka zawierające 2545 i 12606 cząsteczek wody SPC/E. Do analizy porównawczej wykorzystującej obliczenia

największego przepływu (opisane niżej w tym rozdziale) przydało się prostopadłościennie, podłużne pudełko o wymiarach około $12,5 \times 5,5 \times 5,5$ nm, zawierające 11051 cząsteczek czystej wody SPC/E.

Struktury 1BG2 i 1MKJ

Struktury 1BG2 (28) i 1MKJ (234) zostały wybrane, ponieważ są tworzone przez konwencjonalną kinezynę pracującą jako dimer oraz umożliwiają porównanie tego samego białka w dwóch różnych konformacjach. Białko to jest zwane K349, ponieważ zawiera pierwsze (tzn. od strony N-końca) 349 aminokwasów łańcucha ciężkiego konwencjonalnej kinezyiny ludzkiej. Aminokwasy te formują domenę motoryczną oraz początek odcinka szyjnego. Struktury krystaliczne to białka monomeryczne, a nie dimery, które tworzą funkcjonalną kinezynę. Choć obie kinezyiny są skompleksowane z ADP, z uwagi na różne warunki krystalizacji występują pomiędzy nimi różnice.

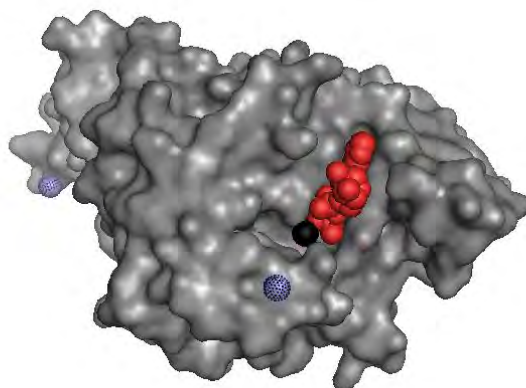
Struktura 1BG2 (**Rys. 4.1**) została otrzymana z użyciem PEG (glikol polietylenowy). Charakteryzuje się tym, że szyjka łącznikowa jest niewidoczna, zlokalizowano tylko aminokwasy do numeru 325. W związku z tym można bezpiecznie założyć, że szyjka znajduje się w stanie niezadokowanym, ponieważ C-końcowe odcinki helis α_4 i α_5 zapobiegają połączeniu tworząc zawadę steryczną.



Rys. 4.1. Struktura 1BG2 wraz z ADP (kolor czerwony) i zlokalizowanymi cząsteczkami wody (kolor niebieski). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Struktura 1MKJ (**Rys. 4.2**) została otrzymana z użyciem siarczanu litu. Uważa się, że obecność jonów siarczanowych, wiążących się blisko ADP w miejscu aktywnym, pozwoliła uzyskać strukturę z zadokowaną szyjką łącznikową. Elementy tworzące klastery przełącznika II oddalają się na tyle od miejsca wiązania, że możliwe jest połączenie szyjki łącznikowej z domeną

motoryczną. Opisywane w rozdziale trzecim modele ruchu kinezyzny konformację z przyłączoną szyjką wiążą z obecnością ATP w miejscu aktywnym. W strukturze 1MKJ znaczna część pętli L11 jest niewidoczna, zatem uważa się, że jest ona w tym przypadku ruchliwa i elastyczna.



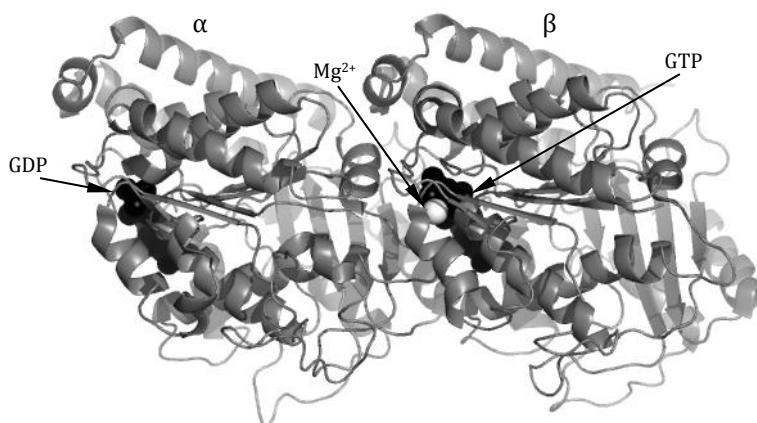
Rys. 4.2. Struktura 1MKJ wraz z ADP (kolor czerwony) i zlokalizowanymi cząsteczkami wody (kolor niebieski), widoczny też jon Mg²⁺ (kolor czarny). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Aminokwasy, których położenia nie zostały wyznaczone krystalograficznie, to aminokwasy o numerach 1-2 w przypadku 1BG2 oraz 1 i 239-250 w przypadku 1MKJ. Sekwencja aminokwasów o numerach 239-250 przynależy do łatwo zmieniającej swoje ułożenie pętli L11.

Struktura 1JFF

Struktura 1JFF (235) (**Rys. 4.3**) to dimer tubulinowy pochodzący z bydła domowego (*Bos taurus*). Została otrzymana z użyciem jonów cynku i taksolu, który działa stabilizująco na strukturę tubuliny. Nie wszystkie aminokwasy udało się zlokalizować podczas eksperymentu.

Aminokwasy, których położenia nie zostały wyznaczone krystalograficznie, to początkowa reszta metioninowa α -tubuliny i β -tubuliny oraz aminokwasy 35-60 stanowiące boczną pętlę α -tubuliny, ale przede wszystkim nie ustalono współrzędnych kilkunastu aminokwasów na C-końcach α -tubuliny i β -tubuliny. Wykazują one naturalne nieustrukturyzowanie i dużą ruchliwość.



Rys. 4.3. Struktura 1JFF wraz z GDP i GTP (kolor czarny), widoczny też jon Mg^{2+} (kolor biały). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Struktura 2P4N

Struktura 2P4N (236) (Rys. 4.4) posłużyła za punkt wyjścia do skonstruowania układów składających się z kinezyiny i dimeru tubulinowego.



Rys. 4.4. Struktura 2P4N wraz z ADP, GDP i GTP (kolor czarny), widoczne też dwa jony Mg^{2+} (kolor biały). Położenie dimeru tubulinowego jest takie jak na rysunku 4.3. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Autorzy tej struktury użyli mikroskopii krioelektronowej, aby obserwować mikrotubule wraz z przyczepionymi do nich kinezynami. Do otrzymanych przez siebie map dopasowali znane wcześniej struktury dimeru tubulinowego 1JFF oraz kinezyzny 1BG2.

Przygotowanie układów 1BG2, 1MKJ i 1JFF

Przygotowując każdy z układów (1BG2, 1MKJ lub 1JFF), z oryginalnego pliku PDB pobrałam współrzędne wszystkich aminokwasów, jonów magnezu oraz dwu- i trójfosforanów nukleozydów (ADP, GDP i GTP), które towarzyszą białkom w naturalnych warunkach. Ponadto pobrałam współrzędne wszystkich krystalograficznie zlokalizowanych cząsteczek wody. Jeżeli obecne były dodatkowe jony jako pozostałości po krystalizacji, to zostały one usunięte.

Aminokwasy, których położenia nie zostały wyznaczone krystalograficznie oraz wszelkie brakujące atomy zlokalizowanych aminokwasów, cząsteczek ADP, GDP, GTP i wody zostały dodane w programie LEaP, który stanowi część pakietu Amber.

Pewien wyjątek stanowi tu struktura 1JFF. Nie zostały dodane aminokwasy składające się na ruchliwe C-końcowe łańcuchy (za wyjątkiem dwóch aminokwasów na ich początkach), ponieważ wybór współrzędnych początkowych do symulacji byłby w ich przypadku bardzo dyskusyjny. Ponieważ zasadniczym celem skonstruowania układów wykorzystujących strukturę 1JFF było badanie właściwości wody w obszarze pomiędzy miejscem wiążącym mikrotubulę na kinezyźnie oraz powierzchnią dimeru tubulinowego, a C-końcowe fragmenty łańcuchów białkowych tubulin znajdują się raczej z boku cząsteczek, dlatego w imię uproszczenia modelu i niewprowadzania do niego zbyt wiele przypadkowości łańcuchy zostały pominięte.

Stan aminokwasów obdarzonych ładunkiem był następujący: Arg - sprotonowana grupa boczna, Asp - grupa boczna w formie kwasowej, Glu - grupa boczna w formie kwasowej, Lys - sprotonowana aminowa grupa boczna.

Ponieważ C-końce łańcuchów polipeptydowych α -tubuliny i β -tubuliny nie przypadają w naturalnej postaci na aminokwasie, który został ustalony jako końcowy podczas przygotowywania modelu do symulacji, a także łańcuch ciężki natywnej kinezyzny nie kończy się ani na 325., ani na 349. aminokwasie, po ostatnim aminokwasie każdego badanego białka została dodana grupa NME (N-metyloamid), aby uniknąć powstania ujemnie naładowanego końca tam, gdzie w rzeczywistych warunkach on nie występuje.

W standardowej bazie danych Ambersa nie ma gotowych cząsteczek ADP, GDP i GTP, które można wykorzystać w czasie tworzenia topologii. Plik zawierający schemat budowy ADP został skonstruowany na podstawie R-adenozyny z fosforanem na końcu 5' i grupą hydroksylową na końcu 3', której topologia jest dostępna w Amberze, oraz na podstawie pracy (245), z której zaadaptowano parametryzację dla dwufosforanów. Podobnie została dobrana parametryzacja dla cząsteczek GDP i GTP, które zostały skonstruowane na bazie R-guanozyny z fosforanem na końcu 5' i grupą hydroksylową na końcu 3', z parametryzacją dla dwu- i trójfosforanu zaczerpniętą ze wspomnianej pracy.

W następnej kolejności do każdego układu dodano odpowiednią liczbę jonów Na^+ , w minimalnej ilości potrzebnej do elektrostatycznego zubożenia (5 dla 1BG2 i 4 dla 1MKJ, 37 dla 1JFF).

Aby usunąć powstałe naprężenia wynikłe z powodu zbyt blisko siebie położonych atomów czy też ściśniętych lub nadmiernie rozciągniętych wiązań, przeprowadzona została krótka minimalizacja energii (300 kroków metodą najszybszego spadku i 200 kroków metodą sprzężonych gradientów). Podczas minimalizacji, aby zapobiec przypadkowym zmianom w konformacji, pobrane z bazy PDB położenia atomów białka były przytrzymywane z użyciem harmonicznego siły ograniczającej. Wartość stałej siłowej wynosiła $10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

Następnym krokiem była solwatacja: umieszczenie każdego układu w oktaedrycznym pudełku wypełnionym cząsteczkami wody modelu SPC/E w ten sposób, aby najmniejsza odległość pomiędzy białkiem a ścianką pudełka wynosiła około 2 nm. Cząsteczki wody dodawane były do układu zawierającego cząsteczkę białka w odległości od atomów białka nie bliższej, niż wynosiła suma odpowiednich promieni van der Waalsa.

W rezultacie układ 1BG2 wzbogacił się o 33808 cząsteczek wody, 1MKJ o 38502 cząsteczek wody, a 1JFF o 71114 cząsteczek wody.

Po solwatowaniu białka znowu przeprowadzona została krótka minimalizacja energii (300 kroków metodą najszybszego spadku i 200 kroków metodą sprzężonych gradientów), pobrane z bazy PDB położenia atomów białka były przytrzymywane z użyciem harmonicznego siły ograniczającej, a wartość stałej siłowej wynosiła tym razem $5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

Przygotowanie układów 1BG2_1JFF

Przygotowanie układów 1BG2_1JFF, zawierających dimer tubulinowy i domenę katalityczną kinezyiny w różnych odległościach od siebie, wymagało dodatkowych przygotowań i wykorzystania struktury 2P4N, zawierającej współrzędne kinezyiny umiejscowionej na tubulinie. Konstrukcja układów przebiegała w następujących etapach:

- Cząsteczka kinezyiny została przesunięta w stosunku do pierwotnego położenia o pożądaną odległość (0,4, 1,2 i 2,0 nm) ponad powierzchnię dimeru tubulinowego. Przy wyborze tych odległości zasugerowałam się pracą (220), w której badano właściwości wody pomiędzy dwiema podjednostkami białkowymi i zastosowałam właśnie takie odległości jak użyte w tym artykule.
- Z układów 1BG2 i 1JFF uprzednio zrównoważonych w obecności wody zostało pobrane białko wraz z najbliższymi cząsteczkami wody (do odległości 2,5 – 4 \AA od jakiegokolwiek atomu białka).
- Do przesuniętych współrzędnych białek układu 2P4N dopasowane zostały współrzędne białek z układów 1BG2 i 1JFF tak, aby średnie odchylenie kwadratowe było jak najmniejsze.
- Do powstałych w ten sposób nowych układów zostały dodane jony Na^+ w minimalnej ilości potrzebnej do zubożenia elektrostatycznego.
- Całość została solwatowana wodą SPC/E. Ponieważ przedmiotem zainteresowania była woda pomiędzy kinezyną i tubuliną, więc można było

przyjąć nieco mniejszą niż w pozostałych przypadkach odległość minimalną białka od ścianek oktaedrycznego boksu symulacyjnego (10 Å).

Po solwatowaniu przeprowadzono krótką minimalizację energii (300 kroków metodą najszybszego spadku i 200 kroków metodą sprzężonych gradientów), położenia atomów białek były przytrzymywane z użyciem harmonicznego siły ograniczającej, a wartość stałej siłowej wynosiła $5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$.

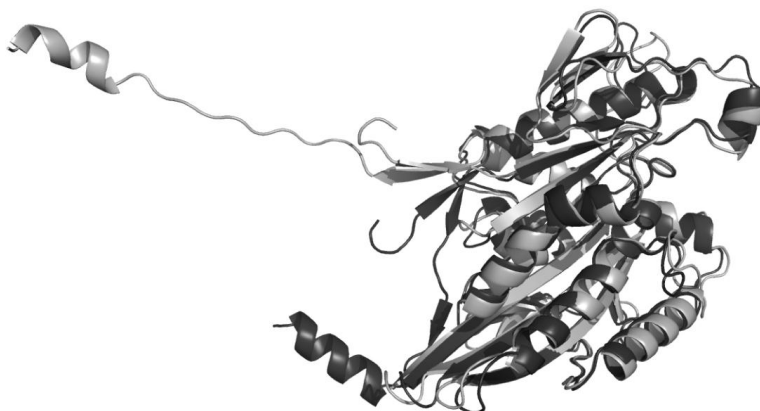
Każdorazowo w celu powtórzenia obliczeń, układ konstruowany był od początku, ponieważ położenie kinezyiny zmieniało się powoli w trakcie symulacji w stosunku do położenia tubuliny. Konieczność ta była wynikiem chęci utrzymania w miarę stałej odległości pomiędzy białkami, przy zrezygnowaniu z wprowadzenia sztucznych więzów w postaci sił harmonicznym przytrzymujących atomy białka w wybranym położeniu.

Przygotowanie układów 1MKJ do pomiarów siły generowanej przez dokującą się szyjkę łącznikową

Przygotowanie układów mających służyć do uzyskania wglądu w proces dokowania się szyjki łącznikowej (pomiarów siły generowanej przez dokującą się szyjkę) wymagało przeprowadzenia dwóch dodatkowych symulacji z wykorzystaniem już istniejącego układu 1MKJ. Najpierw została otrzymana została struktura ze sztucznie odciągniętą szyjką łącznikową, której następnie pozwolono ponownie się zbliżyć do domeny katalitycznej.

Odciąganie szyjki łącznikowej

Od domeny katalitycznej z zadokowaną szyjką łącznikową została odciągnięta szyjka łącznikowa z użyciem zewnętrznej siły, działającej w kierunku w przybliżeniu prostopadłym do powierzchni białka. Siła ta była równa około $440\cdot 10^{-12} \text{ N}$ i została przyłożona do atomów węgla $\alpha 7$ (aminokwasy 339-348), która występuje tuż za szyjką łącznikową. Równocześnie, aby zapobiec przesunięciu się całego białka, przytrzymane zostały wybrane atomy na spodzie kinezyiny, który w normalnych warunkach powinien oddziaływać z mikrotubulą (atomy o numerach 2222, 2244, 2263, 2287, 3735, 3977, 4223, 4230, 4241, 4255, 4276, 4300, 4306, 4327, 4351). **Rys. 4.5** przedstawia stan początkowy i końcowy układu.

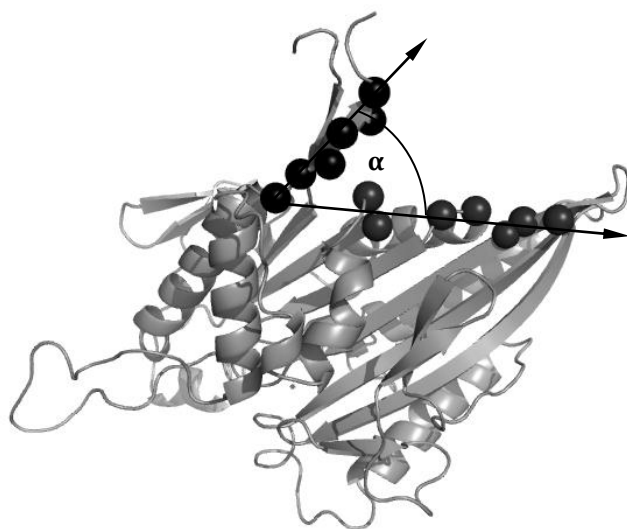


Rys. 4.5. Kolor ciemnoszary: kinezyzna z zadokowaną szyjką, przed rozpoczęciem odciągania. Kolor jasnoszary: kinezyzna ze sztucznie uwolnioną szyjką. Zachowane jest połączenie szyjki łącznikowej i początkowego fragmentu łańcucha białkowego kinezyzny (tzw. struktura CNB, omówiona w przeglądzie literatury). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Powtórne dokowanie się szyjki

Po procesie odciągania szyjki przeprowadzona została symulacja powtórnego dokowania. Aby przyspieszyć obliczenia (to znaczy móc zmniejszyć układ o pewną ilość cząsteczek wody) i usprawnić przebieg dokowania, usunięte zostały aminokwasy od numeru 334 do końca. Za waliną o numerze 333 została dodana grupa NME, aby otrzymać zakończenie łańcucha w postaci nienaładowanej. Ciągłe przytrzymywane były te atomy na spodzie kinezyzny, które były przytrzymywane podczas odciągania szyjki. Wybrane konformacje otrzymane na różnych etapach tej symulacji zostały następnie użyte jako konformacje startowe do oszacowania siły, jaką może generować dokująca się szyjka łącznikowa.

Obliczenia zostały przeprowadzone dla szyjki łącznikowej nachylonej pod kilkoma kątami w stosunku do domeny katalitycznej (poglądowo sposób zdefiniowania kąta przedstawia **Rys. 4.6**).



Rys. 4.6. Sposób definiowania kąta nachylenia szyjki. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Kąt α zmierzony został pomiędzy dwoma wektorami wyznaczonymi przez wskazane atomy na powierzchni domeny katalitycznej kinezyiny i należące do szyjki łącznikowej.

4.3. Przebieg symulacji

Układy: 1BG2, 1MKJ, 1JFF, 1BG2 1JFF i czysta woda

W celu doprowadzenia każdego z układów do stanu równowagi, przeprowadzono wstępną symulację (bez zapisywania trajektorii) w warunkach stałej temperatury i ciśnienia: w temperaturze 298 K (układ był połączony z termostatem, przeskalowanie prędkości odbywało się ze stałą czasową wynoszącą 1 ps), pod ciśnieniem jednego bara (izotropowa - jednakowa wzdłuż każdej osi laboratoryjnego układu współrzędnych - regulacja ciśnienia, ze stałą czasową 1 ps). Czas równoważenia wynosił około 600-1600 ps (300 000-800 000 iteracji z krokiem czasowym 0,002 ps), zależnie od układu.

W przypadku układów 1BG2_1JFF składających się z dimeru tubulinowego i kinezyiny (uprzednio wstępnie zrównoważonych), podczas równoważenia wszystkie atomy węgla alfa przytrzymywane były w wyjściowym położeniu przy użyciu siły harmonicznej, wartość stałej siłowej wynosiła $2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Celem było umożliwienie swobodnego poruszania się cząsteczek wody wokół białek oraz pozostawienie pewnej swobody ruchu łańcuchom bocznym aminokwasów z jednoczesnym zapobieżeniem przedwczesnej zmianie wzajemnego położenia kinezyiny i tubuliny.

Po tym etapie można było rozpocząć 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 ewentualnie krokiem czasowym (był on równy 0,001 lub 0,002 ps). Nie stosowano też żadnych sił przytrzymujących atomy. W rezultacie tych symulacji otrzymałam pliki z zapisem trajektorii, z których każdy zawierał następujące po sobie chwilowe konfiguracje układu (w postaci współrzędnych kartezjańskich wszystkich atomów) w odstępie czasowym 0,001 ps (do obliczeń funkcji autokorelacji prędkości i współczynników dyfuzji) lub 0,01 ps (do obliczeń funkcji rozkładu radialnego, energii i geometrii wiązań wodorowych, parametrów uporządkowania opartych na dwucząstkowych funkcjach korelacji, wielościanów Voronoia, parametrów LSI).

Symulacje układów zawierających jedynie cząsteczki wody, przeprowadzone w celach porównawczych, przebiegały w analogicznych jak wyżej opisane warunkach.

Zbieranie plików z zapisem trajektorii i obliczenia właściwości wody były powtarzane w celu oszacowania rozrzutu wartości mierzonych wielkości fizycznych. Łączny czas symulacji wynosił od kilkunastu do 25 ns, w zależności od badanego układu.

Niektóre zebrane trajektorie zostały poddane, klatka po klatce, procedurze minimalizacji energii, w celu dokonania porównawczych obliczeń wybranych parametrów opisujących właściwości wody. Cel tego postępowania zostanie przedyskutowany w rozdziale poświęconym omówieniu wyników.

Układ MKJO – cząsteczka czysto hydrofobowa (z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi na atomach)

Podczas symulacji należało zastosować siłę harmoniczną, aby zapobiec rozwinięciu się białka. Stała siłowa była równa $10 \text{ kcal} \cdot \text{Å}^{-2} \cdot \text{mol}^{-1}$. Większość wyników, które będę omawiać niżej, dotyczy białka, którego wszystkie atomy były przytrzymywane. Niektóre obliczenia współczynników dyfuzji były jednak przeprowadzone także dla białka, w którym łańcuchy boczne aminokwasów nie były przytrzymywane (przytrzymywano tylko atomy szkieletu polipeptydowego).

Układ 1MKJ skonstruowany w celu obliczenia siły generowanej przez dokującą się szyjkę łącznikową

Nieco odmiennie przebiegała symulacja mająca na celu otrzymanie trajektorii do obliczenia siły generowanej przez dokującą się szyjkę łącznikową. Podczas tej symulacji, przytrzymywano atom węgla α waliny o numerze 331 z użyciem siły harmoniczej, ze stałą siłową równą $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$, sugerując się pracą [25]. Użycie tej siły było konieczne do przeprowadzenia obliczeń, jak zostanie to omówione poniżej. Przytrzymywane były także te atomy, które przytrzymywane były podczas symulacji odciągania szyjki. Trajektorie zapisywano z krokiem czasowym 0,001 ps.

4.4. Analiza wyników symulacji

Poniżej omówię sposób obliczania interesujących mnie parametrów charakteryzujących wybrane cechy wody i białka. Analizowałam właściwości dynamiczne i strukturalne wody, ruchliwość atomów białka, a ponadto mierzyłam siłę generowaną przez dokującą się do powierzchni domeny katalitycznej szyjkę łącznikową.

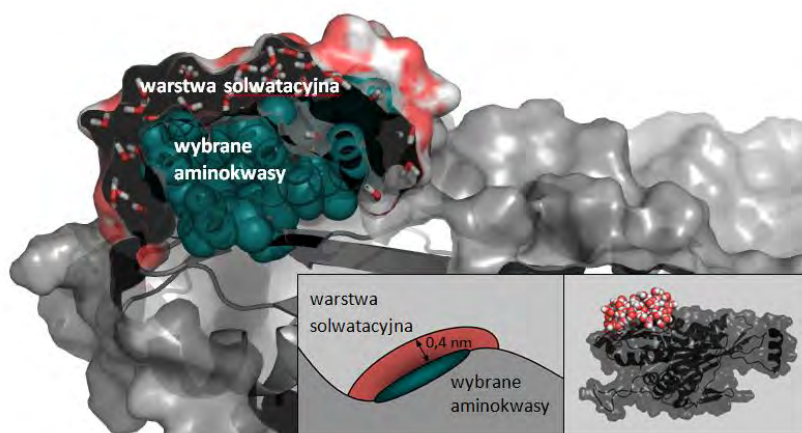
Najpierw należało zdecydować, które cząsteczki wody uznać za przynależne do otoczki solwatacyjnej i jakie kryteria zastosować, aby je wyodrębnić wśród innych.

Układem odniesienia przy wyborze cząsteczek wody solwatacyjnej była cząsteczka białka. Obliczenia były realizowane dla cząsteczek wody znajdujących się w określonych przedziałach odległości od wybranych atomów białka, wchodzących w skład aminokwasów umiejscowionych na powierzchni białka.

Przestrzeń zawierająca cząsteczki wody będące przedmiotem obliczeń była definiowana nieco w odmienny sposób w przypadku analizy pojedynczej domeny motorycznej kinezyiny oraz w przypadku analizy układu składającego się z kinezyiny wraz z dimerem tubulinowym.

W przypadku analizy samej kinezyiny, każdy przedział odległości od wybranych atomów białka określały dwa promienie. Podczas analizy brano były pod uwagę te cząsteczki wody, które znajdowały się w odległości większej niż mniejszy z promieni od wszystkich atomów białka oraz w odległości mniejszej niż większy z promieni od wybranych atomów białka. Położenie cząsteczki wody w przestrzeni określone było poprzez współrzędne jej środka masy. Sposób definiowania pierwszej otoczki solwatacyjnej został zilustrowany na **Rys. 4.7**.

Pomiar właściwości dynamicznych wody solwatacyjnej (współczynników dyfuzji) wymagał analizy zmian wektora prędkości cząsteczki w czasie i następnie całkowania otrzymanych funkcji autokorelacji względem czasu (podrozdział 4.4.6). Długość przedziału czasowego użytego do całkowania jest określona czasem korelacji, który w przypadku wody solwatacyjnej wynosi około 1,5 ps. Stosownie do tego przyjąłem, że cząsteczka wody znajduje się w wybranym przedziale odległości wówczas, gdy znajduje się tam średnie położenie jej środka masy, liczone w czasie 1,5 ps.

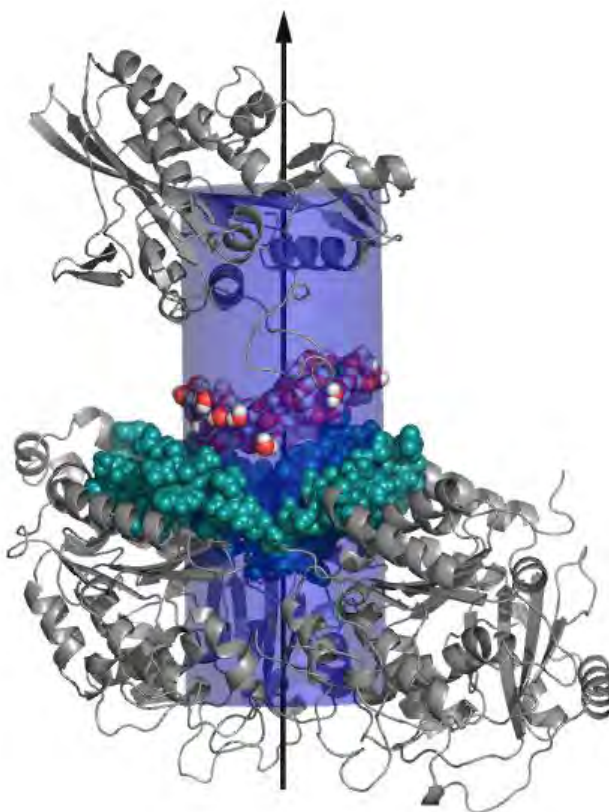


Rys. 4.7. Sposób definiowania pierwszej warstwy solwatacyjnej (w przedziale odległości 0,0-0,4 nm) wokół wybranych reszt aminokwasowych na powierzchni kinezy. Wybrane aminokwasy przedstawione są jako zielone sfery. W prawym dolnym rogu znajduje się cała badana cząsteczka białka (kolor szary) wraz z uwidocznionymi cząsteczkami wody wchodzącej w skład otoczki solwatacyjnej jednego z obszarów na powierzchni kinezy. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Przy definiowaniu obszarów solwatacyjnych wzięto pod uwagę głównie strukturę drugorzędową określonego fragmentu białka, ponadto pominięto te aminokwasy, które były praktycznie całkowicie schowane wewnątrz cząsteczki białka. **Tabela 4.3** podaje numery aminokwasów przyporządkowanych poszczególnym obszarom, wraz z umownymi nazwami tych obszarów. Opisane kryteria odległości stosowały się do wszystkich atomów tych aminokwasów. Ponieważ struktura 1BG2 kończy się na 325 aminokwasie, definicje w kilku miejscach się różnią od tych dla struktury 1MKJ.

	Nazwa obszaru	Struktura drugorzędowa	Numery aminokwasów
1	$\alpha 0$	$\alpha 0$	20-25
2	$\alpha 1a$	$\alpha 1a$	58-60,62-64
3	$\alpha 1b$	$\alpha 1b$	66-68,70-72,74-75
4	$\alpha 2aL4MgADP$	L4 oraz $\alpha 2a$	85-93,96, Mg^{2+} , ADP
5	$\alpha 2b$	$\alpha 2b$	108-110,112-114,116-121
6	$\alpha 3$	$\alpha 3$	176-178,180-182,184-185,187-190
7	$\alpha 3a$	$\alpha 3a$	197-204
8	$\alpha 4$	$\alpha 4$	256-257,259-260,262-263,265-270
9	$\alpha 5L12$	L12 oraz $\alpha 5$	271-279
10	$\alpha 5L13$	$\alpha 5$ oraz L13	281-282,284-285,287-293
11	$\alpha 61$	$\alpha 6$	306-311,313-314
12	$\alpha 62$	$\alpha 6$	315-318,320-321,323-324
13	$\alpha 7$	$\alpha 7$	336-349 (tylko 1MKJ)
14	$\beta 0/\beta 0\beta 9$	$\beta 0$ oraz $\beta 9$	4-8,326-329 (4-8 dla 1BG2)
15	$\beta 1a\beta 1b$	$\beta 1a$ i $\beta 1b$ oraz łącząca je pętla	32-40
16	$\beta 1c$	$\beta 1c$ oraz pętla łącząca z $\beta 1b$	41-47
17	$\beta 1\beta 8$	$\beta 1$, pętla łącząca $\beta 1c$ i $\beta 2$ oraz $\beta 8$	9-10,12,48-50,295-297
18	$\beta 5a\beta 5b$	$\beta 5/L8$ ($\beta 5a$ i $\beta 5b$)	154-157,163-167
19	$\beta 5L8$	$\beta 5/L8$	158-162
20	$\beta 10$	$\beta 10$ oraz kilka reszt tuż przed i za	330-335 (tylko 1MKJ)
21	$\beta 4\beta 5$	końcówka $\beta 4$ do początku $\beta 5/L8$	136-143
22	$\beta 4567_1$	$\beta 4$, $\beta 6$ oraz $\beta 7$	123-129,214-216,222-223
23	$\beta 4567_2$	$\beta 4$, $\beta 5/L8$, $\beta 6$ oraz $\beta 7$	131,168-172,209,211,213,224,226,228
24	$L\beta 1\alpha 0\beta 2\alpha 1a$	pętla łącząca $\beta 1$ i $\alpha 0$ oraz $\beta 2$ i $\alpha 1a$	16-19,53-57
25	$L\alpha 0\beta 1a$	pętla łącząca $\alpha 0$ i $\beta 1a$	26-31
26	L5	L5	97-105
27	L8	$\beta 5/L8$	145-153
28	L9	L9	191-196
29	L10	L10	217-221
30	L11_1	L11	233-238,250-255
31	L11_2	L11	239-249

Tabela 4.3. Zdefiniowane obszary na powierzchni białek 1BG2 i 1MKJ wraz z numerami tworzących je aminokwasów i nazwami struktur drugorzędowych kinezy, do których należą wybrane obszary.



Rys. 4.8. Sposób definiowania kolejnych zakresów obliczeń dla wody solwatacyjnej (tu za pomocą sfer zaznaczono cząsteczki wody znajdujące się w przedziale odległości 0,6-1,0 nm od wybranych aminokwasów dimeru) znajdującej się pomiędzy dimerem tubulinowym (na dole) i kinezyzną (u góry). Wybrane aminokwasy, do których stosowano kryteria odległości w postaci promienia minimalnego i maksymalnego, zaznaczone są jako zielone sfery. Powierzchnia walcowa o promieniu 1,5 nm (ogranicza przestrzeń, w której znajdowały się środki mas analizowanych cząsteczek wody solwatacyjnej) ma kolor niebieski; oś walca zaznaczona jest jako czarna strzałka. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

W przypadku układu składającego się z dimeru tubulinowego i kinezyzny, kolejne zakresy obliczeń były definiowane w funkcji odległości od wybranych aminokwasów znajdujących się na powierzchni dimeru tubulinowego, pod cząsteczką kinezyzny. Jednak w kilku przypadkach obliczenia były także przeprowadzane dla pierwszej warstwy solwatacyjnej spodniej części kinezyzny. Dodatkowo w obliczeniach nie były uwzględniane te cząsteczki wody, które spełniały kryteria odległości, ale znajdowały się poza przestrzenią pomiędzy dimerem tubulinowym a kinezyzną. Granice tej przestrzeni zostały ustalone równaniem walca o promieniu 1,5 nm, którego dolna podstawa

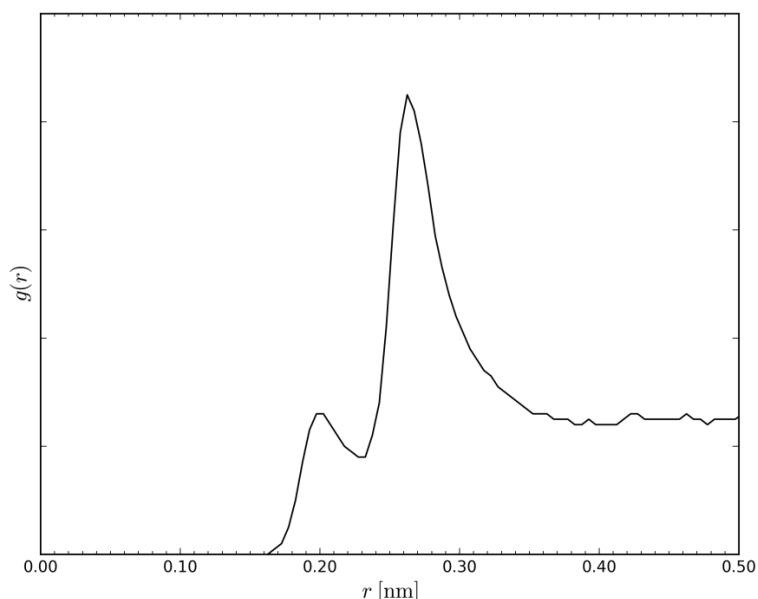
znajdowała się w obszarze zajęтым przez dimer tubulinowy, a górna w obszarze zajęтым przez kinezyne, jak schematycznie ilustruje to **Rys. 4.8**.

4.4.1. Zdefiniowanie granic poszczególnych warstw solwatacyjnych białka

Przed przystąpieniem do właściwego etapu analizy trajektorii, należało zdecydować się na to, jakie będą kryteria odległości ograniczające poszczególne warstwy solwatacyjne. Dlatego obliczenia rozpoczęto od wyznaczenia funkcji rozkładu radialnego wody wokół białka, co pozwoliło na ocenę grubości pierwszej warstwy hydratacji (**Rys. 4.9**).

Przy ustalaniu jej zasięgu wzięto pod uwagę zarówno położenie pierwszego minimum na funkcji rozkładu radialnego, jak i fakt, że średnica pojedynczej cząsteczki wody wynosi około 0,3 nm. Grubość kolejnych warstw przyjęto za równą pierwszej.

Obliczona funkcja nie jest ściśle funkcją rozkładu radialnego w tradycyjnym znaczeniu tego pojęcia. Funkcja ta jest funkcją rozkładu odległości środków mas cząsteczek wody od najbliższych im atomów kinezyne.



Rys. 4.9. Funkcja rozkładu radialnego środków masy cząsteczki wody – najbliższy atom kinezyne.

Funkcja rozkładu ma dwa piki: pierwszy - w odległości 2,0 Å; a drugi - w odległości około 2,7 Å. Ich interpretację można znaleźć w przeglądzie literatury (podrozdział 3.3).

Na podstawie przebiegu tej funkcji przyjęty został promień obliczeń równy 0,4 nm, przy tej odległości całkowicie zanika drugi pik widoczny na wykresie. Odległość 0,4 nm jest wartością z grubsza porównywalną ze średnicą cząsteczki wody. Zatem poszczególne warstwy solwatacyjne to kolejne warstwy o grubości 0,4 nm każda, odległe od powierzchni białka o 0 nm, 0,4 nm, 0,8 nm itd.. Z potrzeby zachowania ciągłości w śledzeniu zmian właściwości wody, zastosowałam procedurę polegającą na przesuwaniu warstwy o grubości 0,4 nm o stałą wartość wynoszącą 0,1 nm. Kolejne zakresy obliczeń będą zatem definiowane jako ograniczone przedziałami odległości 0,0-0,4 nm, 0,1-0,5 nm, 0,2-0,6 nm itd. W tabelach z wynikami każdy przedział opisywany jest jedną wartością promienia, która jest średnią arytmetyczną z promienia mniejszego i większego.

Jeżeli obliczenia określonych parametrów były powtarzane z wykorzystaniem różnych fragmentów trajektorii, to podawane w następnym rozdziale w tabelach lub przedstawiane na wykresach wartości są średnią ze wszystkich obliczeń wykonanych dla danego zbioru cząsteczek wody.

4.4.2. Funkcje rozkładu radialnego

Funkcję rozkładu radialnego wyznacza się według wzoru:

$$g(r) = \frac{1}{\rho} \frac{dN(r)}{dV(r)} = \frac{1}{\rho} \frac{dN(r)}{4\pi r^2 dr} \quad (4.16)$$

ρ – gęstość czystej wody, wyznaczona w oddzielnej symulacji, wyrażona liczbą cząsteczek wody na jednostkę objętości

dN – liczba cząsteczek przypadająca na objętość dV

Korzystając z wyników symulacji, wartość funkcji rozkładu radialnego można obliczyć, używając poniższego wzoru:

$$g(r) = \frac{1}{\rho} \lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{\Delta N}{\Delta V} = \frac{\langle \Delta N(r, \delta r) \rangle}{\rho * \frac{4}{3} \pi [(r + \delta r)^3 - r^3]} \quad (4.17)$$

$\langle \Delta N(r, \delta r) \rangle$ – średnia liczba cząstek wody zawarta w objętości $\Delta V = \frac{4}{3} \pi [(r + \delta r)^3 - r^3]$

δr – krok obliczeń (w obliczeniach używałam kroku równego 0,005 nm)

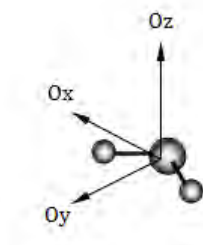
W pracy zostało wykorzystane mniej standardowe podejście: wyznaczone zostały funkcje rozkładu radialnego przedstawiające położenia środków mas cząsteczek wody w odniesieniu do najbliższych atomów białka. Funkcja ta została wyznaczona w ten sposób, że dla każdej cząsteczki wody poszukiwano, w jakiej odległości znajduje się atom białka położony najbliżej danej cząsteczki. Celem było uzyskanie rozkładu cząsteczek wody względem powierzchni białka.

4.4.3. Wewnętrzny układ współrzędnych cząsteczki wody

Niektóre z obliczeń wymagały określania wzajemnej orientacji dwóch cząsteczek wody względem siebie. Aby tego dokonać, z każdą z cząsteczek wody

związano jej własny, wewnętrzny układ współrzędnych. Układ ten skonstruowany został w następujący sposób (**Rys. 4.10**):

- Początek układu pokrywa się ze środkiem masy cząsteczki wody.
- Kierunki osi pokrywają się z kierunkami osi głównych tensora bezwładności:
- Osi Oz odpowiada największa wartość głównego momentu bezwładności cząsteczki wody.
- Osi Ox odpowiada najmniejsza wartość głównego momentu bezwładności cząsteczki wody.



Rys. 4.10. Kierunki osi wewnętrznego układu współrzędnych cząsteczki wody.

4.4.4. Uwzględnienie asymetrii środowiska przy obliczaniu wartości parametrów charakteryzujących właściwości wody solwacyjnej

Na zmianę wartości parametrów obliczonych dla wody solwacyjnej w porównaniu z wartościami charakteryzującymi czystą wodę mogą wpływać dwa czynniki. Pierwszym jest zmiana lokalnej struktury wody w pobliżu powierzchni białka (zachodząca z powodu jej charakteru chemicznego, który jest odmienny od charakteru chemicznego czystej wody jak i z powodu jej kształtu, wymuszającego pewne orientacje cząsteczek) Drugim jest fakt, że w pobliżu białka cząsteczki wody nie są otoczone ze wszystkich stron innymi cząsteczkami wody, tak jak w czystym rozpuszczalniku.

Wpływ tego drugiego efektu na rezultaty obliczeń nie zawsze jest oczywisty i dostrzegalny na pierwszy rzut oka. Jednak jego nieuwzględnienie może prowadzić do błędnej interpretacji wyników.

Z tego powodu, aby spróbować wyeliminować wpływ asymetrii otoczenia (występuje pewna zajęta przez białko i pozbawiona cząsteczek wody przestrzeń), wprowadzona została pewna modyfikacja w obliczaniu niektórych z omawianych parametrów.

Przeprowadzona została symulacja boksów zawierającego jedynie cząsteczki wody. Tak otrzymane współrzędne wody zostały nałożone na cząsteczkę białka. Następnie wybrano do analizy cząsteczki wody znajdujące się w przedziale odległości od atomów białka odpowiadającym przyjętemu zasięgowi otoczki solwacyjnej. Dodatkowo należało także usunąć te

cząsteczki, których współrzędne znalazły się w obszarze zajęty przez białko (to znaczy bliżej niż zadana odległość odcięcia d_0 od któregośkolwiek atomu białka – wskazówką do jej wyboru mogą być funkcje rozkładu odległości z **Rys. 5.37**).

W ten sposób warstwa solwacyjna zostaje wypełniona wodą o strukturze wody czystej i można dla niej przeprowadzić obliczenia interesującego nas parametru P_i . Następnie obliczamy nową wartość ΔP_i parametru P_i jako różnicę pomiędzy wartością uzyskaną dla rzeczywistej wody solwacyjnej $(P_i)_{solv}$ i wartością uzyskaną dla fikcyjnej warstwy solwacyjnej $(P_i)_{bulk}$:

$$\Delta P_i = (P_i)_{solv} - (P_i)_{bulk}$$

Nowa wartość ma być miarą zmiany parametru P_i w wodzie solwacyjnej w porównaniu z wodą czystą.

Nieco podobne koncepcyjnie postępowanie zaproponowali Merzel i Smith, opisując procedurę obliczania gęstości wody solwacyjnej (217) (ich procedura różni się tym, że obliczenia porównawcze dla czystej wody przeprowadzane są w ten sposób, że niektóre cząsteczki wody zostają uznane za białko, co jest prawie równoznaczne z naszym podejściem).

Próby uwzględnienia objętości zajętej przez cząsteczkę substancji rozpuszczonej w wodzie były także czynione na przykład podczas obliczeń funkcji rozkładu radialnego (246).

Do innego rodzaju modyfikacji należy z kolei na przykład modyfikacja tradycyjnej wersji parametru tetraedryczności (który bierze pod uwagę położenia czterech najbliższych sąsiadów cząsteczki wody) (116). Parametr w nowej wersji może uwzględniać zmienną liczbę najbliższych sąsiadów w otocze solwacyjnej lub możliwość oddziaływania z białkiem (1) (247).

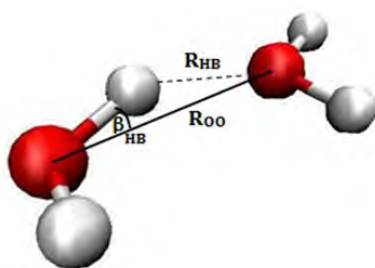
Na koniec należy dodać, iż opisany sposób postępowania przy wyznaczaniu stanu referencyjnego (dla fikcyjnej warstwy solwacyjnej wypełnionej czystą wodą) może wzbudzać pewne wątpliwości, zwłaszcza jeżeli chodzi o sposób usuwania cząsteczek znajdujących się w obszarze zajęty przez białko. Usuwane są wszystkie cząsteczki, których współrzędne środka masy znajdują się bliżej niż pewna wybrana wielkość d_0 od jakiegokolwiek atomu białka. Powierzchnia kontaktu wody i białka ma złożony kształt. Zbyt duża lub zbyt mała wartość d_0 może doprowadzić do jej zniekształcenia, a tym samym do wypaczenia otrzymanego wyniku. Ponadto zastosowanie jednej i tej samej odległości granicznej od wszystkich atomów białka jest pewnym uproszczeniem. Dlatego wykonywałam wiele obliczeń dla sprawdzenia, używając kilku różnych wartości d_0 (w racjonalnym zakresie zmienności). Otrzymane wartości parametrów lub przebieg wykresów różnicowych mogły się nieco różnić, ale w zasadzie nie obserwowałam pomiędzy nimi różnic jakościowych, które mogłyby zmienić wyciągane wnioski (niektóre z obliczeń porównawczych zawarłam w Aneksie: Rys. A2 ÷ A5, Tabela A2 ÷ A4, Tabela A8).

4.4.5. Analiza wiązań wodorowych woda-woda

Definicja wiązania wodorowego

Przyjęłam definicję wiązania wodorowego zaczerpniętą z pracy Werneta *et al.* (75), w której zaproponowano, by funkcja określająca, czy dwie cząsteczki wody są połączone wiązaniem wodorowym, zależała od dwóch zmiennych, mianowicie od:

- kąta β_{HB} (rys. 4.4) pomiędzy:
 - wektorem poprowadzony od atomu tlenu O_D cząsteczki – donoru wiązania do atomu tlenu O_A cząsteczki – akceptora wiązania oraz
 - wiązaniem O_D-H_D cząsteczki – donoru wiązania,
- odległości tlen – tlen dwóch cząsteczek wody (R_{OO})



Rys. 4.11. Definicja kąta β_{HB} ($H_D-O_D \cdots O_A$).

Aby można było mówić o wiązaniu wodorowym, przy odległości 2,6 Å kąt nie może być większy niż 40°, a przy maksymalnej odległości 3,3 Å kąt powinien wynosić 0°.

Wiązanie istnieje, jeżeli spełnione jest kryterium:

$$R_{OO} \leq -0,000044\beta_{HB}^2 + 0,33 \text{ [nm]} \quad (4.18)$$

Ponadto dodajemy warunek, aby całkowita energia oddziaływań pomiędzy dwiema molekułami spełniającymi to kryterium była ujemna, co z grubsza można interpretować jako istnienie siły przyciągającej.

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 (symbole analogiczne jak we wzorze 4.4, ϵ_0 – przenikalność elektryczna próżni):

$$E_{HB} = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (4.19)$$

Obliczenia dotyczyły średniej energii wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy parami cząsteczek wody.

Geometria pojedynczego wiązania wodorowego

Do analizy geometrii pojedynczego wiązania wodorowego wykorzystywano następujące parametry:

- kąt β_{HB} ,
- odległość tlen akceptora wiązania – wodór donora wiązania (R_{HB}), która może być nazwana długością wiązania wodorowego.

W funkcji odległości od wybranych fragmentów powierzchni białka obliczone zostały wartości średnie wymienionych parametrów, a także histogramy obrazujące prawdopodobieństwo wystąpienia określonej wartości kąta β_{HB} oraz odległości R_{HB} .

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

Rozkład prawdopodobieństwa kątów θ pomiędzy sąsiednimi wiązaniami wodorowymi

Analiza wiązań wodorowych została poszerzona o analizę rozkładu kątów θ . Kąty te zdefiniowane zostały z wykorzystaniem pomysłu Chau i Hardwick'a (116), którzy wprowadzili tak zwany parametr tetraedryczności. Tutaj oryginalna koncepcja została nieco zmodyfikowana. Autorzy ci zaproponowali parametr, który obliczany jest w następujący sposób: wybieramy cząsteczkę wody i znajdujemy jej czterech najbliższych sąsiadów; następnie obliczamy sześć kątów, które tworzone są przez wektory łączące atom tlenu cząsteczki centralnej z atomami tlenu cząsteczek sąsiadujących. Znając te kąty, można było następnie obliczyć parametr tetraedryczności za pomocą nieskomplikowanego wzoru. Modyfikacja wprowadzona tutaj polega na tym, że dla centralnej cząsteczki wody, wybieramy wszystkie cząsteczki, które tworzą z nią wiązanie wodorowe. Zatem liczba sąsiadujących cząsteczek niekoniecznie jest równa czterem. Następnie również obliczane są kąty pomiędzy odpowiednimi wektorami łączącymi cząsteczki i budowany jest histogram rozkładu prawdopodobieństwa dla różnych wartości tych kątów.

4.4.6. Współczynniki dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej

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

Stosowane są dwie metody pomiaru współczynników dyfuzji (jedna korzysta z obliczenia przesunięcia kwadratowego, a druga z funkcji autokorelacji prędkości). Zastosowanie pierwszej z tych metod (tzw. wzoru Einsteina, $D_T = \frac{1}{6} \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{\langle |r_i(t) - r_i(0)|^2 \rangle}{t}$), do obliczenia współczynnika dyfuzji translacyjnej D_T wymaga dostatecznie długiego przedziału czasowego t , aby

zniknęły korelacje położenia, gdyż ten sposób liczenia zakłada, że średnie przesunięcie kwadratowe jest liniową funkcją czasu.

Współczynniki dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej obliczone zostały z użyciem funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej i rotacyjnej, ponieważ metoda ta pozwala na obliczenie tych współczynników w krótkim przedziale czasowym (1,5 ps), dzięki czemu nie tracimy możliwości przyporządkowania cząsteczki do konkretnej warstwy solwatacji.

Prędkość translacyjną \mathbf{v}_T cząsteczki wody definiujemy jako prędkość jej środka masy. Prędkość translacyjną w chwili t wyznaczamy, wykorzystując zmianę położenia środka masy cząsteczki po upływie czasu τ według wzoru:

$$\mathbf{v}_T(t) = \frac{\Delta \mathbf{r}(t)}{\tau} \quad (4.20)$$

Czasową funkcję autokorelacji prędkości translacyjnej $C_T(t)$ w stanie równowagi opisuje wzór 4.21:

$$C_T(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} \left(\frac{1}{T} \int_0^T \mathbf{v}_T(t') \mathbf{v}_T(t' + t) dt' \right) = \langle \mathbf{v}_T(0) \mathbf{v}_T(t) \rangle \quad (4.21)$$

Wektory $\mathbf{v}_T(0)$ i $\mathbf{v}_T(t)$ symbolizują prędkości w chwili początkowej $t=0$ i po upływie czasu t . Dla N_W cząsteczek wody funkcja autokorelacji prędkości może być obliczona z danych otrzymanych dzięki symulacji z użyciem wzoru 4.22:

$$C_T(t) = \frac{1}{N_t N_W} \sum_{j=1}^{N_t} \sum_{i=1}^{N_W} [\mathbf{v}_{Tij}(0) \mathbf{v}_{Tij}(t)] \quad (4.22)$$

N_t - liczba zbadanych przedziałów czasowych o długości t

Do obliczenia współczynnika dyfuzji może posłużyć tak zwana zależność Greena - Kubo:

$$D_T = \frac{1}{d} \lim_{t \rightarrow \infty} \left(\int_0^t \langle \mathbf{v}_T(0) \mathbf{v}_T(t') \rangle dt' \right) = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \mathbf{v}_T(0) \mathbf{v}_T(t) \rangle dt \quad (4.23)$$

W przypadku funkcji autokorelacji prędkości rotacyjnej, wykorzystany został wektor \mathbf{v}_R prędkości kątowej rotacji cząsteczki wokół jej środka masy w miejsce prędkości translacyjnej środka masy:

$$\mathbf{v}_R(t) = \frac{\Delta \phi(t)}{\tau} \quad (4.24)$$

Współczynnik dyfuzji rotacyjnej można policzyć ze wzoru analogicznego do podanego powyżej dla dyfuzji translacyjnej:

$$D_R = \frac{1}{d} \lim_{t \rightarrow \infty} \left(\int_0^t \langle \mathbf{v}_R(0) \mathbf{v}_R(t') \rangle dt' \right) = \frac{1}{3} \int_0^\infty \langle \mathbf{v}_R(0) \mathbf{v}_R(t) \rangle dt \quad (4.25)$$

Podczas obliczania współczynników dyfuzji, całkowanie odbywało się w granicach od 0 do 1,5 ps (funkcja autokorelacji w praktyce osiąga wartość równą zero dla czasów rzędu 1,0-1,5 ps).

4.4.7. Widmo mocy prędkości translacyjnej

Niech $v(t)$ będzie funkcją opisującą zmiany prędkości poruszania się cząsteczki wody w czasie. Rozłożenie tej funkcji $v(t)$ na sumę składowych harmonicznym (w postaci szeregu Fouriera) może wydobyć informację o tym, czy oscylacyjny ruch cząsteczki cechuje się występowaniem drgań o preferowanych częstościach.

Rozwinięcie funkcji $v(t)$ w szereg Fouriera przedstawia się następująco:

$$v(t) = \frac{a_0}{2} + a_1 \cos(\omega_1 t) + b_1 \sin(\omega_1 t) + a_2 \cos(\omega_2 t) + b_2 \sin(\omega_2 t) + \dots + a_n \cos(\omega_n t) + b_n \sin(\omega_n t) + \dots \quad (4.26)$$

Stałe a_n i b_n występujące w równaniu są określone wzorami:

$$a_n = \frac{1}{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} v(t) \cos(\omega_n t) dt \quad n = 0, 1, \dots$$

$$b_n = \frac{1}{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} v(t) \sin(\omega_n t) dt \quad n = 1, 2, \dots \quad (4.27)$$

$$\omega_n = \frac{2\pi n}{T}$$

Postać taka przedstawia ruch cząsteczki jako złożenie niezależnych oscylatorów harmonicznym o częstościach drgań ω_n i amplitudach $A_n = \sqrt{a_n^2 + b_n^2}$. Dominującym składowym harmonicznym przypisane będą duże wartości amplitud.

Ilość energii niesionej przez pojedynczą składową harmoniczną n o częstości drgań ω_n jest proporcjonalna do kwadratu amplitudy drgań charakteryzującej oscylator, która jest sumą kwadratów odpowiednich współczynników Fouriera. Zależność kwadratu amplitudy od częstości nazywamy widmem mocy funkcji.

Rozwinięcie funkcji autokorelacji prędkości w szereg Fouriera da się wyrazić wzorem:

$$C(t) = \frac{c_0}{2} + c_1 \cos(\omega_1 t) + c_2 \cos(\omega_2 t) + \dots + c_n \cos(\omega_n t) + \dots = \frac{c_0}{2} + \sum_n c_n \cos(\omega_n t) \quad n = 1, 2, \dots \quad (4.28)$$

gdzie współczynniki c_n liczone są według podanego wzoru na a_n . Twierdzenia Wienera – Chinczyna mówi, że jeżeli $C(t)$ jest funkcją autokorelacji funkcji $v(t)$, to wówczas współczynniki c_n w powyższym rozwinięciu związane są ze współczynnikami a_n i b_n rozwinięcia funkcji $v(t)$ następującą zależnością:

$$c_n = a_n^2 + b_n^2 \quad (4.29)$$

Inaczej mówiąc, widmo amplitudowe funkcji $C(t)$ jest widmem mocy funkcji $v(t)$. Zatem widmem mocy funkcji $v(t)$ jest funkcja w postaci:

$$S(\omega_n) = \begin{cases} \frac{c_0}{2} & \text{dla } n = 0 \\ c_n & \text{dla } n = 1, 2, \dots \end{cases} \quad (4.30)$$

Do wyznaczenia wartości $S(\omega_n)$ posłużyły wartości funkcji autokorelacji prędkości zebrane w przedziale czasu $\langle 0; t_k \rangle$. Ponieważ okres $T = 2t_k$, zatem:

$$S(\omega_0) = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} C(t) dt = \frac{1}{t_k} \int_0^{t_k} C(t) dt \quad (4.31)$$

$$S(\omega_n) = \frac{1}{T/2} \int_{-T/2}^{T/2} C(t) \cos\left(\frac{2\pi n}{T} t\right) dt = \frac{2}{t_k} \int_0^{t_k} C(t) \cos\left(\frac{\pi n}{t_k} t\right) dt, \quad n = 1, 2, \dots \quad (4.32)$$

$S(\omega_0)$ stanowi miarę współczynnika dyfuzji, który został zdefiniowany poprzez całkę z funkcji autokorelacji prędkości.

W celu ułatwienia analizy, widma mocy zostały znormalizowane w ten sposób, aby pola pod nimi zawarte były zawsze jednakowe.

Widma translacyjne są niesymetryczne. Dokonana została próba rozłożenia ich na składowe gaussowskie. Pojedyncze pasmo można opisać równaniem:

$$A(v) = A_0 \exp\left(-\frac{(v - v_{max})^2}{2\sigma^2}\right) \quad (4.33)$$

A_0 – amplituda pasma;

v_{max} – położenie maksimum pasma;

σ – połówkowa szerokość pasma.

4.4.8. Parametry lokalnego uporządkowania oparte na dwucząstkowych funkcjach korelacji

Oprócz właściwości dynamicznych, interesowały mnie także właściwości strukturalne wody solwatacyjnej i ich ewentualne powiązanie z mechanizmem ruchu kinezy. Jednak odpowiedź na pytanie o ilościową ocenę zmian strukturalnych w wodzie solwatacyjnej jest niełatwa. Ponieważ parametry powszechnie stosowane do opisu właściwości strukturalnych wody nie spełniały każdy z osobna w pełni naszych oczekiwań, pojawiła się potrzeba wypróbowania rozwiązań mniej standardowych.

Uporządkowanie strukturalne wody w badanym układzie składającym się z solwatowanego białka będzie się manifestowało poprzez specyficzne położenia i orientacje cząsteczek wody względem innych cząsteczek wody oraz względem cząsteczki białka. Najbardziej racjonalną miarą tego uporządkowania byłaby całkowita entropia wody. Jednak obliczenie całkowitej entropii układu jest zadaniem bardzo trudnym. Z tego powodu została opracowana metoda oszacowania lokalnego uporządkowania wody z wykorzystaniem parametrów opartych na pojęciu entropii i dwucząstkowych funkcjach korelacji (129). Należy zaznaczyć, że parametry te nie są tożsame z entropią.

Przedstawione poniżej rozumowanie opiera się na szkielecie zawartym w pracy Lazaridis'a i Paulaitis'a (123) oraz w pracy (129).

Pojęcie entropii

Entropia jest miarą nieuporządkowania układu fizycznego. Każda rzeczywista substancja ma w temperaturze większej od zera bezwzględnej entropię większą od zera. W temperaturze równej zero entropia substancji może przyjmować wartość zero i przyjmuje wartość zero dla wszystkich doskonale krystalicznych substancji, włącznie ze związkami chemicznymi.

Znany wzór na całkowitą entropię układu makroskopowego podał Ludwig Boltzmann. Entropia S jest równa:

$$S = k_B \ln W \quad (4.34)$$

k_B – stała Boltzmann

W – liczba sposobów na jakie makroskopowy stan termodynamiczny układu może być zrealizowany poprzez mikrostan

Obliczenia entropii komplikuje fakt, że wyznaczenie W jest w większości przypadków technicznie niemożliwe.

Dwucząstkowe wkłady do entropii

Suma statystyczna

Jeżeli mamy do czynienia z układem, na który składają się pewne cząstki (np. cząsteczki wody) rozważane jako bryły sztywne, to na energię E określonego stanu będzie składała się suma energii kinetycznej E_{trans} ruchu postępowego (zależnej od pędów), energii kinetycznej ruchu obrotowego E_{rot} (zależnej od momentów pędów) oraz potencjalnej U (zależnej od konfiguracji układu – położen środków mas cząsteczek oraz ich wzajemnej orientacji). Gdy w przestrzeni trójwymiarowej znajduje się N cząstek, to zapisując klasyczną postać sumy stanów Q jako całkę, należy dokonać całkowania po $3N$ współrzędnych środków mas cząsteczek $\mathbf{q}=(q_x, q_y, q_z)$, $3N$ kątach określających orientację $\boldsymbol{\omega}=(\alpha, \beta, \gamma)$; $d\boldsymbol{\omega}=\sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma$, $3N$ składowych opisujących pęd $\mathbf{p}=(p_x, p_y, p_z)$ oraz $3N$ współrzędnych opisujących momenty pędu $\mathbf{J}=(J_x, J_y, J_z)$.

$$Q = \frac{1}{h^{sN} N! \sigma^N} \int e^{-E/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \quad (4.35)$$

Stała Plancka h pojawia się jako skutek uwzględnienia zasady nieoznaczoności. Liczba s w wykładniku wynosi 5 dla cząsteczek liniowych i 6 dla cząsteczek nieliniowych. Od tej chwili we wzorach będzie używana wartość 6, którą stosuje się w przypadku wody.

Liczba symetrii σ podaje liczbę nieodróżnialnych orientacji cząsteczki. Dla cząsteczki wody wynosi 2, ponieważ istnieje oś obrotu, w przypadku której rotacja o 180° zamienia ze sobą miejscami dwa nieodróżnialne atomy wodoru. Wprowadzana jest w celu uniknięcia wliczania nierozróżnialnych konfiguracji do sumy statystycznej.

Czynnik $N!$ uwzględnia fakt, że zamiana miejscami dwóch nieodróżnialnych cząstek nie spowoduje żadnej zauważalnej z zewnątrz zmiany w układzie.

Rozpisując energię E jako sumę energii kinetycznej ruchu postępowego i obrotowego oraz potencjalnej ($E = E_{trans} + E_{rot} + U$) i przyjmując, że pędy i momenty pędów nie są skorelowane z położeniami i orientacjami, zauważymy, że sumę statystyczną można przedstawić jako iloczyn części translacyjnej, rotacyjnej i konfiguracyjnej.

$$Q = \frac{1}{h^{6N} N! \sigma^N} \int e^{-(E_{trans} + E_{rot} + U)/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N = Q_{trans} \cdot Q_{rot} \cdot Q_U \quad (4.36)$$

Część translacyjna sumy statystycznej Q_{trans}

Energia kinetyczna związana jest z pędem środka masy cząsteczki zależnością: $E_{trans} = \mathbf{p}^2/2m$. Wektor pędu \mathbf{p} można rozłożyć na trzy składowe p_x, p_y, p_z .

Zatem całkowitą energię kinetyczną ruchu postępowego układu N cząstek o takich samych masach m wyraża wzór:

$$E_{trans} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2m} (p_{xi}^2 + p_{yi}^2 + p_{zi}^2) \quad (4.37)$$

Część translacyjna sumy statystycznej będzie wobec tego równa:

$$\begin{aligned} Q_{trans} &= \frac{1}{h^{3N}} \int e^{-E_{trans}/k_B T} d\mathbf{p}^N = \\ &= \frac{1}{h^{3N}} \int \exp \left[- \sum_{i=1}^N \frac{1}{2m} (p_{xi}^2 + p_{yi}^2 + p_{zi}^2) / k_B T \right] dp_x^N dp_y^N dp_z^N = \\ &= \frac{1}{h^{3N}} \left(\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{p^2}{2mk_B T}} dp \right)^{3N} = \left(\frac{\sqrt{2\pi mk_B T}}{h} \right)^{3N} \end{aligned} \quad (4.38)$$

Część rotacyjna sumy statystycznej Q_{rot}

W ujęciu klasycznym energia ciała rotującego wokół osi jest równa $E_{rot} = J^2/2I$, gdzie I jest momentem bezwładności względem osi obrotu, a J momentem pędu względem osi obrotu. W trójwymiarowej przestrzeni rozważamy trzy osie obrotu, związane z trzema głównymi momentami bezwładności I_x, I_y, I_z . W przypadku niesymetrycznych cząsteczek, takich jak cząsteczka wody, wszystkie trzy główne momenty bezwładności są różne i całkowitą energię kinetyczną ruchu obrotowego można wyrazić wzorem:

$$E_{rot} = \frac{J_x^2}{2I_x} + \frac{J_y^2}{2I_y} + \frac{J_z^2}{2I_z} \quad (4.39)$$

Zatem całkowita energia kinetyczna ruchu obrotowego układu złożonego z N cząstek o różnych od siebie trzech głównych momentach bezwładności jest równa:

$$E_{rot} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \left(\frac{J_{xi}^2}{I_x} + \frac{J_{yi}^2}{I_y} + \frac{J_{zi}^2}{I_z} \right) \quad (4.40)$$

Część rotacyjna sumy statystycznej będzie równa:

$$\begin{aligned}
Q_{rot} &= \frac{1}{h^{3N}} \int e^{-E_{rot}/k_B T} d\mathbf{J}^N = \\
&= \frac{1}{h^{3N}} \int \exp \left[- \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \left(\frac{J_{xi}^2}{I_x} + \frac{J_{yi}^2}{I_y} + \frac{J_{zi}^2}{I_z} \right) / k_B T \right] dJ_x^N dJ_y^N dJ_z^N = \\
&= \frac{1}{h^{3N}} \left(\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{J_x^2}{2I_x k_B T}} dp \right)^N \cdot \left(\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{J_y^2}{2I_y k_B T}} dp \right)^N \cdot \left(\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{J_z^2}{2I_z k_B T}} dp \right)^N = \\
&= \left(\frac{\sqrt{2\pi I_x k_B T}}{h} \right)^N \cdot \left(\frac{\sqrt{2\pi I_y k_B T}}{h} \right)^N \cdot \left(\frac{\sqrt{2\pi I_z k_B T}}{h} \right)^N \quad (4.41)
\end{aligned}$$

Część konfiguracyjna sumy statystycznej Q_U

Związana jest ona z energią potencjalną układu, która zależy od położenia i orientacji poszczególnych cząstek.

$$Q_U = \frac{1}{N! \sigma^N} \int \exp \left(- \sum_{i=1}^N \frac{U_i}{k_B T} \right) d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.42)$$

Pojęcie n -cząstkowych funkcji korelacji

Zapytajmy o prawdopodobieństwo, że N konkretnych, rozróżnialnych cząstek zajmie określony punkt w przestrzeni fazowej, czyli będą miały określone położenia, orientacje, pędy i momenty pędów. Gęstość prawdopodobieństwa $P_{T,N}$ wynosi:

$$P_{T,N} = \frac{e^{-E/k_B T}}{\int e^{-E/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N} \quad (4.43)$$

Jeżeli uwzględnimy czynnik normujący sumy statystycznej, otrzymamy nowe wyrażenie:

$$P'_{T,N} = \frac{e^{-E/k_B T}}{\frac{1}{h^{6N} N! \sigma^N} \int e^{-E/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N} = \frac{e^{-E/k_B T}}{Q} \quad (4.44)$$

Jeżeli interesuje nas prawdopodobieństwo, że jedynie współrzędne środków mas i orientacje cząstek przyjmą określone wartości, a pędy i momenty pędów wszystkich cząstek mogą być dowolne, to gęstość tego prawdopodobieństwa otrzymamy z wyrażenia (4.43), dokonując całkowania po wszystkich pędach i momentach pędów:

$$\begin{aligned}
P_N &= \int \frac{e^{-E/k_B T}}{\int e^{-E/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N} d\mathbf{p}^N d\mathbf{J}^N = \\
&= \int \frac{e^{-(E_{trans} + E_{rot} + U)/k_B T}}{\int e^{-(E_{trans} + E_{rot} + U)/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N} d\mathbf{p}^N d\mathbf{J}^N = \frac{e^{-U/k_B T}}{\int e^{-U/k_B T} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N} \quad (4.45)
\end{aligned}$$

Uwzględniając czynnik normujący sumy statystycznej, otrzymujemy:

$$P'_N = \frac{e^{-U/k_B T}}{\frac{1}{h^{6N} N! \sigma^N} \int e^{-U/k_B T} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N} \quad (4.46)$$

Jeżeli mamy do czynienia z nierozróżnialnymi cząstkami, to gęstość prawdopodobieństwa można obliczyć, mnożąc P_N przez czynnik $N! \sigma^N$:

$$f_N = N! \sigma^N P'_N = \frac{P'_N}{h^{6N}} \quad (4.47)$$

Prawdopodobieństwo, że znajdziemy jedynie n cząstek (spośród zbioru liczącego N cząstek) takich, że będą znajdować się w punktach o współrzędnych $q_{x1}, q_{y1}, q_{z1}, q_{x2}, q_{y2}, q_{z2} \dots q_{xn}, q_{yn}, q_{zn}$ oraz że przyjmą one orientacje opisane określonymi wartościami kątów $\alpha_1, \beta_1, \gamma_1, \alpha_2, \beta_2, \gamma_2 \dots \alpha_n, \beta_n, \gamma_n$ będzie oczywiście większe. Położenia pozostałych $N-n$ cząstek mogą być dowolne. Dowolne są również pędy i momenty pędów wszystkich cząstek, łącznie z n wybranymi. Gęstość tego prawdopodobieństwa można otrzymać, posługując się całką z wyrażenia podanego wyżej (4.45). Całkujemy po wszystkich współrzędnych położenia i kątach pozostałych $N-n$ cząstek:

$$\begin{aligned} P_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) &= \int P_N d\mathbf{q}^{N-n} d\boldsymbol{\omega}^{N-n} = \int \frac{f_N}{N! \sigma^N} d\mathbf{q}^{N-n} d\boldsymbol{\omega}^{N-n} = \\ &= \int \frac{e^{-U/k_B T}}{\int e^{-U/k_B T} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N} d\mathbf{q}^{N-n} d\boldsymbol{\omega}^{N-n} \end{aligned} \quad (4.48)$$

Jeżeli n będzie równe 0, wówczas oznacza to, że położenia wszystkich cząstek mogą być dowolne i naturalnie $P_N^{(0)}$ będzie równe 1.

