

Imię i nazwisko autorki rozprawy: Emilia Kaczkowska
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Oddziaływania międzycząsteczkowe w wybranych układach trójskładnikowych: woda - osmolit - model łańcucha białkowego.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Intermolecular interactions in selected water - osmolyte - model of polypeptide chains systems.

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr hab. inż. Joanna Krakowiak	dr inż. Jarosław Wawer

Gdańsk, 2020



Podziękowania

Pragnie podziękować:

*Promotorce i Promotorowi pomocniczemu,
za cierpliwość, cenne uwagi i poświęcony czas, dzięki którym zarówno praca
eksperymentalna jak i napisanie tej rozprawy nie było traumą.*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Chemii Fizycznej,
za życzliwość z jaką spotkałam się od pierwszych zajęć z chemii fizycznej.*

*Współautorom publikacji,
za pomoc w przeprowadzeniu badań i wsparcie merytoryczne.*

*Rodzicom,
za dom pełen miłości i książek.*

*Przyjaciółom,
za wspólne tańce, hulanki i swawole, które zapewniają mi radość i dają energię.*





Spis treści

1. Wstęp	2
2. Cel i zakres pracy	13
3. Część teoretyczna	15
3.1 Spektroskopia w podczerwieni w analizie oddziaływań w układzie woda-osmolit-NMA	15
3.2. Analiza oddziaływań w układach trójskładnikowy na podstawie pomiarów gęstości i szybkości dźwięku w roztworach	20
3.3. Badanie wybranych aspektów formowania się włókien amyloidowych	29
3.3.1. Techniki pomiarowe wykorzystane w badaniu procesu powstawania włókien	34
3.4. Pomiar temperatury denaturacji białka za pomocą techniki różnicowej fluorymetrii skaningowej w nanoskali (nanoDSF)	40
4. Część eksperymentalna.....	42
4.1. Przygotowanie roztworów oraz warunki przeprowadzanych badań	42
5. Wyniki badań i ich dyskusja	49
5.1. Spektroskopia w podczerwieni układów trójskładnikowych woda-NMA-osmolit....	49
5.2. Pomiary wolumetryczne i akustyczne	55
5.3. Pomiary nanoDSF - wpływ osmolitów na temperaturę denaturacji lizozymu.....	85
5.4. Badanie procesu tworzenia się włókien amyloidowych w roztworach osmolitów ..	93
7. Dorobek naukowy	114
8. Bibliografia.....	116
9. Materiały uzupełniające	128



Wykaz skrótów

BET- *N,N,N*-trimetyloglicyna

BU – *n*-butylomocznik

GLY – glicyna

HEWL- lizozym z białka jaja kurzego

NMA – *N*-metyloacetamid

TAU – tauryna

TMAO - *N*-tlenek trimetyloaminy

TMU – *N,N, N',N'*-tertrametylomocznik

A_K – [$\text{kg}\cdot\text{m}^2/(\text{N}\cdot\text{mol})$] – współczynnik emipryczny, współczynnik kierunkowy prostej opisującej zależność $\kappa_s = f(m)$

d – [kg/m^3] - gęstość roztworu

d_0 - [kg/m^3] – gęstość rozpuszczalnika

m – [mol/kg] – molalność roztworu

u – [m/s] - szybkość dźwięku

$K_{s,\phi}$ – [$\text{m}^5/(\text{mol}\cdot\text{N})$] – pozorna molowa ściśliwość adiabatyczna

$K_{s,\phi}^0$ – [$\text{m}^5/(\text{mol}\cdot\text{N})$] – graniczna pozorna molowa ściśliwość adiabatyczna

S_n – liczba hydratacyjna

S_n^0 – graniczna liczba hydratacyjna

V_ϕ - [m^3/mol] – pozorna objętość molowa

V_ϕ^0 – [m^3/mol] – graniczna pozorna objętość molowa

S_K - [$\text{kg}\cdot\text{m}^5/(\text{N}\cdot\text{mol}^2)$] - współczynnik emipryczny, współczynnik kierunkowy prostej opisującej zależność $K_{s,\phi} = f(m)$

S_v – [$\text{kg}\cdot\text{m}^3/\text{mol}^2$] - współczynnik emipryczny, współczynnik kierunkowy prostej opisującej zależność $V_\phi = f(m)$

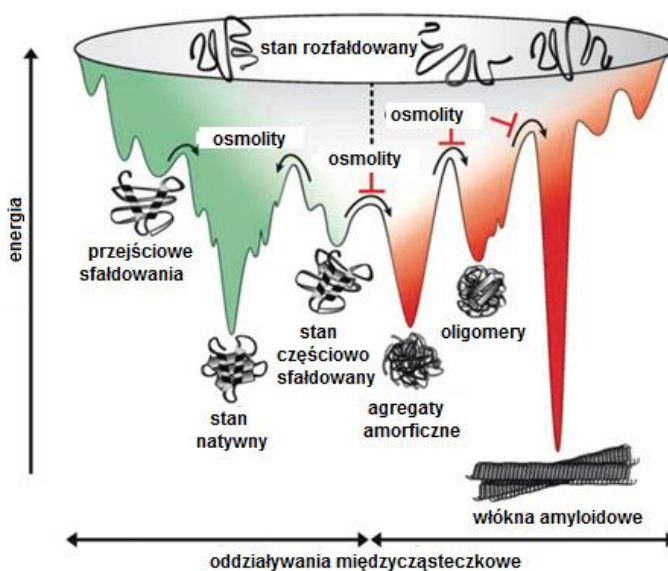
$\Delta_t V_\phi^0$ – [m^3/mol] – funkcja przeniesienia granicznej pozornej objętości molowej

$\Delta_t K_{s,\phi}^0$ - [$\text{m}^5/(\text{mol}\cdot\text{N})$] – funkcja przeniesienia granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej



1. Wstęp

O tym, że makrocząsteczki, jakimi są białka pełnią kluczowe role w organizmie żywym świadczy, chociażby, że funkcjonowanie ssaka zależy od około 30 tysięcy białek. Aminokwasy są blokami budującymi białko, tworzącymi zasadniczo rzecz biorąc liniowy łańcuch. Struktura ta nie jest biologicznie aktywna, dopóki białko nie uzyska formy natywnej. Z powodu oddziaływań między aminokwasami, zaraz po translacji, następuje fałdowanie białka. Część białek spontanicznie formuje się w strukturę aktywną, część ulega nieefektywnemu fałdowaniu, część ulega niepoprawnemu pofałdowaniu. W wyniku dwóch ostatnich procesów białko nie uzyskuje aktywności biologicznej. Rozwinięte białko charakteryzuje się dużą entropią i dużą entalpią swobodną (G , energia swobodna Gibbsa, funkcja Gibbsa). Duża entropia wynika z wielu możliwych konfiguracji struktury, które rozwinięte białko może przyjąć, a wysoka entalpia swobodna odzwierciedla niestabilność białka w takiej konfiguracji (patrz rys. 1). W momencie rozpoczęcia się fałdowania białka entalpia swobodna maleje, tak samo jak ilość dostępnych konformacji. Stan natywny jest osiąganym, gdy energia swobodna osiąga minimum, ale lokalne minima mogą „uwięzić” białko w stanie przejściowym i spowolnić proces fałdowania [1].



Rysunek 1. Schemat energetyczny różnych form białka na podstawie [2]

Duże zatłoczenie we wnętrzu komórki dodatkowo sprzyja nieprawidłowemu pofałdowaniu się białka. Czynnikiem wpływającym na zwiększenie się prawdopodobieństwa

błądu w fałdowaniu białka są m.in. mutacje genetyczne, starzenie się komórki, zmiany w cytoplazmie komórki wywołane przez zmiany temperatury, obecność metali ciężkich, zmiany pH, stres oksydacyjny (czyli niezachowana równowaga między wolnymi rodnikami i przeciwutleniaczami w komórce). Zjawisko agregacji niepoprawnie pofałdowanego białka i jego akumulacja w komórkach związana jest z chorobami takimi jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona, zakaźne encefalopatie gąbczaste, stwardnienie zanikowe boczne czy cukrzyca typu II [3,4]. Poprawnie pofałdowane białka są nie tylko niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych, ale pozwalają również na przeprowadzenie wielu procesów technologicznych [5]. Ze względu na szeroki wachlarz funkcji biologicznych białka wykorzystywane są w przemyśle biotechnologicznym, chemicznym, spożywczym i farmaceutycznym, co wymaga od nich nie tylko odpowiedniej struktury trzeciorzędowej, ale także jej stabilności. Struktura białka uwarunkowana jest przez takie oddziaływania jak np. wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe i jonowe. Jak już to zostało podkreślone, zmiany w otoczeniu makrocząsteczki zakłócają te oddziaływania, co może prowadzić do rozwinięcia się białka, jego denaturacji i utraty aktywności. Chociaż jest wiele czynników powodujących denaturację, to denaturacja termiczna jest najważniejszą z nich zarówno podczas przechowywania jak i w trakcie procesu otrzymywania i modyfikacji białka. Do stabilizacji polipeptydów, poza ich warunkami natywnymi, rozwinięto procedury takie jak modyfikacje chemiczne, immobilizacje, modyfikacje genetyczne i dodatek substancji stabilizujących. W naturze związkami, które stabilizują białko są m.in. osmolity, małe cząsteczki organiczne szerzej opisane w rozdziałach 1.1 i 1.2. Zrozumienie oddziaływań występujących w układach woda – białko – substancja stabilizująca, jest więc kluczowe zarówno dla rozwoju medycyny jak i biotechnologii.

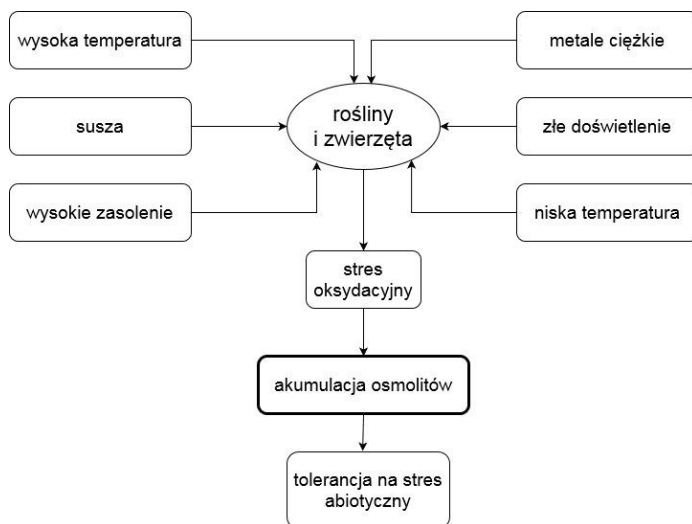
W niniejszej rozprawie analizowane są układy, w skład których wchodzi trzy elementy: osmolit, białko (lub jego model) oraz woda. W kolejnej części przedstawię pokrótce czym są i za co odpowiadają wspomniane osmolity.

1.1. Osmolity – małe cząsteczki o dużym wpływie na białko

Źródła przyczyn występowania stresów środowiskowych można podzielić na biotyczne (uwzględniające m.in. pasożyty) lub abiotyczne do których zalicza się suszę, duże zasolenie, niekorzystną temperaturę, wilgotność, obecność metali ciężkich w glebie [6,7]. W odpowiedzi na stres wywołany przez suszę i zasolenie rośliny wykształciły w sobie zmiany przystosowujące je do ciężkich warunków na przykład wprowadzając zmiany w odbieraniu bodźców (rys.2). Badania pokazują, że jednym ze sposobów na walkę ze stresem środowiskowym jest gromadzenie się w komórkach małych cząsteczek tak zwanych osmolitów [8,9]. Są to związki o niskiej masie cząsteczkowej, występujące w naturze, dobrze



rozpuszczalne i gromadzące się w komórce w wysokich stężeniach (sięgających nawet 1 mol/dm³). Dodatkowo związki te mają zdolność wpływania na stabilność białka, zwiększając ją (stabilizatory) lub zmniejszając (destabilizatory). Klasyfikacja ta nie jest prosta i istnieją osmolity stabilizujące, których właściwości zwiększające temperaturę topnienia przejawiają się tylko na określony rodzaj białka lub w pewnym zakresie stężeń.



Rysunek 2. Przyczyny występowania stresu oksydacyjnego u roślin i zwierząt. Odpowiedzią na to zjawisko jest m.in. akumulacja osmotów w komórce.

Ze względu na strukturę chemiczną osmolity można podzielić na niskocząsteczkowe węglowodany w tym cukry (trehaloza), poliole (glicerol, inozytol) i ich pochodne (o-metyloinozytol), aminokwasy (tauryna, glicyna, prolina) i ich pochodne (np. ektoina), metyloaminy (np. *N,N,N*-trimetyloglicynę i jej pochodną *N*-tlenek trimetyloaminy- TMAO). Wszystkie te związki są szeroko rozpowszechnione w naturze np. *N,N,N*-trimetyloglicyna występuje w każdym królestwie żywym, a tauryna jest powszechna w organizmach morskich i organach ssaków. Osmolity z grupy węglowodanów występują w grzybach, algach, roślinach i nerkach ssaków. Cukry i poliole występują głównie w organizmach narażonych na zamarzanie. Organizmy często gromadzą w swoich komórkach mieszaniny związków o różnych stężeniach, w zależności od jego środowiska występowania. Nerka ssaka na przykład gromadzi poliole (myo-inozytol, sorbitol), metyloaminy (*N,N,N*-trimetyloglicynę i glicerofosforylocholinę) i aminokwas (taurynę) [10]. W tabeli 1 wymieniono kilka sposobów ochrony komórek przed stresem abiotycznym przez osmolity.



Tabela 1. Ochronne właściwości osmolitu przejawiające się stabilizacją makrocząsteczek i błon (na podstawie [10])

Własność osmolitu	Przykład osmolitu i organizmu w którym występuje
Przeciwdziałanie skutkom nagromadzenia się mocznika w komórce	Metyloaminy np. <i>N</i> -tlenek trimetyloaminy (rekin)
Zwiększanie termostabilności	Trehaloza, anionowe poliole (Archeony)
Ochrona błon i ścian przez zamarzaniem	Trehaloza, prolina (np. <i>Hemideina maori</i>)
Ochrona komórek w stanie wysuszenia	Węglowodany, np. trehaloza (suszone drożdże)
Przeciwdziałanie skutkom obecności soli nieorganicznych	Metyloaminy (rośliny mokrzał słonych)
Przeciwdziałanie wysokiemu ciśnieniu	<i>N</i> -tlenek trimetyloaminy (ryby głębinowe)

Warto zauważyć, że osmolity, ze względu na szeroki wachlarz właściwości i neutralność wobec organizmu znalazły szereg zastosowań w biotechnologii np.

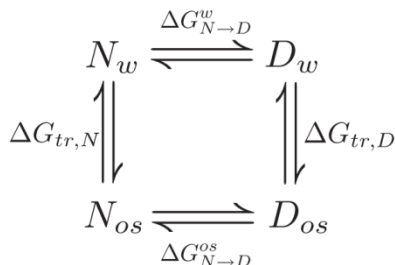
- w technologii rekombinacji DNA [11–13],
- w kontroli agregacji białek [14–18],
- w przechowywaniu białek i peptydów [19–21],
- w hodowli komórek [7]–[9],
- w przemyśle kosmetycznym [25–27]
- w rolnictwie np. jako dodatek do pasz dla zwierząt hodowlanych [28,29],
- w procesie oczyszczanie białek [30–32],
- w przemyśle farmaceutycznym [33–38].

1.2. Osmolity stabilizujące strukturę białka

Równowaga w reakcji fałdowania się białka nie jest zwyczajną reakcją chemiczną, ponieważ przejściu ze stanu rozwiniętego (D) do natywnego (N) nie towarzyszy pojawienie się lub są niszczenie żadnych wiązań kowalencyjnych.

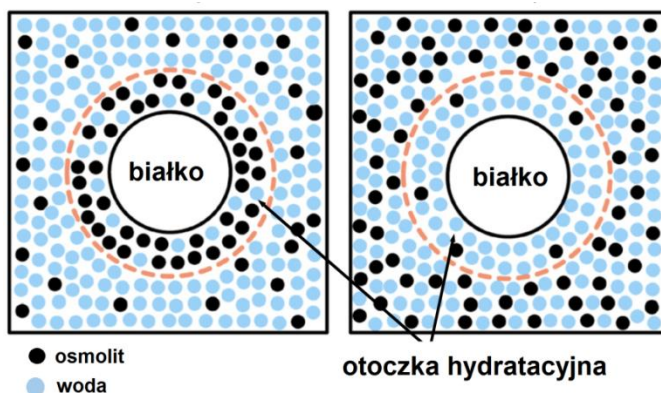
Osmolity są małymi organicznymi cząsteczkami, które wywierają duży wpływ na proces fałdowania się białka, nie wpływając przy tym na powstawanie lub rozpad wiązań kowalencyjnych. Osmolity stabilizujące przesuwają równowagę w stronę stanu natywnego (N), podczas gdy osmolity destabilizujące w stronę stanu rozwiniętego (D) [39]. Mimo wielu badań nieznany jest mechanizm, który w pełni wyjaśniałby wpływ osmolitów na stabilność termodynamiczną białka (w tym również lizozymu). Na rysunku 3 przedstawiono schemat cyklu termodynamicznego przejść między stanem natywnym i zdenaturowanym białka.





Rysunek 3. Schemat przedstawiający cykl termodynamiczny zawierający przejścia między stanem natywnym lub zdenaturowanym w wodzie (odpowiednio N_w i D_w) lub w roztworze osmolitu (N_{os} lub D_{os}) na podstawie [192].

Pierwszą i najpopularniejszą teorią wyjaśniającą wpływ osmolitów na strukturę białka jest teoria osmofobowa, obecnie funkcjonująca jako mechanizm preferencyjnego wykluczania [39,40,49,41–48]. Model ten opiera się na oddziaływaniach pomiędzy rozpuszczalnikiem a łańcuchem głównym białka. Zgodnie z tym hipotetycznym mechanizmem stabilizujące osmolity takie jak TMAO, są preferencyjnie wykluczane z powierzchni łańcucha polipeptydowego, ponieważ woda chętniej niż TMAO oddziałuje z grupami polarnymi łańcucha głównego białka. Osmolity destabilizujące, takie jak mocznik, przeciwnie do osmolitów stabilizujących, gromadzą się w pobliżu łańcucha głównego białka. Za powód tego zjawiska uznaje się silniejsze powinowactwo destabilizatorów do oddziaływania z łańcuchem polipeptydowym niż posiada cząsteczka wody. Zgodnie z tą ciągle rozwijaną hipotezą, osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białka i nie zakłócają jego hydratacji. Osmolity destabilizujące są zdolne do bezpośredniego oddziaływania z powierzchnią białka i ułatwiają jego proces rozwijania. Na rysunku 4 pokazano zjawisko akumulacji i wykluczania osmolitu z powierzchni białka.



Rysunek 4. Rysunek przedstawiający akumulację (po lewej) lub wykluczanie (po prawej) osmolitów z powierzchni białka.



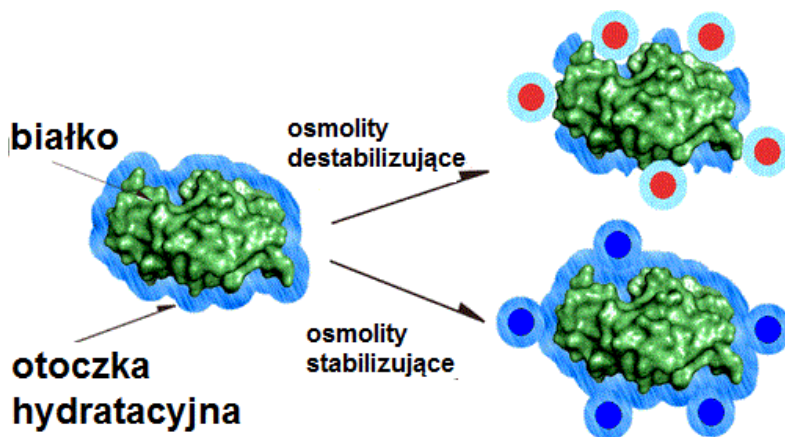
Model ten nie uwzględnia niepolarnych fragmentów łańcucha polipeptydowego i oddziaływań, które w pobliżu tej części białka występują, a one również mogą mieć wpływ na lokalne stężenia osmolitu przy powierzchni białka. Mechanizm ten nie wyjaśniał też, dlaczego niektóre z cząsteczek chcą bezpośrednio oddziaływać z białkiem, a inne nie. Ponadto znaleziono osmolity stabilizujące, które nie spełniają tych reguł [50].

Inna hipoteza stanowi, że osmolity nie działają bezpośrednio na białko, a zmieniają otaczające je cząsteczki wody, osłabiając lub wzmacniając strukturę rozpuszczalnika, co wpływa na makrocząsteczkę w nim zanurzoną [51–56]. Efekt hydrofobowy wynika z oddziaływań pomiędzy cząsteczką hydrofobową i wodą (hydratacja hydrofobowa) jak również oddziaływań między grupami hydrofobowymi za pośrednictwem rozpuszczalnika (oddziaływania hydrofobowe). W ostatnich latach liczba badań nad zjawiskiem hydrofobowości nie maleje ze względu na powiązania efektu hydrofobowego z procesem fałdowania się białek, tworzenia się miceli czy ze stabilnością błon biologicznych. Powszechną metodą badania udziału rozpuszczalnika w utrzymywaniu stanu natywnego białka jest modyfikowanie struktury wody za pomocą dodatku określonej ilości monohydroksylowych alkoholi o różnych długościach łańcucha węglowego [57]. Modyfikowanie struktury rozpuszczalnika (np. wody) poprzez dodatek substancji współrozpuszczonej jest również rozpowszechnione celem zmiany przebiegu i wydajności wielu reakcji chemicznych, procesu tworzenia się miceli i błon biologicznych. Nic więc dziwnego, że podejrzewa się osmolity o oddziaływanie z białkami poprzez ten pośredni mechanizm z udziałem cząsteczek wody. Białko przyjmuje szeroki zakres izoenergetycznych, ale odmiennych funkcjonalnie stanów. Obecność wody oddziałującej z makrocząsteczką obniża bariery entalpowe pomiędzy poszczególnymi konformacjami białka, umożliwiając jej szybsze zmiany i przyjęcie najodpowiedniejszej postaci. Oznacza to, że zmiany w strukturze rozpuszczalnika, wpływające na jego dynamikę, wpływają również na strukturę samej makrocząsteczki i dynamikę jej przejść z jednej konformacji w drugą. Eksperymentalne badanie proponowanego powiązania pomiędzy osmolitem, wodą i białkiem, wymaga scharakteryzowania warstwy hydratacyjnej cząsteczki jako funkcji stężenia dodatku osmolitu i zmian w stabilności białka. Powszechnie wykorzystywane techniki analizują najczęściej wszystkie cząsteczki wody obecne w całej objętości roztworu, a nie tylko o najbliższym otoczeniu białka lub osmolitu. Korzystne byłoby więc znalezienie prostej metody, która mogłaby być wykorzystana do badania struktury wody w otocze hydratacyjnej białka i osmolitu znajdujących się w tym samym roztworze. Model ten jednak nie do końca sprawdza się dla wodnych roztworów białka z osmolitami, ponieważ pewne badania wykazują, że nie ma wyraźnej zależności między wpływem osmolitu na wodę, a jego właściwościami stabilizującymi białko [58–60].



Oba z proponowanych mechanizmów wydają się nie wyjaśniać w pełni zjawiska stabilizacji białek w obecności osmolitów. Możliwe, że na różnym etapie procesu zwijania lub rozwijania białek różne mechanizmy są faworyzowane lub konieczne jest opracowanie innego mechanizmu.

W czasie trwania moich studiów doktoranckich w Katedrze Chemii Fizycznej PG zaproponowano mechanizm opierający się na podobieństwie (lub jego braku) otoczek hydratacyjnych białka i osmolitu [61]. Otoczka hydratacyjna osmolitów stabilizujących jest bardzo podobna do strefy hydratacyjnej białka (patrz rysunek 5). Podobieństwo to przejawia się w funkcji rozkładu odległości tlen-tlen cząsteczek wody. Wokół stabilizatorów i białek jest zmniejszona populacja wiązań wodorowych o najbardziej powszechnej długości dla wody objętościowej („bulk”) i występuje wzrost oddziaływań krótszego zasięgu. Otoczka hydratacyjna destabilizatorów jest za to wyraźnie różna od strefy hydratacyjnej białka. Osmolity te tworzą w swoim otoczeniu tzw. strefę wody różnej strukturalnie (z ang. „structurally different water”). Dodanie destabilizatorów do układów z białkiem powoduje „rozpuszczanie/rozluźnianie” się otoczki hydratacyjnej makrocząsteczki i destabilizację jej natywnej formy. Do tej pory nie znalazły się przesłanki wskazujące, że ten hipotetyczny mechanizm jest sprzeczny z wynikami przeprowadzonych eksperymentów. Schemat tego mechanizmu przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Schematyczne przedstawienie hipotezy o podobieństwie otoczki hydratacyjnej białka z otoczką hydratacyjną osmolitów. Osmolity destabilizujące (czerwone) mają otoczkę hydratacyjną różniącą się od otoczki hydratacyjnej białka, w przeciwieństwie do osmolitów stabilizujących (niebieskie), których otoczka hydratacyjna jest podobna do sfery hydratacyjnej białka na podstawie [61].

1.3. Woda jako środowisko badanych procesów

Procesy biochemiczne w komórce zachodzą w środowisku wodnym. Ze względu na wzrost świadomości ekologicznej woda stopniowo zastępuje rozpuszczalniki organiczne w



przemysle. Od dawna wiadomo, że woda w postaci ciekłej i jako rozpuszczalnik, posiada unikalne właściwości. Jej wyjątkowość wynika z połączenia niewielkiego rozmiaru jej cząsteczki z występowaniem ładunków umiejscowionych wzdłuż czterech ramion tetraedru. Silne wiązania wodorowe między cząsteczkami wody powodują dużą energię kohezji, wysoką temperaturę wrzenia, duże napięcie powierzchniowe i „niechęć” do rozpuszczania obojętnych (niepolarnych lub hydrofobowych) cząsteczek. Cząsteczka wody potrafi mocno oddziaływać z cząsteczkami polarnymi. Jest świetnym rozpuszczalnikiem dla wielu związków chemicznych o budowie jonowej czy dużych biocząsteczek takich jak białka czy DNA, ale także dla wirusów i komórek.

1.4. Charakterystyka wybranych osmolitów

Tak jak opisałam to wyżej, analizowane przeze mnie układy zawierają cząsteczki jednego osmolitu, wodę i białko lub jego model. Do swoich badań wybrałam osmolity stabilizujące białko, czyli glicynę, *N,N,N*-trimetyloglicynę (betainę), *N*-tlenek trimetyloaminy (TMAO) i osmolity destabilizujące, czyli pochodne mocznika: *n*-butylomocznik i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik, których wzory strukturalne przedstawione są w tabeli 2. W pierwszej wersji badań zamiast betainy planowałam badać układy zawierające taurynę, która ostatecznie nie okazała się tak ciekawym obiektem badawczym. Ze względu jednak na wysiłek włożony w zbadanie układów dwuskładnikowych metodami wolumetrycznymi i akustycznymi pozostawiłam w tej pracy wyniki z dodatkiem tauryny i pojawia się ona w części teoretycznej, jako osmolit stabilizujący.

Glicyna (GLY) jest najprostszym aminokwasem, który jest stabilizatorem białek w warunkach fizjologicznych. Zwiększa temperaturę topnienia lizozymu z białka jaja kurzego o około 5 K, podobnie jak jej pochodne: *N*-metyloglicyna i *N,N*-dimetyloglicyna [62]. Według literatury glicyna wpływa na stabilizację polipeptydu poprzez mechanizm wykluczania z hydratowanej powierzchni białka, co mają potwierdzać symulacje MD jak i pomiary zmian napięcia powierzchniowego roztworów z glicyną [63,64].

***N,N,N*-trimetyloglicyna (betaina)** należy do osmolitów stabilizujących dla większości białek i tak jak glicyna wpływa na stabilizację polipeptydu poprzez mechanizm wykluczania z dobrze hydratowanej powierzchni. Wraz z proliną jest głównym osmolitem, który gromadzi się w roślinach, bakteriach, algach i morskich bezkręgowcach w odpowiedzi na stres abiotyczny, głównie wywołany przez duże zasolenie. Jest osmolitem stabilizującym, „przeciwdziałającym”, który wzmacnia stabilność białka, niwelując denaturujące właściwości mocznika [65]. Betaina jest denaturantem dla wielu białek przy niskim pH, ale są również białka, które destabilizuje w pH fizjologicznym np. GFP- zielone białko fluorescencyjne. Betaina destabilizuje podwójną helisę i obniża temperaturę topnienia DNA. Przyczyną zjawiska destabilizacji białek przez betainę może być jej oddziaływanie z aminokwasami



łańcuchów bocznych białek takimi jak fenyloalanina i tryptofan, które są na tyle silne, że prowadzą do destabilizacji struktury [66].

Tabela 2. Wzory strukturalne wybranych osmotitów z podziałem na osmotity uznawane za stabilizatory (A- glicyna, B- tauryna, C- N,N,N-trimetyloglicyna, D- N-tlenek trimetyloaminy) i destabilizatory (E- N,N,N',N'- tetrametylomocznik, F- n-butylomocznik).