Analogicznie jak w przypadku (4.47), chcąc otrzymać prawdopodobieństwo $f_N^{(n)}$ dla nierozróżnialnych cząstek, dostajemy:

$$f_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) = \frac{N!}{(N-n)!} \sigma^n P_N^{(n)} = \frac{1}{(N-n)! \sigma^{N-n}} \int f_N d\mathbf{q}^{N-n} d\boldsymbol{\omega}^{N-n} \quad (4.49)$$

Funkcja ta spełnia warunek normalizacji:

$$\int f_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) d\mathbf{q}^n d\boldsymbol{\omega}^n = \frac{N!}{(N-n)!} \sigma^n \quad (4.50)$$

Jeżeli mamy do czynienia z cieczą izotropową, wówczas $f_N^{(1)}$ nie zależy od położenia w określonym miejscu w przestrzeni i orientacji tej jednej wybranej cząsteczki. Wówczas, w przypadku cząsteczki nieliniowej, jak na przykład cząsteczka wody, można napisać (przyjmując, że $\Omega = 8\pi^2$):

$$\begin{aligned} \int f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) d\mathbf{q}d\boldsymbol{\omega} &= f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot \int d\mathbf{q} \cdot \int d\boldsymbol{\omega} = \\ &= f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot \int_{z=0}^Z \int_{y=0}^Y \int_{x=0}^X dq_x dq_y dq_z \cdot \int_{\alpha=0}^{\pi} \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{\gamma=0}^{2\pi} \sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma = \\ &= f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot V \cdot 8\pi^2 = f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot V \cdot \Omega \end{aligned} \quad (4.51)$$

Z drugiej strony:, korzystając z zależności (4.45), (4.47) i (4.50):

$$\int f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) d\mathbf{q}d\boldsymbol{\omega} =$$

$$\begin{aligned}
&= \int \left(\frac{1}{(N-1)! \sigma^{N-1}} \int N! \sigma^N \frac{e^{-U/k_B T}}{\int e^{-U/k_B T} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N} d\mathbf{q}^{N-1} d\boldsymbol{\omega}^{N-1} \right) d\mathbf{q} d\boldsymbol{\omega} = \\
&= N\sigma \int \frac{e^{-U/k_B T}}{\int e^{-U/k_B T} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N = N\sigma = f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot V \cdot \Omega \quad (4.52)
\end{aligned}$$

W ten sposób otrzymujemy następujący wzór:

$$f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) = \frac{N\sigma}{V\Omega} = \rho \frac{\sigma}{\Omega} \quad (4.53)$$

$\rho = N/V$ - gęstość liczbowa cząstek

Funkcję f_N można rozisać jako iloczyn N funkcji $f_N^{(1)}$ uwzględniając w iloczynie dodatkową funkcję $g^{(N)}$:

$$f_N(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) = f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{q}_2, \boldsymbol{\omega}_2) \cdot \dots \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{q}_N, \boldsymbol{\omega}_N) \cdot g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) \quad (4.54)$$

Funkcja $g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N)$ jest N -cząstkową funkcją korelacji, zależną od położeń i orientacji. W przypadku funkcji $f_N^{(n)}$ można napisać analogiczny iloczyn:

$$f_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) = f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{q}_2, \boldsymbol{\omega}_2) \cdot \dots \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{q}_n, \boldsymbol{\omega}_n) \cdot g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) \quad (4.55)$$

Wówczas n -cząstkowa funkcja korelacji $g^{(n)}$ jest równa:

$$g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) = \frac{f_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n)}{f_N^{(1)}(\mathbf{q}_1, \boldsymbol{\omega}_1) \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{q}_2, \boldsymbol{\omega}_2) \cdot \dots \cdot f_N^{(1)}(\mathbf{q}_n, \boldsymbol{\omega}_n)} = \frac{f_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n)}{(\rho\sigma/\Omega)^n} \quad (4.56)$$

z warunkiem normalizacyjnym w postaci:

$$\int g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) d\mathbf{q}^n d\boldsymbol{\omega}^n = \frac{N! \Omega^n}{(N-n)! \rho^n} \quad (4.57)$$

Tak zdefiniowaną n -cząstkową funkcję korelacji możemy wyrazić jako iloczyn $(n-1)$ -cząstkowych funkcji korelacji, uwzględniając wszystkie możliwe kombinacje i wprowadzając dodatkowy czynnik $\delta g^{(n)}$ uwzględniający oddziaływania n -cząstkowe.

Ponieważ wszystkie $(n-1)$ -cząstkowe funkcji korelacji można wyrazić jako iloczyn $(n-2)$ -cząstkowych funkcji korelacji i tak dalej, każdą n -cząstkową funkcję korelacji można przedstawić za pomocą wzoru zawierającego jedynie dwucząstkowe funkcje korelacji i odpowiednią liczbę czynników uwzględniających oddziaływania trój-, cztero- pięciocząstkowe itd. aż do n -cząstkowych.

$$\begin{aligned}
g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) &= g^{(2)}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \boldsymbol{\omega}_1, \boldsymbol{\omega}_2) \cdot \dots \cdot g^{(2)}(\mathbf{q}_{n-1}, \mathbf{q}_n, \boldsymbol{\omega}_{n-1}, \boldsymbol{\omega}_n) \cdot \\
&\cdot \delta g^{(3)}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \mathbf{q}_3, \boldsymbol{\omega}_1, \boldsymbol{\omega}_2, \boldsymbol{\omega}_3) \cdot \dots \cdot \delta g^{(3)}(\mathbf{q}_{n-2}, \mathbf{q}_{n-1}, \mathbf{q}_n, \boldsymbol{\omega}_{n-2}, \boldsymbol{\omega}_{n-1}, \boldsymbol{\omega}_n) \cdot \dots \cdot \\
&\cdot \delta g^{(n-1)}(\dots) \cdot \dots \cdot \delta g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) \quad (4.58)
\end{aligned}$$

Jeżeli rozważana ciecz jest jednorodna i izotopowa, wówczas wszystkie dwucząstkowe funkcje korelacji oraz czynniki uwzględniające korelacje od trójczątkowych do n -czątkowych są identyczne. Wówczas, jeżeli $n=N$:

$$g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) = g^{(2)}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \boldsymbol{\omega}_1, \boldsymbol{\omega}_2) \cdot \dots \cdot g^{(2)}(\mathbf{q}_{N-1}, \mathbf{q}_N, \boldsymbol{\omega}_{N-1}, \boldsymbol{\omega}_N) \cdot$$

$$\cdot \delta g^{(3)}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \mathbf{q}_3, \boldsymbol{\omega}_1, \boldsymbol{\omega}_2, \boldsymbol{\omega}_3) \cdot \dots \cdot \delta g^{(3)}(\mathbf{q}_{n-2}, \mathbf{q}_{n-1}, \mathbf{q}_n, \boldsymbol{\omega}_{n-2}, \boldsymbol{\omega}_{n-1}, \boldsymbol{\omega}_n) \cdot \dots \cdot \delta g^{(n)}(\dots) \cdot \dots \cdot \delta g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) \quad (4.59)$$

Liczba każdego z czynników tego iloczynu jest równa liczbie kombinacji bez powtórzeń w przypadku wyboru n elementów ze zbioru N -elementowego:

$$g^{(N)} = [g^{(2)}]^{(N)}_2 \cdot [\delta g^{(3)}]^{(N)}_3 \cdot [\delta g^{(4)}]^{(N)}_4 \cdot \dots \cdot [\delta g^{(N)}] \quad (4.60)$$

Po obustronnym zlogarytmowaniu:

$$\ln g^{(N)} = \binom{N}{2} \ln g^{(2)} + \binom{N}{3} \ln \delta g^{(3)} + \binom{N}{4} \ln \delta g^{(4)} + \dots + \ln \delta g^{(N)} \quad (4.61)$$

Po obustronnym zlogarytmowaniu równania (4.54) i podstawieniu zależności (4.61):

$$\begin{aligned} \ln f_N &= \sum_{i=1}^N \ln f_N^{(i)} + \ln g^{(N)} = \\ &= N \ln f_N^{(1)} + \binom{N}{2} \ln g^{(2)} + \binom{N}{3} \ln \delta g^{(3)} + \binom{N}{4} \ln \delta g^{(4)} + \dots + \ln \delta g^{(N)} \end{aligned} \quad (4.62)$$

Podstawienie powyższej zależności do wzoru na entropię prowadzi do otrzymania entropii w postaci sumy wkładów korelacji jedno-, dwu-, trój- itd. cząstkowych, jak pokazane zostanie poniżej.

Entropia

Entropię statystyczną można wyrazić za pomocą wzoru:

$$S_N = \frac{-k_B}{h^{6N} N! \sigma^N} \int P'_{T,N} \ln P'_{T,N} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \quad (4.63)$$

Za $P'_{T,N}$ dokonujemy podstawienia, wykorzystując równanie (4.47) i fakt, że $P'_{T,N}$ i P_N są powiązane zależnością $P'_{T,N} = N! \sigma^N \cdot \lambda_{trans}^{3N} \cdot \lambda_{rot}^N \cdot e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot P_N$:

$$\begin{aligned} S_N &= \frac{-k_B}{h^{6N} N! \sigma^N} \int \lambda_{trans}^{3N} \cdot \lambda_{rot}^N \cdot e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot f_N \cdot \\ &\quad \cdot \ln(\lambda_{trans}^{3N} \cdot \lambda_{rot}^N \cdot e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot f_N) d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N = \\ &= \frac{-k_B \lambda_{trans}^{3N} \lambda_{rot}^N}{h^{6N} N! \sigma^N} \int e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot f_N \cdot \\ &\quad \cdot \left[\ln(\lambda_{trans}^{3N} \lambda_{rot}^N) - \frac{E_{trans}}{k_B T} - \frac{E_{rot}}{k_B T} + \ln f_N \right] d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \end{aligned} \quad (4.64)$$

gdzie dokonałam podstawienia: $\lambda_{trans} = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}}$

$$\lambda_{rot} = \frac{h}{\sqrt{2\pi I_x k_B T}} \cdot \frac{h}{\sqrt{2\pi I_y k_B T}} \cdot \frac{h}{\sqrt{2\pi I_z k_B T}}$$

m – masą cząstki

I_x, I_y, I_z – główne momenty bezwładności cząstki

Całkę rozłożymy na sumę czterech całek i obliczymy każdą oddzielnie wykorzystując fakt, że zgodnie z (4.50) mamy:

$$\int f_N d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N = N! \sigma^N \quad (4.65)$$

Po przeprowadzeniu obliczeń i zsumowaniu wyników mamy:

$$S_N = 3k_B N - k_B N \ln(\lambda_{trans}^3 \lambda_{rot}) - \frac{k_B}{N! \sigma^N} \int f_N \ln f_N d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.66)$$

Dla uproszczenia zapisu, oznaczmy:

$$S_0 = 3k_B N - k_B N \ln(\lambda_{trans}^3 \lambda_{rot}) \quad (4.67)$$

Po podstawieniu zależności (4.62) otrzymujemy:

$$S_N = S_0 - \frac{k_B}{N! \sigma^N} \int f_N \left[N \ln f_N^{(1)} + \binom{N}{2} \ln g^{(2)} + \binom{N}{3} \ln \delta g^{(3)} + \right. \\ \left. + \binom{N}{4} \ln \delta g^{(4)} + \dots + \ln \delta g^{(N)} \right] d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.68)$$

Całkę z tej sumy można rozłożyć na sumę całek, a następnie, wykorzystując zależność (4.49), można przekształcić tę sumę do postaci:

$$S_N = S_0 - \frac{k_B}{1! \sigma} \int f_N^{(1)} \ln f_N^{(1)} d\mathbf{q} d\boldsymbol{\omega} - \frac{k_B}{2! \sigma^2} \int f_N^{(2)} \ln g^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 + \\ - \frac{k_B}{3! \sigma^3} \int f_N^{(3)} \ln \delta g^{(3)} d\mathbf{q}^3 d\boldsymbol{\omega}^3 - \frac{k_B}{4! \sigma^4} \int f_N^{(4)} \ln \delta g^{(4)} d\mathbf{q}^4 d\boldsymbol{\omega}^4 + \\ - \dots - \frac{k_B}{N! \sigma^N} \int f_N \ln \delta g^{(N)} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.69)$$

Używając wzoru (4.55) i korzystając dodatkowo z zależności (4.53), po paru przekształceniach otrzymamy:

$$S_N = \left[3k_B N - k_B N \ln \left(\lambda_{trans}^3 \lambda_{rot} \frac{N\sigma}{\Omega V} \right) \right] - \frac{k_B}{2! \Omega^2} \left(\frac{N}{V} \right)^2 \int g^{(2)} \ln g^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 + \\ - \frac{k_B}{3! \Omega^3} \left(\frac{N}{V} \right)^3 \int g^{(3)} \ln \delta g^{(3)} d\mathbf{q}^3 d\boldsymbol{\omega}^3 - \frac{k_B}{4! \Omega^4} \left(\frac{N}{V} \right)^4 \int g^{(4)} \ln \delta g^{(4)} d\mathbf{q}^4 d\boldsymbol{\omega}^4 + \\ - \dots - \frac{k_B}{N! \Omega^N} \left(\frac{N}{V} \right)^N \int g^{(N)} \ln \delta g^{(N)} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.70)$$

Jak widać, na całkowitą entropię układu składa się część niezależna od korelacji wielocząsteczkowych oraz części zawierające n -cząstkowe funkcje korelacji. Należy jednak zaznaczyć, że części niezależnej od korelacji wielocząsteczkowych w podanej wyżej postaci nie można utożsamiać z entropią gazu doskonałego.

W przypadku gazu doskonałego w zespole kanonicznym wkład pochodzący od korelacji wielocząsteczkowych wynosi k_B na każdą cząstkę (czyli razem $k_B N$) (248). Przyczyna nie leży oczywiście w tym, że w gazie doskonałym występuje korelacja położenia cząstek, ale w specyficznym zachowaniu się n -cząstkowych funkcji korelacji. Wkład pochodzący od dwucząstkowej funkcji korelacji wynosi $\frac{1}{2} k_B N$, od trójcząstkowej $\frac{1}{6} k_B N$, od czterocząstkowej $\frac{1}{12} k_B N$ itd., wszystkie razem sumują się do $k_B N$. Dla przykładu przedstawię sposób obliczenia wkładu pochodzącego od funkcji dwucząstkowej.

Wykorzystując równania (4.48) i (4.49), jeżeli energia potencjalna oddziaływań pomiędzy cząstkami wynosi 0 ($U=0$, jak musi być w przypadku gazu doskonałego), wówczas ogólny wzór na funkcję $g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n)$ otrzymamy w poniższy sposób:

$$\begin{aligned}
f_N^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) &= \frac{N!}{(N-n)!} \sigma^n \int \frac{e^{-0/kT}}{\int e^{-0/kT} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N} d\mathbf{q}^{N-n} d\boldsymbol{\omega}^{N-n} = \\
&= \frac{N!}{(N-n)!} \sigma^n \frac{1}{V^n \Omega^n}
\end{aligned} \tag{4.71}$$

Podstawiamy teraz (4.71) do wzoru (4.56) na $g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n)$, otrzymując po uproszczeniu:

$$g^{(n)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n) = \frac{N!}{(N-n)! N^n} \tag{4.72}$$

Zależność ową podstawiamy do tego fragmentu wzoru na entropię (4.70), który zawiera dwucząstkową funkcję korelacji i obliczymy granicę tego wyrażenia dla nieskończenie dużej liczby cząstek:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} \left(-\frac{k_B}{2! \Omega^2} \left(\frac{N}{V} \right)^2 \int \frac{N!}{(N-2)! N^2} \ln \frac{N!}{(N-2)! N^2} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 \right) = \frac{1}{2} k_B N \tag{4.73}$$

Zatem, chcąc przedstawić entropię układu złożonego z N cząstek w postaci sumy entropii gazu doskonałego (s^{id}) i wkładów pochodzących od oddziaływań n -cząstkowych ($s^{(n)}$, $n = 2, 3, \dots, N$), napiszemy:

$$S_N = s^{id} + s^{(2)} + s^{(3)} + \dots + s^{(n)} + \dots + s^{(N)} = s^{id} + s^{exc} \tag{4.74}$$

Należy pamiętać aby, korzystając z poszczególnych składników sumy w równaniu (4.70), od odpowiednich wzorów odjąć wkłady, które już są uwzględnione poprzez wprowadzenie członu s^{id} . Zatem wkład dwucząstkowy $s^{(2)}$ w tej konwencji zapisu będzie równy:

$$\begin{aligned}
s^{(2)} &= -\frac{k_B}{2! \Omega^2} \left(\frac{N}{V} \right)^2 \int g^{(2)} \ln g^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 - \frac{1}{2} k_B N = \\
&= -\frac{k_B}{2! \Omega^2} \left(\frac{N}{V} \right)^2 \int [g^{(2)} \ln g^{(2)} - g^{(2)} + 1] d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2
\end{aligned} \tag{4.75}$$

Jak widać, człon dwucząstkowy jest ujemny i oddaje zmniejszenie entropii w wyniku korelacji położeń cząsteczek. Im wyraźniejsza jest ta korelacja, tym entropia jest mniejsza.

Praktyczne zastosowanie równania (4.70) w jego pełnej postaci ograniczone jest problemem obliczeniowym, jako że obliczenia korelacji więcej niż dwucząstkowych jest trudne lub niemożliwe do przeprowadzenia (z uwagi na powolną zbieżność). Zatem w praktyce wkłady pochodzące od oddziaływań wyższego rzędu są pomijane. Nie powoduje to dużej straty jakości obliczeń, ponieważ uważa się, że przy nie za dużych gęstościach oraz daleko od punktu krytycznego lub stanu zamarzania około 85% lub więcej informacji dotyczącej struktury cieczy jest zawarta w dwucząstkowych funkcjach korelacji, jak omówiono w części literaturowej (125). Wkłady pochodzące od oddziaływań wyższego rzędu niż trójcząstkowe są zanedbywalnie małe.

Stąd wyrażenie na entropię układu N cząstek w tak zwanym przybliżeniu dwucząstkowym przyjmuje postać:

$$S_N \cong s^{id} + s^{(2)} \tag{4.76}$$

Podział entropii na część translacyjną i orientacyjną

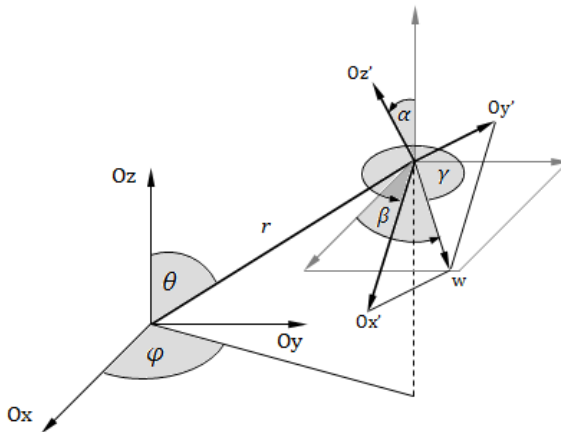
Funkcję $g^{(2)}(\mathbf{q}_1, \mathbf{q}_2, \boldsymbol{\omega}_1, \boldsymbol{\omega}_2)$ zależną od sześciu współrzędnych położenia i sześciu kątów określających orientację można w przypadku jednorodnej, izotropowej cieczy zastąpić funkcją $g^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega})$, gdzie r jest odległością pomiędzy cząsteczkami, $\mathbf{v} = (\varphi, \theta)$ są współrzędnymi kątowymi opisującymi położenie środka masy cząstki w stosunku do środka masy cząstki centralnej w sferycznym układzie współrzędnych o początku w środku masy cząsteczki centralnej, natomiast kąty $\boldsymbol{\omega} = (\alpha, \beta, \gamma)$ są kątami opisującymi orientację przestrzenną cząstki w stosunku do cząstki centralnej. Założenie o izotropowości oznacza, że dla dowolnie wybranej cząsteczki centralnej jej otoczenie będzie takie samo. Funkcję $g^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega})$ można rozłożyć na czynniki zależne od odległości, kątów sferycznych i orientacji. W celu określenia r , \mathbf{v} i $\boldsymbol{\omega}$ należało skorzystać z wewnętrznych układów współrzędnych związanego z cząsteczkami wody (**Rys. 4.10**).

Dzięki temu można było określić wzajemne położenie dwóch cząsteczek, znając wzajemne położenie dwóch układów współrzędnych (**Rys. 4.12**). Zakres zmienności kątów wynosi:

$$\begin{aligned} 0 \leq \varphi < 2\pi & & 0 \leq \alpha < \pi \\ 0 \leq \theta < \pi & & 0 \leq \beta < 2\pi \\ & & 0 \leq \gamma < 2\pi \end{aligned}$$

Ponadto wprowadzam oznaczenia:

$$\begin{aligned} \Omega &= \int d\boldsymbol{\omega} = \int_{\alpha=0}^{\pi} \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{\gamma=0}^{2\pi} \sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma = 8\pi^2 \\ \Upsilon &= \int d\mathbf{v} = \int_{\theta=0}^{\pi} \int_{\varphi=0}^{2\pi} \sin\theta d\theta d\varphi = 4\pi \end{aligned} \quad (4.77)$$



Rys. 4.12. Sposób definiowania współrzędnych, od których zależy wartość funkcji $g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$.

Funkcję $g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ można wyrazić jako iloczyn dwóch prawdopodobieństw (wychodząc z jej definicji):

$$g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) = \frac{dw'(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)}{dw(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)} \quad (4.78)$$

$dw(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ – prawdopodobieństwo znalezienia drugiej cząstki w stosunku do centralnej w określonej pozycji opisanej parametrami $r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma$ (przy założeniu braku korelacji położenia cząstek)

$dw'(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ – prawdopodobieństwo znalezienia drugiej cząstki w stosunku do centralnej w określonej pozycji opisanej parametrami $r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma$ (przy uwzględnieniu korelacji położenia)

Prawdopodobieństwo $dw(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ można wyrazić jako iloczyn dwóch prawdopodobieństw. Pierwsze z nich dotyczy prawdopodobieństwa, że znajdziemy cząstkę w określonym elemencie objętości i obliczamy je jako iloraz tego elementu objętości $dV(r, \varphi, \theta)$ przez całkowitą objętość układu. Drugie natomiast jest ilorazem elementu „objętości” przestrzeni kątów $d\omega(\alpha, \beta, \gamma)$, w którym chcemy znaleźć cząstkę, przez całkowitą „objętość” przestrzeni kątów.

$$dw(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) = \frac{dV(r, \varphi, \theta)}{V} \frac{d\omega(\alpha, \beta, \gamma)}{\Omega} \quad (4.79)$$

Prawdopodobieństwo $dw'(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ można wyrazić, zgodnie z definicją prawdopodobieństwa, jako stosunek liczby cząstek $dN(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ znajdujących w otoczeniu „punktu” o współrzędnych $(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ w stosunku do całkowitej liczby cząstek (z wyjątkiem centralnej):

$$dw'(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) = \frac{dN(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)}{N - 1} \quad (4.80)$$

Zatem (zakładając, że $N - 1 \cong N$) otrzymujemy:

$$\begin{aligned}
g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) &= \frac{dN(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)}{N} \frac{V}{dV(r, \varphi, \theta)} \frac{\Omega}{d\omega(\alpha, \beta, \gamma)} = \\
&= \frac{dN(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)}{Nr^2 dr} \frac{V}{\sin\theta d\theta d\varphi} \frac{\Omega}{\sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma} = \\
&= \frac{V}{N} \frac{dN(r)}{4\pi r^2 dr} \cdot \frac{4\pi}{dN(r)} \frac{dN(\varphi, \theta|r)}{\sin\theta d\theta d\varphi} \cdot \frac{\Omega}{dN(\varphi, \theta|r)} \frac{dN(\alpha, \beta, \gamma|r, \varphi, \theta)}{\sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma} \quad (4.81)
\end{aligned}$$

$dN(\varphi, \theta|r)$ - ilość cząstek znajdujących w kierunku opisywanym kątami φ, θ w stosunku do cząsteczki centralnej w przedziale $(\mathbf{u}, \mathbf{u} + d\mathbf{u})$ przy założeniu, że znajdują się w przedziale odległości $(r, r + dr)$

$dN(\alpha, \beta, \gamma|r, \varphi, \theta)$ - ilość cząstek przyjmujących orientacje opisywane kątami α, β, γ w stosunku do cząsteczki centralnej w przedziale $(\omega, \omega + d\omega)$ przy założeniu, że znajdują się w przedziale odległości $(r, r + dr)$ i w kierunku opisywanym kątami φ, θ w stosunku do cząsteczki centralnej w przedziale $(\mathbf{u}, \mathbf{u} + d\mathbf{u})$

Po uwzględnieniu opisanych przekształceń, można rozpisać funkcję $g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ jako iloczyn trzech czynników:

$$g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) = g_r^{(2)}(r) \cdot g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r) \cdot g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \varphi, \theta) \quad (4.82)$$

Pierwszy z czynników, translacyjny $g_r^{(2)}(r)$, jest funkcją rozkładu radialnego, czyli jest miarą prawdopodobieństwa znalezienia cząstki w odległości r od cząstki centralnej w stosunku do sytuacji, gdy brak jest wszelkich korelacji odległości pomiędzy cząstkami.

Drugi z czynników, konfiguracyjny $g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r)$, jest równy prawdopodobieństwu znalezienia cząstki w kierunku określonym przez kąty φ, θ podzielonym przez prawdopodobieństwo dotyczące sytuacji, gdy brak jest korelacji położeń opisywanych kątami φ, θ , czyli wszystkie wartości kątów φ, θ są tak samo prawdopodobne.

$$g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta|r) = \frac{dw'(r, \varphi, \theta)}{dw(r)} \quad (4.83)$$

Trzeci z czynników, orientacyjny $g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \varphi, \theta)$, jest równy prawdopodobieństwu znalezienia cząstki o określonej orientacji opisanej przez kąty α, β, γ podzielonym przez prawdopodobieństwo dotyczące sytuacji, gdy brak jest korelacji orientacyjnej, czyli wszystkie orientacje są tak samo prawdopodobne.

$$g_{orient}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma|r, \varphi, \theta) = \frac{dw'(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)}{dw(r, \varphi, \theta)} \quad (4.84)$$

Teraz można rozłożoną na czynniki funkcję $g^{(2)}(r, \mathbf{u}, \omega)$ podstawić do wzoru na dwucząstkowy wkład do entropii. Stała przed całką zmienia się w rezultacie pomnożenia przez czynnik $V\Omega$, którego pojawienie się jest wynikiem całkowania po nieużywanych już trzech współrzędnych położenia i trzech kątach określających orientację, natomiast $d\mathbf{q}$ zamienia się na $r^2 dr d\mathbf{v}$:

$$s^{(2)} = -\frac{k_B}{2! \Omega^2} \left(\frac{N}{V}\right)^2 \int [g^{(2)}(\mathbf{q}^2, \omega^2) \ln g^{(2)}(\mathbf{q}^2, \omega^2) - g^{(2)}(\mathbf{q}^2, \omega^2) + 1] d\mathbf{q}^2 d\omega^2 =$$

$$= -\frac{k_B N N}{2! \Omega V} \int [g^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega}) \ln g^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega}) - g^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega}) + 1] r^2 dr d\mathbf{v} d\boldsymbol{\omega} \quad (4.85)$$

Podstawiając zależność (4.82):

$$s^{(2)} = -\frac{k_B N N}{2! \Omega V} \int [g_r^{(2)}(r) \cdot g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \cdot g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}) \cdot \ln (g_r^{(2)}(r) \cdot g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \cdot g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v})) + -g_r^{(2)}(r) \cdot g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \cdot g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}) + 1] r^2 dr d\mathbf{v} d\boldsymbol{\omega} \quad (4.86)$$

Całkę można rozpisać na sumę trzech całek, a następnie wzór uprościć korzystając z tego, iż funkcje $g_r^{(2)}$, $g_{conf}^{(2)}$, $g_{orient}^{(2)}$ spełniają następujące warunki normalizacyjne:

$$\begin{aligned} \frac{1}{V} \int g_r^{(2)}(r) dV &= 1 \\ \frac{1}{Y} \int g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) d\mathbf{v} &= 1 \\ \frac{1}{\Omega} \int g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}) d\boldsymbol{\omega} &= 1 \end{aligned} \quad (4.87)$$

Zatem:

$$\begin{aligned} s^{(2)} &= -\frac{k_B N N}{2! V} \int [g_r^{(2)}(r) \cdot \ln (g_r^{(2)}(r)) - g_r^{(2)}(r) + 1] 4\pi r^2 dr + \\ &- \frac{k_B N N}{2! V} \int [g_r^{(2)}(r) \cdot g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \cdot \ln (g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r))] r^2 dr d\mathbf{v} + \\ &- \frac{k_B N N}{2! \Omega V} \int [g_r^{(2)}(r) \cdot g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \cdot g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}) \cdot \ln (g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}))] r^2 dr d\mathbf{v} d\boldsymbol{\omega} \end{aligned} \quad (4.88)$$

Można teraz wskazać trzy składniki sumy składające się na $s^{(2)}$, związane odpowiednio z entropią translacyjną $s_{trans}^{(2)}$ (zależną jedynie od odległości cząsteczek) oraz konfiguracyjną $s_{conf}^{(2)}$ i orientacyjną $s_{orient}^{(2)}$ (obie zależą nie tylko od odpowiednich kątów, ale także od odległości cząsteczek):

$$s_{trans}^{(2)} = -\frac{k_B N \rho}{2!} \int [g_r^{(2)}(r) \ln (g_r^{(2)}(r)) - g_r^{(2)}(r) + 1] 4\pi r^2 dr \quad (4.89)$$

$$s_{conf}^{(2)} = -\frac{k_B N \rho}{2!} \int \left[\frac{g_r^{(2)}(r)}{Y} \int g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \ln (g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r)) d\mathbf{v} \right] 4\pi r^2 dr \quad (4.90)$$

$$\begin{aligned} s_{orient}^{(2)} &= -\frac{k_B N \rho}{2!} \int \left[\frac{g_r^{(2)}(r)}{Y \Omega} \int g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}) \ln (g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v})) d\mathbf{v} d\boldsymbol{\omega} \right] 4\pi r^2 dr \end{aligned} \quad (4.91)$$

Ostatecznie można więc napisać:

$$s^{(2)} = s_{trans}^{(2)} + s_{conf}^{(2)} + s_{orient}^{(2)} \quad (4.92)$$

Układ dwuskładnikowy

Jeżeli analizujemy układ dwuskładnikowy, na przykład składający się z wody i cząsteczki białka, należy zmodyfikować otrzymane równania. Zastosowane w tej sekcji symbole będą użyte w tym samym ogólnym znaczeniu co w sekcji dotyczącej układu jednoskładnikowego, ale teraz będą dotyczyły mieszaniny. W przypadku układu dwuskładnikowego, będzie można dokonać podziału na człony pochodzące od poszczególnych składników. Wynika to z faktu, że energia całkowita jest sumą energii wzajemnych oddziaływań AA , BB i AB .

Załóżmy, że mamy układ składający się z dwóch rodzajów cząstek, A i B, całkowita liczba cząstek wynosi $N=N_A+N_B$. Wówczas suma statystyczna będzie w postaci:

$$Q = \frac{1}{h^{6N} N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int e^{-E/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \quad (4.93)$$

Gęstość prawdopodobieństwa $P'_{T,N}$ dotycząca wszystkich N cząstek, analogiczne do gęstości prawdopodobieństwa (4.44) wynosi:

$$P'_{T,N} = \frac{e^{-E/k_B T}}{\frac{1}{h^{6N} N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int e^{-E/k_B T} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N} \quad (4.94)$$

Symbol $d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N$ i oznacza w tym kontekście całkowanie po współrzędnych, pędach, orientacjach i momentach pędów wszystkich cząstek A i B (np. $d\mathbf{q}^N = d\mathbf{q}^{N_A} d\mathbf{q}^{N_B}$).

Funkcja f_N będzie teraz w postaci:

$$f_N = N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B} P_N = \frac{P'_N}{h^{6N}} \quad (4.95)$$

Funkcja $f_N^{(n,m)}$ tym razem określa gęstość prawdopodobieństwa, że n cząstek A znajdzie się w położeniu $(\mathbf{q}_{A,1}, \mathbf{q}_{A,2}, \dots, \mathbf{q}_{A,n})$ i m cząstek B znajdzie się w położeniu $(\mathbf{q}_{B,1}, \mathbf{q}_{B,2}, \dots, \mathbf{q}_{B,m})$ oraz w orientacjach $(\boldsymbol{\omega}_{A,1}, \boldsymbol{\omega}_{A,2}, \dots, \boldsymbol{\omega}_{A,n})$ i $(\boldsymbol{\omega}_{B,1}, \boldsymbol{\omega}_{B,2}, \dots, \boldsymbol{\omega}_{B,m})$.

$$\begin{aligned} f_N^{(n,m)} &= \frac{N_A! N_B!}{(N_A - n)! (N_B - m)!} \sigma_A^n \sigma_B^m \int P_N d\mathbf{q}^{N-(n+m)} d\boldsymbol{\omega}^{N-(n+m)} = \\ &= \frac{1}{(N_A - n)! (N_B - m)! \sigma_A^{N_A-n} \sigma_B^{N_B-m}} \int f_N d\mathbf{q}^{N-(n+m)} d\boldsymbol{\omega}^{N-(n+m)} \end{aligned} \quad (4.96)$$

Funkcja $f_N^{(n,m)}$ spełnia warunek normalizacyjny w postaci:

$$\int f_N^{(n,m)}(\mathbf{q}^n, \boldsymbol{\omega}^n, \mathbf{q}^m, \boldsymbol{\omega}^m) d\mathbf{q}^n d\boldsymbol{\omega}^n d\mathbf{q}^m d\boldsymbol{\omega}^m = \frac{N_A! N_B!}{(N_A - n)! (N_B - m)!} \sigma_A^n \sigma_B^m \quad (4.97)$$

Analogicznie jak w przypadku (4.54), mamy:

$$f_N(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) = [f_{N_A}^{(1)}(\mathbf{q}_A, \boldsymbol{\omega}_A)]^{N_A} [f_{N_B}^{(1)}(\mathbf{q}_B, \boldsymbol{\omega}_B)]^{N_B} g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) \quad (4.98)$$

Do uproszczenia tego równania możemy wykorzystać zależność (4.53), podstawiając do tego wzoru raz liczby cząstek, gęstość i σ dla składnika A, a następnie dla składnika B:

$$f_N(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) = \left(\rho_A \frac{\sigma_A}{\Omega}\right)^{N_A} \left(\rho_B \frac{\sigma_B}{\Omega}\right)^{N_B} g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) \quad (4.99)$$

Podobnie jak w przypadku (4.60), rozkładamy funkcję $g^{(N)}$ na iloczyn, uwzględniając dodatkowe korelacje pomiędzy cząstkami składnika A i B.

$$g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) = [g_{AA}^{(2)}]^{N_A} \cdot [g_{BB}^{(2)}]^{N_B} \cdot [g_{AB}^{(2)}]^{N_A N_B} \cdot [\delta g_{AAA}^{(3)}]^{N_A} \cdot [\delta g_{AAB}^{(3)}]^{N_A N_B} \cdot [\delta g_{ABB}^{(3)}]^{N_A N_B} \cdot [\delta g_{BBB}^{(3)}]^{N_B} \cdot [\delta g_{AAA}^{(4)}]^{N_A} \cdot \dots \cdot \delta g^{(N)} \quad (4.100)$$

Po obustronnym zlogarytmowaniu:

$$\begin{aligned} \ln g^{(N)}(\mathbf{q}^N, \boldsymbol{\omega}^N) &= \binom{N_A}{2} \ln g_{AA}^{(2)} + \binom{N_B}{2} \ln g_{BB}^{(2)} + N_A N_B \ln g_{AB}^{(2)} + \binom{N_A}{3} \ln \delta g_{AAA}^{(3)} + \\ &+ \binom{N_A}{2} N_B \ln \delta g_{AAB}^{(3)} + N_A \binom{N_B}{2} \ln \delta g_{ABB}^{(3)} + \binom{N_B}{3} \ln \delta g_{BBB}^{(3)} + \\ &+ \binom{N_A}{4} \ln \delta g_{AAA}^{(4)} + \dots + \ln \delta g^{(N)} \end{aligned} \quad (4.101)$$

Podobnie jak w przypadku (4.62), otrzymujemy:

$$\ln f_N = N_A \ln f_{N_A}^{(1)} + N_B \ln f_{N_B}^{(1)} + \ln g^{(N)} \quad (4.102)$$

Analogicznie jak poprzednio można teraz rozłożyć entropię na części pochodzące od wkładów jednocząstkowych, dwucząstkowych itd.

Wzór na entropię będzie teraz w postaci:

$$S_N = \frac{-k_B}{h^{6N} N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int P'_{T,N} \ln P'_{T,N} d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \quad (4.103)$$

Po wykorzystaniu faktu, że $P'_{T,N}$ i P_N są powiązane zależnością $P'_{T,N} = N_A! N_B! \cdot \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B} \cdot \lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B} \cdot e^{-E_{trans}/k_B T} e^{-E_{rot}/k_B T} P_N$, otrzymamy:

$$\begin{aligned} S_N &= \frac{-k_B}{h^{6N} N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B} \lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B} \cdot \\ &\cdot \frac{e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot f_N}{N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \ln(N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B} \lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B} \\ &\cdot \frac{e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot f_N}{N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}}) d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N = \\ &= \frac{-k_B \lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B}}{h^{6N} N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int e^{-E_{trans}/k_B T} \cdot e^{-E_{rot}/k_B T} \cdot f_N \cdot \\ &\cdot \left[\ln(\lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B}) - \frac{E_{trans}}{k_B T} - \frac{E_{rot}}{k_B T} + \ln f_N \right] d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \end{aligned} \quad (4.104)$$

gdzie dokonałam podstawienia: $\lambda_{trans} = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}}$

$$\lambda_{rot} = \frac{h}{\sqrt{2\pi I_x k_B T}} \cdot \frac{h}{\sqrt{2\pi I_y k_B T}} \cdot \frac{h}{\sqrt{2\pi I_z k_B T}}$$

m – masą cząstki A lub B

I_x, I_y, I_z – główne momenty bezwładności cząstki A lub B

Tak jak poprzednio, rozkładamy całkę na sumę czterech całek i obliczamy każdą z nich osobno. Tym razem skorzystamy z warunku, że:

$$\int f_N d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N = N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B} \quad (4.105)$$

Po przeprowadzeniu obliczeń i zsumowaniu wyników otrzymujemy:

$$S_N = 3k_B(N_A + N_B) - k_B \ln(\lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B}) + \\ - \frac{k_B}{N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int f_N \ln f_N d\mathbf{q}^N d\mathbf{p}^N d\boldsymbol{\omega}^N d\mathbf{J}^N \quad (4.106)$$

Dla uproszczenia zapisu podstawiam:

$$S_0 = 3k_B(N_A + N_B) - k_B \ln(\lambda_{A,trans}^{3N_A} \lambda_{B,trans}^{3N_B} \lambda_{A,rot}^{N_A} \lambda_{B,rot}^{N_B}) \quad (4.107)$$

Po podstawieniu do (4.106) zależności (4.101) i (4.102) otrzymujemy:

$$S_N = S_0 - \frac{k_B}{N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int f_N \left[N_A \ln f_{N_A}^{(1)} + N_B \ln f_{N_B}^{(1)} + \binom{N_A}{2} \ln g_{AA}^{(2)} + \binom{N_B}{2} \ln g_{BB}^{(2)} \right. \\ \left. + N_A N_B \ln g_{AB}^{(2)} + \binom{N_A}{3} \ln \delta g_{AAA}^{(3)} + \binom{N_A}{2} N_B \ln \delta g_{AAB}^{(3)} + N_A \binom{N_B}{2} \ln \delta g_{ABB}^{(3)} + \right. \\ \left. + \binom{N_B}{3} \ln \delta g_{BBB}^{(3)} + \binom{N_A}{4} \ln \delta g_{AAAA}^{(4)} + \dots + \ln \delta g^{(N)} \right] d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.108)$$

Całkę z tej sumy można rozłożyć na sumę całek, a następnie, korzystając ze wzoru (4.96), można przekształcić tę sumę do postaci:

$$S_N = S_0 - \frac{k_B}{1! \sigma_A} \int f_{N_A}^{(1)} \ln f_{N_A}^{(1)} d\mathbf{q} d\boldsymbol{\omega} - \frac{k_B}{1! \sigma_B} \int f_{N_B}^{(1)} \ln f_{N_B}^{(1)} d\mathbf{q} d\boldsymbol{\omega} + \\ - \frac{k_B}{2! \sigma_A^2} \int f_{N_A}^{(2)} \ln g_{AA}^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 - \frac{k_B}{2! \sigma_B^2} \int f_{N_B}^{(2)} \ln g_{BB}^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 + \\ - \frac{k_B}{\sigma_A \sigma_B} \int f_N^{(1,1)} \ln g_{AB}^{(2)} d\mathbf{q}_A d\boldsymbol{\omega}_A d\mathbf{q}_B d\boldsymbol{\omega}_B - \frac{k_B}{3! \sigma_A^3} \int f_{N_A}^{(3)} \ln \delta g_{AAA}^{(3)} d\mathbf{q}^3 d\boldsymbol{\omega}^3 + \\ - \dots - \frac{k_B}{N_A! N_B! \sigma_A^{N_A} \sigma_B^{N_B}} \int f_N \ln \delta g^{(N)} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.109)$$

Jeżeli dodatkowo skorzystamy z zależności (4.53), to po paru przekształceniach dojdziemy do postaci:

$$S_N = 3k_B(N_A + N_B) - k_B \left[N_A \ln \left(\lambda_{A,trans}^3 \lambda_{A,rot} \rho_A \frac{\sigma_A}{\Omega} \right) + N_B \ln \left(\lambda_{B,trans}^3 \lambda_{B,rot} \rho_B \frac{\sigma_B}{\Omega} \right) \right] \\ - \frac{k_B}{2! \Omega^2} \rho_A^2 \int g_{A,A}^{(2)} \ln g_{A,A}^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 - \frac{k_B}{2! \Omega^2} \rho_B^2 \int g_{B,B}^{(2)} \ln g_{B,B}^{(2)} d\mathbf{q}^2 d\boldsymbol{\omega}^2 + \\ - \frac{k_B}{\Omega^2} \rho_A \rho_B \int g_{A,B}^{(2)} \ln g_{A,B}^{(2)} d\mathbf{q}_A d\boldsymbol{\omega}_A d\mathbf{q}_B d\boldsymbol{\omega}_B - \frac{k_B}{3! \Omega^3} \rho_A^3 \int g_{A,A,A}^{(3)} \ln \delta g_{A,A,A}^{(3)} d\mathbf{q}^3 d\boldsymbol{\omega}^3 + \\ - \dots - \frac{k_B}{N_A! N_B! \Omega^N} \rho_A^{N_A} \rho_B^{N_B} \int g^{(N)} \ln \delta g^{(N)} d\mathbf{q}^N d\boldsymbol{\omega}^N \quad (4.110)$$

Jak można zauważyć, w powyższym wzorze są człony zawierające funkcje korelacji dla samego składnika A, dla samego składnika B oraz funkcje uwzględniające korelacje pomiędzy cząstkami składników A i B.

Po ominięciu członów związanych z korelacjami wyższego rzędu niż dwucząstkowe oraz po uwzględnieniu różnicy pomiędzy fragmentem wzoru niezależnym od korelacji wielocząstkowych a s^{id} , możemy napisać przybliżony wzór na entropię dla układu dwuskładnikowego składającego się z N_W cząsteczek wody i N_P cząsteczek białka:

$$S_N \cong s^{id} + s_{PP}^{(2)} + s_{PW}^{(2)} + s_{WW}^{(2)} \quad (4.111)$$

Człon s^{id} jest równy:

$$\begin{aligned} s^{id} &= N_P s_P^{id} + N_W s_W^{id} = \\ &= N_P k_B \left[4 + \ln \left(\frac{\rho_P \sigma_P}{\Omega} \lambda_{P,trans}^3 \lambda_{P,rot} \right) \right] + N_W k_B \left[4 + \ln \left(\frac{\rho_W \sigma_W}{\Omega} \lambda_{W,trans}^3 \lambda_{W,rot} \right) \right] \end{aligned} \quad (4.112)$$

$\rho_P = N_P/V$ - gęstość liczbowa białka

$\rho_W = N_W/V$ - gęstość liczbowa wody

$\sigma_P = 1$ - liczba symetrii dla białka

$\sigma_W = 2$ - liczba symetrii dla wody

$\lambda_{trans} = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}}$, m jest masą cząsteczki białka lub wody

$\lambda_{rot} = \left(\frac{h}{\sqrt{2\pi k_B I}} \right)^3 \cdot \frac{1}{\sqrt{I_x I_y I_z}}$, $I_x I_y I_z$ są głównymi momentami bezwładności cząsteczki białka lub wody

Składnik odnoszący się do oddziaływań białko-białko (poza obszarem zainteresowań tej pracy) jest równy:

$$s_{PP}^{(2)} = -\frac{\rho_P^2}{2! \Omega^2} k_B \int \left\{ g_{PP}^{(2)}(\mathbf{r}_P^2, \boldsymbol{\omega}_P^2) \ln [g_{PP}^{(2)}(\mathbf{r}_P^2, \boldsymbol{\omega}_P^2)] - g_{PP}^{(2)}(\mathbf{r}_P^2, \boldsymbol{\omega}_P^2) + 1 \right\} d\mathbf{r}_P^2 d\boldsymbol{\omega}_P^2 \quad (4.113)$$

Składnik odnoszący się do oddziaływań białko-woda, zależny od dwunastu zmiennych (poza obszarem zainteresowań tej pracy) jest równy:

$$\begin{aligned} s_{PW}^{(2)} &= -\frac{\rho_P \rho_W}{\Omega^2} k_B \int \left\{ g_{PW}^{(2)}(\mathbf{r}_P, \mathbf{r}_W, \boldsymbol{\omega}_P, \boldsymbol{\omega}_W) \ln [g_{PW}^{(2)}(\mathbf{r}_P, \mathbf{r}_W, \boldsymbol{\omega}_P, \boldsymbol{\omega}_W)] \right. \\ &\quad \left. - g_{PW}^{(2)}(\mathbf{r}_P, \mathbf{r}_W, \boldsymbol{\omega}_P, \boldsymbol{\omega}_W) + 1 \right\} d\mathbf{r}_P d\mathbf{r}_W d\boldsymbol{\omega}_P d\boldsymbol{\omega}_W \end{aligned} \quad (4.114)$$

Składnik odnoszący się do oddziaływań woda-woda (zależny w pobliżu białka od dwunastu zmiennych) jest równy:

$$\begin{aligned} s_{WW}^{(2)} &= -\frac{\rho_W^2}{2! \Omega^2} k_B \int \left\{ g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \boldsymbol{\omega}_{W1}, \boldsymbol{\omega}_{W2}) \ln [g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \boldsymbol{\omega}_{W1}, \boldsymbol{\omega}_{W2})] \right. \\ &\quad \left. - g_{WW}^{(2)}(\mathbf{r}_{W1}, \mathbf{r}_{W2}, \boldsymbol{\omega}_{W1}, \boldsymbol{\omega}_{W2}) + 1 \right\} d\mathbf{r}_{W1} d\mathbf{r}_{W2} d\boldsymbol{\omega}_{W1} d\boldsymbol{\omega}_{W2} \end{aligned} \quad (4.115)$$

W tym wyrażeniu funkcja $g_{WW}^{(2)}$ zależy od dwunastu zmiennych, co powoduje, że obliczenie całki zawartej we wzorze jest bardzo trudne. Stąd należało dokonać pewnych założeń użytecznych z obliczeniowego punktu widzenia.

Bierzemy pod uwagę cząsteczki wody obecne w pobliżu białka (w przybliżeniu dwie warstwy solwatacyjne), które stanowią zbiór cząstek centralnych i zakładamy, że układ jest jednorodny, zdając sobie sprawę, że założenie to jest pod pewnym względem nieco problematyczne. Teraz można

przejsć do wyrażenia dwucząstkowych funkcji korelacji jako funkcji wzajemnej odległości i orientacji cząsteczek wody, dokonując następnie rozłożenia $s_{WW}^{(2)}$ na człony translacyjny, konfiguracyjny i orientacyjny. Analogicznie jak w przypadku wzoru (4.85):

$$s_{WW}^{(2)} = -N_W k_B \frac{\rho_W}{2! \Omega_2} \int \left\{ g_{WW}^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega}) \ln [g_{WW}^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega})] - g_{WW}^{(2)}(r, \mathbf{v}, \boldsymbol{\omega}) + 1 \right\} r^2 dr d\mathbf{v} d\boldsymbol{\omega} \quad (4.116)$$

Ponieważ, jak wspomniano w części literaturowej, najbardziej znaczący wkład do entropii pochodzi od pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej cząsteczki wody, wykorzystamy tę informację w celu zdefiniowania parametrów uporządkowania opartych na dwucząstkowych funkcjach korelacji. Funkcja $s_{WW}^{(2)}(r)$ może służyć jako pewna miara średniego uporządkowania strukturalnego wody z pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej wokół cząsteczki wody, jeżeli taki zakres odległości r wybrany zostanie podczas obliczeń.

Ponieważ $g_{WW}^{(2)}$ można przedstawić w postaci iloczynu trzech czynników (translacyjnego, konfiguracyjnego i orientacyjnego), zatem otrzymujemy:

$$s_{WW}^{(2)}(r) = s_{WW,trans}^{(2)}(r) + s_{WW,conf}^{(2)}(r) + s_{WW,orient}^{(2)}(r) \quad (4.117)$$

$$s_{WW,trans}^{(2)}(r) = -N_W k_B \frac{\rho_W}{2!} \int_0^r \left[g_r^{(2)}(r) \ln (g_r^{(2)}(r)) - g_r^{(2)}(r) + 1 \right] 4\pi r^2 dr \quad (4.118)$$

$$s_{WW,conf}^{(2)}(r) = -N_W k_B \frac{\rho_W}{2!} \int_0^r \left[\frac{g_r^{(2)}(r)}{Y} \int g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) \ln (g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r)) d\mathbf{v} \right] 4\pi r^2 dr \quad (4.119)$$

$$s_{WW,orient}^{(2)}(r) = -N_W k_B \frac{\rho_W}{2!} \int_0^r \left[\frac{g_r^{(2)}(r)}{Y\Omega} \int g_{conf}^{(2)}(\mathbf{v}|r) g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v}) \ln (g_{orient}^{(2)}(\boldsymbol{\omega}|r, \mathbf{v})) d\mathbf{v} d\boldsymbol{\omega} \right] 4\pi r^2 dr \quad (4.120)$$

Trzy parametry uporządkowania będą równe:

$$\begin{aligned} s_{trans} &= \frac{s_{WW,trans}^{(2)}(r)}{N_W} \\ s_{conf} &= \frac{s_{WW,conf}^{(2)}(r)}{N_W} \\ s_{orient} &= \frac{s_{WW,orient}^{(2)}(r)}{N_W} \end{aligned} \quad (4.121)$$

Parametr mierzący całkowite uporządkowanie strukturalne będzie równy:

$$S_{ort} = S_{conf} + S_{orient} \quad (4.122)$$

W tym kontekście N_W oznacza ilość cząsteczek wody znajdującą w analizowanym obszarze. Przy obliczeniach przyjęto, że zakres obliczeń wynosi $r=0,58$ nm (czyli w przybliżeniu dwie warstwy solwatacyjne) z krokiem $0,02$ nm oraz z krokiem 10° dla kątów. Jak omówiono w części literaturowej, główny i największy wpływ na wynik obliczeń mają dwie pierwsze warstwy solwatacyjne cząsteczki wody.

Osobnym problemem jest zbieżność uzyskanych wyników. Znalezione empiryczną funkcję w postaci (65):

$$s^{(2)}(t) = s_\infty - \frac{A}{B + \sqrt{t}(\ln t + C)} \quad (4.123)$$

Za pomocą tej funkcji, dysponując kolejnymi punktami obliczonymi dla coraz dłuższych trajektorii, można przybliżyć wartość $s^{(2)}$ dla przypadku nieskończenie długiej symulacji ($t \rightarrow \infty$). Wartość tę oznacza symbol s_∞ . Z kolei A , B i C są stałymi otrzymanymi w wyniku dopasowania parametrów równania do punktów pomiarowych metodą najmniejszych kwadratów.

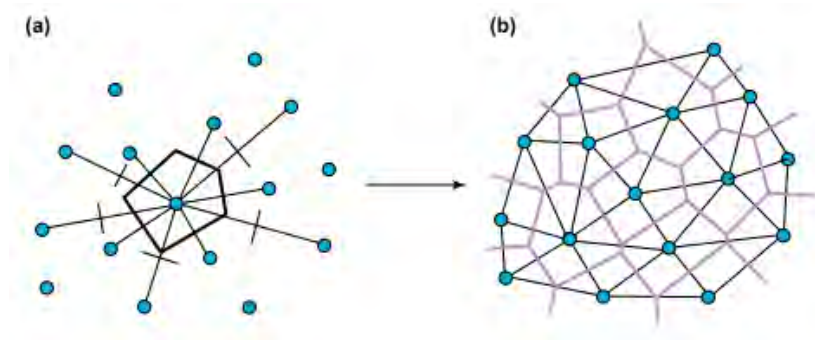
Należy jeszcze raz zaznaczyć, że obliczanych wartości parametrów nie można utożsamiać z entropią absolutną. Wszystkie parametry obliczane są nie dla całości układu i nie dla wszystkich cząsteczek wody, ale tylko dla tych obecnych w wybranej warstwie solwatacyjnej.

4.4.9. Podział przestrzeni na wielościany Voronia

Metoda Voronia jest sposobem podziału przestrzeni zawierającej pewien zbiór punktów na wielościany. Punkt może w sposób symboliczny reprezentować atom, fragment cząsteczki (np. grupę chemiczną, aminokwas itp.) lub całą cząsteczkę – w zależności od potrzeb. Kształty i rozmiary poszczególnych wielościanów zależą od rozmieszczenia owych punktów.

Każdy wielościan konstruowany jest dookoła jednego punktu centralnego i zawiera w sobie ten fragment przestrzeni, który jest bliżej tego punktu niż jakiegokolwiek innego w danym zbiorze. Pomiedzy wielościanami nie pozostawia się przestrzeni pustych.

Aby utworzyć wielościan Voronia, należy wybrany punkt połączyć odcinkami z pozostałymi, a następnie znaleźć płaszczyzny, które są przecinane przez odcinek pod kątem prostym i które położone są dokładnie w połowie długości każdego odcinka (**Rys. 4.13**). Poszukiwanym wielościanem jest najmniejszy wielościan wyznaczony przez tak zdefiniowane płaszczyzny. Współrzędne każdego wierzchołka wielościanu można wyznaczyć, znajdując punkt wspólny trzech płaszczyzn.



Rys. 4.13. Konstruowanie wielościanów Voronoia. Dla uproszczenia przykład pokazany jest na płaszczyźnie: bisekcja odcinków łączących punkt centralny ze wszystkimi pozostałymi w układzie i wybranie najmniejszego wielościanu; powtórzenie postępowania dla każdego punktu w układzie, w wyniku czego przestrzeń zostaje podzielona na wielościany Voronoia (rysunek pochodzi z publikacji (133)).

W tym przypadku wielościany zostały wyznaczone na trzy różne sposoby, nieco odmienne od oryginalnego podejścia. Metody liczenia ewoluowały w toku pracy. Pierwszym zastosowanym sposobem było przyjęcie za punkt centralny współrzędnych środka masy cząsteczki wody, natomiast punkty pozostałe są wyznaczone przez współrzędne wszystkich atomów w układzie (poza atomami cząsteczki centralnej). Powodem dla takiego postępowania była chęć zwiększenia symetrii obliczeń w przypadku cząsteczek z pierwszej otoczki solwatacyjnej białka. Jeżeli chcielibyśmy uwzględnić w obliczeniach wszystkie atomy białka, to uwzględnianie cząsteczek wody jako pojedynczych punktów mogło się wydawać rozwiązaniem prowadzącym do sytuacji, w której otoczenie cząsteczki z warstwy solwatacyjnej jest od strony białka bardziej „gęste” od atomów niż od strony wody.

Drugi zastosowany sposób polegał na tym, że cząsteczka wody była rozważana jako suma trzech komórek Voronoia, odpowiadających atomom tlenu i wodoru, a punkty pozostałe były wyznaczone przez współrzędne pozostałych atomów w układzie.

Na końcu, kierując się artykułami (249-251), zastosowano trzecie podejście. Cząsteczka wody była rozważana jako punkt, a komórki Voronoia były tworzone w taki sposób, że odcinki łączące kolejne pary punktów są dzielone proporcjonalnie do parametru σ potencjału Lennarda-Jonesa. Taki sposób podziału może nieco bardziej realistycznie niż poprzednie odwzorowywać powierzchnię styku wody z powierzchnią białka.

Podział Voronoia wykorzystany został w analizie wyników symulacji przy obliczaniu trzech wielkości, omówionych poniżej.

Objętość i parametr asferyczności komórki Voronoia

Interesującymi mnie parametrami charakteryzującymi pojedynczą komórkę są jej średnia objętość oraz tak zwany parametr asferyczności, wprowadzony przez Ruocco *et al.* (134).

$$\eta = \frac{A^3}{36\pi V^2} \quad (4.124)$$

A – powierzchnia komórki
 V – objętość komórki

Najmniejszą wartość (równą jedności) parametr przyjmuje w przypadku sferycznego kształtu komórki.

Wyniki uzyskane pierwszą, drugą i trzecią z opisanych metod oznaczano odpowiednio symbolami: V i η , V_{ATO} i η_{ATO} , V_{vdW} i η_{vdW} .

Współczynnik lokalnego pofałdowania

Zdefiniowanie współczynnika szorstkości powierzchni białka, który byłby prosty i uniwersalny w użyciu nie jest sprawą łatwą ze względu na skomplikowaną geometrię tej powierzchni. Jako przykład próby zdefiniowania parametru oddającego średni stopień szorstkości całej powierzchni białka można przytoczyć prace Choi *et al.* (252,253). Jeszcze trudniejszym zadaniem jest znalezienie parametru do charakteryzowania lokalnej geometrii powierzchni białka (na przykład (254) lub (255)). Użycie tych parametrów jest jednak często ograniczone do specyficznych zastosowań. Na przykład zostały wykorzystane do oszacowania ilości wypukłości i wgłębień na powierzchni białka (254).

Zdefiniowany został nowy parametr γ :

$$\gamma = \frac{V_{solv}}{S_{solv} r_W} \quad (4.125)$$

V_{solv} – objętość pierwszej sfery hydratacyjnej wybranego obszaru na powierzchni białka, obliczona jako suma objętości komórek Voronia (opisanych w poprzednim sprawozdaniu);

S_{solv} – pole powierzchni kontaktu wybranego obszaru na powierzchni białka i wody z otoczki pierwszej sfery hydratacyjnej (liczone jako pole powierzchni odpowiednich ścian komórek Voronia);

r_W – promień van der Waalsa cząsteczki wody (wprowadzony w celu uzyskania parametru bezwymiarowego).

Wartości parametru γ będą zależały od wybranej metody podziału przestrzeni na komórki Voronia. Obliczenia dla niektórych otoczek solwatacyjnych zostały przeprowadzone z użyciem więcej niż jednej metody. Wyniki uzyskane pierwszą, drugą i trzecią z opisanych metod oznaczano odpowiednio symbolami: γ , γ_{ATO} , γ_{vdW} .

4.4.10. Ruchliwość atomów białka i analiza głównych składowych

Metoda analizy głównych składowych ma na celu wyodrębnienie ruchów w największej skali, o dużych wariacjach, które dominują we fluktuacjach białka. Podany tu opis metody bazuje na pracach (209), (206) i (208).

Założmy, że badamy cząsteczkę białka składającą się z N atomów. Aby jednoznacznie określić jej położenie w przestrzeni, należy podać $3N$ współrzędnych.

Dysponując trajektorią składającą się z K konfiguracji, w K macierzach kolumnowych $\mathbf{X}(k)$, $k = 1, K$ możemy zapisać współrzędne wszystkich atomów w kolejnych konfiguracjach. Analizując położenia, eliminuje się postępowy ruch środka masy białka oraz ruch obrotowy białka jako całości.

Trzeba tu nadmienić, że w przypadku elastycznych cząsteczek (takich, które nie są bryłami sztywnymi) wyeliminowanie ruchu środka masy i ruchu rotacyjnego może stwarzać wiele problemów. Konieczność taka zachodzi chociażby przy obliczaniu entropii translacyjnej i konfiguracyjnej cząsteczek, który to temat podjęli na przykład Schäfer *et al.* (256). Zaznaczyli oni, że choć można dopasować położenia atomów w dwóch różnych chwilach czasowych metodą najmniejszych kwadratów, to wyraźne rozdzielanie wewnętrznych zmian konfiguracyjnych od rotacji cząsteczki jako całości w przypadku giętkich cząsteczek jest w zasadzie niemożliwe.

Symulowaną cząsteczkę białka z pewnością należy uznać za giętką i zmieniającą wzajemne ułożenie atomów. Z braku innych możliwości, ruch translacyjny i rotacyjny był usuwany poprzez dopasowanie metodą najmniejszych kwadratów współrzędnych ciężkich atomów białka. Aby zwiększyć realizm obliczeń, z dopasowania wyłączone zostały atomy wchodzące w skład tych fragmentów cząsteczki, co do których można się było spodziewać, że z powodu swojej struktury i wyraźnego odstawania od powierzchni głównej części cząsteczki będą mogły poruszać się bardziej od innych i w sposób w sporej mierze niezależny od pozostałych atomów (głównie dotyczy to pętli L11 i helisy $\alpha 7$).

Ponadto średnie położenia atomów w analizowanym okresie zapisujemy w macierzy kolumnowej $\langle \mathbf{X} \rangle$. Następnie konstruujemy macierz \mathbf{D} o wymiarach $3N \times K$, której kolejne kolumny k otrzymujemy, odejmując od chwilowych położenia atomów położenia średnie.

$$\mathbf{D}_k = \mathbf{X}(k) - \langle \mathbf{X} \rangle \quad (4.126)$$

W celu określenia ruchliwości różnych fragmentów na powierzchni białka, zanalizowane były średnie położenia wszystkich ciężkich atomów i odchylenia standardowe od średniej po czasie 25 ns, po czasie 1 ns oraz po czasie 5 ps. Służyć miały one za miarę ruchliwości atomów w analizowanym przedziale czasowym. Otrzymane odchylenia standardowe zostały uśrednione po wszystkich ciężkich atomach znajdujących się na powierzchni białka i należących do uprzednio zdefiniowanych obszarów na powierzchni kinezy. Kryterium, aby uznać atom za powierzchniowy, była jego odległość od cząsteczek wody (nie większa niż 0,4 nm).

Postawą do analizy układu metodą głównych składowych jest znajomość macierzy wariancji-kowariancji \mathbf{C} . Jest to symetryczna macierz o wymiarach $3N \times 3N$. Poszukiwana macierz wariancji-kowariancji może zostać otrzymana z wykorzystaniem macierzy \mathbf{D} :

$$\mathbf{C} = \frac{1}{K} \mathbf{D} \mathbf{D}^T \quad (4.127)$$

Elementy na przekątnej będą po prostu uśrednionym po wszystkich konfiguracjach kwadratem różnicy chwilowego położenia atomu i jego położenia średniego.

Macierz \mathbf{C} może być przeprowadzona do postaci diagonalnej przez przekształcenie \mathbf{T} . Znając je, możemy napisać równanie na macierz diagonalną $\mathbf{\Lambda}$ zawierającą wartości własne λ_i .

$$\mathbf{\Lambda} = \mathbf{T}^T \mathbf{C} \mathbf{T} \quad (4.128)$$

Kolejne kolumny \mathbf{T} są wektorami własnymi (głównymi składowymi) odpowiadającymi kolejnym wartościom własnym macierzy. Znając wartości własne związane z każdym wektorem własnym, można określić, jaki procent informacji zawarty jest w głównej składowej.

Dla trajektorii o długości 25 ns, do analizy wybrano najwolniejszą składową, odpowiadającą ruchom o największej amplitudzie. Podobnie jak przy obliczeniach odchylenia standardowego, wychylenia atomów jej odpowiadające uśredniono po wszystkich ciężkich atomach znajdujących się na powierzchni białka i należących do uprzednio zdefiniowanych obszarów na powierzchni kinezyiny.

4.4.11. Obliczenia średniego momentu dipolowego warstwy solwatacyjnej i natężenia pola elektrycznego

Cząsteczki wody modelu SPC/E charakteryzują się występowaniem stałego momentu dipolowego (jest to model sztywny i niepolaryzowalny).

Wektor momentu dipolowego układu elektrycznie obojętnego, składającego się z N ładunków punktowych, można zdefiniować jako:

$$\mathbf{p} = \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i q_i \quad (4.129)$$

gdzie \mathbf{r}_i jest wektorem określającym położenie cząstki. Wynik nie zależy od wyboru punktu odniesienia. W prostym przypadku pary ładunków, wektor momentu dipolowego skierowany jest od ładunku ujemnego do ładunku dodatniego.

$$\mathbf{p}_{AV} = \frac{1}{N_k} \sum_{k=1}^{N_k} \frac{\sum_{i=1}^{N_W} \mathbf{p}_i}{N_W} \quad (4.130)$$

N_k - liczba analizowanych klatek trajektorii

Obliczone zostały średnie wypadkowe wektory momentu dipolowego \mathbf{p}_{AV} cząsteczek wody w warstwie solwatacyjnej. Wartość momentu dipolowego podzielona została przez wartość momentu dipolowego pojedynczej cząsteczki, dzięki czemu otrzymano wielkość bezwymiarową.

Niezerowy wypadkowy moment dipolowy może wskazywać na znaczny wpływ pola elektrycznego. Dlatego oszacowałam średnie natężenie pola elektrycznego wytwarzanego przez białka, odczuwanego przez cząsteczki wody w wybranej warstwie solwatacyjnej. Zostało ono obliczone w ten sposób, że dla punktu położonego w środku masy każdej cząsteczki wody policzono wektor

natężenia pola elektrycznego, uśredniając następnie wyniki po wszystkich analizowanych cząsteczkach wody i wszystkich klatkach trajektorii:

$$\mathbf{E}_{AV} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{1}{N_k} \sum_{k=1}^{N_k} \frac{\sum_{i=1}^{N_W} \sum_{j=1}^{n_p} \frac{Q_j}{|\mathbf{d}_{ij}|^2} \frac{\mathbf{d}_{ij}}{|\mathbf{d}_{ij}|}}{N_W} \quad (4.131)$$

N_k – liczba analizowanych klatek trajektorii

\mathbf{d}_{ij} – wektor łączący atom białka j ze środkiem masy cząsteczki wody i

N_W – liczba cząsteczek wody w analizowanej warstwie solwatacyjnej

n_p – liczba atomów białka

Q_j – ładunek atomu j białka

ϵ_0 – przenikalność elektryczna próżni

4.4.12. Obliczenia siły generowanej przez szyjkę łącznikową

W celu obliczenia siły wykorzystana została metoda opisana w pracy (25). Dzięki niej możemy wyznaczyć siłę jako funkcję stałej siłowej k i wychylenia z położenia równowagi (opis przygotowania układu do symulacji w podrozdziale 4.2, a przebieg symulacji w podrozdziale 4.3). Załóżmy, że mamy jednowymiarowy układ, w którym pewien obiekt punktowy został przywiązany z użyciem stałej siłowej k w położeniu x_0 . Wartość tej stałej powinna być na tyle duża, aby obiekt fluktuował w bliskim otoczeniu x_0 . Całkowita energia potencjalna $E_c(x)$ obiektu w położeniu x będzie wówczas równa sumie energii pochodzącej od oddziaływań z pozostałymi elementami układu i energii związanej z istnieniem harmonicznego potencjału ograniczającego:

$$E_c(x) = E(x) + \frac{k}{2}(x - x_0)^2 \quad (4.132)$$

Wykorzystując twierdzenie Taylora, można przedstawić energię $E(x)$ w postaci sumy, której pierwszym składnikiem będzie energia w położeniu x_0 . Ograniczając się do pochodnej drugiego rzędu otrzymamy:

$$E(x) \cong E(x_0) + \frac{(x - x_0)}{1!} E'(x_0) + \frac{(x - x_0)^2}{2!} E''(x_0) \quad (4.133)$$

Podstawiając powyższe wyrażenie do pierwszego wzoru dostaniemy:

$$E_c(x) \cong E(x_0) + (x - x_0)E'(x_0) + \frac{(x - x_0)^2}{2} [E''(x_0) + k] \quad (4.134)$$

Dla uproszczenia zapisu podstawmy $x - x_0 = y$.