Stabilizatory		Destabilizatory
<p>A</p> <p>B</p>	<p>C</p> <p>D</p>	<p>E</p> <p>F</p>

Tauryna jest β -aminokwasem, ale zamiast grupy karboksylowej posiada grupę sulfonową, która ma silniejsze właściwości kwasowe, co czyni taurynę jonem obojnaczym w całym zakresie pH fizjologicznego. Występuje w tkankach zwierzęcych m.in. w mózgu, nerkach, wątrobie i mięśniach, ale nie wchodzi w skład białek. Jej właściwości do regulacji ciśnienia osmotycznego wynikają z jej obojętnego charakteru w pH fizjologicznym, słabej dyfuzji przez błony komórkowe i braku funkcji metabolicznych w większości komórek. Istnieje zaledwie kilka publikacji wspominających o jej właściwościach stabilizujących białko [67–69].

N-tlenek trimetyloaminy (TMAO) związek amfifilowy stabilizujących białka i DNA. Jest jednym z najczęściej analizowanych osmotitów w literaturze ze względu na swoje właściwości kompensowania negatywnego wpływu mocznika na stabilność białka [70]. Najnowsze badania wskazują, że TMAO jest związkiem, który nie wpisuje się w żadną z dwóch głównych hipotez próbujących wyjaśnić zjawisko stabilizacji [71]. Według najnowszych badań TMAO gromadzi się zarówno na granicy powietrze–woda i na granicy polipeptyd–woda. Wyniki pokazują, że TMAO ma także mały wpływ na strukturę otaczającej go wody w porównaniu do innych osmotitów. Dla TMAO zaproponowano mechanizm według którego oddziałuje on ze stanem rozwiniętym białka, ale jego oddziaływanie z białkiem zwiniętym są siedem razy silniejsze, stąd jego stabilizacyjny wpływ na białko. TMAO może zachowywać się jak związek powierzchniowo czynny na granicy polarnych i niepolarnych obszarów pofaldowanego białka.



***N,N,N',N'*-tertrametylomocznik (TMU)** jest jedyną metylową pochodną mocznika, która miesza się z wodą w każdych proporcjach. Aliklowe pochodne mocznika (w tym TMU z najbardziej rozwiniętą częścią hydrofobową) są lepszymi denaturantami niż alkohole i amidy. TMU jest silniejszym denaturantem niż chlorek guanidyny. Stabilność termiczna rybonukleazy i ferrocycyochromu spada wraz ze wzrostem stężenia mocznika i jego pochodnych oraz wraz ze wzrostem grupy hydrofobowej tej pochodnej, czyli w grupie metylomocznika, dimetylomocznika, etylomocznika i tetrametylomocznika. Ten ostatni jest najsilniejszym denaturantem [72–75].

***n*-butylomocznik (BU)** podobnie jak TMU jest destabilizatorem i pochodną mocznika, ale posiada długi łańcuch alkilowy. Jest izomerem konstytucyjnym TMU. W literaturze występuje w publikacjach z innymi alkilopochodnymi mocznika lub w porównaniu z *N,N,N',N'*-tetrametylomocznikiem [76]. Związek ten nie występuje naturalnie w przyrodzie, ale posiada właściwości denaturujące białko.

1.5. Modele białek

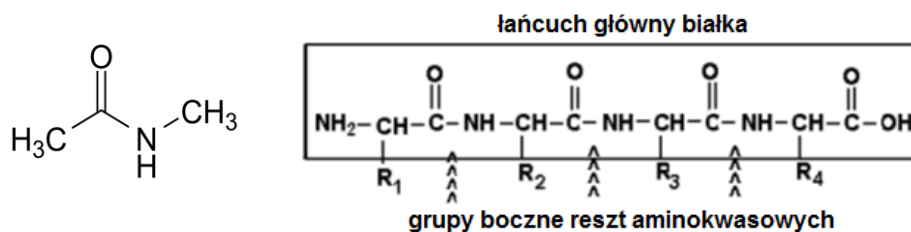
Z chemicznego punktu widzenia białka są strukturalnie jednymi z najbardziej skomplikowanymi cząsteczkami. Niestety oznacza to, że ich badania wiążą się z otrzymywaniem dużych ilości danych, które są trudne, a czasami niemożliwe do analizy. Z tego powodu, jeśli chce się uzyskać informacje na poziomie molekularnym na temat białka stosuje się odpowiednie cząsteczki modelowe. Są one dużo mniejszych rozmiarów, i posiadają wybrane właściwości bardzo zbliżone do białek, na zbadaniu których nam zależy.

Jednym z popularniejszych modelowych białek jest lizozym z białka jaja kurzego (HEWL z ang. hen egg white lysozyme) [77,78]. HEWL jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym składającym się ze 129 reszt aminokwasowych połączonych 4 mostkami disiarczkowymi. Jest łatwo rozpuszczalny w wodzie, a jego punkt izoelektryczny wynosi około 11,3. W przeciwieństwie do większości białek łatwo krystalizuje, tworząc kryształy o dużej dyfrakcji. Ma 60% podobieństwa sekwencji do ludzkiego lizozymu. Eksperymentalne badanie hydratacji białka, chociażby takiego małego jak lizozym, jest trudne, m.in. spektroskopowo, ze względu na udział zarówno hydratacji hydrofilowej jak hydrofobowej pochodzącej od niepolarnych fragmentów w całościowym widmie. Nie jest łatwo stwierdzić od czego pochodzą dane zmiany w mierzonym widnie/parametrach, dlatego konieczne są kolejne uproszczenia. W badaniach spektroskopowych stosowanymi cząsteczkami modelowymi są amidy i krótkie fragmenty białek - peptydy.

Do moich badań wybrałam cząsteczkę *N*-metyloacetamidu (NMA), którego wzór strukturalny pokazałam na rysunku 6. Struktura chemiczna tego amidu jest podobna do fragmentu wiązania peptydowego w białku, a jego hydratacja badana spektroskopowo



przypomina hydratację lizozymu [79]. Hydratacja lizozymu zdominowana jest przez hydratację łańcucha głównego, stąd wynikać może duże podobieństwo w hydratacji lizozymu z białka jaja kurzego (HEWL) i NMA [80]. W dynamice molekularnej i w wielu eksperymentach, wykorzystywany jest więc jako najprostszy model łańcucha głównego białka [81–88].



Rysunek 6. Po lewej wzór strukturalny N-metyloacetamidu, po prawej fragment łańcucha głównego białka, którego często stosowanym modelem jest właśnie cząsteczka NMA.

2. Cel i zakres pracy

Cel

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest zbadanie oddziaływań międzycząsteczkowych w wodnych układach osmolitów i NMA (modelu białka). Praca ta ma wnieść nowe informacje pozwalające na określenie sposobu stabilizacji/destabilizacji struktury białka przez osmolity. Ze względu na trudności w analizie na poziomie molekularnym wyników badań układów zawierających dużą cząsteczkę białka zdecydowałam się na zastosowanie jego modelu – *N*-metyloacetamidu (NMA). W realizacji postawionego celu wykorzystałam równoległe dwa kierunki badań:

- spektroskopię w podczerwieni (FTIR) za pomocą której zamierzałam zaobserwować i zidentyfikować oddziaływania NMA-osmolit, gdyż metoda ta pozwala na śledzenie zmian na poziomie molekularnym,
- badania wolumetryczne i akustyczne, które pozwalają na zaobserwowanie zmian makroskopowych dotyczących efektów objętościowych jak i sprężystości badanego układu.

Dodatkowo mając możliwość śledzenia formowania się włókien amyloidowych, postanowiłam zbadać również wpływ wytypowanych osmolitów na proces formowania się włókien białkowych

Cele pracy będą realizowany przez:

- określenie wpływu obecności osmolitów na widma NMA w wodzie rejestrowane w podczerwieni,
- wyznaczenie znanych parametrów wolumetrycznych i akustycznych dla badanych układów, w tym funkcji przeniesienia z wody do wodnych roztworów NMA dla wybranych osmolitów, a w oparciu o nie obliczenie również parametrów oddziaływań osmolit-NMA w układach 3-składnikowych,
- określenie różnic w procesie powstawania i morfologii powstałych włókien amyloidowych z HEWL w obecności poszczególnych osmolitów.

Głównym powodem wyboru tej problematyki badawczej był brak znajomości mechanizmu zjawiska stabilizacji/destabilizacji struktury białka przez osmolity mimo intensywnych badań prowadzonych od wielu lat. W literaturze przedmiotu brak również



doniesień wykorzystujących spektroskopię w podczerwieni lub pomiary wolumetryczne i akustyczne do opisu oddziaływań w układach trójskładnikowych woda-osmolit-cząsteczka modelowa białka. Metody te są stosunkowo proste i dobrze poznane i należałoby zweryfikować ich przydatność do badań oddziaływań w układach zawierających cząsteczkę modelową i osmolit.

Zakres

Obiektami badawczymi są osmolity, pośród których do badań wybrałam stabilizatory: glicynę, *N,N,N*-trimetyloglicynę i *N*-tlenek trimetyloaminy, a także destabilizatory: *n*-butylomocznik i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik. Wybrane stabilizatory są cząsteczkami naturalnie występującymi w żywym organizmie. Glicyna jest najprostszym związkiem organicznym, który w komórce ma wpływ na stabilność białek, a betaina jest jej *N*-metylową pochodną. Wpływ TMAO na modele białek jest natomiast najczęściej opisywanym zjawiskiem w literaturze przedmiotu. Wybrane destabilizatory są pochodnymi mocznika, naturalnego osmolitu występującego w organizmach żywych i są swoimi izomerami, co może pozwolić na określenie wpływu struktury chemicznej związku na jego oddziaływanie z NMA w roztworze wodnym.

W badaniach, w których monitorowano proces powstawania włókien amyloidowych, wykorzystałam lizozym z białka jaja kurzego (HEWL), które jest łatwo dostępnym białkiem, powszechnie wykorzystywanym do badania procesów amyloidogenezy. Mimo swojej niewielkiej masy cząsteczkowej, lizozym do badań spektroskopowych i pomiarów gęstości i szybkości rozchodzenia się dźwięku, jest zbyt skomplikowaną cząsteczką. Dla tych metod zdecydowałam się na wybór cząsteczki modelowej jaką jest *N*-metyloacetamid, który jest hydratowany w sposób zbliżony do hydratacji HEWL.



3. Część teoretyczna

3.1 Spektroskopia w podczerwieni w analizie oddziaływań w układzie woda-osmolit-NMA

W czasie realizacji prac dyplomowych wykorzystywałam spektroskopię w podczerwieni do badania oddziaływań w wodnych roztworach białek i osmolitów. Początkowo analizowałam uzyskane przeze mnie dane widmowe za pomocą metody widm różnicowych w ujęciu zaproponowanym przez prof. Janusza Stangreta [89]. Po uzyskaniu stopnia magistra miałam jeszcze okazję współpracować z promotorem moich prac dyplomowych – dr hab. Piotrem Bruździakiem – nad oddziaływaniami cząsteczki NMA z solami kwasu fosforowego (V). Efektem współpracy była publikacja w czasopiśmie *Journal of Molecular Liquids* [90]. Zaproponowana przez doktora Bruździaka, modyfikacja sposobu przygotowywania serii roztworów przeznaczonych do badania oddziaływań została zastosowana przeze mnie również w niniejszej pracy. Zrezygnowałam jednak z metody widm różnicowych na rzecz szybszej metody chemometrycznej (PARAFAC). Daje ona wprawdzie mniej informacji, ale pozwala na zdecydowanie szybszą analizę serii widm i izolację najważniejszych zmian widmowych spowodowanych potencjalnymi oddziaływaniami w roztworach. Uzyskane za jej pomocą informacje są wystarczające do dalszej analizy. Sposób przygotowania roztworów oraz wady (przede wszystkim dublowanie informacji w seriach izolowanych od strony NMA i osmolitu) i zalety tej metody, są zaprezentowane w publikacji [90].

Spektroskopia w podczerwieni (IR) jest jedną z najstarszych technik wykorzystywaną do analizy struktury drugorzędowej białek [91,92]. Z upływem czasu jej znaczenie malało na korzyść np. krystalografii rentgenowskiej albo magnetycznego rezonansu jądrowego, jednak dzięki ulepszeniu techniki pomiarowej, komputerowej analizie danych, nowym rozwiązaniom technicznym (np. spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia – ATR nadal jest jedną z wiodących technik w tego typu analizach. Promieniowanie o danej długości fali absorbowane jest przez cząsteczkę (a właściwie przez pojedyncze wiązania lub grupy wiązań, jeśli analizowany jest tzw. środkowy zakres podczerwieni) jeśli jego absorpcja wiąże się ze zmianą momentu dipolowego cząsteczki. Drgania wiązań lub całych grup wiązań nazywa się normalnymi, jeśli spełnione są tzw. reguły wyboru, czyli charakterystyczne dla danego rodzaju spektroskopii zasady absorpcji promieniowania, jak podana wyżej reguła dotycząca zmian momentu dipolowego. Drgania normalne kwalifikuje się według rodzajów wykonywanych drgań. Kryterium podziału jest rodzaj współrzędnych wewnętrznych biorących udział w danym drganiu. Drgania zmieniające przede wszystkim długość wiązania nazywa się drganiami rozciągającymi (ang. stretching). Drgania zmieniające głównie wartości kątów płaskich zwane są zwyczajowo drganiami zginającymi lub deformacyjnymi (ang. bending). Drgania zmieniające kąty pozapłaszczyznowe, np. kąty torsyjne lub inne dwuścienne, zwane są

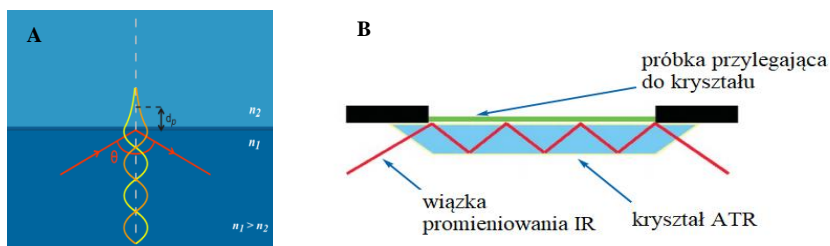


drzganiami poza płaszczyznę. Dodatkowo drzgania często mają również określoną symetrię i wówczas do nazwy jego rodzaju można dodać przymiotnik symetryczny lub asymetryczny.

Cząsteczka NMA, posiadająca w swej strukturze ugrupowanie peptydowe, może być z powodzeniem wykorzystywana w badaniach jako jeden z najprostszych modeli, co zostało opisane już w literaturze [80].

Przeszkodą we wszystkich pomiarach FTIR roztworów białek oraz większości prostych związków organicznych, w tym NMA i osmolitów, jest obecność wody. Absorbuje ona bardzo silnie przy liczbie falowej 1645 cm^{-1} , co przypada na maksimum zakresu I pasma amidowego. Rozwiązaniem tego problemu może być bardzo krótka droga optyczna ($\approx 5\mu\text{m}$), jednak problem w tym przypadku może stanowić niska powtarzalność pomiarów. Pomocna okazuje się spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia (ang. attenuated total reflectance – ATR).

Technika ta wykorzystuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia światła na granicy faz, co ukazane jest na rysunku 7. Wiązka światła wprowadzana jest do materiału o wysokim współczynniku załamania światła, przezroczystego dla promieniowania IR np. diamentu, selenku cynku lub germanu. Wiązka pada na wewnętrzną część materiału, na którą nałożona jest kropla roztworu o znacząco niższym współczynniku załamania światła i ulega zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia. W wyniku interferencji fali padającej oraz fali odbitej tworzy się fala stojąca, która rozchodzi się w kierunku prostopadłym do granicy ośrodków. Dzięki temu promieniowanie zostaje pochłonięte przez próbkę przylegającą do materiału. Następnie wiązka światła opuszcza kryształ i trafia do detektora. W przypadku spektroskopii ATR głębokość penetracji promieniowania jest bardzo mała i stosunkowo stała, nie ma więc problemów wywołanych przez krótką drogę wiązki promieniowania. Widma ATR można traktować jako złożenie widma refleksyjnego (odbiciowego) oraz absorpcyjnego. Korekcja ATR umożliwia wyodrębnienie części absorpcyjnej widma ATR.



Rysunek 7. Na rys. A ukazane jest zjawisko powstawania fali zanikającej, która przenika próbkę przylegającą próbkę do kryształu ATR, na rys. B pokazane jest całkowite wewnętrzne odbicie promieniowania w kryształ ATR

Zaletami spektroskopii w podczerwieni FTIR z wykorzystaniem, techniki ATR, które miały największy wpływ na moje badania są:



- szeroki zakres wielkości badanych cząsteczek: od roztworów cząsteczek organicznych do roztworów całych białek
- krótki czas pomiaru (przy 512 skanach w rozdzielczość 2 cm^{-1} pomiar trwa około 18 minut),
- niewielka ilość potrzebnej próbki (około $2\mu\text{l}$),
- niski koszt pomiaru,
- wypracowana w Katedrze Chemii Fizycznej PG metodyka obróbki i analizy widm.

W literaturze można znaleźć wiele przykładów wykorzystania spektroskopii w podczerwieni do obserwowania zmian w strukturze drugorzędowej białek pod wpływem zmian w ich otoczeniu [93–97]. Jednak jedyne doniesienia o wykorzystaniu tej techniki bezpośrednio do badania oddziaływań białko-osmolit w roztworze wodnych głównie pochodzą z Politechniki Gdańskiej [61,98,99].

W swojej pracy magisterskiej badałam oddziaływania w roztworach białka (HEWL) i glicyny i jej *N*-metylo podstawionych pochodnych. Pod wpływem osmolitu zawartego w wodnym roztworze, w strukturze białka pojawiały się pewne zmiany. Zmierzone widmo było więc wypadkową różnych konfiguracji białka w układzie i czyniło to widmo składową kilku elementów. Przyjęty przeze mnie model zakładał, że rozpuszczona cząsteczka (białko/osmolit) pod wpływem dodatku (osmolitu/białka) może przyjmować dwie postacie: białko/osmolitu niezaburzonego (ang. bulk) i zaburzonego [89]. Jak widać model ten można było analizować z dwóch stron, od strony białka, którego widmo jest zaburzone obecnością osmolitu, lub zmian zachodzących w osmolocie pod wpływem białka. Oba podejścia były stosowane w poprzednich pracach zespołów Katedry Chemii Fizycznej PG oraz moich, jednak zdecydowanie łatwiejszym w interpretacji było widmo osmolitu, ze względu na mały rozmiar cząsteczki i dużo łatwiejszą interpretację widm. Z powodu trudności w interpretacji widm cząsteczek białek powstał pomysł, by zastosować uproszczony model łańcucha polipeptydowego – cząsteczkę *N*-metyloacetamidu, NMA. O zasadności tego wyboru wspomniałam w rozdziale: Modele białek.

Podobne podejście eksperymentalne wykorzystałam do analizy problemu postawionego przede mną w niniejszej pracy. Równoległa analiza czynnikowa (PARFAC z ang. Parallel factor analysis) lub inaczej rozkład kanoniczny (CANDECOMP z ang. Canonical decomposition) są użyteczne do wyznaczenia czynników ze zbioru zmiennych w trzech lub więcej wymiarach. W przypadku danych otrzymanych z pomiarów spektroskopowych w podczerwieni układów woda-osmolit-NMA można wskazać trzy osie zmiennych: liczbę falową, stężenie molowe NMA, stężenie molowe osmolitu. Dodatkowy wymiar danych (oś stężenia drugiego składnika) narzuca ograniczenia na etapie izolacji czynników w przeciwieństwie do dwukierunkowej analizy czynników (lub PCA). Dzięki temu wyznaczone zostaną wiarygodne czynniki o znaczeniu fizycznym. Schemat tej metody przedstawiono na rysunku 8.



Wadami tej metody są jedynie:

- konieczność interpolacji widm do ustalonych stężeń,
- problem z wyznaczeniem liczby czynników składowych i istotnych, niosących za sobą ważne dla wyniku informacje.

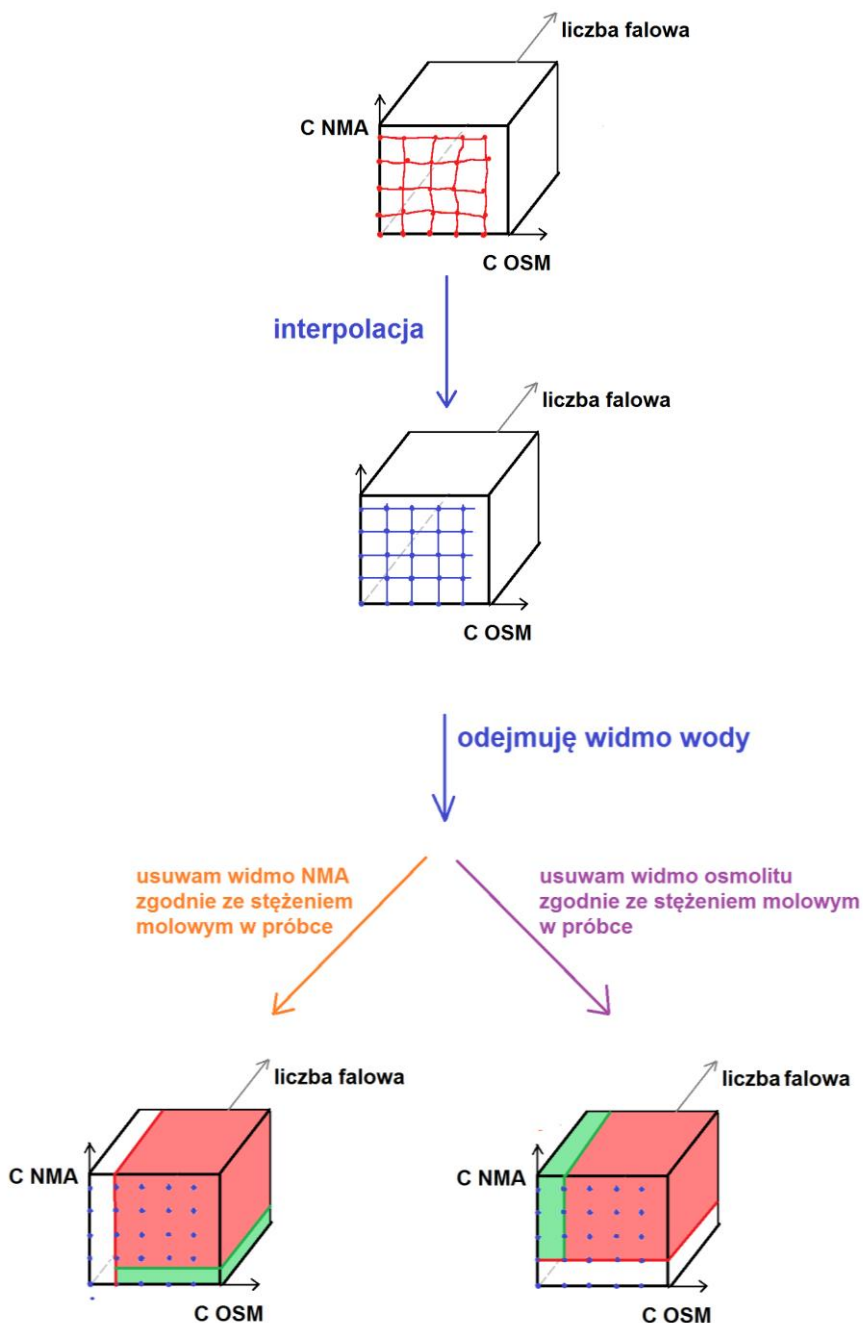
Zastosowanie interpolacji widm do określonych stężeń, w niektórych przypadkach, jest nawet korzystne. Podczas naważania występują pewne błędy i różnice w stężeniach przygotowanych próbek (np. w danej serii o zmiennym stężeniu NMA i stałym stężeniu osmolitu nigdy nie uda się uzyskać roztworów o tym samym stężeniu molowym osmolitu). Z tego powodu określa się jak najdokładniej stężenia każdego ze składników i interpoluje się widma do określonych stężeń. Dzięki tej procedurze zmniejsza się błędy pojawiające się w trakcie przygotowywania roztworów.

Drugi problem, związany z zastosowaniem metody PARAFAC, nie ma jednego słusznego rozwiązania i w literaturze podanych jest wiele sposobów na wyznaczenie liczby istotnych składowych widma. W przypadku widm IR liczba tych czynników może być określona na podstawie kształtu widm wyizolowanych składowych (wyizolowane czynniki mają znaczenie fizyczne i można je przedstawić w postaci widma). Proponuje się aby:

- 1) najpierw rozpocząć rozkład widma na 2 składowe,
- 2) rozkładać widmo na 3, 4 itd. składowe zwracając uwagę na wyniki z poprzedzającego kroku,
- 3) podział widma na coraz to większą liczbę czynników należy zakończyć jeśli z kolejną składową nie pojawiają się dodatkowe zmiany na widmie. Jeśli po wprowadzeniu kolejnych czynników, nie pojawiają się dodatkowe informacje lub są dublowane w kilku faktorach oznacza to, że ich liczba jest za duża.

Wstępnie można przewidzieć minimalną liczbę czynników, z których widmo powinno się składać. Wyizolowany zestaw zawiera jeden składnik (albo NMA albo osmolit). Jedna ze składowych odpowiadać będzie za jego niezaburzoną formę (np. niezaburzona część NMA), kolejna za formę tego składnika zaburzoną przez obecność większej ilości cząsteczek tego związku (np. widmo NMA zaburzone obecnością większej ilości cząsteczek NMA w układzie), dopiero trzecia i kolejne składowe obrazować będzie zmiany w strukturze tego związku wywołane oddziaływaniami z cząsteczkami innego rodzaju w roztworze (np. zmiany w widmie NMA wywołane oddziaływaniami z osmolitem). Oznacza to, że trzeci czynnik i ewentualne kolejne, zawierają najbardziej przydatne dla mnie informacje, czyli te o rodzaju i sile oddziaływań pomiędzy dwoma różnymi cząsteczkami chemicznymi.





Rysunek 8. Schemat przedstawiający zastosowanie metody PARFAC w analizie widm osmolit-NMA-woda. W wyniku usunięcia dwóch czynników: widma wody i widma NMA lub osmolitu, analiza jest bardziej szczegółowa. Należy pamiętać, że usunięcie tych czynników nie usuwa całej informacji o usuniętym związku. Z zielonych serii dostajemy widma zmienności czystych składników NMA lub osmolitu, a z czerwonych serii po analizie PARFAC otrzymujemy czynniki, które wskazują na regiony widm wrażliwe na oddziaływania w roztworze.



Jak zostało to wspomniane wyżej, widmo jednego z wyznaczonych czynników odpowiada wyłącznie zmianom w strukturze danego składnika związanym z obecnością innych cząsteczek tego składnik (widmo danego związku może się zmieniać wraz ze zmianą stężenia tego związku). Rozpoznanie tej składowej i odpowiadającej jej widmu nie powinno być problemem. Mając widma danego związku (o różnym stężeniu) w wodzie, odejmując udział rozpuszczalnika, można zaobserwować zmiany w widmie tego składnika spowodowane jego zwiększającym się stężeniem. W tym przypadku wyznaczyłam pochodną absorbancji molowej danego związku chemicznego po stężeniu tego związku dla każdej liczby falowej. Taka pochodna ma kształt widma i wskazuje na zmiany w serii widm spowodowane zwiększającym się stężeniem analizowanego składnika.

Równoległa analiza czynnikowa jest szybką metodą analizy danych, daje wiarygodne wyniki w postaci widm podobnych do widm różnicowych i przy zastosowaniu proponowanej metody wstępnej obróbki widm jest wrażliwa na nawet bardzo małe zmiany w strukturze cząsteczek, dlatego sprawdziła się w przypadku badanych przeze mnie wodnych układów NMA z dodatkiem osmoliu.

3.2. Analiza oddziaływań w układach trójskładnikowy na podstawie pomiarów gęstości i szybkości dźwięku w roztworach

Metodą komplementarną do analizy oddziaływań w układach trójskładnikowych przy wykorzystaniu spektroskopii IR są pomiary gęstości roztworu i szybkości rozchodzenia się w nim dźwięku. Precyzyjne pomiary densymetryczne i akustyczne pozwalają na obliczenie parametrów termodynamicznych dla analizowanego układu, które odzwierciedlają uśrednione oddziaływania wszystkich elementów roztworu. Opis układu trójskładnikowego wymaga obliczenia wybranych funkcji termodynamicznych w dwóch układach: z wodą i z dodatkiem wodnego roztworu wybranego związku chemicznego. Innymi słowy, przed analizą układów trójskładnikowych niezbędne jest zbadanie oddziaływań każdego elementu układu z wodą, czyli hydratacji osmoliu i cząsteczki białka/modelu białka.

W przypadku układów dwuskładnikowych (woda-osmoliu), dla roztworów NMA, glicyny tauryny, *N*-tlenku trimetyloglicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny parametry wolumetryczne i akustyczne wyznaczyłam w ramach pracy doktorskiej zaś dla roztworów *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika i *n*-butylomocznika wykorzystałam dane literaturowe [100,101].

Pomiary gęstości i szybkości rozchodzenia się dźwięku w roztworze nie dostarczają wprost informacji o oddziaływaniach występujących w układzie, ale zastosowanie prostego modelu matematycznego, może dać głębsze spojrzenie na strukturę stref solwatacyjnych.



Na podstawie literatury przedmiotu o hydratacji wybranych związków wiemy, że:

glicyna

- bardzo silnie oddziałuje z cząsteczkami wody, co spowodowane jest tym, że w roztworach wodnych występuje w formie jonu obojnaczego (tzw. zwitterion),
- w zależności od wybranej metody eksperymentalnej lub obliczeniowej wyznaczone liczby hydratacyjne i odległości między atomami różnią się, ale wskazują na powstawanie wiązań wodorowych między cząsteczkami glicyny i wody:
- środowisko solwatacyjne zawiera średnio 14,4 cząsteczek wody z czego 3,2 związanych jest z grupą amoniową, 6,1 z grupą metylową, 5,1 z karboksylową [102],
- z badań radialnej dystrybucji wodnego roztworu glicyny o stężeniu 5% molowych z wykorzystaniem pomiaru czasu przelotu dyfrakcji neutronowej wynika, że z grupą aminową skoordynowanych jest z $3,0 \pm 0,6$ cząsteczek wody. Odległości $r_{N \cdots O} = 2,85 \pm 0,05 \text{ \AA}$ i $r_{N \cdots D} = 3,25 \pm 0,05 \text{ \AA}$ sugerują, że tworzy się wiązanie wodorowe między tą grupą a najbliższymi jej cząsteczkami wody [103],
- pierwsza otoczka hydratacyjna zawiera około 5 cząsteczek wody [104],
- wykorzystując pomiary kalorymetryczne liczba hydratacyjna dla glicyny w formie zwitterionu wynosi $7 \pm 0,6$ cząsteczek wody [105].

N,N,N-trimetyloglicyna (betaina) [106]

- na wpływ struktury hydratacyjnej betainy ma wpływ tylko hydratacja grup metylowych i grupy karboksylowej,
- wiązanie wodorowe osmolitu z wodą tworzy grupa karboksylowa betainy,
- betaina jest w stanie wiązać znaczącą liczbę cząsteczek wody i jest dobrze hydratowana nawet w dużych stężeniach,
- warstwa wody otaczająca BET jest ciągła i otacza całą cząsteczkę.

tauryna [99]

- osłabia strukturę otaczającej jej wody,
- otoczona jest dwoma populacjami cząsteczek wody: (I) związanych słabymi wiązaniami wodorowymi w pobliżu grupy sulfonowej i (II) tworzących silne wiązania w pobliżu grupy aminowej,
- wzmocniona struktura wody wokół grupy aminowej wpływa na wzmocnienie się strefy hydratacyjnej białka (dla układów woda-tauryna-białko) i stabilizuje natywną formę białka.



N-tlenek trimetyloaminy (TMAO)

- amfifilowy charakter cząsteczki tworzącej jon obojnaczy silnie wpływa na strukturę i dynamikę otoczki hydratacyjnej,
- atom tlenu w cząsteczce TMAO tworzy średnio 3 wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, które pośrednio oddziałują z grupami metylowymi TMAO [107],
- z symulacji MD wyznaczona ogólna liczba hydratacyjna zawiera się w zakresie 24-16 (w zależności od stężenia związku) [108,109], z widm IR około 8,5 [110], a badania wolumetryczne wskazują tylko na 5,2 cząsteczki [111],
- według pomiarów spektroskopowych w podczerwieni każda grupa metylowa TMAO jest otoczona 4 cząsteczkami wody [112,113], według MD 7,1 cząsteczkami [109],
- nie ma zgody wśród naukowców co do tendencji wzrostowej lub spadkowej liczby cząsteczek wody związanych z tlenem z TMAO wraz ze zmianą stężenia osmolitu w roztworze [114,115],
- liczba wiązań wodorowych TMAO – cząsteczki wody wynosi od 3-4 [107,116] do 50 cząsteczek [117].

n-butyloamocznik

- związek hydratowany hydrofobowo, gdyż im dłuższa grupa alkilowa przyłączona do atomu azotu lub im więcej grup metylowych tym charakter cząsteczki pochodnej mocznika bardziej hydrofobowy [118],
- łańcuch alkilowy w cząsteczce jest relatywnie długi i możliwe jest utworzenie przez wodę struktury klatratopodobnej. Ze względu na elastyczność tej reszty i różnorodność jej konfiguracji, zmiana pozornej molowej objętości BU w roztworach wodnych wraz ze wzrostem stężenia nie jest proporcjonalna do rozmiaru grupy hydrofobowej w porównaniu do roztworu n-propylomocznika [101]

N,N,N',N'-tetrametyloamocznik

- przy stężeniach 0,012-0,025 ułamka molowego TMU w wodzie zachodzi jego agregacja, dodawaniu TMU do wody towarzyszy zmniejszanie się objętości roztworu i zwiększanie się oddziaływań pomiędzy składnikami [119],
- zmiany w granicznej pozornej molowej rozszerzalności (ang. limiting partial molar expansion) pokazują, że w niskich temperaturach otoczka hydratacyjna TMU jest mniej uporządkowana niż woda objętościowa, ale wraz ze wzrostem temperatury uporządkowanie wzrasta [120],
- symulacja rozkładu radialnego sugeruje wzmocnienie oddziaływań woda-woda i woda-TMU wraz z dodatkiem TMU,



- dynamika reorientacji cząsteczek wody bezpośrednio otaczającej część hydrofobową cząsteczki jest od 3 (przy niższych stężeniach TMU) do 10 razy (przy wyższych) wolniejsza, niż ma to miejsce w przypadku wody objętościowej. Efekt ten jest relatywnie krótkiego zasięgu, gdyż zaobserwowano go tylko dla 8-12 cząsteczek wody przypadających na jedną cząsteczkę TMU (przy stężeniach niższych niż 0,07 cząsteczki TMU na 1 cząsteczkę wody) [121],
- im wyższa temperatura tym udział hydratacji hydrofobowej jest niższy [121].

N-metyloacetamid (NMA) [79]

- badania roztworów wodnych NMA metodami spektroskopii w podczerwieni wykazały, że tylko 2-3 cząsteczki wody spośród około 30 obecnych w otoczeniu NMA jest zaburzonych przez obecność tego amidu,
- właściwości strukturalne i energetyczne wody w otoczeniu NMA w niewielkim stopniu różnią się od wody objętościowej (ang. „bulk”) i przypominają klatratopodobną klatkę wiązań wodorowych, charakterystyczną dla hydratacji hydrofobowej.

W literaturze temat badań układów trójskładnikowych zawierających cząsteczki modelowe białka za pomocą pomiarów densymetrycznych i wolumetrycznych nie jest szeroko poruszany. Odnaleźć można publikację analizującą układ zawierający glicynę w wodnych roztworach: formamidu, *N*-metyloformamidu (NMF), *N,N*- dimetyloacetamidu (DMA) [122–124]. Pomiaru te są jednak ograniczone do jednej temperatury $T=298,15\text{K}$ i skupiają się tylko na właściwościach wolumetrycznych wyprowadzonych na podstawie pomiarów gęstości. Wynika z nich, że dominujące są oddziaływania hydrofilowe między naładowaną grupą aminokwasu i grupą $-\text{CONH}-$ w NMF/ DMA, a glicyna posiada własności do zaburzania struktury rozpuszczalnika zawierającego DMF i własności te wzmacniają się wraz ze wzrostem stężenia DMF.

Informacje dotyczące objętości i ściśliwości cząsteczek w wodzie są źródłem istotnych danych o strukturze roztworów, sposobie i stopniu solwatacji. Entalpia swobodna (G) powiązana jest z objętością (V) według poniższego wzoru:

$$\left(\frac{\delta G}{\delta P}\right)_T = V \quad (9)$$

Dla układów otwartych zależność ta przyjmuje postać:

$$\left(\frac{\delta \mu_i}{\delta P}\right)_T = \bar{V} \quad (10)$$

gdzie \bar{V} to cząstkowa molowa objętość, a μ_i to potencjał chemiczny (cząstkowa molowa entalpia swobodna), czyli najważniejsza wielkość spośród cząstkowych molowych funkcji termodynamicznych. Wielkość \bar{V} można oszacować wyznaczając pozorną objętość molową.



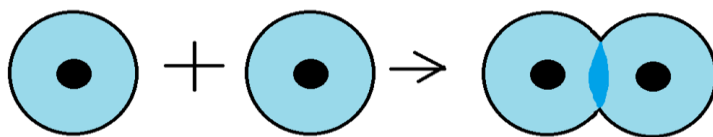
Pozorna objętość molowa, V_ϕ , to różnica między objętością roztworu i rozpuszczalnika przypadająca na 1 mol substancji rozpuszczonej. W praktyce V_ϕ oblicza się na podstawie gęstość roztworu, d , gęstości rozpuszczalnika, d_0 , molalności, m i masy molowej substancji rozpuszczonej, M na podstawie wzoru:

$$V_\phi = \frac{M_2}{d} - \frac{d - d_0}{m d d_0} \quad (11)$$

Pozorna objętość molowa może przyjmować zarówno ujemne jak i dodatnie wartości, ponieważ substancja rozpuszczona wpływa na strukturę rozpuszczalnika, co skutkuje wzrostem lub zmniejszeniem jego objętości. Wielkość ta jest funkcją stężenia, dla substancji organicznych na ogół prostoliniową w odpowiednich przedziałach stężeń, co można wyrazić wzorem:

$$V_\phi = V_\phi^0 + S_V m \quad (12)$$

Wartość granicznej pozornej objętości molowej V_ϕ^0 jest między innymi miarą oddziaływań w roztworze nieskończenie rozcieńczonym, czyli dostarcza informacji o oddziaływaniach rozpuszczalnik – substancja rozpuszczona i rozpuszczalnik – rozpuszczalnik (w sferze solwatacyjnej) i jest równa cząstkowej objętości molowej substancji rozpuszczonej V^0 . Współczynnik kierunkowy w zależności (12), S_V , jest miarą oddziaływań między cząsteczkami substancji rozpuszczonej. W dwuskładnikowych roztworach wodnych dodatnie wartości współczynnika empirycznego, S_V , wskazują na dominujące oddziaływania hydrofilowe, ujemne na hydrofobowe, między cząsteczkami substancji rozpuszczonej. Nakładanie się warstw hydratacyjnych substancji rozpuszczonej, które prowadzi do zmniejszenia się V_ϕ^0 i ujemnej wartości parametru S_V , ukazane jest schematycznie na rysunku 9.



Rysunek 9. Zmniejszanie się granicznej pozornej molowej objętości w wyniku nakładania się warstw hydratacyjnych cząsteczek substancji rozpuszczonej.

Pozorna molowa objętość, V_ϕ , zmienia się wraz z temperaturą. W przypadku prostych związków organicznych prawie zawsze obserwuje się wzrost V_ϕ ze wzrostem temperatury. Wpływ temperatury na graniczną molową pozorną objętość V_ϕ^0 można opisać funkcją wielomianową, której równanie zależy od analizowanego przedziału temperatur. Im większy przedział, tym równanie bardziej skomplikowane. W większości przypadków przyjmuje postać funkcji wielomianowej drugiego stopnia:



$$V_{\phi}^0(T) = a_0 + a_1(T - 298,15) + a_2(T - 298,15)^2 \quad (13)$$

gdzie a_0, a_1, a_2 to współczynniki wirialne, a T jest temperaturą w K.

Graniczna cząstkowa molowa rozszerzalność, $E_{\phi}^0(T)$, jest pierwszą pochodną V_{ϕ}^0 po temperaturze, co można wyrazić zależnością (14) otrzymaną na podstawie (13)

$$E_{\phi}^0(T) = a_1 + 2a_2(T - 298,15) \quad (14)$$

Ze względu na wąski na ogół zakres analizowanych temperatur wewnętrzna rozszerzalność substancji rozpuszczonej może być pominięta i wartość $E_{\phi}^0(T)$ odzwierciedla głównie wpływ temperatury na objętość najbliższego otoczenia cząsteczki substancji rozpuszczonej.

Druga pochodna V_{ϕ}^0 po temperaturze jest często używana jako kryterium przypisania charakteru własności dalekiego zasięgu tj. wzmacniających lub burzących strukturę rozpuszczalnika przez substancję rozpuszczoną. Wartość tą wyprowadzono na podstawie zależności termodynamicznych pomiędzy cząstkową molową pojemnością cieplną i cząstkową molową objętością, zgodnie ze wzorem:

$$\left(\frac{\partial \bar{C}_p^0}{\partial P}\right)_T = -T \left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_P = -T \left(\frac{\partial E_{\phi}^0}{\partial T}\right)_P \quad (15)$$

Wykorzystując równanie 14 obliczyłam parametr $(\delta^2 V_{\phi}^0 / \delta T^2)_P$ z prostej zależności:

$$\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_P = 2a_2 \quad (16)$$

Parametrem, który opisuje zmiany objętości cieczy lub ciała stałego pod wpływem zmian ciśnienia jest ściśliwość. W przemianie adiabatycznej zdefiniowana jest za pomocą wzoru:

$$\kappa_S = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_S \quad (17)$$

gdzie V jest objętością, p - ciśnieniem, S jest entropią.

Znając gęstość, d , i szybkość dźwięku, u można obliczyć z równania Laplace'a ściśliwość adiabatyczną rozpuszczalnika $\kappa_{s,0}$ i roztworu κ_s korzystając ze wzoru:

$$\kappa_s = \frac{1}{u^2 d} \quad (18)$$

W analizowanych przeze mnie zakresach stężeń ściśliwość roztworów maleje liniowo ze wzrostem molalności, m , co można wyrazić wzorem:

$$\kappa_s = \kappa_{s,0} + A_K m \quad (19)$$

Wyznaczone parametry κ_s i $\kappa_{s,0}$ z równania odpowiednio 18 i 19 wykorzystuje się między innymi do obliczenia liczb hydratacyjnych zgodnie z równaniem Passynskiego, uwzględniając liczbę moli rozpuszczalnika n_0 i substancji rozpuszczonej, n

$$S_n = \left(1 - \frac{\kappa_s}{\kappa_{s,0}}\right) \cdot \frac{n_0}{n_1} \quad (20)$$



Liczba hydratacyjna, S_n definiowana jest jako liczba cząsteczek wody zlokalizowanych w dowolnie określonej odległości od cząsteczki substancji rozpuszczonej. Inna definicja mówi, że jest to średnia liczba cząsteczek wody, które są zaangażowane w oddziaływania pomiędzy substancją rozpuszczoną a rozpuszczalnikiem, czego wynikiem są obserwowalne zmiany we właściwościach fizycznych rozpuszczalnika. Dla metod akustycznych własnością tą jest zazwyczaj ściśliwość. Aby obliczyć liczby hydratacyjne w nieskończone rozcieńczonym roztworze S_n^0 , korzysta się ze wzoru:

$$S_n^0 = \lim_{n_1 \rightarrow 0} S_n = - \left(\frac{\partial \kappa_s}{\partial x_1} \right) \cdot \frac{1}{\kappa_{s,0}} \quad (21)$$

gdzie x_1 oznacza ułamek molowy substancji rozpuszczonej.

Kolejnym wyznaczanym parametrem jest pozorna molowa ściśliwość adiabatyczna $K_{S,\phi}$.

Definiuje się ją za pomocą wzoru:

$$K_{S,\phi} = - \left(\frac{\partial V_\phi}{\partial P} \right)_S \quad (22)$$

$K_{S,\phi}$, pozorną molową ściśliwość adiabatyczną w praktyce wyznacza się na podstawie wzoru:

$$K_{S,\phi} = \frac{(\kappa_s d_o - \kappa_{s,0} d)}{m d d_0} + \frac{M \kappa_s}{d} \quad (23)$$

Wielkość ta jest funkcją stężenia, dla substancji organicznych na ogół prostoliniową w odpowiednio wąskich przedziałach stężeń, co można wyrazić wzorem:

$$K_{S,\phi} = K_{S,\phi}^0 + S_k m \quad (24)$$

$K_{S,\phi}^0$ jest graniczną pozorną molową ściśliwością adiabatyczną, S_k – empirycznym parametrem.

Graniczna pozorna molowa ściśliwość adiabatyczna odzwierciedla oddziaływania pomiędzy substancją rozpuszczoną a rozpuszczalnikiem. Dla substancji organicznych graniczna pozorna molowa objętość przyjmuje zawsze wartości dodatnie, a graniczna pozorna molowa ściśliwość adiabatyczna może być dodatnia, ujemna lub bliska zeru. Z tego powodu wartości $K_{S,\phi}^0$ mają duże znaczenie w opisie oddziaływań w układzie.

Dotychczasowe badania wyraźnie wskazują, że w układach dwuskładnikowych właściwości sfery hydratacyjnej mogą być scharakteryzowane 4 parametrami:

- zmianami pozornej objętości molowej substancji rozpuszczonej ze zmianą jej stężenia,
- różnicą pomiędzy standardową pozorną objętością molową substancji rozpuszczonej, a jej objętością własną,
- standardową cząstkową ściśliwością molową substancji rozpuszczonej,
- zależnością temperaturową standardowej cząstkowej ściśliwości molowej.



Powyższe parametry pozwalają rozróżnić oddziaływania hydrofilowe, hydrofobowe czy zdolności do zaburzenia struktury wody przez analizowaną cząsteczkę [125].

Dla układów trójskładnikowych można również wykorzystać powyższe wzory i zależności traktując:

- osmolit jako substancję rozpuszczoną, a wodny roztwór NMA jako rozpuszczalnik - I podejście ,
- NMA jako substancję rozpuszczoną, a wodny roztwór osmolitu jako rozpuszczalnik- II podejście.

Dzięki porównaniu parametrów uzyskanych w wyniku obrania podejścia I z wynikami dla osmolitu w wodzie, możliwe jest wyznaczenie wpływu NMA na cząsteczkę osmolitu. Analogicznie, porównując parametry otrzymane w podejściu II z wynikami dla NMA w wodzie, możliwe jest wyznaczenie wpływu osmolitu na cząsteczkę NMA. Do opisu układów trójskładnikowych posłużą mi standardowe funkcje przeniesienia. Dla dowolnej funkcji F , funkcje przeniesienia $\Delta_t F^0$ z czystej wody (W) do wody z dodatkiem (W+D) można wyrazić wzorem:

$$\Delta_t F^0 = F(W + D) - F(W) \quad (25)$$

Funkcja przeniesienia odpowiada zmianie danego parametru w wyniku procesu przeniesienia 1 mola substancji z nieskończonego rozcieńczonego roztworu (W) do układu zawierającego (W+D). Dla roztworów najczęściej wyznacza się funkcje przeniesienia entalpii ($\Delta_t H^0$), entropii ($\Delta_t S^0$), energii Gibbsa ($\Delta_t G^0$) oraz objętość $\Delta_t V_\phi^0$ i ściśliwości $\Delta_t K_{S,\phi}^0$. Wyznaczone wartości odzwierciedlają wpływ dodatku (D) na omawianą wartość wyznaczaną dla substancji rozpuszczonej.

Chcąc zbadać wpływ NMA na pozorną objętość molową i pozorną molową ściśliwość adiabatyczną wybranych osmolitów w ramach prowadzonych badań wyznaczać będą funkcję przeniesienia granicznej pozornej molowej objętości, $\Delta_t V_\phi^0$, i granicznej adiabatycznej pozornej molowej ściśliwości $\Delta_t K_{S,\phi}^0$.

Dla badanych układów zawierających rozpuszczalnik (który stanowi wodny roztwór NMA) i substancję rozpuszczoną, wyznacza się standardowe cząstkowe objętości przeniesienia substancji rozpuszczonej, $\Delta_t V_\phi^0$, z wody do wodnego roztworu NMA. Oblicza się go na podstawie wyznaczonych wartości V_ϕ^0 osmolitu w roztworze NMA i w wodzie według wzoru:

$$\Delta_t V_\phi^0 = V_\phi^0(\text{roztwór NMA}) - V_\phi^0(\text{woda}) \quad (26)$$

Analogicznie można wyznaczyć wartości granicznych pozornych molowych ściśliwości adiabatycznych przeniesienia osmolitu z wody do wodnych roztworów NMA:

$$\Delta_t K_{S,\phi}^0 = K_{S,\phi}^0(\text{roztwór NMA}) - K_{S,\phi}^0(\text{woda}) \quad (27)$$



McMillan i Mayer w swojej pracy dotyczącej stanów równowagi termodynamicznej w ciekłych roztworach udowodnili, że wszystkie wielkości termodynamiczne roztworu wieloskładnikowego można opisać równaniem wirialnym (w postaci szeregu potęgowego) dla stężenia jednego ze składników układu [126]. W tym przybliżeniu kolejne współczynniki wirialne odpowiadają współczynnikom oddziaływania w grupach zawierających coraz większą ilość cząsteczek poczynając od układu złożonego z 2-ch różnych cząsteczek roztworu. W przypadku wielkości wolumetrycznych i akustycznych najczęściej wykorzystuje się przybliżenie McMillan'a i Mayer'a dla granicznych cząstkowych (pozornych) objętości molowych przeniesienia z układu 2-składnikowego do układu trójskładnikowego oraz dla granicznych cząstkowych (pozornych) adiabatycznych molowych ściśliwości w analogicznych układach według wzoru:

$$\Delta_t Y^0 = 2y_{AB}m_B + 3y_{ABB}m_B^2 + 4y_{ABBB}m_B^3 \dots \quad (28)$$

W przypadku układów trójskładnikowych indeksy A i B odnoszą się kolejno do substancji rozpuszczonej i do substancji obecnej w roztworze rozpuszczalnika (w moich badaniach jest to NMA), a y_{AB} , y_{ABB} , y_{ABBB} opisują kolejno współczynniki oddziaływań w układach podwójnych (AB), potrójnych (ABB) i poczwórnych (ABBB). Do przeprowadzenia obliczeń wymagane jest wyznaczenie wartości $\Delta_t Y$ dla kilku różnych stężeń substancji wchodzącej w skład rozpuszczalnika.

Funkcje przeniesienia wyrażone wzorem 28, mogą zawierać nieskończoną liczbę członów, przy czym im wyższy stopień wielomianu, tym wkład tego członu mniej istotny. Do opisu badanych układów najczęściej wykorzystywane są równania kwadratowe i sporadycznie trzeciego stopnia. W przypadku badanych przeze mnie układów $\Delta_t K_S^0$ było przedstawiane za pomocą wielomianu drugiego stopnia (równanie 29), zaś w przypadku $\Delta_t V_\phi^0$: drugiego dla TMAO (równanie 30) i trzeciego dla pozostałych osmolitów (równanie 31).

$$\Delta_t K_S^0 = 2k_{AB}m_B + 3k_{ABB}m_B^2 \quad (29)$$

$$\Delta_t V_\phi^0 = 2v_{AB}m_B + 3v_{ABB}m_B^2 \quad (30)$$

$$\Delta_t V_\phi^0 = 2v_{AB}m_B + 3v_{ABB}m_B^2 + 4v_{ABBB}m_B^3 \quad (31)$$

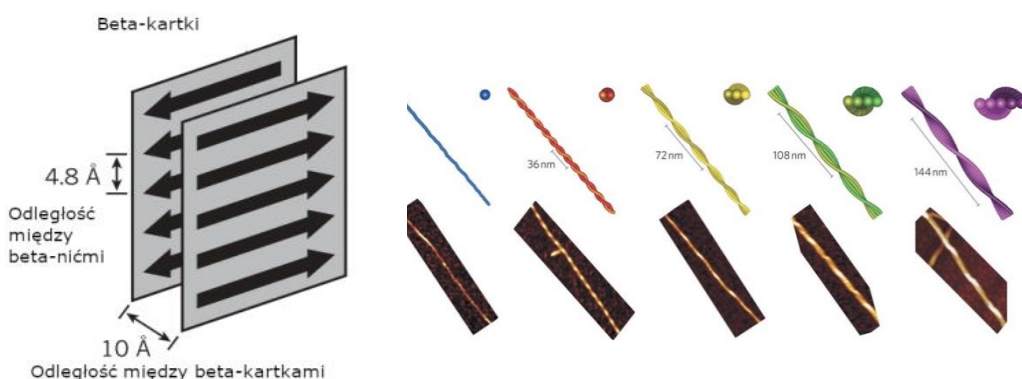
Powyżej przedstawiłam podstawy teoretyczne dotyczące badań oddziaływań w układach trójskładnikowych woda-osmolit-model łańcucha białkowego z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni i metod wolumetryczno-akustycznych. Są to układy ważne, gdyż być może zależności w nich panujące przekładają się na układy bardziej skomplikowane, co zamierzam sprawdzić.



3.3. Badanie wybranych aspektów formowania się włókien amyloidowych

Jednym w procesów, w którym białko ulega modyfikacji strukturalnej, jest proces tworzenia się amyloidów z białka natywnego. Jest to proces samorzutny, ale wpływ na jego przebieg i morfologię powstałych amyloidów mają na przykład osmolity [127–132].

Amyloid to określony typ wydłużonego, nierozgałęzionego włókna białkowego. Złożony jest z wielu (często tysięcy) uporządkowanych, powielonych motywów strukturalnych peptydu. Na powtarzającą się jednostkę składają się fragmenty, które mają strukturę β -kardki (inaczej β -harmonijek), z których każda zawiera tysiące identycznych β -nici ułożonych równolegle w odległości ok 4,8 Å (patrz rys. 10). Dwie β -kardki odległe są od siebie o około 6–12Å. Różnice w morfologii włókien przejawiają się głównie w ich długości (od kilkuset nanometrów do kilku mikrometrów), grubości (7–10nm) czy skręcenia spiralnego (rys. 10) [133–136].



Rysunek 10. Po lewej: włókno amyloidowe złożone z beta-nici, po prawej: włókna amyloidowe powstałe z beta-laktoglobuliny, różniące się ilością skręconych ze sobą beta-nici.

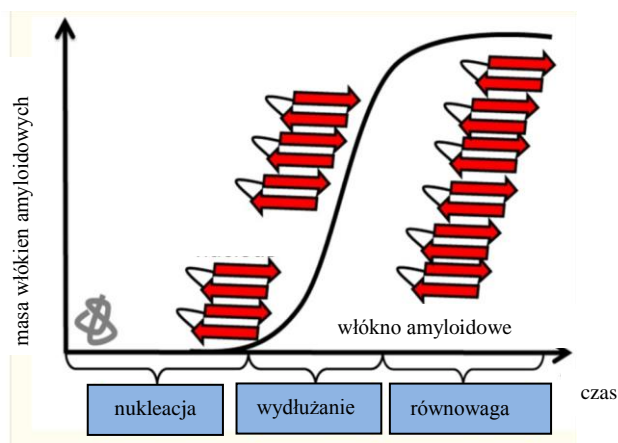
Zainteresowanie zjawiskiem powstawania amyloidów z łańcuchów polipeptydowych w ostatnim czasie gwałtownie zwiększyło się, stając się jednym z głównych tematów badań naukowców różnych dziedzin. Nagły wzrost ilości badań poświęconym temu zagadnieniu wynika m.in. z :

- powiązania tworzenia się amyloidów z chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak choroba Alzheimer'a, ale również innymi np. cukrzyca typu II [137];
- potrzeby poznania mechanizmu formowania się amyloidów, jako jednej z form białka, co przyczyni się do zwiększenia wiedzy dotyczącej natywnych form białek i peptydów;
- możliwości stworzenia nowej strategii leczenia;



- chęci pozyskania nowych nanomateriałów z innowacyjnymi i potencjalnie przydatnymi właściwościami [138].

Medyczne i biologiczne znaczenie amyloidów jest znane od dawna, ale nowością jest zastosowanie amyloidów w tworzeniu nowych materiałów. Na przykład włókna amyloidowe mogą pełnić rolę katalitycznego rusztowania, które przyspiesza przebieg reakcji biochemicznych, środka transportującego lub magazynującego, który zawiera lub przekazuje informacje genetyczne albo hormony [138]. Naukowcy z Cambridge pokazali, że cienka warstwa z fibryli amyloidowych jest nie tylko biologicznie kompatybilna, ale też porównywanie wytrzymała mechanicznie z warstwami stworzonymi z keratyny [139]. Proces tworzenia się włókien/agregatów jest powiązany z procesem rozpuszczania się białek. Rozpuszczalność peptydów zależy natomiast od ich struktury. Powyżej granicy rozpuszczalności peptydy wytrącają się w postaci kryształów, włókien albo amorficznych agregatów. Ze względu na morfologię wyróżnia się dwa typy agregatów: uporządkowane (amyloidy bogate w struktury beta) i nieuporządkowane (amorficzne). Udowodniono, że częściowe rozwinięcie struktury natywnej może prowadzić do tworzenia się form uporządkowanych. Struktury przejściowe, pojawiające się podczas procesu częściowego rozwinięcia, mają wyeksponowane na zewnątrz fragmenty hydrofobowe. W komórce, w roztworze wodnym hydrofobowe fragmenty przyciągają się prowadząc do utworzenia się amyloidów. Proces powstawania amyloidów można podzielić na 3 główne fazy: fazę nukleacji, eleongacji i saturacji [140]. W fazie nukleacji monomery ulegają zmianom strukturalnym i łączą się tworząc oligomery. Następnie oligomery te ulegają szybkiemu wzrostowi poprzez dodatek do nich kolejnych monomerów. Faza nukleacji jest niekorzystna energetycznie i zachodzi stopniowo, natomiast faza wydłużania jest procesem korzystniejszym energetycznie i zachodzi szybciej. Krzywa kinetyczna tworzenia się amyloidu może być przybliżona krzywą sigmoidalną (patrz rysunek



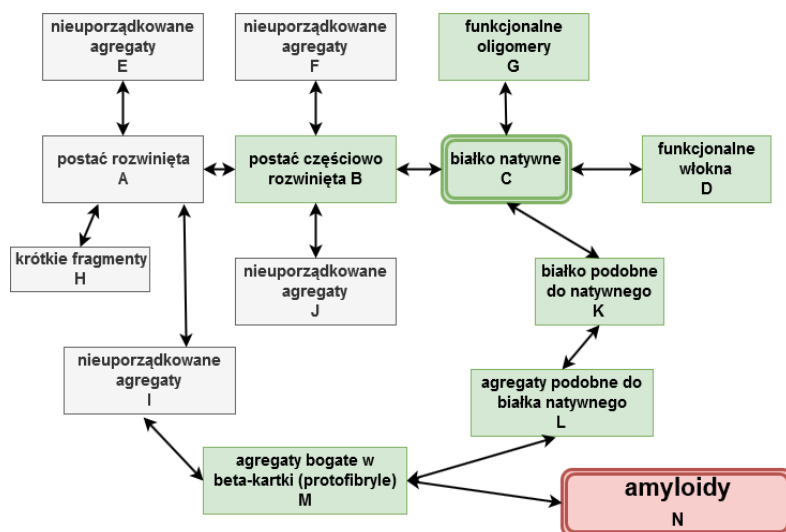
Rysunek 11. Wykres przedstawiający wzrost masy włókien w poszczególnych fazach amyloidogenezy. Kinetyka tworzenia się amyloidu może być przybliżona krzywą sigmoidalną [193].