Aby znaleźć wartości średnie wychylenia od położenia równowagi $\langle y \rangle$ i kwadratu wychylenia od położenia równowagi $\langle y^2 \rangle$, można posłużyć się wzorami:

$$\langle y \rangle = \frac{\int y e^{-\beta\epsilon(y)} dy}{\int e^{-\beta\epsilon(y)} dy} \quad (4.135)$$

$$\langle y^2 \rangle = \frac{\int y^2 e^{-\beta\epsilon(y)} dy}{\int e^{-\beta\epsilon(y)} dy} \quad (4.136)$$

gdzie:

$$\varepsilon = yE' + \frac{y^2}{2}E'' \quad (4.137)$$

Wyrażenie to nie zawiera stałego składnika $E(x_0)$, gdyż ulega on skróceniu. Natomiast $\beta \equiv \frac{1}{k_B T}$. Po przeprowadzeniu obliczeń otrzymujemy:

$$\langle y \rangle = \langle x - x_0 \rangle = -\frac{E'}{E'' + k} \quad (4.138)$$

$$\langle y^2 \rangle - \langle y \rangle^2 = \langle (x - x_0)^2 \rangle - \langle x - x_0 \rangle^2 = \frac{k_B T}{E'' + k} \quad (4.139)$$

Łącząc oba równania, możemy wyznaczyć E' (podstawivszy E'' wyznaczone z drugiego równania z pary):

$$E' = -\langle x - x_0 \rangle \frac{k_B T}{\langle (x - x_0)^2 \rangle - \langle x - x_0 \rangle^2} \quad (4.140)$$

Siła będzie równa ujemnej wartości pochodnej energii potencjalnej w punkcie x_0 . W trzech wymiarach, oznaczając położenie równowagowe przez $\vec{r}_0 = [r_x, r_y, r_z]$, otrzymamy wektor siły $\vec{F}(\vec{r}_0) = [F_x, F_y, F_z]$ wykorzystując wzór:

$$F_i(\vec{r}_0) = -\frac{\partial E(\vec{r}_0)}{\partial r_i} = \langle r_i - r_{i0} \rangle \frac{k_B T}{\langle (r_i - r_{i0})^2 \rangle - \langle r_i - r_{i0} \rangle^2} \quad (4.141)$$

4.4.13. Wartość maksymalnego przepływu

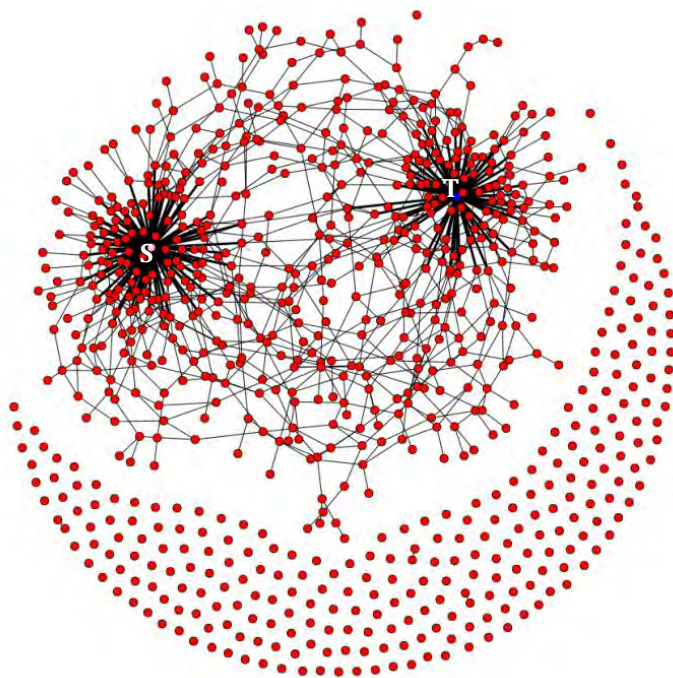
Inspiracją do przeprowadzenia obliczeń była omówiona we wstępie praca (144).

Cząsteczki wody zawarte w przestrzeni pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym zostały przedstawione w postaci grafu nieskierowanego. Wierzchołkami grafu zostały atomy tlenu cząsteczek wody, które połączono krawędziami, jeżeli pomiędzy cząsteczkami wody były wiązania wodorowe. W celu otrzymania grafu, skonstruowana została macierz sąsiedztwa \mathbf{S} . Była to symetryczna, zerojedynkowa macierz. Liczba jej wierszy odpowiada liczbie przyszyłych wierzchołków grafu. Jeżeli wierzchołki i i j połączone miały być krawędzią, wówczas $s_{ij} = s_{ji} = 1$.

Każdej krawędzi przypisano przepustowość odpowiadającą energii wiązania wodorowego. Ponadto dodano wirtualny wierzchołek będący źródłem, który połączono krawędziami (o przepustowości w przybliżeniu odpowiadającej średniej energii wiązania wodorowego w wodzie SPC/E, czyli 20 kJ/mol) z cząsteczkami wody w otoczce solwatacyjnej górnej powierzchni dimeru tubulinowego (wszystkimi do odległości 0,4 nm). Drugi wirtualny wierzchołek, zwany ujściem, połączono z cząsteczkami wody w otoczce solwatacyjnej dolnej powierzchni kinezyny.

Wykonano również porównawczą serię obliczeń, w której zamiast wody solwatacyjnej użyto czystej wody otrzymanej w wyniku oddzielnej symulacji. Współrzędne cząsteczek wody zostały nałożone na współrzędne białka, po czym można było utworzyć graf w sposób analogiczny do powyżej opisanej procedury. Z obliczeń wyeliminowano te cząsteczki wody, w przypadku których współrzędne atomu tlenu wypadały bliżej niż 0,17 nm od współrzędnych białka.

Przekształcenie macierzy sąsiedztwa na graf oraz obliczenia maksymalnego przepływu pomiędzy źródłem i ujściem były przeprowadzone za pomocą pakietu Igraph w postaci rozszerzenia do języka Python.



Rys. 4.14. Przykładowy graf otrzymany z macierzy sąsiedztwa. Zaznaczono źródło (S) i ujście (T). (Duża liczba wierzchołków niepołączonych krawędziami wynika ze sposobu wybierania cząsteczek wody do analizy.)

4.4.14. Local Structure Index (LSI)

Parametr zwany local structure index (LSI) został wprowadzony przez Shiratani'ego i Sasai (106,257). Do zdefiniowania tego parametru skłoniła autorów obserwacja, iż sposób chwilowego ułożenia cząsteczek wody wokół wskazanej cząsteczki centralnej może wykazywać pewne charakterystyczne cechy, w zależności od tego, czy lokalnie tetraedryczna struktura jest dobrze rozwinięta czy mocno osłabiona. Jeżeli sąsiadujące cząsteczki są rozmieszczone mniej więcej jednorodnie, to wskazuje to na zaburzenie struktury tetraedrycznej. Z kolei gdy cząsteczki są obecne w promieniu $2.7 \text{ \AA} - 3.2 \text{ \AA}$, a region pomiędzy $3.2 \text{ \AA} - 3.8 \text{ \AA}$ jest wolny, to wskazuje to na rozwiniętą strukturę tetraedryczną, kiedy w bezpośredniej bliskości brak jest dodatkowych cząsteczek, które mogłyby zaburzać lokalną strukturę wiązań wodorowych.

LSI, $I(\mu, t)$, zdefiniowany jest w następujący sposób:

$$I(\mu, t) = \frac{1}{n(\mu, t)} \sum_{i=1}^{n(\mu, t)} [\Delta(i; \mu, t) - \bar{\Delta}(\mu, t)]^2 \quad (4.142)$$

μ – centralna cząsteczka wody

t – czas

$n(\mu, t)$ – liczba cząsteczek obecnych w promieniu $3,7 \text{ \AA}$ od cząsteczki centralnej; cząsteczki są uporządkowane według wzrastającej odległości od cząsteczki centralnej: $r_1 < r_2 < \dots < r_i < r_{i+1} < \dots < r_{n(\mu, t)} < r_{n(\mu, t)+1}$

$\Delta(i; \mu, t)$ – różnica w odległości dwóch kolejnych cząsteczek od cząsteczki centralnej: $r_{i+1} - r_i$

$\bar{\Delta}(\mu, t)$ – średnia wartość $\Delta(i; \mu, t)$: $\bar{\Delta}(\mu, t) = \frac{1}{n(\mu, t)} \sum_{i=1}^{n(\mu, t)} \Delta(i; \mu, t)$

W wartościach LSI odbijają się fluktuacje położenia najbliższych cząsteczek i obecność pustej przestrzeni tuż poza pierwszą otoczką solwacyjną. Jeżeli przestrzeń ta jest obecna, to wartość LSI jest duża. Jeżeli cząsteczki są rozmieszczone przypadkowo, to wartość LSI jest w przybliżeniu równa zero.

W pracy posługuję się średnią wartością parametru LSI obliczoną dla wszystkich cząsteczek wody w analizowanej warstwie solwacyjnej.

$$\langle I \rangle = \frac{1}{N_k} \sum_{k=1}^{N_k} \frac{1}{N_W} \sum_{\mu=1}^{N_W} I(\mu, k\delta t) \quad (4.143)$$

N_k – liczba analizowanych klatek trajektorii

N_W – liczba cząsteczek wody w analizowanej warstwie solwacyjnej

k – numer analizowanej konfiguracji

δt – krok czasowy

4.5. Możliwe źródła błędów wyznaczonych wielkości fizycznych

Prawdopodobnie najważniejszym źródłem błędów jest ograniczona i stosunkowo niewielka liczba cząsteczek - zwłaszcza w pierwszej, lecz także i w kolejnych warstwach solwacji. Oznacza to uśrednianie rezultatów po stosunkowo mało licznej próbie. Ponadto do powstawania różnic pomiędzy kolejnymi seriami obliczeń mogą się także przyczyniać ruchy białka.

W celu jak najlepszego zneutralizowania wpływu powyższych czynników na wyniki, należało albo prowadzić analizę przez odpowiednio długi czas, albo też brać pod uwagę kilka krótszych odcinków trajektorii, lecz rozrzuconych w wystarczająco długim przedziale czasu. W zależności od układu i obliczanej wielkości fizycznej, zastosowano jedno i/lub drugie podejście.

4.6. Narzędzia – programy i komputery

Przygotowanie modeli dokonane zostało z użyciem programów wchodzących w skład pakietu Amber10 (230) i własnych.

Dynamika przeprowadzona została z użyciem programu Sander, będącego częścią pakietu Amber10 (230).

Do wizualizacji struktur korzystałam z programu PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1, Schrödinger, LLC.).

Podczas analizy rezultatów symulacji korzystałam z programów dostępnych w pracowni oraz własnych.

Wszystkie wykresy były sporządzone z użyciem biblioteki do tworzenia wykresów dla języka Python – matplotlib.

Część obliczeń wykonałam, wykorzystując komputery Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej (TASK).

5. Wyniki i ich dyskusja

Ogólnie sformułowanym celem mojej pracy było zanalizowanie szeroko rozumianych właściwości wody w otocze solwatacyjnej kinezyiny i znalezienie ewentualnego związku pomiędzy efektami solwatacyjnymi a funkcjonalnością biologiczną białka, czyli wykonywaniem pracy mechanicznej. Ogólność tego sformułowania wynikała przede wszystkim ze skromnej ilości dostępnych danych mogących służyć za punkt wyjścia i ukierunkowujących badania. Jak wspomniałam w przeglądzie literatury, podczas dyskusji dotyczących mechanizmu ruchu białkowych motorów molekularnych roli rozpuszczalnika nie poświęca się przeważnie zbyt dużo uwagi. Tym niemniej, kilka obserwacji pozwoliło na naszkicowanie trzech celów bardziej szczegółowych:

- 1) właściwości wody solwatacyjnej białek są często różne od właściwości wody czystej, a odpowiedni stopień uwodnienia jest białkom niezbędny do prawidłowego funkcjonowania – dlatego zdecydowałam się na próbę uzyskania opisu efektów solwatacyjnych wokół pojedynczej domeny motorycznej kinezyiny;
- 2) tubulina odgrywa istotną rolę podczas poruszania się kinezyiny, które jest związane z powtarzającymi się procesami asocjacji i dysocjacji tych dwóch struktur białkowych – dlatego poszerzyłam badania o analizę efektów solwatacyjnych w obszarze pomiędzy kinezyną a dimerem tubulinowym;
- 3) podczas pracy zmienia się konformacja kinezyiny, a zwłaszcza sposób ułożenia szyjki łącznikowej względem domeny katalitycznej – dlatego postanowiłam ocenić rolę rozpuszczalnika w procesie zbliżania się szyjki łącznikowej do powierzchni domeny katalitycznej kinezyiny.

Stosownie do tego, prezentacja wyników podzielona została na trzy podrozdziały, odpowiadające wskazanym powyżej celom.

W części pierwszej przedstawiam opis wybranych właściwości wody solwatuującej domenę motoryczną kinezyiny oraz wskazuję na ich związek z ruchliwością atomów samego białka. Efektem tej części pracy jest, między innymi, odkrycie interesującej współzależności pomiędzy kształtem powierzchni granicznej białko – woda a ruchliwością atomów białka. Czynnikiem leżącym u podłoża tej zależności jest fakt, że kształt sąsiadującej powierzchni białka wywiera wpływ na zachowanie wody. W tym podrozdziale przedstawiam wybrane rezultaty dotyczące układów 1MKJ (kinezyiny z zadokowaną szyjką łącznikową i zawierającą ADP i jon magnezu) oraz 1MKJ_0 (utworzonego z układu 1MKJ, w którym ładunki cząstkowe wszystkich atomów białka oraz związanego z białkiem ADP i jonu Mg^{2+} zostały wyzerowane). Ponadto w celach porównawczych wykonanych zostało wiele obliczeń także dla układu 1BG2 (kinezyiny z uwolnioną szyjką łącznikową i zawierającą ADP i jon magnezu). Wyniki uzyskane dla układów 1BG2 oraz 1MKJ były w większości przypadków podobne. Największe zaobserwowane różnice są wynikiem

głównie tego, że łańcuch polipeptydowy struktury 1MKJ jest dłuższy - dodatkowy fragment oddziałuje z domeną katalityczną i przechodzi w helisę sztywną. Wykresy i tabele przedstawione w treści tego podrozdziału dotyczą układu 1MKJ. Wartości liczbowe wybranych parametrów dla układu 1BG2 i 1MKJ można ponadto znaleźć w tabelach w Aneksie (Tabela A1 ÷ A7). Wyniki i dyskusja z tego podrozdziału zawarte są częściowo w pracy (258).

W drugiej części opisuję właściwości wody znajdującej się w obszarze pomiędzy domeną katalityczną kinezyiny a dimerem tubulinowym. Głowa kinezyiny, krocząc po mikrotubuli, cyklicznie przyłącza się i odłącza od powierzchni szlaku. Należy podkreślić, że dostępnych jest stosunkowo niewiele doniesień dotyczących zachowania się wody w obszarze pomiędzy dwoma asocjującymi białkami, a te istniejące nie zawsze prowadzą do jednoznacznych wniosków. Opisywane w tej części rezultaty wyraźnie wskazują na zmiany w strukturze wody zachodzące w badanym obszarze. Sytuacja, w której mamy do czynienia z wodą pomiędzy dwiema powierzchniami białkowymi różni się od sytuacji w której analizujemy pojedyncze białko między innymi tym, że w obszarze pomiędzy białkami wektory natężenia pola elektrycznego układają się inaczej niż miałyby to miejsce w przypadku braku dodatkowego białka. W tym podrozdziale przedstawiam wybrane rezultaty dotyczące między innymi układów: 1BG2_1JFF_4 (układu składającego się z kinezyiny 1BG2 oraz dimeru tubulinowego 1JFF odsuniętych od siebie o 0,4 nm), 1BG2_1JFF_12 (układu składającego się z kinezyiny 1BG2 oraz dimeru tubulinowego 1JFF odsuniętych od siebie o 1,2 nm), 1BG2_1JFF_20 (układu składającego się z kinezyiny 1BG2 oraz dimeru tubulinowego 1JFF odsuniętych od siebie o 2,0 nm), 1JFF (układu składającego się z dimeru tubulinowego 1JFF, dla którego obliczenia były wykonane w celach porównawczych). Obserwowane zmiany w strukturze wody solwatacyjnej, sięgające poza pierwszą otoczkę solwatacyjną i występujące także dla odległości 2,0 nm pomiędzy białkami (a szczególnie przesłanki świadczące o wzroście gęstości), skłoniły mnie do zapytania o przyczynę tych zmian. Poszukując odpowiedzi, cofnęłam się do analizy układów 1MKJ i 1MKJ_0. W rezultacie powstał model solwatacji, który mógł zostać zastosowany także do opisu zmian strukturalnych wody w obszarze pomiędzy białkami. Wyniki i dyskusja z tego podrozdziału zawarte są częściowo w pracy (259).

Trzeci podrozdział poświęcony jest roli, jaką woda solwatacyjna może odgrywać w procesie przyłączania się szyjki łącznikowej do powierzchni domeny katalitycznej. Proces ten uważany jest za jeden z kluczowych etapów podczas wykonywania kroku przez kinezynę. Początkowo wydawało się, że wpływ wody solwatacyjnej na jego przebieg powinien być bardzo wyraźny i łatwy do wykazania. Celem zbadania, czy wpływ taki istnieje, wykorzystałam, oprócz modelu wody SPC/E, także kilka jego modyfikacji (opisanych w rozdziale poświęconym metodyce). Modyfikacje te polegały na zmianie oddziaływań van der Waalsa. W trakcie pracy okazało się jednak, że rola rozpuszczalnika jest bardzo trudna do uchwycenia, zaś dotychczasowe wnioski wciąż nie są jednoznaczne. Dlatego wyniki przedstawione w tej części wymagają jeszcze uzupełnienia. Tym samym, opisuję jedynie aktualny stan moich badań, powstrzymując się przed wyciąganiem dalej idących wniosków. Omówione w tym podrozdziale wyniki dotyczą układu 1MKJ ze sztucznie odciążoną szyjką

łącznikową i pozbawionego początkowego fragmentu helisy szyjnej (w celu usprawnienia obliczeń).

5.1. Solwatacja pojedynczej domeny motorycznej kinezyiny

Ponieważ dysponowałam niewielką liczbą przesłanek, na których mogłabym się oprzeć stawiając początkową hipotezę roboczą, pozwalającą na racjonalne ukierunkowanie przyszłej pracy, zdecydowałam się na rozpoczęcie od następującego rozumowania. Otóż kinezyina podczas wykonywania pracy wykazuje wyraźną preferencję do ruchu w jednym kierunku. Jeżeli woda solwatacyjna miałaby w jakiś sposób wspomagać ten ruch, to nie jest wykluczone, że występować będzie pewna asymetria przestrzenna we właściwościach fizycznych wody solwatacyjnej domeny motorycznej. To przypuszczenie uprawdopodobniały doniesienia zawarte w pracy Suzuki *et al.* (185) o wykryciu takiej asymetrii w przypadku innego białka motorycznego, miozyny, współdziałającej z aktyną. Aby to wstępne przypuszczenie sprawdzić, podzieliłam powierzchnię domeny motorycznej kinezyiny na szereg obszarów (opisanych w rozdziale poświęconym metodyce) i badałam wybrane właściwości wody znajdującej się w sąsiedztwie każdego z tych obszarów. W tym kontekście naturalne wydawało się rozpoczęcie od wyznaczenia wartości współczynników dyfuzji.

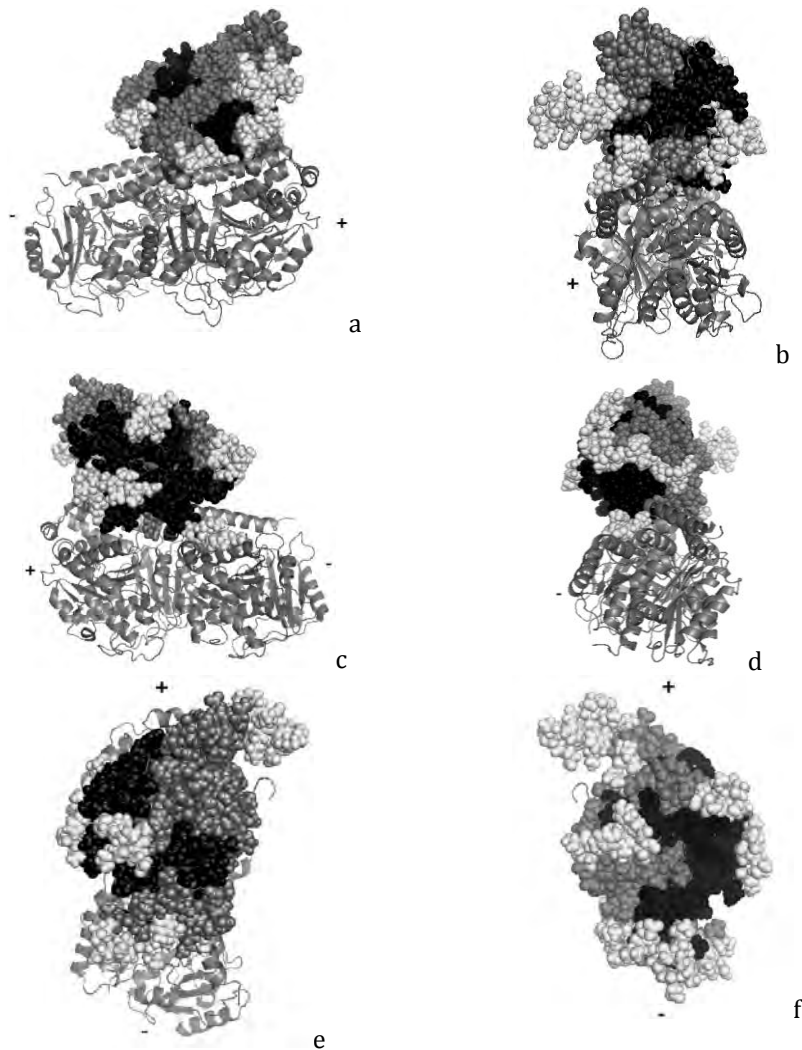
5.1.1. Współczynniki dyfuzji

Znalezione wartości współczynników dyfuzji wody w otoczkach solwatacyjnych wybranych obszarów na powierzchni kinezyiny zostały przedstawione na wykresie (**Rys. 5.3**) i w Aneksie (Tabela A6). Ponieważ punktem wyjścia była hipoteza o możliwej asymetrii we właściwościach wody solwatacyjnej, skorelowanej z kierunkiem ruchu głowy podczas pracy motoru, podzieliłam otrzymane wartości współczynników dyfuzji wody w pierwszej otoczce solwatacyjnej na trzy kategorie: małe, średnie i duże (wszystkie jednak były wyraźnie mniejsze od współczynnika dyfuzji czystej wody). Następnie naniosłam odpowiednie oznaczenia kolorystyczne na strukturę białka osadzoną na dimerze tubulinowym. Rezultat tego postępowania obrazuje **Rys. 5.1**.

Jak widać, wstępna hipoteza była zbyt prosta i nie potwierdziła się. Nie da się zauważyć żadnej wyraźnej zależności pomiędzy kierunkiem, w jakim przemieszcza się białko (to znaczy w stronę końca plus mikrotubuli), a średnimi wartościami współczynników dyfuzji wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej. Zatem należało przyjąć, że rola efektów solwatacyjnych jest subtelniejsza, a jej zanalizowanie wymaga dużo bardziej szczegółowych badań.

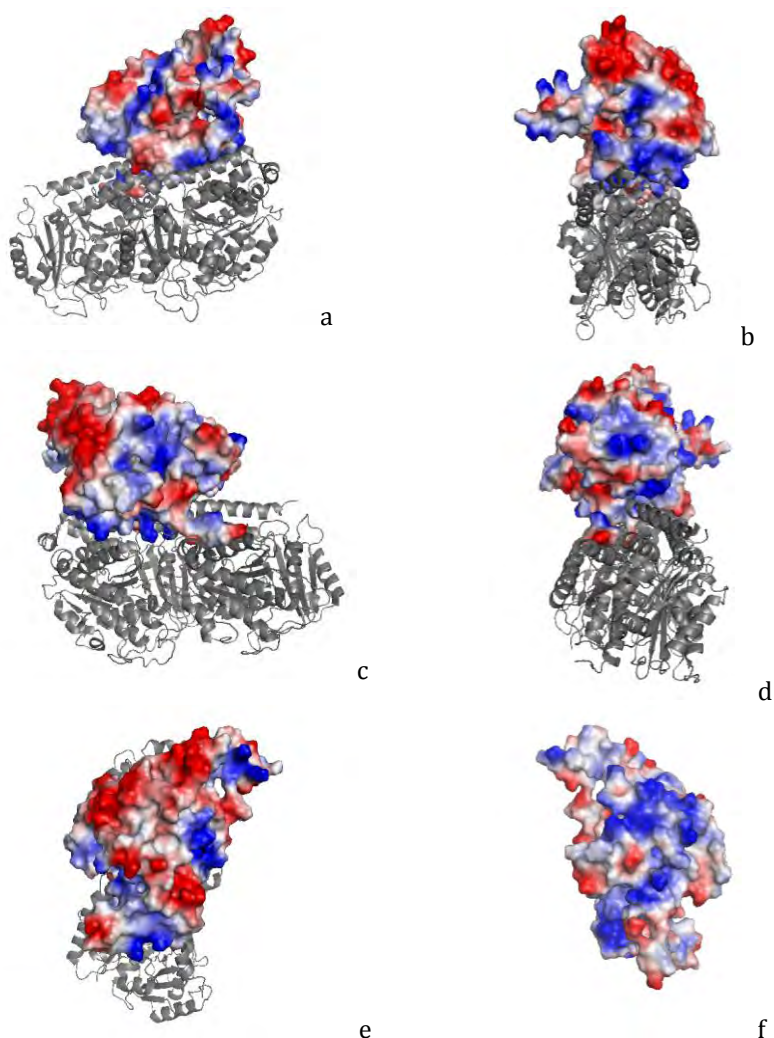
Obecność białka mogła wpływać na zróżnicowanie właściwości wody na dwa sposoby: poprzez zmianę lokalnych cech geometrycznych lub chemicznych określonego fragmentu powierzchni. Dane przytoczone w przeglądzie literaturowym sugerują, że należy się raczej skłaniać ku uznaniu przeważającego wpływu kształtu powierzchni na współczynniki dyfuzji. Postanowiłam jednak zanalizować, jak przedstawia się sytuacja w moim przypadku, gdy podzieliłam całą otoczkę solwatacyjną białka na szereg mniejszych i sprawdzić, czy startując od prostego opisu jakościowego uda się

przejsć krok dalej do ilościowego scharakteryzowania właściwości powierzchni białka i jej wpływu na wartości współczynników dyfuzji.



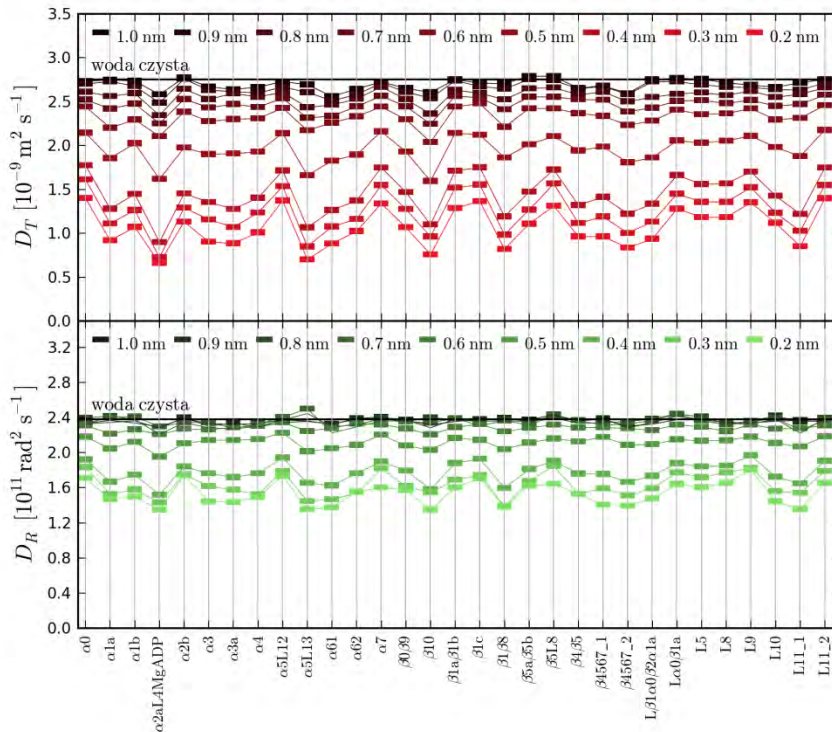
Rys. 5.1. Wybrane obszary na powierzchni domeny katalitycznej kinezy 1BG2 (wraz z dimerem α i β -tubuliny dodanym w celu zilustrowania sposobu osadzenia na mikrotubuli – PDB-ID: 2P4N). Oznaczono kierunek plus i minus mikrotubuli: a, c) widok z boku; b, d) widok z przodu i z tyłu; e, f) widok z góry i z dołu – od strony mikrotubuli (w tym ostatnim przypadku niewidocznej). Kolor fragmentów białka odpowiada współczynnikom dyfuzji translacyjnej wody dla pierwszej warstwy solwatacyjnej: kolor czarny – najmniejsze wartości współczynników dyfuzji; kolor szary – średnie wartości współczynników dyfuzji; kolor biały – największe wartości współczynników dyfuzji. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Na **Rys. 5.1** i **Rys. 5.2** możemy zaobserwować, że powierzchnię kinezyiny cechuje duża niejednorodność topograficzna, a **Rys. 5.2** ilustruje, że tej niejednorodności towarzyszy zróżnicowanie charakteru chemicznego aminokwasów.



Rys. 5.2. Przybliżony rozkład gęstości ładunku na powierzchni domeny katalitycznej kinezyiny 1BG2 (bez uwzględniania wpływu rozpuszczalnika), otrzymana za pomocą programu PyMOL. Dimer α i β -tubuliny dodany został w celu zilustrowania sposobu osadzenia na mikrotubuli – PDB-ID: 2P4N): a, c) widok z boku; b, d) widok z przodu i z tyłu; e, f) widok z góry i z dołu – od strony mikrotubuli (w tym ostatnim przypadku niewidocznej). Niebieski kolor białka odpowiada ładunkom dodatnim, a czerwony ładunkom ujemnym.

Z tych powodów, dzięki podzieleniu powierzchni na stosunkowo dużą liczbę obszarów, otrzymujemy wycinki powierzchni o szerokiej rozpiętości właściwości. Okazuje się to przydatne na dalszych etapach analizy wyników.



Rys. 5.3. Współczynniki dyfuzji translacyjnej (D_T) i rotacyjnej (D_R) dla wody w otoczkach solwatacyjnych wybranych obszarów na powierzchni kinezyiny 1MKJ przy zwiększającej się odległości od powierzchni białka oraz dla czystej wody (czarna linia ciągła).

Jakościowa analiza dokonana za pomocą **Rys. 5.1** i **Rys. 5.2** sugeruje, że w wartościach współczynników dyfuzji najwyraźniej rzeczywiście zaznacza się wpływ topografii kinezyiny. Ich duże zróżnicowanie widać dokładniej na **Rys. 5.3**. Zmniejszającym się w pierwszej warstwie wartościom współczynników dyfuzji translacyjnej towarzyszą zmniejszające się wartości współczynników dyfuzji rotacyjnej. Niemniej ruchy rotacyjne są mniej hamowane niż translacyjne. W drugiej warstwie solwatacyjnej (zdefiniowanej tu jako zawierającej cząsteczki wody znajdujące się w przedziale odległości 0,4-0,8 nm od powierzchni białka) utrzymują się efekty związane ze zmniejszeniem się współczynnika dyfuzji translacyjnej, natomiast ruchy rotacyjne powoli zaczynają przypominać te, którymi charakteryzuje się czysta woda. Przy odległości od powierzchni białka sięgającej około 0,8 nm, zaczynają się zacierać

zarówno różnice pomiędzy poszczególnymi obszarami solwatacyjnymi jak i pomiędzy wodą z otoczki solwatacyjnej i wodą czystą. Współczynniki dyfuzji translacyjnej zbliżają się do współczynnika dyfuzji charakterystycznego dla czystej wody. Dla dyfuzji rotacyjnej spowolnienie zanika znacznie szybciej, bo już przy odległości około 0,6 nm.

Największymi współczynnikami dyfuzji wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej charakteryzują się wypukłe elementy struktury (takie jak otoczenie $\alpha 0$, $\alpha 7$, L9, $\alpha 5aL12$ lub L11_2). Można się ponadto spodziewać, że na wartość współczynnika dyfuzji obszarów L11_1, L11_2 i sąsiadujących z nimi (np. $\alpha 3a$) będzie miało wpływ aktualne położenie pętli L11, ponieważ jest ona dosyć długa i elastyczna.

Z kolei do miejsc o najmniejszej wartości tego współczynnika należy $\alpha 2aL4MgADP$. Na obszar ten składa się okolica miejsca aktywnego, które charakteryzuje się wklęsłą geometrią i obecnością wielu miejsc obdarzonych ładunkiem (znajduje się tam cząsteczka ADP zawierająca ujemnie naładowany fosforan, obdarzony ładunkiem dodatnim ładunkiem jon Mg^{2+} oraz dodatnio naładowane reszty obecne na samym białku).

Występują także inne miejsca charakteryzujące się nierówną powierzchnią, gdzie współczynniki dyfuzji osiągają małą wartość (np. $\alpha 5L13$). Warto jednak zaznaczyć, że na przykład fragment $\alpha 3$ wydaje się znajdować na stosunkowo odsłoniętym fragmencie białka, a mimo to współczynnik dyfuzji wody jest tam niezbyt duży. Po umiejscowieniu fragmentu na mapie rozkładu ładunku można zauważyć, że ten obszar charakteryzuje się występowaniem znaczącego ujemnego ładunku powierzchniowego. Z kolei w miejscu $\beta 1\beta 8$ występuje znaczny ładunek dodatni. Być może oddziaływania elektrostatyczne także wpływają na zmniejszenie wartości współczynnika dyfuzji. Charakter chemiczny powierzchni białka mógłby ułatwiać lub utrudniać ruch cząsteczkom wody poprzez zmodyfikowanie struktury wody. Ponadto ruchliwość może zostać zmniejszona przez oddziaływania z hydrofilowymi lub naładowanymi łańcuchami bocznymi.

Oglądając powierzchnię białka w programie graficznym nie sposób dokonać analizy na poziomie ilościowym. Tymczasem przydatne byłoby znaleźć miarę charakteryzującą kształt lub charakter chemiczny powierzchni, aby sprawdzić, jak współczynniki dyfuzji zmieniają się w zależności od tych parametrów.

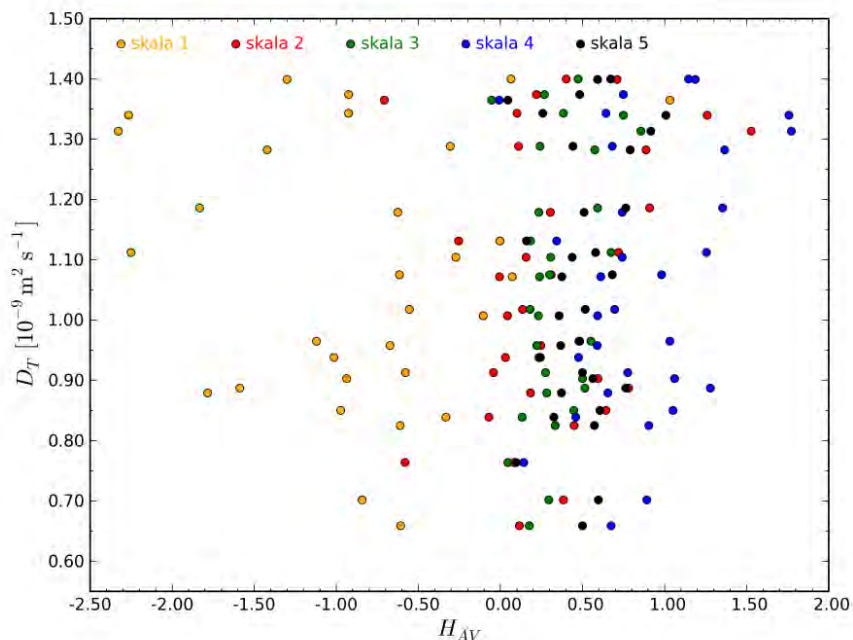
5.1.2. Miara średniej hydrofobowości analizowanych obszarów białka

Zdefiniowanie jednej liczby, która mogłaby oddać charakter chemiczny fragmentu powierzchni białka, jest zadaniem bardzo trudnym. O tym, jaki wpływ będą miały określone aminokwasy na zachowanie otaczających je cząsteczek wody, zadecyduje nie tylko to, czy ich łańcuchy boczne posiadają (albo nie) donory lub akceptory wiązań wodorowych, ale także to, w jaki sposób będą one względem siebie ułożone (np. czy reszty dodatnio i ujemnie naładowane blisko sąsiadują ze sobą czy są od siebie oddalone, czy łączą się wiązaniami wodorowymi czy nie). Za ilustrację może służyć białko

przeciwdziałające zamarzaniu płynów komórkowych (1,260,261), w którego przypadku sposób ułożenia hydrofilowych i hydrofobowych grup na powierzchni białka ma wpływ na strukturę wody w warstwie solwatacyjnej.

Mimo to, podjęta została próba oszacowania średniej hydrofobowości wybranych obszarów na powierzchni białka. Jako liczbową miarę charakteryzującą oddziaływania poszczególnych aminokwasów z wodą przyjęłam tak zwaną skalę hydrofobowości. Problemem jest fakt, że w literaturze można znaleźć wiele skali hydrofobowości, a poszczególne skale mogą się znacznie pomiędzy sobą różnić. Jest to niestety kolejną słabością zaproponowanej miary hydrofobowości analizowanych obszarów, ponieważ sprawia, że jest ona bardzo wrażliwa na wprowadzony zestaw danych wejściowych.

Zdecydowałam się użyć kilku różnych skali hydrofobowości, zaczerpniętych z prac (262), (263) i (264). Wartości parametru charakteryzującego hydrofobowość poszczególnych aminokwasów znajdujących się na powierzchni białka i należących do poszczególnych obszarów zostały zsumowane i uśrednione. Opis uzyskania tych wartości należy uzupełnić o dwa szczegóły techniczne. Mianowicie pod uwagę wzięte zostały tylko te aminokwasy, których dowolny atom znajduje się nie dalej niż 2,5 Å od cząsteczek wody solwatacyjnej. Ponadto zasięg pierwszej otoczki solwatacyjnej sięga nieco poza granice wybranego obszaru, nakładając się na sąsiedni. Dlatego do obliczeń zostały dodane wartości hydrofobowości sąsiednich aminokwasów, jeżeli ich atom węgla α znajdował się nie dalej niż 4 Å od aminokwasów obszaru wybranego.



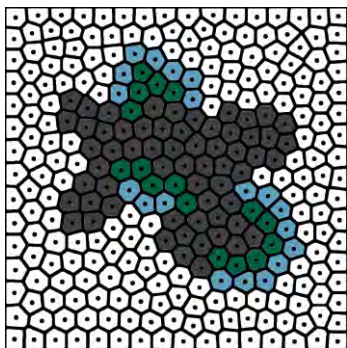
Rys. 5.4. Współczynnik dyfuzji wody z pierwszej warstwy solwatacyjnej, D_T , wybranych obszarów na powierzchni kinezyiny 1MKJ w funkcji średniej hydrofobowości tych powierzchni, H_{AV} , zgrubnie oszacowanej na podstawie pięciu różnych skal, oznaczonych różnymi kolorami (źródła, z których zaczerpnięto wartości liczbowe hydrofobowości: skala 1 - (262), skala 2 - (263), skala 3, 4 i 5 - (264)).

Na załączonym wykresie (**Rys. 5.4**) nie widać żadnej współzależności pomiędzy współczynnikiem dyfuzji i obliczonym parametrem hydrofobowości. Wskazuje to na to, że (przy wszystkich zastrzeżeniach co do użytych miar hydrofobowości) charakter chemiczny powierzchni zapewne nie jest głównym czynnikiem wpływającym na zróżnicowanie wartości współczynników dyfuzji wody. Niektóre z wyników zaprezentowanych na przykład przez Hua *et al.* (220) wskazują na to, że czynnik ten prawdopodobnie rzeczywiście nie jest bardzo znaczący. Według ich rezultatów, czasy rezydencji cząsteczek wody przy hydrofilowych i hydrofobowych łańcuchach bocznych są zbliżone.

5.1.3. Współczynnik lokalnego pofałdowania jako miara kształtu powierzchni

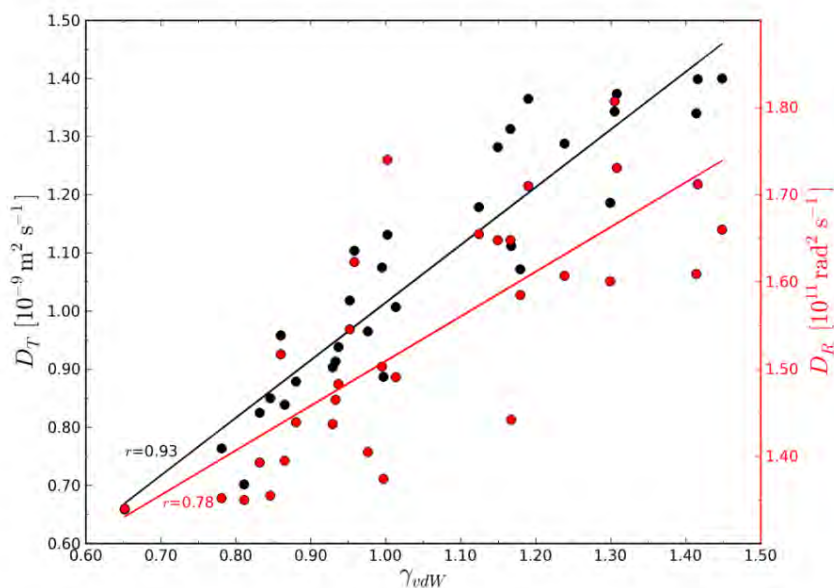
Do bardziej dokładnego przeanalizowania problemu wpływu geometrii powierzchni białka na wartości obliczonych parametrów opisujących właściwości wody posłuży nowo zdefiniowany parametr γ , charakteryzujący geometrię powierzchni kontaktu białka i wody. Sposób jego wyznaczania jest opisany w metodach obliczeniowych. Mniejsze wartości parametru γ

otrzymujemy wtedy, kiedy na jednostkę powierzchni kontaktu pomiędzy wodą i białkiem przypada mniejsza objętość warstwy solwatacyjnej. Im ta objętość będzie mniejsza, tym większego wpływu obecności białka na cząsteczki wody należy się spodziewać. Aby to lepiej zilustrować, dołączyłam **Rys. 5.5**.



Rys. 5.5. Ilustracja koncepcji stojącej za definicją parametru γ . Rysunek przedstawia w sposób schematyczny podział na wielościany Voronoia układu składającego się z cząsteczki zanurzonej w wodzie i wody. Komórki należące do cząsteczki zanurzonej w wodzie oznaczone są na szaro i zielono (kolorem zielonym oznaczono wybrane obszary na powierzchni cząsteczki). Komórki odpowiadające cząsteczkom wody przypisanym warstwom solwatacyjnym oznaczone są na niebiesko (dla uproszczenia, są to tylko komórki dzielące ścianę z komórkami wybranych atomów). Zauważmy, że w przypadku bardziej wypukłych fragmentów cząsteczki, przy tej samej liczbie powierzchniowych atomów cząsteczki zanurzonej w wodzie może zgromadzić się więcej cząsteczek wody niż zmieści się przy tej samej liczbie w przypadku fragmentów bardziej wklęsłych. Z tego powodu stosunek sumarycznej objętości cząsteczek w warstwie solwatacyjnej do całkowitej powierzchni kontaktu tej warstwy z cząsteczką rozpuszczoną będzie się zmieniał (będzie mniejszy dla wklęsłych części i większy dla wypukłych części).

Jak wspomniałam w rozdziale poświęconym omówieniu metod obliczeniowych, sposób liczenia tego parametru ewoluował w toku pracy. Tutaj zamieściłam wykres uzyskany z uwzględnieniem promieni van der Waalsa (czyli metodą trzecią). Aneks zawiera wykres (Rys. A1) wykonany z wykorzystaniem podziału na wielościany Voronoia metodą pierwszą, kiedy sąsiadujące cząsteczki wody były rozważane jako pojedyncze atomy. Wartości parametru γ są nieco inne, ale ogólny przebieg wykresu i wnioski, jakie można wyciągnąć na jego podstawie, się nie zmieniają.



Rys. 5.6. Korelacja pomiędzy parametrem lokalnej szorstkości γ_{vdW} i współczynnikami dyfuzji D_T i D_R dla wody z pierwszych warstw solwacyjnych wybranych obszarów na powierzchni kinezyiny 1MKJ.

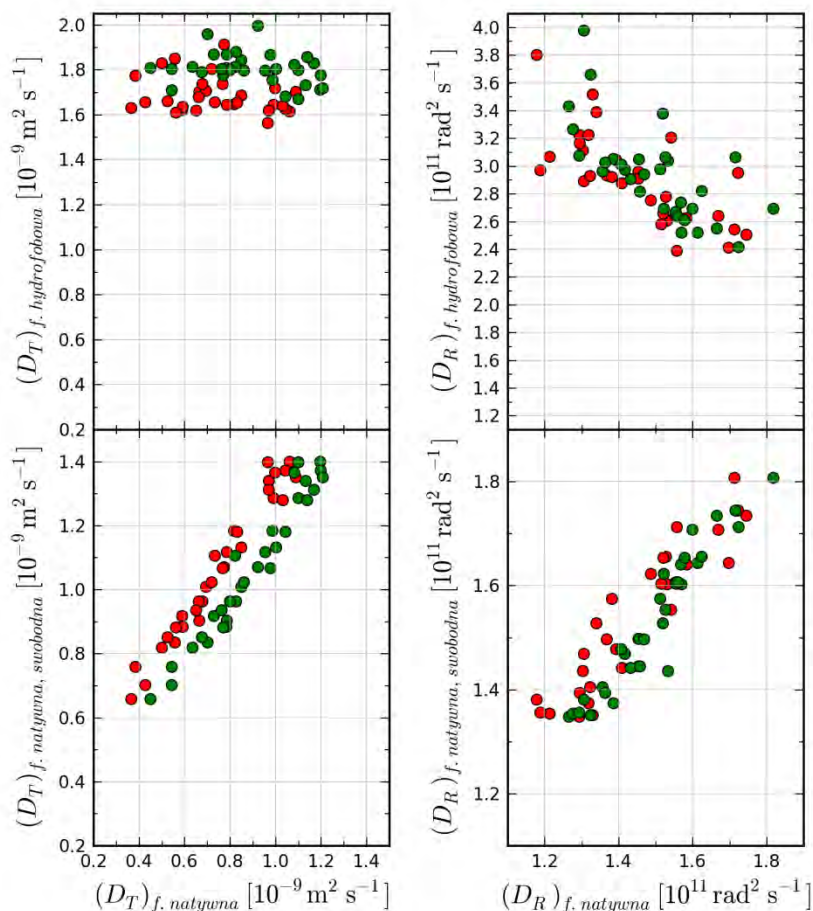
Okazuje się, że występuje wyraźna korelacja pomiędzy wartościami parametru γ_{vdW} i współczynnikami dyfuzji wody solwacyjnej (**Rys. 5.6**). Zatem można przypuszczać, że rzeczywiście najważniejszy wpływ na współczynniki dyfuzji wywiera geometria, natomiast wpływ chemicznych właściwości powierzchni jest dużo mniejszy.

Dla potwierdzenia teorii o różnicującym współczynnikach dyfuzji wody solwacyjnej wpływie geometrii powierzchni makromolekuły, przeprowadzono obliczenia porównawcze dla czysto hydrofobowej postaci cząsteczki białka. Cząsteczka białka była podczas symulacji przytrzymywana, aby zapobiec jej rozwinięciu.

Tak drastyczna zmiana właściwości białka może wpłynąć na zmianę właściwości dynamicznych wody solwacyjnej. Wykres poniżej (**Rys. 5.7**) przedstawia wartości współczynników dyfuzji obliczone dla wody wokół formy hydrofobowej kinezyiny w funkcji współczynników dyfuzji obliczonych wokół naturalnej, przytrzymywanej formy kinezyiny.

Pizzitutti *et al.* (179) pokazali, że unieruchomienie cząsteczki białka wpływa na współczynnik dyfuzji translacyjnej wody solwacyjnej. Wyjaśnienie jest intuicyjne. Aby zaszła dyfuzja, cząsteczka musi przesunąć się w przestrzeni. Nieruchome białko nie zwolni miejsca, aby takie przesunięcie mogło zajść. Cząsteczka może więc zająć tylko miejsce zwolnione przez inną cząsteczkę

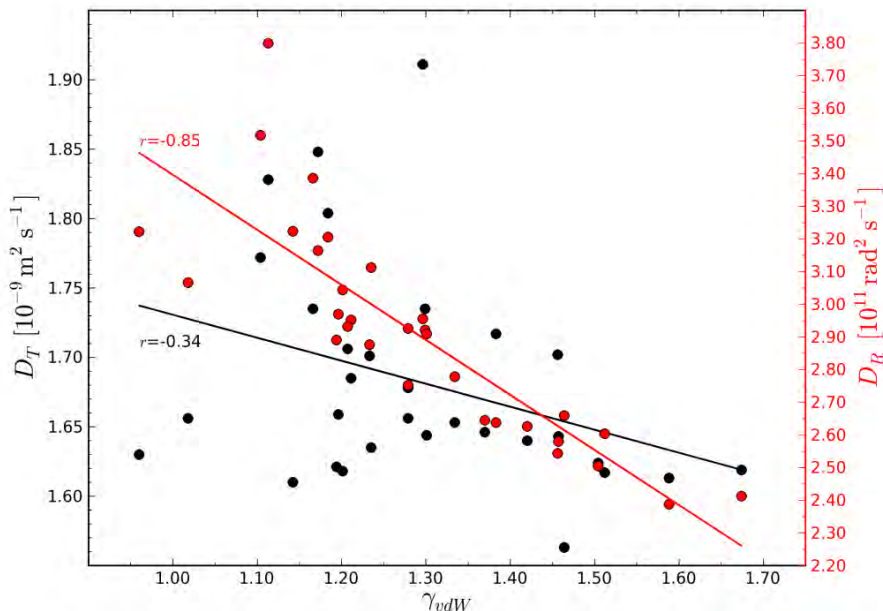
wody. Zjawisko omawiane przez Pizzititti'ego *et al.* widać również w prezentowanych wynikach. Przy czym, chociaż wartości współczynników dyfuzji dla formy natywnej zmieniły się po jej przytrzymaniu, to istnieje korelacja pomiędzy wartościami współczynników dyfuzji wody solwatacyjnej formy swobodnej i przytrzymywanej (**Rys. 5.7**, dolny rząd).



Rys. 5.7. U góry: Współczynnik dyfuzji translacyjnej D_T i rotacyjnej D_R wody w pierwszej otoczce solwatacyjnej wybranych obszarów na powierzchni kinezyny dla przytrzymywanej formy natywnej 1MKJ i przytrzymywanej formy hydrofobowej 1MKJ_0. Na czerwono zaznaczono wyniki dla przypadku, kiedy wszystkie atomy kinezyny były przytrzymywane, natomiast na zielono dla przypadku, kiedy przytrzymywane były tylko atomy szkieletu (bez atomów tworzących łańcuchy boczne). Na dole: Korelacja pomiędzy współczynnikami dyfuzji translacyjnej D_T i rotacyjnej D_R wody solwatacyjnej swobodnej formy natywnej i przytrzymywanej formy natywnej. Oznaczenia kolorystyczne jak u góry.

Wartości współczynników dyfuzji są nieco wyższe w przypadku, kiedy nie przytrzymywano wszystkich atomów białka, a jedynie szkielet.

Z obserwacją Pizzitutti'ego *et al.* zgadza się też fakt, że wartości współczynników dyfuzji translacyjnej i rotacyjnej są w przypadku wody solwatacyjnej cząsteczki hydrofobowej wyraźnie większe. Ponadto wartości współczynników dyfuzji translacyjnej są znacznie mniej zróżnicowane pomiędzy sobą. Współczynniki dyfuzji rotacyjnej pozostały wyraźnie zróżnicowane, przy czym widać tendencję, że tam, gdzie w przypadku kinezyiny w formie natywnej były mniejsze, w przypadku formy hydrofobowej są większe. W przypadku formy natywnej, większe wartości współczynników dyfuzji rotacyjnej były obserwowane dla wody znajdującej się w sąsiedztwie wystających części białka. Zatem dla formy hydrofobowej zależność ta jest najwyraźniej odwrotna. Większą swobodę rotacyjną można tłumaczyć tym, że w zagłębieniach cząsteczka wody sąsiaduje z mniejszą liczbą innych cząsteczek wody, które mogą poprzez wiązania wodorowe spowalniać ich ruchy rotacyjne. Tłumaczenie to zdaje się potwierdzać fakt, że współczynniki dyfuzji rotacyjnej wzrosły nawet powyżej wartości charakterystycznej dla czystej wody (w przeciwieństwie do współczynników dyfuzji translacyjnej). W sposób ilościowy tę prawidłowość ilustruje poniższy wykres (**Rys. 5.8**). Jak widać, współczynnik korelacji pomiędzy wartościami współczynnika dyfuzji rotacyjnej i parametrem γ ma wartość przeciwną niż w przypadku formy natywnej. Ponadto współczynniki dyfuzji rotacyjnej wykazują większą zależność od kształtu powierzchni kontaktu wody i białka niż współczynniki dyfuzji translacyjnej.



Rys. 5.8. Współczynniki dyfuzji translacyjnej D_T i rotacyjnej D_R w funkcji parametru γ_{vdW} dla wody z pierwszych warstw solwacyjnych wybranych obszarów na powierzchni czysto hydrofobowej formy kinezyiny (1MKJ_0).

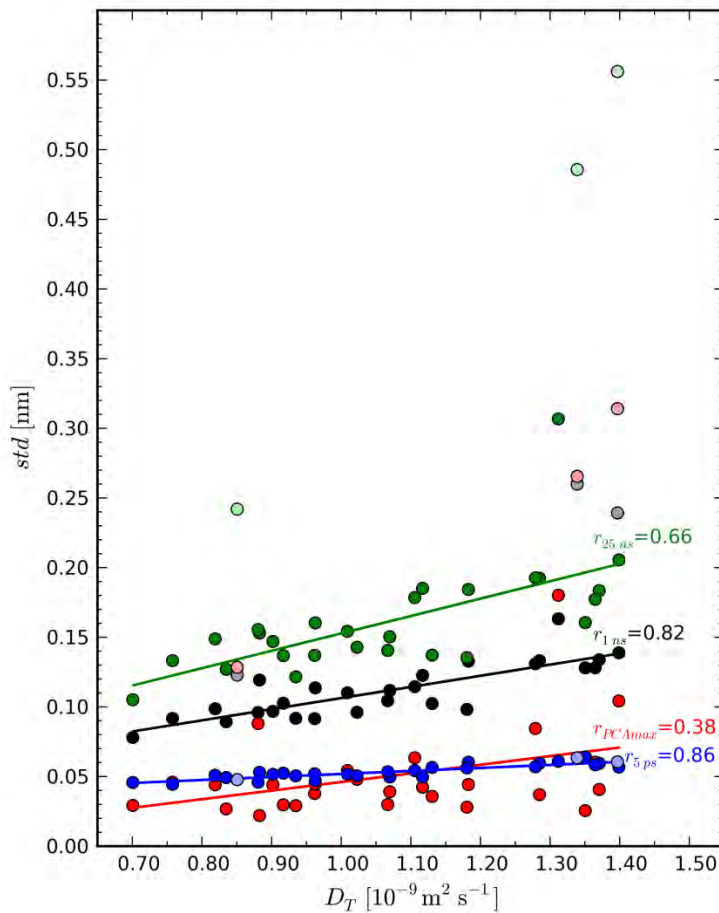
Ta ostatnia obserwacja wraz z faktem mniejszego zróżnicowania wartości współczynników dyfuzji w stosunku do formy natywnej były dość nieoczekiwanymi rezultatami tej analizy. Powrócę krótko do tych wyników w podrozdziale 5.2 i zaproponuję ich wyjaśnienie, omawiając różnice pomiędzy solwatacją hydrofobową i hydrofilową.

Wysoka zmienność wartości współczynników dyfuzji przywiodła mnie następnie do pytania, czy towarzyszy jej analogiczna zmienność w ruchliwości różnych atomów cząsteczki białka.

5.1.4. Ruchliwość powierzchniowych atomów białka

Jak wspomniałam w przeglądzie literatury, istnieją doniesienia dotyczące zmian w ruchliwości całych fragmentów łańcucha białkowego oraz łańcuchów bocznych aminokwasów w zależności od tego, w skład jakiej struktury drugorzędowej wchodzi oraz jaka jest lokalna geometria cząsteczki białka. Dane te potwierdzają intuicję: najbardziej ruchliwe fragmenty cząsteczki białka to te tworzące wypukłe miejsca na jej powierzchni. Jest to sformułowanie ogólnikowe i nie dostarcza informacji na temat stopnia powiązania lokalnej geometrii powierzchni z ruchliwością.

Z drugiej strony mówi się, że ruchliwość białka jest silnie powiązana z ruchliwością wody. Zatem, wychodząc od tego stwierdzenia i chcąc w przybliżony sposób ocenić, czy i jak współczynniki dyfuzji wody solwatacyjnej powiązane są z dynamiką białka, obliczyłam wielkości charakteryzujące ruchliwość powierzchniowych atomów białka, należących do zdefiniowanych obszarów na powierzchni białka. Pod uwagę wzięte zostały wartości odchyłeń od średniego położenia w różnych odcinkach czasowych (25 ns, 1 ns, 5 ps) oraz pierwsza składowa uzyskana w wyniku analizy głównych składowych (PCA). Dokładny opis sposobu ich obliczenia znajduje się w sekcji poświęconej metodom obliczeniowym. Jak wspomniałam w przeglądzie literatury, ruchy białka są niezwykle złożone, a analiza układu o tak wielu stopniach swobody nastrożyc wiele trudności. Analiza głównych składowych pozwala na dobrze uzasadnione zredukowanie złożoności problemu.



Rys. 5.9. Korelacje pomiędzy współczynnikiem dyfuzji D_T wody z pierwszymi otoczek solwatacyjnych i ruchliwością atomów powierzchniowych różnych fragmentów na powierzchni kinezyiny 1MKJ. Na czerwono zaznaczone są punkty odpowiadające najwolniejszej głównej składowej (o największej amplitudzie) uzyskanej w wyniku analizy PCA. Na niebiesko zaznaczono odchylenie standardowe atomów od położenia średniego zmierzone w okresie 5 ps. Na czarno zaznaczono odchylenie standardowe atomów od położenia średniego zmierzone w okresie 1 ns. Na zielono zaznaczono odchylenie standardowe atomów od położenia średniego zmierzone w okresie 25 ns. Jaśniejszymi kolorami oznaczono punkty dla obszarów $\alpha 7$, L11_1 i L11_2, które nie były brane pod uwagę podczas wyznaczania współczynnika korelacji (wyjaśnienie w tekście).

Wykres powyżej (**Rys. 5.9**) przedstawia ruchliwość atomów powierzchniowych kinezyiny (w funkcji współczynnika dyfuzji wody) wyznaczoną w różnych skalach czasowych i różnymi metodami. Większej ruchliwości atomów powierzchniowych białka towarzyszy większa ruchliwość wody w warstwie solwatacyjnej. Współczynnik korelacji rośnie w miarę zmniejszania się długości odcinka czasowego. Należy zaznaczyć, że przy jego

obliczaniu pominięte zostały obszary $\alpha 7$, L11_1 i L11_2, które wyraźnie odstają od pozostałej części cząsteczki i mogą się poruszać w zauważalnym stopniu niezależnie od pozostałych elementów białka. Na wykresie punkty te zaznaczone są jaśniejszymi kolorami. Ponadto ruchliwość nie została obliczona w przypadku obszaru nazwanego $\alpha 2aL4MgADP$, który różni się od pozostałych tym, że zawiera związaną cząsteczkę ADP i jon Mg^{2+} . Ich obecność zapewne wpływa także na ruchliwość najbliższych atomów białka, dlatego obszar ten został pominięty.

Zależność jest silniejsza dla ruchów zachodzących w mniejszej skali czasowej, a więc tych o wyższej częstotliwości. Pierwsza główna składowa uzyskana z analizy PCA ma oddawać najwolniejszy ruch w analizowanej skali czasowej, to znaczy o największej amplitudzie. Jak widać, w tym przypadku korelacja jest najślabsza ($r=0.39$).

Istnienie znaczącej korelacji pomiędzy wartościami współczynnika dyfuzji wody i ruchliwością powierzchniowych atomów białka skłania do stwierdzenia, iż najprawdopodobniej topografia białka powoduje zróżnicowanie ruchliwości atomów powierzchniowych białka oraz właściwości dynamicznych wody solwatacyjnej. Z kolei zmniejszona lub zwiększona ruchliwość wody może dalej wpływać na ruchliwość atomów powierzchniowych białka, różnicując je znacznie pomiędzy poszczególnymi fragmentami cząsteczki. Zatem woda będzie wpływać na ruchliwość różnych atomów białka w różny sposób (zależny od lokalnej geometrii).

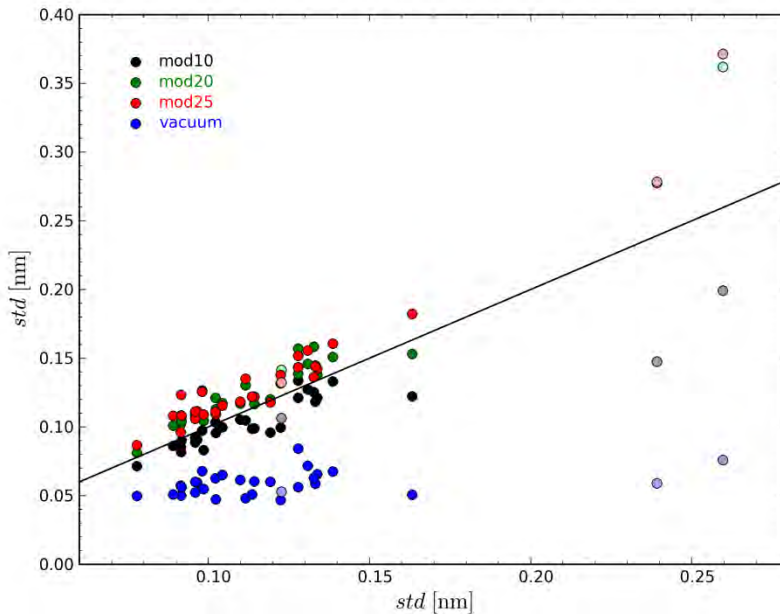
Aby zanalizować bliżej ten problem, użyte zostały zmodyfikowane modele wody (opis modyfikacji w rozdziale poświęconym metodyce) oraz przeprowadzono symulację białka bez rozpuszczalnika (w próżni). Skoro twierdzimy, że rozpuszczalnik wpływa na ruchliwość białka, to zmiana rozpuszczalnika powinna skutkować zmianą ruchliwości atomów powierzchniowych.

Porównanie współczynnika dyfuzji oraz średniej energii wiązań wodorowych i średniej liczby wiązań wodorowych przypadających na jedną cząsteczkę wody obliczonych dla modyfikowanych modeli wody i niezmienionego modelu SPC/E zawiera **Tabela 5.1**. Współczynniki dyfuzji tych modeli wyraźnie różnią się od siebie, więc wpływ zmiany modelu na dynamikę białka powinien być zauważalny. Z drugiej strony, zmodyfikowane modele zachowują gęstość i elektrostatykę modelu SPC/E, dlatego zmiana z punktu widzenia białka nie jest bardzo drastyczna.

Model	D_T [$10^{-9}m^2 \cdot s^{-1}$]	n_{HB}	E_{HB} [kJ/mol]
mod10	1,52	3,48	21,19
SPC/E	2,75	3,28	20,12
mod20	3,71	3,09	19,31
mod25	4,54	2,87	18,51

Tabela 5.1. Podstawowe właściwości modyfikowanych modeli wody wraz z właściwościami wody SPC/E dodanymi dla porównania: współczynnik dyfuzji D_T , średnia liczba wiązań wodorowych n_{HB} , średnia energia wiązania wodorowego E_{HB} .

Na **Rys. 5.10** widać, że dla modeli, w przypadku których współczynnik dyfuzji jest większy niż dla wody SPC/E (mod20 i mod25), ruchliwość powierzchniowych atomów białka jest większa, natomiast dla modelu o mniejszym współczynniku dyfuzji (mod10), ruchliwość powierzchniowych atomów jest mniejsza. W przypadku symulacji w próżni, ruchliwości atomów białka stają się dużo mniej zróżnicowane pomiędzy poszczególnymi obszarami.



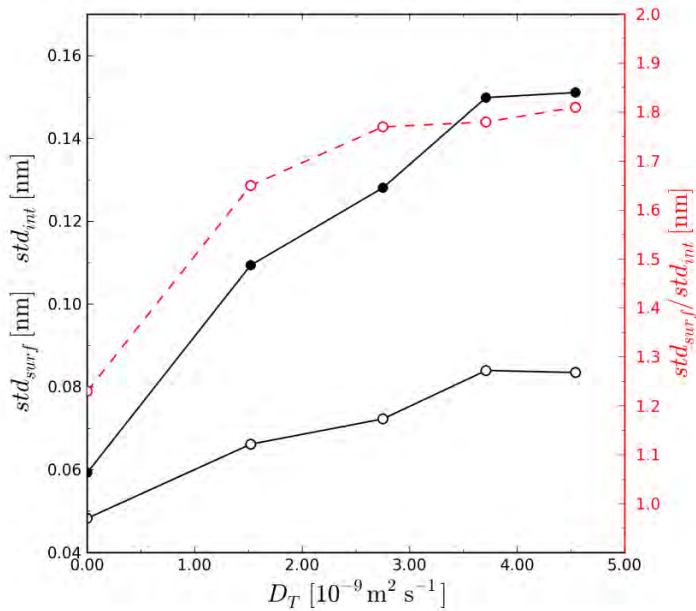
Rys. 5.10. Ruchliwość powierzchniowych atomów kinezyiny 1MKJ w przypadku symulacji w próżni (*vacuum*) oraz z wykorzystaniem modyfikowanych modeli wody (mod10, mod20, mod25) w funkcji ruchliwości atomów białka w wodzie SPC/E. Miarą ruchliwości jest odchylenie standardowe atomów od położenia średniego zmierzone w okresie 1 ns.

Fluktuacje położenia atomów powierzchniowych mogą przenosić się na atomy nieznajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie cząsteczek wody. Problem ten dyskutuje niedawny artykuł Honga *et al.* (265). W tabeli poniżej (**Tabela 5.2**) zawarte są średnie wartości ruchliwości atomów powierzchniowych i wewnętrznych (tzn. wszystkich poza powierzchniowymi). Występuje wyraźna tendencja do zwiększania się ruchliwości atomów wewnętrznych wraz ze zwiększaniem się ruchliwości atomów powierzchniowych.

Model	$(std)_{all}$ [nm]	$(std)_{surf}$ [nm]	$(std)_{int}$ [nm]	$(std)_{surf}/(std)_{int}$
vacuum	0,0521	0,0593	0,0483	1,23
mod10	0,0811	0,1094	0,0662	1,65
SPC/E	0,0915	0,1281	0,0723	1,77
mod20	0,1066	0,1499	0,0840	1,78
mod25	0,1067	0,1511	0,0835	1,81

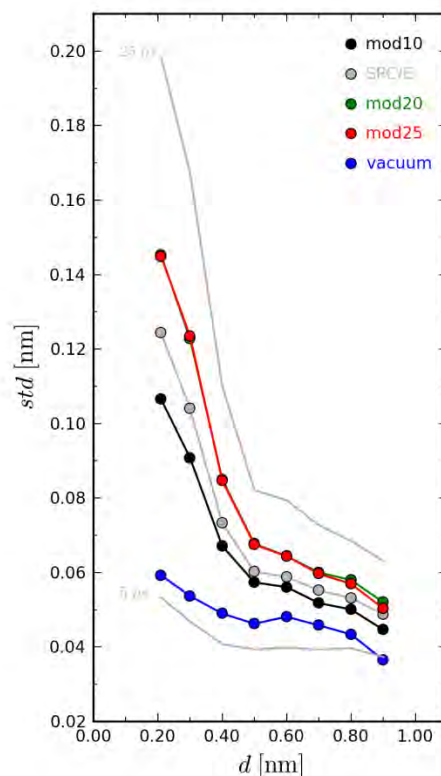
Tabela 5.2. Średnia ruchliwość ciężkich atomów (tzn. wszystkich poza atomami wodoru) kinezyiny 1MKJ dla symulacji w próżni, w wodzie SPC/E oraz w modyfikowanych modelach wody. Wartości te są średnimi otrzymanymi po analizie wielu odcinków trajektorii o długości 1 ns każdy. W kolumnach od lewej: średnia ruchliwość wszystkich atomów białka $(std)_{all}$, średnia ruchliwość powierzchniowych atomów białka $(std)_{surf}$, średnia ruchliwość wewnętrznych atomów białka $(std)_{int}$, stosunek ruchliwości atomów powierzchniowych do ruchliwości atomów wewnętrznych $(std)_{surf}/(std)_{int}$.