11). Po początkowym wolnym wzroście włókien następuje nagły wzrost ich ilości i długości, zakończony fazą wysycenia, gdzie długość i ilość włókien jest już praktycznie stała.

Przekształcenie się białka z jego stanu natywnego we włókno amyloidowe następuje poprzez liczne stany przejściowe według różnych mechanizmów, co zostało przedstawione na rys 13. Z reguły, zwinięte białko musi się rozwinąć, co najmniej częściowo, tak by powstała postać częściowo rozwinięta (B) lub całkowicie rozwinięta (A) [141–143]. Struktury rozwinięte są amyloidogenne ze względu na odsłonięcie grup hydrofobowych z łańcucha głównego, które w stanie natywnym schowane są we wnętrzu białka i oddziałują ze sobą w stanie zwiniętym (rys. 14). Wczesne oligomery są z reguły nieuporządkowane, giętkie, mało stabilne, nie zawierają struktury bogatej w beta-kartki, którymi charakteryzują się amyloidopodobne oligomery (protofibryle M). Bez względu na ścieżkę powstania amyloidu, początkowe agregaty mają zawsze te same cechy konformacyjne i nie wiążą się z barwnikami np. ThT, co świadczy o braku beta-kartek w ich strukturze. Wraz z postępem agregacji (np. ścieżka B→J→M na rysunku 13) oligomery przekształcają się w formy stabilizowane beta kartkami (protofibryle – M).

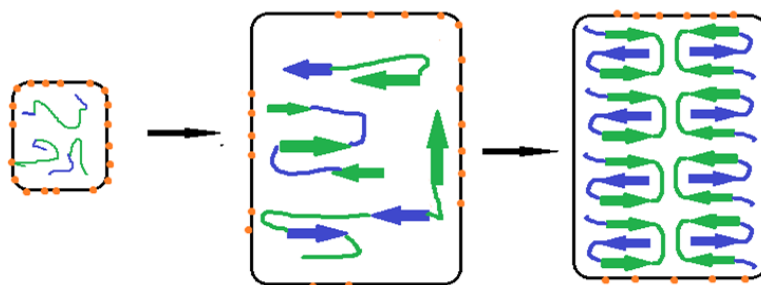
Reorganizacja ta obejmuje zwiększenie rozmiaru, stabilności, upakowania, zwiększenie regularności występowania beta-kartek. Oligomery pre-amyloidowe pełnią rolę „związków” do tworzenia się włókien, które powstają poprzez dołączenie się kolejnego monomeru lub oligomeru pre-amyloidowego, rozrastając się. Opisana wyżej, najbardziej prawdopodobna ścieżka reprezentowana jest przez symbole C→A/B→I/J→M→N na rysunku 13.



Rysunek 12. Schemat powstawania amyloidów z białka natywnego na podstawie [141].



Istnieją doniesienia, że osmolity mają duży potencjał do tłumienia (lub zahamowania) błędnego pofałdowania, a co za tym idzie możliwości powstawania włókien białkowych. W literaturze przedmiotu udokumentowane jest zastosowanie osmolitów jako środków terapeutycznych do leczenia kilku chorób związanych z błędnie pofałdowanym białkiem [144–146]. Warto zaznaczyć, że niektóre osmolity przyspieszają powstawanie włókien lub agregatów z wybranych peptydów. Jednym z białek podatnych na agregację jest lizozym, który wykorzystałam w swoich badaniach.



Rysunek 13. Schemat przedstawiający zmniejszające się odsłonięcie struktur hydrofobowych dla rozpuszczalnika przypadające na liczbę monomerów w procesie tworzenia się włókien amyloidowych. Fragmenty hydrofobowe zaznaczone na zielono, hydrofilowe na niebiesko, pomarańczowe punkty wskazują na ekspozycję części hydrofobowych cząsteczki wobec rozpuszczalnika wraz z postępującym procesem amyloidogenezy na podstawie [194]

Zgodnie z moją wiedzą dane literaturowe dotyczące wpływu wykorzystanych przeze mnie osmolitów tj.: glicyny, *N,N,N*-trimetyloglicyny, *n*-butylomocznika i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika na proces formowania się amyloidów z lizozymu są bardzo ograniczone. W pracach [147,148] stwierdzono, że glicyna ma bardzo mały wpływ na formowanie się włókien z HEWL i wykazuje właściwości lekko hamujące amyloidogenezę lizozymu. W publikacji dotyczącej wpływu prolina na agregację HEWL można natomiast znaleźć fragment, w którym autorzy przedstawiają dane, z których wynika, że glicyna nie hamuje agregacji rozfałdowanego lizozymu [149]. W literaturze poruszany jest szerzej wpływ osmolitów takich jak TMAO, prolina, glicerol i prostych węglowodanów na ten proces.

Udowodniono, że osmolity takie jak sarkozyna, prolina, TMAO i 4-hydroksy-L-prolina hamują powstawanie włókien z lizozymu [150]. Sarkozyna i 4-hydroksyprolina znacząco wydłużają początkowy etap elongacji. W obecności TMAO zauważono większe prawdopodobieństwo powstania amorficznych agregatów. Badania pokazują, że osmolity oddziałują z białkiem na etapie nukleacji i wydaje się, że etap ten jest kluczowym w zahamowaniu powstawania włókien. Inny zespół wykazał, że TMAO i glicerol przyspieszają

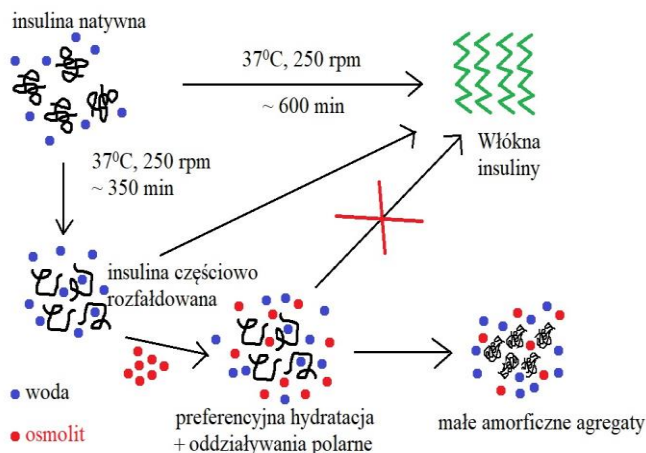
przemiany struktury nieuporządkowanej w struktury beta-kartek, co jest niezbędne do wytworzenia się włókien [130] i co nie jest zgodne z [150]. Tej zmianie towarzyszy natychmiastowe przekształcenie się amorficznych agregatów w jednolite globularne i zdolne do nukleacji struktury. Zmiany w hydratacji β -amyloidów wpływają również na końcowe etapy tworzenia się amyloidów i sprzyjają pośredniemu przekształceniu się protofibrili (protowłókien) w dojrzałe włókna obserwowane *in vivo*. Sugeruje się, że osmolity mogą, przynajmniej częściowo, regulować formowanie się amyloidów poprzez stabilizowanie niskoenergetycznych konformerów, które są niezbędne w szlaku amyloidogennym. Jest to zgodne z obserwacją, że naturalnie występujące osmolity organiczne hamują przemianę komórkowego białka prionowego (PrP^c) w proteazooporne i tworzące amyloidy białko PrP^{SC} związanego z chorobami encefalopatycznymi. Podobną stabilizację nieprawidłowo sfałdowanych zmutowanych białek transbłonowych w retikulum endoplazmatycznym przez glicerol zaobserwowano dla transportera chlorków związanego z mukowiscydozą [151,152] i akwaporynami powiązanych z cukrzycą nerczycową [153].

Powyższe informacje mogą potencjalnie zostać wykorzystane do stworzenia lub rozwinięcia modeli komórkowych agregacji β -amyloidów i oceny czynników modulujących tworzenie się włókien. Terapia trehalozą okazała się sukcesem w przypadku odwrócenia efektów agregacji huntingtyny w transgenicznym mysim modelu choroby Huntingtona [146]. Największe sukcesy odniesiono w leczeniu chorób takich jak moczówka prosta nerkowa, rozedma płuc i przewlekła choroba wątroby [153]. Większość do tej pory zbadanych węglowodanów wykazuje właściwości wzmacniania fibrylogenezy albo na etapie powstawania dojrzałych włókien albo poprzez zwiększenie ilości zarodków nukleacji, ale są również takie, które ten proces hamują.

Prowadzone są też badania ukazujące, że ektoina, betaina, trehaloza i cyrulina hamują tworzenie się amyloidów z insuliny [154]. Zjawisko to wiąże się z połączeniem efektu zwiększenia się napięcia powierzchniowego roztworu z preferencyjną hydratacją monomerów insuliny w obecności osmolitów, co przedstawione jest na rysunku 12.

Zdolność do opóźnienia wystąpienia i spowolnienia procesu fibrylacji insuliny ma również prolina, która w tym procesie jest skuteczniejsza od betainy i cyruliny [155]. Choć wiadomo, że osmolity kompatybilne stabilizują stan natywny, wyniki wskazują na destabilizujący wpływ prolina na częściowo zwinięte struktury i wczesne agregaty. W eksperymencie tym dodatkowo stwierdzono również, że osmolity są najskuteczniejsze w zapobieganiu fibrylacji insuliny, jeśli są dodawane przed rozpoczęciem fazy wydłużania.





Rysunek 14. Schemat mechanizmu hamowania powstawania włókien amyloidowych insuliny w obecności wybranych osmolitów zaproponowany w [154].

3.3.1. Techniki pomiarowe wykorzystane w badaniu procesu powstawania włókien

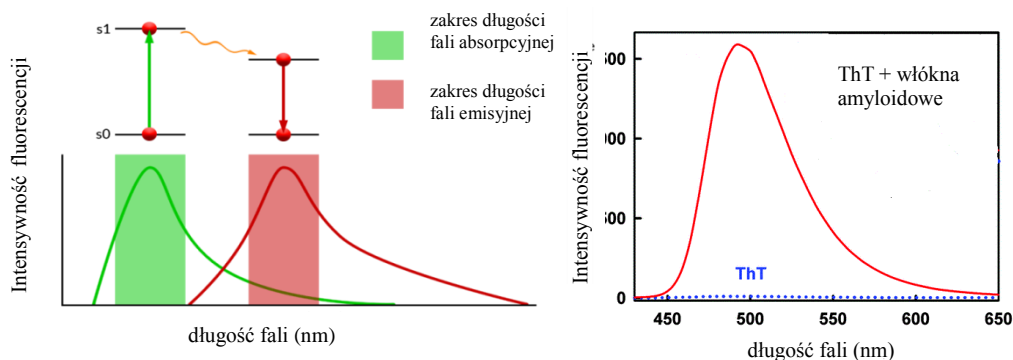
Złożony proces agregacji białka i tworzenia się włókien amyloidowych wymaga rozwinięcia pakietu prostych technik badawczych, które pozwolą na wykrycie zmian strukturalnych w różnych formach białka. Właściwości strukturalne i fizykochemiczne agregatów najczęściej bada się z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej, spektroskopii dichroizmu kołowego, spektroskopii w podczerwieni, dynamicznego i statycznego rozproszenia światła, transmisyjnej mikroskopii elektronowej lub mikroskopii sił atomowych. W badaniach *in vitro* najpopularniejszymi technikami do stwierdzenia obecności włókien amyloidowych są spektroskopia fluorescencyjna przeprowadzona w obecności tioflawiny T, spektroskopia UV-VIS z czerwienią Kongo, transmisyjna mikroskopia elektronowa i spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera. Techniki te nie są nowe, ale dla prostych i dobrze poznanych procedur znaleziono nowy obszar badań. W naszych pomiarach zastosowaliśmy typowe techniki pomiarowe takie jak: dichroizm kołowy, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia fluorescencyjna, elektroforeza peptydowa SDS-PAGE i badanie rozproszenie światła przez makrocząsteczki.

A) Spektroskopia fluorescencyjna

Fluorescencja jest zjawiskiem emitowania światła przez wzbudzony atom lub cząsteczkę, w którym światło wyemitowane jest o mniejszej energii niż wzbudzające, czyli absorbowane przez atom (rys. 15). Intensywność fluorescencji (przy niskich stężeniach) jest



proporcjonalna do stężenia substancji emitującej. Przy wyższych stężeniach charakterystyczne jest zjawisko autowygaszania i nie jest zachowana liniowość zależności intensywności fluorescencji od stężenia. Spektroskopia wykorzystuje fluorescencję bezpośrednią cząsteczki lub wskaźnika, który wiąże się ze specyficznymi fragmentami badanej cząsteczki. Fluorescencja własna białka jest słaba, gdyż tylko dwa aminokwasy – tryptofan i tyrozyna wykazują właściwości fluorescencyjne w zakresie fali wzbudzenia 280-290 nm. W moich badaniach wykorzystuję wskaźnik: tioflawinę T (ThT). Barwnik ten wiąże się z domenami bogatymi w beta-kartki, wykazując fluorescencję. Cząsteczka ta należy do grupy rotorów molekularnych. Oznacza to, że jej wzbudzenie jest powiązane z wewnątrz molekularną rotacją, która generuje transfer ładunku z części donorowej do części akceptorowej. Wzrost fluorescencji następuje, gdy cząsteczka tioflawiny T ma utrudnioną rotację, co ma miejsce w środowisku o wysokiej lepkości bądź, gdy zwiąże się ze sztywnym układem np. włóknem amyloidowym [156]. ThT jest często używana do obserwowania kinetyki tworzenia się oligomerów, choć stosowane są też inne barwniki takie jak: DCV – [4-(dicyjanowinylo) julolidyna] czy FE – [4-(dietyloamino) – 3- hydroksyflawon [157–160]. W moich badaniach fluorymetria wykorzystywana jest do badania zmian w intensywności fluorescencji wraz z przebiegiem procesu fibrylacji w próbkach białka zawierających różne osmolity. Na rysunku 15 po prawej, pokazano różnicę między intensywności tła (roztworu ThT) z białkiem zawierającym struktury wiążące ThT (ThT+włókna amyloidowe).



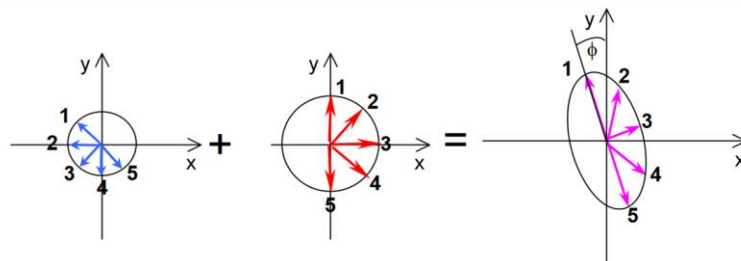
Rysunek 15. Od lewej: zakresy długości fali emisyjnej i absorpcyjnej we fluorescencji, po prawej: Intensywność fluorescencji tła (samego ThT) i ThT związanej z włóknami amyloidowymi [195].

B) Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Spektroskopia dichroizmu kołowego opiera się na pomiarze różnicy absorpcji promieniowania elektromagnetycznego spolaryzowanego kołowo przez próbkę. Jeśli wektor fali elektromagnetycznej oscyluje wzdłuż jednej linii, wówczas takie fale nazywamy spolaryzowanymi liniowo. O świetle spolaryzowanym kołowo mówimy wtedy, gdy dwie fale



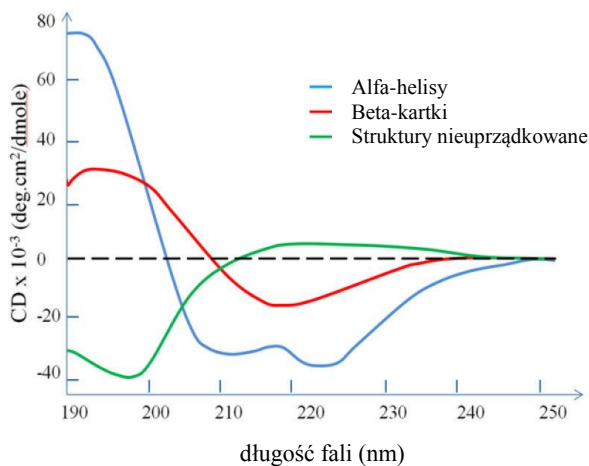
spolaryzowane liniowo w dwóch różnych płaszczyznach, skierowane w tym samym kierunku, różnią się od siebie fazą. Dichroizm kołowy to niejednakowa absorpcja prawego i lewego, kołowo spolaryzowanego promieniowania (patrz rys.16).



Rysunek 16. Po opuszczeniu próbki aktywnie optycznej fale prawo- i lewoskrętna są spolaryzowane kołowo, różnią się jednak fazą i amplitudą w wyniku czego fala spolaryzowana jest eliptyczna. . [196].

Optycznie aktywne makrocząsteczki, takie jak białka, wykazują zróżnicowaną absorpcję światła spolaryzowanego kołowo lewo i prawoskrętnego. Pomiary CD wykonywane są najczęściej w zakresie światła widzialnego i nadfioletu, gdzie obejmują przejścia elektronowe, a także w zakresie podczerwieni, gdzie dotyczą przejść oscylacyjnych. Dichroizm kołowy (CD) w dalekim ultrafiolecie (190-250 nm) jest głównie oparty na wzbudzeniu przejścia elektronowego $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$ w grupie amidowej. Łańcuch główny białka tworzy charakterystyczne struktury drugorzędowe takie jak alfa-helisy, beta-kartki i struktury nieuporządkowane. Dla α -helisy obserwuje się maksimum przy 190 nm oraz minimum przy 208 nm (patrz rys 17). Konformacja β -kartkowa charakteryzuje się maksimum przy ok. 195 nm oraz pojedynczym minimum przy 216 nm, z kolei dla struktury nieuporządkowanej typowe jest pojedyncze minimum przy ok. 195 nm i rozmyte maksimum przy ok. 215 nm. Ilościowa analiza widm CD dostarcza informacji o zawartości poszczególnych frakcji struktury drugorzędowej [161–163]. W ostatnich dziesięcioleciach zaproponowano wiele ulepszonych algorytmów opartych na wyborze zmiennych czy rozkładzie znormalizowanego widma. Technika ta jest łatwa w użyciu, ale pokazuje uśredniony wynik dla dużej liczby oligomerów, dlatego nie jest możliwe przypisanie różnic w strukturze amyloidów występującym w jednej próbce. Dodatkowo ilościowe określenie zawartości beta-kartek jest szczególnie trudne, ze względu na duże morfologiczne i spektralne zróżnicowanie beta-kartek, dlatego w moich pomiarach CD wykorzystywane jest łącznie z m.in. ze spektroskopią fluorescencyjną. Dichroizm kołowy umożliwia śledzenie zmian w udziale alfa-helisy i beta-kartek w tworzonych obiektach w trakcie procesu fibrylacji. O tworzeniu się włókien świadczy wzrastający udział beta-kartek i zmniejszający się udział alfa-helisy w układzie. Na rysunku 17 przedstawiono widma CD charakterystyczne dla struktur drugorzędowych.

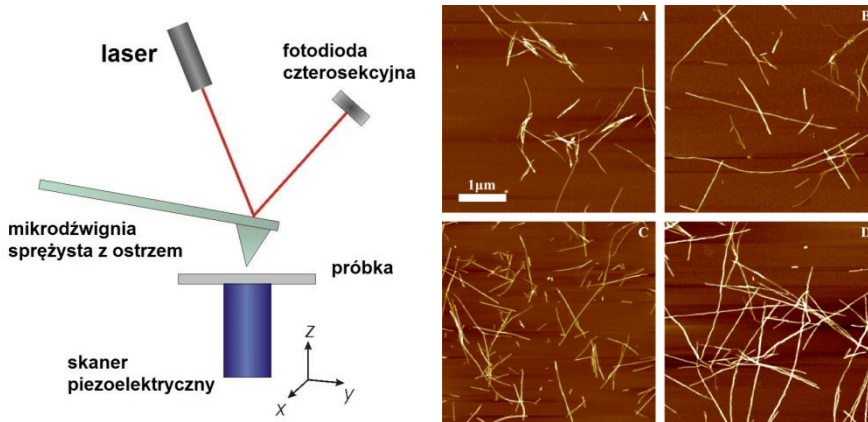




Rysunek 17. Widma CD dla alfa-helisy, beta-kartki i struktur nieuprządkowanych na podstawie [197].

C) Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Mikroskopia sił atomowych jest nowoczesną techniką umożliwiającą obrazowanie i badanie właściwości fizyko-chemicznych (m.in. tarcia, adhezji, rozkładu ładunku elektrostatycznego, przewodności elektrycznej) powierzchni analizowanych materiałów w trzech wymiarach na poziomie rozdzielczości pojedynczych nanometrów [164–167]. AFM jest techniką mikroskopową, w której ramię sondy zakończonej ostrą igłą skanuje powierzchnię próbki (patrz rys. 18). Oddziaływania igły z powierzchnią próbki zmieniają rozkład sił przyłożonych do ramienia, co powoduje odginanie się igły. Ugięcie lub zmiana w przyłożonej sile jest mierzona dzięki odbiciu się wiązki lasera od czujnika. Zmiany w ugięciu igły są wykorzystywane do stworzenia mapy powierzchni próbki, zawierającej informacje o topografii, właściwościach fizycznych, magnetycznych czy chemicznych powierzchni. Rozdzielczość jaką można uzyskać w pomiarach AFM zależy od wielkości i rodzaju użytego tipa, rodzaju i chropowatości próbki, trybu obrazowania, ale jest zazwyczaj mniejsza niż 10 nm szerokości i do 1 nm wysokości.



Rysunek 18. Po lewej: budowa mikroskopu AFM, po prawej: przykładowe obrazy amyloidów uzyskane przez AFM z białka rMoPrP na podstawie [168]

Rodzaj informacji uzyskanej z mikroskopii sił atomowych zależy od trybu pracy mikroskopu. Aby zbadać rozmiar i kształt amyloidów oligomerowych zazwyczaj używa się trybu kontaktowego lub kontaktu przerywanego [164,167,168]. W trybie kontaktowym wykorzystywane są różnice w oddziaływaniach pomiędzy powierzchnią a igłą, co wpływa na ugięcie tej ostatniej i umożliwia stworzenie obrazu topograficznego. Igła skanuje powierzchnię na pewnej wysokości. Odległość między ostrzem a atomami badanej próbki jest mniejsza niż 0,1 nm i igła naciska na powierzchnię z siłą rzędu 10^{-7} - 10^{-10} N. Tryb kontaktu przerywanego charakteryzuje się tym, że ramie oscyluje w (lub blisko) częstotliwości rezonansowej, czyli w przedziale wartości 50-500 kHz. Inaczej mówiąc powierzchnia próbki jest „opukiwana” przez ostrze. Obserwowanie amplitudy vibracji umożliwia zebranie informacji o ukształtowaniu powierzchni próbki. Tryb kontaktu przerywanego ma tą przewagę nad trybem kontaktowym, że igła nie dotyka praktycznie powierzchni próbki, a co za tym idzie nie ulega ona zniszczeniu. Dzięki obrazom uzyskanym w pomiarze można stwierdzić obecność włókien amyloidowych lub innych struktur np. oligomerów i ich morfologię (długość, średnicę, rozgałęzienia), ilość obiektów białkowych i ich zróżnicowanie.

D) Rozproszenie światła przez roztwory makromolekuł

Technika statycznego rozproszenia światła jest często stosowana do charakteryzowania agregatów białkowych o średnicach od kilku nanometrów do mikrometrów oraz do monitorowania procesu agregacji białek [169–173]. Wiązka monochromatycznego promieniowania oświetla ciekłą próbkę. Wektor elektryczny fali padającej indukuje zmienne dipole elektryczne w elementach układu, które z kolei stają się źródłem wtórnych fal elektromagnetycznych o tej samej długości. Częstkowe fale, rozproszone przez poszczególne



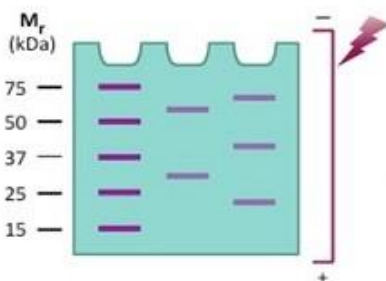
elementy w punkcie obserwacji, nakładają się wzajemnie. Jeśli wszystkie elementy są optycznie jednorodne (mają tę samą wartość współczynnika załamania światła), to taki ośrodek rozprasza promieniowanie tylko w kierunku fali padającej. Różnice we właściwościach optycznych elementów są warunkiem pojawienia się promieniowania rozproszonego pod innymi kątami. Kiedy monochromatyczna wiązka światła pada na roztwór zawierający makrocząsteczki, światło rozprasza się we wszystkich kierunkach zależnie od stosunku długości fali światła do średnicy cząsteczki. Intensywność sygnału rozpraszanego światła zależy od kształtu, masy cząsteczkowej i stężenia związków w roztworze. Detektory rozpraszania światła są szczególnie wrażliwe na wykrywanie dużych agregatów, nawet jeśli występują one w małych ilościach. Intensywność światła w rozpraszaniu światła, jest uśredniona czasowo, co dostarcza informacji o stopniu agregacji białka. Większa intensywność rozproszenia oznacza większy stopień agregacji. W trakcie prowadzonych badań opisywanych w niniejszej pracy dokonywano pomiaru gęstości optycznej dla długości fali 350 nm. Proces detekcji szczegółowo opisano w punkcie 4.1.3. w części eksperymentalnej rozprawy.

E) Rozdział elektroforetyczny próbek białka

Przedłużona ekspozycja białka na trudne warunki może prowadzić do niepożądanych reakcji (głównie degradacji), które nie są głównym obiektem zainteresowań moich badań. Aby ocenić skalę tego zjawiska przeprowadza się elektroforezę żelową w warunkach denaturacji (elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności surfaktantu anionowego: SDS- siarczan dodecyłu sodu, SDS-PAGE). Technika ta pozwala między innymi na monitorowanie składu mieszaniny białek, kontrolę ich czystości, oznaczanie masy cząsteczkowej czy określenie punktu izoelektrycznego białka. Do analizy polipeptydów stosowane są żele poliakrylamidowe. Polimer ten charakteryzuje się dużą wytrzymałością mechaniczną, jest pozbawiony ładunków, a tworzona przez niego struktura może charakteryzować się różnym stopniem usieciowania. Cząsteczki o wymiarach małych w stosunku do wielkości porów żelu migrują łatwo, natomiast bardzo duże cząsteczki pozostają prawie nieruchome. SDS jest silnym detergentem anionowym i niszczy oddziaływania niekowalencyjne, decydujące o przestrzennej strukturze makrocząsteczki. Przygotowanie próbek do analizy często wymaga dodatku, oprócz SDS, substancji redukującej i denaturacji termicznej (95-100°C). Czynnikiem redukującym (np. ditiotritol, 2-merkaptotanol) odpowiada za rozpad mostków disiarczkowych, co prowadzi do powstania struktury liniowej. Przed i w trakcie elektroforezy białka ulegają dysocjacji i denaturacji w obecności SDS, który łączy się z białkami w stosunku masowym 1,4:1 (SDS:białko). Dzięki łączeniu się białka z SDSem w



specyficzny sposób, białko przejmuje wypadkowy ujemny ładunek bez względu na długość makrocząsteczki. W efekcie działania powyższych czynników, białka poruszają się w żelu w kierunku elektrody dodatniej (anody) z szybkością zależną jedynie od ich wielkości (rysunek 19). Ruchliwość frakcji białkowych w polu elektrycznym jest wprost proporcjonalna do logarytmu masy cząsteczkowej. Do rozdzielania białek potrzebny jest bufor elektroforetyczny (najczęściej układ tris-glicyna, inaczej układ Laemmli'ego). W układzie rozdzielającym stosuje się żel zatężający (pH=6,6) i żel rozdzielający (pH=8,8). Dzięki elektroforezie żelowej jesteśmy w stanie stwierdzić czy występują różnice w procesie degradacji HEWL w obecności różnych osmolitów i różnych stężeń dodatku.



Rysunek 19. Prążki powstałe na płycie wskazują na masę cząsteczką obiektów obecnych w badanym roztworze [174].

3.4. Pomiar temperatury denaturacji białka za pomocą techniki różnicowej fluorymetrii skaningowej w nanoskali (nanoDSF)

Najczęściej stosowaną techniką do badania przejść fazowych w układach biologicznych np. z białkiem jest różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC). Pomiar temperatury denaturacji białka za pomocą DSC jest długi i umożliwia wykonanie pomiaru dla jednej próbki dziennie. Do badania stabilności termicznej białka można wykorzystać również spektroskopię CD, ale technika ta jest lepiej opracowana do badania stabilności białka w stałej temperaturze. Ze względu na szybkość i prostotę pomiaru technika różnicowej fluorymetrii skaningowej w nanoskali (nanoDSF) wydaje się konkurencją dla szeroko wykorzystywanej kalorymetrii DSC. Dodatkowym ułatwieniem jest wykorzystanie w tym pomiarze jednorazowych kapilar (o objętości mniejszej niż 10ul), dzięki temu możliwe stało się zmierzenie temperatury denaturacji lepkich roztworów białka, które były bardzo trudne do usunięcia z ciężko dostępnych celek w kalorymetrze DSC. Technika nanoDSF wykorzystuje wewnętrzną fluorescencję białka zawierającego tryptofan albo tyrozynę, więc niepotrzebny jest dodatkowy barwnik zewnętrzny. Próbkę poddaje się działaniu promieniowania UV o



długości 280 nm i mierzona jest intensywność fluorescencji przy 350 nm i 330 nm. Podczas pomiaru zwiększana jest temperatura próbki z określoną szybkością i rejestrowany jest stosunek intensywności fluorescencji przy 350 nm do intensywności fluorescencji przy 330 nm (F_{350}/F_{330}). Punkt przegięcia na wykresie zależności stosunku intensywności (F_{350}/F_{330}) od temperatury jest temperaturą denaturacji białka – T_m . Dla lepszego zobrazowania wyników pomiarów można je przedstawić w postaci pierwszej pochodnej (F_{350}/F_{330}) po temperaturze, czyli ($\partial(F_{350}/F_{330})/\partial(T)$).

4. Część eksperymentalna

4.1. Przygotowanie roztworów oraz warunki przeprowadzanych badań

Ze względu na szeroki zakres stosowanych technik konieczne było stworzenie dla każdej z nich odpowiedniej procedury przygotowania próbki do pomiaru. W tabeli 3 zestawiono wszystkie użyte odczynniki chemiczne wraz z ich specyfikacją.

Tabela 3. Odczynniki wraz z ich pochodzeniem i czystością wykorzystywane w pracy eksperymentalnej.

Odczynnik	Wzór sumaryczny	Masa molowa/(g·mol ⁻¹)	Źródło	Czystość % wagowy
N-metyloacetamid (NMA)	C ₃ H ₇ NO	73,09	Aldrich Chemicals	≥99%
Glicyna	C ₂ H ₅ NO ₂	75,07	Sigma	≥99%
N,N,N-trimetyloglicyna	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,15	Alfa Aesar	≥99%
Tauryna	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125,15	Alfa Aesar	99%
N,N,N-tlenek trimetyloaminy dwuwodny (TMAO)	(CH ₃) ₃ NO*2H ₂ O	111,14	Fluka	≥99%
n- butylomocznik	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	116,16	Fluka	≥99%
TMU	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	116,16	Sigma-Aldrich	99%
lizozym	-	14,4 kDa	Fluka	-
Kwas chlorowodorowy	HCl	36,46	POCH SA	-
Chlorek sodu	NaCl	58,44	VWR	99,9%

4.1.1. Pomiar oddziaływań w układach trójskładnikowych woda-osmolit-NMA na podstawie widm IR

Wszystkie roztwory zostały przygotowane wagowo z wykorzystaniem wody dejonizowanej. Ze względu na różnice w rozpuszczalności osmolitów, przygotowane stężenia roztworów osmolitów w wodzie wynosiły około:

- dla n-butyloaminy i N,N,N',N'-tetrametyloaminy: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mol/kg H₂O.
- dla glicyny i N,N,N-trimetyloglicyny: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 mol/kg H₂O.
- dla TMAO: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mol/kg H₂O.

Końcowa seria roztworów, których widma IR zostały zmierzone zawierały również *N*-metyloacetamid, którego stężenia były różne i zawierały się w zakresie stężeń od 0 do 1 mol NMA/kg wody z osmolitem. Zmierzone widma ATR-FTIR każdego roztworu stanowiły bazę danych, na podstawie których można było ekstrapolować widma do określonych stężeń, tak by w każdej serii, stężenie któregoś z dodatku było stałe.

Widma FTIR zmierzono za pomocą spektrometru Nicolet 8700 (Thermo) wyposażonego w sześciiodbiciową przepływową przystawkę ATR z kryształem germanu (Specac). Temperatura podczas pomiarów utrzymywana była na poziomie $25 \pm 0,1$ °C dzięki kontrolerowi temperatury (Specac). Każde widmo jest uśrednionym wynikiem 512 skanów wykonanych z rozdzielczością 2 cm^{-1} . Źródło EverGlo spektrometru pracowało w trybie turbo podczas pomiarów. Spektrometr i przystawka ATR były omywane azotem w celu zlikwidowania wpływu pary wodnej na rejestrowane widma. Wszystkie widma ATR poddano analizie wykorzystując program OMNIC (Thermo Scientific).

4.1.2. *Pomiary wolumetryczne i akustyczne*

W celu zmierzenia gęstości i szybkości rozchodzenia się dźwięku przygotowałam szereg wodnych roztworów analizowanych związków o stężeniach mieszczących się w przedziale od ok. 0,05 do 0,5 mol substancji/kg wody. W badaniach układów trójskładnikowych przygotowałam szereg roztworów osmolitu rozpuszczonych w wodnym roztworze NMA. Do tej części badań wykorzystałam TMAO pozbawione wody, ze względu na potrzebę zachowania stałego stężenia NMA w układach trójskładnikowych. Dwuwodny *N*-tlenek trimetyloaminy poddałam suszeniu przez 13h w temperaturze 50°C i przy ciśnieniu około 30 inHg. Temperatura topnienia TMAO*2H₂O wynosiła 98°C, a bezwodnego 227-230,6°C.

Bardzo ważne było odpowiednie odgazowanie i czystość wykorzystywanej wody. Wykorzystałam wodę dejonizowaną, przed przygotowaniem roztworów gotowano przez około 20 minut pod zmniejszonym ciśnieniem.

Stężenia osmolitu mieszczą się w przedziale od ok. 0,05 do 0,35 mol substancji/kg rozpuszczalnika, a zawartość NMA w danej serii jest stała i wynosi około 2, 4, 6 lub 8 mol/kg H₂O.

Wszystkie roztwory zostały przygotowane wagowo, z użyciem wagi analitycznej (Radwag WAA 40/160/X/1, Polska) z precyzją 0,01 mg. Standardowa niepewność wyznaczenia molalności roztworu jest zdeterminowana głównie przez czystość odczynników (która dla wszystkich użytych związków wynosi 99%) i mieści się w zakresie od 0,0035-0,080 mol/kg w zależności od stężenia roztworu.

Do zmierzenia gęstości i szybkości dźwięku użyto aparatu Anton Paar DSA 5000 M. Precyzja wykonania pojedynczego pomiaru gęstości wynosi $0,05 \cdot 10^{-3} \text{ kg/m}^3$, a pomiaru szybkości dźwięku 0,5 m/s (przy częstotliwości 3MHz). Pomiary przeprowadzono dla każdego roztworu w temperaturze (288,15, 298,15 i 308,15) K z dokładnością wartości temperatury do 0,01 K. Pomiary zostały wykonane w trakcie mojego półtoramiesięcznego pobytu naukowego na Uniwersytecie Łódzkim, Katedra Chemii Fizycznej. W wyniku podziału prac ustalono, że będę odpowiedzialna za przygotowanie wszystkich próbek do pomiarów a bezpośrednio pomiar wykona pracownik UŁ (dr Magdalena Tyczyńska).

4.1.3. *Pomiary tworzenia się włókien amyloidowych z HEWL w obecności osmolitu*

Lizozym z białka jaja kurzego (Fluka, Cat. No. 62971) oczyszczono z mogących tam występować soli, poprzez przeprowadzenie dializy i liofilizacji według schematu: lizozym rozpuszczono w dejonizowanej wodzie do stężenia około 0,3 g/ 1 ml i dializowano z czystą wodą przez 24h w temperaturze około $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Oczyszczone białko liofilizowano przez 48h.

Membrana dializacyjna: Sigma-Aldrich, szerokości: 33 mm, odcięcie MW 11124

Roztwory lizozymu z osmolitem przygotowałam poprzez zmieszanie ze sobą dwóch roztworów bazowych A i B (tabela 4)

Tabela 4. Charakterystyka roztworów wyjściowych do otrzymania roztworów białka z dodatkiem osmolitu o ustalonym pH i sile jonowej.

Roztwór	A			B			
	Stężenie lizozymu [mg/ml]	pH	Sila jonowa [mM]	Stężenie lizozymu [mg/ml]	Stężenie osmolitu [mM]	pH	Sila jonowa [mM]
BU TMU	25	2	200	25	500	2	200
GLY BET	25	2	600	25	400	2	600

Roztwory A i B przefiltrowałam jednokrotnie z wykorzystaniem filtra strzykawkowego (Minisart Cat. No. 16553) o średnicy porów $0,1 \mu\text{m}$ i wymieszałam w odpowiednich proporcjach otrzymując następujące roztwory:

- dla n-butyloczynnika i *N,N,N',N'*-tetrametyloczynnika – roztwory zawierające: 0 mM, 50 mM, 250 mM i 500 mM dodatku osmolitu, 25 mg/ml HEWL, o pH=2 i sile jonowej= 200 mM,
- dla glicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny – roztwory zawierające: 0 mM i 400 mM dodatku osmolitu, 25mg/ml HEWL, o pH=2 i sile jonowej= 600mM.



Glicyna i betaina to związki występujące pod postacią jonów obojnaczych, co oznacza, że reagują z kwasem solnym, za pomocą którego ustawia się pH=2 w wyżej wymienionych roztworach. W związku z tym uzyskanie pH=2 dla roztworów zawierających aminokwasy wymaga dodatku większej ilości kwasu, a więc siła jonowa roztworów zwiększa się do ponad 500 mM, co przybliżyłam do 600 mM poprzez dodatek NaCl. W pierwszej wersji pomiarów stabilizatorem wybranym do badań była tauryna, której rozpuszczalność jest niska i wynosi 0,4 M. Aby móc porównywać wyniki między sobą, zdecydowałam, że wszystkie stabilizatory, będą mierzone w zakresie stężeń do 0,4 M. Ostatecznie okazało się, że ciekawszym obiektem badań jest betaina, która zastąpiła taurynę w tych badaniach, ale stężenia osmolitów stabilizujących pozostały na poziomie 0,4 M.

Śledzenie procesu tworzenia się włókien polegało na jednoczesnym poddawaniu badaniom roztworów zawierających jeden wybrany osmolit o różnym stężeniu (tzw. jedna seria pomiarowa). Zestaw składający się z 4 próbek lizozymu o stężeniu około 25 mg/ml wraz z 4 różnymi stężeniami dodatku inkubowano w łaźni wodnej (GFL 1086) w temperaturze $45,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ z wytrząsaniem ($121\text{-}125\text{ min}^{-1}$) przez 10 dni. Pomiarów wykonano dla roztworów w dniu ich przygotowania oraz kilkakrotnie w ciągu całego czasu ogrzewania. W zależności od metody badawczej inkubowane próbki rozcieńczano do odpowiednich stężeń białka (mg/ml) AFM: 0,15; CD: 3; elektroforeza: 3, turbidymetria 25 i fluorescencja 0,08. W temperaturze 3°C przechowywano zestaw próbek składający się z: 4 roztworów białka o stężeniu 25 mg/ml bez lub wraz z osmolitem w 3 stężeniach, a także 4 próbki tła, w których nie było lizozymu i różniły się od siebie stężeniem osmolitu.

A) *Spektroskopia fluorescencyjna*

Analizowane roztwory przygotowano w buforze PBS (10mM buforu fosforanowego PBS, 150 mM NaCl, pH = 7,0). Jako wskaźnik użyto tioflawinę T - ThT (Sigma-Aldrich Cat. No. T3516), którego stężenie wynosiło 9,5 μM , stężenie białka zaś 0,08 mg/ml. Widma zmierzyłam na spektrofluorymetrze FP-8300 JASCO w zakresie 460-550 nm przy długość fali wzbudzenia 440 nm, Ex bandwidth: 5 nm, Em bandwidth: 10 nm. Pozostałe parametry pomiaru to: szybkość skanowania wynosząca 200 nm/min, odpowiedź: 50 msec. Dla każdego roztworu rejestrowano 5 lub 6 powtórzeń i uśredniano je. Napięcie na fotopowielaczu ustawiłam na 370V.

B) *Dichroizm kołowy (CD)*

Próbka roztworu białka została rozcieńczona za każdym razem filtrowaną wodą do stężenia 0,15 mg lizozymu /ml. Dokładne stężenie białka określono za pomocą spektroskopii UV-VIS. Widma CD zostały zmierzone za pomocą spektropolarymetru Jasco J-815 w zakresie UV (193-260 nm). Skany wykonywano z szybkością 50 nm/minutę i krokiem 0.2 nm w jednostce



milistopnia (mdeg). Długość optyczna wynosiła 1 mm. Analizie poddano wartości będące różnicą sygnału badanego roztworu i roztworu tła (tj. próbki bez dodatku białka). Wykonano po 6 skanów dla każdego roztworu. Otrzymane widmo zinterpretowano za pomocą algorytmu CDSSTR, set 7 udostępnionego przez Wydział Krystalografii, Uniwersytetu Londyńskiego pod adresem www.dichroweb.crtst.bbk.ac.uk [175,176].

C) Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Na świeżo odsłoniętą powierzchnię miki naniesiono 20 μl roztworu białka (rozcieńczonego wodą do stężenia 0,015 mg lizozymu/ml). Po 5 minutach powierzchnia miki została przepłukana dwoma porcjami (2x50 μl) filtrowanej wody (filtru strzykawkowy Minisart Cat. No. 16553, 0,1 μm). Próbki następnie suszono przez 3-4 dni w eksykatorze nad P_2O_5 i przechowywano nad żelazem krzemionkowym. Skany powierzchni wykonałam przy użyciu mikroskopu Nanosurf Easyscan 2 w trybie kontaktowym. Pomiar przeprowadziłam na obszarze skanowania o rozmiarze 9x9 μm z rozdzielczością 512x512 px i z siłą nacisku 20nN. Wyniki analizowałam w programie Gwyddion 2.50.

D) Spektroskopia UV-VIS

Spektroskopia UV-VIS zastosowana jest do obliczenia stężenia białka w próbkach wykorzystywanych do pomiarów CD. Widma absorpcyjne UV-VIS zmierzono na spektrofotometrze Thermo Evolution 300. Stężenie białka wyznaczono mierząc absorbancję dla długości fali 280 nm i wykorzystując współczynnik ekstynkcji: $\epsilon = 2,65 \text{ dm}^3\text{g}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dla każdej próbki wykonano 3 skany, które uśredniono.

E) Rozpraszanie światła przez makrocząsteczki

Gęstość optyczną mierzono przy długości 350 nm przy użyciu spektrofotometru Thermo Evolution 300. Stężenie białka w próbkach wynosiło 3 mg/ml. Długość drogi optycznej wynosiła 1 cm. Kuwetę wyposażono w mieszkadło, zaprojektowane i wykonane w Katedrze Chemii Fizycznej PG. Dla każdej próbki zebrano 10 skanów i uśredniono je.

F) Elektroforeza żelowa (SDS-PAGE)

Elektroforezę na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS przeprowadzono w obecności Tris-trycyny. Marker: firmy Thermo Fisher Cat. No. 26628; the Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder 1.7 to 40 kDa. Barwnik: Coomassie Brilliant Blue G250



Ze względu na konieczność wykonania wszystkich pomiarów w tym samym czasie, niemożliwe było wykonanie ich wszystkich przeze mnie, dlatego poniżej podaje szacunkowe wartości mojego udziału w pomiarach:

- przygotowanie roztworów do inkubacji i rozcieńczenie ich do stężenia białka 3mg/ml – 100% mojego udziału,
- spektroskopia fluorescencyjna – 100% mojego udziału,
- spektroskopia dichroizmu kołowego – wszystkie pomiary wykonane przez dr Danutę Augustin-Nowacką na Uniwersytecie Gdańskim,
- AFM – przygotowanie próbek – dr inż. J.Wawer , pomiary mikroskopowe – 80% mojego udziału,
- spektroskopia UV-VIS – wszystkie pomiary wykonane przez dr inż. J. Wawera,
- statyczne rozproszenie światła- wszystkie pomiary wykonane przez dr inż. Joannę Krakowiak.
- elektroforeza żelowa SDS-PAGE- wszystkie pomiary wykonane przez dr inż. Marcina Olszewskiego z PG,

4.1.4. Pomiary nanoDSF

Przygotowano cztery zestawy wodnych roztworów:

- glicyny/ *N,N,N*-trimetyloglicyny/ tauryny o sile jonowej około 600 mM, pH=2, stężeniu lizozymu 25 mg/ml i stężeniu osmolitu do 0,4M dla tauryny i do 0,5M dla glicyny i jej pochodnej,
- *n*-butylomocznika / *N,N,N',N'*-tetrametyomocznika o sile jonowej około 200 mM, pH=2 i stężeniu lizozymu 25 mg/ml i stężeniu osmolitu do 0,5M,
- TMAO o sile jonowej około 500 mM, pH=2, stężeniu lizozymu 25 mg/ml i stężeniu osmolitu do 0,5 M,
- lizozymu o stężeniu 25 mg/ml, pH=2 i silne jonowej w zakresie od 50 mM do 600 mM.

Do zmierzenia temperatury denaturacji wszystkich roztworów wykorzystano aparat nanoDSF (Prometheus NT 48, Nanotemper). Przed pomiarem próbki inkubowano przez 2h w temperaturze pokojowej. Badania przeprowadzono w przedziale temperatury od 20 do 90°C przy szybkości zmian temperatury 2°C/min. Próbkę poddano działaniu promieniowania UV o długości 280 nm i zmierzona intensywność fluorescencji przy 350 nm i 330 nm.

Analiza statystyczna

- wszystkie odchylenia standardowe zostały oszacowane z wykorzystaniem wzoru:



$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

gdzie: x_i – wartości eksperymentalne, \bar{x} - wartość średnia, n – liczba wyników,

- wszystkie współczynniki regresji liniowej obliczono metodą najmniejszych kwadratów w programie Excel,
- stopień wielomianu aproksymującego ustalano na podstawie wyników testu chi-kwadrat [177],
- wyniki zaokrąglano adekwatnie do wartości niepewności.

5. Wyniki badań i ich dyskusja

Ze względu na dużą ilość informacji zawartej w tabelach lub na wykresach w tej części często używane będą skróty nazw związków chemicznych:

- HEWL: lizozym z białka jaja kurzego,
- GLY: glicyna,
- BET: *N,N,N*-trimetyloglicyna,
- BU: *n*-butylomocznik,
- TMU: *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik.

5.1. Spektroskopia w podczerwieni układów trójskładnikowych woda-NMA-osmolit

NMA zaburza w dosyć charakterystyczny sposób tylko trzy cząsteczki wody [79]. Z pomocą obliczeń kwantowo-mechanicznych udało się ustalić, że cząsteczkami zaburzonymi wody są głównie te, które oddziałują z grupami funkcyjnymi NMA. To one będą prawdopodobnie w pierwszej kolejności reagowały na zmiany spowodowane potencjalnym oddziaływaniem NMA z innymi cząsteczkami. Pozostałe cząsteczki wody ze sfery hydratacyjnej NMA posiadają właściwości zbliżone do wody czystej. Niewielka wrażliwość cząstek NMA na oddziaływania, także z silnymi elektrolitami, może być zatem efektem dużej łatwości tej cząsteczki w dopasowywaniu się do sfery hydratacyjnej oddziałującego partnera. Oddziaływania z jonem fosforanowym stanowią skrajny przykład takich oddziaływań, gdyż jon fosforanowy posiada olbrzymią, prawie w całości zaburzoną pierwszą sferę hydratacyjną i jakiegokolwiek zmiany dotyczące jednej otaczających go cząsteczek wody, przenoszą się na pozostałe cząsteczki wody [90]. NMA ze względu na swój rozmiar i tylko trzy cząsteczki wody zaburzonej (w dodatku będących od siebie w dużym stopniu niezależnych: dwie cząsteczki przy grupie karbonylowej C=O, jedna cząsteczka przy grupie aminowej N-H), może swobodnie dopasować się do partnera bez znaczących zmian w strukturze swojej zaburzonej sfery hydratacyjnej. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że te spostrzeżenia można przenieść także na przedstawione układy. Brak jest silnych dowodów na zmiany w obrębie struktury oscylacyjnej NMA, które mogłyby świadczyć o silnych bezpośrednich oddziaływaniach amidu z badanymi cząsteczkami. Zmiany te dotyczą w dużej mierze partnera oddziaływania oraz cząsteczek wody.

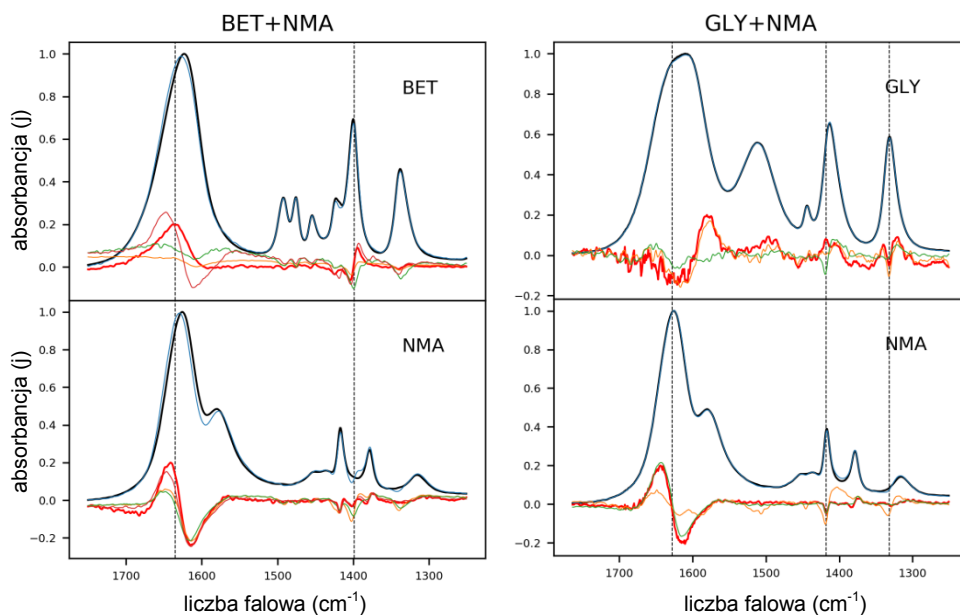
Na każdym wykresie 20-22 niebieska linia to widmo czystego składnika, a czerwone to widmo zmienności, czyli widmo podsumowujące najważniejsze zmiany spowodowane tylko zmianą jego stężenia. Widmo zmienności otrzymuje się odejmując widmo molowe związku odpowiadające najniższemu stężeniu od widma molowego o stężeniu najwyższym danego związku. Kolejne widma (zielone, pomarańczowe, błękitne itd.) to wyizolowane czynniki, które



podlegają analizie. Rysunek górny to widma osmolitu z faktoraми z serii wyizolowanych widm danego osmolitu (bez obecności NMA), dolny to widma NMA z faktoraми z serii wyizolowanych widm NMA (bez udziału osmolitu).

Analiza badanych układów polega głównie na prześledzeniu czy któreś widmo czynników odtwarza widmo zmienności (co świadczy o braku oddziaływań pomiędzy cząsteczkami osmolit-NMA) lub czy pojawiają się w nim dodatkowe pasma, niewidoczne na żadnych innych widmach (co może oznaczać występowanie oddziaływań między NMA i osmolitem). Należy pamiętać, że niektóre widma czynników mogą pojawić się zarówno na wykresach górnych – widmach osmolitu jak i dolnych – widmach NMA.

Na rysunku 20 po lewej przedstawiono wyniki badań spektroskopowych dla układów NMA-N,N,N-trimetyloglicyna-woda. Na górnym rysunku około liczby falowej: 1500 cm^{-1} i 1350 cm^{-1} można zauważyć, że zarówno widmo zmienności betainy (czerwona linia) jak i widma czynników (zielona, pomarańczowa i różowa linia) odtwarzają pasma widma niebieskiego, czyli widma „czystej” betainy. Gdy widma czynników, odtwarzają kształt pierwotnego widma BET, uznaje się, że nie można mówić o oddziaływaniach realizowanych poprzez odpowiednie grupy funkcyjne betainy.



Rysunek 20. Wykresy przedstawiające wyniki analizy PARAFAC dla: po lewej: układów N,N,N-trimetyloglicyny z NMA, po prawej: dla glicyny i NMA. Niebieska linia reprezentuje widmo czystego składnika, a czerwona widmo zmienności. Kolejne linie (zielone, pomarańczowe, błękitne itd.) to wyizolowane czynniki, które podlegają analizie. Rysunek górny to widma osmolitu z faktoraми z serii wyizolowanych widm danego osmolitu (bez obecności NMA), dolny to widma NMA z faktoraми z serii wyizolowanych widm NMA (bez udziału osmolitu).

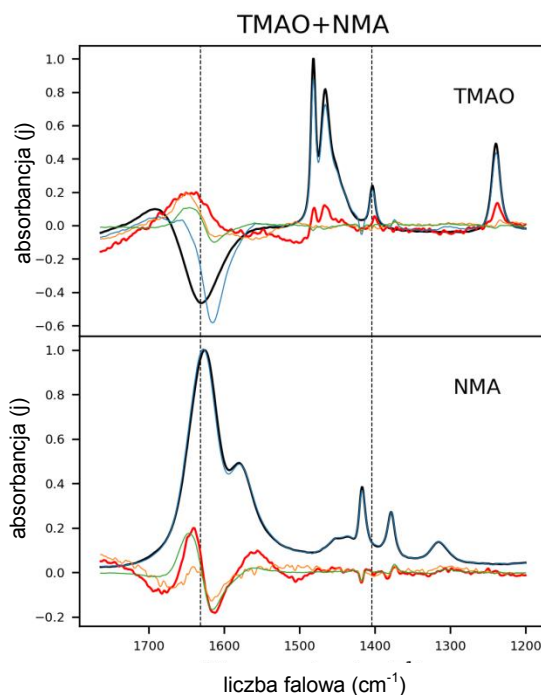
Pasmo karbonylowe *N,N,N*-trimetyloglicyny ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$) ulega w obecności NMA niewielkim zmianom. Świadczy o tym obecność pasm w widmach faktorów, które są nieobecne na widmach zmienności (czerwone) i w widmie pierwotnym BET. Oznacza to, że ich pojawienie jest wynikiem oddziaływań *N,N,N*-trimetyloglicyny z NMA. Widmo NMA (dolna część rysunku 20 po lewej) praktycznie nie wykazuje żadnych zmian w zakresie pasm C=O ($1600-1700 \text{ cm}^{-1}$) lub N-H ($1350-1450 \text{ cm}^{-1}$) w obecności betainy. Z tego powodu można sądzić, że oddziaływania w tym układzie mają charakter pośredni. Nie wynikają one jednak z konkurencji o cząsteczki rozpuszczalnika, ponieważ kształt widma zmienności NMA (czerwona linia) jest niemal identyczny z wyizolowanymi widmami faktorów dla NMA (linie zielone, pomarańczowe i różowe). Dodatkowo analogiczne widmo zmienności *N,N,N*-trimetyloglicyny w ogóle nie jest odtwarzane przez widma faktorów wyznaczone dla *N,N,N*-trimetyloglicyny. Może to też świadczyć o tym, że taka konkurencja faktycznie istnieje, jednak wygrywa ją NMA, zmniejszając liczbę cząsteczek wody dostępnej dla *N,N,N*-trimetyloglicyny.

W przypadku widm układów zawierających glicynę (rysunek 20 po prawej), liczba znaczących faktorów wynosi 3 zarówno dla widm glicyny jak i NMA (rzeczywista ich liczba jest prawdopodobnie mniejsza). Zarówno w serii widm glicyny jak i NMA idealnie w widmach czynników odtwarzane są widma czystych substancji oraz widma zmienności. Dodatkowy faktor jest niemal identyczny w obu seriach i może być właściwie traktowany jak złożenie obu widm zmienności (glicyny i NMA). Oznacza to, że kształt odpowiadającego mu widma wykazuje cechy, które można zlokalizować zarówno na widmach zmienności, jak i widmach czystych składników. Na tej podstawie można wyciągnąć wniosek, że oddziaływania między glicyna i NMA w roztworze wodnym są pomijalnie małe. Dodatkowo można stwierdzić, że konkurencja o cząsteczki rozpuszczalnika, nawet jeśli istnieje, nie wpływa znacząco na strukturę oscylacyjną obu cząsteczek.

Widma faktorów cząsteczki TMAO przedstawione na górnym rysunku 21 wykazują pewne zmiany w obecności cząsteczek NMA. Jest to m.in. niewielkie przesunięciem pasma przy ok. 1250 cm^{-1} (wiązanie C≡N rozciągające). Widoczne jest to w charakterystycznym kształcie widma jednego z faktorów (pomarańczowa linia) w tym zakresie (charakterystyczne pasmo różnicowe posiadające minimum i maksimum, widoczne przy długości fali ok. 1250 cm^{-1}). Silne są natomiast zmiany w zakresie pasm zginających -OH (ok. 1650 cm^{-1}). Cząsteczka TMAO nie posiada pasm własnych w tym zakresie (zmierzone pH wyklucza powstawanie formy sprotonowanej TMAOH). Wyraźne pasma różnicowe widoczne w tym zakresie są w takim razie efektem silnych zmian w strukturze wody, powodowanych obecnością NMA. Zmiany w tym zakresie są inne, gdy w roztworze jest obecne jedynie TMAO (widmo zmienności TMAO– czerwone) i gdy dodatkowo występuje w nim NMA. Wciąż jednak zmiany dotyczą pasma, które przypisać można cząsteczkom wody, a nie żadnej z substancji



rozpuszczonych. Ponieważ cząsteczka TMAO zaburza wokół siebie dużo cząsteczek wody i robi to stosunkowo silnie, to można sądzić, że to właśnie one dostosowują się do nowej sytuacji w roztworze, a nie cząsteczka TMAO. Widma cząsteczki NMA jak i samej cząsteczki TMAO wyizolowane z układu TMAO-NMA-woda nie wykazują natomiast znaczących zmian spowodowanych obecnością w wodnym roztworze kolejnego składnika.