Widać jednak (**Rys. 5.11**), że zjawisko to ma swoje granice. Wraz ze wzrostem wartości współczynnika dyfuzji wody, ruchliwość atomów powierzchniowych rośnie, ale wzrost ten zatrzymuje się przy przekroczeniu wartości współczynnika dyfuzji odpowiadającemu modelowi mod20. Zwiększa się także stosunek ruchliwości atomów powierzchniowych do wewnętrznych. Wzrost tego stosunku jest nieliniowy i zachodzi również do momentu, w którym ruchliwość atomów zewnętrznych przestaje rosnać wraz ze wzrostem wartości współczynnika dyfuzji rozpuszczalnika. Najwyraźniej oznacza to, że ruchliwość atomów białka nie jest w stanie zwiększać się tak szybko jak zwiększa się ruchliwość cząsteczek rozpuszczalnika.



Rys. 5.11. Ruchliwość wszystkich atomów powierzchniowych kinezyiny 1MKJ (kolor czarny), wszystkich atomów wewnętrznych kinezyiny (kolor biały) oraz stosunek ruchliwości atomów powierzchniowych do ruchliwości atomów wewnętrznych (kolor czerwony) w funkcji współczynnika dyfuzji kolejnych modeli wody (dla symulacji w próżni przyjęto $D_T = 0$).

Podział atomów białka na tylko dwie kategorie atomów (powierzchniowe i wewnętrzne) jest mało subtelny. Z tego powodu zdecydowałam się zanalizować średnie ruchliwości atomów kinezyiny biorąc pod uwagę kolejne przedziały odległości od cząsteczek wody (tzn. 0-0,25; 0,25-0,35; 0,35-0,45 nm itd. w głąb białka). Wyniki przedstawia **Rys. 5.12**.



Rys. 5.12. Średnia ruchliwość ciężkich atomów kinezyiny 1MKJ, obliczona jako odchylenie standardowe od średniej ich położeń, std , znajdujących się w różnej odległości d od cząsteczek wody. Dane oznaczone kropkami dotyczą odcinka czasowego o długości 1 ns. Różnymi kolorami oznaczono dane dla modelu SPC/E i modyfikowanych modeli wody. Dla porównania zawarte są dane dla modelu SPC/E dla odcinków czasowych 5 ps i 25 ns.

Jak można było się spodziewać, ruchliwość atomów systematycznie i szybko się zmniejsza w miarę przesuwania się w głąb struktury białka. Widać też wyraźnie że, jak wspomniano przed chwilą, w przypadku modyfikowanego modelu wody mod25 ruchliwość atomów białka przestaje nadążać za zwiększającą się ruchliwością wody. Ponadto wpływ wody widoczny jest nawet w przypadku atomów położonych głęboko wewnątrz struktury białka. Szczególnie duża zmiana jest widoczna przy przejściu od symulacji w próżni do symulacji w wodzie.

Analizując te wyniki, należy zawsze pamiętać o niemożności jednoznacznego rozdzielania rotacji cząsteczki białka od jej zmian konformacyjnych (problem ten omówiony jest w rozdziale poświęconym metodom obliczeniowym). Ten czynnik może w niepożądany sposób wpływać na zmierzone ruchliwości atomów.

Kończąc dygresję, warto może w tym miejscu przytoczyć niedawny artykuł Nucci'ego *et al.* (266), który wydaje się dobrze korespondować z omawianymi wynikami. Autorzy tej pracy doświadczalnie wykazali, że wokół różnych fragmentów powierzchni ubikwityny istnieją zgrupowania cząsteczek wody solwatacyjnej charakteryzujące się podobną dynamiką, a przy tym dynamika jednego zgrupowania różni się od sąsiednich zgrupowań. W komentarzu do tej publikacji Hilser (267) napisał, iż najwyraźniej białko potrafi tworzyć niezależne od siebie sieci wiązań wodorowych wokół różnych fragmentów swej powierzchni. Zróżnicowanie właściwości dynamicznych obserwowane przeze mnie w przypadku wody solwatacyjnej kinezyiny jest logicznie spójne z tymi wnioskami.

Otrzymane rezultaty pozwalają dostrzec możliwy wpływ rozpuszczalnika na mechanizm ruchu białka. Ruch kinezyiny wymaga wielkoskalowych przesunięć zachodzących w strukturze trzeciorzędowej białka. Proces ten zachodzi w znacznie dłuższej skali czasowej niż lokalne fluktuacje. Można się jednak spodziewać, że fluktuacje w małej skali mogą wpływać na przechodzenie białka pomiędzy różnymi konformacjami poprzez modyfikowanie bariery energetycznej. Powszechnie mówi się o tym, że w przypadku cząsteczki białka mamy do czynienia z charakterystycznym krajobrazem energetycznym (189). Na złożonej powierzchni entalpii swobodnej występują głębsze i płytsze minima, odpowiadające różnym konformacjom białka. Cząsteczka białka może przechodzić pomiędzy dwiema stabilnymi konformacjami poprzez wiele stanów pośrednich, o wyższej energii. Wprowadzając atomy białka wybiórczo w większy lub mniejszy ruch (zależny od lokalnej geometrii), rozpuszczalnik może ułatwiać zachodzenie fluktuacji potrzebnych do przemieszczania się po powierzchni energii. Twierdzenie to jest tym bardziej uzasadnione, że jak pokazałam, rozpuszczalnik wpływa nie tylko na ruchliwość atomów na powierzchni, ale również tych położonych głębiej w strukturze białka. W ten sposób woda odgrywać może aktywną rolę w poruszaniu się motoru.

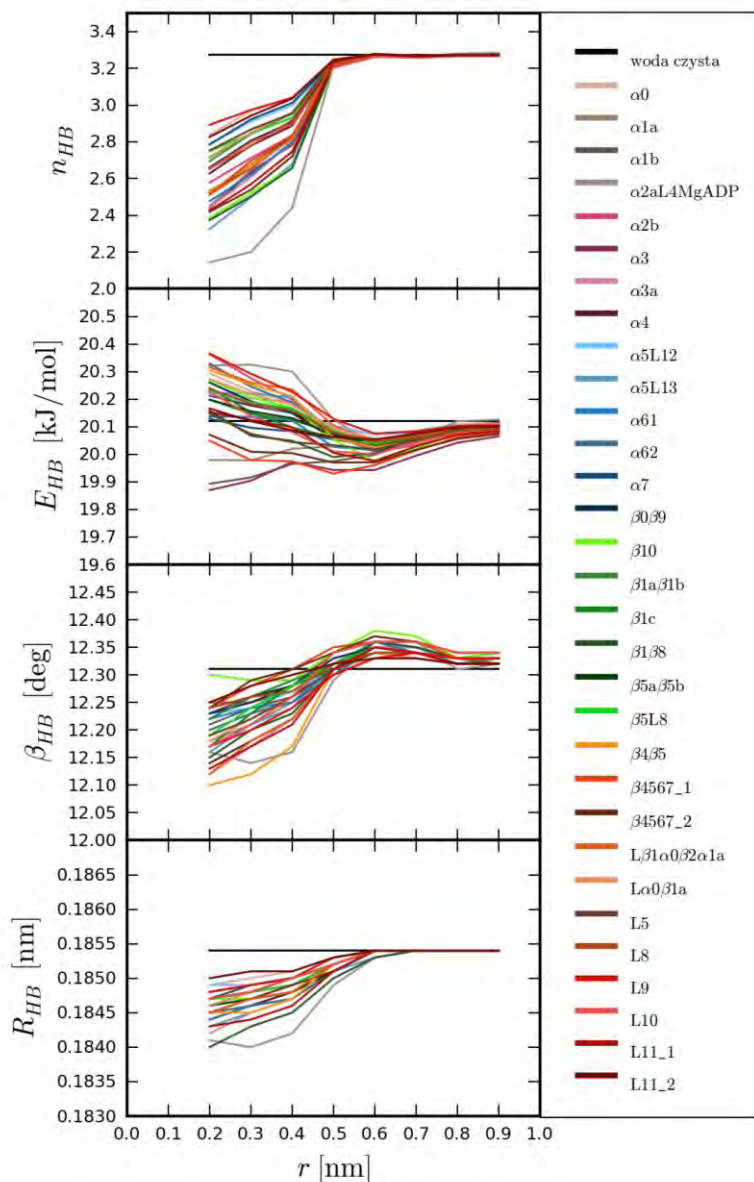
Zaobserwowawszy duże zróżnicowanie właściwości dynamicznych wody solwatacyjnej, postanowiłam sprawdzić, czy podobne zróżnicowanie da się też zauważyć w przypadku jej właściwości strukturalnych.

5.1.5. Geometria i energia wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody

Jako że za specyficzną strukturę wody odpowiadają w dużym stopniu wiązania wodorowe tworzone pomiędzy jej cząsteczkami, analiza średniej geometrii i energii wiązań wodorowych wody solwatacyjnej wydawała się naturalnym pierwszym krokiem analizy ewentualnych zmian strukturalnych.

Zamieszczone w tym podrozdziale wykresy świadczą o tym, że różne cechy wiązań wodorowych nie są w jednakowym stopniu zmienione w otoczeniu kinezyiny, a ponadto osiągają wartości charakterystyczne dla wody czystej przy odmiennych odległościach w miarę oddalania się od białka.

Najwyraźniejszy efekt widoczny w pierwszej warstwie solwatacyjnej to zmniejszenie średniej liczby wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy cząsteczkami wody (**Rys. 5.13**).

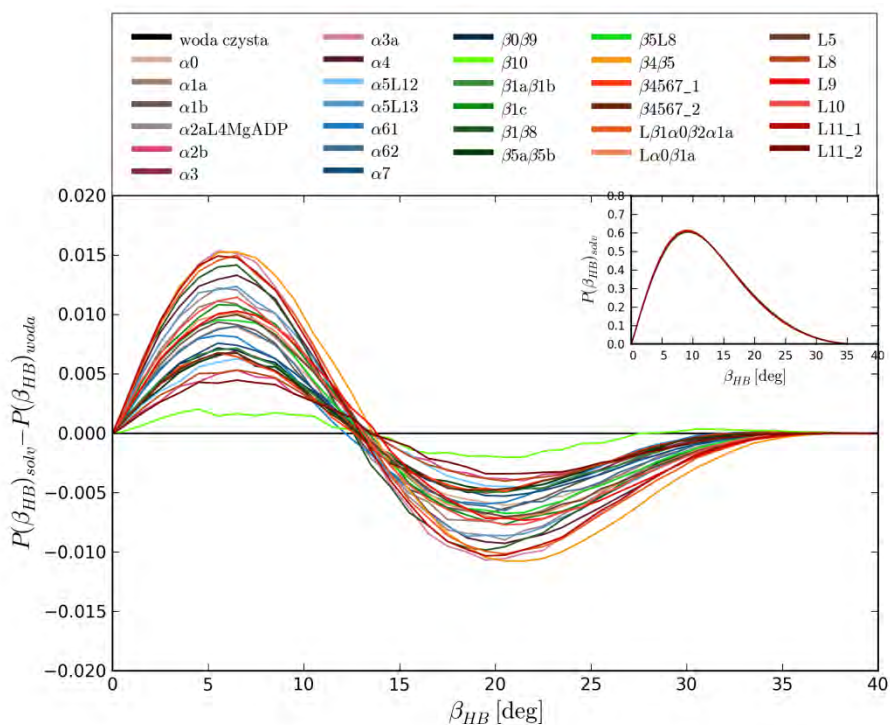


Rys. 5.13. Średnia liczba wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody (n_{HB}), średni kąt wiązania wodorowego (θ_{HB}), średnia energia wiązania wodorowego (E_{HB}), średnia długość wiązania wodorowego (R_{HB}) w kolejnych warstwach wody solwatacyjnej (przy zwiększającej się odległości od białka r) oraz dla czystej wody (czarna linia ciągła). Układ 1MKJ.

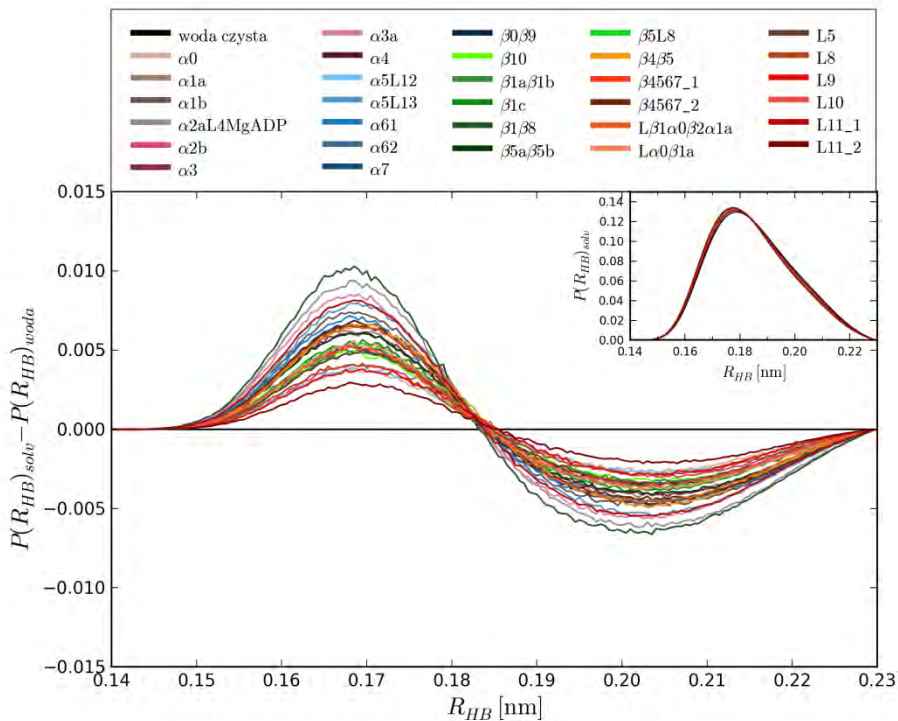
Oczywiste przyczyny spadku liczby wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody solwatacyjnej to możliwość tworzenia wiązań wodorowych z powierzchnią białka oraz fakt, że część przestrzeni wokół cząsteczek wody solwatacyjnej jest zajęta przez białko, a zatem niedostępna innym cząsteczkom wody. Zatem, o ile w czystej wodzie wartość ta może być istotnym parametrem charakteryzującym właściwości strukturalne cieczy, to raczej nie będzie nim w wodzie solwatacyjnej.

Zapytajmy zatem o geometrię pojedynczego wiązania. Wyniki wskazują, że wiązanie nie ulega dużym odkształceniom (nie ma dużych różnic ani w porównaniu z właściwościami wody czystej ani też pomiędzy obszarami). W pierwszej warstwie solwatacyjnej mamy do czynienia z pewnym niewielkim skróceniem średniej długości wiązania wodorowego i z jego nieznacznym wyprostowaniem w porównaniu z wodą czystą. Podobne wyniki uzyskałam wcześniej przy okazji analizy innych układów (128,237).

O ile tuż przy powierzchni białka mamy do czynienia ze zmniejszeniem średniego kąta wiązania, to przy dalszej odległości następuje bardzo niewielkie zwiększenie jego wartości, co jest stowarzyszone z niewielkim zmniejszeniem energii wiązania. Zmiany rozkładu wartości kąta β_{HB} w pierwszej warstwie solwatacyjnej i zmiany rozkładu długości wiązania R_{HB} pokazane są na wykresach poniżej (**Rys. 5.14**, **Rys. 5.15**).



Rys. 5.14. Rozkład prawdopodobieństwa dla kąta θ_{HB} w wiązaniu wodorowym w pierwszych warstwach solwatacyjnych kinezyiny 1MKJ po odjęciu rozkładu prawdopodobieństwa dla czystej wody. Wewnętrzny wykres przedstawia rozkłady uzyskane dla wody solwatacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkład dla wody czystej. Wszystkie linie prawie całkowicie na siebie zachodzą.



Rys. 5.15. Rozkład prawdopodobieństwa dla odległości tlen - wodór (R_{HB}) w wiązaniu wodorowym w pierwszych warstwach solwacyjnych kinezy 1MKJ po odjęciu rozkładu prawdopodobieństwa dla czystej wody. Wewnętrzny wykres przedstawia rozkłady uzyskane dla wody solwacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkład dla wody czystej. Wszystkie linie prawie całkowicie na siebie zachodzą.

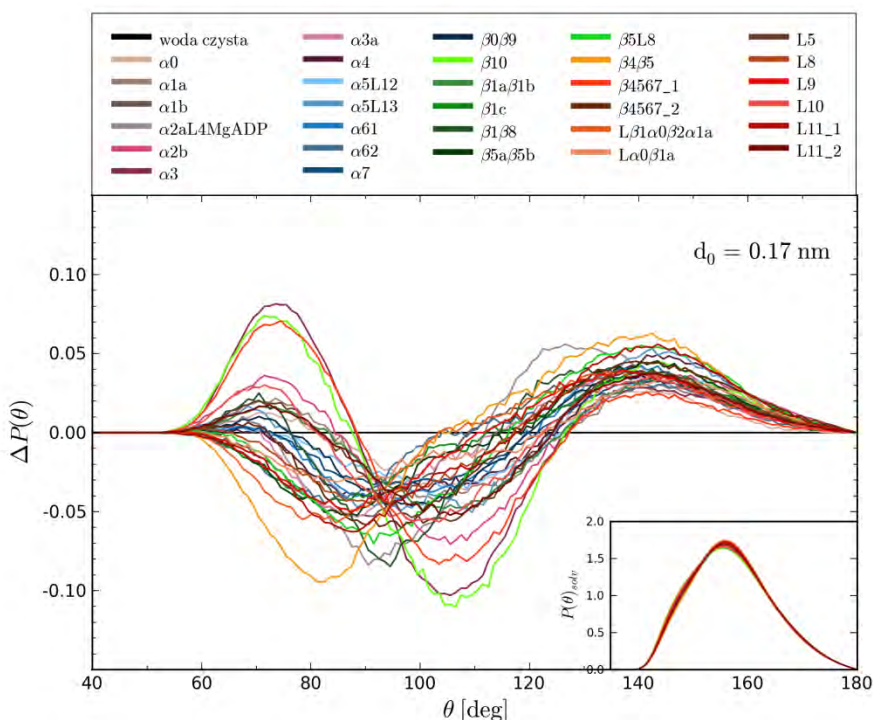
Sam fakt, iż średnia geometria pojedynczego wiązania wodorowego nie jest bardzo zmieniona, nie musi jeszcze oznaczać, że to samo stwierdzenie dotyczy struktury wody. Dlatego zaistniała potrzeba zastosowania dodatkowych parametrów strukturalnych.

Przy ich wyborze i analizie należy pamiętać o trudnościach związanych z asymetrią otoczenia, które powodują, że średnia liczba wiązań wodorowych tworzona przez cząsteczkę wody z warstwy solwacyjnej z innymi cząsteczkami wody nie jest dobrą miarą zmian strukturalnych. Cząsteczki wody sąsiadują z atomami białka z jednej strony, a z innymi cząsteczkami wody z drugiej. Jest to przyczyną, dla której wiele parametrów używanych do charakteryzowania właściwości czystej wody (takich jak średnia liczba wiązań wodorowych, funkcja rozkładu radialnego, parametr tetraedryczności czy LSI) nie nadaje się do bezpośredniego zastosowania w przypadku wody solwacyjnej. Sprawia to, że badanie zmian strukturalnych wody solwacyjnej jest bardzo trudne.

Aby ominąć te trudności w jak największym stopniu, opracowana została procedura obliczeń referencyjnych, opisana w sekcji dotyczącej

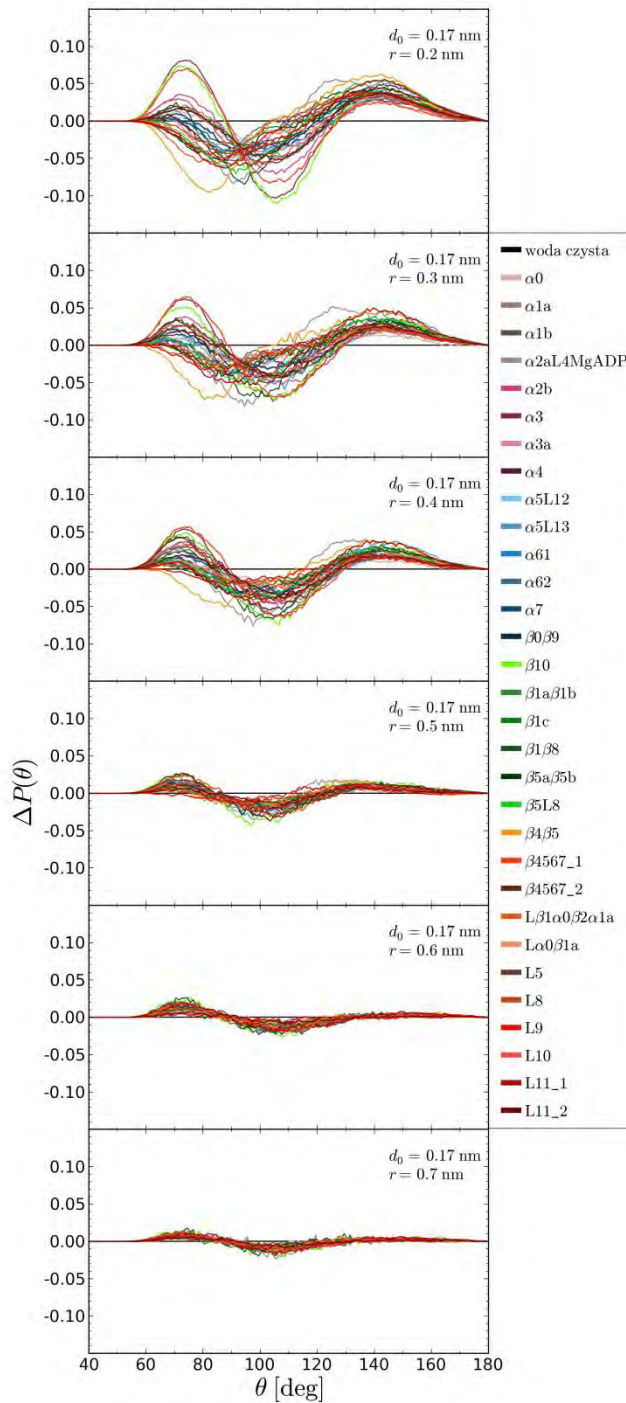
metodyki. Fikcyjna warstwa solwatacyjna była wypełniana cząsteczkami wody o strukturze wody czystej (niezaburzonej), a następnie rezultaty otrzymane tą metodą odejmowane były od rezultatów otrzymanych dla rzeczywistej wody solwatacyjnej.

Pozostając na razie przy zagadnieniu geometrii wiązań wodorowych, zapytałam o sposób ułożenia wiązań wodorowych względem siebie. Wiązania te tworzą w wodzie sieć połączeń. Zmiana wzajemnego ułożenia cząsteczek wody powinna być widoczna w zmianie rozkładu wartości kątów θ zmierzonych pomiędzy wiązaniami wodorowymi tworzonymi przez cząsteczkę centralną z cząsteczkami ją otaczającymi (**Rys. 5.16**, **Rys. 5.17**). Teoretycznie obecność białka mogłaby wpłynąć na rozkład tych kątów, ponieważ wpływa na liczbę sąsiadujących cząsteczek wody. Dlatego zamieszczam tu wykres różnicowy.



Rys. 5.16. Wykres różnicowy rozkładu prawdopodobieństwa dla kątów θ pomiędzy wiązaniami wodorowymi w pierwszych warstwach solwatacyjnych kinezyny 1MKJ. Wewnętrzny wykres przedstawia rozkłady uzyskane dla wody solwatacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkład dla wody czystej. Wszystkie linie prawie całkowicie na siebie zachodzą. Promień odcięcia $d_0=0,17$ nm.

Wyznaczając kąty β_{HB} , analizujemy położenia jedynie dwóch atomów tlenu cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi oraz atomu wodoru, natomiast wyznaczając kąt θ analizujemy każdorazowo trzy atomy tlenu należące do cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi.



Rys. 5.17. Różnicowy rozkład prawdopodobieństwa dla kąta θ pomiędzy wiązaniami wodorowymi w kolejnych warstwach wody solwatacyjnej w odległości r od powierzchni białka. Promień odcięcia $d_0=0.17$ nm. Układ 1MKJ.

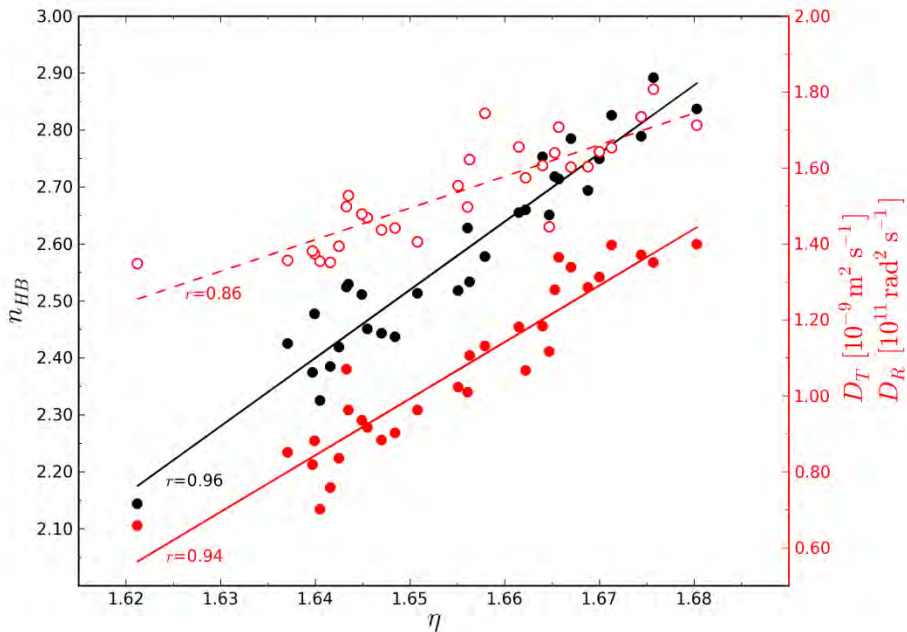
Wykresy rozkładu wartości kątów θ pokazują, że ogólnie sieć wiązań wodorowych zachowuje swoją tetraedryczną charakterystykę. Rozkład wartości kątów θ wykonany dla wody z pierwszej warstwy solwatacyjnej jest bardzo podobny do rozkładu uzyskanego dla czystej wody (**Rys. 5.16**, wykres wewnętrzny) i osiąga maksimum w okolicach 110° . Linie w znacznym stopniu na siebie nachodzą. Tym niemniej, na wykresie różnicowym widać, że dla większości obszarów w okolicach 110° pojawia się minimum. Oznacza to odkształcenie (względne zmniejszenie tetraedryczności) sieci wiązań wodorowych w warstwie solwatacyjnej. Różnice te jednak w żadnym przypadku nie przekraczają kilku procent wartości histogramu. Stosunkowo nieduża deformacja geometrii sieci i pojedynczego wiązania oznacza, iż niewykluczone jest, że z powodu sztywności tej sieci nie każda cząsteczka wody wytworzy optymalną liczbę wiązań wodorowych, a część miejsc wiązania pozostanie niezajęta. O wykryciu takich niezajętych miejsc w wodzie sąsiadującej z niepolarną powierzchnią cząsteczki rozpuszczonej donosi na przykład Perera *et al.* (157).

Analizując sieć wiązań wodorowych możemy się spodziewać, że tym samym analizujemy pewien zbiór najbardziej reprezentatywnych (najbardziej prawdopodobnych) konfiguracji układu. Mimo to, parametry strukturalne oparte na analizie wiązań wodorowych mają tę słabość, iż pojawia się zagrożenie, że ich wartości będą zależały od przyjętej definicji wiązania wodorowego. Co prawda dopóki zastosowana definicja wiązania wodorowego jest racjonalna, dopóty jej zastosowanie powinno prowadzić do racjonalnych wniosków. Jednakże aby opis zmian strukturalnych zachodzących w wodzie solwatacyjnej był szerszy i bardziej wiarygodny, postanowiłam na tym etapie wykorzystać parametry nieużywające definicji wiązania wodorowego. Były to: podział przestrzeni na komórki Voronoia oraz parametry lokalnego uporządkowania oparte na dwucząstkowych funkcjach korelacji.

5.1.6. Wielościany Voronoia

Jak wspomniałam w przeglądzie literatury, podział na komórki Voronoia jest metodą, która była nieraz używana do badania właściwości czystej wody i solwatacji białek. W wyniku podziału przestrzeni na komórki Voronoia, poszczególnym atomom lub cząsteczkom w układzie przypisujemy pewną przynależną im przestrzeń.

Okazało się, że w pierwszej warstwie obserwujemy niezbyt duże, ale wyraźne zmniejszenie się średniej objętości wielościanu Voronoia (pokazuje to każda z wykorzystanych metod). Może to świadczyć o silnym oddziaływaniu cząsteczek wody z powierzchnią białka.



Rys. 5.18. Korelacje pomiędzy średnią liczbą wiązań wodorowych tworzonych przez cząsteczkę wody n_{HB} (kolor czarny), współczynnikiem dyfuzji translacyjnej D_T (kolor czerwony) i rotacyjnej D_R (kolor biały) oraz parametrem asferyczności η dla wody z pierwszych otoczek solwacyjnych wybranych obszarów na powierzchni kinetyzyny 1MKJ.

Kształt komórki Voronoia może być scharakteryzowany za pomocą parametru asferyczności, wprowadzonego przez Ruocco *et al.* (134). Chang *et al.* (137) zauważyli, że asferyczność jako parametr charakteryzujący strukturę wody powiązany jest z ruchami rotacyjnymi cząsteczki. U cząsteczek, dla których wartość parametru asferyczności jest duża, jednocześnie ruchy rotacyjne są powstrzymywane. Natomiast cząsteczki o małej wartości parametru asferyczności wykazują skłonność do swobodniejszych rotacji. Duża wartość parametru asferyczności generalnie oznacza występowanie struktury tetraedrycznej, kiedy cząsteczka tworzy cztery wiązania wodorowe. Natomiast w przypadku małych wartości asferyczności według autorów występuje większe zróżnicowanie lokalnej konfiguracji wiązań wodorowych, z pewną przewagą sytuacji, kiedy jedno wiązanie tworzone jest przez atom tlenu, a jedno tworzone jest przez atom wodoru. Te rezultaty skłoniły mnie do wykonania wykresu zależności średniej liczby wiązań wodorowych i współczynników dyfuzji w funkcji parametru asferyczności dla poszczególnych obszarów solwacyjnych.

Okazało się, że prawidłowość opisana przez Changa *et al.*, a dotycząca układu jednoskładnikowego, obowiązuje także w wodzie solwacyjnej. Istnieje

wyraźna korelacja (dla wody z pierwszej warstwy solwatacyjnej) pomiędzy wartością współczynnika dyfuzji i średnią liczbą wiązań wodorowych tworzących się pomiędzy cząsteczkami wody oraz parametrem asferyczności. Można jednak się domyślać, że inne przyczyny leżą u podstaw powstania tej zależności. Atomy białka charakteryzują się odmiennym ułożeniem przestrzennym (i odmienną dynamiką) niż atomy cząsteczek wody. W przypadku cząsteczki wody znajdującej się w warstwie solwatacyjnej, na wartość parametru asferyczności będzie miało wpływ zarówno ułożenie sąsiednich atomów białka jak i wody. Od ułożenia atomów sąsiadującego fragmentu białka będzie też zależała średnia liczba wiązań wodorowych.

Zatem można wnioskować, że choć parametr asferyczności był niejednokrotnie z powodzeniem stosowany do opisu struktury płynów (134-137), to w przypadku silnie asymetrycznego otoczenia, w jakim znajduje się cząsteczka należąca do pierwszej otoczki solwatacyjnej białka, może nie spełniać oczekiwanej roli, ponieważ jego wartości będą zależały od geometrii powierzchni białka. W rezultacie wartości te będą inne nawet gdyby struktura wody solwatacyjnej się nie zmieniła.

Korelacje pomiędzy średnią liczbą wiązań wodorowych i parametrem asferyczności oraz pomiędzy współczynnikiem dyfuzji i parametrem asferyczności oznaczają także występowanie korelacji pomiędzy współczynnikiem dyfuzji i średnią liczbą wiązań wodorowych (dla porównania korelacja pokazana została na **Rys. 5.21**). Jest to całkowicie zgodne z wnioskiem, do którego doszłam wcześniej, to znaczy że współczynnik dyfuzji zależy od geometrii powierzchni białka. W przypadku średniej liczby wiązań wodorowych i współczynnika dyfuzji, czynnik geometryczny utrudniający kontakt pomiędzy cząsteczkami wody i oddziaływania elektrostatyczne sprzyjające tworzeniu wiązań z powierzchnią białka będą zmieniły oba te parametry w ten sam sposób, powodując obniżenie ich wartości.

Podsumowując, korelacje współczynnika dyfuzji ze średnią liczbą wiązań wodorowych oraz korelacje parametru asferyczności ze średnią liczbą wiązań wodorowych mogą być interpretowane jako przejaw znacznego wpływu geometrii białka na obliczone wartości parametrów charakteryzujących właściwości wody.

Skoro na średnią liczbę wiązań wodorowych tak duży wpływ ma kształt powierzchni granicznej pomiędzy wodą i białkiem (dla porównania przedstawia to **Rys. 5.22**), to odwołajmy się do zastosowanej już procedury obliczeń referencyjnych dla fikcyjnej warstwy solwatacyjnej wypełnionej wodą czystą. Obliczyłam różnicę w średniej liczbie wiązań wodorowych pomiędzy wodą solwatacyjną i wodą o strukturze wody czystej wypełniającej warstwę solwatacyjną, po czym sporządziłam nowe wykresy tej różnicy, Δn_{HB} , w funkcji współczynnika dyfuzji i parametru γ_{vdW} . Okazało się znaczne poprzednio korelacje zniknęły. Znak różnicy Δn_{HB} jest dodatni, co świadczy o tym, że sieć wiązań wodorowych usiłuje się dopasować, w granicach możliwości, do nowej sytuacji zwiększając na tyle, na ile to możliwe, liczbę kontaktów pomiędzy cząsteczkami wody (wcześniej, przy okazji dyskusji geometrii wiązań wodorowych, wspomniałam o niewielkim zmniejszeniu jej tetraedryczności). Znaczne pogorszenie się korelacji pomiędzy średnią liczbą wiązań wodorowych

i parametrem γ_{vdW} po zastąpieniu wielkości n_{HB} parametrem Δn_{HB} wskazuje, jak się wydaje, na to, że na zmiany strukturalne w wodzie solwatacyjnej lokalna geometria ma wpływ niewielki (w przeciwieństwie do wpływu na współczynniki dyfuzji wody).

Aby potwierdzić te przypuszczenia lub im zaprzeczyć, przejdę do analizy kolejnego parametru strukturalnego, to znaczy parametrów lokalnego uporządkowania.

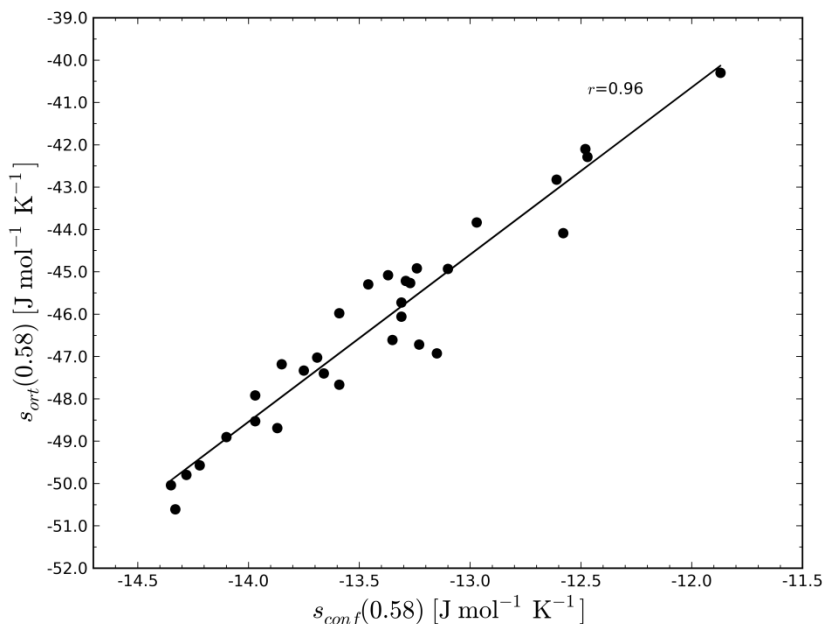
5.1.7. Parametry lokalnego uporządkowania

Parametry uporządkowania, jak zostało to omówione w rozdziale poświęconym metodom obliczeniowym, zostały zdefiniowane z zastosowaniem dwucząstkowych funkcji korelacji. Wartości parametru $s_{tra}(r)$ zależą od odległości środków mas pary cząsteczek. Parametry, których wartości zależą dodatkowo od wzajemnej orientacji cząsteczek to $s_{ort}(r)$ i $s_{conf}(r)$. Do wyznaczenia parametru $s_{ort}(r)$ potrzeba pełnej informacji o wzajemnej orientacji cząsteczek, co w praktyce sprowadza się do ustalenia wzajemnej orientacji dwóch układów współrzędnych, związanych z dwiema cząsteczkami. Parametr $s_{conf}(r)$ jest natomiast uproszczoną wersją parametru $s_{ort}(r)$. Do jego wyznaczenia potrzebna jest jedynie znajomość położenia środka masy cząsteczki otoczenia w układzie współrzędnym związanym z cząsteczką centralną.

Chociaż parametry zostały policzone w oparciu o formalizm matematyczny, który może posłużyć do obliczenia dwucząstkowych wkładów do entropii, to nie można ich z nim utożsamiać. Jednakże w przypadku czystej wody, parametry $s_{ort}(r)$ i $s_{conf}(r)$ stają się równoznaczne z dwucząstkowymi wkładami do entropii $s_{ort}^{(2)}$ i $s_{conf}^{(2)}$ (pod warunkiem wybrania odpowiedniego promienia r).

Dla czystej wody symulowanej w różnych temperaturach znaleziono liniową zależność pomiędzy dwucząstkowymi wkładami do entropii $s_{ort}^{(2)}$ i $s_{conf}^{(2)}$ (127). W pracy (129) zaproponowano zastosowanie parametru $s_{conf}(0.58)$ zamiast $s_{ort}(0.58)$ dla wody solwatacyjnej. Taka możliwość jest bardzo pożądana, ponieważ wyznaczenie parametru s_{ort} jest dużo bardziej czasochłonne niż wyznaczenie parametru s_{conf} (parametr s_{ort} wymaga próbkowania dużej ilości danych wejściowych, żeby poprawnie wyliczyć histogramy i, co z tym związane, dłuższego czasu symulacji).

Należałoby sprawdzić, czy pomiędzy tymi dwoma parametrami występuje współzależność w wodzie solwatacyjnej wokół różnych obszarów kinezy. Z uwagi na czasochłonność symulacji i obliczeń, zależność pomiędzy parametrami została zbadana dla warstwy solwatacyjnej o podwójnej grubości (0-0,8 nm).

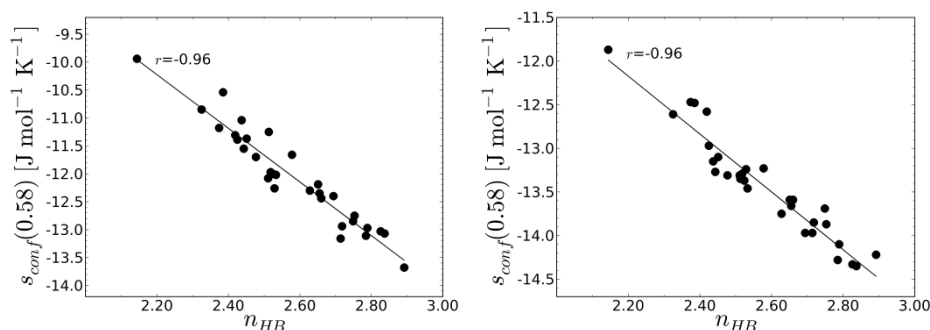


Rys. 5.19. Korelacja pomiędzy parametrami $s_{ord}(0.58)$ i $s_{conf}(0.58)$. Parametry były policzone dla otoczek solwatacyjnych o podwójnej grubości (0,8 nm). Układ 1MKJ.

Nie będzie bezpodstawnym przypuszczenie, że korelacja ta zachodzi również w przypadku warstwy solwatacyjnej o pojedynczej grubości (0-0,4 nm). Poprawność tego założenia może potwierdzić w pewnym stopniu zależność przedstawiona na **Rys. 5.20**. Zilustrowano tam korelację pomiędzy wartością parametru $s_{conf}(0.58)$ (obliczonego dla otoczki solwatacyjnej o podwójnej i pojedynczej grubości) ze średnią liczbą wiązań wodorowych w pierwszej otoczce solwatacyjnej.

Otóż w pracy (127) pokazano, że występuje współzależność pomiędzy średnią liczbą wiązań wodorowych w wodzie a dwucząstkowym wkładem do entropii $s_{conf}^{(2)}$. Istnienie takiej korelacji wskazuje na znaczną rolę wiązania wodorowego w kształtowaniu struktury wody. W przypadku dwucząstkowego wkładu do entropii $s_{conf}^{(2)}$ nie mamy do czynienia z kątem obciążenia i z promieniem obciążenia w takim znaczeniu, w jakim występuje on w wielu definicjach wiązania wodorowego, a więc analizujemy szersze spektrum wzajemnych orientacji cząsteczek wody. Mimo to obserwujemy tak wyraźną korelację. Analizując, z punktu widzenia wybranej cząsteczki centralnej, sąsiadujące cząsteczki powiązane z nią wiązaniami wodorowymi, a następnie przechodząc do kolejnych cząsteczek połączonych wiązaniami wodorowymi z nimi itd., otrzymamy pewien zestaw punktów w przestrzeni konfiguracyjnej. Istnienie dyskutowanej korelacji może uprawniać stwierdzenie, iż tak

otrzymany zestaw punktów w sporej części pokrywa się z najbardziej prawdopodobnymi obsadzeniami, które kształtują wartości $s_{conf}^{(2)}$. Jednakże omawiana współzależność z pracy (127) dotyczy sytuacji, kiedy za zrywanie wiązań wodorowych oraz za zmianę wartości $s_{conf}^{(2)}$ odpowiedzialne są ruchy termiczne, więc niekoniecznie podobna zależność musi występować w wodzie solwatacyjnej. Niemniej jednak, jak widać na załączonym wykresie, parametr $s_{conf}(0.58)$ jest wyraźnie skorelowany ze średnią liczbą wiązań wodorowych w pierwszej otoczce solwatacyjnej.



Rys. 5.20. Korelacja pomiędzy średnią liczbą wiązań wodorowych przypadających na jedną cząsteczkę wody n_{HB} w pierwszych otoczkach solwatacyjnych a parametrem s_{conf} obliczonym dla warstwy solwatacyjnej o grubości równej 0,4 nm (z lewej) oraz o grubości 0,8 nm (z prawej). Układ 1MKJ.

Korelacja jest zachowana zarówno w przypadku pojedynczej, jak i podwójnej grubości warstwy. Spróbujemy teraz użyć zmodyfikowanych wartości parametrów uporządkowania do zlokalizowania źródła tej korelacji. Po analizie dotychczasowych wyników, spodziewam się tu znowu wyraźnego wpływu geometrii białka na obliczenia.

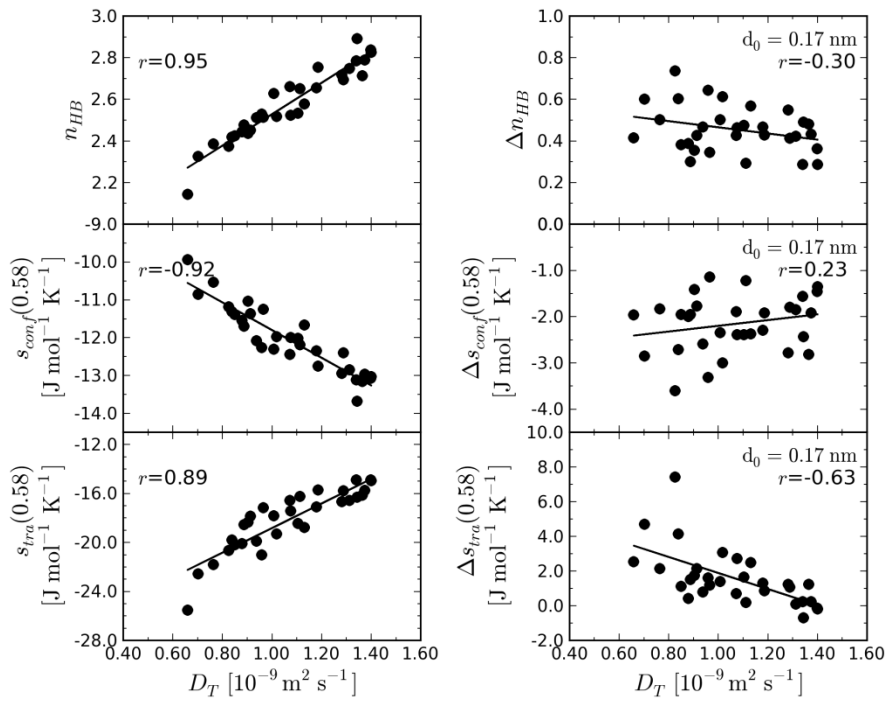
Powodem zróżnicowania wartości parametrów uporządkowania dla poszczególnych warstw solwatacyjnych będą zmiany w lokalnej strukturze wody oddziałującej z wybranym obszarem białka, ale nie tylko. W przypadku cząsteczek wody obecnych w warstwie solwatacyjnej mamy do czynienia z tym, że niektóre fragmenty przestrzeni są zajęte przez białko, a co za tym idzie, pozbawione cząsteczek wody. Będzie to miało wpływ na wartości dwucząstkowej funkcji korelacji, a zatem także na zdefiniowane z jej użyciem parametry uporządkowania. Nieuwzględnienie tych zmian może prowadzić do fałszywych wniosków.

Aby tego uniknąć, wykorzystałam procedurę, która uwzględnia opisany efekt „wyłączonej objętości”. Jak opisano w części dotyczącej metodyki, zmodyfikowany parametr uporządkowania ma w założeniu oddawać zmiany w wewnętrznej strukturze wody (we wzajemnej orientacji i odległościach międzycząsteczkowych) w porównaniu z wodą czystą, ale być nieczuły na obecność pozbawionej cząsteczek wody przestrzeni, gdzie znajduje się białko.

Trzeba dodać, że tak zmodyfikowany parametr może być oczywiście wciąż w pewnym stopniu czuły na kształt powierzchni granicznej woda-białko, jeżeli kształt ten wpływa na wewnętrzną strukturę wody.

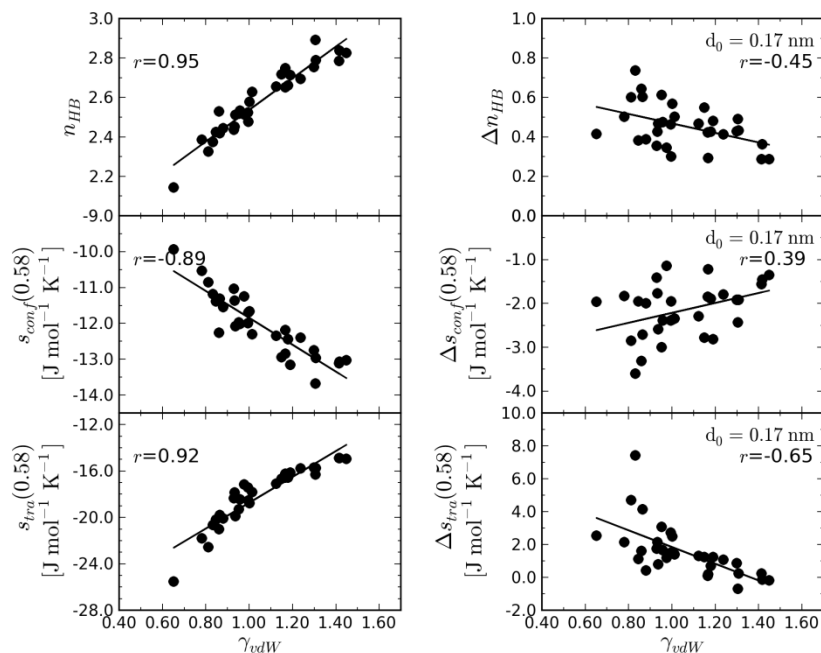
Porównajmy, jak przebiega zależność wartości tego parametru od współczynników dyfuzji i parametru γ . Fakt, że wartości parametru s_{conf} (0.58) zależą między innymi od kształtu sąsiadującego fragmentu białka, tłumaczy, że występuje wyraźna korelacja liniowa pomiędzy s_{conf} (0.58) i współczynnikiem dyfuzji (które również zależą od kształtu), natomiast prawie jej nie ma pomiędzy współczynnikiem dyfuzji i parametrem Δs_{conf} (0.58).

Stąd można wnosić, że współczynniki dyfuzji (i inne zmierzone parametry z nimi skorelowane) wody solwatacyjnej nie są mocno związane ze zmianami strukturalnymi w wodzie solwatacyjnej (których zakres powinny w zamyśle mierzyć parametry Δs), ale zależą głównie od kształtu powierzchni granicznej pomiędzy białkiem i wodą. Wcześniej, na podstawie analizy korelacji pomiędzy Δn_{HB} i parametrem γ_{vdW} , twierdziłam, iż oznacza to stosunkowo niewielki wpływ kształtu powierzchni na zmiany strukturalne wody. Analiza parametrów Δs potwierdziła to przypuszczenie.



Rys. 5.21. Parametry n_{HB} , Δn_{HB} , s_{conf} , Δs_{conf} , $s_{tra}(0.58)$ oraz $\Delta s_{tra}(0.58)$ w funkcji współczynnika dyfuzji D_T dla wody z pierwszych otoczek solwatacyjnych różnych obszarów na powierzchni kinezyiny 1MKJ. Promień odcięcia używany przy liczeniu parametrów różnicowych $d_0=0.17$ nm.

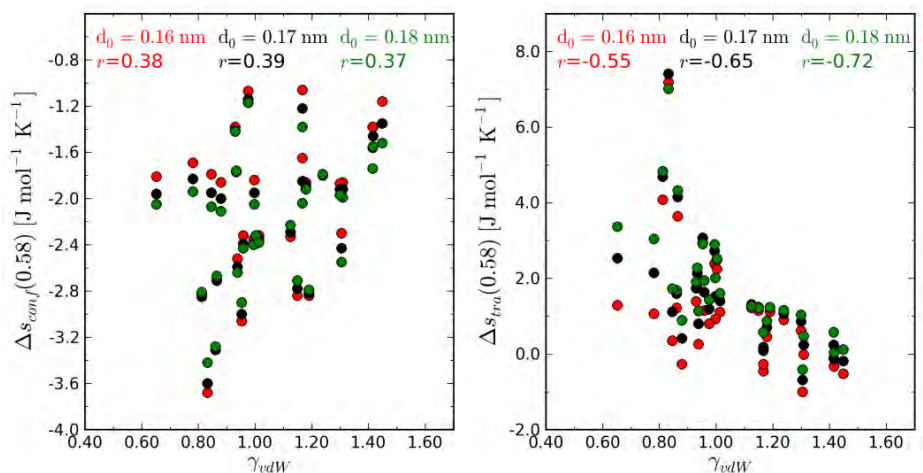
Istotnie, wartości Δs_{conf} są rzeczywiście bardzo słabo skorelowane z parametrem kształtu γ_{vdW} , podczas gdy wartości s_{conf} skorelowane były silnie.



Rys. 5.22. Parametry n_{HB} , Δn_{HB} , s_{conf} , Δs_{conf} , $s_{tra}(0.58)$ oraz $\Delta s_{tra}(0.58)$ w funkcji parametru γ_{vdW} dla wody z pierwszych otoczek solwatacyjnych różnych obszarów na powierzchni kinezyiny 1MKJ. Promień odcięcia używany przy liczeniu parametrów różnicowych $d_0=0.17$ nm.

Trochę lepsza (choć nie imponująca) korelacja występuje pomiędzy parametrem $\Delta s_{tra}(0.58)$ i parametrem γ_{vdW} . Wartości parametru Δs_{tra} zależą od zmiany w odległościach pomiędzy cząsteczkami wody. Wynik ten zatem sugeruje występowanie pewnej (niezbyt ścisłej) zależności pomiędzy gęstością wody i kształtem powierzchni granicznej woda-białko. O zależności takiej wspominali Merzel i Smith (217). Dla porównania pokazana jest korelacja pomiędzy współczynnikiem dyfuzji i parametrami $s_{tra}(0.58)$ oraz $\Delta s_{tra}(0.58)$ (Rys. 5.21). Zagadnienie gęstości wody solwatacyjnej podejmę jeszcze w dalszej części pracy.

Zamieszczam tu też wyniki obliczeń porównawczych, wykonanych dla parametrów $\Delta s_{tra}(0.58)$ i $\Delta s_{conf}(0.58)$. Na poniższych wykresach przedstawiona jest zależność pomiędzy ich wartościami obliczonymi z zastosowaniem różnych promieni odcięcia i parametrem γ_{vdW} opisującym kształt powierzchni granicznej.



Rys. 5.23. Parametry $\Delta s_{trn}(0,58)$ i $\Delta s_{conf}(0,58)$ obliczone przy użyciu różnych wartości promieni odcięcia d_0 w funkcji parametru γ_{vdW} . Układ 1MKJ.

Otrzymane wartości parametrów uporządkowania są oczywiście nieco inne, ale użycie innej wartości d_0 nie wpłynęło jakościowo na przebieg wykresu i wnioski, jakie można z niego wyciągnąć.

5.1.8. Podsumowanie

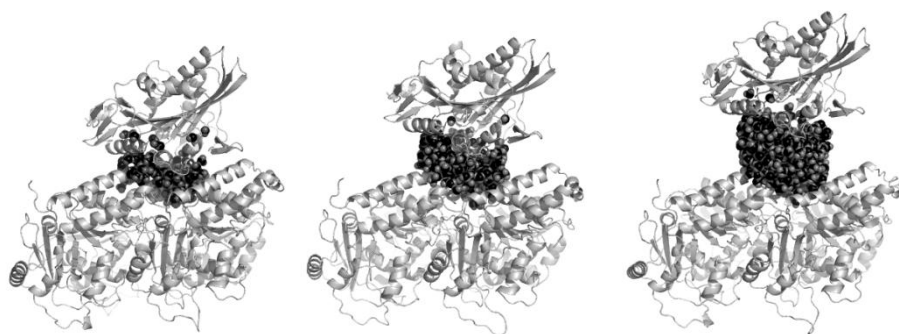
Po wykonaniu pierwszej części pracy, na podstawie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że szereg właściwości wody solwatacyjnej jest odmiennych od właściwości wody czystej, a ponadto różnią się one w sąsiedztwie poszczególnych obszarów na powierzchni białka. Wielkość tych różnic zależy od mierzonego parametru.

Nie udało się jednak zauważyć zależności pomiędzy strukturalnymi i dynamicznymi właściwościami wody w sąsiedztwie wybranych obszarów na powierzchni białka a kierunkiem ruchu motoru. Jednakże odkryto korelację pomiędzy ruchliwością cząsteczek wody solwatacyjnej (determinowaną kształtem powierzchni granicznej białko – woda) a ruchliwością atomów białka. Dzięki mniejszemu lub większemu wpływowi na ruchliwość atomów białka (zależnie od jego lokalnej geometrii), cząsteczki wody mogą pośrednio wpływać na wielkoskalowe zmiany strukturalne różnych fragmentów białka w odmienny sposób, a przez to ułatwiać ruch motoru jako całości.

5.2. Woda solwatacyjna w obszarze pomiędzy domeną katalityczną kinezyiny a dimerem tubulinowym

Praca kinezyiny jest związana z cyklicznym przyłączaniem i odłączaniem głowicy motorycznej od mikrotubuli. Procesom tym towarzyszy raz to usuwanie (przynajmniej częściowe) wody spomiędzy dwóch białek, a następnie powtarne pełne solwatowanie. Literatura poświęcona właściwościom wody solwatacyjnej znajdującej się pomiędzy dwoma białkami nie jest bardzo bogata (a w szczególności jeśli chodzi o motory motoryczne).

Ponieważ dimer tubulinowy, kinezyina i cząsteczki wody stanowią duży układ (wymagający pod względem czasu symulacji, potrzebnego miejsca na dysku i czasu analizy trajektorii), zdecydowałam się skoncentrować na analizie trzech różnych odległości pomiędzy białkami, sugerując się pracą (220). Odległości 0,4, 1,2 i 2,0 nm wydawały się racjonalne z punktu widzenia pracy motoru i wystarczająco zróżnicowane.

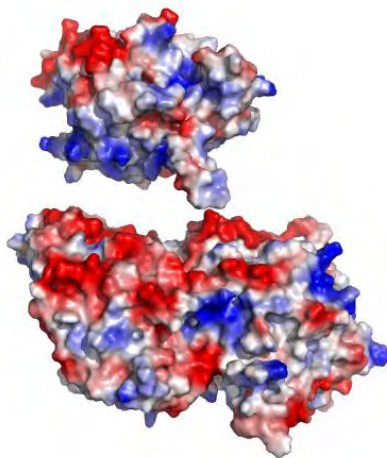


Rys. 5.24. Trzy układy składające się z dimeru tubulinowego 1JFF, kinezyiny 1BG2 i wody. Od lewej: 1BG2_1JFF_4, kinezyina odsunięta od dimeru tubulinowego o 0,4 nm; 1BG2_1JFF_12, kinezyina odsunięta od dimeru tubulinowego o 1,2 nm; 1BG2_1JFF_20, kinezyina odsunięta od dimeru tubulinowego o 2,0 nm. W obszarze pomiędzy białkami uwidocznione są cząsteczki wody (model sferyczny, atom tlenu w kolorze czarnym). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Trzy skonstruowane układy składające się z kinezyiny i dimeru tubulinowego przedstawia **Rys. 5.24**. Wybrane atomy na powierzchni dimeru tubulinowego, służące za punkt odniesienia do obliczeń, znajdują się na jego powierzchni, pod cząsteczką kinezyiny. Jak widać na rysunku poniżej (**Rys. 5.25**), jest to powierzchnia obdarzona znaczącym ładunkiem ujemnym. Z kolei na spodniej stronie kinezyiny występują ładunki dodatnie.

Naturalnie, wraz ze zwiększaniem się odległości pomiędzy białkami, rośnie liczba cząsteczek wody zawartych pomiędzy nimi. Przy czym może się zdarzyć, że w przypadku każdego z układów ciągle będziemy znajdować cząsteczki wody przy promieniach przekraczających zadeklarowane odsunięcie

kinezyne od dimeru tubuliny w stosunku do struktury referencyjnej (to znaczy kinezyne spoczywającej na tubulinie). Można to wytłumaczyć tym, że w położeniu początkowym białka bardzo ściśle do siebie nie przylegały, a po odsunięciu możliwa była swobodna hydratacja ich powierzchni. Z drugiej strony, po rozpoczęciu zbierania trajektorii mogły zachodzić bardzo powolne ruchy dyfuzyjne kinezyne względem tubuliny. Ponadto powierzchnia kinezyne skierowana ku mikrotubuli jest, zwłaszcza na brzegach, nieregularna, a tym samym może tam znaleźć się miejsce dla kilku cząsteczek wody.



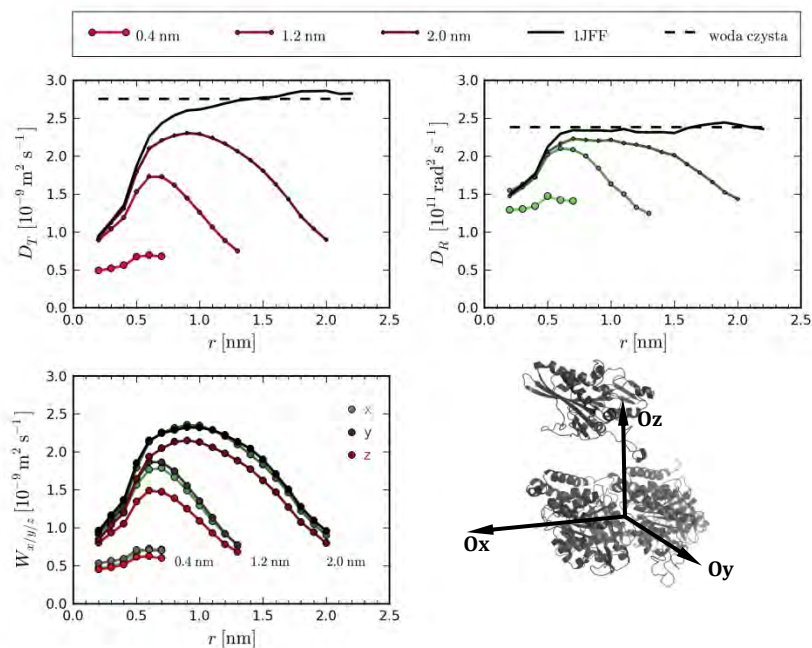
Rys. 5.25. Przybliżony rozkład gęstości ładunku na powierzchni domeny katalitycznej kinezyne 1BG2 oraz dimeru α i β -tubuliny (bez uwzględniania wpływu rozpuszczalnika) otrzymany za pomocą programu PyMOL. Niebieski kolor odpowiada ładunkom dodatnim, a czerwony ładunkom ujemnym.

Wartości parametrów opisujących właściwości wody były wyznaczone przeze mnie na dwa sposoby, w zależności od potrzeb. Pierwszy z nich polegał na badaniu kolejnych przedziałów odległości, liczonych od wierzchniej części dimeru tubulinowego (analogicznie jak miało to miejsce w przypadku kinezyne). Drugi sposób wykorzystywał podział obszaru pomiędzy białkami na pierwszą warstwę solwatacyjną licząc góry tubuliny, pierwszą warstwę solwatacyjną spodu kinezyne i wodę pozostałą, zawartą w obszarze „pośrednim”, czyli tym znajdującym się poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi obu białek. Pomocny powinien być tu **Rys. 5.24**, obrazujący względne położenia obu białek.

W niektórych przypadkach podaję także wyniki otrzymane dla samego dimeru tubulinowego (układ 1JFF). Obliczenia te miały na celu sprawdzenie, czy i w jakim stopniu obecność drugiej powierzchni białkowej w postaci kinezyne wpłynie na zmianę właściwości wody solwatacyjnej samego dimeru.

Postanowiłam zacząć analizę podobnie jak zaczęłam ją w przypadku pojedynczego białka – od obliczenia wartości współczynników dyfuzji wody.

5.2.1. Współczynniki dyfuzji wody zawartej w warstwie solwatacyjnej



Rys. 5.26. U góry: Współczynniki dyfuzji translacyjnej D_T i rotacyjnej D_R dla wody w kolejnych przedziałach odległości od dimeru tubulinowego dla układów 1JFF, 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20 oraz dla wody czystej (linia przerywana). Na dole: Współczynniki dyfuzji liczone w układzie współrzędnych związanym z dimerem tubulinowym i kinezyną $W_{x/y/z}$ dla wody w kolejnych przedziałach odległości od dimeru tubulinowego dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20. Obok rysunek przedstawiający układ współrzędnych związany z kinezyną i dimerem tubulinowym. Oś Ox przebiega przez środki mas obu tubulin, oś Oz wskazuje od tubuliny w kierunku środka masy kinezyiny.

Jak widać na załączonych wykresach (**Rys. 5.26**), woda obecna pomiędzy kinezyną i tubuliną charakteryzuje się znaczną heterogenicznością pod względem wartości współczynników dyfuzji. Ich wartości zależą zarówno od odległości cząsteczek wody od dimeru tubulinowego jak i od wzajemnej odległości białek. W przeciwieństwie do wyników prezentowanych w pracy (220), dotyczącej wody pomiędzy dwiema podjednostkami białkowymi, która posłużyła za punkt wyjściowy przy doboru wzajemnej odległości białek, współczynniki dyfuzji translacyjnej nie przybierają wartości równych wartości charakterystycznej dla wody czystej nawet dla najdalszego oddalenia kinezyiny i dimeru tubulinowego. Przyczyny tej różnicy w rezultatach mogą być dwie. Z jednej strony może to być inny charakter chemiczny powierzchni białkowych. Badane przez autorów białko charakteryzowało się hydrofobowymi

powierzchniami, natomiast zdecydowanie nie można tego samego powiedzieć o przypadku analizowanym tutaj, gdzie obserwujemy wiele aminokwasów obdarzonych ładunkiem ujemnym na powierzchni tubuliny i dodatnim na powierzchni kinezy. Ponadto pętla L11 kinezy jest wypukłym elementem strukturalnym, który wystaje dość znacznie w stronę tubulin i z tego powodu może w pewien sposób wpływać na zmierzone wartości współczynnika dyfuzji.

Jeżeli chodzi o współczynniki dyfuzji rotacyjnej, potwierdza się znany fakt, że współczynniki te hamowane są w mniejszym stopniu niż współczynniki dyfuzji translacyjnej. Mimo to, choć teoretycznie współczynnik dyfuzji rotacyjnej powinien przyjąć wartości charakterystyczne dla czystej wody przynajmniej w środkowym przedziale odległości dla układu 1BG2_1JFF_20 (jak sugeruje porównanie z wynikami dla samej tubuliny), to jednak jego wartości są minimalnie mniejsze w całym zakresie odległości (prawdopodobnie z tych samych powodów, co współczynniki dyfuzji translacyjnej).

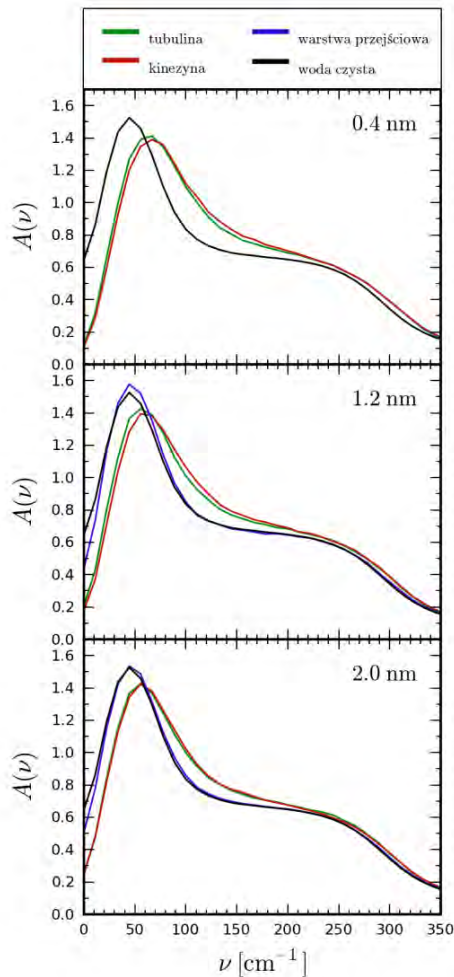
Wyniki porównawczych obliczeń dla układu zawierającego pojedynczy dimer tubulinowy wskazują, że gdyby nie obecność kinezy, współczynniki dyfuzji wody szybciej osiągałyby wartości charakterystyczne dla czystej wody w kolejnych przedziałach odległości od dimeru tubulinowego. Dotyczy to przede wszystkim białek odległych od siebie o 0,4 i 1,2 nm. Jak można zauważyć, dla układu białek oddalonych o 2,0 nm w przedziale odległości 0,2-0,5 nm od dimeru tubulinowego właściwości wody odpowiadają tym, które charakteryzują wodę solwatacyjną samego dimeru, zatem wprowadzenie dodatkowej powierzchni białka odległej o 2,0 nm nie spowodowało pogłębienia się zmian we właściwościach dynamicznych wody solwatacyjnej dimeru tubulinowego. W tym samym przedziale odległości od powierzchni dimeru, dla białek oddalonych o 0,4 nm wyraźnie widać, że wartości współczynników dyfuzji są dużo mniejsze niż byłyby w przypadku samego dimeru tubulinowego. Częsteczki wody zdecydowanie zaczynają czuć się uwięzione pomiędzy dwiema płaszczyznami.

Na tym etapie badań, po analizie współczynników dyfuzji wody solwatacyjnej, okazało się, że nie ujawniają się żadne szczególne cechy, które mogłyby być interpretowane jako zachowanie wyjątkowe, mogące służyć usprawnianiu pracy motoru (przez szczególne rozumienie wykraczające poza cechy omówione już przy okazji dyskusji współczynników dyfuzji i ruchliwości atomów białka domeny motorycznej). Zdecydowałam się jednak sprawdzić, czy jakieś ukryte cechy dynamiki wody solwatacyjnej nie ujawnią się, jeżeli zmienię układ współrzędnych, w którym obliczam współczynniki dyfuzji. Postanowiłam związać układ współrzędnych z kinezyną i dimerem tubulinowym tak, aby oś O_x przebiegała przez środki mas tubulin, a oś O_z wskazywała od tubuliny w kierunku środka masy kinezy. Sposób zdefiniowania osi przedstawiony jest na **Rys. 5.26**. W ten sposób oś O_x jest mniej więcej równoległa do kierunku ruchu motoru, a oś O_z jest równoległa do kierunku, w jakim zachodzi osiadanie kinezy na mikrotubuli. Miałam nadzieję, że być może dzięki temu uda się zauważyć jakiś związek współczynników dyfuzji z kierunkiem ruchu białka i znaleźć dowód na ułatwiający przesuwanie się motoru po szlaku wpływ cząsteczek wody. Podział ten jednak nie przyniósł oczekiwanych rezultatów. Współczynniki dyfuzji mierzone wzdłuż każdej osi okazały się do siebie bardzo podobne. Nieznacznie odróżniały się jedynie współczynniki zmierzone wzdłuż

osi Oz. Otóż okazało się, że ruch wzdłuż osi Oz jest bardziej hamowany niż ruch w dwóch pozostałych kierunkach. Narzucającym się, dosyć oczywistym wyjaśnieniem jest fakt, że cząsteczki wody doświadczają większej trudności przy poruszaniu się w ograniczonej przestrzeni w dół lub w górę pomiędzy białkami, natomiast nieco bardziej swobodnie jest im kierować się na zewnątrz, poza obszar pomiędzy białkami.