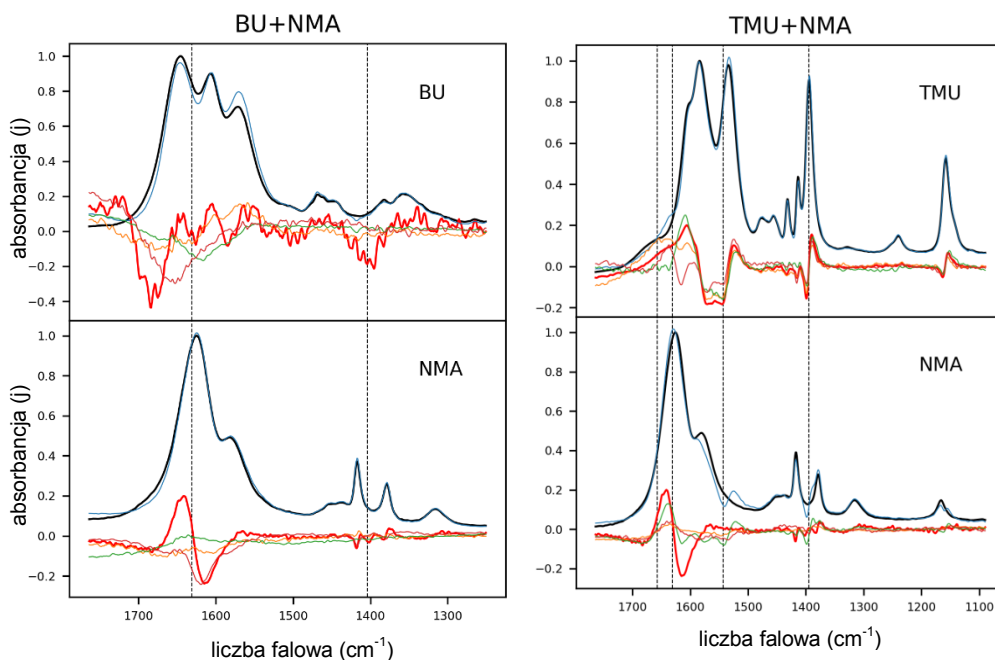
Rysunek 21. Wykres przedstawiający wyniki analizy PARAFAC dla układów TMAO z NMA. Niebieska linia reprezentuje widmo czystego TMAO, a czerwona widmo zmienności. Kolejne linie (zielone, pomarańczowe, błękitne itd.) to wyizolowane czynniki, które podlegają analizie. Rysunek górny to widma TMAO z faktoremami z serii wyizolowanych widm TMAO (bez obecności NMA), dolny to widma NMA z faktoremami z serii wyizolowanych widm NMA (bez udziału osmolitu).

Trzy wybrane stabilizatory wydają się mieć niewielki wpływ na strukturę oscylacyjną NMA. W różny sposób jednak same reagują na obecność tego składnika roztworu.

W przypadku widm n-butyloczynnika przedstawionych na rysunku 22 widmo żadnego z czynników nie jest podobne do widma jego zmienności. Dodatkowo na widmach czynników (zarówno dla n-butyloczynnika jak i NMA) pojawiają się pasma, które nie występują w oryginalnych widmach NMA lub osmolitu. Dla układów zawierających *N,N,N',N'*-tetrametyloczynnik (rys. 22 po prawej) widma czynników (zarówno dla NMA jak i TMU) również nie odtwarzają widma zmienności dla liczb falowych powyżej 1600 cm^{-1} . W tym zakresie pojawiają się pasma nieobecne w widmach czystego NMA lub TMU.



Pochodne mocznika odróżnia od stabilizatorów przede wszystkim brakiem odtwarzania widma zmienności w serii NMA. W przypadku stabilizatorów jeden z odtwarzanych czynników zawsze miał ten sam kształt, co widmo zmienności NMA, co mogło świadczyć o pewnej „niewrażliwości” NMA na obecność stabilizatora w roztworze. Odtwarzanie takiego widma sugerowało, że NMA nadal zachowywała się w obecności stabilizatora, jakby przede wszystkim „odczuwała” jedynie zmiany stężenia, tj. ilości dostępnej wody, a nie oddziaływała ze stabilizatorem bezpośrednio. W przypadku denaturantów takie widmo nie jest w całości odtwarzane ani w serii NMA, ani w samej serii widm zmienności pochodnych mocznika. Podział na obie serie jest trochę sztuczny, ponieważ te same czynniki lub specyficzne pasma mogą pojawiać się niezależnie od pochodzenia serii widm (obie serie są pochodnymi tej samej jednej serii widm zmierzonych dla mieszanin trójskładnikowych). Brak odtwarzania widm zmienności przede wszystkim wskazuje na różnicę w zachowaniu NMA w roztworach denaturantów w porównaniu do roztworów stabilizatorów, ale także na rolę wody w tego typu roztworach. Cząsteczka NMA przestaje niejako reagować na zmiany spowodowane stężeniem roztworu, co wskazuje na to, że może być zaangażowana w oddziaływania z cząsteczką denaturanta.



Rysunek 22. Wykresy przedstawiające wyniki analizy PARAFAC dla: po lewej: układów *n*-butylomocznika z NMA, po prawej: dla *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika i NMA. Niebieska linia reprezentuje widmo czystego składnika, a czerwona widmo zmienności. Kolejne linie (zielone, pomarańczowe, błękitne itd.) to wyizolowane czynniki, które podlegają analizie. Rysunek górny to widma osmolitu z czynnikami z serii wyizolowanych widm danego osmolitu (bez obecności NMA), dolny to widma NMA z czynnikami z serii wyizolowanych widm NMA (bez udziału osmolitu).

Podobny efekt można zresztą zauważyć także w seriach izolowanych czynników samych denaturantów, dla których w większości analizowanego zakresu widma czynników nie są podobne do odpowiednich widm zmienności.

Kolejnym elementem odróżniającym zachowanie cząsteczek w roztworach denaturantów w porównaniu do roztworów stabilizatorów, jest obecność pasm różnicowych, wskazujących na pewnego rodzaju oddziaływanie pojawiające się w roztworach denaturantów. W przypadku stabilizatorów pasm takich praktycznie nie było lub były bardzo słabe. W przypadku denaturantów są one już wyraźnie silniejsze niż naturalne szumy widm. Trudno jednak określić, czy potencjalne oddziaływania mają charakter bezpośredni, czy też pośredni.

Za bezpośrednimi oddziaływaniami przemawia fakt, iż na widmach czynników pojawiają się pasma, które nie występują w oryginalnych widmach NMA lub denaturanta: w przypadku *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika głównie w zakresie powyżej 1600 cm^{-1} , w przypadku *n*-butylomocznika w całym zakresie pasma amidowego I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$). Warto zaznaczyć, że dodatkowe pasma na czynnikach układu NMA-TMU pojawiają się w zakresie wysokich liczb falowych pasma *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika. Zmiany te są podobne jak w przypadku roztworów TMU i lizozymu z białka jaja kurzego, co opisano w [110]. Można więc podejrzewać, że zaobserwowane wówczas oddziaływania mogą mieć charakter ogólny i wynikać z oddziaływania denaturanta z łańcuchem głównym białka, którego modelem często jest właśnie NMA.

Za brakiem bezpośrednich oddziaływań przemawia z kolei to, że obserwowane zmiany, przede wszystkim w czynnikach izolowanych z serii dla NMA, nie są silne. Dodatkowe pasma często wskazują na niewielkie przesunięcia lub zmiany szerokości pasm składowych w oryginalnych widmach, przy silnych bezpośrednich oddziaływaniach można spodziewać się silnych przesunięć w położeniu pasm, przede wszystkim w zakresie pasma amidowego I. Zmiany te można byłoby przypisać pojawieniu się silnych wiązań wodorowych między cząsteczkami NMA i osmolitu (pojawia się wprawdzie pasmo różnicowe na widmie odtwarzanego czynnika czystego NMA – linia zielona, ok. 1550 cm^{-1} – jednak można je łatwo przypisać raczej przesunięciu jednego z pasm cząsteczki *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika). Brak takich pasm niekoniecznie wskazuje na brak tego typu oddziaływań, ale może oznaczać również, że oddziaływania te mają podobną energię, co wiązania wodorowe z cząsteczkami wody i nie są znacząco konkurencyjne w stosunku do oddziaływania z rozpuszczalnikiem.

Oddziaływania w roztworach denaturantów mogą także realizować się poprzez cząsteczki wody, jak w przypadku NMA i jonów fosforanowych [90]. Brak wrażliwości NMA na tego typu oddziaływania, wyrażona praktycznie brakiem zmian na izolowanych widmach czynników odpowiadających NMA w roztworze fosforanów, była wówczas tłumaczona zdolnością cząsteczki NMA do wpasowywania się w strukturę otaczającego ją



rozpuszczalnika. Podobny efekt może mieć miejsce w przypadku roztworów denaturantów. Cząsteczka NMA najprawdopodobniej oddziałuje z nimi, o czym świadczy brak odtwarzania widma zmienności wśród widm czynników, ale jej zdolność do adaptacji do tego typu oddziaływań nie powoduje znaczących zmian w widmie oscylacyjnym samej cząsteczki NMA.

5.2. Pomiarów wolumetryczne i akustyczne

Tak jak zostało to wcześniej przedstawione, głównym celem tej pracy jest analiza oddziaływań w układach trójskładnikowych woda-osmolit-cząsteczka modelowa białka. Do interpretacji wyników pomiarów gęstości i szybkości dźwięku w roztworach trójskładnikowych konieczne jest zmierzenie wybranych funkcji termodynamicznych wszystkich składników w czystej wodzie w określonym zakresie temperatur. W literaturze dostępne były parametry wolumetryczne dla glicyny, *N,N,N*-trimetyloaminy, *N*-tlenku timetyloglicyny, *n*-butylomocznika, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika, ale brakowało informacji dotyczących pozornych molowych ściśliwości adiabaticznych (w co najmniej 3 różnych temperaturach) dla tauryny, *N*-tlenku timetyloaminy, *N,N,N*-trimetyloglicyny i *N*-metyloacetamidu. Z tego powodu postanowiłam zmierzyć wartości gęstość, *d*, i szybkości dźwięku, *u*, dla wodnych roztworów tych związków w zakresie od 288,15 do 308,15K. Wyniki te zastawiłam w tabelach 5 i 7. Komplet danych niezbędnych do analizy układów trójskładnikowych dostępny był w literaturze dla wodnych roztworów *n*-butylomocznika i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika [178,179]. Dla roztworów *N,N,N*-trimetyloglicyny gęstość i szybkość zmierzono w trzech temperaturach (dla pozostałych związków w pięciu) ze względu na ograniczoną dostępność urządzenia pomiarowego.

Analizując zależność gęstości roztworów od stężenia dodatków można zauważyć duże różnice pomiędzy wybranymi układami. Zarówno w przypadku glicyny, *N,N,N*-trimetyloglicyny i tauryny następuje wyraźny wzrost gęstości wraz ze wzrostem ilości substancji rozpuszczonej. Efekt ten jest najsilniejszy (w przeliczeniu na 1 mol związku) dla tauryny. Zmiany gęstości dla glicyny i tauryny w przeliczeniu na gram substancji rozpuszczonej są natomiast identyczne. Dla układów z TMAO czy NMA zmiany gęstości odniesione do 1 grama substancji rozpuszczonej są niewielkie. Zwiększenie stężenia TMAO w niewielkim stopniu zwiększa gęstość roztworu, natomiast dla NMA obserwujemy spadek gęstości wraz ze wzrostem stężenia substancji rozpuszczonej. Zmiany gęstości pod wpływem zwiększającego się stężenia dodatku osmolitu można podzielić na:

- wyraźny wzrost gęstości wraz ze wzrostem stężenia dla TAU>GLY>BET,
- niewielki wzrost gęstości wraz ze wzrostem stężenia TMAO,
- niewielki spadek gęstości wraz ze wzrostem stężenia NMA.



Tabela 5. Gęstość, d , wybranych związków chemicznych w wodzie o stężeniu m w zakresie temperatur $T=(288,15-308,15) K$

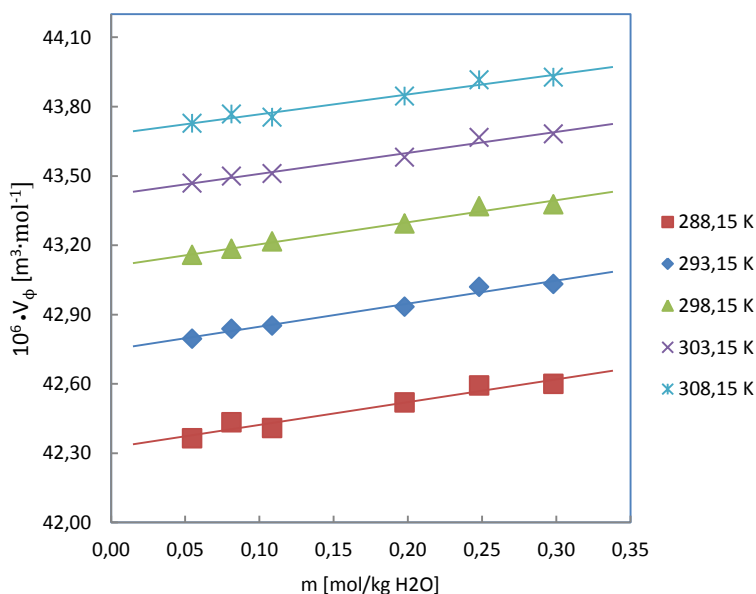
$m /(\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1})$	$d /(\text{kg}\cdot\text{m}^{-3})$				
	288,15K	293,15K	298,15K	303,15K	308,15K
<i>N</i> -metyloacetamid					
0,3049	999,051	998,110	996,908	995,455	993,807
0,2533	999,052	998,119	996,923	995,489	993,841
0,1507	999,055	998,140	996,961	995,542	993,907
0,1105	999,060	998,155	996,981	995,566	993,937
0,08351	999,068	998,163	996,992	995,583	993,958
0,05563	999,073	998,174	997,008	995,601	993,978
0	999,097	998,205	997,041	995,639	994,029
Glicyna					
0,2981	1008,659	1007,642	1006,382	1004,898	1003,216
0,2482	1007,077	1006,081	1004,837	1003,369	1001,697
0,1979	1005,488	1004,515	1003,286	1001,834	1000,170
0,1087	1002,633	1001,693	1000,494	999,065	997,425
0,08124	1001,741	1000,816	999,628	998,205	996,560
0,05469	1000,833	999,967	998,787	997,372	995,743
0	999,098	998,205	997,041	995,639	994,029
<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna					
0,3013	1004,661	-	1002,4010	-	999,2540
0,2501	1003,736	-	1001,4800	-	998,3840
0,1988	1002,8050	-	1000,5820	-	997,4830
0,1085	1001,150	-	998,999	-	995,9430
0,07815	1000,571	-	998,460	-	995,4090
0	999,098	-	997,044	-	994,029
TMAO					
0,2034	999,540	998,637	997,472	996,068	994,452
0,1694	999,460	998,558	997,392	995,992	994,375
0,1348	999,388	998,487	997,321	995,922	994,306
0,1010	999,312	998,410	997,249	995,849	994,231
0,07383	999,255	998,354	997,195	995,793	994,178
0,05588	999,215	998,283	997,123	995,722	994,108
0	999,097	998,203	997,045	995,645	994,030



m /(mol·kg ⁻¹)	d /(kg·m ⁻³)				
	288,15K	293,15K	298,15K	303,15K	308,15K
Tauryna					
0,1997	1009,919	1008,927	1007,680	1006,209	1004,530
0,1489	1007,213	1006,239	1005,015	1003,561	1001,899
0,1070	1004,937	1003,988	1002,780	1001,343	999,693
0,08199	1003,577	1002,640	1001,445	1000,016	998,374
0,05466	1002,100	1001,174	999,993	998,573	996,936
0	999,099	998,205	997,046	995,646	994,029

Spadek gęstości spowodowany wzrostem temperatury jest większy dla tauryny, glicyny i betainy niż dla NMA lub TMAO.

Zmiany pozornej objętości molowej, wyliczonej na podstawie wzoru 11, ze stężeniem są niewielkie i mają charakter liniowy dla wszystkich analizowanych związków chemicznych dla wszystkich wybranych temperatur pomiaru. Na wykresie 1 przedstawiono przykładową zależność liniową: $V_{\phi} = f(c)$ dla glicyny.



Wykres 1. Wykres zależność pozornej molowej objętości od stężenia, m, roztworu glicyny w pięciu temperaturach.

Zgodnie ze wzorem 12 wyznaczone zostały wartości granicznej pozornej objętości molowej i współczynnika S_v , które zestawiono w tabeli 6 wraz z wartościami V_{ϕ}^0 dostępnymi w

literaturze. Obserwujemy dobrą zgodność wartości literaturowych z otrzymanymi przeze mnie wynikami. Wartości V_{ϕ}^0 dla analizowanych związków układają się w następującej kolejności: BET>NMA>TMAO>TAU>GLY. Szereg ten odpowiada również masom cząsteczkowym tych związków.

Tabela 6. Parametry równania 12 w temperaturach $T=(288,15 \text{ do } 308,15)\text{K}$, wartości literaturowe: a- [180], b-[181], c-[182], d-[183], e-[184], f-[185], g-[186].

T/ K	$10^6 \cdot V_{\phi}^0 /$ ($\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	$10^6 \cdot S_w /$ ($\text{kg} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-2}$)	$10^8 \cdot \sigma /$ ($\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)	$10^6 \cdot V_{\phi \text{lit}}^0 /$ ($\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$)
NMA				
288,15	73,62±0,02	-1,1±0,1	11	
293,15	73,81±0,02	-0,92±0,09	9,3	
298,15	73,94±0,02	-0,61±0,04	6,1	74,0 ^a
303,15	74,128±0,002	-0,43±0,01	4,3	
308,15	74,46±0,02	-0,6±0,1	6,6	
Glicyna				
288,15	42,32±0,02	1,0±0,1	9,9	42,34 ^b , 42,3 ^c
293,15	42,75±0,01	0,99±0,07	9,9	42,77 ^b , 42,8 ^c
298,15	43,11±0,01	0,95±0,07	9,4	43,10 ^b , 43,18 ^d
303,15	43,42±0,01	0,91±0,07	9,0	43,44 ^b , 43,59 ^e
308,15	43,68±0,02	0,85±0,08	8,6	43,7 ^b , 44,81 ^f
N,N,N-trimetyloglicyna				
288,15	98,16±0,06	0,2±0,3	5,4	98,55 ^b
298,15	99,18±0,08	-0,1±0,4	7,5	99,40 ^b
308,15	99,86±0,07	-0,2±0,3	6,3	100,08 ^b
TMAO				
288,15	73,07±0,01	-0,5±0,1	3,1	72,97 ^b
293,15	73,19±0,04	-0,5±0,2	4,2	73,08 ^b
298,15	73,32±0,02	-0,5±0,2	3,5	73,19 ^b , 73,15 ^g
303,15	73,41±0,03	-0,5±0,2	3,4	73,30 ^b
308,15	73,56±0,02	-0,6±0,2	3,8	73,39 ^b
Tauryna				
288,15	70,1±0,1	0,7±0,8	8,7	
293,15	70,69±0,07	0,1±0,5	5,2	
298,15	71,13±0,08	0,3±0,7	6,7	
303,15	71,52±0,08	0,3±0,6	6,1	
308,15	71,90±0,06	0,0±0,5	4,6	



Wartość granicznej pozornej objętości molowej zmienia się wraz z temperaturą i dla wszystkich badanych związków, zgodnie z oczekiwaniami, rośnie wraz ze wzrostem temperatury pomiaru. Współczynnik kierunkowy S_v z równania 12, ukazuje jak V_ϕ zmienia się wraz ze wzrostem stężenia substancji rozpuszczonej. S_v w układach jest również miarą oddziaływań między cząsteczkami substancji rozpuszczonej. Dodatnia wartość S_v w układach 2-składnikowych świadczy o tym, że między cząsteczkami substancji rozpuszczonej dominują oddziaływania hydrofilowe. W przypadku ujemnych wartości S_v to oddziaływania hydrofobowe dominują między cząsteczkami substancji rozpuszczonej. Spośród wybranych związków jedynie dla glicyny i tauryny S_v jest duże i dodatnie w analizowanym zakresie temperatur, co oznacza, że im większa ilość rozpuszczonej glicyny lub tauryny tym większa pozorna objętość molowa roztworu. Dla NMA i TMAO, efekt jest przeciwny, co przejawia się w dużych ujemnych wartościach parametru S_v . Dla N,N,N -trimetyloglicyny natomiast S_v jest bliskie 0, co sugeruje brak dominującego charakteru oddziaływań pomiędzy cząsteczkami aminokwasu.

Wszystkie zmierzone szybkości rozchodzenia się dźwięku w roztworze przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Zmierzone wartości szybkości rozchodzenia się dźwięku dla wybranych osmolitów w wodzie dla $T=(288,15-308,15)K$.

m / (mol·kg ⁻¹)	u/(m·s ⁻¹)				
	288,15K	293,15K	298,15K	303,15K	308,15K
NMA					
0,3049	1481,8	1496,6	1509,6	1520,8	1530,2
0,2533	1479,2	1494,3	1507,5	1518,9	1528,5
0,1507	1474,0	1489,6	1503,3	1515,1	1525,0
0,1105	1472,0	1487,8	1501,6	1513,6	1523,7
0,08351	1470,7	1486,6	1500,5	1512,6	1522,7
0,05563	1469,2	1485,3	1499,4	1511,5	1521,8
0	1466,4	1482,7	1497,0	1509,4	1519,8
Glicyna					
0,2981	1482,9	1498,7	1512,5	1524,4	1534,6
0,2482	1480,2	1496,0	1509,9	1521,9	1532,1
0,1979	1477,4	1493,4	1507,4	1519,4	1529,7
0,1087	1472,4	1488,6	1502,7	1514,9	1525,3
0,08124	1470,9	1487,1	1501,3	1513,5	1523,9
0,05469	1469,4	1485,6	1499,9	1512,2	1522,6
0	1466,3	1482,7	1497,0	1509,4	1519,9



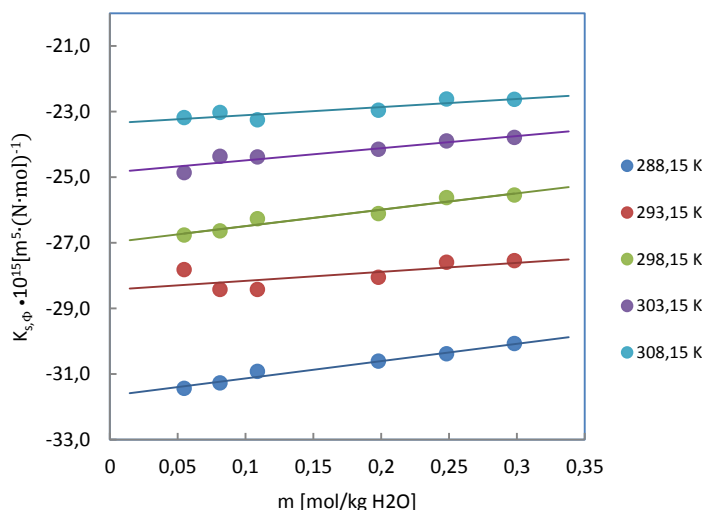
m / (mol·kg ⁻¹)	u/(m·s ⁻¹)				
	288,15K	293,15K	298,15K	303,15K	308,15K
<i>N,N,N</i> -trimetyloamina					
0,3013	1490,9	-	1519,2	-	1540,1
0,2501	1486,8	-	1515,5	-	1536,8
0,1988	1482,7	-	1511,8	-	1533,4
0,1085	1475,4	-	1505,1	-	1527,3
0,07815	1472,9	-	1502,9	-	1525,3
0	1466,3	-	1497,0	-	1519,9
TMAO					
0,2034	1482,4	1497,8	1511,3	1523,0	1532,8
0,1694	1479,7	1495,3	1508,9	1520,7	1530,6
0,1348	1477,0	1492,7	1506,5	1518,4	1528,4
0,1010	1474,3	1490,2	1504,1	1516,1	1526,3
0,07383	1472,2	1488,2	1502,2	1514,3	1524,6
0,05588	1470,8	1486,8	1500,9	1513,1	1523,4
0	1466,4	1482,7	1497,0	1509,4	1519,8
Tauryna					
0,1997	1476,4	1492,2	1506,1	1518,1	1528,2
0,1489	1473,9	1489,8	1503,8	1515,9	1526,1
0,1070	1471,8	1487,8	1501,9	1514,1	1524,3
0,08199	1470,5	1486,6	1500,8	1513,0	1523,3
0,05466	1469,1	1485,3	1499,5	1511,8	1522,1
0	1466,4	1482,7	1497,0	1509,4	1519,8

Wpływ stężenia i temperatury na szybkość dźwięku w badanych roztworach nie jest tak zróżnicowany jak w przypadku gęstości. Prędkość dźwięku rośnie liniowo wraz ze wzrostem stężenia we wszystkich analizowanych układach, a efekt ten maleje w szeregu: BET>GLY>TMAO>TAU>NMA.

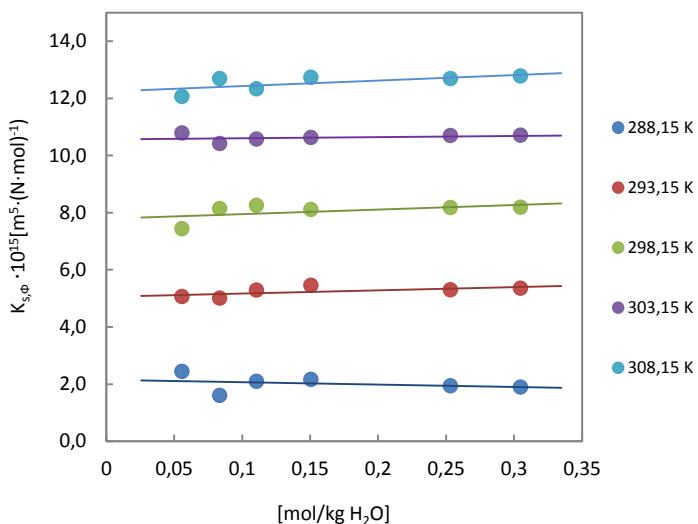
Na podstawie zmierzonych gęstości i szybkości rozchodzenia się dźwięku w roztworach obliczyłam zgodnie ze wzorem 23 pozorne molowe ściśliwości abiatatyczne, które mogą przyjmować wartości duże dodatnie, duże ujemne lub bliskie zera. Spośród wybranych związków tylko dla NMA wartości $K_{s,\phi}$ są dodatnie. Dodatnie wartości $K_{s,\phi}$ oznaczają, że ściśliwość danego roztworu jest wyższa niż ściśliwość samego rozpuszczalnika, czyli wody. W przypadku glicyny i tauryny wartości pozornych molowych



ściśliwości adiabatycznych są duże i ujemne w całym zakresie analizowanych temperatur. Dla TMAO i *N,N,N*-trimetyloglicyny wartości $K_{s,\phi}$ są umiarkowanie ujemne. Wartości pozornej molowej adiabatycznej ściśliwości zmieniają się liniowo wraz ze stężeniem substancji rozpuszczonej. Na wykresie 2 i 3 przedstawiłam pozorną molową ściśliwość w różnych temperaturach odpowiednio dla glicyny i NMA.



Wykres 2. Pozorne molowe ściśliwości adiabatyczne dla roztworów glicyny w temperaturach $T=(288,15-308,15)K$.



Wykres 3. Pozorne molowe ściśliwości adiabatyczne dla roztworów *N*-metyloacetamidu (NMA) w temperaturach $T=(288,15-308,15) K$.

Zależność $K_{s,\phi} = f(m)$ jest liniowa i opisana równaniem 24, na podstawie którego obliczyłam graniczne pozorne molowe ściśliwości adiabatyczne i parametr empiryczny S_K . Wartości te zamieściłam w tabeli 8 wraz z danymi literaturowymi, które pozostają w zgodzie z obliczonymi wartościami $K_{s,\phi}^0$.

Tabela 8. Parametry równania 24 w temperaturach $T=(288,15 \text{ do } 308,15)\text{K}$ dla badanych związków. Wartości literaturowe a-[181], b-[187].

T/K	$10^{15} \cdot K_{s,\phi}^0 /$ ($\text{m}^5 \cdot (\text{N} \cdot \text{mol})^{-1}$)	$10^{15} \cdot S_K /$ ($\text{kg} \cdot \text{m}^5 \cdot \text{N}^{-1} \cdot \text{mol}^{-2}$)	$10^{16} \cdot \sigma /$ ($\text{m}^5 \cdot (\text{N} \cdot \text{mol})^{-1}$)	$10^{11} \cdot A_k /$ ($\text{m}^5 \cdot \text{kg} \cdot (\text{N} \cdot \text{mol}^2)^{-1}$)	$10^{15} \cdot K_{s,\phi, \text{lit}}^0 /$ ($\text{m}^5 \cdot (\text{N} \cdot \text{mol})^{-1}$)
NMA					
288,15	1,8±0,1	0,4±0,2	0,93	-3,1	
293,15	5,2±0,1	0,5±0,2	0,96	-2,7	
298,15	8,0±0,1	0,7±0,2	1,1	-2,4	
303,15	10,66±0,04	0,1±0,1	0,49	-2,1	
308,15	12,8±0,1	0,0±0,3	1,3	-1,9	
Glicyna					
288,15	-31,48±0,05	5,1±0,1	4,9	-4,9	
293,15	-28,9±0,1	4,5±0,2	4,4	-4,6	
298,15	-26,83±0,05	4,2±0,1	4,3	-4,4	-25,46 ^a , -25,0 ^b
303,15	-25,2±0,1	4,3±0,1	4,1	-4,2	
308,15	-23,7±0,0	3,69±0,07	3,7	-4,1	
N,N,N - trimetyloglicyna					
288,15	-17,0±0,1	7,0±0,5	5,9	-5,8	
298,15	-9,2±0,1	4,2±0,5	3,6	-5,0	-8,2 ^a
308,15	-4,3±0,1	3,7±0,6	3,2	-4,4	
TMAO					
288,15	-16,8±0,1	-1,2±0,3	0,96	-5,0	
293,15	-13,3±0,1	-0,8±0,2	0,88	-4,6	
298,15	-10,2±0,1	-1,2±0,2	0,80	-4,2	-11,10 ^a
303,15	-7,8±0,1	-0,6±0,2	0,61	-3,9	
308,15	-5,7±0,1	-0,1±0,2	0,61	-3,7	
Tauryna					
288,15	-25,0±0,1	2,6±0,4	1,9	-5,6	
293,15	-22,0±0,1	1,6±0,3	1,2	-5,3	
298,15	-19,75±0,09	2,4±0,3	1,4	-5,0	
303,15	-18,1±0,1	3,0±0,2	2,0	-4,8	
308,15	-16,6±0,1	2,7±0,3	1,7	-4,6	



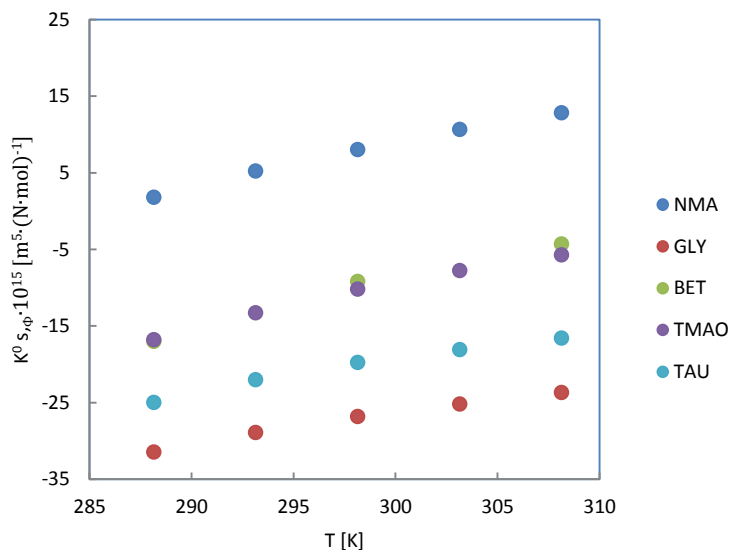
Jak widać na podstawie powyższej tabeli zmiany $K_{s,\phi}$ wraz ze wzrostem stężenia dodatku mogą być różne i tak zaobserwowałam:

- znaczny wzrost $K_{s,\phi}$ ze stężeniem dla: glicyny, *N,N,N*-trimetyloglicyny i tauryny,
- spadek $K_{s,\phi}$ ze stężeniem dla TMAO,
- niewielki wzrost $K_{s,\phi}$ ze stężeniem dla NMA.

Oprócz parametru S_K , świadczącego o zmianach $K_{s,\phi}$ ze stężeniem dodatku badanego związku, z równania 24 wyznaczyłam $K_{s,\phi}^0$. Wartości $K_{s,\phi}^0$ są, podobnie jak $K_{s,\phi}$:

- dodatnie dla NMA
- duże ujemne dla glicyny i tauryny
- umiarkowanie ujemne dla TMAO i *N,N,N*-trimetyloglicyny.

Zmiany $K_{s,\phi}^0$ z temperaturą są przedstawione na wykresie 4 i dla wszystkich badanych związków i rosną wraz z temperaturą.



Wykres 4. Zależność granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej, $K_{s,\phi}^0$, od temperatury dla wszystkich analizowanych związków: *N*-metyloacetamid (NMA), glicyna (GLY), *N,N,N*-trimetyloglicyna (BET), *N*-tlenek trimetyloaminy (TMAO), tauryna (TAU).

Wykorzystując ściśliwość roztworu zgodnie ze wzorem 20 i 21 obliczyłam liczby hydratacyjne oraz graniczne liczby hydratacyjne, które zestawiałam w tabeli 9. Najniższe wartości liczby hydratacyjnej otrzymano dla cząsteczki NMA ($s_n^0 = 3$ dla 298,15K), najwyższe dla *N,N,N*-trimetyloglicyny ($s_n^0 = 6,4$ dla 298,15K). Betaina jest dużą cząsteczką, dlatego ma możliwość oddziaływania z wieloma cząsteczkami wody. NMA jest porównywalne wielkością



do glicyny, ale aminokwas posiada dwukrotnie wyższą wartość liczby solwatacyjnej niż *N*-metyloacetamid. Zgodnie z przypuszczeniami, wraz ze wzrostem temperatury układu wartości S_n^0 maleje dla wszystkich badanych związków, jednak dla glicyny spadek S_n^0 między temperaturami 288,15 a 308,15 K jest najmniejszy (ok. 10%), a dla NMA największy (ok. 35%). Wpływ temperatury na wartości S_n^0 jest większy przy słabszych oddziaływaniach substancja rozpuszczona – woda.

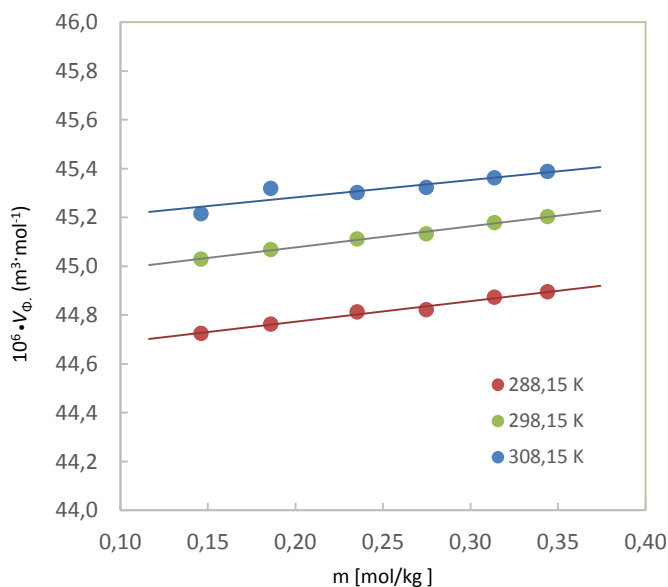
Tabela 9. Wartości granicznych liczb hydratacyjnych, S_n^0 badanych związków w wybranych temperaturach.

T/K	288,15	293,15	298,15	303,15	308,15
Związek	S_n^0				
NMA	3,7	3,3	3,0	2,7	2,4
Glicyna	5,8	5,6	5,4	5,3	5,2
<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna	7,1	-	6,4	-	5,8
TMAO	6,0	5,6	5,2	4,9	4,7
Tauryna	6,7	6,4	6,2	6,0	5,9

Obliczenie pozornych objętości molowych i pozornych ściśliwości molowych w wodzie dla wybranych osmolitów było niezbędne by móc porównać je z parametrami w roztworach bardziej złożonych. W układach trójskładnikowych (osmolit-NMA-woda) substancją rozpuszczoną jest osmolit, zaś jego stałym otoczeniem (rozpuszczalnikiem) jest wodny roztwór NMA. Do pierwszej serii badań, określających wpływ NMA na osmolit, wybrałam trzy stabilizatory: glicynę, *N,N,N*-trimetyloglicynę i TMAO, a także dwa destabilizatory *n*-butylomocznik i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik.

Uzyskane wyniki pomiarów gęstości i szybkości rozchodzenia się dźwięku w roztworach wykonano w trzech temperaturach: 288,15; 298,15 i 308,15K i zamieściłam je w tabelach 27-31 w materiałach uzupełniających. Na podstawie gęstości roztworów, tak jak w przypadku układów dwuskładnikowych, obliczyłam wartości pozornej objętości molowej w oparciu o wzór 11 (rozpuszczalnikiem jest wodny roztwór NMA). Dla wszystkich układów, we wszystkich temperaturach, pozorna objętość molowa jest liniową funkcją molalności substancji rozpuszczonej, co opisuje wzór 12. Zależność $V_\phi = f(m)$ przedstawiłam na wykresie 5 na przykładzie glicyny w wodnym roztworze NMA o stężeniu 6 mol/kg. Na podstawie liniowej zależności pozornej objętości molowej wyznaczyłam dwie wartości: graniczną pozorną objętość molową i parametr S_v , które zestawiałam w tabelach 10-12.





Wykres 5. Liniowa zależność pozornej objętości molowej od molalności roztworu na przykładzie roztworów glicyny w wodnym roztworze NMA o stężeniu 6 moli/kg wody dla temperatur $T=(288,15-308,15)$ K.

Tabela 10. Parametry (S_V and V_ϕ^0) z równania 12 dla **glicyny** i **N,N,N-trimetyloglicyna** w wodnych roztworach NMA dla temperatur $T=(288,15-308,15)$ K.

T/K	$m_{NMA}/$ (mol·kg ⁻¹)	$10^6 \cdot V_\phi^0 /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot S_V /$ (kg·m ³ ·mol ⁻²)	$10^8 \cdot \sigma /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot V_\phi^0 /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot S_V /$ (kg·m ³ ·mol ⁻²)	$10^8 \cdot \sigma /$ (m ³ ·mol ⁻¹)
		GLICYNA			N,N,N-trimetyloglicyna		
288,15	2	42,978±0,030	0,96±0,11	1,7	97,260±0,029	-0,07±0,11	1,9
298,15	2	43,717±0,065	0,58±0,23	3,7	98,175±0,035	-0,19±0,14	2,3
308,15	2	44,113±0,039	0,80±0,14	2,2	98,910±0,015	-0,11 ±0,06	1,0
288,15	4	43,549±0,022	1,260±0,079	0,9	97,01±0,021	-0,02±0,055	1,0
298,15	4	43,705±0,096	1,24±0,35	4,4	97,80±0,016	-0,08±0,035	0,7
308,15	4	44,234±0,023	1,327±0,083	1,0	98,51±0,010	-0,14±0,04	0,5
288,15	6	44,604±0,014	0,843±0,055	0,9	97,207±0,040	-0,38±0,15	2,6
298,15	6	44,905±0,009	0,863±0,034	0,5	97,859±0,033	-0,26±0,13	2,2
308,15	6	45,140±0,043	0,71±0,17	2,8	98,442±0,021	-0,20±0,08	1,4
288,15	8	45,640±0,027	0,33±0,11	1,5	97,330±0,039	0,23±0,15	2,6
298,15	8	45,760±0,023	0,405±0,096	1,3	97,962±0,037	0,14±0,14	2,4
308,15	8	45,755±0,022	0,675±0,093	1,2	98,508±0,034	0,09±0,13	2,3



Tabela 11. Parametry (S_v and V_ϕ^0) z równania 12 dla **TMAO** w wodnych roztworach dla temperatur $T=(288,15-308,15)$ K.

T/K	$m_{NMA}/$ (mol·kg ⁻¹)	$10^6 \cdot V_\phi^0 /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot S_v /$ (kg·m ³ ·mol ⁻²)	$10^8 \cdot \sigma /$ (m ³ ·mol ⁻¹)
288,15	2	71,083±0,044	-0,40±0,15	2,5
298,15	2	71,638±0,051	-0,52±0,19	2,9
308,15	2	72,059±0,042	-0,23 ±0,15	2,4
288,15	4	70,074±0,062	-0,06±0,24	4,1
298,15	4	70,769±0,019	-0,13±0,07	1,2
308,15	4	71,618±0,031	-0,74±0,12	2,0
288,15	6	69,696±0,029	0,18±0,11	1,7
298,15	6	70,425±0,029	-0,008±0,098	1,5
308,15	6	71,153±0,341	-0,9±1,3	2,0
288,15	8	70,060±0,054	-0,54±0,21	5,3
298,15	8	70,563±0,034	-0,30±0,13	3,4
308,15	8	71,055±0,029	-0,14±0,11	2,9

Tabela 12. Parametry (S_v i V_ϕ^0) z równania 12 dla **n-butyloamocznika** i **N,N,N',N'-tetrametyloamocznika** w wodnych roztworach NMA dla temperatur $T=(288,15-308,15)$ K.

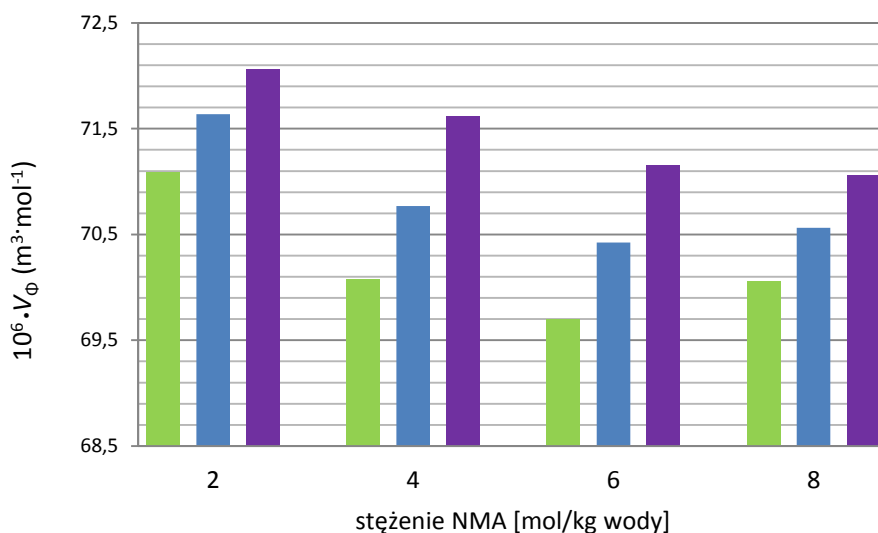
T/K	$m_{NMA}/$ (mol·kg ⁻¹)	$10^6 \cdot V_\phi^0 /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot S_v /$ (kg·m ³ ·mol ⁻²)	$10^8 \cdot \sigma /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot V_\phi^0 /$ (m ³ ·mol ⁻¹)	$10^6 \cdot S_v /$ (kg·m ³ ·mol ⁻²)	$10^8 \cdot \sigma /$ (m ³ ·mol ⁻¹)
		n-butyloamocznik			N,N,N',N'-tetrametyloamocznika		
288,15	2	107,119±0,056	0,81±0,22	3,7	111,814±0,019	-0,78±0,07	1,3
298,15	2	108,784±0,054	0,84±0,21	3,6	113,347±0,062	-0,80±0,23	4,1
308,15	2	110,361±0,055	0,85±0,21	3,7	114,743±0,022	-0,50±0,08	1,5
288,15	4	107,429±0,073	1,05±0,29	4,9	111,271±0,018	-0,49±0,07	1,2
298,15	4	109,076±0,084	1,12±0,33	5,5	113,115±0,124	-1,16±0,48	8,2
308,15	4	110,715±0,061	1,02±0,24	4,0	114,531±0,072	-0,67±0,28	4,7
288,15	6	108,267±0,020	1,15±0,07	1,3	111,409±0,016	-0,25±0,06	1,1
298,15	6	109,854±0,022	1,15±0,08	1,4	113,009±0,017	-0,17±0,07	1,2
308,15	6	111,400±0,025	1,06±0,09	1,6	114,576±0,013	-0,13±0,05	0,8
288,15	8	109,426±0,054	0,80±0,21	3,6	111,875±0,049	-0,17±0,18	3,2
298,15	8	110,877±0,030	0,80±0,12	2,0	113,380±0,035	-0,02±0,13	2,3
308,15	8	112,288±0,016	0,75±0,06	1,1	114,888±0,028	-0,04±0,11	1,8

Otrzymane wartości granicznej pozornej objętości molowej w wodnym roztworze NMA dla poszczególnych osmolitów można uporządkować rosnąco; GLY<TMAO<BET<BU<TMU. Szereg ten jest zgodny z kolejnością granicznej pozornej molowej objętości tych związków w wodzie czystej.

Parametr S_v przyjmuje wartości:

- dodatnie dla: glicyny i n-butyloczynnika
- ujemne dla: TMAO i TMU
- bliskie zera dla : BET.

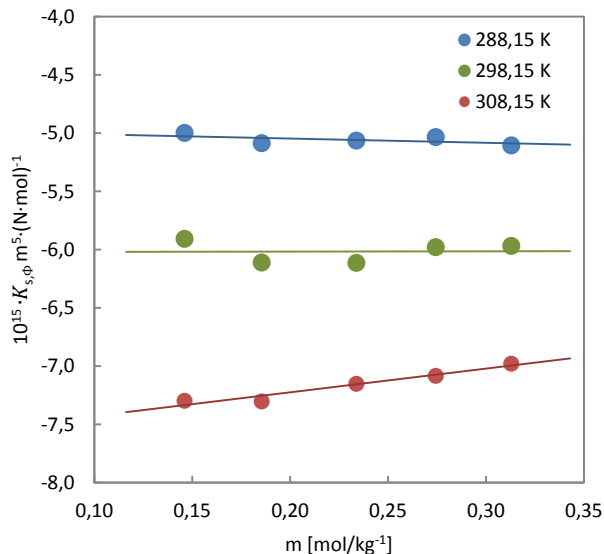
Dla wszystkich wybranych związków V_ϕ^0 jednoznacznie wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Nie zawsze natomiast V_ϕ^0 wzrasta wraz ze stężeniem NMA w rozpuszczalniku, co pokazałam na wykresie 6 na przykładzie TMAO, dla którego graniczne pozorne objętości molowe dla substancji rozpuszczonej w 8 mol NMA/kg wody nie przyjmują najwyższych wartości spośród roztworów TMAO. Podobną tendencję widać również dla roztworów zawierających *N,N,N*-trimetyloglicynę.



Wykres 6. Zależność granicznej pozornej objętości molowej od stężenia NMA $V_\phi^0 = f(m)$ dla roztworów TMAO w wodnych roztworach NMA w różnych temperaturach • 288,15 K, • 298,15 K, • 308,15 K.

Na podstawie zmierzonych gęstości i szybkości rozchodzenia się dźwięku w roztworach obliczyłam, z wykorzystaniem wzoru 23, pozorne molowe ściśliwości adiabatyczne. Parametr ten może przyjmować wartości od dużych dodatnich po duże ujemne. Dla wybranych związków zależność $K_{s,\phi} = f(m)$ jest liniową funkcją stężenia, co opisuje wyrażenie 24. Na wykresie 7 przedstawiłam wpływ molalności glicyny na $K_{s,\phi}$ w wodnych roztworach NMA o stężeniu 8 mol/kg.





Wykres 7. Zależność pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej od molalności glicyny $K_{s,\phi} = f(m)$ w wodnym roztworach NMA o stężeniu 8 mol/kg w temperaturach $T=(288,15-308,15)K$.

Parametrami wyliczonymi z zależności 24 jest: graniczna pozorna molowa ściśliwość adiabatyczna i współczynnik S_K , które przedstawiłam w tabelach 13-15.

Tabela 13. Parametry równania 24 dla glicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny w wodnych roztworach NMA dla różnych temperatur i przy ciśnieniu $p \approx 0,1MPa$.

T/K	$m_{NMA} / (mol \cdot kg^{-1})$	$10^{15} \cdot K_{s,\phi}^0 / (m^5 \cdot (N \cdot mol)^{-1})$	$10^{15} \cdot S_K / (kg \cdot m^5 \cdot N^{-1} \cdot mol^{-2})$	$10^{16} \cdot \sigma / (m^5 \cdot (N \cdot mol)^{-1})$	$10^{15} \cdot K_{s,\phi}^0 / (m^5 \cdot (N \cdot mol)^{-1})$	$10^{15} \cdot S_K / (kg \cdot m^5 \cdot N^{-1} \cdot mol^{-2})$	$10^{16} \cdot \sigma / (m^5 \cdot (N \cdot mol)^{-1})$
		glicyna			<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna		
288,15	2	-20,61±0,13	3,19±0,46	0,72	-6,89±0,10	0,81±0,40	0,7
298,15	2	-19,13±0,13	4,21±0,47	0,73	-2,89±0,13	0,29±0,51	0,9
308,15	2	-18,070±0,075	4,38±0,27	0,43	0±0,14	0,36±0,54	0,9
288,15	4	-14,35±0,01	4,47±0,38	0,48	-0,85±0,17	-1,20±0,63	0,80
298,15	4	-14,66±0,01	4,78±0,49	0,62	0,675±0,095	0,48±0,34	0,44
308,15	4	-14,72±0,01	4,82±0,46	0,58	2,27±0,14	1,05±0,50	0,63
288,15	6	-9,02±0,05	1,77±0,18	0,30	2,88±0,38	-1,74±1,46	2,5
298,15	6	-9,56±0,10	1,70±0,40	0,67	3,96±0,16	-1,01±0,62	1,1
308,15	6	-10,03±0,12	1,54±0,45	0,76	4,67±0,23	-0,47±0,89	1,5
288,15	8	-4,973±0,071	-0,36±0,30	0,40	4,24±0,22	2,28±0,84	1,4
298,15	8	-6,02±0,19	-0,02±0,79	1,1	5,19±0,14	1,72±0,55	0,93
308,15	8	-7,63±0,065	-2,04±0,27	0,36	6,08±0,18	0,68±0,68	1,2



Tabela 14. Parametry równania 24 dla TMAO w wodnych roztworach NMA dla różnych temperatur i przy ciśnieniu $p \approx 0,1 \text{ MPa}$.

T/K	$m_{\text{NMA}}/(\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1})$	$10^{15}\cdot K_{s,\phi}^0/(\text{m}^5\cdot(\text{N}\cdot\text{mol})^{-1})$	$10^{15}\cdot S_K/(\text{kg}\cdot\text{m}^5\cdot\text{N}^{-1}\cdot\text{mol}^{-2})$	$10^{16}\cdot\sigma/(\text{m}^5\cdot(\text{N}\cdot\text{mol})^{-1})$
288,15	2	-13,49±0,56	1,44±1,99	3,0
298,15	2	-8,43±0,34	1,15±1,20	1,8
308,15	2	-4,48±0,30	0,69±1,07	1,6
288,15	4	-9,42±0,29	0,56±1,10	1,9
298,15	4	-5,81±0,12	0,62±0,48	0,8
308,15	4	-2,55±0,18	-0,13±0,69	1,2
288,15	6	-6,32±0,07	3,12±0,25	0,4
298,15	6	-3,46±0,14	2,53±0,51	0,8
308,15	6	-0,84±0,33	1,23±1,21	1,9
288,15	8	-0,39±0,22	-2,31±0,86	1,4
298,15	8	-0,72±0,19	-0,32±0,74	1,2
308,15	8	-2,10±0,10	-0,04±0,39	0,7

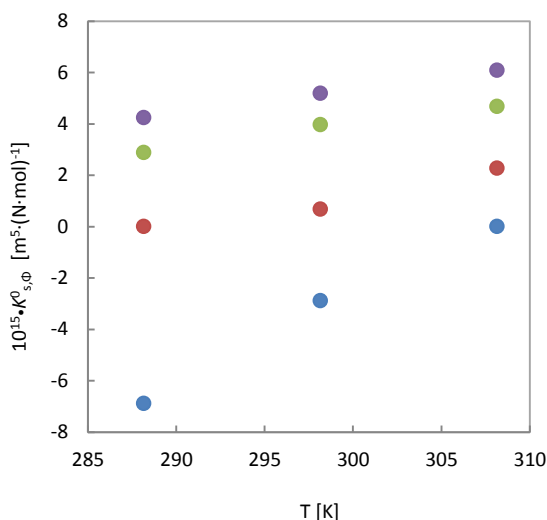
Tabela 15. Parametry równania 24 dla n-butylomocznika i N,N,N',N'-tetrametylomocznika w wodnych roztworach NMA dla różnych temperatur i przy ciśnieniu $p \approx 0,1 \text{ MPa}$.

T/K	$m_{\text{NMA}}/(\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1})$	$10^{15}\cdot K_{s,\phi}^0/(\text{m}^5\cdot(\text{N}\cdot\text{mol})^{-1})$	$10^{15}\cdot S_K/(\text{kg}\cdot\text{m}^5\cdot\text{N}^{-1}\cdot\text{mol}^{-2})$	$10^{16}\cdot\sigma/(\text{m}^5\cdot(\text{N}\cdot\text{mol})^{-1})$	$10^{15}\cdot K_{s,\phi}^0/(\text{m}^5\cdot(\text{N}\cdot\text{mol})^{-1})$	$10^{15}\cdot S_K/(\text{kg}\cdot\text{m}^5\cdot\text{N}^{-1}\cdot\text{mol}^{-2})$	$10^{16}\cdot\sigma/(\text{m}^5\cdot(\text{N}\cdot\text{mol})^{-1})$
		BU			TMU		
288,15	2	-1,40±0,21	12,00±0,80	1,4	6,13±0,29	3,8±1,1	1,9
298,15	2	7,13±0,20	10,81±0,76	1,3	15,35±0,30	1,9±1,1	2,0
308,15	2	14,49±0,24	9,80±0,91	1,6	22,56±0,20	2,29±0,77	1,3
288,15	4	13,27±0,24	7,84±0,95	1,6	15,900±0,038	2,98±0,15	0,3
298,15	4	19,37±0,25	7,05±0,95	1,6	22,66±0,18	1,80±0,71	1,2
308,15	4	24,82±0,17	6,42±0,67	1,1	29,05±0,19	0,94±0,74	1,3
288,15	6	22,31±0,12	7,52±0,46	0,8	23,343±0,059	0,80±0,23	0,4
298,15	6	27,09±0,11	6,50±0,44	0,7	28,87±0,39	0,4±1,5	2,6
308,15	6	31,29±0,12	6,73±0,45	0,7	33,47±0,12	1,87±0,46	0,8
288,15	8	30,34±0,35	3,0±1,4	2,3	28,72±0,17	0,54±0,68	1,2
298,15	8	33,92±0,34	2,7±1,3	2,2	33,94±0,24	0,49±0,94	1,6
308,15	8	37,94±0,26	1,3±1,0	1,7	37,40±0,059	2,20±0,23	0,4



Pomiary granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej w roztworach NMA pozwoliły stwierdzić, że $K_{s,\phi}^0$ jest:

- ujemne w całym zakresie mierzonych stężeń NMA i temperatur dla: glicyny, TMAO,
- dodatnie w całym zakresie mierzonych stężeń NMA i temperatur dla: TMU,
- dodatnie z wyjątkiem roztworów w $T=288,15$ i $m_{\text{NMA}}=2 \text{ mol/kg}^{-1}$ dla BU,
- dodatnie lub ujemne w zależności o temperatury i stężenia NMA dla: BET (patrz wykres 8).

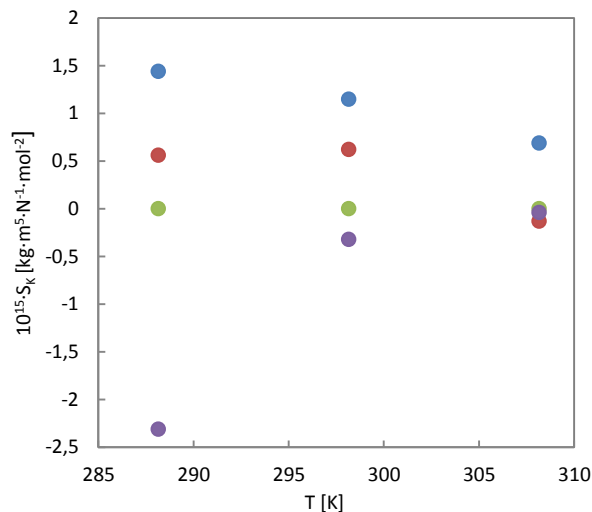


Wykres 8. Zależność granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej od temperatury dla *N,N,N*-trimetyloglicyny (BET) w roztworze NMA o danym stężeniu: • 2 mol/kg, • 4 mol/kg, • 6 mol/kg, • 8 mol/kg.

Parametr S_K z równania 23 w przypadku badanych związków przyjmuje wartości:

- dodatnie (duże i umiarkowanie duże) dla BU i TMU,
- od niewielkich dodatnich do niewielkich ujemnych dla GLY, BET, TMAO.

Na wykresie 9 przedstawiono przykładową zależność S_K od temperatury dla TMAO.



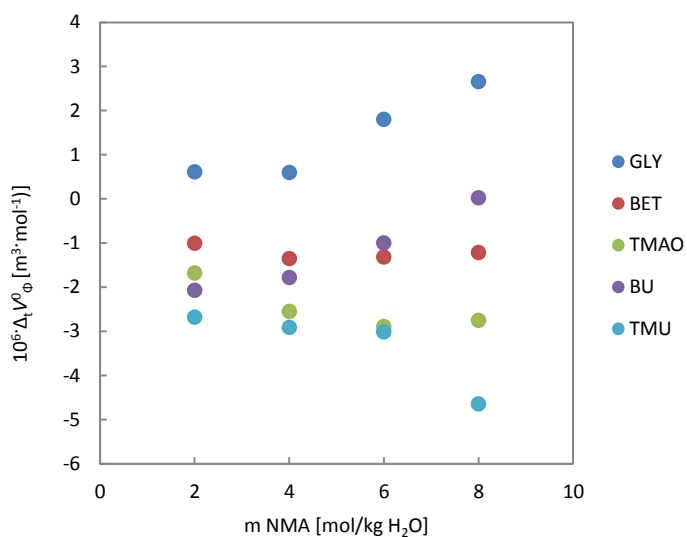
Wykres 9. Zależność parametru S_k od temperatury dla TMAO w roztworze NMA o danym stężeniu: • 2 mol/kg, • 4 mol/kg, • 6 mol/kg, • 8 mol/kg.