Ostatnią próbą uzyskania bardziej szczegółowego obrazu ruchów wody solwatacyjnej było otrzymanie tak zwanego widma mocy prędkości (co czyni się poprzez transformację Fouriera funkcji autokorelacji prędkości). Ta technika wykorzystana była przeze mnie już wcześniej przy okazji analizy otoczki solwatacyjnej poliglicyny (128).

Jak wspomniałam w przeglądzie literatury (81,82,268,269), ruchom translacyjnym przypisuje się dwa główne pasma w okolicach 50 i 200 cm^{-1} , natomiast ruchom rotacyjnym szerokie pasmo z maksimum zlokalizowanym w okolicach 600 cm^{-1} . Pasma odpowiadające rotacyjnej części widma jest szerokie i niesymetryczne, a ponadto trudne w analizie. Dlatego ograniczę się do przedstawienia tu jedynie części translacyjnej widma.



Rys. 5.27. Widmo mocy prędkości translacyjnej dla wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej dimeru tubulinowego, kinezyzny oraz w warstwie przejściowej, poza pierwszą warstwą solwatacyjną (dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20). Dla porównania dodane jest też widmo dla czystej wody.

Na **Rys. 5.27** można zaobserwować dwa pasma przy wartościach liczby falowej równej mniej więcej 50 i 200 cm^{-1} . Według najbardziej rozpowszechnionej opinii, pierwszy z tych pików należy przypisać ruchom translacyjnym utrudnionym w wyniku uwięzienia w „klatce” z sąsiednich cząsteczek (81). Drugi pik przypisuje się drganiom związanym z obecnością wiązań wodorowych (81,269). Położenie punktu przecięcia z osią pionową, tzn. przy liczbie falowej równej zero odzwierciedla wartość współczynnika dyfuzji wody. Na wykresach widać duże różnice w wartościach $A(\nu=0)$ pomiędzy

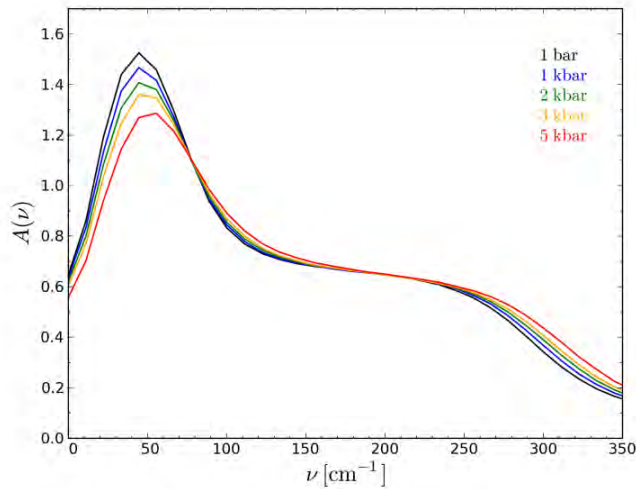
pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi oraz warstwą obejmującą wodę poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi obu powierzchni.

Odległość [nm]		D_T [$10^{-9}\text{m}^2\text{s}^{-1}$]	D_R [$10^{11}\text{rad}^2\text{s}^{-1}$]	v_{max} [cm^{-1}]
0,4	Tubulina	0,45	1,20	54,3
	Kinezyzna	0,38	1,10	56,3
1,2	Tubulina	0,84	1,44	50,3
	Kinezyzna	0,71	1,33	52,0
	Warstwa prz.	1,85	2,15	42,4
2,0	Tubulina	1,01	1,53	49,3
	Kinezyzna	1,03	1,55	50,6
	Warstwa prz.	2,14	2,21	41,9
SPC/E		2,75	2,38	41,0

Tabela 5.3. Wartości współczynników dyfuzji translacyjnej D_T i rotacyjnej D_R oraz położenie maksimum głównego pik w widmie mocy prędkości translacyjnej v_{max} dla wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej tubuliny i kinezyzny, poza pierwszą warstwą solwatacyjną oraz dla czystej wody (otrzymane w wyniku rozłożenia widma na trzy składowe gaussowskie).

Widmo uzyskane dla wody solwatacyjnej, nawet tej zawartej w obszarze poza pierwszą otoczką solwatacyjną, wykazuje różnice w porównaniu z przebiegiem uzyskanym dla wody czystej. Największa różnica dotyczy tego, że główny pik z maksimum zlokalizowanym w okolicach 50 cm^{-1} przesuwa się ku większym wartościom liczby falowej w przypadku wody solwatacyjnej. Drugie pasmo, z maksimum zlokalizowanym w okolicach 200 cm^{-1} , zmieniło się mniej wyraźnie. Podobny rezultat uzyskałam w przypadku wody solwatacyjnej poliglicyny (128), o takich cechach widma wody solwatacyjnej pisze również na przykład Chakraborty *et al.* (82). Otrzymane widmo rozłożyłam na składowe Gaussowskie, aby otrzymać ilościową informację o wielkości przesunięć. Załączyłam tylko dane dotyczące pierwszego pasma (przy 50 cm^{-1}), ponieważ jest lepiej wykształcone i bardziej symetryczne niż drugie (przy 200 cm^{-1}), dlatego rezultaty rozkładu są dla niego bardziej wiarygodne (**Tabela 5.3**). Przesunięcie jest równe około 10 cm^{-1} w przypadku pierwszej otoczki solwatacyjnej i około 1 cm^{-1} dla wody poza pierwszą otoczką solwatacyjną. O ile przesunięcie pierwszego pasma mogę interpretować jako objaw zwiększonej sztywności struktury cieczy, jak wspomniałam w przeglądzie literatury, to mniejsza zmiana położenia drugiego pasma może być powiązana z faktem, że niewiele zmienia się również energia wiązania wodorowego (dane na **Rys. 5.30**).

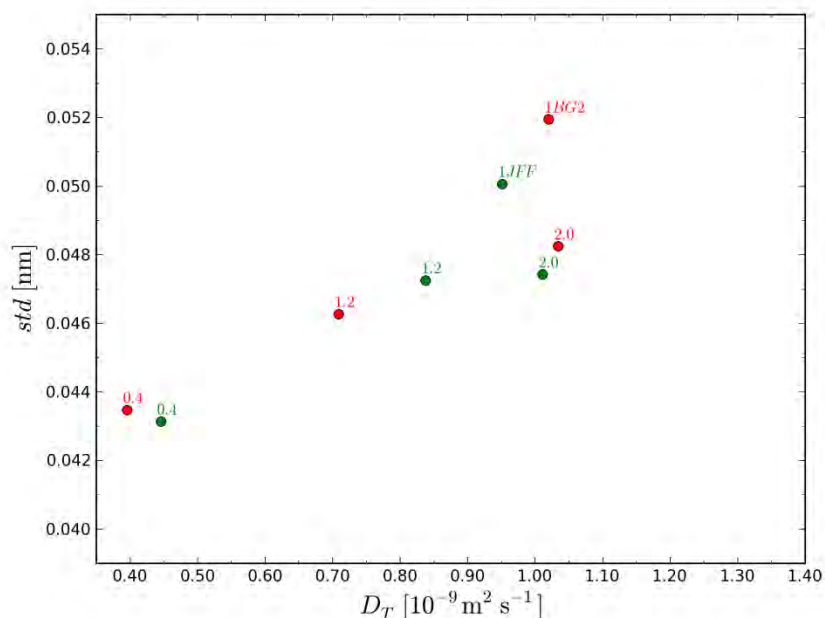
Jak zostanie to opisane i przedyskutowane dalej, woda solwatacyjna pomiędzy białkami ma zwiększoną gęstość (w porównaniu z wodą czystą). Przesunięcie położenia pierwszej składowej widma w kierunku większych liczb falowych oznacza silniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe, co dobrze pasuje do obserwacji dotyczących wzrostu gęstości tej wody. Wzrost gęstości cieczy (wody) można także wymusić zwiększeniem ciśnienia. Dla porównania sporządzone zostały widma mocy uzyskane dla czystej wody SPC/E pod zwiększonym ciśnieniem (**Rys. 5.28**), dobranym tak (z przedziału $1\text{ bar} \div 5\text{ kbar}$), aby otrzymać przyrost gęstości wody zbliżony do tego, o którym mówi się przy okazji wody solwatacyjnej białek.



Rys. 5.28. Widmo mocy prędkości translacyjnej dla czystej wody SPC/E pod różnymi ciśnieniami (1 bar ÷ 5 kilobarów).

Zwiększenie ciśnienia skutkowało przyrostem gęstości wody, od 0,9981 g/cm³ przy ciśnieniu 1 bara do 1,1579 g/cm³ przy ciśnieniu 5 kilobarów. Taki, około 15-procentowy, wzrost gęstości odpowiada wzrostowi gęstości, o jakim wspomina się w literaturze w kontekście wody solwacyjnej, jak było to omówione w rozdziale 3.3. Otrzymany obraz widma (zarówno jego kształt, jak i zmiana położenia głównych pasm) bardzo przypomina ten obserwowany dla wody solwacyjnej. Rezultat ten potwierdza moją, przedstawioną powyżej, interpretację obserwowanych zmian w widmie mocy.

5.2.2. Ruchliwość powierzchniowych atomów białka



Rys. 5.29. Współczynniki dyfuzji translacyjnej D_T w pierwszej warstwie solwatacyjnej oraz średnie odchylenia standardowe położenia wybranych powierzchniowych atomów dimeru tubulinowego od położenia średniego wyznaczone w przedziale czasu równym 5 ps dla układów 1JFF, 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20 (zielone kropki). Współczynniki dyfuzji translacyjnej D_T w pierwszej warstwie solwatacyjnej oraz średnie odchylenia standardowe położenia wybranych powierzchniowych atomów kinezyiny od położenia średniego wyznaczone w przedziale czasu równym 5 ps dla układów 1BG2, 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20 (czerwone kropki).

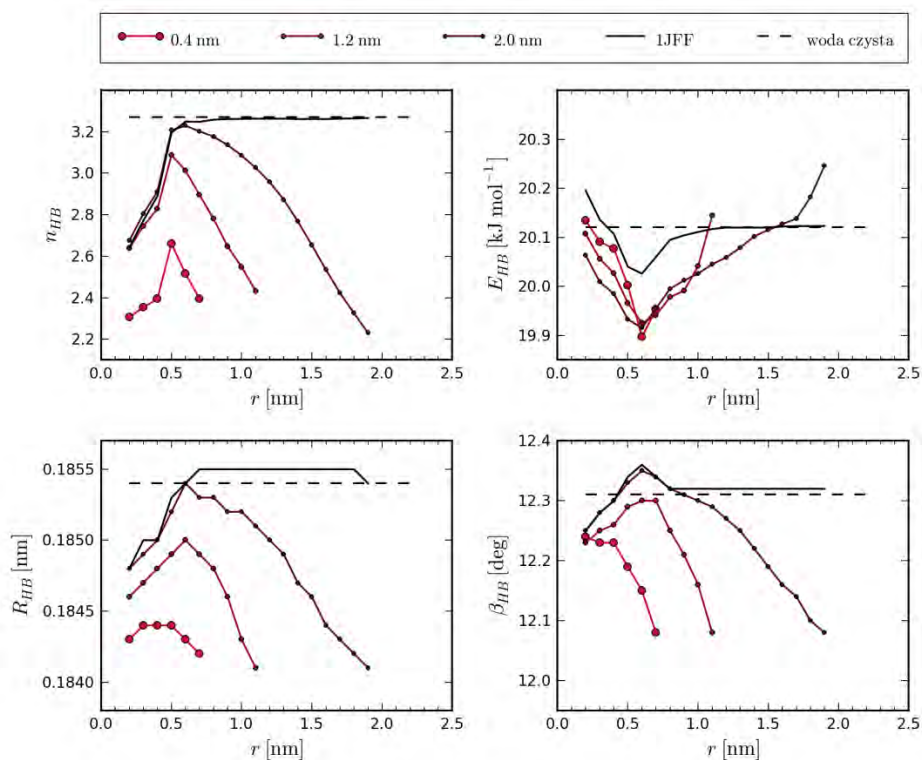
Ponieważ współczynniki dyfuzji wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej dimeru tubulinowego różniły się pomiędzy poszczególnymi układami, postanowiłam sprawdzić, czy zmienia się również ruchliwość atomów białka. W przypadku samej kinezyiny, obserwowałam zróżnicowanie ruchliwości powierzchniowych atomów należących do różnych obszarów na powierzchni kinezyiny, a ruchliwość ta zmieniała się wraz ze zmianą współczynników dyfuzji wody solwatacyjnej. Ponieważ spośród wszystkich zanalizowanych przedziałów czasowych korelacja pomiędzy tymi wielkościami była największa dla długości odcinka równej 5 ps, również obecnie analizowałam średnią ruchliwość powierzchniowych atomów tubuliny i kinezyiny w okresie 5 ps.

Okazało się, że również w tym przypadku można mówić o ogólnej tendencji zwiększania się ruchliwości powierzchniowych atomów białka wraz ze zwiększaniem się współczynnika dyfuzji wody. Tym razem jednak za każdym

razem mierzę ruchliwość tego samego zbioru atomów, a nie atomów wchodzących w skład odmiennych fragmentów białka. Mimo to również występują różnice w ich właściwościach dynamicznych. Tam, gdzie średni współczynnik dyfuzji wody w otocze solwatacyjnej jest największy, tam występują też największe fluktuacje atomów białka. Wskazuje to po raz kolejny na bezpośredni wpływ ruchliwości cząsteczek wody na ruchliwość atomów białka (przynajmniej w analizowanej niewielkiej skali czasowej).

Przy referowaniu dalszych wyników postanowiłam, w miarę możliwości, trzymać się kolejności zastosowanej w poprzednim rozdziale. Przejdę teraz zatem do parametrów strukturalnych, rozpoczynając od geometrii wiązań wodorowych. Struktura wody solwatacyjnej może mieć znaczenie dla oddziaływań pomiędzy białkami z podobnych powodów, dla których na przykład miała znaczenie dla oddziaływań białka przeciwdziałającego zamarzaniu płynów komórkowych z powierzchnią lodu, które to zagadnienie omówione zostało w przeglądzie literatury. Podobieństwo strukturalne otoczek solwatacyjnych może ułatwiać zbliżanie się białek na wczesnych etapach oddziaływania, zanim dojdzie do bezpośredniego kontaktu aminokwasów.

5.2.3. Geometria i energia wiązań wodorowych tworzonych pomiędzy cząsteczkami wody

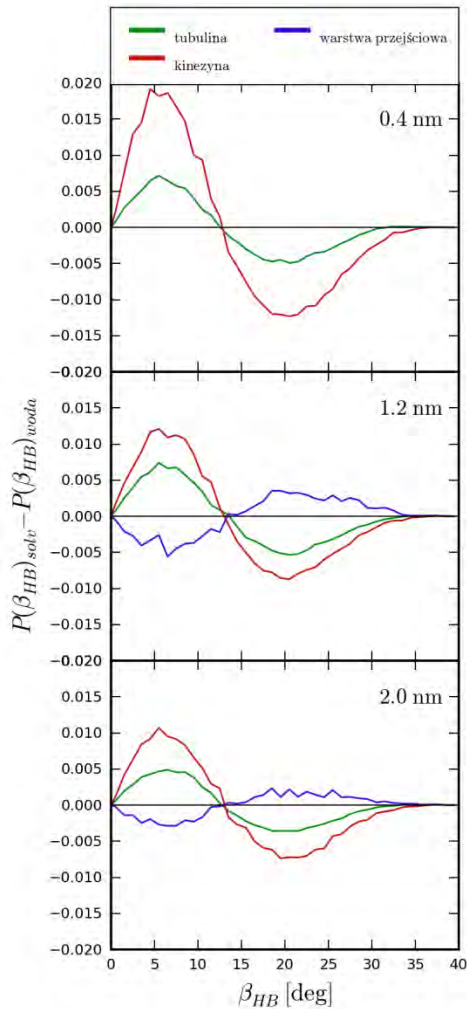


Rys. 5.30. Średnia liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wody n_{HB} , średnia energia wiązania wodorowego E_{HB} , średnia odległość tlen – wodor w wiązaniu wodorowym R_{HB} oraz średnia wartość kąta wiązania wodorowego β_{HB} dla wody w kolejnych przedziałach odległości od dimeru tubulinowego dla układów 1JFF, 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20 oraz dla wody czystej (linia przerywana).

Wpływ obecności dodatkowej cząsteczki białka (kinezy) na średnią geometrię wiązania wodorowego w sąsiedztwie dimeru tubulinowego jest nieco mniej zauważalny niż jej wpływ na współczynniki dyfuzji. Tym niemniej, tylko dla odległości 2,0 nm średnie właściwości pojedynczego wiązania wodorowego są prawie takie same, jak w przypadku samego dimeru tubulinowego (**Rys. 5.30**).

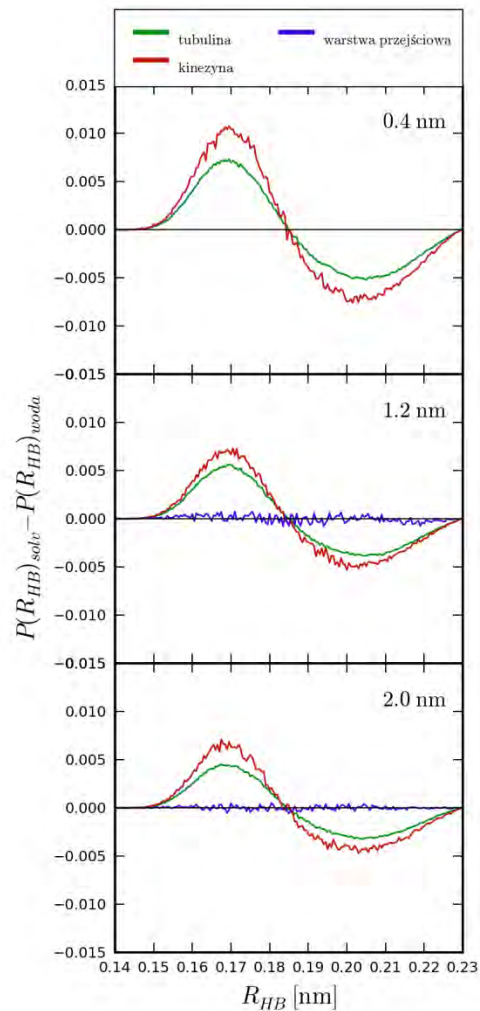
Zmiana geometrii pojedynczego wiązania w odniesieniu do wody zawartej pomiędzy dwiema płaszczyznami białkowymi jest porównywalna z tym, co obserwowałam dla wody solwacyjnej pojedynczego białka – zarówno co do zakresu, jak i kierunku tych zmian. Wiązania wodorowe tworzone przez

cząsteczki wody z pierwszej warstwy solwatacyjnej są nieco krótsze i bardziej wyprostowane (**Rys. 5.30**, **Rys. 5.31**, **Rys. 5.32**).



Rys. 5.31. Rozkład prawdopodobieństwa dla kąta β_{HB} w wiązaniu wodorowym dla wody w pierwszych otoczkach solwatacyjnych dimeru tubulinowego i kinezyzny oraz poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi po odjęciu prawdopodobieństwa dla czystej wody dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20.

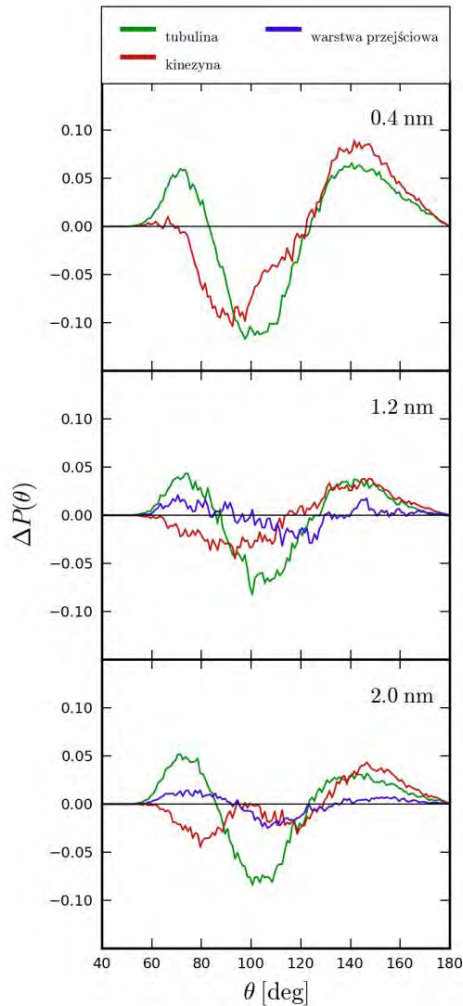
Zmiany te są również podobne do zmian zachodzących w pierwszej otoczce solwatacyjnej dimeru tubulinowego.



Rys. 5.32. Rozkład prawdopodobieństwa dla długości wiązania wodorowego R_{HB} dla wody w pierwszych otoczkach solwatacyjnych dimeru tubulinowego, kinezyzny oraz poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi po odjęciu prawdopodobieństwa dla czystej wody dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20.

Dla wody poza pierwszą otoczką solwatacyjną nie widać już różnicy w rozkładzie długości wiązania, natomiast średni kąt jest tym razem nieco większy, co nie różni się od zachowania obserwowanego przy odległości około 0,6 nm – 0,7 nm od powierzchni domeny motorycznej samej kinezyzny (**Rys. 5.13**). Tak jak w przypadku pojedynczego białka, temu minimalnemu odkształceniu towarzyszy bardzo małe zmniejszenie średniej energii wiązania (**Rys. 5.30**). Natomiast znaczne zmniejszenie średniej liczby wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody solwatacyjnej świadczy raczej o

geometrycznych ograniczeniach ich tworzenia, nie zaś o zmianach strukturalnych, jak to opisywałam w pierwszym podrozdziale.



Rys. 5.33. Różnicowy rozkład prawdopodobieństwa dla kątów θ pomiędzy wiązaniami wodorowymi dla wody w pierwszych otoczkach solwatacyjnych dimeru tubulinowego, kinezyzny oraz poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20. Promień odcięcia $d_0=0,17$ nm.

Różnicowe rozkłady kątów θ (**Rys. 5.33**), opisujących geometrię sieci wiązań wodorowych woda-woda, wskazują na odkształcenie tej sieci w porównaniu z wodą czystą – występuje minimum w okolicy 110° , które

świadczy o mniejszym uporządkowaniu tetraedrycznym sieci niż jest to charakterystyczne dla czystej wody.

Podsumowując: geometria zarówno pojedynczego wiązania, jak i sieci wiązań wodorowych woda-woda w warstwie solwatacyjnej zawartej w obszarze pomiędzy białkami posiada cechy zbliżone do tych obserwowanych dla wody solwatacyjnej wokół samej kinezyiny (tzn. w nieobecności dimeru tubulinowego). Jednak aby zanalizować problem szerzej, postanowiłam przeprowadzić analizę sieci wiązań wodorowych z jeszcze jednego punktu widzenia, odwołując się do koncepcji tak zwanego maksymalnego przepływu, stosowanej w teorii grafów.

5.2.4. Wartość maksymalnego przepływu

Ahmad *et al.* (144) w swej pracy stwierdzili, że woda pełni rolę czynnika spajającego dwie powierzchnie białkowe podczas asocjacji. Wniosek ten wysnuli na podstawie przedstawienia analizowanego układu w postaci grafu i badając zmiany maksymalnego przepływu zachodzące w miarę zbliżania się dwóch białek. Postanowiłam wykorzystać ten pomysł, aby zobaczyć, czy z takim zjawiskiem mogłabym mieć do czynienia również w przypadku procesu asocjacji obu jednostek białkowych: kinezyiny i tubuliny. Jednakże nie do końca akceptowałam proponowaną przez tych autorów metodę obliczeń, dlatego postanowiłam ją zmodyfikować w sposób opisany w rozdziale poświęconemu metodom obliczeniowym.

Cząsteczki wody solwatacyjnej pomiędzy białkami połączone wiązaniami wodorowymi przedstawiłam w postaci grafu i wykonałam obliczenia maksymalnego przepływu od kinezyiny do tubuliny, uwzględniając energie wiązań wodorowych. Znalezione wartości można intuicyjnie interpretować jako miarę liczby i „przepustowości” dróg łączących powierzchnie obu białek i biegnących po nieprzerwanych łańcuchach wiązań wodorowych. Analogiczne obliczenia przeprowadziłam po wypełnieniu obszaru wodą o strukturze wody czystej (**Tabela 5.4**).

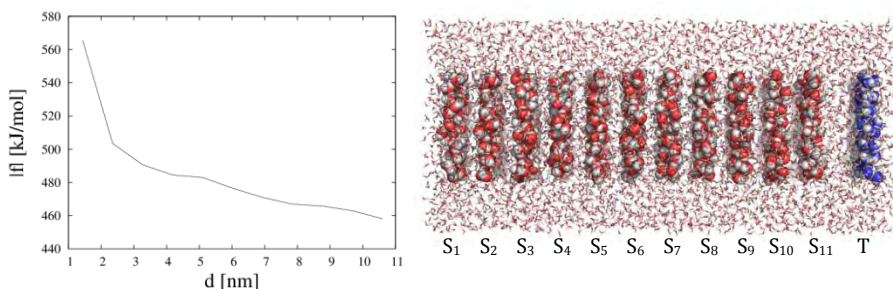
Odległość [nm]	$ f _{solv}$ [kJ/mol]	$ f _{bulk}$ [kJ/mol]	$\Delta f $ [kJ/mol]	Δn_{HB}	ΔE_{HB} [kJ/mol]
0,4	1358,0	1133,7	224,3	0,727	-0,084
1,2	1058,3	935,1	123,2	0,455	-0,132
2,0	661,9	648,7	13,2	0,249	-0,221

Tabela 5.4. Wartości maksymalnego przepływu dla wody solwatacyjnej pomiędzy dimerem tubulinowym i kinezyną $|f|_{solv}$; wyniki z porównawczej serii obliczeń dla wypełnienia wodą czystą ($d_0=0,17$ nm) $|f|_{bulk}$; różnica pomiędzy maksymalnym przepływem dla wody solwatacyjnej i wynikami obliczeń porównawczych $\Delta|f|$; średnia liczba wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody dla całej warstwy solwatacyjnej pomiędzy białkami Δn_{HB} (po odjęciu wartości uzyskanych po wypełnieniu wodą czystą); średnia różnica ΔE_{HB} pomiędzy energią wiązania wodorowego w wodzie pomiędzy białkami i czystej.

Analizując wyniki, widzimy zwiększanie się wartości maksymalnego przepływu w miarę zmniejszania się odległości pomiędzy białkami. Główna przyczyna zauważalnego wzrostu jest jednak inna niż w przypadku pracy (144). Tam brane były pod uwagę jedynie cząsteczki wody z otoczki przylegającej do

asocjujących płaszczyzn białka. W rezultacie, podczas zbliżania się dwóch płaszczyzn dochodziło do coraz większego nakładania się i współdzielenia otoczek solwatacyjnych, czemu oczywiście musiało towarzyszyć otrzymywanie większych wartości maksymalnego przepływu. Przedstawione tutaj obliczenia miały na celu wyeliminować bezpośredni wpływ tego, że otoczki solwatacyjne dwóch powierzchni białkowych w miarę zbliżania nakładają się na siebie. Z tego powodu pod uwagę brane były wszystkie cząsteczki znajdujące się w zdefiniowanym obszarze pomiędzy białkami, a nie tylko te bezpośrednio przylegające do obu powierzchni. Takie podejście wydawało się bardziej racjonalne, jeżeli chcemy uważać wartość maksymalnego przepływu za parametr oddający stopień pośrednictwa wody we wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy białkami.

W zmianach wartości maksymalnego przepływu powinny być widoczne całościowe zmiany w sieci wiązań wodorowych, to znaczy zarówno w energii tych wiązań jak i w ich liczbie. Jeżeli zwrócimy uwagę tylko na wartości z kolumny $|f|_{solv}$ tabeli powyżej, to na pierwszy rzut oka może się wydawać, iż zmiany w tej strukturze pomiędzy trzema układami są znaczne. Jednakże zapytajmy najpierw, jaką zmienność tych wartości otrzymamy, jeżeli poddamy analizie prostopadłościennie, podłużne pudełko z czystą wodą SPC/E. Wewnątrz niego wybrano płaskie powierzchnie składające się z cząsteczek wody i znajdujące się w różnej odległości od siebie (**Rys. 5.34**, po prawej). Jak widać na załączonym rysunku (**Rys. 5.34**, po lewej), wartość maksymalnego przepływu, mierzonego dla wody zawartej pomiędzy tymi powierzchniami, silnie zależała od wybranej odległości pomiędzy powierzchniami, zwłaszcza dla odległości mniejszych.



Rys. 5.34. Po lewej: Wartość maksymalnego przepływu w funkcji odległości pomiędzy płaszczyznami tworzonymi przez czystą wodę SPC/E. Po prawej: Modelem sferycznym przedstawiono płaszczyzny tworzone przez cząsteczki wody, przypisane do źródeł (S z indeksem od 1 do 11) i ujścia (T). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

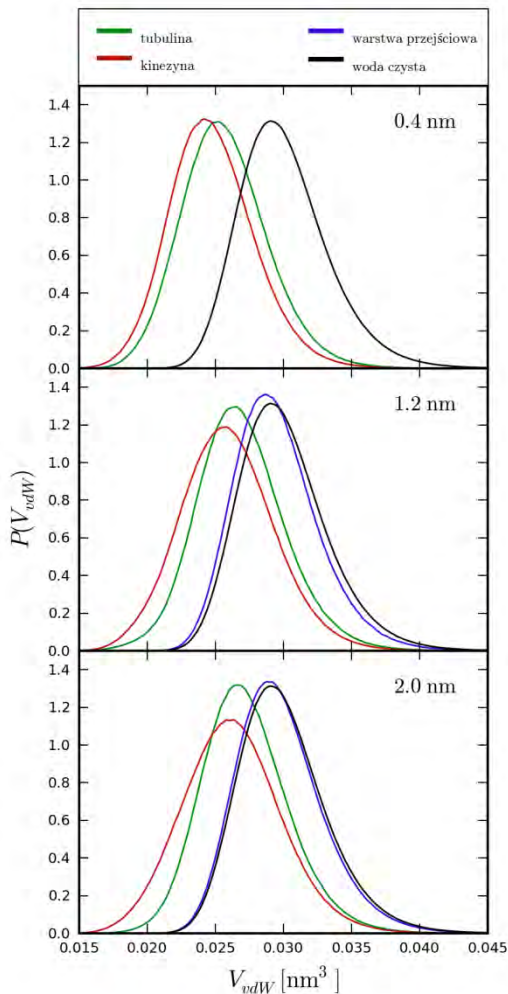
Nie znaczy to naturalnie, że struktura wody była w jakikolwiek sposób odmienna w kolejnych przypadkach. Jednak zmienność wartości przepływu staje się zrozumiała, gdy weźmiemy pod uwagę, że nieprzerwany łańcuch wiązań wodorowych ma ograniczoną długość. Zanalizujmy teraz wyniki z

trzeciej kolumny, która zawiera wartości maksymalnego przepływu J_{bulk} obliczone z wykorzystaniem czystej wody, którą wypełniono przestrzeń pomiędzy białkami. Jak widać, przy większych odległościach pomiędzy białkami różnice z w stosunku do wody solwatacyjnej są praktycznie nieobecne, wynosząc jedynie około 2 % dla 2,0 nm. Tylko w przypadku najmniejszej odległości mamy do czynienia z bardziej wyraźną różnicą w wartościach maksymalnego przepływu. Dodatkowo, co interesujące, występująca różnica jest dodatnia, czyli większy przepływ uzyskałam dla wody solwatacyjnej, niż dla wody czystej. Sugeruje to, że w przypadku wody solwatacyjnej mamy do czynienia z nieco bardziej korzystną konfiguracją sieci wiązań wodorowych niż jest to w przypadku wody czystej. W świetle tego wyniku można spekulować o tym, że obecność białek w taki sposób wpływała na sieć wiązań wodorowych, aby zwiększyć oddziaływanie zachodzące pomiędzy nimi za pośrednictwem wody solwatacyjnej. Choć średnia energia wiązania wodorowego nieco się zmniejszyła, to najwyraźniej równoważy to z nawiązką wzrost średniej liczby wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody.

W przypadku kinezyiny nie chodzi oczywiście o trwałe jej przyłączenie się do mikrotubuli. Szybko po sobie muszą następować procesy asocjacji i dysocjacji. Z jednej strony można postawić hipotezę, że woda solwatacyjna ma takie właściwości, że promuje łączenie się białek. Hipoteza taka stałaby w opozycji do hipotezy, że woda solwatacyjna ułatwia oddalenie się białek od siebie. Trzecia możliwość jest taka, że woda solwatacyjna uczestniczy w obu tych procesach (asocjacji i dysocjacji), ale nie faworyzuje żadnego z nich. Następną uwagę ma charakter czysto spekulatywny. Otóż jeżeli miałabym wybrać pomiędzy twierdzeniem, że woda solwatacyjna ułatwia łączenie się kinezyiny i tubuliny a twierdzeniem, że ułatwia ich rozłączenie, to jako bardziej pożądaną z punktu widzenia pracy motoru wskazałabym pierwszą opcję. Dwie głowy kinezyiny połączone są krótkimi szyjkami łącznikowymi. Naprężenie szyjek może sprzyjać odrywaniu głowy tylnej od miejsca wiążącego na mikrotubuli i oddalaniu się od niego (ponieważ będzie to zmniejszało naprężenie). Ten sprzyjający czynnik będzie natomiast nieobecny w przypadku zbliżania się do kolejnego miejsca wiążącego. Dlatego pomocniczy udział wody w wiązaniu do mikrotubuli mógłby być sprzyjającą okolicznością.

Trzeba w tym miejscu dodać, że podane rezultaty dosyć znacznie (bardziej, niż wiele innych) zależą od przyjętej wartości promienia odcięcia d_0 (co nie jest zaskakujące), dlatego należy traktować je z ostrożnością. Wyniki te traktuję jako interesujące rezultaty wstępne, zachęcające aby w przyszłości pogłębić analizę wody solwatacyjnej wykorzystując tę metodę.

5.2.5. Wielościany Voronoia



Rys. 5.35. Rozkład objętości, V_{vdW} , komórek Voronoia przypisanych cząsteczkom wody zawartej w pierwszych otoczkach solwatacyjnych dimeru tubulinowego, kinezyzny oraz poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20. Rozkład objętości dla wody czystej dodany dla porównania.

Na objętość komórki Voronoia jako miernika gęstości należy patrzeć z ostrożnością, jeżeli dotyczy wody w najbliższym sąsiedztwie białka (z podobnego powodu, dla którego należy ostrożnie interpretować wartości parametru asferyczności, co było dyskutowane w podrozdziale pierwszym), ale w przypadku analizy cząsteczek nie mających bezpośredniej styczności z białkiem analiza ta jest bardziej wiarygodna. Do zagadnienia użyteczności

podziału Voronoia przy pomiarze gęstości powrócę jeszcze w tym podrozdziale, omawiając zmiany strukturalne prowadzące do zmian gęstości wody solwatacyjnej.

Jak wspominałam w przeglądzie literatury, wiele prac dotyczących asocjacji dwóch powierzchni białkowych wspomina o spadku gęstości wody solwatacyjnej pomiędzy nimi. Rozkłady objętości komórek Voronoia wykonane dla wody solwatacyjnej znajdującej się poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi wykluczają, że moglibyśmy mieć tutaj do czynienia z jakimkolwiek spadkiem gęstości. Co prawda o spadku gęstości mówi się najczęściej w przypadku asocjacji hydrofobowej. W rozważanym przeze mnie przypadku z całą pewnością nie mamy do czynienia z asocjacją hydrofobową. W przypadku asocjacji hydrofilowej, można znaleźć (mniej liczne) publikacje mówiące o wzroście gęstości wody, co zgadzałyby się całkowicie z moimi wynikami.

5.2.6. Parametry lokalnego uporządkowania

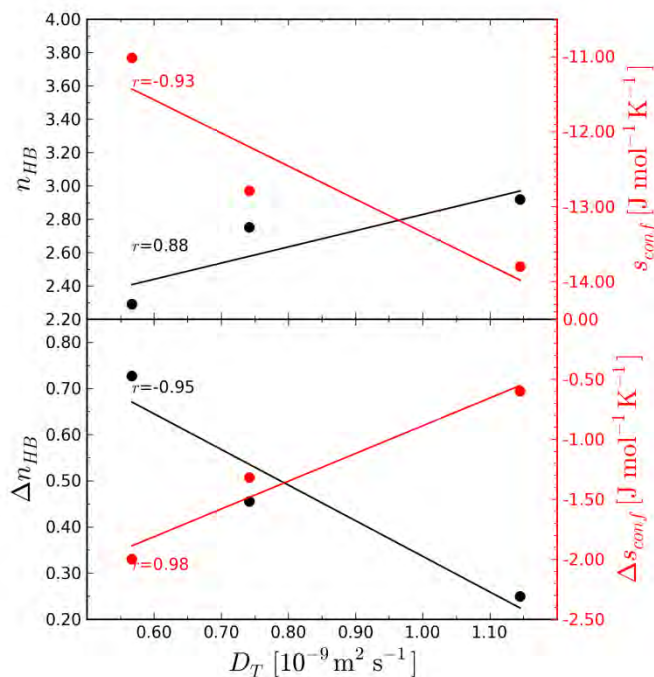
Jak było to już omawiane w pierwszym podrozdziale, bezwzględna wartość liczbową parametrów uporządkowania obliczonych dla wody w warstwie solwatacyjnej nie nadaje się do bezpośredniego interpretowania. Dlatego ograniczę się do przedstawienia wartości otrzymanych po odjęciu wyników dla fikcyjnej warstwy solwatacyjnej. Wcześniej (**Rys. 5.19**) okazało się, że parametry s_{conf} i s_{ort} są powiązane w przybliżeniu zależnością liniową (współczynnik korelacji był równy 0,96, a wartość współczynnika kierunkowego wynosiła około 3,9). Zależność ta zostanie wykorzystana w celu zgrubnego oszacowania wartości parametru charakteryzującego całkowity zakres zmian strukturalnych wody solwatacyjnej Δs_{tot} . Zostanie on obliczony jako suma:

$$\Delta s_{tot} = \Delta s_{tra} + \Delta s_{ort} = \Delta s_{tra} + 3.9 \Delta s_{conf}$$

Odległość [nm]	$\Delta s_{tra}(0,58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta s_{conf}(0,58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta s_{tot}(0,58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]
0.4	2,78	-2,00	-5,02
1.2	1,11	-1,32	-4,04
2.0	0,07	-0,60	-2,27

Tabela 5.5. Wartości parametrów uporządkowania dla wody pomiędzy dimerem tubulinowym i kinezyną dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20.

Wartości Δs_{tot} są ujemne, co wskazuje na większy stopień uporządkowania wody w warstwie solwatacyjnej pomiędzy białkami. Parametr ten obliczony dla całej warstwy solwatacyjnej dla odległości 0,4 i 1,2 nm jest równy około -5÷-4 J mol⁻¹K⁻¹, a dla 2,0 nm jego wartość bezwzględna jest jeszcze mniejsza. Porównując te liczby z entropią czystej wody SPC/E (około 60 J mol⁻¹K⁻¹ (65)), okazuje się, że świadczą one raczej o niezbyt dużych zmianach w strukturze wody. Dla porównania wykonałam też obliczenia dla wody solwatacyjnej wierzchniej części samego dimeru tubulinowego w dwóch przedziałach odległości (Aneks, Tabela A8). Otrzymałam wówczas wartości o jeszcze mniejszej wartości bezwzględnej.



Rys. 5.36. U góry: Korelacja pomiędzy współczynnikiem dyfuzji D_T , średnią liczbą wiązań wodorowych n_{HB} tworzoną przez cząsteczki wody i parametrem s_{conf} dla układu 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20. Na dole: Korelacja pomiędzy współczynnikiem dyfuzji, średnią liczbą wiązań wodorowych tworzoną przez cząsteczki wody po odjęciu wartości uzyskanej dla wody czystej Δn_{HB} i parametrem Δs_{conf} dla układu 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20. Zakres obliczeń współczynnika dyfuzji i średniej liczby wiązań wodorowych był taki sam jak zadany zakres obliczeń parametrów uporządkowania, to znaczy obejmował całą otoczkę solwatacyjną pomiędzy białkami.

Okazuje się, że podobnie jak w przypadku wody solwatacyjnej pojedynczego białka (**Rys. 5.21**), występuje także teraz korelacja pomiędzy współczynnikiem dyfuzji a parametrem s_{conf} oraz współczynnikiem dyfuzji a średnią liczbą wiązań wodorowych tworzonych przez jedną cząsteczkę wody. Wszystkie parametry obliczyłam dla całej wody zawartej w przestrzeni pomiędzy białkami. W przypadku wyników dla samej kinezyzny można było traktować tę zależność jako rezultat wpływu geometrii sąsiadującej powierzchni białka na wartości obliczonych parametrów. Jednakże teraz trudno mówić oczywiście o tym, aby geometria powierzchni dimeru tubulinowego i spodu kinezyzny znacząco różniła się w przypadkach analizowanych tu układów. Tym niemniej kształt przestrzenny badanego obszaru zawierającego wodę solwatacyjną zmienia się z powodu różnej odległości kinezyzny od tubuliny. Średnia liczba wiązań wodorowych przypadających na jedną cząsteczkę wody z oczywistego względu rośnie wraz ze zwiększaniem odległości pomiędzy białkami, ponieważ wtedy rośnie też liczba cząsteczek znajdujących się w

obszarze pomiędzy nimi, ale bezpośrednio nieprzylegających do białka i przypominających w znacznym stopniu wodę czystą. Z tego samego powodu rośnie także współczynnik dyfuzji.

Co ciekawe, współzależności pomiędzy współczynnikami dyfuzji, średnią liczbą wiązań wodorowych i parametrem s_{conf} utrzymały się nadal po zastosowaniu różnicowego parametru lokalnego uporządkowania Δs_{conf} i wielkości Δn_{HB} (przeciwnie niż miało to miejsce w przypadku pojedynczego białka – wtedy korelacja zanikła). Charakter zależności zmienia się jednak z rosnącą na malejącą i odwrotnie. Tym razem najmniejsza wartość Δn_{HB} będzie występowała w przypadku największej odległości pomiędzy białkami, wraz z największą wartością Δs_{conf} . Najmniejsza wartość Δn_{HB} i największa (najmniej ujemna) wartość Δs_{conf} będą wskazywać na najmniejsze średnie zmiany strukturalne wody solwatacyjnej.

Choć wartości parametru Δs_{tot} są ujemne (wskazując na większe uporządkowanie wody w warstwie pomiędzy białkami), to wartości Δs_{tra} są dodatnie. Przy okazji omawiania solwatacji pojedynczej domeny motorycznej stwierdziłam, że taki wynik wskazywać może na większą gęstość wody solwatacyjnej. Dobrze koresponduje to ze zmniejszoną objętością komórek Voronia dla wody poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi, która również może być interpretowana jako oznaka zwiększenia gęstości.

5.2.7. Model solwatacji makrocząsteczek proponujący mechanizm zmian gęstości wody solwatacyjnej

Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują, że zachodzą zmiany gęstości wody w obszarze pomiędzy białkami, i to nie tylko w pierwszych otoczkach solwatacyjnych kinezyiny i dimeru tubulinowego, ale także poza pierwszymi otoczkami. Skłania to do postawienia pytania o przyczyny i mechanizm tych zmian.

Jak już wspomniałam w przeglądzie literatury, zwiększenie gęstości wody pomiędzy asocjującymi białkami nie jest zjawiskiem zawsze obserwowanym, są częste doniesienia o zmniejszaniu się gęstości lub braku jej zmian. Także zakres zmian gęstości wody solwatacyjnej pojedynczego białka jest sprawą dyskusyjną. Gęstość wody jest podstawową wielkością używaną do charakteryzowania właściwości fizycznych cieczy. Zmiana gęstości wody solwatacyjnej może wpływać na zachowanie się samego białka oraz na przebieg procesów przyłączania się ligandów czy asocjacji dwóch białek. Należy ponadto przypuszczać, że zmiana gęstości jest rezultatem zmian strukturalnych wody.

Ta sekcja zostanie poświęcona próbie wyjaśnienia obserwowanych zmian gęstości wody solwatacyjnej (w połączeniu z dyskusją zmian strukturalnych w niej zachodzących), dokonanej w oparciu o specyficzne właściwości samej wody. Znajdzie się tu odwołanie do pewnych idei, na których opiera się opisany w przeglądzie literaturowym model struktury czystej wody autorstwa Tanaki, który postuluje istnienie w wodzie struktur o dużej i małej objętości właściwej.

W tym celu powrócę do analizy pojedynczej domeny motorycznej, traktując ją jako wygodny punkt startu dla moich rozważań. W jej przypadku

dysponują wieloma zdefiniowanymi obszarami na powierzchni białka, które charakteryzują się różnorodną geometrią i charakterem chemicznym, co będzie przydatne dla skonstruowania i przetestowania modelu.

W toku dalszej analizy zostanie wykorzystana także czysto hydrofobowa cząsteczka białka (układ 1MKJ_0 z wyzerowanymi ładunkami cząstkowymi wszystkich atomów białka). Skonstruowana została ona w celu porównania, jak na opracowywany model solwatacji wpłynie drastyczna zmiana w oddziaływaniach elektrostatycznych z powierzchnią białka. Jeżeli model ma opierać się o właściwości czystej wody, to zasadniczo powinien dać się dopasować do opisu właściwości wody solwatacyjnej wokół różnych makrocząsteczek, niezależnie od ich charakteru chemicznego.

Ponadto, w procesie analizy rezultatów symulacji niezwykle przydatna okazała się procedura minimalizacji energii zastosowana do kolejnych konfiguracji układu uzyskanych w wyniku zwykłej dynamiki molekularnej. Ten sposób postępowania zastosowali na przykład Appignanesi *et al.* (270) i Accordino *et al.* (271). Przy okazji dyskusji wyników, w pracach wykorzystujących tę technikę odwoływali się oni również do modelu Tanaki, twierdząc, że minimalizacja energii pomaga wyostrzyć podział na struktury o dużej i małej objętości. Dzięki przeprowadzeniu minimalizacji energii, otrzymujemy konfigurację oczyszczoną z fluktuacji termicznych. W ciekłej wodzie, wszystkie cząsteczki znajdują się w nieustannym ruchu. Jeżeli można mówić o obecności w wodzie pewnych bardziej uporządkowanych struktur, to będą one raczej niezbyt trwałe i mniej lub bardziej zniekształcone przez chwilowe drgania cząsteczek. Minimalizacja energii sprowadza układ do lokalnego minimum jego energii potencjalnej i pozwoli na analizę tej samej trajektorii z nowego punktu widzenia.

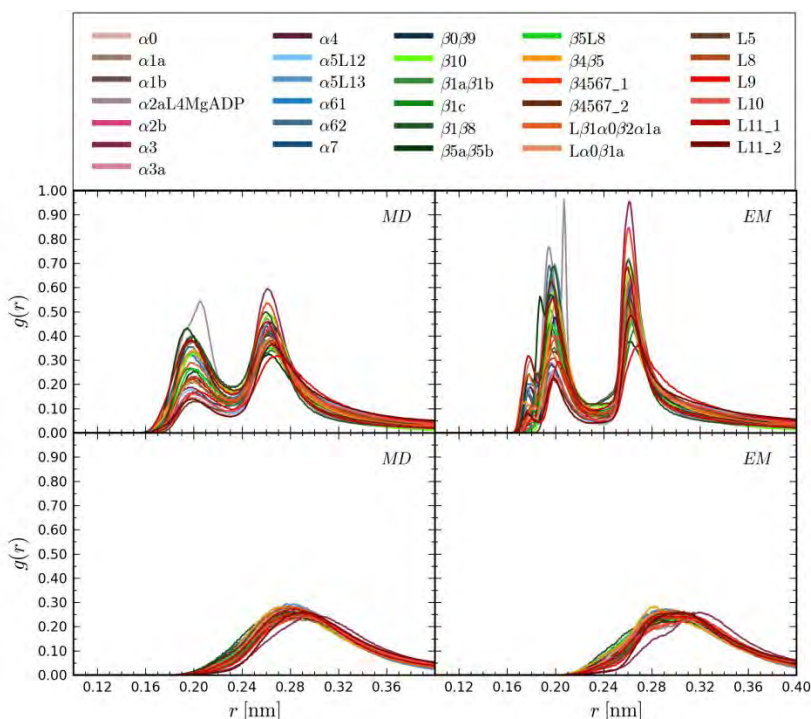
Zasadność użycia objętości komórek Voronoia przy obliczeniach gęstości wody

Gęstość liczbowa definiuje się jako liczbę cząsteczek przypadających na jednostkę objętości. O ile zliczanie liczby cząsteczek nie nastęrcza trudności, to już wyznaczenie średniej objętości zajętej przez cząsteczkę wody może być problematyczne, zwłaszcza w przypadku układów niejednorodnych. Woda solwatacyjna jest takim właśnie układem. Zapewne jedną z przyczyn rozbieżnych doniesień dotyczących gęstości wody solwatacyjnej może być fakt, że pomiar objętości dostępnej cząsteczce wody solwatacyjnej nastęrcza tak wiele trudności. Wydaje się, że jej bezpośrednią geometryczną miarą może być objętość komórki Voronoia przypisanej cząsteczce wody. Intuicyjnie można by sądzić, że zmniejszenie się średniej objętości komórki należy interpretować jako wzrost gęstości wody, zaś jej zwiększenie jako spadek gęstości. Jednakże, jak zostanie to przedyskutowane poniżej, w wyniku dokładniejszej analizy okazało się, że miara ta niekoniecznie sprawdza się w przypadku cząsteczek wody znajdujących się w bezpośrednim sąsiedztwie cząsteczki białka.

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, w przypadku wody solwatacyjnej różnych obszarów na powierzchni kinezyiny (oraz wody zawartej w obszarze pomiędzy dwoma białkami) obserwujemy nieduże zmniejszenie się średniej objętości wielościanu Voronoia. Porównajmy teraz te wyniki z

rezultatami uzyskanymi dla czysto hydrofobowej formy białka (wyniki liczbowe można znaleźć w Aneksie, Tabela A1). Średnie objętości komórek Voronoia w tym przypadku mniej różnią się od wartości charakterystycznej dla czystej wody, a nawet mogą być odrobinę większe.

Pożądanym uzupełnieniem tych rezultatów byłyby informacja o tym, jak środki masy cząsteczek wody układają się w funkcji odległości od powierzchni białka. Przyjrzyjmy się zatem funkcjom rozkładu odległości cząsteczek wody od atomów białka znajdujących się w obszarze obejmującym pierwszą warstwę solwatacyjną (0-0,4 nm).



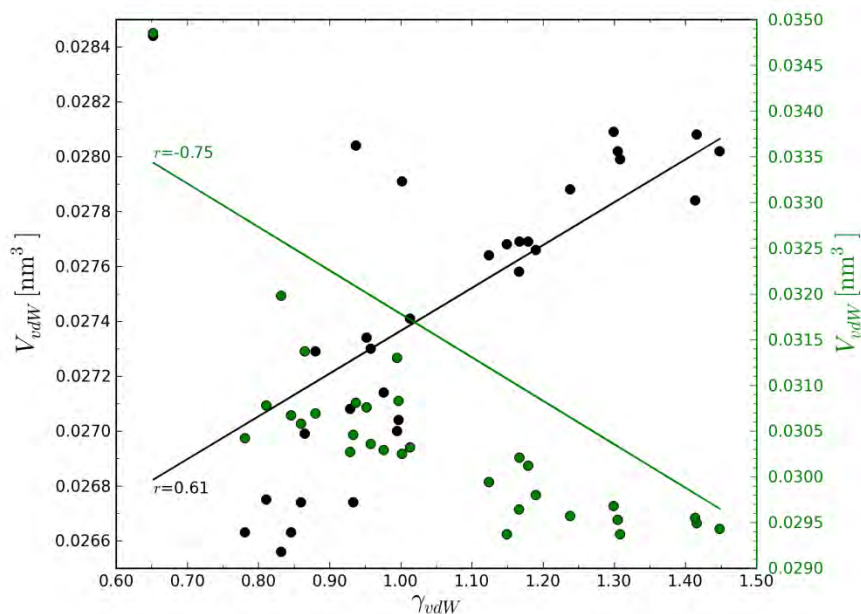
Rys. 5.37. Funkcje rozkładu odległości cząsteczek wody solwatacyjnej wybranych obszarów na powierzchni kinazy od atomów białka (u góry układ 1MKJ, na dole układ 1MKJ_0; wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM).

Wykres **Rys. 5.37** przedstawia te funkcje rozkładu przed i po poddaniu otrzymanej trajektorii procedurze minimalizacji energii. Fakt, że w przypadku formy natywnej obserwujemy dwa piki, a w przypadku formy hydrofobowej tylko jeden, zapewne wynika z tego, że w przypadku braku akceptorów i donorów wiązań wodorowych na powierzchni białka, cząsteczki wody nie orientują się z ich powodu atomami wodoru lub tlenu w stronę białka.

Ponadto zauważyć można, że woda solwatacyjna wokół formy hydrofobowej kinazy odsuwa się od powierzchni białka na większą odległość

niż ma to miejsce w przypadku kinezyiny natywnej (wartości funkcji stają się większe od zera przy większej wartości promienia r). Różnica wynosi kilka setnych nanometra. Oznacza to, że cząsteczki wody słabiej przylegają do powierzchni hydrofobowej niż ma to miejsce w przypadku formy natywnej. Obserwacja ta dobrze pasuje do wspomnianych większych (w porównaniu z formą natywną) objętości komórek Voronoia dla wody solwatacyjnej wokół formy hydrofobowej.

Ponadto, jak widać na **Rys. 5.38**, w przypadku formy natywnej średnia objętość komórki Voronoia zwiększa się wraz ze zwiększaniem się parametru γ_{vdW} (większe wartości oznaczają bardziej wypukłe fragmenty powierzchni styku cząsteczki białka i wody), a w przypadku formy hydrofobowej jest odwrotnie.



Rys. 5.38. Średnia objętość komórki Voronoia V_{vdW} dla cząsteczek wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej wybranych obszarów na powierzchni kinezyiny w funkcji parametru γ_{vdW} (forma natywna 1MKJ – kolor czarny, forma hydrofobowa 1MKJ_0 – kolor zielony).

Korelacje te mogą oznaczać, że warstwa solwatacyjna odsuwa się od hydrofobowej powierzchni białka bardziej w przypadku wklęsłych fragmentów struktury niż w przypadku obszarów bardziej wypukłych.

Zauważmy ponadto, że wartości parametru γ_{vdW} dla formy hydrofobowej są większe niż dla formy natywnej. Odsunięcie cząsteczek wody od powierzchni białka, a szczególnie od zagłębienia struktury, prowadzi do

wygładzenia powierzchni kontaktu pomiędzy białkiem i wodą i w rezultacie do zwiększenia wartości parametru γ_{vdw} .

Fakt odsunięcia się warstwy solwatacyjnej od powierzchni białka na większą odległość w przypadku formy hydrofobowej niż w przypadku formy natywnej ma dwie interesujące i ważne konsekwencje. Po pierwsze, tłumaczy, przynajmniej w części, większe objętości komórek Voronoia wyznaczone dla wody solwatacyjnej. Pomiedzy wodą a białkiem powstaje pusta przestrzeń. Mówi się, że na styku dużej powierzchni hydrofobowej i ciekłej wody tworzy się warstwa graniczna przypominająca powierzchnię ciecz-gaz (169,171). Gdybyśmy i tutaj mieli do czynienia z taką sytuacją, to mogłoby to wyjaśnić zarówno większe objętości komórek Voronoia (które oprócz tego są bardziej zróżnicowane pod względem rozmiarów – Aneks, Tabela A1), jak i większe wartości odległości r_{min} . Po drugie, dzięki lekkiemu odsunięciu, te cząsteczki wody, które znajdują się blisko powierzchni białka, uzyskują nieco większą swobodę ruchu. Efekt ten najłatwiej dostrzec, analizując zachowanie się układu poddanego procedurze minimalizacji energii.

Wartość r_{min} dla kinezyny hydrofobowej po minimalizacji energii zwiększa się, czyli pusta przestrzeń pomiędzy wodą i białkiem staje się jeszcze bardziej widoczna. Nietrudno jest podać wyjaśnienie tego zjawiska. Mianowicie minimalizacja energii prowadzi do tego, że cząsteczki wody ustawiają się bardziej korzystnie względem siebie (pod względem energii potencjalnej). Przyczyną tego stanu rzeczy jest to, że zniknął główny czynnik dezorganizujący strukturę wody, normalnie zawsze obecny w postaci energii kinetycznej ruchu cząsteczek. Aby osiągnąć bardziej optymalne wzajemne ustawienie, cząsteczki wody na ogół będą musiały się odrobinę odsunąć od powierzchni białka, zwłaszcza w przypadku bardziej wklęsłych obszarów. Tym samym powiększy się pusta przestrzeń pomiędzy białkiem i wodą, co jest doskonale widoczne na **Rys. 5.37**. Przed minimalizacją przestrzeń ta była częściowo penetrowana przez cząsteczki wody, właśnie dzięki ich energii kinetycznej, która pozwalała na to pomimo mniej korzystnych oddziaływań jeżeli chodzi o energię potencjalną.

Innymi słowy, w przypadku hydratacji powierzchni hydrofobowej możemy mieć do czynienia z dwoma przeciwstawnymi efektami, utrudniającymi analizę. Jeżeli jej woda solwatacyjna wykazywałaby tendencję do zwiększania swej gęstości, to efekt ten mógłby być przysłaniany z powodu odsunięcia się tej warstwy od powierzchni białka i tym samym stworzenia warunków dla pewnego jej „rozmycia” przestrzennego. W efekcie końcowym obserwujemy dość przypadkowe, przynajmniej na pierwszy rzut oka, zmiany, których istotę można dostrzec jedynie analizując stan układu znajdującego się w lokalnym minimum jego energii potencjalnej.

Podsumowując, fakt, że warstwa solwatacyjna jest bardziej odsunięta od powierzchni białka (i że obserwujemy związane z tym zwiększenie średniej objętości komórki Voronoia) niekoniecznie musi oznaczać, że woda zawarta w tej warstwie ma mniejszą gęstość. Skoro objętość komórki Voronoia nie jest w tym przypadku całkowicie miarodajna, należy spróbować zastosować inny parametr.

Zmiany w strukturze wody prowadzące do wzrostu gęstości

Ponieważ zmiana gęstości jest rezultatem zmian strukturalnych, analiza tych zmian powinna wyjaśnić ewentualną zmianę gęstości. Jak wspomniałam w przeglądzie literatury, istnieje pogląd, że ciekłą wodę można rozważać jako mieszaninę struktur o wysokiej gęstości (HDL) i niskiej gęstości (LDL). Jeżeli taki obraz jest prawdziwy, wówczas można by interpretować zmiany gęstości jako przesunięcie równowagi pomiędzy tymi dwoma rodzajami cieczy. Jednakże mówienie o cieczy jako układzie składającym się z dwóch faz może być kontrowersyjne (113). Przede wszystkim trudno mówić o ostrej granicy rozdzielającej oba stany, dlatego raczej nie ma możliwości ścisłego rozróżnienia pomiędzy nimi i ustalenia ich zawartości. Niemniej jednak zaproponowano (270-272), że pewną pomocą w osiągnięciu tego celu mogą służyć parametr tetraedryczności lub parametr LSI.

Omówiony w przeglądzie literaturowym model Tanaki również postuluje istnienie dwóch rodzajów struktur: nielicznych stabilnych, uporządkowanych struktur o niskiej energii i wysokiej objętości właściwej, otoczonych przez wiele nieuporządkowanych struktur o wyższej energii i mniejszej objętości właściwej (proporcja zawartości obu rodzajów struktur określać powinna gęstość cieczy jako całości). W modelu tym widać pewne koncepcyjne podobieństwa do postulowanego współistnienia wody HDL i LDL, ale nie jest on identyczny z tym podejściem (111). Pomimo że model ten bazuje na mocno uproszczonej koncepcji Strässlera i Kittela (273), to jednak bardzo dobrze sprawdził się w tłumaczeniu wielu wyjątkowych właściwości wody. Świadczy to na korzyść podstawowej idei leżącej u jego podstaw.

W dyskusji, którą przedstawiam poniżej, dotyczącej struktury i gęstości wody solwatacyjnej, chciałabym zastosować pewne koncepcje z modelu Tanaki, choć niekoniecznie sam model w jego dosłownej postaci. Wychodzę od hipotezy, że w wodzie możemy znaleźć bardziej uporządkowane, niskoenergetyczne układy, utworzone z cząsteczek wody, które zajmują dużą objętość oraz bardziej nieuporządkowane układy cząsteczek o dużej gęstości i wyższej energii. Te dwa rodzaje struktur mogą wzajemnie w siebie przechodzić. Najtrudniejszym zadaniem wydaje się znalezienie miary pozwalającej na określenie ich względnej zawartości w wodzie.

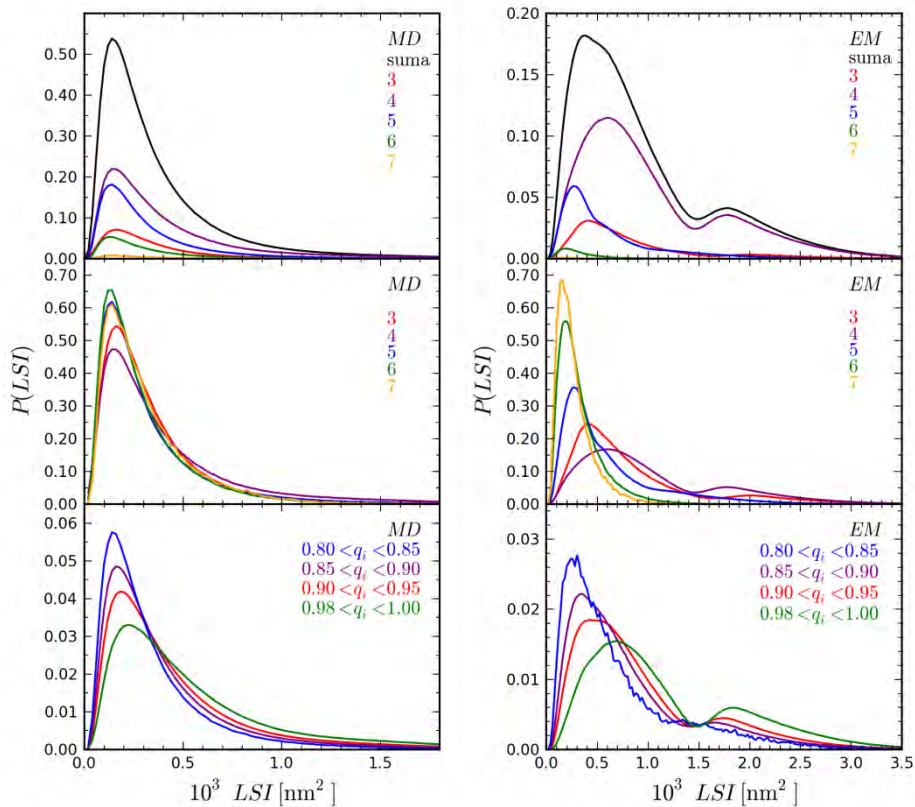
Poniższe rozważania poświęcone są prezentacji sposobu rozwiązania następującego problemu: jak, w przypadku wody solwatacyjnej białka, rozróżnić dwa wyżej opisane rodzaje struktur, charakteryzujące się odpowiednio niskim i wysokim stopniem upakowania przestrzennego. Ostatecznym celem będzie zbudowanie takiego modelu hydratacji, który w rezultacie pozwoli na identyfikację przyczyn powodujących zmianę względnej zawartości obu rodzajów struktur.

Zacznijmy rozumowanie od tego, że przy wysokiej gęstości, pierwsza otoczka solwatacyjna cząsteczek wody powinna być bardziej zatłoczona niż przy niskiej gęstości. Należałoby zatem użyć parametru strukturalnego, w którego wartościach obecność tej dodatkowej cząsteczki (lub cząsteczek) będzie się uwidaczniała. Proponuję dwa sposoby rozwiązania tego problemu, przy czym oba bazują na analizie funkcji opisującej rozkład przestrzenny najbliższych sąsiadów (tzn. innych cząsteczek wody) wokół wybranej losowo

cząsteczki wody. Pierwszym z nich jest analiza jedynie części radialnej tego rozkładu, co doprowadziło Shiratani'ego i Sasai do zdefiniowania parametru strukturalnego, znanego w literaturze jako LSI (jest on opisany w rozdziale dotyczącym metod obliczeniowych). Drugim sposobem jest wzięcie pod uwagę części kątowej rozkładu, co nie jest, o ile mi wiadomo, dotychczas opisane w literaturze z tego punktu widzenia. Omówię po kolei oba te podejścia, wraz z wnioskami wynikającymi z ich zastosowania.

Analiza części radialnej funkcji rozkładu woda-woda. Zaproponowano (270-272), że Local Structure Index (LSI) może zostać użyty jako parametr stosowany do rozróżnienia pomiędzy strukturami o wysokiej i niskiej gęstości. Te uwieńczone sukcesem zastosowania parametru LSI skłaniają do rozważenia zastosowania go przy próbie zanalizowania zmian gęstości wody solwatacyjnej. Niestety, z powodu jego definicji w anizotropowym środowisku nie sprawdzi się on jako miara bezpośrednia. Parametr ten mierzy niejednorodności w rozkładzie odległości cząsteczek sąsiadujących z cząsteczką centralną. Pozbawienie cząsteczki wody części jej otoczki hydratacyjnej, będące skutkiem obecności powierzchni białka w jej sąsiedztwie, spowoduje automatycznie istotne zmiany w wartościach parametru LSI. Z tej przyczyny, do opisu właściwości wody solwatacyjnej białka zamierzam użyć opisanej już wyżej metody histogramów różnicowych.

Analizę zaczniemy od przestudiowania histogramu rozkładu wartości LSI dla czystej wody SPC/E (**Rys. 5.39**). Jak widać na rysunku, jeżeli liczba cząsteczek w pierwszej warstwie solwatacyjnej zaczyna przekraczać cztery, prowadzi to do zmniejszania się wartości parametru LSI wraz ze zwiększaniem się liczby najbliższych sąsiadów.



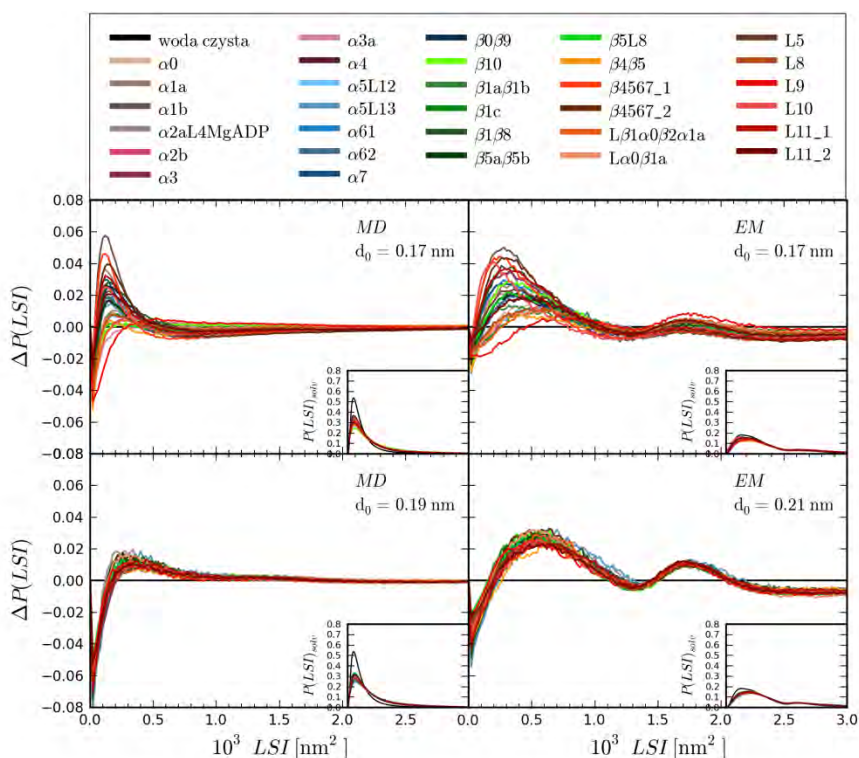
Rys. 5.39. Rozkład wartości parametru LSI dla czystej wody SPC/E. U góry: histogramy wyznaczone osobno dla zmiennej liczby sąsiadów w pierwszej otoczce solwatacyjnej cząsteczki wody, dla której liczymy LSI. W środku: histogramy wyznaczone osobno dla zmiennej liczby sąsiadów w pierwszej otoczce solwatacyjnej cząsteczki wody, dla której liczymy LSI, znormalizowane do jednakowego pola (linie dla różnej liczby sąsiadów oznaczone są różnymi kolorami, opisanymi na wykresie). Na dole: histogramy wyznaczone dla cząsteczek tworzących dokładnie cztery wiązania wodorowe z podziałem na różne wartości stopnia tetraedryczności q_i tego układu. Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM.

Obserwowany wzrost wartości histogramu dla $LSI < 10^{-3} \text{ nm}^2$ oraz obniżanie się wartości dla $LSI > 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^2$ mogą być zinterpretowane w kontekście wyników opisanych w pracach Appignanesi'ego *et al.* (270) i Accordino *et al.* (271). Stwierdzili oni, że tym cząsteczkom, których najbliższe otoczenie jest nieustrukturyzowane i charakteryzuje się wysoką lokalną gęstością, odpowiadają małe wartości LSI, natomiast tym, których otoczenie jest dobrze ustrukturyzowane i charakteryzuje się niską lokalną gęstością, odpowiadają duże wartości LSI.

Cytowani autorzy zaobserwowali bimodalny rozkład wartości LSI i zaproponowali, na podstawie wyznaczonej zależności temperaturowej wartości

parametru LSI, żeby użyć jego wartości równej $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^2$ jako rozgraniczającej pomiędzy cząsteczkami znajdującymi się w nisko i wysoko uporządkowanym otoczeniu. Chociaż w tym przypadku wskazanie tej wartości miało swoje uzasadnienie, to zakładanie istnienia ostrej granicy oddzielającej omawiane dwa stany wydaje się nierealistyczne, szczególnie w przypadku wody w temperaturze pokojowej. Na przykład Shiratani i Sasai (106) wyróżnili trzy stany: nieustrukturyzowany, umiarkowanie ustrukturyzowany i wysoce ustrukturyzowany.

Założenie o istnieniu uporządkowanych struktur o dużej objętości właściwej jest ważnym elementem modelu wody ciekłej zaproponowanego przez Tanakę. Jednak ani LSI ani parametru tetraedryczności nie można użyć bezpośrednio do zidentyfikowania struktur Tanaki. Tym niemniej można rozsądnie założyć, że otoczenie cząsteczki wchodzącej w skład wysokoobjętościowej struktury Tanaki jest tetraedryczne. Żeby sprawdzić, jak w przypadku czystej wody zmieniają się wartości parametru LSI wraz ze zmianą tetraedryczności, zidentyfikowane zostały cząsteczki wody tworzące dokładnie cztery wiązania wodorowe. Dla takiego układu została obliczona tetraedryczność (116) oraz wartość parametru LSI dla centralnej cząsteczki wody. Dzięki temu można było wyznaczyć histogramy rozkładu wartości LSI osobno dla układu czterech wiązań różniących się wartościami tetraedryczności (**Rys. 5.39**, na dole). Analiza tych histogramów w kontekście wcześniejszych rozważań prowadzi do wniosku, że wysoki stopień uporządkowania tetraedrycznego partnerów tworzących wiązanie wodorowe jest powszechniejszy wtedy, gdy lokalna gęstość wody jest niższa.

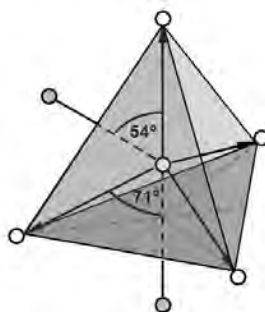


Rys. 5.40. Histogramy różnicowe rozkładu wartości LSI dla pierwszej otoczki solwatacyjnej wybranych obszarów na powierzchni kinazy (u góry układ 1MKJ, na dole układ 1MKJ_0; wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM). Wewnętrzne wykresy przedstawiają rozkłady uzyskane dla wody solwatacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkłady dla wody czystej.

Analizując wykresy różnicowe dla wody solwatacyjnej (**Rys. 5.40**) można zauważyć, że zwiększyła się liczba cząsteczek, dla których wartość LSI jest mała. (poniżej 10^{-3} nm^2), co może wskazywać na jej większą gęstość.

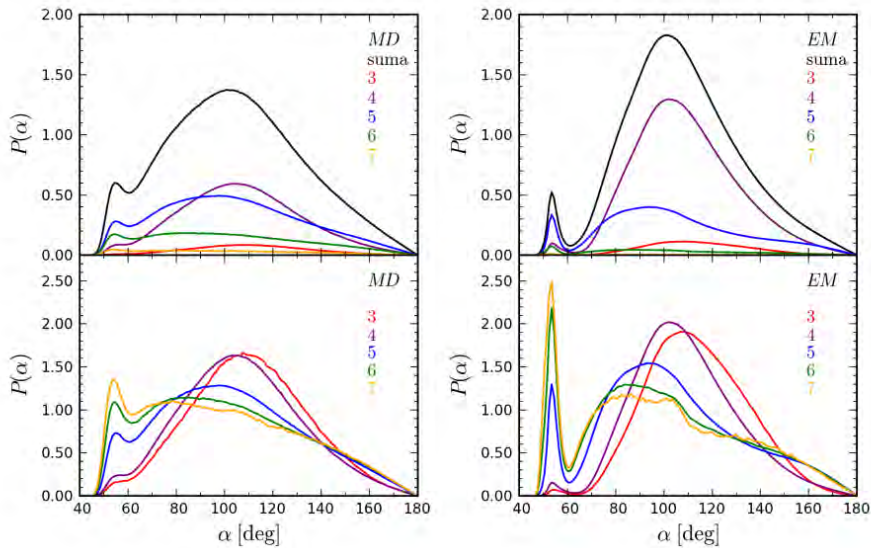
Analiza części katowej funkcji rozkładu woda-woda. Wysoki stopień uporządkowania tetraedrycznego otoczenia danej cząsteczki wody oznacza równocześnie niską gęstość przestrzennego upakowania tych cząsteczek. Wzrost tej gęstości może się odbyć poprzez wtargnięcie dodatkowej cząsteczki w obszar pierwszej otoczki solwatacyjnej. Ze względu na geometrię tetraedru, można wyszczególnić pewne preferowane kierunki zbliżania się nadmiarowej cząsteczki do centrum tetraedru (**Rys. 5.41**). Jednym z nich będzie środek krawędzi tetraedru, a drugim środek powierzchni bocznej tetraedru. Jeżeli zmierzmy kąty pomiędzy wektorami łączącymi cząsteczkę centralną z cząsteczką zbliżającą się i cząsteczkę centralną z cząsteczką ułożoną na wierzchołku tetraedru (najbliższą cząsteczce zbliżającej się), to owe dwie sytuacje będą odpowiadały kątom równym odpowiednio 54° i 71° . Obecność

dodatkowej cząsteczki może nie być widoczna na omawianym wcześniej rozkładzie kątów θ (ponieważ jest możliwe, że nie będzie ona spełniała kryterium wiązania wodorowego). Dlatego przygotowany został rozkład kątów α , które mierzono pomiędzy wektorami łączącymi cząsteczkę centralną ze wszystkimi cząsteczkami znajdującymi się w jej pierwszej otoczce solwatacyjnej (do odległości 0,33 nm). Zgodnie z przedstawioną argumentacją, należy się spodziewać, że wraz ze wzrostem liczby sąsiadów wzrastać też będzie prawdopodobieństwo wystąpienia kątów o wartościach zbliżonych do 54° i 71° . Oznacza to, że opisywany histogram rozkładu kątów α zawiera informację zarówno o stopniu zatłoczenia najbliższego otoczenia cząsteczki wody, jak i o stopniu lokalnego uporządkowania tetraedrycznego tego otoczenia.



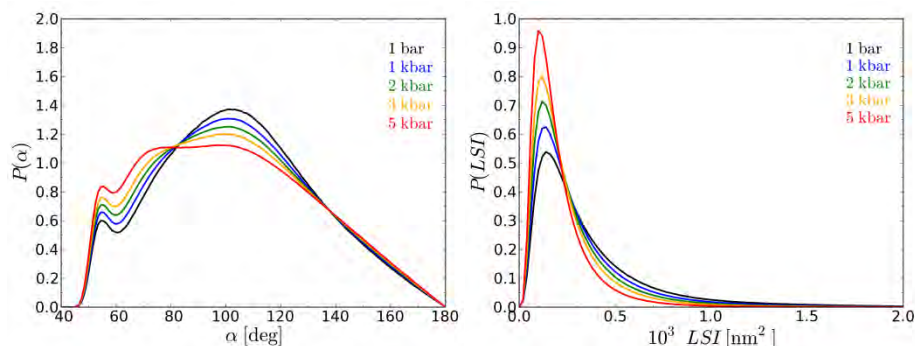
Rys. 5.41. W przypadku konfiguracji tetraedrycznej, preferowane kierunki, z których może zbliżyć się dodatkowa cząsteczka to kierunki wyznaczone przez prostą łączącą cząsteczkę centralną ze środkiem krawędzi tetraedru i środkiem ściany tetraedru.

Analizując rozkłady kątów α dla czystej wody wykonane osobno dla różnej liczby cząsteczek znajdujących się w pierwszej otoczce solwatacyjnej (**Rys. 5.42**) otrzymujemy potwierdzenie tezy, że przy wzroście liczby sąsiadów, faktycznie rośnie znacząco wysokość piku przy pięćdziesięciu kilku stopniach. Zatem obecność tego piku może być użyta jako wskaźnik podwyższonej lokalnej gęstości. Pik przy 71° jest niestety dużo słabiej wyodrębniony, ponieważ jest on ukryty pod szerokim pasmem opisującym rozkład kątów tetraedrycznych.



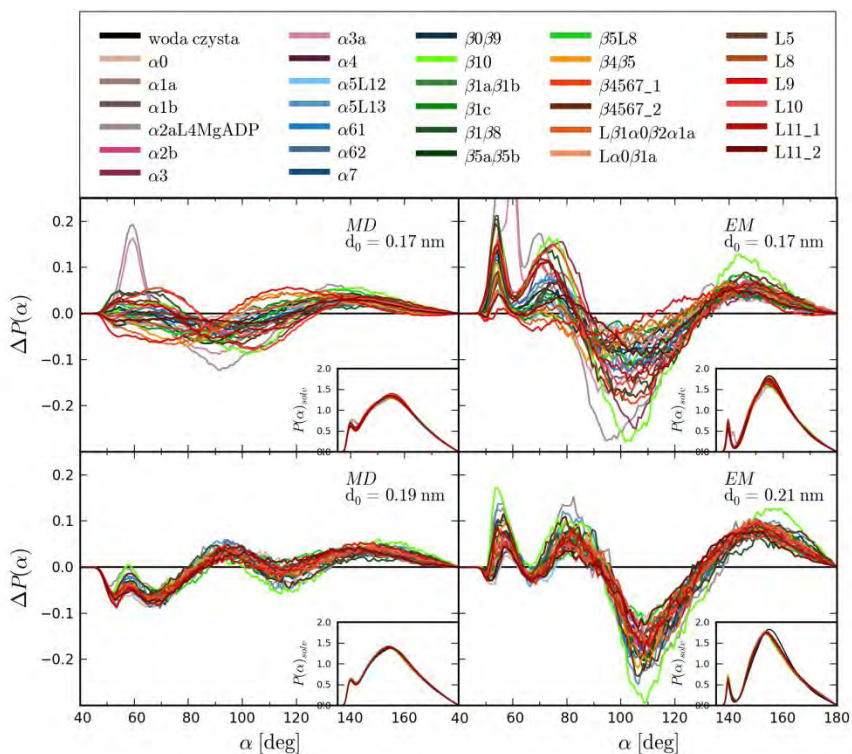
Rys. 5.42. Rozkład wartości kąta α w czystej wodzie SPC/E. U góry: Histogramy sporządzone osobno dla różnej liczby sąsiadów w pierwszej otoczce solwatacyjnej. Na dole: Histogramy sporządzone osobno dla różnej liczby sąsiadów w pierwszej otoczce solwatacyjnej i znormalizowane do jednakowego pola (linie dla różnej liczby sąsiadów oznaczone są różnymi kolorami, opisanymi na wykresie). Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako *MD*, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako *EM*.

Jeśli przedstawione rozumowanie jest słuszne, to wzrost gęstości wody spowodowany wzrostem ciśnienia powinien generować zmiany na histogramie kątów α analogiczne do tych opisanych powyżej, spowodowanych wzrostem liczby sąsiadów. Aby to sprawdzić, wykonane zostały również obliczenia dla wody SPC/E pod różnymi ciśnieniami (od 1 bara do 5 kilobarów). Zwiększonemu ciśnieniu, które prowadzi do wzrostu gęstości (omówionemu wcześniej przy okazji widm mocy), towarzyszyły zarówno zmiany w rozkładzie wartości LSI jak i wzrost wartości histogramów kątów α w okolicach 54° i 71° (**Rys. 5.43**), podobne do tych obserwowanych w warstwie solwatacyjnej (**Rys. 5.40**, **Rys. 5.44**).



Rys. 5.43. Rozkład kątów α i wartości LSI dla wody SPC/E pod różnymi ciśnieniami (od 1 bara do 5 kilobarów).

Podobnie jak poprzednio i z tych samych przyczyn, analizę zachowania się wody w warstwie solwatacyjnej także prowadzę w oparciu o histogramy różnicowe. W przypadku wody solwatacyjnej formy natywnej kinezyny, na histogramach różnicowych (**Rys. 5.44**) wyraźnie rzuca się w oczy fakt, że zmniejszyło się uporządkowanie tetraedryczne (widoczne minimum przy wartościach kątów w okolicach 100°). Ponadto w przypadku wielu warstw solwatacyjnych obserwujemy wzrost wartości histogramu dla kątów 54° i 71° . Wzrost ten po minimalizacji energii układu staje się dużo bardziej wyraźny i jest widoczny dla pierwszej warstwy solwatacyjnej każdego z obszarów na powierzchni kinezyny. W świetle rozumowania przedstawionego w poprzednim akapicie, taki przebieg histogramów różnicowych świadczy o tym, że w porównaniu z wodą czystą, w przypadku wody solwatacyjnej większa liczba cząsteczek wody wchodzi do pierwszej otoczki solwatacyjnej cząsteczki centralnej. Będzie to przyczyną zaburzenia tetraedrycznego uporządkowania cząsteczek oraz wskazuje na wzrost gęstości wody solwatacyjnej będącej, zgodnie z przedstawioną argumentacją, rezultatem zmniejszenia się ilości uporządkowanych, wysokoobjętościowych struktur.

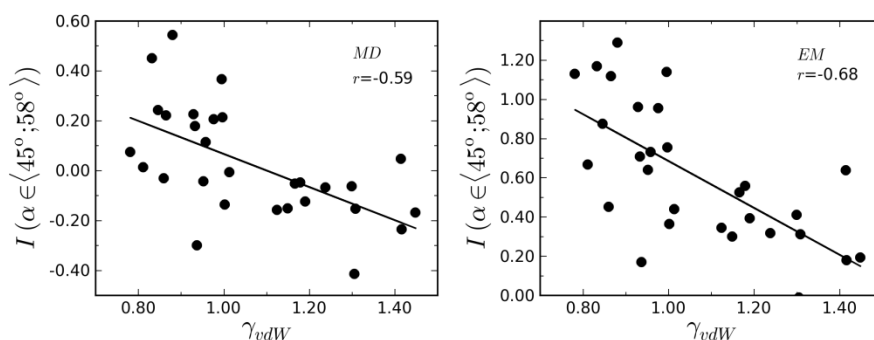


Rys. 5.44. Różnicowy histogram rozkładu wartości kąta α dla pierwszej otoczki solwatacyjnej wybranych obszarów na powierzchni kinezy (u góry układ 1MKJ, na dole układ 1MKJ_0; wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako *MD*, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako *EM*). Wewnętrzne wykresy przedstawiają rozkłady uzyskane dla wody solwatacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkłady dla wody czystej.

Odmienne niż dla formy natywnej wygląda histogram różnicowy kątów α wyznaczony w przypadku formy hydrofobowej. Analiza tego histogramu wyznaczonego przed minimalizacją energii może sugerować, że zamiast z podwyższeniem gęstości, możemy mieć do czynienia z jej obniżeniem, ponieważ wykres przebiega zupełnie inaczej niż ten otrzymany dla formy natywnej (w okolicach 54° i 71° występują minima). Jednakże po minimalizacji otrzymujemy jakościowo bardzo podobny obraz do tego obserwowanego dla wody solwatacyjnej formy natywnej. Jako wyjaśnienie można znowu przywołać istnienie wolnej przestrzeni pomiędzy wodą i białkiem, powtarzając argumentację przedstawioną w sekcji poświęconej omówieniu zasadności użycia metody komórek Voronoi'a i funkcji rozkładu odległości przedstawionych na **Rys. 5.37**. Obszar ten podczas dynamiki molekularnej jest częściowo dostępny dla cząsteczek wody, natomiast po minimalizacji staje się obszarem zabronionym – cząsteczki wody odsuwają się nieco od białka i zbliżają do innych cząsteczek wody.

Przypomnę w tym miejscu o wynikach obliczeń współczynników dyfuzji dla formy hydrofobowej białka (**Rys. 5.7**). Warstwa solwatacyjna jest luźniej z nią związana i nieco rozmyta tuż na powierzchni styku. Może to tłumaczyć mniejszą zależność współczynników dyfuzji od parametru charakteryzującego kształt powierzchni. Ponadto wyjaśnia także większe wartości tych współczynników w porównaniu z bardziej ściśle przylegającą warstwą solwatacyjną formy natywnej, jako że pomiędzy wodą a białkiem znajduje się dodatkowa przestrzeń, do której mogą przesunąć się cząsteczki wody, jeżeli energia kinetyczna im na to pozwoli. W przypadku formy natywnej woda solwatacyjna bardziej ściśle przylega do powierzchni białka, przez co sąsiadujące cząsteczki wody od razu natrafiają na „ścianę” ograniczającą ich swobodę ruchu (pomijając spowalniający wpływ oddziaływań elektrostatycznych z białkiem).

Przebieg histogramu różnicowego skłania do próby wykorzystania go w celu ilościowej oceny zmian gęstości. Jest jednak pewna trudność: co prawda pik w okolicach 54° jest dobrze oddzielony od pozostałej części histogramu, ale pik w okolicach 71° nakłada się na resztę histogramu, co może utrudniać jego użycie. Niemniej jednak, nawet obliczenie wartości całki z różnicowego rozkładu kątów α jedynie w granicach 45° - 58° powinno dostarczyć choć częściowej informacji co do przyrostu liczby struktur o zaburzonej geometrii i wysokiej gęstości.

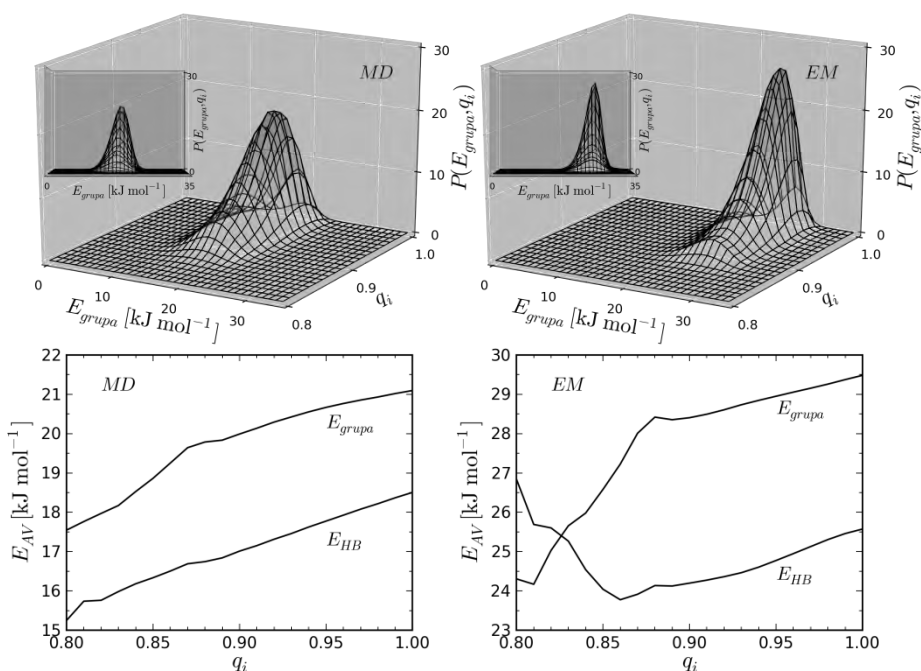


Rys. 5.45. Wartości całek oznaczonych, określających pole obszaru zawartego pod wykresem różnicowym dla kątów α formy natywnej 1MKJ w przedziale 45° - 58° , w funkcji parametru γ_{vdW} . Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM.

Wcześniej zaobserwowaliśmy współzależność pomiędzy objętością komórki Voronoia i parametrem opisującym kształt powierzchni kontaktu pomiędzy białkiem i wodą (**Rys. 5.38**). Przy (niekoniecznie prawdziwym) założeniu, że objętość komórki Voronoia może w tym przypadku służyć za miarę gęstości wody, z zależności tej wynikałoby, że gęstość wody solwatacyjnej jest większa przy wklęsłych częściach białka, a mniejsza (bardziej zbliżona do gęstości wody czystej) przy wypukłych częściach białka. Istnienie tego typu

zależności zgadzałyby się z rezultatami opublikowanymi przez Merzela i Smitha (217). Idąc dalej, skoro wartość całki z różnicowego rozkładu kątów α w proponowanym zakresie (45° - 58°) ma w zamierzeniu być miarą wzrostu gęstości wody w danej otoczce solwatacyjnej, to powinniśmy oczekiwać współzależności pomiędzy jej wartością a parametrem γ_{vdW} . Współczynnik korelacji powinien mieć przeciwny znak niż było to w przypadku korelacji pomiędzy objętością komórki Voronoia i parametrem γ_{vdW} , ponieważ większa wartość całki oznacza większą gęstość, zaś większa objętość komórki Voronoia może oznaczać mniejszą gęstość. Należy ponadto pamiętać, że współczynnik korelacji może mieć mniejszą wartość z powodu przybliżonego charakteru obliczeń zmian ilości nieuporządkowanych struktur (całkowanie w ograniczonym przedziale kątów pozwala wychwycić tylko niektóre z różnych ich rodzajów). Jak widać (**Rys. 5.45**), pewna współzależność pomiędzy wartością całki i parametrem γ_{vdW} faktycznie istnieje, choć – zgodnie z przewidywaniami – współczynnik korelacji nie jest bardzo duży.

Warto zwrócić uwagę na jeszcze jeden, dość istotny aspekt zagadnienia. Do tej pory analiza koncentrowała się raczej na charakterystyce geometrycznej, ale nie wiemy wiele o energii oddziaływań pomiędzy cząsteczkami tworzącymi struktury o różnej geometrii. Tymczasem model Tanaki przewiduje, że wysokoobjętościowe struktury są jednocześnie niskoenergetyczne. Co prawda, jak już wspomniałam, użyte metody obliczeń nie dają podstaw do jednoznacznego utożsamienia dyskutowanych tu struktur tetraedrycznych z uporządkowanymi strukturami z modelu Tanaki, jednak dobrze byłoby sprawdzić, jaką energią charakteryzują się omawiane przeze mnie struktury. Dałoby to mocniejszą podstawę dla próby częściowej ich identyfikacji ze strukturami Tanaki o niskiej gęstości. Obliczenia, które mogą dać nam pewne wskazówki na ten temat, przeprowadzone zostały jedynie dla czystej wody; niestety, nie da się identycznych obliczeń zrealizować w odniesieniu do wody solwatacyjnej (znowu pojawia się problem asymetrii środowiska). Pomysł takiego sprawdzenia zasadał się na wyborze, przy użyciu kryterium uporządkowania, określonej grupy cząsteczek wody oraz obliczeniu przybliżonej energii potencjalnej tej grupy. Tak więc wzięto pod uwagę tylko te cząsteczki wody, które tworzą dokładnie cztery wiązania wodorowe z innymi je otaczającymi. W takim przypadku całkowita liczba sąsiadujących cząsteczek wody w pierwszej otoczce solwatacyjnej (do 0,33 nm) może być równa liczbie partnerów tworzących wiązania wodorowe (tzn. 4), ale może też być większa, przy czym pozostałe, „nadmiarowe” cząsteczki nie spełniają kryterium wiązania wodorowego, choć znajdują się w najbliższym sąsiedztwie cząstki centralnej (patrz definicja wiązania wodorowego opisana w rozdziale 4.4). Znalazłszy takie grupy, obliczono dla nich parametr tetraedryczności q_i , średnią energię wiązania wodorowego w grupie E_{HB} oraz całkowitą (sumaryczną, tzn. elektrostatyczną i van der Waalsa) energię oddziaływań pomiędzy wszystkimi cząsteczkami tworzącymi grupę, która to wartość została następnie podzielona przez liczbę cząsteczek w grupie dla otrzymania wartości E_{grupa} .



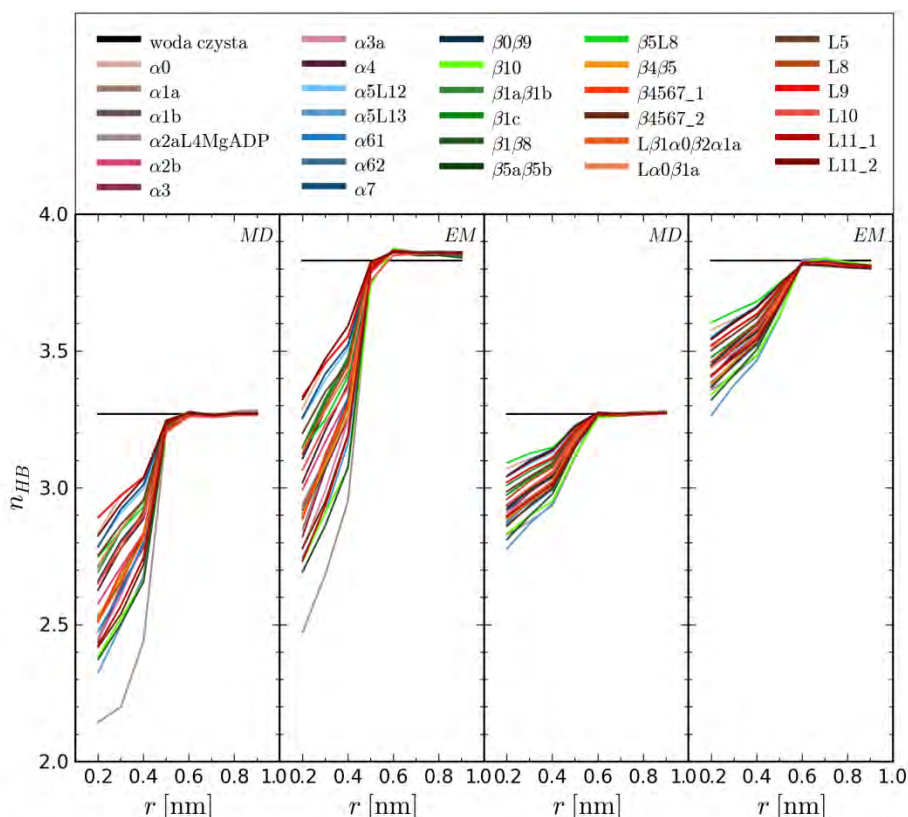
Rys. 5.46. Wyniki analizy energii oddziaływań dla tych cząsteczek czystej wody, które tworzą dokładnie cztery wiązania wodorowe. U góry: Trójwymiarowe rozkłady prawdopodobieństwa wystąpienia określonej energii oddziaływań E_{grupa} przy zmiennej wartości parametru tetraedryczności q_i . Na dole: Współzmiennosc energii E_{grupa} i E_{HB} wraz z wartością parametru tetraedryczności q_i . Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM.

Zarówno energia pojedynczego wiązania wodorowego, E_{HB} , jak i przypadająca na jedną cząsteczkę średnia energia oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w grupie, E_{grupa} , rosną wraz ze wzrostem stopnia uporządkowania tetraedrycznego, q_i . Wobec tego należy stwierdzić, że wprowadzenie dodatkowej cząsteczki powoduje zarówno obniżenie średniej energii wiązania wodorowego, jak i średniej energii stabilizującej cały układ (rozumianej tu w sposób bardzo przybliżony, jako wartość E_{grupa}).

Podane tu wnioski mogą znaleźć potwierdzenie w literaturze. Na przykład Matysiak *et al.* (274) stwierdzili, że w przypadku, gdy występuje nadmiar sąsiadujących cząsteczek wody, wówczas bardziej prawdopodobne jest, że będziemy mieli do czynienia ze słabszymi wiązaniami wodorowymi. Wskazali również na to, że wprowadzenie do pierwszej otoczki hydratacyjnej nadmiarowej cząsteczki wody może doprowadzić do zaburzenia lub zerwania istniejącego wiązania. Do tych obserwacji dobrze też pasują wyniki Reiteri'ego *et al.* (275), dostarczając informacji o dynamicznym charakterze struktur obecnych w cieczy. Według nich, cząsteczki wody, które tworzą długożyjące

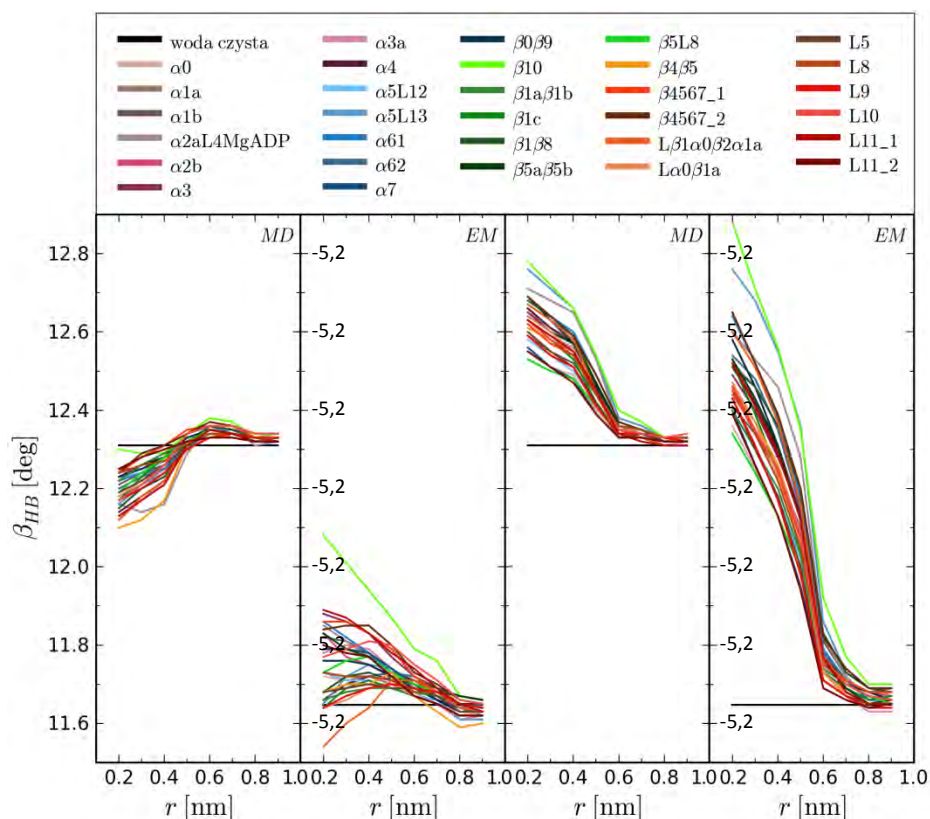
konfiguracje, charakteryzują się tym, że średnio ich najbliższe otoczenie jest o około 9% mniej gęste.

Można więc stwierdzić, że wiązania wodorowe są czynnikiem stabilizującym uporządkowane struktury o wysokiej objętości, których powstawanie prowadzi do spadku energii układu i które działają przeciwnie do tendencji tworzenia struktur nieuporządkowanych o większej gęstości, których powstawanie prowadzi do wzrostu entropii. Zdolność do tworzenia wiązań wodorowych uważa się za kluczowy czynnik decydujący o wyjątkowych właściwościach wody. Dlatego warto też sprawdzić, jak minimalizacja energii wpłynęła na ich geometrię.



Rys. 5.47. Średnia liczba wiązań wodorowych n_{HB} pomiędzy cząsteczkami wody solwatacyjnej w kolejnych przedziałach odległości od białka oraz dla czystej wody (czarna linia ciągła). Dwa pierwsze wykresy od lewej: układ 1MKJ; dwa pierwsze wykresy od prawej: układ 1MKJ_0. Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM.

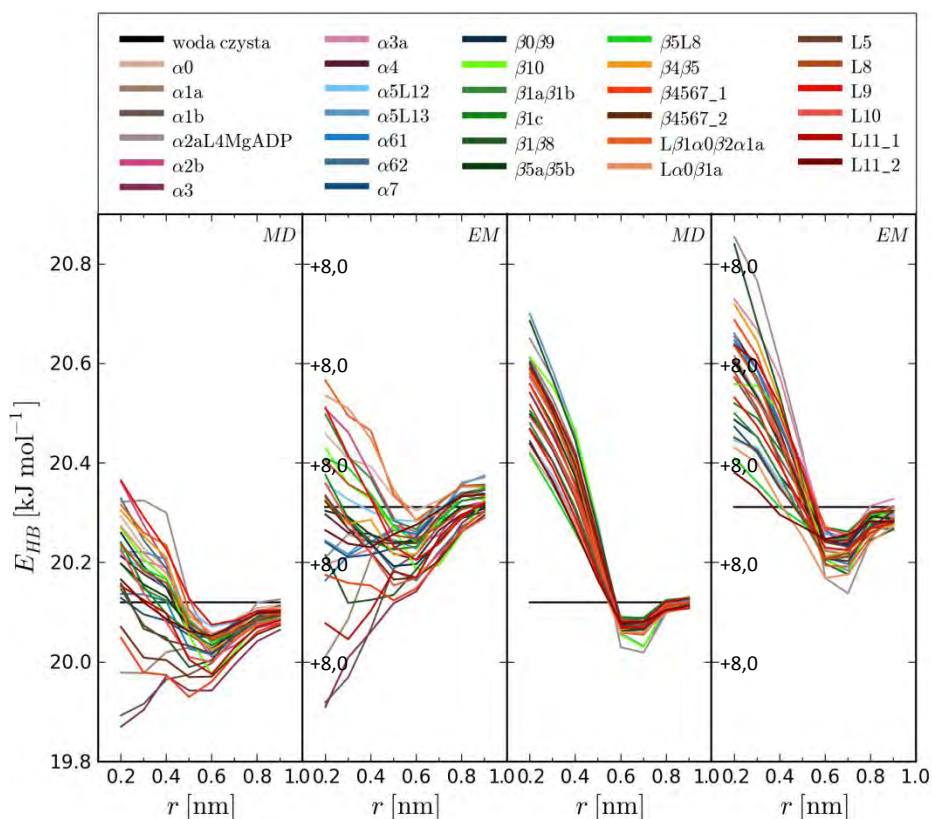
Widzimy (**Rys. 5.47**), że średnia liczba wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody jest na ogół większa wokół formy hydrofobowej niż w sąsiedztwie formy natywnej białka. Prawdopodobnie najważniejszą, oczywistą przyczyną tej różnicy jest możliwość (lub jej brak) tworzenia wiązań wodorowych z powierzchnią białka. Zdecydowane zwiększenie się liczby wiązań wodorowych w warstwie solwatacyjnej po zminimalizowaniu trajektorii potwierdza wcześniejsze przypuszczenia dotyczące odsuwania się cząsteczek wody od powierzchni hydrofobowej i przysuwania ich ku sąsiadującym cząsteczkom wody w celu zoptymalizowania oddziaływań woda-woda, które zachodzi wskutek minimalizacji.



Rys. 5.48. Średni kąt wiązania wodorowego β_{HB} wody solwatacyjnej w kolejnych przedziałach odległości od białka oraz dla czystej wody (czarna linia ciągła). Dwa pierwsze wykresy od lewej: układ 1MKJ; dwa pierwsze wykresy od prawej: układ 1MKJ_0. Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM.

Ponadto średni kąt wiązania wodorowego (**Rys. 5.48**) (oraz średnia odległość pomiędzy atomami wodoru i tlenu zaangażowanymi w wiązanie) w wyniku minimalizacji wyraźnie się zmniejszają, co bardzo dobrze koresponduje

z faktem, że jednocześnie następuje wzrost średniej energii wiązań wodorowych (**Rys. 5.49**). Zauważmy jednak, że choć średni kąt wiązania po minimalizacji wody solwatacyjnej cząsteczki hydrofobowej uległ zmniejszeniu, to jednak wyraźnie zwiększyła się różnica pomiędzy wartościami tego kąta tuż przy powierzchni białka i w oddaleniu od niej. Ilustruje to, że cząsteczki próbują podjąć niełatwe wyzwanie, jakim jest utworzenie możliwie wielu wiązań wodorowych przy powierzchni białka, nawet kosztem pewnego ich zdeformowania (w większości przypadków jest to mniej niż 1° różnicy w stosunku do wartości obserwowanej dla wody znajdującej się w oddaleniu od powierzchni białka). Zdeformowaniu towarzyszy niewielkie wydłużenie wiązania (**Rys. 5.50**).

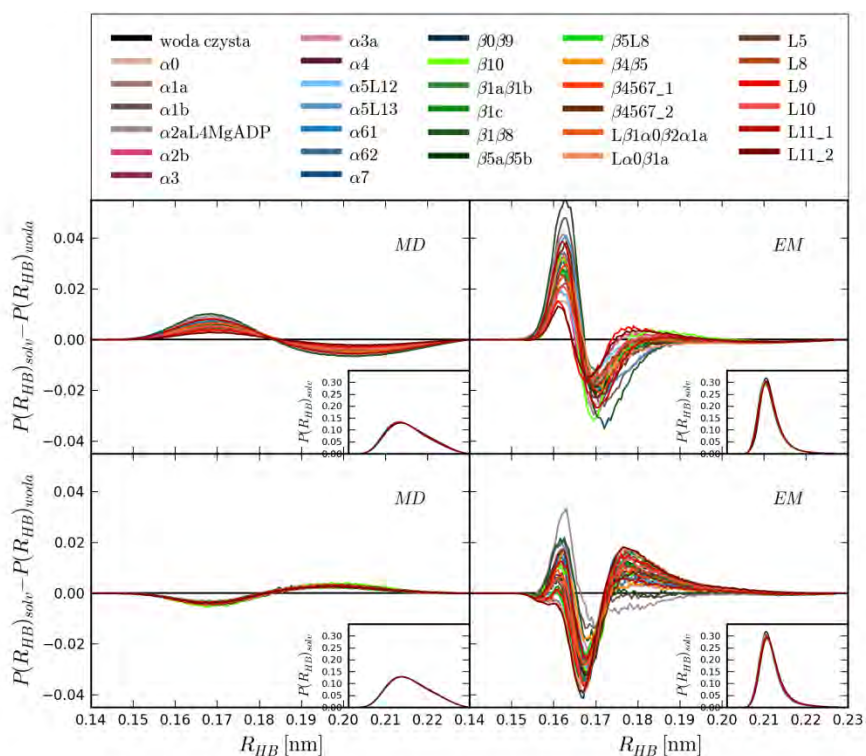


Rys. 5.49. Średnia energia wiązania wodorowego E_{HB} wody solwatacyjnej w kolejnych przedziałach odległości od białka oraz dla czystej wody (czarna linia ciągła). Dwa pierwsze wykresy od lewej: układ 1MKJ; dwa pierwsze wykresy od prawej: układ 1MKJ_0. Wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM.

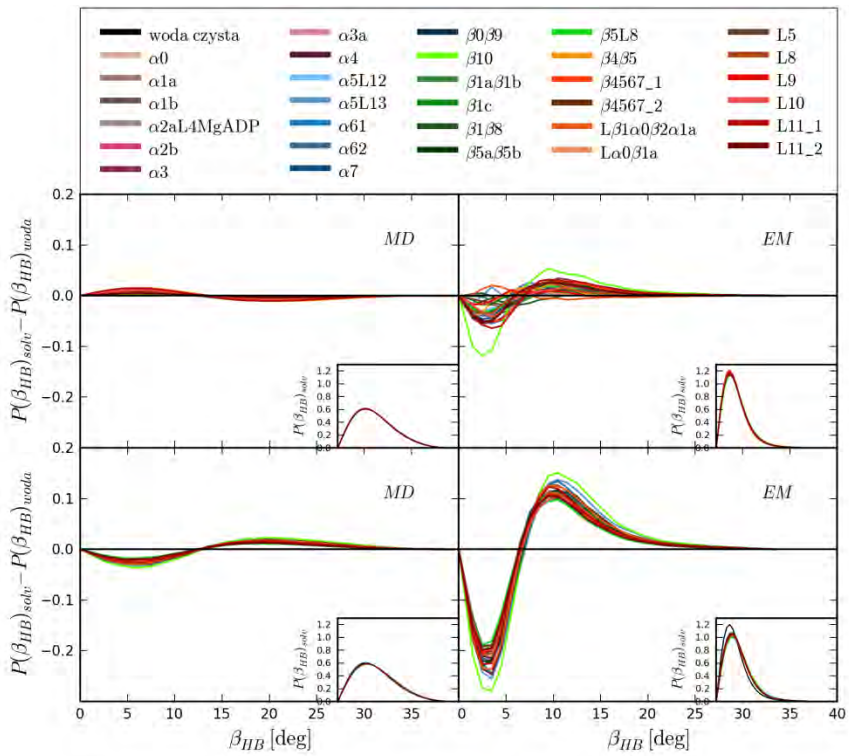
W przeciwieństwie do formy natywnej, wiązania wodorowe wody solwatacyjnej formy hydrofobowej średnio były nieco dłuższe i bardziej

zakrzywione niż wiązania wody czystej już przed minimalizacją, która pogłębiła te różnice.

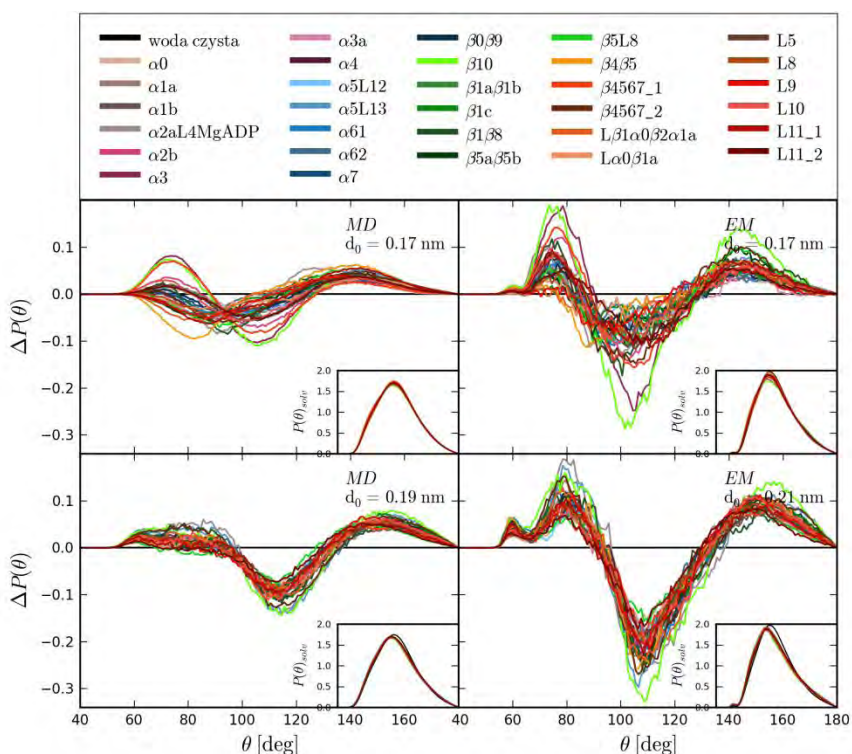
Zarówno średni kąt wiązania jak i jego długość zmieniają się w dokładnie przeciwny sposób w otoczce sowatacyjnej kinezyiny hydrofobowej i formy natywnej w przypadku zwykłej dynamiki molekularnej. Tymczasem po minimalizacji energii zmiany zaczynają być jakościowo podobne.



Rys. 5.50. Rozkład prawdopodobieństwa dla odległości tlen - wódor (R_{HB}) w wiązaniu wodorowym w pierwszej warstwie solwatacyjnej po odjęciu prawdopodobieństwa dla czystej wody (u góry układ 1MKJ, na dole układ 1MKJ_0; wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM). Wewnętrzne wykresy przedstawiają rozkłady uzyskane dla wody solwatacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkłady dla wody czystej.



Rys. 5.51. Rozkład prawdopodobierstwa dla kąta θ_{HB} w wiązaniu wodorowym w pierwszej warstwie solwacyjnej po odjęciu prawdopodobierstwa dla czystej wody (u góry układ 1MKJ, na dole układ 1MKJ_0; wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM). Wewnętrzne wykresy przedstawiają rozkłady uzyskane dla wody solwacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkłady dla wody czystej.



Rys. 5.52. Wykres różnicowy dla rozkładu prawdopodobieństwa dla kąta θ pomiędzy wiązaniami wodorowymi w pierwszej warstwie solwatacyjnej oraz dla czystej wody (u góry układ 1MKJ, na dole układ 1MKJ_0; wyniki uzyskane z trajektorii przed minimalizacją oznaczone jako MD, wyniki uzyskane z trajektorii poddanej minimalizacji oznaczone jako EM). Wewnętrzne wykresy przedstawiają rozkłady uzyskane dla wody solwatacyjnej przed odejmowaniem oraz rozkłady dla wody czystej.

Przedstawione dotychczas rozważania stanowią podstawę dla ostatecznego sformułowania modelu solwatacji makrocząsteczek. Argumentacja jest następująca.

Punktem wyjścia jest zauważenie, że sieć wiązań wodorowych wody solwatacyjnej jest mniej tetraedryczna niż wody czystej. Wykres powyżej (**Rys. 5.52**) przedstawia wyniki obliczeń rozkładów kątów θ przed i po minimalizacji. Można wskazać przynajmniej dwa czynniki mogące leżeć u podłoża tej deformacji. Pierwszym z nich będzie próba dopasowania sieci wiązań do powierzchni białka, wymuszona przez ciśnienie zewnętrzne (cały układ znajduje się pod ciśnieniem atmosferycznym, które dociska wodę do powierzchni białka; gdyby ciśnienie zewnętrzne było równe zero, woda zamieniłaby się w parę). Powinno to doprowadzić do zniekształcenia sieci, być może za wyjątkiem rzadko spotykanych sytuacji, kiedy powierzchnia białka (wraz z donorami i akceptorami wiązań wodorowych) jest doskonale dopasowana do geometrii sieci wiązań wodorowych woda-woda. Stopień

zniekształcenia tej sieci powinien zależeć od lokalnej geometrii powierzchni. Drugim czynnikiem będzie oddziaływanie cząsteczek wody z powierzchnią białka siłami elektrostatycznymi, co może modyfikować wzajemną ich orientację i pogłębiać zmiany spowodowane przez czynnik pierwszy. Na czynnik elektrostatyczny i jego rolę we wzroście gęstości wody solwatacyjnej wskazali Merzel i Smith (217). Oczekiwać można ponadto, że w rezultacie działania obu tych czynników łącznie (to znaczy wpływu oddziaływań elektrostatycznych i dopasowywania się wody do kształtu białka), dojdzie do dosyć ścisłego przylegania wody solwatacyjnej do powierzchni białka, co faktycznie obserwujemy w przypadku formy natywnej.

Fakt deformacji sieci wiązań wodorowych w stosunku do wody czystej może mieć podstawowe znaczenie dla zwiększenia gęstości wody solwatacyjnej. Deformacja sieci oznacza, że obniżona jest stabilność bardziej uporządkowanych struktur (omówione wyżej wyniki dla czystej wody wskazują, że ze spadkiem tetraedryczności układu czterech wiązań wodorowych zmniejsza się wartość bezwzględna energii potencjalnej wzajemnych oddziaływań w grupie cząsteczek, czyli zmniejsza się stabilność całej grupy). W efekcie mogą one zostać łatwiej przekształcone w struktury nieuporządkowane o wysokiej gęstości i energii, ponieważ są bardziej podatne na penetrację przez otaczające cząsteczki i łatwiej się poddają ich niszczącemu działaniu. Zwiększone prawdopodobieństwo zapadnięcia się wysokoobjętościowych struktur staje się zatem przyczyną większej gęstości. Jednocześnie proces odwrotny, polegający na odtwarzaniu tych struktur, będzie mniej prawdopodobny z braku odpowiedniej tetraedrycznej matrycy, sprzyjającej właściwemu układaniu się cząsteczek wody.

Zachowanie się wody w pobliżu cząsteczki czysto hydrofobowej na pierwszy rzut oka wydaje się być inne niż w pobliżu formy natywnej. W przypadku zwykłej dynamiki molekularnej, niektóre zmiany (na przykład rozkładu kątów α) są częściowo lub całkowicie odwrotne od zmian znalezionych dla formy natywnej. Jednakże po minimalizacji energii wyniki wskazują na wzrost gęstości wody – choć prawdopodobnie mniejszy, niż dla formy natywnej, to jednak porównywalny co do wielkości. Różnicowy histogram rozkładów kątów θ pokazuje też, że tetraedryczność sieci wiązań wodorowych jest znacząco zmniejszona w stosunku do wody czystej. Kształt tych histogramów jest trochę inny od obserwowanego dla formy natywnej, co oznacza, że sieć wiązań wodorowych jest zniekształcona w inny sposób (i głębiej, biorąc pod uwagę, że odchylenia są większe). Jest to wynikiem braku oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy białkiem i wodą. Powoduje to, że siły oddziaływania pomiędzy samymi cząsteczkami wody przewyższają przyciągające siły oddziaływania z powierzchnią białka i przez to mają względnie większy udział w tym, jak cząsteczki wody się ułożą. Wychodząc od uwagi o braku tych oddziaływań, można dojść także do prawdopodobnego wyjaśnienia, dlaczego wydaje się, że gęstość wody solwatacyjnej formy natywnej jest większa niż formy hydrofobowej, chociaż stopień deformacji sieci wiązań wodorowych dla formy natywnej jest mniejszy. Otóż aby zniszczyć strukturę o wysokiej objętości, trzeba doprowadzić do zerwania pewnej, większej lub mniejszej, liczby wiązań wodorowych. Po zerwaniu wiązania

pozostaje niezajęte miejsce donorowe lub akceptorowe. Chociaż istnienie takich niezajętych miejsc o potencjale tworzenia wiązania było stwierdzone eksperymentalnie wokół cząsteczek hydrofobowych (157), to jednak nie jest to sytuacja preferowana z energetycznego punktu widzenia. Trwałe zerwanie wiązania wodorowego pomiędzy parą cząsteczek odbywać się będzie najłatwiej w sytuacji, kiedy w bliskim sąsiedztwie dostępny będzie partner do wymiany wiązania. W skrajnym przypadku sytuacji takiej odpowiada skokowy model wymiany wiązań wodorowych (276), omówiony we wstępie literaturowym. Służyć za nowego partnera może zarówno cząsteczka wody, jak i akceptor lub donor wiązania wodorowego na powierzchni białka. Ponieważ oczywiście w przypadku formy hydrofobowej powierzchnia białka nie jest zdolna do tworzenia wiązań wodorowych, więc w tym przypadku możemy mieć do czynienia z sytuacją, kiedy sieć wiązań wodorowych się deformuje, nawet stosunkowo znacznie, ale wobec braku nowego partnera same wiązania nie ulegają zerwaniu. Komplementarny do tych wniosków jest przedstawiony w przeglądzie literatury (przy okazji dyskusji efektu hydrofobowego) pogląd, że w wodzie solwatacyjnej cząsteczki hydrofobowej dochodzi do spowalniania dynamiki wiązań wodorowych.

Opisany model hydratacji pozwala w jasny i bardzo intuicyjny sposób przedstawić różnicę pomiędzy hydratacją hydrofobową a hydrofilową. Jak argumentowałam powyżej, cechą charakterystyczną zjawiska hydratacji hydrofobowej jest pewne odsunięcie się przylegającej warstwy wody od hydratowanej powierzchni, w wyniku czego powstaje cienki obszar pustej przestrzeni. Jest to kluczowy czynnik, odróżniający proces hydratacji formy hydrofobowej od procesu hydratacji formy natywnej białka. Z punktu widzenia energii potencjalnej oddziaływań międzycząsteczkowych, obszar ten jest obszarem zabronionym, może jednak być penetrowany przez cząsteczki wody posiadające wystarczającą energię kinetyczną, pozwalającą im na wniknięcie w głąb bariery potencjału. Przypuśćmy teraz, że w warstwie solwatacyjnej obecne są oba rodzaje struktur: zarówno te o niskim uporządkowaniu i wysokiej gęstości, jak i te o wysokim uporządkowaniu i niskiej gęstości. Jak to opisałam powyżej, różnią się one także wewnętrzną energią potencjalną oddziaływań międzycząsteczkowych woda-woda. W sąsiedztwie powierzchni hydrofobowej zachowanie się obu tych rodzajów struktur będzie odmienne: cząsteczkom wody wchodzącym skład struktur o wysokiej gęstości wystarczy nieco mniejsza energia kinetyczna, aby penetrować obszar zabroniony, niż cząsteczkom wbudowanym w struktury wysoce uporządkowane, z powodu różnicy w energii potencjalnej. W rezultacie, za „rozmycie” warstwy solwatacyjnej odpowiedzialny będzie głównie rozpad struktur o wysokiej gęstości. Co więcej, rozpad ten dokonywać się będzie przede wszystkim na drodze „wypychania” ze struktury tych cząsteczek wody, które przyczyniają się do pojawienia się pików przy 54° i 71° na rozkładzie różnicowym kątów α (gdyż to te cząsteczki są w znacznej mierze odpowiedzialne za wzrost energii potencjalnej oddziaływań w strukturze).

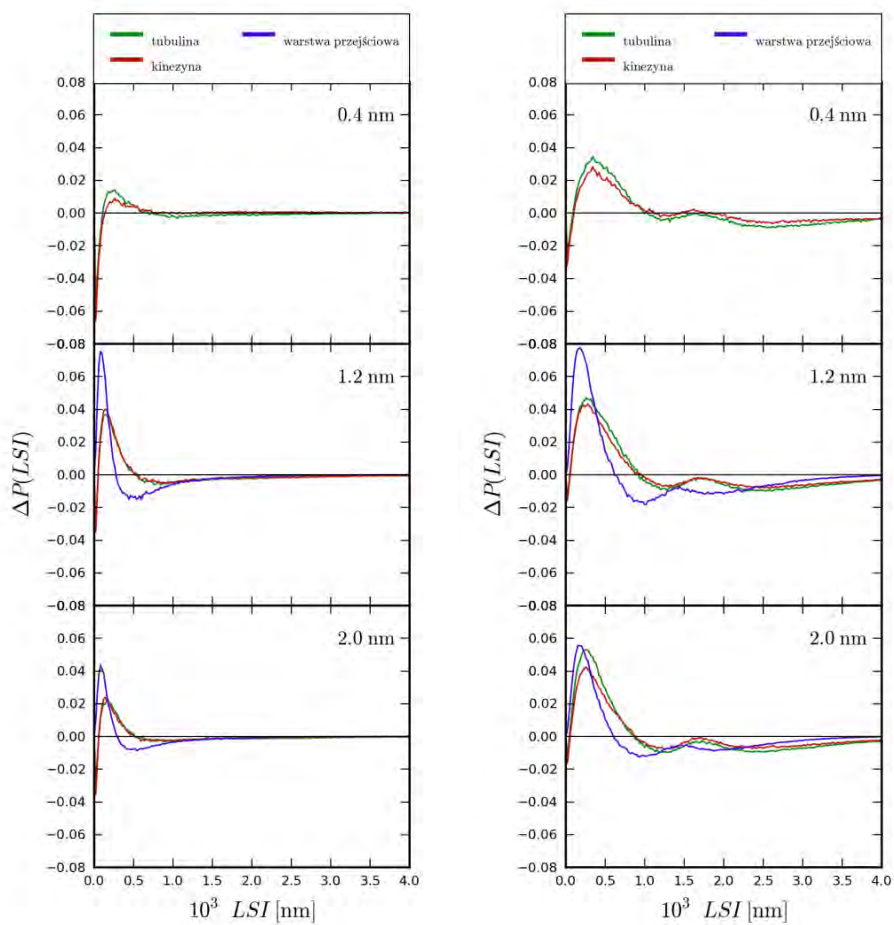
Oczywiście, w przypadku hydratacji formy natywnej zjawisko odsunięcia się wody od hydratowanej powierzchni praktycznie nie występuje. Zatem istnienie tego efektu wyjaśnia pozorne sprzeczności w obrazie solwatacji

obu form: hydrofobowej i natywnej. Ponadto, całość przedstawionej argumentacji każe odnosić się z dużą ostrożnością do (ostatnio coraz bardziej popularnej) metody wykorzystywania komórek Voronoï'a w analizie właściwości wody solwatacyjnej.

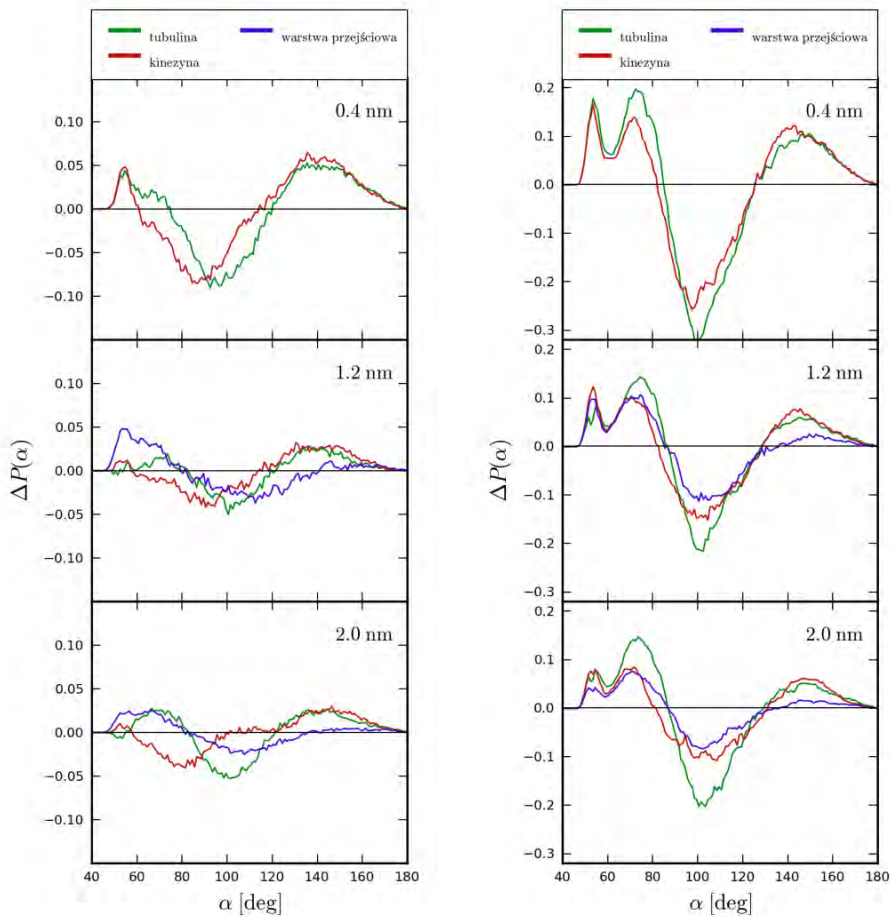
Na koniec warto dodać, że podział powierzchni białka na wiele obszarów o różnej geometrii i charakterze chemicznym pozwolił na uzyskanie szerszego obrazu niż można by otrzymać analizując uśrednione właściwości całej otoczki solwatacyjnej. Oczywiście właściwości wody w pobliżu różnych obszarów się różnią, ale jakościowo udało się stworzyć spójny opis obejmujący wszystkie obszary, dla którego punktem wyjścia były właściwości czystej wody. Dlatego można domniemywać, że zaproponowany model procesu hydratacji powinien odnosić się także do innych białek, a nie tylko kinezyiny.

5.2.8. Zastosowanie modelu solwatacji do opisu właściwości wody znajdującej się w obszarze pomiędzy białkami

W przypadku wody solwatacyjnej znajdującej się w pierwszej otoczce solwatacyjnej oraz w warstwie przejściowej pomiędzy białkami, mamy do czynienia z podobnymi przebiegami histogramów różnicowych wartości LSI i kątów α , jak to przed chwilą omawiałam przy okazji wody solwatacyjnej pojedynczego białka (**Rys. 5.53, Rys. 5.54**).



Rys. 5.53. Różnicowy rozkład wartości LSI dla wody w pierwszych otoczkach solwatacyjnych kinezyzny i tubuliny oraz wody w warstwie przejściowej (poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi). Z lewej: wyniki uzyskane w wyniku analizy trajektorii przed minimalizacją. Z prawej: Wyniki uzyskane w wyniku analizy trajektorii zminimalizowanej. Promień odcięcia $d_0=0,17$ nm.



Rys. 5.54. Różnicowy rozkład wartości kąta α dla wody w pierwszych otoczkach solwatacyjnych kinezyzny i tubuliny oraz wody w warstwie przejściowej (poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi). Z lewej: wyniki uzyskane w wyniku analizy trajektorii przed minimalizacją. Z prawej: Wyniki uzyskane w wyniku analizy trajektorii zminimalizowanej. Promień odcięcia $d_0=0,17$ nm.

Świadczy to zatem o wzroście gęstości wody solwatacyjnej. O tym samym można było wnioskować na podstawie pomiaru objętości komórek Voronoia. Choć z omówionych wyżej powodów niekoniecznie metoda ta musi być wiarygodna dla wody z pierwszej otoczki solwatacyjnej, to jednak powinna się sprawdzać, jeżeli analizujemy cząsteczki wody niestykające się bezpośrednio z białkiem.

Na uwagę zasługuje spostrzeżenie, że woda w obszarze „pośrednim”, tzn. poza warstwami bezpośrednio przylegającymi do powierzchni obu białek,

również ma podwyższoną gęstość. Proponowany i opisany w poprzedniej sekcji model solwatacji biomolekuł pozwala wyjaśnić ten efekt następująco.

Jeżeli mamy do czynienia z wodą znajdującą się w obszarze pomiędzy dwoma białkami, to występuje w jej przypadku czynnik, który odróżnia tę sytuację od przypadku, kiedy obecna jest tylko jedna cząsteczka białka. Jest to dodatkowe pole elektryczne obecne w przestrzeni pomiędzy białkami. Takie pole obecne jest oczywiście również wokół pojedynczej cząsteczki białka, lecz w obszarze pomiędzy dwoma białkami jest ono znacznie silniejsze i bardziej jednorodne, przez co jego wpływ jest bardziej widoczny w dużym obszarze przestrzeni.

Ponieważ cząsteczki wody SPC/E obdarzone są stałym momentem dipolowym, mogą odpowiadać na obecność pola elektrycznego, zmieniając swą orientację przestrzenną. Tendencja dipoli do ustawiania się zgodnie z liniami pola elektrycznego może powodować dodatkowe odkształcenie sieci wiązań wodorowych, co zgodnie z przedstawionym powyżej modelem hydratacji może skutkować dalszym wzrostem gęstości. Dlatego zdecydowałam się oszacować wypadkowy moment dipolowy cząsteczek wody pomiędzy białkami.

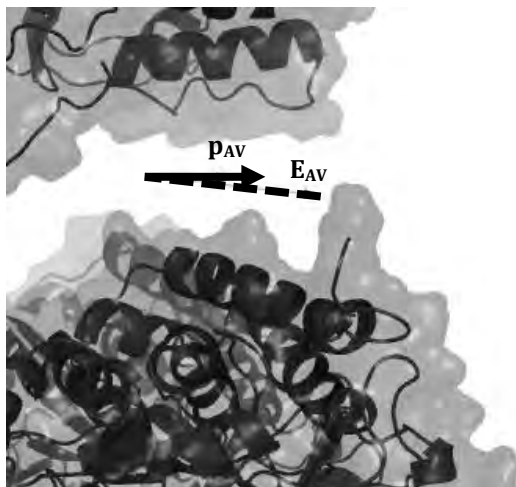
5.2.9. Średni moment dipolowy warstwy solwatacyjnej i natężenie pola elektrycznego

Wyniki obliczeń średniego wypadkowego momentu dipolowego dla cząsteczek wody solwatacyjnej zawartej w obszarze pomiędzy dwoma białkami (kinezyną i dimerem tubulinowym) wraz z uśrednioną wartością natężenia pola elektrycznego działającego na cząsteczki wody zawiera **Tabela 5.6**.

Odległość [nm]		E_{AV} [10^9 V/m]	ρ_{AV}
0,4	Całość	3,0	0,19
1,2	Całość	3,7	0,19
	Warstwa prz.	4,8	0,30
2,0	Całość	4,1	0,17
	Warstwa prz.	5,0	0,21

Tabela 5.6. Wartości średniego momentu dipolowego dla cząsteczek wody zawartej pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym (ρ_{AV}) oraz średnie natężenie pola elektrycznego (E_{AV}) tylko dla cząsteczek położonych dalej niż 0,4 nm od powierzchni białek („warstwa prz.”) oraz dla wszystkich cząsteczek wody pomiędzy białkami („całość”). Wyniki dla momentu dipolowego są bezwymiarowe, gdyż podzielone zostały przez wartość momentu dipolowego pojedynczej cząsteczki wody.

Jedną parę wyników zilustrowałam na **Rys. 5.55**.



Rys. 5.55. Kierunek i zwrot wypadkowego wektora momentu dipolowego dla cząsteczek wody znajdujących się pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym, ale nie bliżej niż 0,4 nm od powierzchni białek (czyli poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi) (\mathbf{p}_{AV}). Linią przerywaną zaznaczono kierunek wektora pola elektrycznego generowanego przez białko i odczuwanego przez cząsteczki wody (\mathbf{E}_{AV}). Wyniki dla układu 1BG2_1JFF_20. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Okazuje się, że w obszarze pomiędzy białkami można stwierdzić występowanie niezerowego wypadkowego momentu dipolowego. Kierunek tego wektora podąża za kierunkiem wektora pola elektrycznego wytwarzanego przez białka, którego doświadczają cząsteczki wody w tym obszarze.

Analizując podane w tabeli powyżej wartości, można dojść do wniosku, że podane wartości wypadkowego momentu dipolowego cząsteczek wody solwatacyjnej są znaczne. Zatem pole elektryczne wywiera wpływ na średnią orientację cząsteczek wody zawartych w tym obszarze. W wielu przypadkach taka zmiana ułożenia przestrzennego może się odbywać wbrew naturalnej tendencji do tworzenia konformacji tetraedrycznej, wpływając na podwyższenie gęstości.

Ponadto można zauważyć, że wartości średniego momentu dipolowego otrzymanego dla wody znajdującej się dalej niż 0,4 nm od obu białek (poza pierwszymi otoczkami solwatacyjnymi) są większe niż wartości obliczone dla całej wody znajdującej pomiędzy białkami. Najwyraźniej w dużej bliskości białka na cząsteczki wody silniej wpływają inne czynniki (takie jak lokalny kształt powierzchni białka lub lokalny ładunek), skłaniając je do przyjęcia określonego ułożenia w przestrzeni.

5.2.10. Podsumowanie

Właściwości wody solwatacyjnej pomiędzy dwoma białkami okazały się być często jakościowo (a często także ilościowo) porównywalne ze zmianami

obserwowanymi w przypadku pojedynczego białka. Woda w obszarze pomiędzy białkami charakteryzuje się wyższą gęstością niż woda czysta. Wzrost gęstości wody solwatacyjnej, zgodnie z postulowanym modelem solwatacji makromolekuł, może być wytłumaczony działaniem dwóch czynników. Pierwszym z nich jest odkształcenie sieci wiązań wodorowych spowodowane próbami dopasowania geometrii sieci wiązań wodorowych woda-woda do nieregularnego ukształtowania powierzchni białka. Drugim jest obecność pola elektrycznego, które wywiera porządkujący wpływ na wektory momentów dipolowych poszczególnych cząsteczek wody. Efektem działania każdego z tych czynników jest destabilizacja istniejących w ciekłej wodzie struktur, charakteryzujących się wysoką stabilnością energetyczną oraz dużą objętością właściwą. Prowadzi to w efekcie do wzrostu gęstości wody w tym obszarze przestrzeni, w którym poddana jest ona działaniu jednego lub obu tych czynników. W przypadku wody znajdującej się w obszarze pomiędzy białkami i zawartej w obszarze „pośrednim” – tzn. w warstwie, którą otrzymamy po wyłączeniu obszaru przylegającego bezpośrednio do powierzchni obu białek – czynnikiem decydującym o wzroście gęstości jest pole elektryczne generowane przez molekuły obu sąsiadujących jednostek białkowych. Dodatkowo na wzrost gęstości tej wody może wpływać deformacja sieci wiązań wodorowych zachodząca w pierwszej otoczce solwatacyjnej. Sieć wiązań wodorowych pierwszej warstwy solwatacyjnej białka łączy się przecież z resztą otaczającej wody. Dlatego jej deformacja w naturalny sposób zaburza także geometrię sieci wiązań wodorowych w drugiej warstwie solwatacyjnej białka.

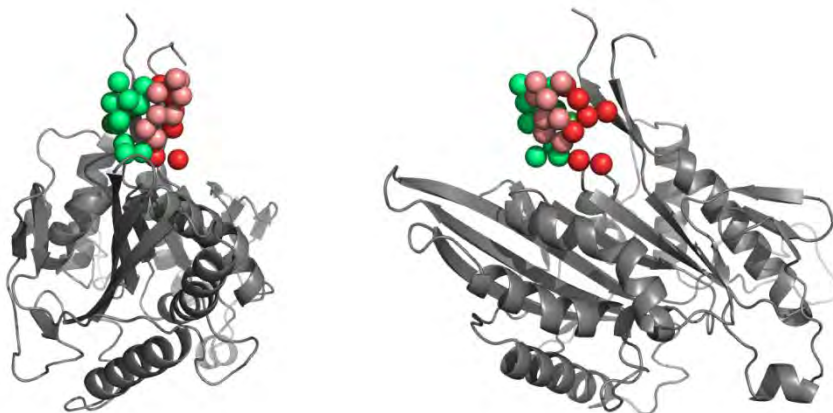
5.3. Rola efektów solwatacyjnych w procesie dokowania się szyjki łącznikowej

Natknąć się można na wiele dyskusji dotyczących dokładnej roli szyjki łącznikowej w pracy kinezy, jak omówiłam to w przeglądzie literatury. Podczas wykonywania kroku przez motor, szyjka łącznikowa przyłącza się do powierzchni przedniej głowy, a tylna głowa przemieszcza się do przodu. Wielu autorów uważa, że proces dokowania się szyjki nie jest w stanie sam z siebie wygenerować siły potrzebnej do przesuwania motoru. Jednak jak wskazuje praca (25), jeżeli szyjka połączona jest z krótkim początkowym fragmentem łańcucha białkowego w strukturę zwaną CNB, to wówczas struktura ta ma wyraźną preferencję do łączenia się z domeną motoryczną, a proces ten może mieć ważny udział w generowaniu mocy przez motor. Autorzy zmierzili wartość siły, którą potrafi generować ruch części domeny motorycznej kinezy. Okazało się, że wyniki pomiarów różnią się w przypadku symulacji z uwzględnieniem cząsteczek wody i bez ich jawnego uwzględniania.

Rezultaty te skłaniają do przypuszczenia, że efekty solwatacyjne mogą wywierać wpływ na siłę, jaka jest wytwarzana podczas dokowania. Wniosek ten był przyczyną zaprojektowania przez mnie układów składających się z głowicy kinezy zanurzonej w wodzie SPC/E oraz w wodzie o parametrach zmodyfikowanych w sposób opisany w części poświęconej metodyce. Parametry te zostały tak dobrane, że gęstość pozostała w przybliżeniu taka sama jak oryginalnego modelu SPC/E. Modyfikacji nie uległy też siły oddziaływania elektrostatycznego pomiędzy cząsteczkami wody (oraz oczywiście cząsteczkami wody i białkiem). Zmodyfikowane zostały jedynie parametry Lennarda-Jonesa atomu tlenu. Płytsze minimum energii oddziaływania (z powodu zmniejszenia parametru energii ϵ) oznacza wprowadzenie silniejszych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami. Dla zachowania tej samej gęstości należało zwiększyć parametr odległości σ , który jest równy odległości międzycząsteczkowej, dla której energia oddziaływań jest równa zero. Z kolei zwiększenie wartości parametru ϵ powodowało zmniejszenie siły oddziaływań i wiązało się z koniecznością zmniejszenia wartości σ . W pierwszym podrozdziale można znaleźć dane (**Tabela 5.1**), jak modyfikacje te wpłynęły na współczynniki dyfuzji i średnią liczbę oraz energię tworzonych wiązań wodorowych. Widzimy, że zmiany tych wielkości pomiędzy poszczególnymi modelami są niewątpliwe – właściwości rozpuszczalnika zdecydowanie się zmieniły. Ponadto w systematyczny sposób zmieniała się też ruchliwość atomów białka, w zależności od właściwości fizycznych przyjętego modelu wody.

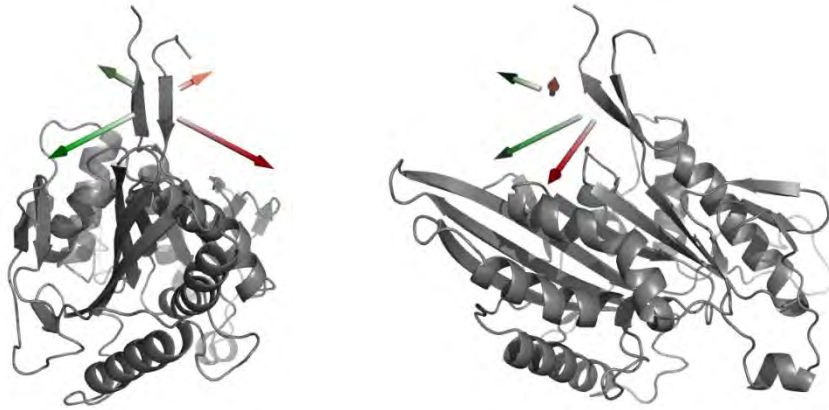
Wydawało się na początku, że w świetle tych rezultatów oraz w obliczu wniosków wypływających z pracy (25), wpływ wody na siłę towarzyszącą dokowaniu będzie łatwo wykrywalny i jednoznaczny w interpretacji. W celu zwiększenia realizmu obliczeń, zdecydowałam się na modyfikację sposobu przeprowadzania obliczeń w stosunku do podejścia użytego we wspomnianej publikacji. Tam użyto tylko małego fragmentu łańcucha, analizowanego w oderwaniu od reszty białka, ja natomiast zdecydowałam się wykorzystać całą domenę katalityczną z przyłączoną do niej szyjką. Dzięki temu nie trzeba było sztucznie przytrzymywać atomów w bezpośrednim sąsiedztwie szyjki.

Sposób przygotowania układów do obliczeń został opisany w rozdziale dotyczącym metodyki. Ponieważ niezbędnym etapem wstępnym była symulacja swobodnego opadania szyjki (a właściwie struktury zwanej CNB) odciągniętej uprzednio na pożądaną odległość, postanowiłam sprawdzić, jak poruszają się wówczas cząsteczki wody w jej sąsiedztwie. W tym celu zidentyfikowałam cząsteczki obecne w obszarze pomiędzy szyjką łącznikową a powierzchnią kinezyiny (**Rys. 5.56**) i sprawdziłam, w jakich kierunkach się one średnio poruszają podczas początkowych etapów dokowania się szyjki (liczyłam wektor przesunięcia cząsteczki po czasie 2 ps).



Rys. 5.56. Wybrane cząsteczki wody pomiędzy szyjką łącznikową a domeną katalityczną podzielone zostały na cztery podgrupy, oznaczone różnymi kolorami. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

W analizowanym przedziale czasu (około 140 ps) kąt pomiędzy szyjką łącznikową a domeną katalityczną zmienił się o około 10° (od około 60° do około 50°). Po uśrednieniu rezultatów dla wszystkich cząsteczek i odcinków trajektorii, można zauważyć pewną tendencję do wyboru przez cząsteczki wody określonych kierunków ruchu (**Rys. 5.57**). Cząsteczki usuwają się spod szyjki na boki. Jest to tylko zgrubne oszacowanie jakościowe. Prawdopodobnie manipulacje kryteriami wyboru i podziałem wody na podgrupy wpłynęłyby na otrzymane wektory.



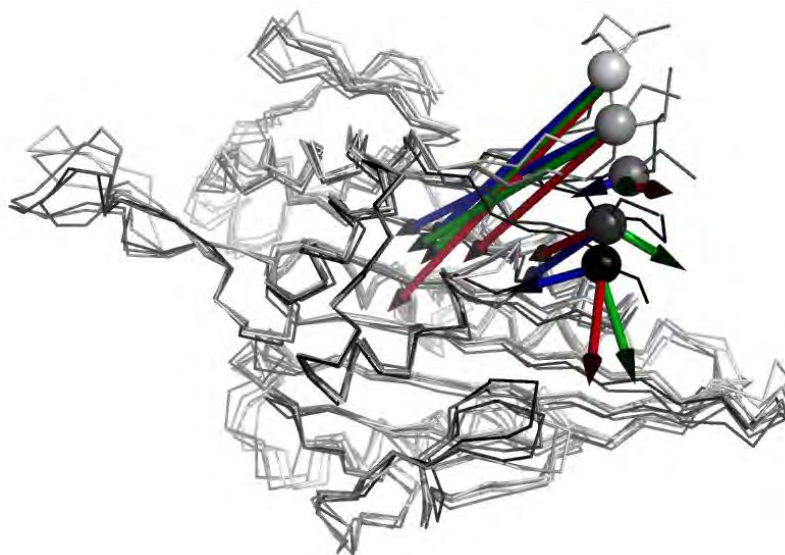
Rys. 5.57. Wektory obrazujące kierunki ruchu wody znajdującej się pomiędzy powoli opadającą szyjką łącznikową i domeną katalityczną dla początkowych etapów dokowania. Każdy wektor został otrzymany w ten sposób, że zmierzono, jakie jest przesunięcie cząsteczki wody znajdującej się w analizowanym obszarze po okresie 2 ps. Poszczególne wektory odpowiadają średnim dla cząsteczek wody z czterech różnych podgrup. Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Z trajektorii uzyskanej w wyniku symulacji opadania szyjki wybrane zostało kilka struktur o różnym stopniu nachylenia szyjki. Wyniki obliczeń siły uzyskane z tych konfiguracji startowych zawiera poniższa tabela.

	Mod10	SPC/E	Mod20
α	F	F	F
[deg]	[pN]	[pN]	[pN]
62	216,7	165,2	168,4
51	151,9	182,0	173,3
43	83,6	61,5	89,9
39	96,9	112,4	59,5
24	109,2	91,1	96,9

Tabela 5.7. Wartości obliczonej siły |F| generowanej przez szyjkę łącznikową w zależności od kąta nachylenia α szyjki łącznikowej w stosunku do powierzchni domeny.

Wyniki te w formie rysunku z zaznaczonymi wektorami sił przedstawiam poniżej (**Rys. 5.58**).



Rys. 5.58. Wektory sił wraz z fragmentem kinezyzny obejmującym szyjkę łącznikową i domenę katalityczną, do której szyjka się przyłącza (model wody SPC/E – kolor niebieski, model mod10 – kolor czerwony, model mod20 – kolor zielony). Sferą zaznaczony jest węgiel α waliny o numerze 331, który był przytrzymywany w celu obliczenia siły (patrz: Opis metod obliczeniowych). Rysunek wykonany za pomocą programu PyMOL.

Obliczenia siły, z jaką ciągnięta jest końcówka szyjki łącznikowej w kierunku domeny katalitycznej pokazały, że siła ta zależy od czasu, jaki upłynął od początku symulacji opadania szyjki do chwili, w której pobrano konfigurację startową do obliczeń siły (tym samym zależy od kąta pomiędzy szyjką i domeną katalityczną). Dla większych wychyleń szyjki siła ta okazuje się przeważnie większa, a dla mniejszych mniejsza. W przypadku dwóch początkowych konfiguracji, wektor siły jest skierowany w przybliżeniu wzdłuż szyjki i w kierunku domeny katalitycznej, co sugeruje, że wtedy dużą rolę mogły odgrywać naprężenia rozciągające w samym łańcuchu białkowym.

Jak okazało się w trakcie obliczeń, otrzymywane wyniki są obciążone dosyć dużą niepewnością. Na obecnym etapie nie można zauważyć wyraźnej i jednoznacznej zależności pomiędzy modelem i wartością lub kierunkiem siły. Dlatego przedstawione tu rezultaty należy traktować jako wstępne i wymagające ewentualnego uzupełnienia.

6. Podsumowanie

A great deal more remains to be discovered about motor proteins. Nature is vastly more subtle, and generally smarter, than we tend to give her credit for being.

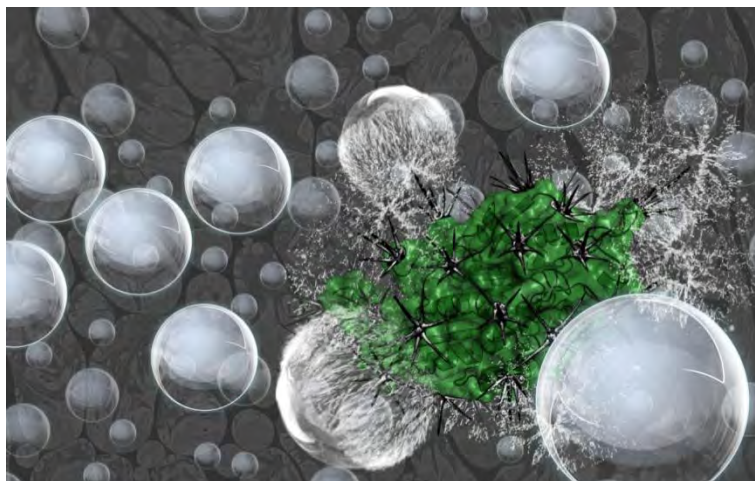
(Steven M. Block, *Biophysical Journal*, 2007,92,2986)

W pracy tej podjęłam próbę opisanego właściwości wody solwatacyjnej pojedynczej domeny motorycznej kinezyzny oraz wody znajdującej się pomiędzy kinezyzną i dimerem tubulinowym, znajdujących się w różnych odległościach od siebie. Do badań tych skłoniły mnie liczne doniesienia, że woda jest niezbędna białkom do prawidłowego funkcjonowania, a jej właściwości w otocze solwatacyjnej mogą się wyraźnie różnić od właściwości wody czystej. Przy tym rola efektów solwatacyjnych jest przeważnie pomijana w dyskusjach dotyczących mechanizmu działania białkowych motorów molekularnych. Właściwości wody próbowałam powiązać z funkcjonalnością białka. Wiele wskazuje na to, że otoczka solwatacyjna kinezyzny raczej dzieli wiele cech z wodą solwatacyjną innych biomolekuł niż się od niej w sposób specjalny odróżnia.

Okazało się, że kształt powierzchni granicznej pomiędzy białkiem i wodą wpływa na ruchliwość cząsteczek wody, która z kolei w znacznym stopniu kształtuje ruchliwość atomów białka, mających z nią kontakt. Przy tym wpływ wody nie ogranicza się jedynie do atomów powierzchniowych, ale przenosi się w głąb białka. Chociaż podczas ruchu kinezyzny zachodzą zmiany strukturalne o większym zakresie i dłuższej skali czasowej niż obserwowane podczas symulacji, to jednak można z dużą dozą pewności stwierdzić, że woda, wpływając lokalnie mniej lub bardziej na ruchliwość atomów białka, może ułatwiać jego przechodzenie pomiędzy jedną konformacją i drugą.

W wyniku analizy rezultatów otrzymanych dla trajektorii niezminimalizowanej i trajektorii poddanej procedurze minimalizacji energii, zaproponowany został uniwersalny model solwatacji biomolekuł, wyjaśniający mechanizm wzrostu gęstości wody solwatacyjnej w oparciu o zmiany w strukturze wody. Według tego modelu, odkształcenie sieci wiązań wodorowych, które zachodzi w wodzie solwatacyjnej na skutek dopasowywania się jej do powierzchni białka, prowadzi do względnego zmniejszenia się liczby uporządkowanych struktur powiązanych wiązaniami wodorowymi i charakteryzujących się dużą objętością właściwą. Dodatkowo przedyskutowano różnice pomiędzy solwatacją hydrofobową i hydrofilową. Wydaje się, że w przypadku dużych cząsteczek, najważniejszym czynnikiem różnicującym oba procesy jest obecność niewielkiej pustej przestrzeni pomiędzy hydrofobową cząsteczką a wodą solwatacyjną. Jej obecność wyjaśnia wiele zaskakujących różnic pomiędzy rezultatami otrzymanymi dla formy natywnej i hydrofobowej

oraz pomiędzy rezultatami otrzymanymi dla formy hydrofobowej przed minimalizacją energii i po.



Rys. 6.1. Symboliczne przedstawienie rozpadu wysokoobjętościowych struktur wody w otoczeniu białka, dyskutowane przy okazji omawiania zmian strukturalnych prowadzących do wzrostu gęstości wody solwatacyjnej. Rysunek wykonany za pomocą programów GIMP i PyMOL do publikacji (259).

Model ten nadaje się do zastosowania zarówno do wody solwatacyjnej domeny motorycznej kinezy, jak i do wody solwatacyjnej zawartej pomiędzy dimerem tubulinowym i kinezyną. W tym drugim przypadku na wodę solwatacyjną może oddziaływać dodatkowy czynnik w postaci pola elektrycznego pochodzącego od drugiego białka (linie pola będą przebiegały inaczej niż przebiegają w przypadku pojedynczego białka). Istotnie, cząsteczki wody wykazują znaczną tendencję do podążania za wektorami natężenia pola elektrycznego wytwarzanego przez białka, co może się dodatkowo przyczyniać do zniekształcania sieci wiązań wodorowych i wzrostu gęstości. Poza tym jednak woda solwatacyjna pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym charakteryzuje się wieloma podobnymi cechami do wody solwatacyjnej pojedynczego białka. Jeżeli odległość pomiędzy białkami wynosi 2,0 nm, to obecność drugiej powierzchni białkowej prawie nie wpłynie na zwiększenie się zmian we właściwościach wody solwatacyjnej w porównaniu z sytuacją, w której tylko jedna powierzchnia białka jest obecna. Wpływ taki jednakże jest bardzo wyraźny dla odległości 0,4 nm, kiedy cząsteczki wody są uwięzione pomiędzy dwiema powierzchniami.

Na koniec można dodać, że fakt, iż obie łączące i rozłączające się w toku pracy motoru powierzchnie białkowe (tzn. spodnia powierzchnia tubuliny i górna powierzchnia kinezy) są silnie solwatowane, a woda solwatacyjna pomiędzy nimi wykazuje pewien wzrost uporządkowania (jak wskazują wartości parametru lokalnego uporządkowania ΔS_{tot}) może być sprzyjającą

okolicznością dla szybkości kroczenia kinezy. Cząsteczki wody nie mają tendencji do opuszczania obszaru pomiędzy białkami (jest wprost przeciwnie), dlatego swoją obecnością mogą zapobiegać nadmiernie silnym oddziaływaniom pomiędzy samymi białkami, a w ten sposób ułatwiać rozdzielanie się powierzchni.

7. Streszczenie

Choć woda solwacyjna odgrywa bez wątpienia ważną rolę w funkcjonowaniu białek, to jej znaczenie nie jest przeważnie dyskutowane w kontekście poruszania się motorów białkowych.

Celem pracy było zbadanie właściwości wody solwacyjnej wokół domeny motorycznej kinezyiny oraz pomiędzy kinezyną a dimerem tubulinowym. Ponadto, analizowany był wpływ rozpuszczalnika na siłę generowaną przez szyjkę łącznikową kinezyiny. Dane otrzymane zostały z użyciem symulacji komputerowych.

Do przygotowania układów do symulacji użyto struktur 1MKJ, 1BG2 i 1JFF z Protein Data Bank oraz modelu wody SPC/E. Powierzchnia cząsteczki kinezyiny została podzielona na wiele obszarów, aby zanalizować właściwości ich wody solwacyjnej oddzielnie. Woda solwacyjna pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym była badana dla trzech odległości pomiędzy białkami (0,4 nm, 1,2 nm i 2,0 nm).

Odkryto liniową zależność pomiędzy współczynnikiem dyfuzji wody solwacyjnej a ruchliwością sąsiadujących atomów białka. Porównanie wyników symulacji otrzymanych z użyciem modelu SPC/E, modyfikowanych modeli wody i w próżni skłania do twierdzenia, że woda wpływa silnie na ruchliwość atomów białka. Wpływ wody wyraźnie zależy od kształtu powierzchni granicznej pomiędzy białkiem i wodą. W rezultacie woda solwacyjna może ułatwiać zachodzenie odpowiednich zmian konformacyjnych białka, istotnych dla wykonywania pracy przez motor.

Zmiany w strukturze i dynamice wody solwacyjnej pojedynczego białka i wody w obszarze pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym wydają się mieć wiele cech wspólnych. Wpływ dodatkowej powierzchni białka (w postaci kinezyiny) na właściwości wody solwacyjnej dimeru tubulinowego jest słabo zauważalny dla odległości 2,0 nm pomiędzy białkami, natomiast dla odległości 0,4 nm jest duży. Na zachowanie się wody pomiędzy powierzchniami białkowymi wywiera wpływ pole elektryczne pochodzące od białek, które porządkuje dipola cząsteczek wody solwacyjnej.

Zarówno pomiędzy białkami, jak i w otoczeniu pojedynczej cząsteczki kinezyiny, obserwujemy podwyższoną gęstość wody. Przyczynę większej gęstości wody solwacyjnej wyjaśnia opisany tu model solwatacji, który bazuje na właściwościach czystej wody. Według niego w otocze solwacyjnej dochodzi do deformacji sieci wiązań wodorowych, które to zjawisko pociąga za sobą skutek w postaci zmniejszenia ilości wysokoobjętościowych, uporządkowanych struktur, istniejących w wodzie. Ponadto przedyskutowano różnice pomiędzy solwatacją hydrofobową i hydrofilową. Wiele wskazuje na to, że w przypadku dużych cząsteczek, najważniejszym czynnikiem różnicującym oba procesy jest obecność niewielkiej pustej przestrzeni pomiędzy hydrofobową cząsteczką solwatowaną a wodą solwacyjną.

8. Summary

Although solvation water is essential for maintaining proper functioning of proteins, its significance is rarely evoked when discussion concerns protein molecular motors.

The aim of this thesis was to investigate the properties of solvation water next to a single kinesin motor domain and between the kinesin and a tubulin dimer. Besides, the influence of the solvent on the force that the neck linker of the kinesin generates was analyzed. All data was obtained by computer simulations.

To prepare systems for the simulations, structures 1MKJ, 1BG2 and 1JFF from the Protein Data Bank were used, along with the SPC/E water model. The surface of the kinesin was divided into many patches, in order to investigate the properties of solvation water next to them separately. The kinesin and the tubulin dimer were separated by distances equal to 0,4 nm, 1,2 nm and 2,0 nm.

A linear correlation between diffusion coefficients of solvation water and mobility of neighboring protein atoms was discovered. The comparison of results obtained with the SPC/E water model, modified water models and simulation *in vacuo* lead to the conclusion that water influences the mobility of protein atoms to a significant extent. The influence of water depends strongly on the shape of the water-protein interface. As a result, solvation water can facilitate large conformational changes, important for the movement of the motor.

Changes in dynamics and structure of solvation water surrounding the single protein and placed between the kinesin and tubulin dimer appear to have a lot in common. The influence of the additional protein surface (*i. e.* kinesin) on the properties of solvation water of a tubulin dimer is almost negligible when the proteins are separated by a distance equal to 2.0 nm, but strong when the distance is equal to 0,4 nm. The solvation water between the proteins is affected by the electric field generated by the proteins. It orders the vectors of dipole moment of water molecules.

Between the proteins, as well as around the single protein molecule, solvation water density is increased. The origin of this phenomenon is explained by a solvation model, discussed here, based on the properties of bulk water. According to this model, the hydrogen bond network in solvation water is deformed. It leads to diminishing the number of high-volume, ordered structures, existing in water. Moreover, differences between hydrophobic and hydrophilic solvation were discussed. There is an evidence of a crucial role of an empty space existing between water and a hydrophobic molecule in shaping characteristic features of hydrophobic solvation.

Dorobek naukowy

Publikacje:

Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Structural and dynamic properties of water within the solvation layer around various conformations of the glycine-based polypeptide. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, Vol. 112, 15503-15512.

Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. The hydrogen bond network structure within the hydration shell around simple osmolytes: Urea, tetramethylurea, and trimethylamine-N-oxide, investigated using both a fixed charge and a polarizable water model. *The Journal of Chemical Physics*. 2010, Vol. 133, 035102(1-8).

Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. The importance of the shape of the protein-water interface of a kinesin motor domain for dynamics of the surface atoms of the protein. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012, Vol. 14, 5561-5569.

Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Why the Solvation Water around Proteins Is More Dense than Bulk Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, Vol. 116, 12113-12124.

W procesie recenzji: **Kuffel, A.; Zielkiewicz, J.** Properties of water in the region between a tubulin dimer and a single motor head of kinesin.

Konferencje:

Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Właściwości fizyczne wody w otoczce solwatacyjnej poliglicyny – badania metodą dynamiki molekularnej. *Materiały Zjazdowe, 51. Zjazd PTChem i SITPChem, Opole, 7-11.09.2008*, numer: S04-PS-20FM, plakat

Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Hydratacja domeny katalitycznej kinezy. *Materiały Zjazdowe, 53. Zjazd PTChem i SITPChem, Gliwice, 14-18.09.2010*, numer: S07_P16_FM, plakat

Kuffel, A.; Czapiewski, D.; Zielkiewicz, J. Charakterystyka otoczki solwatacyjnej białka przeciwdziałającego zamarzaniu wody. *Materiały Zjazdowe, 53. Zjazd PTChem i SITPChem, Gliwice, 14-18.09.2010*, numer: S07_P17_FM, plakat

Staże:

wrzesień 2012 – grudzień 2012: trzymiesięczny staż naukowy na Wydziale Fizyki Uniwersytetu w Messynie w ramach projektu "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki (POKL.04.01.01-00-368/09)

Granty:

Praca ta uzyskała dofinansowanie z Narodowego Centrum Nauki w postaci grantu promotorskiego numer N N204 431940.

Obliczenia wykonano na komputerach Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej (Calculations were carried out at the Academic Computer Center in Gdańsk).

Bibliografia

1. **Nutt, D. R.; Smith, J. C.** Dual Function of the Hydration Layer around an Antifreeze Protein Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *Journal of the American Chemical Society*. 2008, Vol. 130, 13066-13073.
2. **Hirokawa, N.; Noda, Y.; Tanaka, Y.; Niwa, Sh.** Kinesin Superfamily Motor Proteins and Intracellular Transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, Vol. 10, 682-696.
3. **Woehlke, G.; Schliwa, M.** Directional Motility of Kinesin Motor Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, Vol. 1496, 117-127.
4. **Ray, K.** How Kinesin Walk, Assemble and Transport: A Birds-eye-view of Some Unresolved Questions. *Physica A*. 2006, Vol. 372, 52-64.
5. **Mandelkow, E.; Mandelkow, E.-M.** Kinesin Motors and Disease. *TRENDS in Cell Biology*. 2002, Vol. 12, 585-591.
6. **Marx, A.; Müller, J.; Mandelkow, E.-M.; Hoenger, A.; Mandelkow, E.** Interactions of Kinesin Motors, Microtubules, and MAPs. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2006, Vol. 27, 125-137.
7. **Schliwa, M. (ed.)** *Molecular Motors*. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
8. **Yildiz, A.; Selvin, P. R.** Kinesin: Walking, Crawling or Sliding Along? *TRENDS in Cell Biology*. 2005, Vol. 15, 112-120.
9. **Verhey, K. J.; Hammond, J. W.** Traffic Control: Regulation of Kinesin Motors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, Vol. 10, 765-777.
10. **Miki, H., Okada, Y.; Hirokawa, N.** Analysis of the Kinesin Superfamily: Insights into Structure and Function. *TRENDS in Cell Biology*. 2005, Vol. 15, 467-476.
11. **Kaptein, L. C.; Peterman, E. J. G.; Kwok, B. H.; Kim, J. H.; Kapoor, T. M.; Schmidt, C. F.** The Bipolar Mitotic Kinesin Eg5 Moves on Both Microtubules that It Crosslinks. *Nature*. 2005, Vol. 435, 114-118.
12. **Hammond, J. W., Cai, D.; Verhey, K. J.** Tubulin Modifications and Their Cellular Functions. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008, Vol. 20, 71-76.
13. **Clancy, B. E.; Behnke-Parks, W. M.; Andreasson, J. O. L.; Rosenfeld, S. S.; Block, S. M.** A Universal Pathway for Kinesin Stepping. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2011, Vol. 18, 1020-1027.
14. **Kolomeisky, A. B.; Fisher, M. E.** Molecular Motors: A Theorist's Perspective. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2007, Vol. 58, 675-695.
15. **Kikkawa, M.** The Role of Microtubules in Processive Kinesin Movement. *Trends in Cell Biology*. 2008, Vol. 18, 128-135.
16. **Carter, N. J.; Cross, R. A.** Mechanics of the Kinesin Step. *Nature*. 2005, Vol. 435, 308-312.
17. **Skowronek, K. J., Kocik, E.; Kasprzak, A. A.** Subunits Interactions in Kinesin Motors. *European Journal of Cell Biology*. 2007, Vol. 86, 559-568.
18. **Yildiz, A.; Tomishige, M.; Vale, R. D.; Selvin, P. R.** Kinesin Walks Hand-Over-Hand. *Science*. 2004, Vol. 303, 676-678.

19. **Hoenger, A.; Thormählen, M.; Diaz-Avalos, R.; Doerhoefer, M.; Goldie, K. N.; Müller, J.; Mandelkow, E.** A New Look at the Microtubule Binding Patterns of Dimeric Kinesins. *Journal of Molecular Biology*. 2000, Vol. 297, 1087-1103.
20. **Gutiérrez-Medina, B., Fehr, A. N.; Block, S. M.** Direct Measurements of Kinesin Torsional Properties Reveal Flexible Domains and Occasional Stalk Reversals During Stepping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, Vol. 106, 17007-17012.
21. **Kull, F. J.; Endow, Sh. A.** Kinesin: Switch I & II and the Motor Mechanism. *Journal of Cell Science*. 2002, Vol. 115, 15-23.
22. **Rice, S.; Lin, A. W.; Safer, D.; Hart, C. L.; Naber, N.; Carragher, B. O.; Cain, S. M.; Pechatnikova, E.; Wilson-Kubalek, E. M.; Whittaker, M.; Pate, E.; Cooke, R.; Taylor, E. W.; Milligan, R. A.; Vale, R. D.** A Structural Change in the Kinesin Motor Protein that Drives Motility. *Nature*. 1999, Vol. 402, 778-784.
23. **Lakämper, S.; Meyhöfer, E.** The E-Hook of Tubulin Interacts with Kinesin's Head to Increase Processivity and Speed. *Biophysical Journal*. 2005, Vol. 89, 3223-3234.
24. **Vale, R. D.; Milligan, R. A.** The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins. *Science*. 2000, Vol. 288, 88-95.
25. **Hwang, W., Lang, M. J.; Karplus, M.** Force Generation in Kinesin Hinges on Cover-Neck Bundle Formation. *Structure*. 2008, Vol. 16, 62-71.
26. **Tripet, B.; Hodges, R. S.** Helix Capping Interactions Stabilize the N-Terminus of the Kinesin Neck Coiled-Coil. *Journal of Structural Biology*. 2002, Vol. 137, 220-235.
27. **Sack, S.; Müller, J.; Marx, A.; Thormählen, M.; Mandelkow, E. M.; Brady, S. T.; Mandelkow, E.** X-ray Structure of Motor and Neck Domains from Rat Brain Kinesin. *Biochemistry*. 1997, Vol. 36, 16155-16165.
28. **Kull, F. J.; Sablin, E. P.; Lau, R.; Fletterick, R. J.; Vale, R. D.** Crystal Structure of the Kinesin Motor Domain Reveals a Structural Similarity to Myosin. *Nature*. 1996, Vol. 380, 550-555.
29. **Kikkawa, M.; Sablin, E. P.; Okada, Y.; Yajima, H.; Fletterick, R. J.; Hirokawa, N.** Switch-based Mechanism of Kinesin Motors. *Nature*. 2001, Vol. 411, 439-445.
30. **Woehlke, G.** A Look into Kinesin's Powerhouse. *FEBS Letters*. 2001, Vol. 508, 291-294.
31. **Sablin, E. P.; Fletterick, R. J.** Nucleotide Switches in Molecular Motors: Structural Analysis of Kinesins and Myosins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001, Vol. 11, 716-724.
32. **Yan-Bin, H.; Zhang, P.; Hui, Z.; Li, A.; De-Xin, K.; Qing, J.** Water in the Neck-Zipper Region of Kinesin. *Chinese Physics Letters*. 2009, Vol. 26, 078701(1-4).
33. **Hirokawa, N., Nitta, R.; Okada, Y.** The Mechanisms of Kinesin Motor Motility: Lessons from the Monomeric Motor KIF1A. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, Vol. 10, 877-884.
34. **Yanagida, T.; Ueda, M.; Murata, T.; S., Esaki; Ishii, Y.** Brownian Motion, Fluctuation and Life. *BioSystems*. 2007, Vol. 88, 228-242.
35. **Taniguchi, Y.; Nishiyama, M.; Ishii, Y.; Yanagida, T.** Entropy Rectifies the Brownian Steps of Kinesin. *Nature Chemical Biology*. 2005, Vol. 1, 342-347.

36. **Czövek, A., Szöllösi, G. J.; Derényi, I.** The Relevance of Neck Linker Docking in the Motility of Kinesin. *BioSystems*. 2008, Vol. 93, 29-33.
37. **Hariharan, V.; Hancock, W. O.** Insights into the Mechanical Properties of the Kinesin Neck Linker Domain from Sequence Analysis and Molecular Dynamics Simulations. *Cellular and Molecular Bioengineering*. 2009, Vol. 2, 177–189.
38. **Shu, Y.-G.; Zhang, X.-H.; Ou-Yang, Z.-C.; Li, M.** The Neck Linker of Kinesin 1 Seems Optimally Designed to Approach the Largest Stepping Velocity: a Simulation Study of an Ideal Model. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2012, Vol. 24, 035105(1-7).
39. **Gennerich, A.; Vale, R. D.** Walking the Walk: How Kinesin and Dynein Coordinate their Steps. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009, Vol. 21, 59–67.
40. **Rosenfeld, S. S.; Fordyce, P. M.; Jefferson, G. M.; King, P. H.; Block, S. M.** Stepping and Stretching. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, Vol. 278, 18550-18556.
41. **Miyazono, Y.; Hayashi, M.; Karagiannis, P.; Harada, Y.; Tadakuma, H.** Strain Through the Neck Linker Ensures Processive Runs: a DNA-Kinesin Hybrid Nanomachine Study. *The EMBO Journal*. 2010, Vol. 29, 93–106.
42. **Kalchishkova, N.; Böhm, K. J.** The Role of Kinesin Neck Linker and Neck in Velocity Regulation. *Journal of Molecular Biology*. 2008, Vol. 382, 127-135.
43. **Khalil, A. S.; Appleyard, D. C.; Labno, A. K.; Georges, A.; Karplus, M.; Belcher, A. M.; Hwang, W.; Lang, M. J.** Kinesin's Cover-Neck Bundle Folds Forward to Generate Force. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, Vol. 105, 19247–19252.
44. **Okada, Y., Higuchi, H.; Hirokawa, N.** Processivity of the Single -Headed Kinesin KIF1A through Biased Binding to Tubulin. *Nature*. 2003, Vol. 424, 574-577.
45. **Xie, P.** Mechanism of Processive Movement of Monomeric and Dimeric Kinesin Molecules. *International Journal of Biological Sciences*. 2010, Vol. 6, 665-674.
46. **Endres, N. F.; Yoshioka, C.; Milligan, R. A.; Vale, R. D.** A Lever-arm Rotation Drives Motility of the Minus-end-directed Kinesin Ncd. *Nature*. 2006, Vol. 439, 875-878.
47. **Uchimura, S.; Oguchi, Y.; Hachikubo, Y.; Ishiwata, Sh.; Muto, E.** Key Residues on Microtubule Responsible for Activation of Kinesin ATPase. *The EMBO Journal*. 2010, Vol. 29, 1167–1175.
48. **Sindelar, Ch. V.; Downing, K. H.** The Beginning of Kinesin's Force-Generating Cycle Visualized at 9-Å Resolution. *The Journal of Cell Biology*. 2007, Vol. 177, 377-385.
49. **Lakämper, S.; Meyhöfer, E.** Back on Track - On the Role of the Microtubule for Kinesin Motility and Cellular Function. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2006, Vol. 27, 161-171.
50. **Skiniotis, G.; Cochran, J. C.; Müller, J.; Mandelkow, E.; Gilbert, S. P.; Hoenger, A.** Modulation of Kinesin Binding by the C-Termini of Tubulin. *The EMBO Journal*. 2004, Vol. 23, 989-999.
51. **Furuta, K.; Toyoshima, Y. Y.** Minus-End-Directed Motor Ncd Exhibits Processive Movement that Is Enhanced by Microtubule Bundling In Vitro. *Current Biology*. 2008, Vol. 18, 152-157.

52. **Masuda, T.** A Simulation Model of the Conventional Kinesin Based on the Driven-by-Detachment Mechanism. *BioSystems*. 2009, Vol. 97, 121–126.
53. **Block, S. M.** Kinesin Motor Mechanics: Binding, Stepping, Tracking, Gating, and Limping. *Biophysical Journal*. 2007, Vol. 92, 2986–2995.
54. **Kurakin, A.** Self-organization versus Watchmaker: Molecular Motors and Protein Translocation. *BioSystems*. 2006, Vol. 84, 15–23.
55. **Kawaguchi, K.** Energetics of Kinesin-1 Stepping Mechanism. *FEBS Letters*. 2008, Vol. 582, 3719–3722.
56. **Xie, P.** Stepping Behavior of Two-Headed Kinesin Motors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008, Vol. 1777, 1195–1202.
57. **Mather, W. H.; Fox, R. F.** Kinesin's Biased Stepping Mechanism: Amplification of Neck Linker Zippering. *Biophysical Journal*. 2006, Vol. 91, 2416–2426.
58. **Ciudad, A., Sancho, J. M.; Tsironis, G. P.** Kinesin as an Electrostatic Machine. *Journal of Biological Physics*. 2006, Vol. 32, 455–463.
59. **Guillot, B.** A Reappraisal of What We Have Learnt During Three Decades of Computer Simulations on Water. *Journal of Molecular Liquids*. 2002, Vol. 101, 219–260.
60. **Ball, P.** Water — an Enduring Mystery. *Nature*. 2008, Vol. 452, 291–292.
61. **Marx, D.** Throwing Tetrahedral Dice. *Science*. 2004, Vol. 303, 634–636.
62. **Finney, J. L.** Water? What's So Special about It? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2004, Vol. 359, 1145–1165.
63. **Agmon, N.** Liquid Water: From Symmetry Distortions to Diffusive Motion. *Accounts of Chemical Research*. 2012, Vol. 45, 63–73.
64. **Bandyopadhyay, S., Chakraborty, S.; Bagchi, B.** Secondary Structure Sensitivity of Hydrogen Bond Lifetime Dynamics in the Protein Hydration Layer. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, Vol. 127, 16660–16667.
65. **Zielkiewicz, J.** Structural Properties of Water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P Models of Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2005, Vol. 123, 104501(1–6). J. Zielkiewicz, "Erratum : "Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of Water" [J. Chem. Phys. 123, 104501 (2005)]," 2006, Vol. 124, 109901-1.
66. **Mahoney, M. W.; Jorgensen, W. L.** A Five-Site Model for Liquid Water and the Reproduction of the Density. *The Journal of Chemical Physics*. 2000, Vol. 112, 8910–8922.
67. **Mark, P.; Nilsson, L.** Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2001, Vol. 105, 9954–9960.
68. **Hess, B.; van der Vegt, N. F. A.** Hydration Thermodynamics Properties of Amino Acid Analogues: A Systematic Comparison of Biomolecular Force Fields and Water Models. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, Vol. 110, 17616–17626.
69. **Arunan, E.; Desiraju, G. R.; Klein, R. A.; Sadlej, J.; Scheiner, S.; Alkorta, I.; Clary, D. C.; Crabtree, R. H.; Dannenberg, J. J.; Hobza, P.; Kjaergaard, H. G.; Legon, A. C.; Mennucci, B.; Nesbitt, D. J.** Definition of the Hydrogen Bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and Applied Chemistry*. 2011, Vol. 83, 1637–1641.

70. **Kumar, R., Schmidt, J. R.; Skinner, J. L.** Hydrogen Bonding Definitions and Dynamics in Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2007, Vol. 126, 204107(1-12).
71. **Buch, V.** Growth and Structure of Amorphous Ice Condensates: A Computational Study. II. *The Journal of Chemical Physics*. 1992, Vol. 96, 3814-3823.
72. **Luzar, A.; Chandler, D.** Effect of Environment on Hydrogen Bond Dynamics in Liquid Water. *Physical Review Letters*. 1996, Vol. 76, 928-931.
73. **Pal, S., Balasubramanian, S.; Bagchi, B.** Identity, Energy, and Environment of Interfacial Water Molecules in a Micellar Solution. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003, Vol. 107, 5194-5202.
74. **Teixeira, J., Bellissent-Funel, M.-C.; Chen, S.-H.** Dynamics of Water Studied by Neutron Scattering. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 1990, Vol. 2, SA105-SA108.
75. **Wernet, Ph.; Nordlund, D.; Bergmann, U.; Cavalleri, M.; Odelius, M.; Ogasawara, H.** The Structure of the First Coordination Shell in Liquid Water. *Science*. 2004, Vol. 304, 995-999.
76. **Luzar, A.; Chandler, D.** Hydrogen-Bond Kinetics in Liquid Water. *Nature*. 1996, Vol. 379, 55-57.
77. **Hammerich, A. D.; Buch, V.** An Alternative Near-Neighbor Definition of Hydrogen Bonding in Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2008, Vol. 128, 111101(1-4).
78. **Tokmakoff, A.** Shining Light on the Rapidly Evolving Structure of Water. *Science*. 2007, Vol. 317, 54-55.
79. **Henchman, R. H.; Irudayam, Sh. J.** Topological Hydrogen-Bond Definition to Characterize the Structure and Dynamics of Liquid Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, Vol. 114, 16792-16810.
80. **Tan, M.-L., Brooks, B. R.; Ichiye, T.** Temperature Dependence of Diffusion Properties of Soft Sticky Dipole Water. *Chemical Physics Letters*. 2006, Vol. 421, 166-170.
81. **Idrissi, A.; Damay, P.** Interpretation of the Low Frequency Response of Aqueous Solutions: A Molecular Dynamics Analysis. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2006, Vol. 352, 4486-4489.
82. **Chakraborty, S., Sinha, S. K.; Bandyopadhyay, S.** Low-Frequency Vibrational Spectrum of Water in the Hydration Layer of a Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, Vol. 111, 13626-13631.
83. **Ohmine, I.; Saito, Sh. S.** Water Dynamics: Fluctuation, Relaxation, and Chemical Reactions in Hydrogen Bond Network Rearrangement. *Accounts of Chemical Research*. 1999, Vol. 32, 741-749.
84. **Ohmine, I.; Tanaka, H.** Fluctuation, Relaxations, and Hydration in Liquid Water. Hydrogen-Bond Rearrangement Dynamics. *Chemical Reviews*. 1993, Vol. 93, 2545-2566.
85. **Ohmine, I.** Liquid Water Dynamics: Collective Motions, Fluctuation, and Relaxation. *The Journal of Physical Chemistry*. 1995, Vol. 99, 6767-6776.
86. **Ohmine, I., Tanaka, H.; Wolynes, P. G.** Large Local Energy Fluctuations in Water. II. Cooperative Motions and Fluctuations. *Journal of Chemical Physics*. 1988, Vol. 89, 5852(1-9).

87. **Starr, F. W., Nielsen, J. K.; Stanley, H. E.** Hydrogen-Bond Dynamics for the Extended Simple Point-Charge Model of Water. *Physical Review E*. 2000, Vol. 62, 579-587.
88. **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, Vol. 306, 851-853.
89. **Ball, P.** Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chemical Reviews*. 2008, Vol. 108, 74-108.
90. **Roberts, S. T., Ramasesha, K.; Tokmakoff, A.** Structural Rearrangements in Water Viewed Through Two-Dimensional Infrared Spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*. 2009, Vol. 42, 1239-1249.
91. **Geiger, A., Kleene, M.; Paschek, D.** Mechanisms of the Molecular Mobility of Water. *Journal of Molecular Liquids*. 2003, Vol. 106, 131-146.
92. **Laage, D.; Hynes, J. T.** A Molecular Jump Mechanism of Water Reorientation. *Science*. 2006, Vol. 311, 832-835.
93. **Laage, D.; Hynes, J. T.** On the Molecular Mechanism of Water Reorientation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, Vol. 112, 14230-14242.
94. **Luck, W. A. P.** *Hydrogen Bonds in Liquid Water, The Hydrogen Bond. Vol. III.* Amsterdam : North-Holland, 1976.
95. **Mantz, Y. A., Chen, B.; Martyna, G. J.** Temperature-dependent Water Structure: Ab Initio and Empirical Model Predictions. *Chemical Physics Letters*. 2005, Vol. 405, 294-299.
96. **Modig, K., Pfrommer, B. G.; Halle, B.** Temperature-Dependent Hydrogen-Bond Geometry in Liquid Water. *Physical Review Letters*. 2003, Vol. 90, 075502(1-4).
97. **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. *The Journal of Chemical Physics*. 2006, Vol. 125, 084504(1-7).
98. **Head-Gordon, T.; Johnson, M. E.** Tetrahedral Structure or Chains for Liquid Water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, Vol. 103, 7973-7977.
99. **Paesani, F., Iuchi, S.; Voth, G. A.** Quantum Effects in Liquid Water from an ab Initio-based Polarizable Force Field. *The Journal of Chemical Physics*. 2007, Vol. 127, 074506(1-15).
100. **Loparo, J. J., Roberts, S. T.; Tokmakoff, A.** Multidimensional Infrared Spectroscopy of Water. II. Hydrogen Bond Switching Dynamics. *The Journal of Chemical Physics*. 2006, Vol. 125, 194522(1-12).
101. **Franzese, G.; Stanley, H. E.** The Widom Line of Supercooled Water. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2007, Vol. 19, 205126(1-16).
102. **Mishima, O.; Stanley, E.** The Relationship between Liquid, Supercooled and Glassy Water. *Nature*. 1998, Vol. 396, 329-335.
103. **Xu, L.; Kumar, P.; Buldyrev, S. V.; Chen, S.-H.; Poole, P. H.; Sciortino, F.; Stanley, H. E.** Relation between the Widom Line and the Dynamic Crossover in Systems with a Liquid-Liquid Phase Transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, Vol. 102, 16558-16562.

104. **Debenedetti, P. G.; Stillinger, F. H.** Supercooled Liquids and the Glass Transition. *Nature*. 2001, Vol. 410, 259-267.
105. **Mallamace, F.** The Liquid Water Polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, Vol. 106, 15097-15098.
106. **Shiratani, E.; Sasai, M.** Molecular Scale Precursor of the Liquid–Liquid Phase Transition of Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1998, Vol. 108, 3264-3276.
107. **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.; Nilsson, A.** The Inhomogeneous Structure of Water at Ambient Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, Vol. 106, 15214-15218.
108. **Nilsson, A.; Pettersson, L. G. M.** Perspective on the Structure of Liquid Water. *Chemical Physics*. 2011, Vol. 389, 1-34.
109. **Tanaka, H.** Simple Physical Explanation of the Unusual Thermodynamic Behavior of Liquid Water. *Physical Review Letters*. 1998, Vol. 80, 5750-5753.
110. **Tanaka, H.** Two-Order-Parameter Description of Liquids: Critical Phenomena and Phase Separation of Supercooled Liquids. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 1999, Vol. 11, L159-L168.
111. **Tanaka, H.** Simple Physical Model of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2000, Vol. 112, 799-809.
112. **Tanaka, H.** Thermodynamic Anomaly and Polyamorphism of Water. *Europhysics Letters*. 2000, Vol. 50, 340-346.
113. **Limmer, D. T.; Chandler, D.** The Putative Liquid-Liquid Transition is a Liquid-Solid Transition in Atomistic Models of Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2011, Vol. 135, 134503(1-10).
114. **Truskett, T. M., Torquato, S.; Debenedetti, P. G.** Towards a Quantification of Disorder in Materials: Distinguishing Equilibrium and Glassy Sphere Packings. *Physical Review E*. 2000, Vol. 62, 993-1001.
115. **Errington, J. R.; Debenedetti, P. G.** Relationship Between Structural Order and the Anomalies of Liquid Water. *Nature*. 2001, Vol. 409, 318-321.
116. **Chau, B. P.; Hardwick, A. J.** A New Order Parameter for Tetrahedral Configurations. *Molecular Physics*. 1998, Vol. 93, 511-518.
117. **Giovambattista, N.; Debenedetti, P.; Sciortino, F.; Stanley, H. E.** Structural Order in Glassy Water. *Physical Review E*. 2005, Vol. 71, 061505(1-12).
118. **Jana, B.; Pal, S.; Maiti, P. K.; Lin, S.; Hynes, J. T.; Bagchi, B.** Entropy of Water in the Hydration Layer of Major and Minor Grooves of DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, Vol. 110, 19611-19618.
119. **Henchman, R. H.** Free Energy of Liquid Water from a Computer Simulation via Cell Theory. *The Journal of Chemical Physics*. 2007, Vol. 126, 064504(1-8).
120. **Irudayam, Sh. J.; Henchman, R. H.** Solvation Theory to Provide a Molecular Interpretation of the Hydrophobic Entropy Loss of Noble-Gas Hydration. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2010, Vol. 22, 284108(1-17).

121. **Zielkiewicz, J.** Entropy of Water Calculated from Harmonic Approximation: Estimation of the Accuracy of Method. *The Journal of Chemical Physics*. 2008, Vol. 128, 196101(1-2).
122. **Green, H. S.** Ch. III. *The Molecular Theory of Fluids*. Amsterdam : North-Holland, 1952.
123. **Lazaridis, T.; Paulaitis, M. E.** Entropy of Hydrophobic Hydration: A New Statistical Mechanical Formulation. *The Journal of Physical Chemistry*. 1992, Vol. 96, 3847-3855.
124. **Lazaridis, T.; Karplus, M.** Orientational Correlations and Entropy in Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1996, Vol. 105, 4294-4316.
125. **Saija, F., Saitta, A. M.; Giaquinta, P. V.** Statistical Entropy and Density Maximum Anomaly in Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2003, Vol. 119, 3587-3589.
126. **Esposito, R.; Saija, F.; Saitta, A. M.; Giaquinta, P. V.** Entropy-based Measure of Structural Order in Water. *Physical Review E*. 2006, Vol. 73, 040502(1-4).
127. **Zielkiewicz, J.** Two-Particle Entropy and Structural Ordering in Liquid Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, Vol. 112, 7810-7815.
128. **Kuffel, A.; Zielkiewicz, J.** Structural and Dynamic Properties of Water within the Solvation Layer around Various Conformations of the Glycine-based Polypeptide. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, Vol. 112, 15503-15512.
129. **Czapiewski, D.; Zielkiewicz, J.** Structural Properties of Hydration Shell Around Various Conformations of Simple Polypeptides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, Vol. 114, 4536-4550.
130. **Bernal, J. D.; Finney, J. L.** Random Close-Packed Hard-Sphere Model. II. Geometry of Random Packing of Hard Spheres. *Discussions of the Faraday Society*. 1967, Vol. 43, 62-69.
131. **Richards, F. M.** The Interpretation of Protein Structures: Total Volume, Group Volume Distributions and Packing Density. *Journal of Molecular Biology*. 1974, Vol. 82, 1-14.
132. **Procacci, P.; Scateni, R.** A General Algorithm for Computing Voronoi Volumes: Application to the Hydrated Crystal of Myoglobin. *International Journal of Quantum Chemistry*. 1992, Vol. 42, 1515-1528.
133. **Poupon, A.** Voronoi and Voronoi-related Tessellations in Studies of Protein Structure and Interaction. *Current Opinion in Structural Biology*. 2004, Vol. 14, 233-241.
134. **Ruocco, G., Sampoli, M.; Vallauri, R.** Analysis of the Network Topology in Liquid Water and Hydrogen Sulphide by Computer Simulation. *The Journal of Chemical Physics*. 1992, Vol. 96, 6167-6176.
135. **Ruocco, G.; Sampoli, M.; Torcini, A.; Vallauri, R.** Molecular Dynamics Results for Stretched Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1993, Vol. 99, 8095-8104.
136. **Shih, J., Sheu, S.; Mou, C.** A Voronoi Polyhedra Analysis of Structures of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1994, Vol. 100, 2202-2212.
137. **Chang, S. L., Wu, T.; Mou, C. Y.** Instantaneous Normal Mode Analysis of Orientational Motions in Liquid Water : Local Structural Effects. *The Journal of Chemical Physics*. 2004, Vol. 121, 3605-3612.

138. **Fern, J. T., Keffer, D. J.; Steele, W. V.** Measuring Coexisting Densities from a Two-Phase Molecular Dynamics Simulation by Voronoi Tessellations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, Vol. 111, 3469-3475.
139. **Fern, J. T., Keffer, D. J.; Steele, W. V.** Vapor-Liquid Equilibrium of Ethanol by Molecular Dynamics Simulation and Voronoi Tessellation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, Vol. 111, 13278-13286.
140. **Miyake, T.; Aida, M.** Enumeration of Topology-distinct Structures of Hydrogen Bonded Water Clusters. *Chemical Physics Letters*. 2002, Vol. 363, 106-110.
141. **McDonald, Sh., Ojamae, L.; Singer, Sh. J.** Graph Theoretical Generation and Analysis of Hydrogen-Bonded Structures with Applications to the Neutral and Protonated Water Cube and Dodecahedral Clusters. *The Journal of Physical Chemistry A*. 1998, Vol. 102, 2824-2832.
142. **Matsumoto, M.; Ohmine, I.** A New Approach to the Dynamics of Hydrogen Bond Network in Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1996, Vol. 104, 2705-2712.
143. **Bergman, D. L.** Topological Properties of the Hydrogen-Bond Network in Liquid Water. *Chemical Physics*. 2000, Vol. 253, 267-282.
144. **Ahmad, M.; Gu, W.; Geyer, T.; Helms, V.** Adhesive Water Networks Facilitate Binding of Protein Interfaces. *Nature Communications*. 2011, Vol. 2, 261(1-7).
145. **Ball, P.** Water as a Biomolecule. *ChemPhysChem*. 2008, Vol. 9, 2677-2685.
146. **Bizzarri, A. R.; Cannistraro, S.** Molecular Dynamics of Water at the Protein-Solvent Interface. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002, Vol. 106, 6617-6633.
147. **Helms, V.** Protein Dynamics Tightly Connected to the Dynamics of Surrounding and Internal Water Molecules. *ChemPhysChem*. 2007, Vol. 8, 23-33.
148. **Bagchi, B.** Water Dynamics in the Hydration Layer around Proteins and Micelles. *Chemical Reviews*. 2005, Vol. 105, 3197-3219.
149. **Oncley, J. L.** The Investigation of Proteins by Dielectric Measurements. *Chemical Reviews*. 1942, Vol. 30, 433-450.
150. **Haggis, G. H., Buchanan, T. J.; Hasted, J. B.** Estimation of Protein Hydration by Dielectric Measurements at Microwave Frequencies. *Nature*. 1951, Vol. 167, 607 - 608.
151. **Buchanan, T. J.; Haggis, G. H.; Hasted, J. B.; Robinson, B. G.** The Dielectric Estimation of Protein Hydration. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*. 1952, Vol. 213, 379-391.
152. **Granick, S.; Bae, S. Ch.** A Curious Antipathy for Water. *Science*. 2008, Vol. 322, 1477-1478.
153. **Chandler, D.** Two Faces of Water. *Nature*. 2002, Vol. 417, 491.
154. **Southall, N. T., Dill, K. A.; Haymet, A. D. J.** A View of the Hydrophobic Effect. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002, Vol. 106, 521-533.
155. **Finney, J. L.; Bowron, D. T.; Daniel, R. M.; Timmins, P. A.; Roberts, M. A.** Molecular and Mesoscale Structures in Hydrophobically Driven Aqueous Solutions. *Biophysical Chemistry*. 2003, Vol. 105, 391-409.

156. Meyer, E. E.; Rosenberg, K. J.; Israelachvili, J. Recent Progress in Understanding Hydrophobic Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, Vol. 103, 15739–15746.

157. Perera, P. N.; Fega, K. R.; Lawrence, C.; Sundstrom, E. J.; Tomlinson-Phillips, J.; Ben-Amotz, D. Observation of Water Dangling OH Bonds around Dissolved Nonpolar Groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, Vol. 106, 12230–12234.

158. Tomlinson-Phillips, J.; Davis, J.; Ben-Amotz, D.; Spångberg, D.; Pejov, L.; Hermansson, K. Structure and Dynamics of Water Dangling OH Bonds in Hydrophobic Hydration Shells. Comparison of Simulation and Experiment. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2011, Vol. 115, 6177–6183.

159. Xu, H.; Dill, K. A. Water's Hydrogen Bonds in the Hydrophobic Effect: A Simple Model. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, Vol. 109, 23611–23617.

160. Madan, B.; Sharp, K. Changes in Water Structure Induced by a Hydrophobic Solute Probed by Simulation of the Water Hydrogen Bond Angle and Radial Distribution Functions. *Biophysical Chemistry*. 1999, Vol. 78, 33–41.

161. Raschke, T. M.; Levitt, M. Nonpolar Solutes Enhance Water Structure within Hydration Shells while Reducing Interactions between Them. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, Vol. 102, 6777–6782.

162. Rezus, Y. L. A.; Bakker, H. J. Observation of Immobilized Water Molecules around Hydrophobic Groups. *Physical Review Letters*. 2007, Vol. 99, 148301(1–4).

163. Silvestrelli, P. L. Are There Immobilized Water Molecules around Hydrophobic Groups? Aqueous Solvation of Methanol from First Principles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, Vol. 113, 10728–10731.

164. Laage, D.; Stirnemann, G.; Hynes, J. T. Why Water Reorientation Slows without Iceberg Formation around Hydrophobic Solutes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, Vol. 113, 2428–2435.

165. Bakulin, A. A.; Pshenichnikov, M. S.; Bakker, H. J.; Petersen, Ch. Hydrophobic Molecules Slow Down the Hydrogen-Bond Dynamics of Water. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2011, Vol. 115, 1821–1829.

166. Qvist, J.; Halle, B. Thermal Signature of Hydrophobic Hydration Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*. 2008, Vol. 130, 10345–10353.

167. Chandler, D. Interfaces and the Driving Force of Hydrophobic Assembly. *Nature*. 2005, Vol. 437, 640–647.

168. Cheng, Y.-K.; Rossky, P. J. Surface Topography Dependence of Biomolecular Hydrophobic Hydration. *Nature*. 1998, Vol. 392, 696–699.

169. General Discussion. *Faraday Discussions*. 2009, Vol. 141, 309–346.

170. Mittal, J.; Hummer, G. Static and Dynamic Correlations in Water at Hydrophobic Interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, Vol. 105, 20130–20135.

171. Huang, D. M.; Chandler, D. The Hydrophobic Effect and the Influence of Solute-Solvent Attractions. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002, Vol. 106, 2047–2053.

172. Mezger, M.; Reichert, H.; Schöder, S.; Okasinski, J.; Schröder, H.; Dosch, H.; Palms, D.; Ralston, J.; Honkimäki, V. High-Resolution in Situ X-ray Study

of the Hydrophobic Gap at the Water–Octadecyl-trichlorosilane Interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, Vol. 103, 18401–18404.

173. **Zhou, R.; Huang, X.; Margulis, C. J.; Berne, Bruce J.** Hydrophobic Collapse in Multidomain Protein Folding. *Science*. 2004, Vol. 305, 1605-1609.

174. **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. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, Vol. 113, 13723–13734.

175. **Chandler, D.** Oil on Troubled Waters. *Nature*. 2007, Vol. 445, 831-832.

176. **Daura, X., Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F.** Peptide Folding Simulations: No Solvent Required? *Computer Physics Communications*. 1999, Vol. 123, 97-102.

177. **Harano, Y.; Kinoshita, M.** Translational-Entropy Gain of Solvent upon Protein Folding. *Biophysical Journal*. 2005, Vol. 89, 2701-2710.

178. **Henchman, R. H.; McCammon, J. A.** Structural and Dynamic Properties of Water around Acetylcholinesterase. *Protein Science*. 2002, Vol. 11, 2080-2090.

179. **Pizzitutti, F.; Marchi, M.; Sterpone, F.; Rossky, P. J.** How Protein Surfaces Induce Anomalous Dynamics of Hydration Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007, Vol. 111, 7584-7590.

180. **Makarov, V. A.; Kim Andrews, B.; Smith, P. E.; Montgomery Pettitt, B.** Residence Times of Water Molecules in the Hydration Sites of Myoglobin. *Biophysical Journal*. 2000, Vol. 79, 2966-2974.

181. **Jana, B., Pal, S.; Bagchi, B.** Hydrogen Bond Breaking Mechanism and Water Reorientational Dynamics in the Hydration Layer of Lysozyme. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, Vol. 112, 9112-9117.

182. **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 Active Sites. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, Vol. 108, 12608-12616.

183. **De Simone, A.; Dodson, G. G.; Verma, Ch. S.; Zagari, A.; Fraternali, F.** Prion and Water: Tight and Dynamical Hydration Sites Have a Key Role in Structural Stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, Vol. 102, 7535-7540.

184. **Zhang, L.; Wang, L.; Kao, Y.-T.; Qiu, W.; Yang, Y.; Okobiah, O.; Zhong, D.** Mapping Hydration Dynamics around a Protein Surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, Vol. 104, 18461-18466.

185. **Suzuki, M.; Kabir, S. R.; Siddique, Md. Sh. P.; Nazia, U. S.; Miyazaki, T.; Kodama, T.** Myosin-Induced Volume Increase of the Hyper-Mobile Water Surrounding Actin Filaments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004, Vol. 322, 340-346.

186. **Pal, S. K.; Zewail, A. H.** Dynamics of Water in Biological Recognition. *Chemical Reviews*. 2004, Vol. 104, 2099-2123.

187. **Henchman, R. H.; Tai, K.; Shen, T.; McCammon, J. A.** Properties of Water Molecules in the Active Site Gorge of Acetylcholinesterase from Computer Simulation. *Biophysical Journal*. 2002, Vol. 82, 2671-2682.
188. **Kuwajima, K.; Goto, Y.; Hirata, F.; Terazima, M.; Kataoka, M. (eds.)** *Water and Biomolecules. Physical Chemistry of Life Phenomena*. s.l. : Springer, 2009.
189. **Henzler-Wildman, K.; Kern, D.** Dynamic Personalities of Proteins. *Nature*. 2007, Vol. 450, 964-972.
190. **Ringe, D.; Petsko, G. A.** The 'Glass Transition' in Protein Dynamics: What It Is, Why It Occurs, and How to Exploit It. *Biophysical Chemistry*. 2003, Vol. 105, 667-680.
191. **Vitkup, D.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Karplus, M.** Solvent Mobility and the Protein 'Glass' Transition. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2000, Vol. 7, 34-38.
192. **Tournier, A. L., Xu, J.; Smith, J. C.** Translational Hydration Water Dynamics Drives the Protein Glass Transition. *Biophysical Journal*. 2003, Vol. 85, 1871-1875.
193. **Nakagawa, H.; Kataoka, M.** Percolation of Hydration Water as a Control of Protein Dynamics. *Journal of the Physical Society of Japan*. 2010, Vol. 79, 083801(1-4).
194. **Fenimore, P. W.; Frauenfelder, H.; McMahon, B. H.; Parak, F. G.** Slaving: Solvent Fluctuations Dominate Protein Dynamics and Functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, Vol. 99, 16047-16051.
195. **Fenimore, P. W.; Frauenfelder, H.; McMahon, B. H.; Young, R. D.** Bulk-solvent and Hydration-shell Fluctuations, Similar to α - and β -fluctuations in Glasses, Control Protein Motions and Functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004, Vol. 101, 14408-14413.
196. **Frauenfelder, H.; Fenimore, P. W.; Chen, G.; McMahon, B. H.** Protein Folding is Slaved to Solvent Motions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, Vol. 103, 15469-15472.
197. **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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009, Vol. 106, 5129-5134.
198. **Tournier, A. L.; Réat, V.; Dunn, R.; Daniel, R.; Smith, J. C.; Finney, J.** Temperature and Timescale Dependence of Protein Dynamics in Methanol : Water Mixtures. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2005, Vol. 7, 1388-1393.
199. **Doster, W.; Settles, M.** Protein-Water Displacement Distributions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005, Vol. 1749, 173 - 186.
200. **Shenogina, N., Keblinski, P.; Garde, Sh.** Strong Frequency Dependence of Dynamical Coupling Between Protein and Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2008, Vol. 129, 155105(1-4).
201. **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. *Biophysical Journal*. 2010, Vol. 98, 1321-1326.

202. **Zhang, L.; Yang, Y.; Kao, Y.-T.; Wang, L.; Zhong, D.** Protein Hydration Dynamics and Molecular Mechanism of Coupled Water-Protein Fluctuations. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, Vol. 131, 10677-10691.

203. **Halle, B.; Nilsson, L.** Does the Dynamic Stokes Shift Report on Slow Protein Hydration Dynamics? *The Journal of Physical Chemistry B Letters*. 2009, Vol. 113, 8210-8213.

204. **Sinha, S. K.; Bandyopadhyay, S.** Differential Flexibility of the Secondary Structures of Lysozyme and the Structure and Ordering of Surrounding Water Molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 2011, Vol. 134, 115101(1-9).

205. **Levy, R. M., de la Luz Rojas, O.; Friesner, R. A.** Quasi-Harmonic Method for Calculating Vibrational Spectra from Classical Simulations on Multidimensional Anharmonic Potential Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry*. 1984, Vol. 88, 4233-4238.

206. **Dykeman, E. C.; Sankey, O. F.** Normal Mode Analysis and Applications in Biological Physics. *Journal of Physics: Condensed Matter*. 2010, Vol. 22, 423202 (26pp).

207. **Petrone, P.; Pande, V. S.** Can Conformational Change Be Described by Only a Few Normal Modes? *Biophysical Journal*. 2006, Vol. 90, 1583-1593.

208. **Kitao, A., Hirata, F.; Gō, N.** The Effects of Solvent on the Conformation and the Collective Motions of Protein: Normal Mode Analysis and Molecular Dynamics Simulations of Melittin in Water and in Vacuum. *Chemical Physics*. 1991, Vol. 158, 447-472.

209. **Amadei, A., Linssen, A. B. M.; Berendsen, H. J. C.** Essential Dynamics of Proteins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 1993, Vol. 17, 412-425.

210. **Ramanathan, A.; Agarwal, P. K.** Computational Identification of Slow Conformational Fluctuations in Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009, Vol. 113, 16669-16680.

211. **Sharp, K. A.; Vanderkooi, J. M.** Water in the Half Shell: Structure of Water, Focusing on Angular Structure and Solvation. *Accounts of Chemical Research*. 2010, Vol. 43, 231-239.

212. **Kovacs, H., Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F.** Solvent Structure at Hydrophobic Protein Surface. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*. 1997, Vol. 27, 395-404.

213. **Svergun, D. I.; Richard, S.; Koch, M. H. J.; Z., Sayers; Kuprin, S.; Zaccai, G.** Protein Hydration in Solution: Experimental Observation by X-ray and Neutron Scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, Vol. 95, 2267-2272.

214. **Smolin, N.; Winter, R.** Molecular Dynamics Simulations of Staphylococcal Nuclease: the Properties of Water at the Protein Surface. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, Vol. 108, 15928-15937.

215. **Ashbaugh, H. E.; Paulaitis, M. E.** Effect of Solute Size and Solute-Water Attractive Interactions on Hydration Water Structure around Hydrophobic Solutes. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, Vol. 123, 10721-10728.

216. **Raschke, T. M.; Levitt, M.** Detailed Hydration Maps of Benzene and Cyclohexane Reveal Distinct Water Structures. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004, Vol. 108, 13492-13500.

217. **Merzel, F.; Smith, J. C.** Is the First Hydration Shell of Lysozyme of Higher Density than Bulk Water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, Vol. 99, 5378-5383.

218. **Ahmad, M., Gu, W.; Helms, V.** Mechanism of Fast Peptide Recognition by SH3 Domains. *Angewandte Chemie*. 2008, Vol. 47, 7626-7630.

219. **Levy, Y.; Onuchic, J. N.** Water Mediation in Protein Folding and Molecular Recognition. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2006, Vol. 35, 389-415.

220. **Hua, L.; Huang, X.; Zhou, R.; Berne, B. J.** Dynamics of Water Confined in the Interdomain Region of a Multidomain Protein. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, Vol. 110, 3704-3711.

221. **Liu, P.; Huang, X.; Zhou, R.; Berne, B. J.** Observation of a Dewetting Transition in the Collapse of the Melittin Tetramer. *Nature*. 2005, Vol. 437, 159-162.

222. **Giovambattista, N.; Lopez, C. F.; Rossky, P. J.; Debenedetti, P. G.** Hydrophobicity of Protein Surfaces: Separating Geometry from Chemistry. *Understanding Molecular Simulation. From Algorithms to Applications*. 2008, Vol. 105, 2274-2279.

223. **Yang, Z.; Shi, B.; Lu, H.; Xiu, P.; Zhou, R.** Dewetting Transitions in the Self-Assembly of Two Amyloidogenic β -Sheets and the Importance of Matching Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011, Vol. 115, 11137-11144.

224. **Patel, A. J.; Varilly, P.; Jamadagni, S. N.; Hagan, M. F.; Chandler, D.; Garde, Sh.** Sitting at the Edge: How Biomolecules use Hydrophobicity to Tune Their Interactions and Function. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, Vol. 116, 2498-2503.

225. **Yu, N.; Hagan, M. F.** Simulations of HIV Capsid Protein Dimerization Reveal the Effect of Chemistry and Topography on the Mechanism of Hydrophobic Protein Association. *Biophysical Journal*. 2012, Vol. 103, 1363-1369.

226. **Chong, S.-H.; Ham, S.** Impact of Chemical Heterogeneity on Protein Self-Assembly in Water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012, Vol. 109, 7636-7641.

227. **Nishiyama, M.; Kimura, Y.; Nishiyama, Y.; Terazima, M.** Pressure-Induced Changes in the Structure and Function of the Kinesin-Microtubule Complex. *Biophysical Journal*. 2009, Vol. 96, 1142-1150.

228. **Harada, R., Sugita, Y.; Feig, M.** Protein Crowding Affects Hydration Structure and Dynamics. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, Vol. 134, 4842-4849.

229. **Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M.C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J; Kollman, P.** A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins Based on Condensed-Phase Quantum Mechanical Calculations. *Journal of Computational Chemistry*. 2003, Vol. 24, 1999-2012.

230. *Amber 10 User's Manual*.

231. **Allen, M. P.; Tildesley, D. J.** *Computer Simulation of Liquids*. Oxford : Clarendon Press, 2000.

232. **Frenkel, D.; Smit, B.** *Understanding Molecular Simulation. From Algorithms to Applications*. s.l. : Academic Press, 2002. ISBN 0-12-267351-4.

233. **van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G.** *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. Zürich, 1996.
234. **Sindelar, Ch. V.; Budny, M. J.; Rice, S.; Naber, N.; Fletterick, R.; Cooke, R.** Two Conformations in the Human Kinesin Power Stroke Defined By X-ray Crystallography and EPR Spectroscopy. *Nature Structural Biology*. 2002, Vol. 9, 844-848.
235. **Löwe, J.; Li, H.; Downing, K. H.; Nogales, E.** Refined Structure of $\alpha\beta$ -Tubulin at 3.5 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*. 2001, Vol. 313, 1045-1057.
236. **Sindelar, C. V.; Downing, K. H.** The Beginning of Kinesin's Force-Generating Cycle Visualized at 9-Å Resolution. *The Journal of Cell Biology*. 2007, Vol. 177, 377-85.
237. **Kuffel, A.; Zielkiewicz, J.** The Hydrogen Bond Network Structure within the Hydration Shell around Simple Osmolytes: Urea, Tetramethylurea, and Trimethylamine-N-oxide, Investigated Using both a Fixed Charge and a Polarizable Water Model. *The Journal of Chemical Physics*. 2010, Vol. 133, 035102(1-8).
238. **Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R.; Straatsma, T. P.** The Missing Term in Effective Pair Potentials. *The Journal of Physical Chemistry*. 1987, Vol. 91, 6269-6271.
239. **van der Spoel, D., van Maaren, P. J.; Berendsen, H. J. C.** A Systematic Study of Water Models for Molecular Simulation: Derivation of Water Models Optimized for Use with a Reaction Field. *Journal of Chemical Physics*. 1998, Vol. 108, 10220-10230.
240. **Vega, C.; Abascal, J. L. F.** Relation Between the Melting Temperature and the Temperature of Maximum Density for the Most Common Models of Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2005, Vol. 123, 144504.
241. **Vega, C., Sanz, E.; Abascal, J. L. F.** The Melting Temperature of the Most Common Models of Water. *The Journal of Chemical Physics*. 2005, Vol. 122, 114507.
242. **Tieleman, D. P.; Berendsen, H. J. C.** Molecular Dynamics Simulations of a Fully Hydrated Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer with Different Macroscopic Boundary Conditions and Parameters. *The Journal of Chemical Physics*. 1996, Vol. 105, 4871-4880.
243. **Cerutti, D. S.; Freddolino, P. L.; Duke, R. E. Jr.; Case, D. A.** Simulations of a Protein Crystal with a High Resolution X-ray Structure: Evaluation of Force Fields and Water Models. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, Vol. 114, 12811-12824.
244. **Takemura, K.; Kitao, A.** Effects of Water Model and Simulation Box Size on Protein Diffusional Motions. *The Journal of Physical Chemistry B Letters*. 2007, Vol. 111, 11870-11872.
245. **Meagher, K. L., Redman, L. T.; Carlson, H. A.** Development of Polyphosphate Parameters for Use with the AMBER Force Field. *Journal of Computational Chemistry*. 2003, Vol. 24, 1016-1025.
246. **Astley, T.; Birch, G. G.; Drew, M. G. B.; Rodger, P. M.; Wilden, G. R. H.** Effect of Available Volumes on Radial Distribution Functions. *Journal of Computational Chemistry*. 1998, Vol. 19, 363-367.

247. **Godec, A., Smith, J. C.; Merzel, F.** Increase of Both Order and Disorder in the First Hydration Shell with Increasing Solute Polarity. *Physical Review Letters*. 2011, Vol. 107, 267801(1-5).

248. **Baranyai, A.; Evans, D. J.** Direct Entropy Calculation from Computer Simulation of Liquids. *Physical Review A*. 1989, Vol. 40, 3817-3822.

249. **Gellatly, B. J.; Finney, J. L.** Calculation of Protein Volumes: An Alternative to the Voronoi Procedure. *Journal of Molecular Biology*. 1982, Vol. 161, 305-322.

250. **Mezei, M.** Modified Proximity Criterion for the Analysis of the Solvation Environment of a Polyfunctional Solute. *Molecular Simulation*. 1988, Vol. 1, 327-332.

251. **Voloshin, V. P.; Medvedev, N. N.; Andrews, M. N.; R., Burri R.; R., Winter; Geiger, A.** Volumetric Properties of Hydrated Peptides: Voronoi-Delaunay Analysis of Molecular Simulation Runs. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011, Vol. 115, 14217-14228.

252. **Choi, J.-H., Kim, H.; Lee, S.** Correlation Dimension as a Measure of Surface Roughness of Protein Molecules. *Journal of Chemical Physics*. 1998, Vol. 109, 7001-7004.

253. **Choi, J.-H.; Sangyoub, Lee.** Correlation Between the Roughness Degree of a Protein Surface and the Mobility of Solvent Molecules on the Surface. *Journal of Chemical Physics*. 2000, Vol. 113, 6325-6329.

254. **Albou, L.-P.; Schwarz, B.; Poch, O.; Wurtz, J. M.; Moras, D.** Defining and Characterizing Protein Surface Using Alpha Shapes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2009, Vol. 76, 1-12.

255. **Coleman, R. G.; Burr, M. A.; Souvaine, D. L.; Cheng, A. C.** An Intuitive Approach to Measuring Protein Surface Curvature. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2005, Vol. 61, 1068-1074.

256. **Schäfer, H., Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F.** Absolute Entropies from Molecular Dynamics Trajectories. *Journal of Chemical Physics*. 2000, Vol. 113, 7809-7817.

257. **Shiratani, E.; Sasai, M.** Growth and Collapse of Structural Patterns in the Hydrogen Bond Network in Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1996, Vol. 104, 7671-7680.

258. **Kuffel, A.; Zielkiewicz, J.** The Importance of the Shape of the Protein-Water Interface of a Kinesin Motor Domain for Dynamics of the Surface Atoms of the Protein. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012, Vol. 14, 5561-5569.

259. **Kuffel, A.; Zielkiewicz, J.** Why the Solvation Water around Proteins Is More Dense than Bulk Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, Vol. 116, 12113-12124.

260. **Liou, Y.-C.; Tocilj, A.; L., Davies P.; Jia, Z.** Mimicry of Ice Structure by Surface Hydroxyls and Water of a β -Helix Antifreeze Protein. *Nature*. 2000, Vol. 406, 322-324.

261. **Graether, P.; Kuiper, M. J.; Gagné, S. M.; Walker, V. K.; Jia, Z.; D., Sykes B.; Davies, P. L.** Beta-Helix Structure and Ice-Binding Properties of a Hyperactive Antifreeze Protein from an Insect. *Nature*. 2000, Vol. 406, 325-328.

262. **Biswas, K. M., DeVido, D. R.; Dorsey, J. G.** Evaluation of Methods for Measuring Amino Acid Hydrophobicities and Interactions. *Journal of Chromatography A*. 2003, Vol. 1000, 637–655.
263. **Hopp, T. P.; Woods, K. R.** Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981, Vol. 78, 3824–3828.
264. **White, S. H.; Wimley, W. C.** Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 1999, Vol. 28, 319–365.
265. **Hong, L.; Cheng, X.; Glass, D. C.; Smith, J. C.** Surface Hydration Amplifies Single-Well Protein Atom Diffusion Propagating into the Macromolecular Core. *Physical Review Letters*. 2012, Vol. 108, 238102(1-4).
266. **Nucci, N. V., Pometun, M. S.; Wand, A. J.** Site-resolved Measurement of Water-Protein Interactions by Solution NMR. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2011, Vol. 18, 245–249.
267. **Hilser, V. J.** Finding the Wet Spots. *Nature*. 2011, Vol. 469, 166–167.
268. **Cho, M.; Fleming, G. R.; Saito, S.; Ohmine, I.; Stratt, R. M.** Instantaneous Normal Mode Analysis of Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics*. 1994, Vol. 100, 6672(1-12).
269. **Idrissi, A., Sokolić, F.; Perera, A.** A Molecular Dynamics Study of the Urea/Water Mixture. *Journal of Chemical Physics*. 2000, Vol. 112, 9479–9488.
270. **Appignanesi, G. A., Rodriguez Fris, J. A.; Sciortino, F.** Evidence of a Two-State Picture for Supercooled Water and Its Connections with Glassy Dynamics. *The European Physical Journal E*. 2009, Vol. 29, 305–310.
271. **Accordino, S. R.; Rodriguez Fris, J. A.; Sciortino, F.; Appignanesi, G. A.** Quantitative Investigation of the Two-State Picture for Water in the Normal Liquid and the Supercooled Regime. *The European Physical Journal E*. 2011, Vol. 34, 1–7.
272. **Xu, L.; Mallamace, F.; Yan, Z.; 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, Vol. 5, 565–569.
273. **Kittel, C.; Strässler, S.** Degeneracy and the Order of the Phase Transformation in the Molecular-Field Approximation. *Physical Review A*. 1965, Vol. 139, 758–760.
274. **Matysiak, S., Debenedetti, P. G.; Rossky, P. J.** Dissecting the Energetics of Hydrophobic Hydration of Polypeptides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011, Vol. 115, 14859–14865.
275. **Raiteri, P., Laio, A.; Parrinello, M.** Correlations among Hydrogen Bonds in Liquid Water. *Physical Review Letters*. 2004, Vol. 93, 087801(1-4).
276. **Sterpone, F., Stirnemann, G.; Laage, D.** Magnitude and Molecular Origin of Water Slowdown Next to a Protein. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, Vol. 134, 4116–4119.
277. **Sorin, E. J., Rhee, Y. M.; Shirts, M. R.; Pande, V. S.** The Solvation Interface is a Determining Factor in Peptide Conformational Preferences. *Journal of Molecular Biology*. 2006, Vol. 356, 248–256.

Aneks

Aneks zawiera wybrane wartości liczbowe użyte w wykresach w tekście głównym oraz rezultaty uzupełniające, które nie są zamieszczone w tekście głównym.

Woda solwatacyjna pojedynczej domeny motorycznej

Obszar	1MKJ (forma natywna)							1MKJ_0 (forma hydrofobowa)				
	MD							MD			EM	
	η	γ	V [nm ³]	η_{vdw}	γ_{vdw}	V_{vdw} [nm ³]	$std(V_{vdw})$ [nm ³]	γ_{vdw}	V_{vdw} [nm ³]	$std(V_{vdw})$ [nm ³]	V_{vdw} [nm ³]	$std(V_{vdw})$ [nm ³]
$\alpha 0$	1,680	1,288	0,0180	1,657	1,416	0,0281	0,0032	1,588	0,0295	0,0039	0,0294	0,0038
$\alpha 1a$	1,646	0,850	0,0178	1,640	0,933	0,0267	0,0033	1,194	0,0305	0,0042	0,0303	0,0041
$\alpha 1b$	1,643	0,907	0,0179	1,638	0,995	0,0270	0,0032	1,295	0,0313	0,0047	0,0310	0,0047
A2aL4MgADP	1,621	0,623	0,0179	1,729	0,652	0,0284	0,0049	0,960	0,0349	0,0062	0,0348	0,0065
$\alpha 2b$	1,658	0,866	0,0184	1,651	1,002	0,0279	0,0033	1,211	0,0303	0,0040	0,0302	0,0039
$\alpha 3$	1,648	0,874	0,0179	1,644	0,929	0,0271	0,0032	1,233	0,0303	0,0040	0,0302	0,0040
$\alpha 3a$	1,647	0,819	0,0180	1,658	0,880	0,0273	0,0038	1,235	0,0307	0,0052	0,0304	0,0052
$\alpha 4$	1,656	0,934	0,0181	1,654	1,013	0,0274	0,0032	1,207	0,0303	0,0044	0,0302	0,0044
$\alpha 5L12$	1,674	1,205	0,0183	1,653	1,308	0,0280	0,0032	1,504	0,0294	0,0035	0,0293	0,0034
$\alpha 5L13$	1,641	0,688	0,0179	1,640	0,811	0,0268	0,0032	1,018	0,0308	0,0042	0,0307	0,0042
$\alpha 61$	1,640	0,803	0,0178	1,644	0,997	0,0270	0,0032	1,142	0,0308	0,0048	0,0306	0,0047
$\alpha 62$	1,655	0,841	0,0182	1,654	0,952	0,0273	0,0032	1,184	0,0308	0,0046	0,0307	0,0046
$\alpha 7$	1,667	1,235	0,0180	1,649	1,414	0,0278	0,0031	1,512	0,0296	0,0035	0,0295	0,0035
$\beta 0\beta 9$	1,662	0,967	0,0180	1,654	1,179	0,0277	0,0031	1,299	0,0301	0,0040	0,0301	0,0039
$\beta 10$	1,642	0,798	0,0178	1,635	0,781	0,0266	0,0030	1,104	0,0304	0,0043	0,0302	0,0043
$\beta 1a\beta 1b$	1,669	1,098	0,0181	1,654	1,238	0,0279	0,0031	1,457	0,0296	0,0036	0,0295	0,0035
$\beta 1c$	1,666	1,088	0,0182	1,663	1,190	0,0277	0,0032	1,383	0,0298	0,0037	0,0298	0,0038
$\beta 1\beta 8$	1,640	0,771	0,0179	1,637	0,832	0,0266	0,0030	1,113	0,0320	0,0051	0,0318	0,0051
$\beta 5a\beta 5b$	1,656	0,927	0,0182	1,647	0,958	0,0273	0,0032	1,279	0,0304	0,0049	0,0302	0,0048
$\beta 5L8$	1,670	1,209	0,0182	1,643	1,166	0,0276	0,0031	1,674	0,0296	0,0041	0,0294	0,0040
$\beta 4\beta 5$	1,644	0,781	0,0180	1,651	0,860	0,0267	0,0033	1,106	0,0306	0,0043	0,0304	0,0043
$\beta 4567_1$	1,651	0,958	0,0179	1,637	0,976	0,0271	0,0031	1,279	0,0303	0,0041	0,0302	0,0041
$\beta 4567_2$	1,643	0,831	0,0181	1,632	0,865	0,0270	0,0031	1,172	0,0314	0,0055	0,0312	0,0054
$L\beta 1\alpha 0\beta 2\alpha 1a$	1,645	0,830	0,0182	1,673	0,937	0,0280	0,0045	1,201	0,0308	0,0057	0,0308	0,0058
$L\alpha 0\beta 1a$	1,665	1,016	0,0182	1,659	1,149	0,0277	0,0032	1,420	0,0294	0,0035	0,0294	0,0034
L5	1,664	1,110	0,0180	1,656	1,299	0,0281	0,0037	1,370	0,0297	0,0038	0,0296	0,0038
L8	1,662	0,972	0,0180	1,657	1,124	0,0276	0,0033	1,334	0,0299	0,0037	0,0299	0,0038
L9	1,676	1,210	0,0182	1,659	1,305	0,0280	0,0032	1,456	0,0295	0,0037	0,0295	0,0037
L10	1,665	0,957	0,0179	1,647	1,167	0,0277	0,0032	1,325	0,0302	0,0039	0,0302	0,0039
L11_1	1,637	0,772	0,0177	1,647	0,846	0,0266	0,0031	1,196	0,0307	0,0050	0,0305	0,0050
L11_2	1,671	1,153	0,0180	1,657	1,448	0,0280	0,0032	1,464	0,0294	0,0037	0,0293	0,0037
SPC/E	1,725	-	0,0187	1,669	-	0,0301	0,0033	-	0,0301	0,0033	0,0301	0,0032

Tabela A1. Wyniki dla wybranych otoczek solwatacyjnych dla formy natywnej kinazy (1MKJ) oraz dla formy hydrofobowej (1MKJ_0), w całości przytrzymywanej podczas symulacji. W pierwszej kolumnie z lewej nazwa obszaru solwatacyjnego. Znaczenie symboli: średni współczynnik asferyczności η , parameter lokalnego pofałdowania γ , średnia objętość komórki Voronia V , średni współczynnik asferyczności η_{vdw} , parameter lokalnego pofałdowania γ_{vdw} , średnia objętość komórki Voronia V_{vdw} , odchylenie standardowe średniej objętości komórki Voronia $std(V_{vdw})$. Wszystkie wartości dotyczą pierwszej warstwy solwatacyjnej o grubości 0,4 nm. Ostatnia linia zawiera dane dla czystej wody SPC/E. Wyniki otrzymane w wyniku analizy trajektorii przed minimalizacją oznaczono jako MD, a otrzymane w wyniku analizy trajektorii poddanej minimalizacji oznaczono jako EM.

1MKJ (forma natywna)	MD						EM						
	n_{HB}	Δn_{HB}			E_{HB} [kJ mol ⁻¹]	R_{HB} [nm]	β_{HB} [deg]	n_{HB}	Δn_{HB}			E_{HB} [kJ mol ⁻¹]	β_{HB} [deg]
		d_o [nm]							d_o [nm]				
		0,16	0,17	0,18					0,16	0,17	0,18		
Obszar													
$\alpha 0$	2,84	0,35	0,36	0,39	20,29	0,1849	12,20	3,29	0,36	0,39	0,41	28,46	6,52
$\alpha 1a$	2,45	0,43	0,43	0,43	19,98	0,1845	12,18	2,85	0,46	0,46	0,45	28,01	6,53
$\alpha 1b$	2,52	0,46	0,46	0,47	19,89	0,1844	12,21	2,89	0,48	0,50	0,52	27,92	6,62
A2aL4MgADP	2,14	0,38	0,41	0,42	20,32	0,1841	12,16	2,47	0,38	0,41	0,43	28,21	6,65
$\alpha 2b$	2,58	0,54	0,57	0,53	20,36	0,1848	12,25	2,99	0,59	0,59	0,58	28,51	6,63
$\alpha 3$	2,44	0,36	0,36	0,35	19,87	0,1845	12,23	2,82	0,40	0,40	0,40	27,91	6,68
$\alpha 3a$	2,44	0,37	0,39	0,42	20,23	0,1842	12,12	2,78	0,41	0,44	0,46	28,20	6,58
$\alpha 4$	2,63	0,52	0,50	0,54	20,21	0,1844	12,14	3,02	0,49	0,50	0,51	28,30	6,46
$\alpha 5L12$	2,79	0,41	0,43	0,43	20,22	0,1849	12,23	3,25	0,47	0,48	0,50	28,36	6,53
$\alpha 5L13$	2,33	0,59	0,60	0,55	20,22	0,1843	12,16	2,75	0,71	0,70	0,67	28,24	6,45
$\alpha 61$	2,48	0,28	0,30	0,32	20,14	0,1844	12,22	2,94	0,38	0,39	0,41	28,16	6,66
$\alpha 62$	2,52	0,65	0,61	0,61	20,33	0,1845	12,20	2,92	0,65	0,62	0,59	28,33	6,53
$\alpha 7$	2,79	0,24	0,29	0,32	20,13	0,1847	12,22	3,26	0,29	0,33	0,37	28,24	6,59
$\beta 0\beta 9$	2,66	0,46	0,43	0,46	20,26	0,1847	12,23	3,11	0,47	0,47	0,47	28,32	6,56
$\beta 10$	2,39	0,47	0,50	0,53	20,27	0,1847	12,30	2,73	0,53	0,56	0,59	28,43	6,88
$\beta 1a\beta 1b$	2,69	0,39	0,41	0,39	20,20	0,1847	12,22	3,15	0,46	0,46	0,46	28,50	6,46
$\beta 1c$	2,71	0,48	0,48	0,48	20,24	0,1846	12,17	3,14	0,50	0,49	0,47	28,38	6,44
$\beta 1\beta 8$	2,37	0,72	0,74	0,65	20,16	0,1840	12,15	2,69	0,83	0,80	0,76	28,22	6,48
$\beta 5a\beta 5b$	2,53	0,46	0,47	0,46	20,20	0,1846	12,24	2,91	0,50	0,50	0,49	28,30	6,63
$\beta 5L8$	2,75	0,40	0,42	0,48	20,23	0,1846	12,19	3,14	0,34	0,39	0,43	28,41	6,53
$\beta 4\beta 5$	2,53	0,68	0,64	0,67	20,31	0,1845	12,10	2,91	0,75	0,74	0,73	28,33	6,48
$\beta 4567_1$	2,51	0,33	0,34	0,36	20,05	0,1847	12,24	2,89	0,38	0,39	0,39	28,18	6,66
$\beta 4567_2$	2,42	0,61	0,60	0,60	20,07	0,1845	12,24	2,78	0,59	0,58	0,57	28,32	6,64
$L\beta 1\alpha 0\beta 2\alpha 1a$	2,51	0,46	0,47	0,47	20,32	0,1845	12,12	2,94	0,51	0,53	0,54	28,57	6,34
$L\alpha 0\beta 1a$	2,72	0,55	0,55	0,51	20,27	0,1846	12,18	3,14	0,61	0,60	0,59	28,54	6,44
L5	2,75	0,42	0,43	0,45	20,15	0,1847	12,19	3,20	0,49	0,50	0,50	28,34	6,48
L8	2,66	0,50	0,47	0,47	20,24	0,1848	12,24	3,12	0,58	0,56	0,55	28,41	6,53
L9	2,89	0,48	0,49	0,53	20,37	0,1848	12,17	3,34	0,53	0,55	0,58	28,51	6,44
L10	2,65	0,24	0,29	0,31	20,23	0,1847	12,17	3,07	0,28	0,32	0,37	28,36	6,57
L11_1	2,43	0,37	0,38	0,42	20,15	0,1843	12,13	2,74	0,30	0,33	0,36	28,08	6,69
L11_2	2,83	0,26	0,29	0,33	20,17	0,1850	12,25	3,32	0,33	0,38	0,42	28,27	6,60
SPC/E	3,27	-	-	-	20,12	0,1854	12,31	3,83	-	-	-	28,32	6,43

Tabela A2. Wyniki dla wybranych otoczek solwatacyjnych dla formy natywnej kinazy (1MKJ). W pierwszej kolumnie z lewej nazwa obszaru solwatacyjnego. Znaczenie symboli: średnia liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wody (n_{HB}), różnicowa średnia liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wody (Δn_{HB}), średnia energia wiązania wodorowego (E_{HB}), średnia odległość tlen – wodór w wiązaniu wodorowym (R_{HB}), średnia wartość kąta beta (β_{HB}). Wszystkie wartości dotyczą pierwszej warstwy solwatacyjnej o grubości 0,4 nm. Ostatnia linia zawiera dane dla czystej wody SPC/E. Wyniki otrzymane w wyniku analizy trajektorii przed minimalizacją oznaczono jako MD, a otrzymane w wyniku analizy trajektorii poddanej minimalizacji oznaczono jako EM.

1MKJ_0 (forma hydrofobowa)	MD							EM										
	Obszar	n_{HB}			Δn_{HB}			E_{HB} [kJ mol ⁻¹]	R_{HB} [nm]	β_{HB} [deg]	n_{HB}			Δn_{HB}			E_{HB} [kJ mol ⁻¹]	β_{HB} [deg]
		d_o [nm]									d_o [nm]							
		0,18	0,19	0,20	0,20	0,21	0,22											
$\alpha 0$	3,07	0,61	0,64	0,66	20,42	0,1858	12,55	3,58	0,77	0,81	0,84	28,45	7,16					
$\alpha 1a$	2,89	0,82	0,81	0,82	20,61	0,1858	12,65	3,39	0,96	0,98	1,00	28,62	7,32					
$\alpha 1b$	2,93	0,83	0,82	0,83	20,54	0,1858	12,59	3,45	0,97	0,98	1,01	28,57	7,21					
A2aL4MgADP	2,83	1,03	1,04	1,04	20,65	0,1858	12,71	3,36	1,27	1,28	1,28	28,85	7,40					
$\alpha 2b$	2,90	0,87	0,86	0,86	20,57	0,1859	12,66	3,41	1,01	1,01	1,02	28,65	7,33					
$\alpha 3$	2,91	0,80	0,79	0,79	20,54	0,1858	12,65	3,41	0,93	0,94	0,96	28,61	7,29					
$\alpha 3a$	2,91	0,81	0,82	0,84	20,57	0,1858	12,63	3,45	1,01	1,04	1,06	28,73	7,26					
$\alpha 4$	2,89	0,78	0,79	0,80	20,59	0,1858	12,66	3,41	0,96	0,98	1,00	28,66	7,31					
$\alpha 5L12$	3,04	0,64	0,66	0,68	20,44	0,1858	12,58	3,55	0,79	0,83	0,86	28,45	7,23					
$\alpha 5L13$	2,78	1,04	1,03	1,02	20,70	0,1859	12,76	3,27	1,20	1,20	1,20	28,66	7,56					
$\alpha 61$	2,87	0,78	0,80	0,82	20,60	0,1859	12,68	3,38	0,98	1,01	1,04	28,65	7,44					
$\alpha 62$	2,88	0,96	0,92	0,89	20,60	0,1859	12,67	3,38	1,05	1,04	1,04	28,64	7,34					
$\alpha 7$	3,04	0,62	0,65	0,68	20,44	0,1858	12,56	3,55	0,78	0,82	0,86	28,47	7,20					
$\beta 0\beta 9$	2,92	0,74	0,74	0,75	20,50	0,1859	12,69	3,45	0,91	0,92	0,94	28,49	7,38					
$\beta 10$	2,83	0,80	0,81	0,82	20,61	0,1860	12,78	3,34	0,98	1,00	1,02	28,56	7,68					
$\beta 1a\beta 1b$	3,01	0,69	0,69	0,71	20,48	0,1858	12,59	3,52	0,83	0,85	0,88	28,50	7,20					
$\beta 1c$	2,98	0,74	0,73	0,73	20,51	0,1859	12,63	3,48	0,84	0,85	0,88	28,52	7,32					
$\beta 1\beta 8$	2,81	1,08	1,03	0,99	20,69	0,1859	12,68	3,32	1,18	1,16	1,17	28,84	7,31					
$\beta 5a\beta 5b$	2,94	0,82	0,83	0,83	20,56	0,1858	12,64	3,44	0,97	0,99	1,01	28,60	7,33					
$\beta 5L8$	3,09	0,59	0,63	0,66	20,42	0,1858	12,53	3,60	0,77	0,80	0,84	28,41	7,14					
$\beta 4\beta 5$	2,89	0,98	0,96	0,95	20,59	0,1859	12,61	3,38	1,10	1,09	1,09	28,72	7,25					
$\beta 4567_1$	2,94	0,75	0,76	0,77	20,56	0,1859	12,62	3,44	0,90	0,92	0,94	28,69	7,26					
$\beta 4567_2$	2,86	0,89	0,88	0,88	20,60	0,1859	12,69	3,37	1,07	1,08	1,10	28,64	7,45					
L $\beta 1\alpha 0\beta 2\alpha 1a$	2,90	0,83	0,83	0,84	20,58	0,1858	12,67	3,41	1,02	1,02	1,04	28,64	7,40					
L $\alpha 0\beta 1a$	2,99	0,75	0,74	0,74	20,44	0,1859	12,64	3,51	0,87	0,88	0,90	28,43	7,27					
L5	2,99	0,69	0,70	0,72	20,47	0,1858	12,60	3,50	0,85	0,88	0,91	28,45	7,23					
L8	2,96	0,80	0,78	0,77	20,52	0,1859	12,63	3,46	0,90	0,91	0,92	28,58	7,25					
L9	3,02	0,60	0,63	0,66	20,47	0,1858	12,59	3,52	0,77	0,81	0,85	28,53	7,23					
L10	2,94	0,73	0,74	0,76	20,49	0,1859	12,63	3,44	0,91	0,94	0,96	28,57	7,24					
L11_1	2,90	0,88	0,88	0,89	20,59	0,1859	12,63	3,41	1,06	1,07	1,08	28,64	7,32					
L11_2	3,04	0,62	0,66	0,69	20,44	0,1859	12,55	3,54	0,79	0,84	0,88	28,38	7,19					

Tabela A3. Wyniki dla wybranych otoczek solwatacyjnych dla formy hydrofobowej kinezyiny (1MKJ_0), w całości przytrzymywanej podczas symulacji. W pierwszej kolumnie z lewej nazwa obszaru solwatacyjnego. Znaczenie symboli: średnia liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wody (n_{HB}), różnicowa średnia liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wody (Δn_{HB}), średnia energia wiązania wodorowego (E_{HB}), średnia odległość tlen – wodór w wiązaniu wodorowym (R_{HB}), średnia wartość kąta beta (β_{HB}). Wszystkie wartości dotyczą pierwszej warstwy solwatacyjnej o grubości 0,4 nm. Wyniki otrzymane w wyniku analizy trajektorii przed minimalizacją oznaczono jako MD, a otrzymane w wyniku analizy trajektorii poddanej minimalizacji oznaczono jako EM.

1MKJ (forma natywna)	<i>(R=0.4 nm)</i>								<i>(R=0.8nm)</i>		
	<i>S_{tra}(0.58)</i> [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta S_{tra}(0.58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]			<i>S_{conf}(0.58)</i> [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta S_{conf}(0.58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]			<i>S_{tra}(0.58)</i> [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	<i>S_{conf}(0.58)</i> [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	<i>S_{ort}(0.58)</i> [J mol ⁻¹ K ⁻¹]
		<i>d_o</i>		[nm]		<i>d_o</i>		[nm]			
		0,16	0,17			0,17	0,18				
Obszar											
α0	-14,89	-0,33	-0,14	0,04	-13,07	-1,38	-1,46	-1,55	-13,24	-14,35	-50,04
α1a	-17,86	1,84	2,14	2,28	-11,37	-1,76	-1,77	-1,76	-14,31	-13,10	-44,93
α1b	-17,42	2,39	2,73	2,90	-12,00	-2,35	-2,39	-2,40	-14,26	-13,37	-45,08
A2aL4MgADP	-25,53	1,29	2,53	3,37	-9,94	-1,81	-1,96	-2,05	-18,01	-11,87	-40,30
α2b	-18,77	2,25	2,49	2,52	-11,66	-2,39	-2,37	-2,32	-14,40	-13,23	-46,72
α3	-18,35	1,39	1,74	1,91	-11,04	-1,38	-1,41	-1,42	-14,52	-13,15	-46,93
α3a	-20,10	-0,27	0,41	0,89	-11,55	-1,86	-2,00	-2,11	-14,97	-13,27	-45,27
α4	-17,83	1,11	1,40	1,61	-12,30	-2,32	-2,35	-2,38	-14,14	-13,75	-47,33
α5L12	-15,76	-0,01	0,24	0,47	-12,97	-1,86	-1,92	-1,99	-13,48	-14,10	-48,91
α5L13	-22,56	4,08	4,69	4,83	-10,85	-2,83	-2,85	-2,81	-16,15	-12,61	-42,82
α61	-18,56	0,92	1,52	2,01	-11,70	-1,84	-1,95	-2,05	-14,58	-13,31	-45,72
α62	-19,29	2,94	3,07	2,91	-11,97	-3,06	-3,00	-2,90	-14,62	-13,29	-45,22
α7	-14,89	-0,12	0,24	0,58	-13,11	-1,38	-1,56	-1,74	-13,03	-14,28	-49,80
β0β9	-16,56	0,45	0,70	0,87	-12,44	-1,86	-1,89	-1,92	-13,81	-13,59	-47,67
β10	-21,81	1,07	2,15	3,04	-10,54	-1,69	-1,83	-1,94	-16,65	-12,48	-42,10
β1aβ1b	-15,78	0,90	1,07	1,16	-12,40	-1,79	-1,80	-1,79	-13,40	-13,97	-48,53
β1c	-16,14	1,12	1,23	1,24	-13,16	-2,84	-2,82	-2,79	-13,40	-13,97	-47,92
β1β8	-20,66	7,19	7,41	7,01	-11,18	-3,68	-3,60	-3,42	-15,52	-12,47	-42,29
β5aβ5b	-18,46	1,15	1,64	1,94	-12,02	-2,32	-2,39	-2,43	-14,40	-13,46	-45,29
β5L8	-16,57	-0,45	0,09	0,58	-12,85	-1,65	-1,85	-2,04	-14,08	-13,69	-47,02
β4β5	-21,00	1,22	1,60	1,69	-12,26	-3,31	-3,31	-3,28	-15,39	-13,24	-44,92
β4567_1	-17,17	0,80	1,19	1,43	-11,25	-1,07	-1,14	-1,17	-13,62	-13,35	-46,61
β4567_2	-19,79	3,64	4,15	4,33	-11,31	-2,71	-2,71	-2,67	-14,98	-12,58	-44,09
Lβ1α0β2α1a	-19,89	0,26	0,80	1,14	-12,08	-2,52	-2,59	-2,64	-14,55	-13,31	-46,06
Lα0β1a	-16,67	1,15	1,24	1,22	-12,94	-2,84	-2,78	-2,71	-13,81	-13,85	-47,18
L5	-15,71	0,62	0,86	1,04	-12,75	-1,87	-1,92	-1,97	-13,42	-13,87	-48,69
L8	-17,09	1,22	1,31	1,27	-12,35	-2,33	-2,29	-2,23	-14,04	-13,66	-47,40
L9	-16,29	-1,00	-0,69	-0,41	-13,68	-2,30	-2,43	-2,55	-13,54	-14,22	-49,57
L10	-16,23	-0,27	0,18	0,58	-12,19	-1,06	-1,22	-1,38	-13,48	-13,59	-45,98
L11_1	-20,19	0,35	1,12	1,73	-11,39	-1,79	-1,95	-2,07	-15,36	-12,97	-43,83
L11_2	-14,96	-0,52	-0,19	0,12	-13,03	-1,16	-1,35	-1,52	-13,09	-14,33	-50,61
SPC/E	-12,88	-	-	-	-15,34	-	-	-	-12,88	-15,34	-54,27

Tabela A4. Wyniki dla wybranych otoczek solwatacyjnych dla formy natywnej kinezyiny (1MKJ). W pierwszej kolumnie z lewej nazwa obszaru solwatacyjnego. Znaczenie symboli: $S_{tra}(0.58)$, $S_{conf}(0.58)$, $S_{ort}(0.58)$ – parametry uporządkowania dla wody w pierwszej ($R=0,4$ nm) oraz w pierwszej i drugiej warstwie solwatacyjnej ($R=0,8$ nm); $\Delta S_{tra}(0.58)$, $\Delta S_{conf}(0.58)$ – parametry uporządkowania po uwzględnieniu wpływu wyłączonej objętości. Ostatnia linia zawiera dane dla czystej wody SPC/E.

Obszar	SPC/E				próżnia	mod10	mod20	mod25
	std 5 ps [nm]	std 1 ns [nm]	std 25 ns [nm]	PCA max [nm]	std 1 ns [nm]	std 1 ns [nm]	std 1 ns [nm]	std 1 ns [nm]
1MKJ (forma natywna)								
α0	0,0568	0.138	0.211	0.122	0,068	0,133	0,151	0,161
α1a	0,0523	0.104	0.144	0.038	0,047	0,096	0,113	0,109
α1b	0,0497	0.109	0.158	0.039	0,048	0,105	0,130	0,135
α2b	0,0565	0.102	0.138	0.030	0,063	0,103	0,121	0,111
α3	0,0514	0.098	0.148	0.052	0,059	0,091	0,110	0,111
α3a	0,0529	0.118	0.162	0.038	0,060	0,096	0,120	0,118
α4	0,0518	0.110	0.156	0.043	0,062	0,105	0,117	0,118
α5L12	0,0595	0.135	0.182	0.034	0,066	0,121	0,138	0,142
α5L13	0,0457	0.078	0.108	0.027	0,050	0,072	0,081	0,087
α61	0,0458	0.095	0.160	0.086	0,052	0,089	0,108	0,106
α62	0,0505	0.098	0.147	0.064	0,060	0,092	0,109	0,111
α7	0,0634	0.259	0.483	0.227	0,076	0,199	0,362	0,371
β0β9	0,0533	0.103	0.141	0.028	0,065	0,100	0,117	0,116
β10	0,0444	0.093	0.132	0.036	0,050	0,082	0,108	0,123
β1aβ1b	0,0594	0.135	0.194	0.050	0,059	0,118	0,145	0,144
β1c	0,0583	0.129	0.185	0.066	0,056	0,121	0,139	0,143
β1β8	0,0508	0.098	0.152	0.031	0,055	0,083	0,104	0,109
β5aβ5b	0,0541	0.115	0.195	0.090	0,060	0,099	0,117	0,122
β5L8	0,0608	0.167	0.321	0.201	0,051	0,122	0,153	0,182
β4β5	0,0519	0.093	0.137	0.046	0,057	0,085	0,102	0,096
β4567_1	0,0469	0.115	0.160	0.047	0,051	0,099	0,122	0,122
β4567_2	0,0491	0.090	0.125	0.026	0,051	0,086	0,101	0,108
Lβ1α0β2α1a	0,0505	0.093	0.123	0.032	0,056	0,090	0,104	0,108
Lα0β1a	0,0569	0.131	0.198	0.099	0,072	0,127	0,146	0,156
L5	0,0602	0.134	0.181	0.017	0,063	0,125	0,158	0,136
L8	0,0560	0.099	0.135	0.034	0,068	0,097	0,126	0,126
L9	0,0640	0.129	0.165	0.038	0,084	0,134	0,157	0,152
L10	0,0495	0.125	0.180	0.054	0,047	0,100	0,132	0,138
L11_1	0,0477	0.126	0.242	0.130	0,053	0,106	0,141	0,132
L11_2	0,0604	0.244	0.581	0.382	0,059	0,147	0,278	0,278

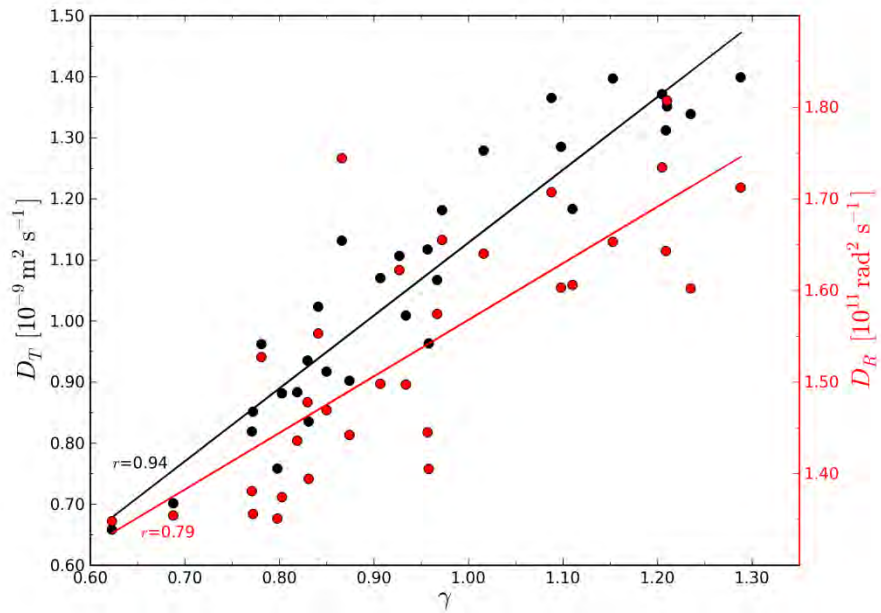
Tabela A5. Odchylenia standardowe powierzchniowych atomów kinezyny 1MKJ od położenia średniego po usunięciu translacji i rotacji całej cząsteczki (uśrednione po wszystkich atomach powierzchniowych w każdym wybranym obszarze). Wyniki otrzymane w wodzie SPC/E dotyczą 5 ps, 1 ns, 25 ns (*std 25*). Ponadto podano rezultaty analizy PCA (*PCA max*). Wyniki otrzymane w próżni oraz w modyfikowanych modelach wody (mod10, mod20, mod25) dotyczą odchyień standardowych od położenia średniego w czasie 1 ns.

Obszar	1MKJ (forma natywna)						1MKJ_0 (forma hydrofobowa)			
	D_T	D_R	$(D_T)_{restr}$	$(D_T)_{restr_BB}$	$(D_R)_{restr}$	$(D_R)_{restr_BB}$	$(D_T)_{restr}$	$(D_T)_{restr_BB}$	$(D_R)_{restr}$	$(D_R)_{restr_BB}$
	[10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	[10 ¹¹ rad ² s ⁻¹]	[10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	[10 ¹¹ rad ² s ⁻¹]	[10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	[10 ¹¹ rad ² s ⁻¹]	[10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	[10 ¹¹ rad ² s ⁻¹]	[10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	[10 ¹¹ rad ² s ⁻¹]
α0	1,40	1,71	1,06	1,20	1,56	1,72	1,61	1,71	2,39	2,42
α1a	0,92	1,47	0,59	0,73	1,31	1,42	1,62	1,87	2,89	2,97
α1b	1,07	1,50	0,78	0,92	1,45	1,46	1,91	1,99	2,96	3,05
A2aL4MgADP	0,66	1,35	0,37	0,45	1,29	1,27	1,63	1,81	3,22	3,43
α2b	1,13	1,74	0,85	1,00	1,72	1,72	1,69	1,80	2,95	3,06
α3	0,90	1,44	0,67	0,79	1,41	1,43	1,70	1,87	2,88	2,91
α3a	0,88	1,44	0,59	0,78	1,30	1,53	1,64	1,81	3,11	3,04
α4	1,01	1,50	0,70	0,85	1,37	1,47	1,71	1,84	2,93	2,94
α5L12	1,37	1,73	1,04	1,20	1,75	1,67	1,62	1,78	2,50	2,55
α5L13	0,70	1,35	0,43	0,55	1,21	1,28	1,66	1,71	3,07	3,26
α61	0,88	1,37	0,56	0,77	1,32	1,39	1,61	1,78	3,22	3,05
α62	1,02	1,55	0,72	0,86	1,54	1,53	1,80	1,80	3,21	3,06
α7	1,34	1,60	0,97	1,13	1,53	1,57	1,62	1,73	2,60	2,52
β0β9	1,07	1,57	0,77	0,98	1,38	1,51	1,74	1,87	2,92	2,98
β10	0,76	1,35	0,38	0,55	1,33	1,32	1,77	1,80	3,52	3,66
β1aβ1b	1,29	1,60	0,99	1,10	1,52	1,56	1,64	1,80	2,58	2,67
β1c	1,37	1,71	1,00	1,08	1,67	1,60	1,72	1,82	2,64	2,69
β1β8	0,82	1,38	0,50	0,64	1,18	1,31	1,83	1,81	3,80	3,98
β5aβ5b	1,11	1,62	0,73	0,82	1,49	1,52	1,66	1,81	2,75	2,69
β5L8	1,31	1,64	0,97	1,17	1,70	1,61	1,62	1,83	2,41	2,52
β4β5	0,96	1,53	0,68	0,83	1,34	1,52	1,74	1,88	3,39	3,38
β4567_1	0,96	1,41	0,66	0,80	1,32	1,36	1,68	1,80	2,93	2,96
β4567_2	0,84	1,39	0,56	0,70	1,30	1,36	1,85	1,96	3,16	3,03
Lβ1α0β2α1a	0,94	1,48	0,65	0,76	1,39	1,41	1,62	1,80	3,04	3,01
Lα0β1a	1,28	1,64	1,03	1,14	1,58	1,57	1,64	1,86	2,63	2,74
L5	1,18	1,61	0,82	0,99	1,56	1,56	1,65	1,75	2,65	2,63
L8	1,18	1,66	0,83	1,04	1,53	1,63	1,65	1,68	2,78	2,82
L9	1,35	1,81	1,09	1,21	1,71	1,82	1,70	1,72	2,54	2,69
L10	1,12	1,45	0,79	0,95	1,45	1,46	1,64	1,80	2,91	2,82
L11_1	0,85	1,36	0,53	0,68	1,19	1,29	1,66	1,79	2,97	3,08
L11_2	1,40	1,65	0,97	1,10	1,52	1,58	1,56	1,67	2,66	2,61
SPC/E	2,75	2,38	2,75	2,75	2,38	2,38	2,75	2,75	2,38	2,38

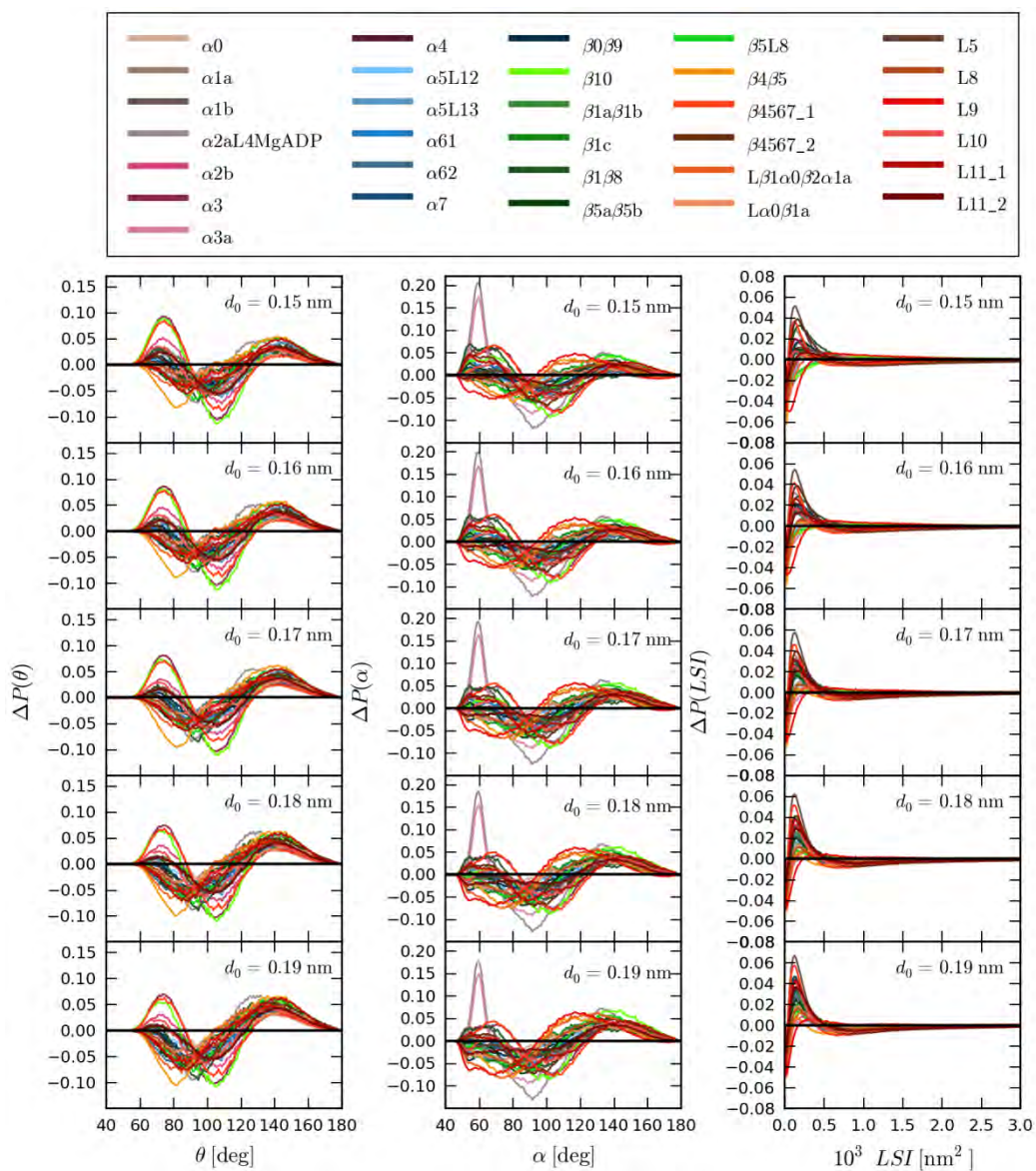
Tabela A6. Wyniki dla wybranych otoczek solwatacyjnych dla formy natywnej kinezy (1MKJ) oraz dla formy hydrofobowej (1MKJ_0). W pierwszej kolumnie z lewej nazwa obszaru solwatacyjnego. Znaczenie symboli: współczynnik dyfuzji translacyjnej D_T , współczynnik dyfuzji rotacyjnej D_R . Indeks *restr* oznacza wyniki otrzymane dla białka w całości przytrzymwanego podczas symulacji, a indeks *restr_BB* oznacza wyniki otrzymane dla białka, w którym łańcuchy boczne aminokwasów nie były przytrzymywane. Wszystkie wartości dotyczą pierwszej warstwy solwatacyjnej o grubości 0,4 nm. Ostatnia linia zawiera dane dla czystej wody SPC/E.

1BG2	(R=0.4 nm)								(R=0.8nm)		
	D_T	D_R	n_{HB}	E_{HB}	R_{HB}	β_{HB}	V	η	$S_{tra}(0.58)$	$S_{conf}(0.58)$	$S_{ort}(0.58)$
Obszar	[10 ⁻⁹ m ² s ⁻¹]	[10 ¹¹ rad ² s ⁻¹]	[k] mol ⁻¹	[nm]	[deg]	[nm ³]		[J mol ⁻¹ K ⁻¹]	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]	
$\alpha 0$	1,42	1,83	2,82	20,29	0,1849	12,22	0,0181	1,680	-13,28	-14,22	-49,35
$\alpha 1a$	0,82	1,31	2,39	20,08	0,1843	12,14	0,0177	1,632	-14,44	-13,08	-44,98
$\alpha 1b$	1,02	1,56	2,50	19,84	0,1844	12,23	0,0180	1,638	-14,00	-13,48	-46,11
$\alpha 2aL4MgADP$	0,56	1,24	2,12	20,32	0,1839	12,10	0,0176	1,622	-18,91	-11,68	-39,49
$\alpha 2b$	0,95	1,59	2,53	20,47	0,1847	12,20	0,0183	1,649	-14,78	-12,98	-45,88
$\alpha 3$	0,89	1,44	2,49	19,99	0,1845	12,21	0,0178	1,656	-14,56	-13,17	-46,58
$\alpha 3a$	0,68	1,32	2,48	20,32	0,1839	12,04	0,0177	1,647	-15,88	-13,13	-44,99
$\alpha 4$	0,91	1,38	2,53	20,20	0,1845	12,18	0,0178	1,655	-14,69	-13,29	-45,07
$\alpha 5L12$	1,27	1,62	2,72	20,19	0,1848	12,24	0,0182	1,670	-13,60	-13,85	-47,52
$\alpha 5L13$	0,85	1,29	2,43	20,17	0,1843	12,13	0,0180	1,642	-15,39	-12,94	-43,96
$\alpha 61$	1,00	1,57	2,49	20,18	0,1846	12,23	0,0178	1,651	-14,78	-13,37	-44,20
$\alpha 62$	0,89	1,37	2,54	20,37	0,1845	12,15	0,0179	1,652	-14,45	-13,32	-46,21
$\beta 0$	1,01	1,42	2,51	20,19	0,1848	12,27	0,0180	1,636	-14,35	-13,21	-45,93
$\beta 1a\beta 1b$	1,25	1,72	2,70	20,18	0,1847	12,21	0,0181	1,669	-13,48	-13,95	-48,38
$\beta 1c$	1,25	1,61	2,71	20,26	0,1847	12,18	0,0182	1,668	-13,64	-13,87	-47,87
$\beta 1\beta 8$	0,54	1,19	2,27	20,20	0,1841	12,16	0,0179	1,624	-16,46	-12,24	-42,51
$\beta 5a\beta 5b$	1,18	1,71	2,58	20,11	0,1846	12,23	0,0182	1,660	-14,24	-13,53	-45,95
$\beta 5L8$	1,49	1,75	2,84	20,22	0,1847	12,18	0,0181	1,675	-13,34	-14,28	-48,77
$\beta 4\beta 5$	0,92	1,55	2,56	20,28	0,1845	12,14	0,0179	1,644	-15,35	-13,38	-45,35
$\beta 4567_1$	1,00	1,53	2,57	20,07	0,1847	12,23	0,0180	1,655	-13,31	-13,73	-48,74
$\beta 4567_2$	0,89	1,45	2,45	20,21	0,1844	12,15	0,0180	1,646	-14,41	-13,15	-45,86
$L\beta 1\alpha 0\beta 2\alpha 1a$	0,91	1,43	2,48	20,28	0,1845	12,14	0,0180	1,648	-14,73	-13,07	-45,58
$L\alpha 0\beta 1a$	1,23	1,71	2,66	20,25	0,1847	12,21	0,0182	1,661	-13,93	-13,68	-46,68
$L5$	1,11	1,68	2,68	20,18	0,1846	12,19	0,0180	1,657	-13,45	-13,67	-48,10
$L8$	1,16	1,69	2,61	20,21	0,1848	12,24	0,0180	1,659	-14,02	-13,69	-47,10
$L9$	1,35	1,93	2,91	20,36	0,1849	12,17	0,0182	1,679	-13,59	-14,27	-49,52
$L10$	1,31	1,56	2,73	20,13	0,1848	12,21	0,0180	1,679	-12,99	-13,99	-49,75
$L11_1$	0,92	1,48	2,55	20,14	0,1845	12,16	0,0179	1,647	-14,53	-13,35	-46,24
$L11_2$	1,34	1,65	2,82	20,23	0,1849	12,22	0,0181	1,674	-13,31	-14,11	-49,13
SPC/E woda	2.75	2.38	3.27	20.12	0.1854	12.31	0.0187	1.725	-12.88	-15.34	-54.27

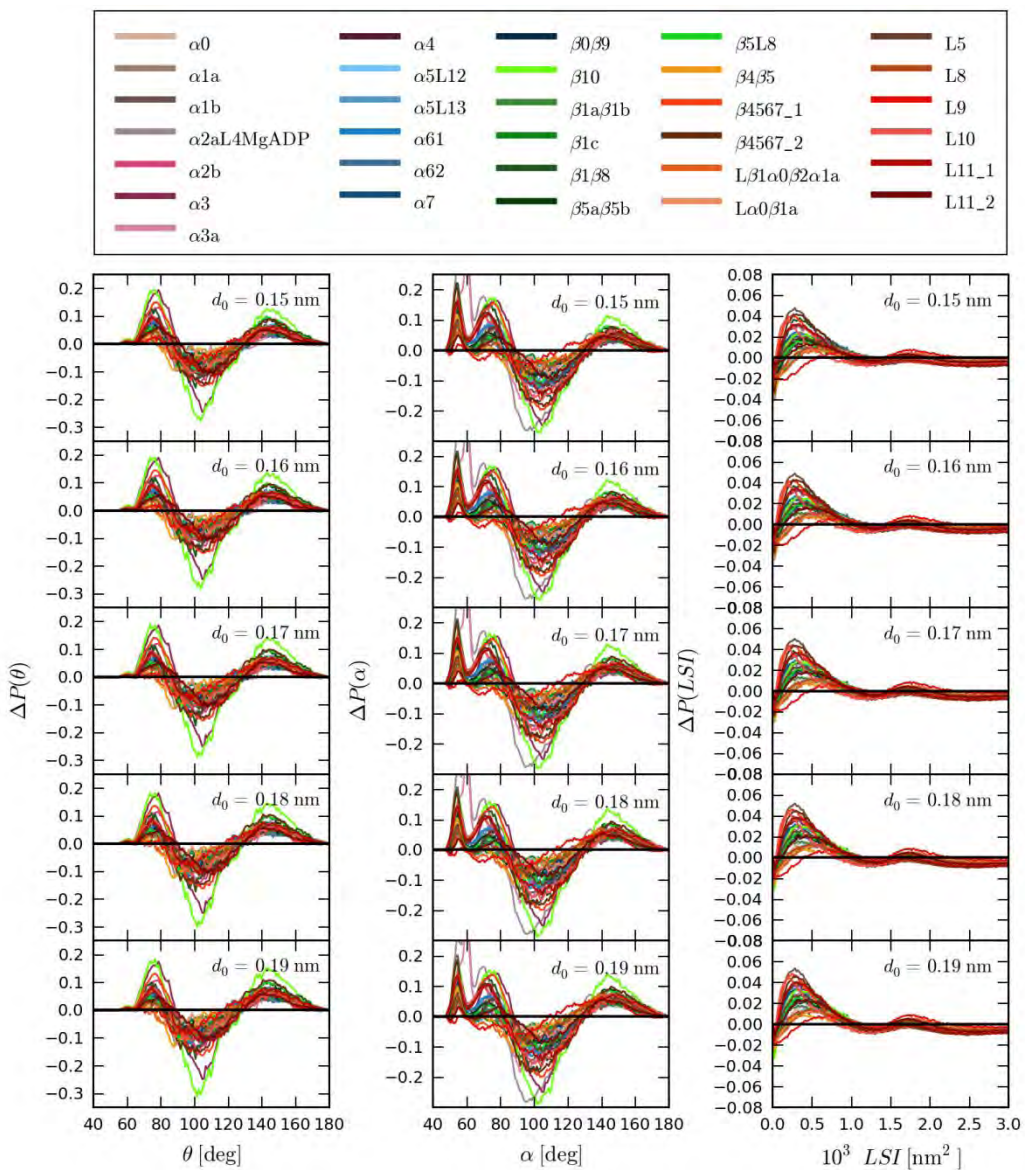
Tabela A7. Wyniki dla układu 1BG2. W pierwszej kolumnie z lewej nazwa obszaru solwatacyjnego. Znaczenie symboli: współczynnik dyfuzji translacyjnej D_T , współczynnik dyfuzji rotacyjnej D_R , średnia liczba wiązań wodorowych na cząsteczkę wody n_{HB} , średnia energia wiązania wodorowego E_{HB} , średnia odległość tlen – wodór w wiązaniu wodorowym R_{HB} , średnia wartość kąta beta β_{HB} , średnia objętość V i parametr asferyczności η komórki Voronoia, parametry uporządkowania $S_{tra}(0.58)$, $S_{conf}(0.58)$, $S_{ort}(0.58)$ dla wody w pierwszej ($R=0,4$ nm) oraz w pierwszej i drugiej ($R=0,8$ nm) warstwie solwatacyjnej. Ostatnia linia zawiera dane dla czystej wody SPC/E.



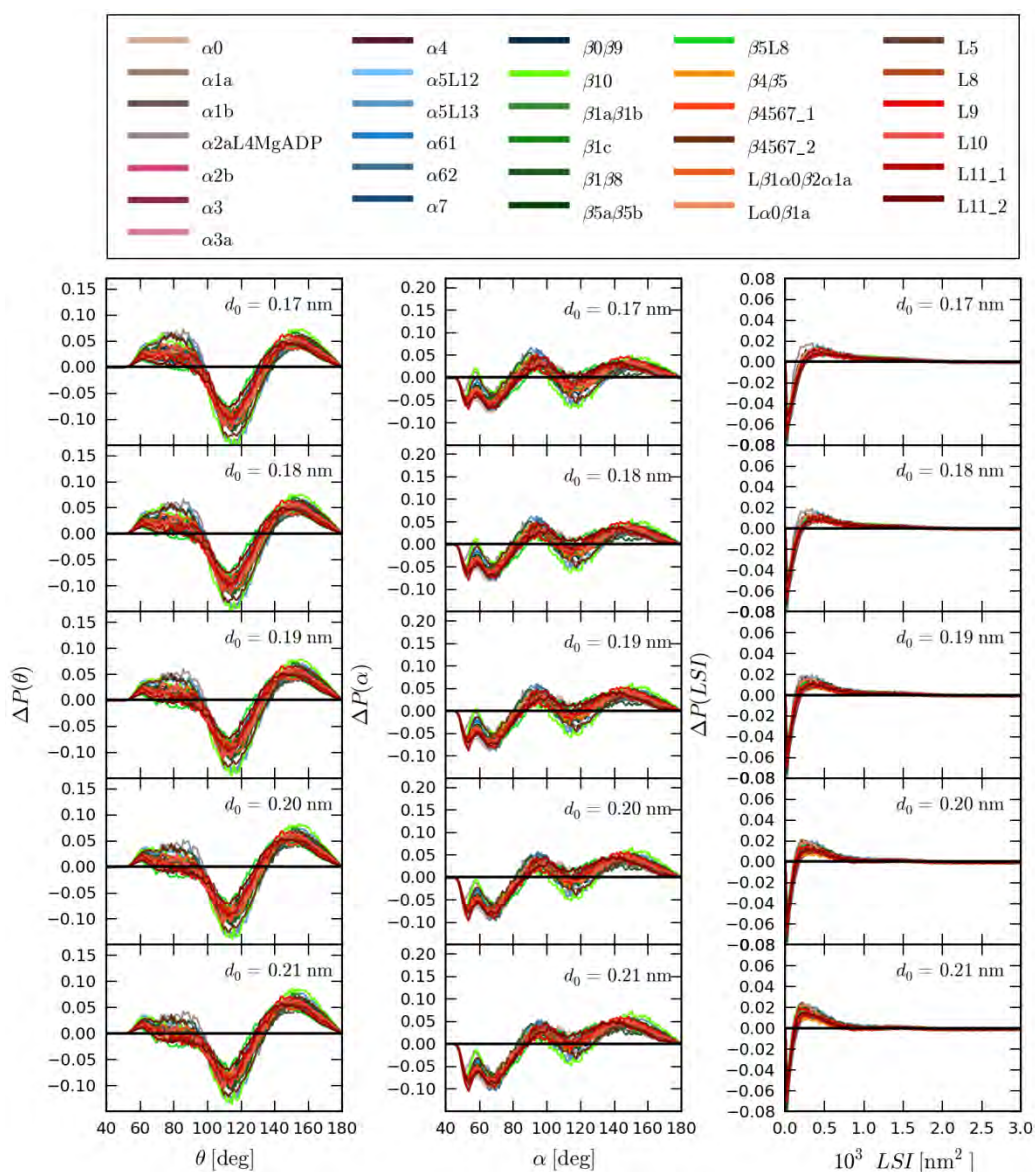
Rys. A1. Korelacja pomiędzy parametrem lokalnej szorstkości γ i współczynnikami dyfuzji D_T i D_R dla pierwszych otoczek solwatacyjnych kolejnych obszarów na powierzchni kinezyny 1MKJ.



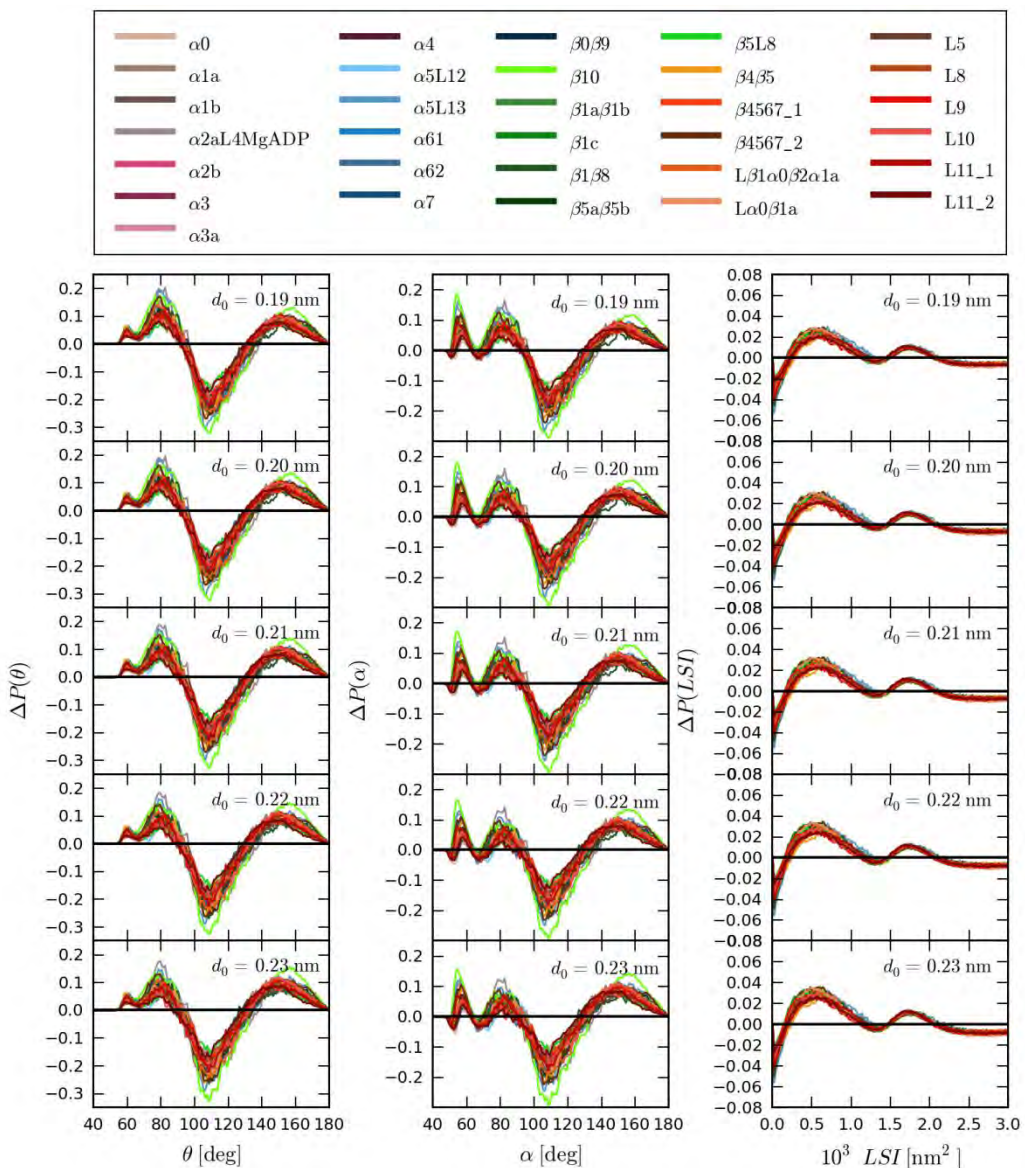
Rys. A2. Wyniki dla układu 1MKJ. Wykresy różnicowe rozkładu prawdopodobieństwa dla kątów θ , α i wartości LSI w pierwszych warstwach solwatacyjnych kolejnych obszarów na powierzchni kinezy. Promień odcięcia d_0 zmienia się od 0,15 do 0,19 nm. Wyniki otrzymane dla trajektorii niepoddanej minimalizacji.



Rys. A3. Wyniki dla układu 1MKJ. Wykresy różnicowe rozkładu prawdopodobieństwa dla kątów θ , α i wartości LSI w pierwszych warstwach solwatacyjnych kolejnych obszarów na powierzchni kinezy. Promień odcięcia d_0 zmienia się od 0,15 do 0,19 nm. Wyniki otrzymane dla trajektorii poddanej minimalizacji.



Rys. A4. Wyniki dla układu 1MKJ_0 (cząsteczka hydrofobowa, w całości przytrzymywana podczas symulacji). Wykresy różnicowe rozkładu prawdopodobieństwa dla kątów θ , α i wartości LSI w pierwszych warstwach solwatacyjnych kolejnych obszarów na powierzchni kinezyny. Promień odcięcia d_0 zmienia się od 0,17 do 0,21 nm. Wyniki otrzymane dla trajektorii niepoddanej minimalizacji.



Rys. A5. Wyniki dla układu 1MKJ_0 (cząsteczka hydrofobowa, w całości przytrzymywana podczas symulacji). Wykresy różnicowe rozkładu prawdopodobieństwa dla kątów θ , α i wartości LSI w pierwszych warstwach solwatacyjnych kolejnych obszarów na powierzchni kinezyny. Promień odcięcia d_0 zmienia się od 0,19 do 0,23 nm. Wyniki otrzymane dla trajektorii poddanej minimalizacji.

Woda solwatacyjna pomiędzy domeną motoryczną i dimerem tubulinowym

Odległość [nm]	$\Delta S_{tra}(0.58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]			$\Delta S_{conf}(0.58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]			$\Delta S_{ort}(0.58)$ [J mol ⁻¹ K ⁻¹]		
	d_o [nm]			d_o [nm]			d_o [nm]		
	0,16	0,17	0,18	0,16	0,17	0,18	0,16	0,17	0,18
0,4	1,64	2,78	3,73	-1,93	-2,00	-2,04	-5,89	-5,02	-4,23
1,2	0,84	1,11	1,31	-1,35	-1,32	-1,28	-4,43	-4,04	-3,68
2,0	0,04	0,07	0,09	-0,68	-0,60	-0,54	-2,61	-2,27	-2,02
1JFF (R=1,2 nm)	0,07	0,08	0,08	-0,57	-0,48	-0,40	-2,15	-1,79	-1,48
1JFF (R=1,6 nm)	-0,03	-0,01	-0,01	-0,44	-0,37	-0,29	-1,75	-1,45	-1,14

Tabela A8. Parametry uporządkowania obliczone dla wody zawartej pomiędzy kinezyną i dimerem tubulinowym dla układów 1BG2_1JFF_4, 1BG2_1JFF_12, 1BG2_1JFF_20. Dwa ostatnie wiersze zawierają wyniki porównawczych obliczeń dla układu 1JFF, kiedy przyjęty zakres obliczeń wynosił R=1,2 nm lub R=1,6 nm od górnej powierzchni dimeru tubulinowego.