Dysponując wartościami granicznymi dla osmotów w czystej wodzie i w roztworach NMA wyznaczyłam funkcje przeniesienia dla granicznej pozornej objętości i ściśliwości osmotu z wody do wodnego roztworu NMA zgodnie ze wzorami 26 i 27. Wykorzystane do tego wartości graniczne dla objętości molowej i ściśliwości adiabatycznej układów dwuskładnikowych są wyznaczone przeze mnie (glicyna, TMAO, *N,N,N*-trimetyloglicyna – tabela 6 i 8) lub zaczerpnięte z literatury (dla BU i TMU [125,179]). Obliczone wartości $\Delta_t V_\phi^0$ i $\Delta_t K_{s,\phi}^0$ zestawiałam w tabeli 16. Na wykresie 10 i 11 przedstawiono kolejno funkcję przeniesienia granicznej pozornej objętości molowej i ściśliwości adiabatycznej badanych osmotów w temperaturze $T=298,15\text{K}$.

Tabela 16. Wartości funkcji przeniesienia objętości i ściśliwości dla osmotów w wodnych roztworach o różnym stężeniu NMA i w temperaturach 288,15; 298,15 i 308,15K.

T/K	288,15	298,15	308,15	288,15	298,15	308,15
m NMA/ (mol·kg ⁻¹)	$10^6 \cdot \Delta_t V_\phi^0 /$ (m ³ ·mol ⁻¹)			$10^{15} \cdot \Delta_t K_{s,\phi}^0 /$ (m ⁵ ·(N·mol) ⁻¹)		
GLICYNA						
2	0,658	0,607	0,433	11,05	7,87	5,33
4	1,229	0,595	0,554	17,31	12,34	8,68
6	2,284	1,795	1,46	22,64	17,44	13,37
8	3,32	2,65	2,075	26,687	20,98	15,77

<i>N,N,N-trimetyloglicyna</i>						
2	-0,897	-1,007	-0,954	10,074	6,37	2,68
4	-1,117	-1,357	-1,337	16,114	9,935	5,32
6	-0,95	-1,323	-1,422	19,764	13,22	7,72
8	-0,827	-1,22	-1,356	21,204	14,45	9,13
<i>TMAO</i>						
2	-1,987	-1,682	-1,501	3,41	1,67	1,82
4	-2,996	-2,551	-1,942	7,48	4,29	3,75
6	-3,374	-2,895	-2,407	10,58	6,64	5,46
8	-3,01	-2,757	-2,505	16,51	9,38	4,2
<i>BUTYLOMOCZNIK</i>						
2	-2,641	-2,076	-1,689	16,2	12,43	9,99
4	-2,331	-1,784	-1,335	30,87	24,67	20,32
6	-1,493	-1,006	-0,654	39,91	32,39	26,79
8	-0,334	0,017	0,238	47,94	39,22	33,44
<i>N,N,N',N'-TETRAMETYLOMOCZNIK</i>						
2	-3,246	-2,683	-2,157	12,13	9,25	6,76
4	-3,789	-2,915	-2,369	21,9	16,56	13,25
6	-3,651	-3,021	-2,324	29,343	22,77	17,67
8	-3,185	-4,65	-2,012	34,72	27,84	21,6

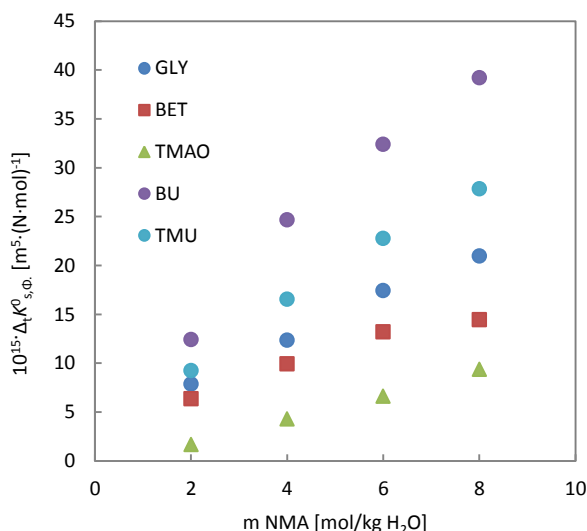


Wykres 10. Funkcja przeniesienia granicznej pozornej objętości molowej, $\Delta_t V_\phi^0$ dla związków: glicyna (GLY), N,N,N-trimetyloglicyna (BET), N-tlenek trimetyloaminy (TMAO), n-butyloamocznik (BU) i N,N,N',N'-tetrametyloamocznik (TMU) w $T=298,15$ K.



Funkcje przeniesienia granicznej pozornej objętości molowej dla wszystkich związków, z wyjątkiem glicyny w całym zakresie mierzonych temperatur i stężeń NMA w rozpuszczalniku są ujemne. Oznacza to, że glicyna jest jedynym związkiem spośród badanych, dla którego dodatek NMA zwiększył wartości V_{ϕ}^0 w stosunku do jego V_{ϕ}^0 w czystej wodzie. Dla pozostałych osmolitów wartości $\Delta_t V_{\phi}^0$ są ujemne dla zdecydowanej większości stężeń NMA i w danym zakresie temperatur. Dla roztworów n-butylococznika i TMU wartości $\Delta_t V_{\phi}^0$ są ujemne i mocno zależne od stężenia NMA w rozpuszczalniku. Dla roztworów TMU wartości $\Delta_t V_{\phi}^0$ najpierw lekko maleją, a powyżej 6 mol/kg NMA gwałtownie się obniżając, osiągając wartość najniższą ze wszystkich osmolitów. Wartości $\Delta_t V_{\phi}^0$ dla roztworów BU rosną, tak by przy najwyższym stężeniu NMA w rozpuszczalniku osiągnąć wartość bliską zero.

Funkcje przeniesienia granicznej pozornej ściśliwości adiabatycznej są natomiast dla wszystkich związków dodatnie, rosnące wraz ze stężeniem NMA w rozpuszczalniku.



Wykres 11. Funkcja przeniesienia granicznej pozornej ściśliwości adiabatycznej dla związków: glicyna (GLY), N,N,N-trimetyloglicyna (BET), N-tlenek trimetyloaminy (TMAO), n-butylococznik (BU) i N,N,N',N'-trimetylococznik (TMU) w $T=298,15$ K.

Zgodnie z przybliżeniem McMillana Mayera wzory 29-31 pozwalają obliczyć odpowiednie współczynniki oddziaływań dla poszczególnych układów w oparciu o znajomość $\Delta_t V_{\phi}^0$ i $\Delta_t K_{s,\phi}^0$. Dla wszystkich wybranych układów, oprócz TMAO, $\Delta_t V_{\phi}^0$ składa się z 3 elementów (równanie 31). Oznacza to, że uwzględnione są współczynniki oddziaływań w układach podwójnych (osmolit-NMA), potrójnych (osmolit-2-NMA) i poczwórnych (osmolit-3-NMA). Wyjątkiem jest TMAO gdzie, uznałam, że dla funkcji przeniesienia objętości warto uwzględnić tylko dwie składowe, czyli oddziaływania w układach podwójnych i potrójnych,



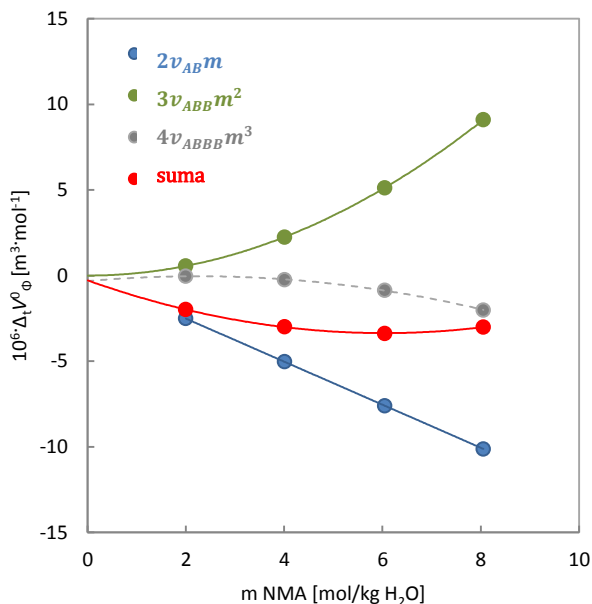
których miarą są odpowiednio współczynniki v_{AB} i v_{ABB} (równanie 30). Na wykresie 12 i 13 przedstawiłam odpowiednio $\Delta_t V_\phi^0$ dla TMAO w 288,15 K składającą się z trzech lub dwóch elementów. Jak widać na wykresie 12 trzecia składowa równania jest niewielka, dlatego zdecydowałam się na uproszczenie równania 31 do 30. Dla wszystkich badanych układów w $\Delta_{tr} K_{s,\phi}^0$ opisane jest wielomianem drugiego stopnia. W tabeli 17 zestawiałam dla każdego związku wartości wszystkich parametrów oddziaływań.

Tabela 17. Wartości współczynników oddziaływań z równania 29-31.

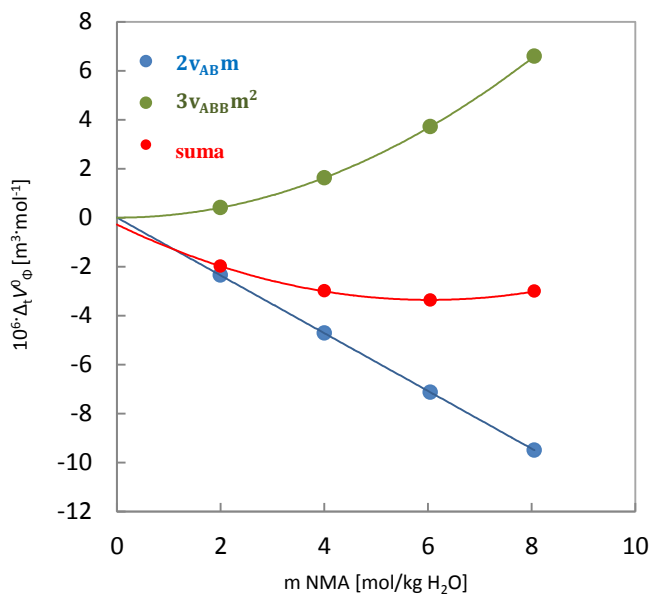
T/K	$10^6 \cdot v_{AB} /$ ($\text{kg} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-2}$)	$10^6 \cdot v_{ABB} /$ ($\text{kg}^2 \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-3}$)	$10^6 \cdot v_{ABBB} /$ ($\text{kg}^2 \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-4}$)	$10^{15} \cdot k_{AB} /$ ($\text{kg} \cdot \text{m}^2 \cdot (\text{N} \cdot \text{mol})^{-1}$)	$10^{15} \cdot k_{ABB} /$ ($\text{kg}^2 \cdot \text{m}^2 \cdot (\text{N} \cdot \text{mol}^2)^{-1}$)
glicyna					
288,15	$0,167 \pm 0,091$	$-0,004 \pm 0,041$	$0,0008 \pm 0,0040$	$2,99 \pm 0,16$	$-0,116 \pm 0,020$
298,15	$0,43 \pm 0,27$	$-0,10 \pm 0,12$	$0,011 \pm 0,012$	$2,07 \pm 0,14$	$-0,067 \pm 0,017$
308,15	$0,26 \pm 0,17$	$-0,043 \pm 0,079$	$0,0055 \pm 0,0077$	$1,371 \pm 0,098$	$-0,033 \pm 0,012$
N,N,N-trimetyloglicyna					
288,15	$-0,3386 \pm$ $0,0098$	$0,0428 \pm$ $0,0044$	$-0,00177 \pm$ $0,00042$	$2,846 \pm 0,091$	$-0,130 \pm 0,011$
298,15	$-0,3580 \pm$ $0,0015$	$0,03953$ $\pm 0,00067$	$-0,001506 \pm$ $0,000064$	$1,753 \pm 0,090$	$-0,073 \pm 0,011$
308,15	$-0,326 \pm$ $0,012$	$0,0327 \pm$ $0,0052$	$-0,00118$ $\pm 0,00050$	$0,717 \pm 0,030$	$-0,0114 \pm 0,0036$
TMAO					
288,15	$-0,590 \pm 0,015$	$0,0339 \pm 0,0018$	-	$0,809 \pm 0,074$	$0,0149 \pm 0,0090$
298,15	$-0,494 \pm 0,015$	$0,0273 \pm 0,0018$	-	$0,396 \pm 0,044$	$0,0167 \pm 0,005$
308,15	$-0,418 \pm 0,043$	$0,0232 \pm 0,0052$	-	$0,558 \pm 0,092$	$-0,020 \pm 0,011$
n-butylomocznik					
288,15	$-1,13 \pm 0,16$	$0,179 \pm 0,074$	$-0,0082 \pm 0,0073$	$4,476 \pm 0,094$	$-0,123 \pm 0,011$
298,15	$-0,89 \pm 0,12$	$0,14 \pm 0,054$	$-0,0065 \pm 0,0053$	$3,42 \pm 0,11$	$-0,079 \pm 0,014$
308,15	$-0,74 \pm 0,12$	$0,124 \pm 0,053$	$-0,0058 \pm 0,0052$	$2,72 \pm 0,11$	$-0,051 \pm 0,013$
N,N,N',N'-tetrametylomocznik					
288,15	$-1,24 \pm 0,13$	$0,164 \pm 0,059$	$-0,0073 \pm 0,0058$	$3,296 \pm 0,029$	$-0,0947 \pm 0,0035$
298,15	$-1,139 \pm 0,053$	$0,185 \pm 0,024$	$-0,0107 \pm 0,0024$	$2,462 \pm 0,055$	$-0,06206 \pm 0,0067$
308,15	$-0,8 \pm 1,0$	$0,12 \pm 0,47$	$-0,005 \pm 0,047$	$1,829 \pm 0,039$	$-0,0392 \pm 0,0048$

Na wykresie 14 przedstawiłam przykładowy udział członów równania 31 (wraz z ich sumą) dla wartości $\Delta_t V_\phi^0$ n-butylomocznika, a na wykresie 15 ukazałam składowe równania 29 dla wartości $\Delta_t K_{s,\phi}^0$ n-butylomocznika (w T=288,15K).

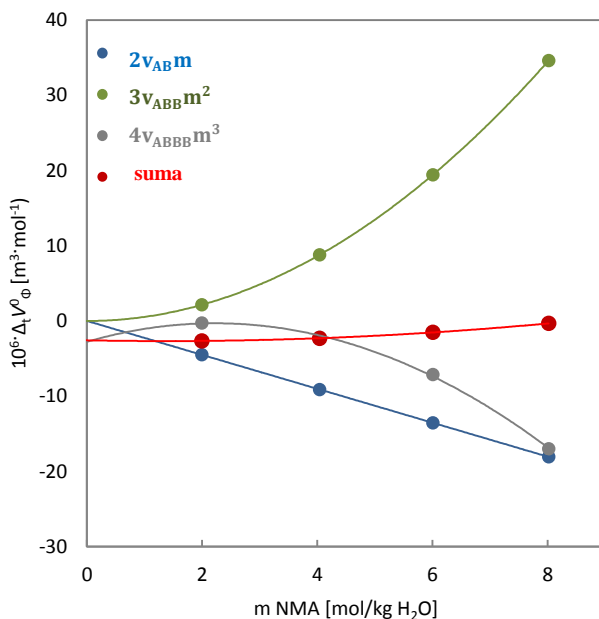




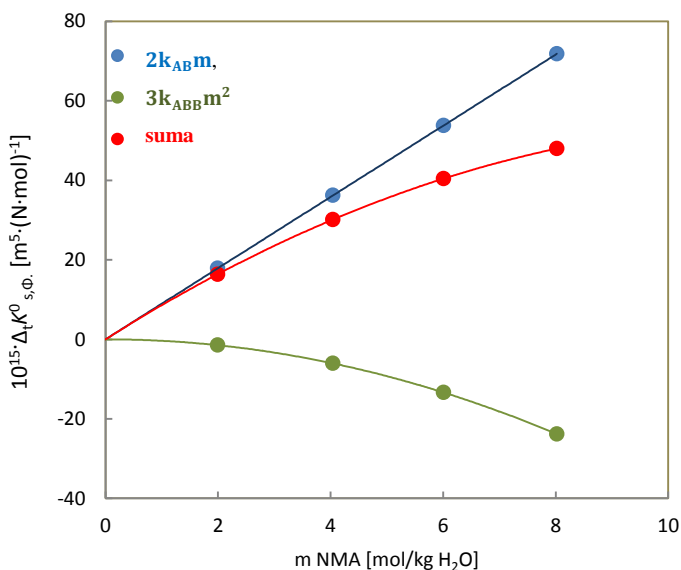
Wykres 12. Zależność funkcji przeniesienia objętości od molalności rozpuszczalnika dla TMAO zawierająca 3 składowe (•), oraz udziały poszczególnych członów wielomianu uwzględniające współczynniki oddziaływań: $2v_{AB}m$, $3v_{ABB}m^2$, $4v_{ABBB}m^3$ w $T=288,15K$.



Wykres 13. Zależność funkcji przeniesienia objętości od molalności rozpuszczalnika dla TMAO zawierająca tylko 2 składowe (•), oraz udziały poszczególnych członów wielomianu uwzględniające współczynniki oddziaływań: $2v_{AB}m$, $3v_{ABB}m^2$ w $T=288,15K$



Wykres 14. Zależność funkcji przeniesienia objętości od molalności rozpuszczalnika dla *n*-butylomocznika (BU) zawierająca 3 składowe (*), oraz udziały poszczególnych członów wielomianu uwzględniające współczynniki oddziaływań: $2v_{AB}m$, $3v_{ABB}m^2$, $4v_{ABBB}m^3$ w $T=288,15K$.



Wykres 15. Zależność funkcji przeniesienia pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej od molalności rozpuszczalnika dla *n*-butylomocznika (BU) zawierająca 2 składowe (*), oraz udziały poszczególnych członów wielomianu uwzględniające współczynniki oddziaływań: $2k_{AB}m$, $3k_{ABB}m^2$ w $T=288,15K$.



Omówienie wyników- pomiary wolumetryczne i akustyczne

Dane eksperymentalne wskazują, że badane związki chemiczne mają różny wpływ na otaczające je wodne środowisko. Użyte techniki pozwalają na zmierzenie jedynie sumarycznych efektów zjawisk występujących w układzie. Oznacza to, że możliwe jest zbadanie jedynie głównych oddziaływań w układzie substancja rozpuszczona-woda. Graniczna pozorna objętość molowa substancji rozpuszczonej, V_{ϕ}^0 , jest sumą jej objętości własnej, V_w i całkowitego efektu w zmianach objętości rozpuszczalnika, V_{odd} .

$$V_{\phi}^0 = V_w + V_{odd} \quad (32)$$

Zmiany we właściwościach rozpuszczalnika mogą być wynikiem pojawienia się oddziaływań między cząsteczkami rozpuszczonymi a rozpuszczalnikiem lub osłabienia/wzmocnienia już istniejących oddziaływań w układzie. Molowe objętości cząstkowe substancji organicznych są dodatnie, gdyż w dużej mierze determinowane są przez objętość własną związku. W roztworach wodnych wartości współczynnika S_v z równania 12 wskazują na dominujący charakter oddziaływania między cząsteczkami substancji rozpuszczonej: dodatnie wartości S_v świadczą o oddziaływaniach hydrofilowych, a ujemne o hydrofobowych.

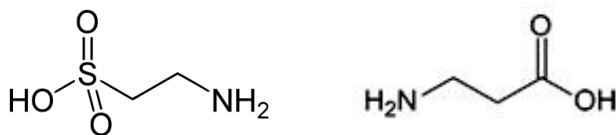
W czystej wodzie glicyna, tauryna i *N,N,N*-trimetyloglicyna mają formę jonu obojnaczego. Można przypuszczać, że w ich roztworach zarówno pomiędzy dwiema cząsteczkami substancji rozpuszczonej jak i między substancją rozpuszczoną a rozpuszczalnikiem będą dominować oddziaływania hydrofilowe. Dodatnie wartości parametru S_v (tabelka 6) dla glicyny i tauryny również potwierdzają to przypuszczenie, jednakże ze względu na dłuższy łańcuch hydrofobowy w cząsteczce tauryny wartości tego parametru są niższe i osiągają wartości bliskie 0, dla najwyższej mierzonej temperatury. Silne bezpośrednie oddziaływania pomiędzy tauryną/glicyną i cząsteczkami wody, mają też odzwierciedlenie w dużych ujemnych wartościach ściśliwości we wszystkich mierzonych temperaturach. Mniejszy wpływ temperatury na zmianę ściśliwości glicyny niż tauryny jest kolejnym dowodem na to, że cząsteczka tauryny jest mniej hydrofilowa niż cząsteczka glicyny.

Tauryna jest aminokwasem sulfonowym i wartość jej pozornej molowej ściśliwości nie jest tak ujemna jak dla aminokwasów z grupą karboksylową. Związek ten jest analogiem strukturalnym β -alaniny, co widoczne jest na rysunku 23. Ściśliwość, $K_{s,\phi}$, w temperaturze 298,15K dla β -alaniny jest równa $-26,3 \cdot 10^{-15} \text{ m}^5/(\text{mol} \cdot \text{N})$, a dla tauryny jest wyższa o około $6,5 \cdot 10^{-15} \text{ m}^5/(\text{mol} \cdot \text{N})$. Na tej podstawie można wnioskować, że grupa sulfonowa oddziałuje słabiej z cząsteczkami wody w porównaniu do grupy karboksylowej obecnej w aminokwasach.

Stwierdzenie wskazujące na to, że tauryna jest związkiem mniej hydrofilowym niż glicyna czy że grupa SO_3^- oddziałuje słabiej z cząsteczkami wody w porównaniu do grupy COO^- nie jest nowością, ale badania te pokazują jak dzięki prostym pomiarom gęstości i szybkości



dźwięków roztworów można wnioskować na temat hydrofilowości/hydrofobowości związków nieznanymi i bardziej skomplikowanymi.



Rysunek 23. Wzór strukturalny po lewej: tauryny, po prawej β -alaniny.

Analiza wyników dla TMAO i *N,N,N*-trimetyloglicyny nie jest tak oczywista jak w powyższych przypadkach. TMAO ma stosunkowo dużą objętość właściwą, umiarkowanie ujemną ściśliwość i ujemne wartości parametrów S_v i S_k z równań 12 i 24. Cząsteczka ta ma bardzo rozbudowaną część hydrofobową i objętościowo małą część hydrofilową. Wydaje się, że oddziaływania hydrofobowe dla tej cząsteczki odgrywają ważną rolę, ponieważ powodują niewielkie, ale mierzalne obniżenie pozornej objętości molowej i ściśliwości adiabatycznej wraz ze stężeniem dodatku TMAO. Obecność hydratacji hydrofobowej wyrażona jest również w dużym wpływie temperatury na $K_{s,\phi}^0$. Większe zmiany są widoczne dla TMAO niż dla hydrofilowych cząsteczek, na przykład glicyny. Te właściwości mają swoje odzwierciedlenie w obliczonych granicznych liczbach hydratacyjnych S_n^0 . Wzrost temperatury o 10 K zmniejszył S_n^0 o 1,3 cząsteczki wody dla TMAO, to jest, dwa razy więcej niż w przypadku glicyny. *N,N,N*-trimetyloglicyna natomiast charakteryzuje się stosunkowo dużą objętością właściwą (podobnie jak TMAO), umiarkowanie ujemną ściśliwością (podobnie jak TMAO), wysokimi dodatnimi wartościami parametru S_k i bliskimi zeru wartościami parametru S_v (nie dającymi się określić, ze względu na błąd, jako dodatnie lub ujemne). Wzrost temperatury o 10 K zmniejszył S_n^0 o 1,3 cząsteczki, czyli tyle samo co w przypadku TMAO, przy czym liczba hydratacyjna dla betainy jest najwyższa ze wszystkich badanych związków.

Analiza danych dla NMA wskazuje na silniejsze oddziaływania hydrofobowe niż w przypadku TMAO czy betainy. Oddziaływania pomiędzy dwiema cząsteczkami NMA mają charakter hydrofobowy, o czym m.in. ujemna wartości parametru S_v . Badania IR wykazały, że NMA w wodnych roztworach nie oddziałuje silnie z wodą. Liczby hydratacyjne, obliczone dwoma niezależnymi metodami (wolumetryczno-akustyczną i spektroskopową) są niskie i wynoszą około 3. Wynikiem tego, jest mały wpływ stężenia na pozorną molową ściśliwość adiabatyczną. Obserwowalny jest mały wzrost wartości $K_{s,\phi}$ wraz ze wzrostem stężenia amidu, ale zmiany $K_{s,\phi}^0$ wraz z temperaturą są porównywane do TMAO i trochę niższe niż dla *N,N,N*-trimetyloglicyny. Wartości granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej NMA są dodatnie, jako jedyne spośród badanych przez mnie związków.



Wpływ temperatury na graniczną pozorną objętość molową może być uznane za kryterium, które pozwala na określenie właściwości burzących lub wzmacniających strukturę wody przez substancje rozpuszczonej [188]. Zgodnie z kryteriami stworzonymi przez Heplera substancja posiada właściwości:

- burzące strukturę rozpuszczalnika jeśli $\left(\frac{\partial V_{\phi}^0}{\partial T}\right)_P > 0$ i $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_P < 0$,
- wzmacniające strukturę rozpuszczalnika jeśli $\left(\frac{\partial V_{\phi}^0}{\partial T}\right)_P < 0$ i $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_P > 0$.

Zgodnie z przedstawionymi powyżej kryteriami:

- glicyna, tauryna, TMAO i *N,N,N*-trimetyloglicyna posiadają właściwości burzące strukturę wody;
- wartości $\left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_P$ dla *N,N,N*-trimetyloglicyny i TMAO są na tyle bliskie zeru, że nie da się powiedzieć jakie właściwości są dominujące dla tych związków.
- nie da się również przypisać właściwości burzących lub wzmacniających strukturę wody cząsteczce NMA, gdyż zarówno pierwsza jak i druga pochodna jest dodatnia. Zmiany wywołane obecnością amidu w wodzie są zbyt małe by jednoznacznie określić jej charakter.

Klasyfikacja ta jest bardzo prosta, ale wartości drugiej pochodnej są często na tyle niskie w porównaniu do niepewności, że nie da się określić ich znaku.

W pracy [178] zaproponowano kryteria dla nieelektrolitów, pozwalające określić ich właściwości w roztworach wodnych na podstawie pomiarów wolumetrycznych oraz szybkości dźwięku. Kryteria te zostały przedstawione w tabeli 18.

Tabela 18. Kryteria określające właściwości osmolitów w roztworach wodnych.

	Związki burzące strukturę wody	Hydratacja hydrofilowa	Silne oddziaływania woda-cząsteczka rozpuszczona	Hydratacja hydrofobowa
S_v	< 0	> 0	≈ 0	< 0
$V_{\phi}^0 - V_{vdw}$	>> 0	> 0	> 0	> 0
$K_{S,\phi}^0$	>> 0	< 0	<< 0	<< 0
$\Delta K_{S,\phi}^0 / \Delta T$	duży	mały	mały	duży

W tabeli 19 przedstawiono omawiane wartości parametrów dla badanych przeze mnie osmolitów.

Zgodnie z tabelami stwierdzam, że:

- W roztworach glicyny i tauryny przeważają oddziaływania hydrofilowe,
- NMA osłabia strukturę wody,



- w roztworach *N,N,N*-trimetyloglicyny występują dość silne oddziaływania woda-betaina,
- TMAO wykazuje właściwości zarówno hydratacji hydrofobowej jak i silnych oddziaływań specyficznych pomiędzy cząsteczkami wody a cząsteczkami TMAO. Wartość parametru S_v jest ujemna i bliska zeru, natomiast $K_{S,\phi}^0$ duże ujemne dla wszystkich analizowanych temperatur.

Tabela 19. Parametry charakterystyczne dla wybranych związków chemicznych: glicyny (GLY), *N,N,N*-trimetyloglicyny (BET), *N*-tlenek trimetyloaminy (TMAO), tauryny (TAU), *N*-metyloacetamidu (NMA). Wartość $K_{S,\phi}^0$ jest niższa dla glicyny

	GLY	BET	TMAO	TAU	NMA
S_v	$\gg 0$	≈ 0	≈ 0	≈ 0	< 0
$V_\phi^0 - V_{vdw}$	> 0	> 0	> 0	> 0	$\gg 0$
$K_{S,\phi}^0$	$\ll 0^*$	< 0	< 0	$\ll 0^*$	$\gg 0$
$\Delta K_{S,\phi}^0 / \Delta T$	małe	średnie	średnie	mały	duży

Tak jak zostało to już wcześniej podkreślone, głównym celem tej pracy jest analiza oddziaływań w układach zawierający wodę, osmolit i *N*-metyloacetamid. W badaniach tych układów trójskładnikowych rozpuszczalnik stanowi wodny roztwór NMA. Porównanie wartości granicznych osmolitu w wodzie i wodnym roztworze NMA pozwoli mi ocenić wpływ NMA na hydratację osmolitu i siłę oddziaływań NMA-osmolit.

Parametr S_v , jest miarą oddziaływań substancja rozpuszczona – substancja rozpuszczona i jest stosunkowo łatwy do interpretacji w układach dwuskładnikowych. W układach trójskładnikowych jego znaczenie nie jest oczywiste. Wartości S_v dla każdego osmolitu zamieściłam w tabelach 10-12. Wszystkie związki, za wyjątkiem *n*-butylomocznika, zachowały ten sam znak S_v w roztworze z NMA, co w wodzie. Roztwory z TMU, TMAO i częściowo *N,N,N*-trimetyloglicyna w wodnym roztworze NMA charakteryzują się parametrem S_v poniżej zera, a glicyna i butylomocznik powyżej 0. Dla glicyny, TMU i BU, TMAO wraz ze wzrostem stężenia NMA wartości parametru S_v różnią się coraz bardziej od wartości tego parametru dla związków w wodzie czystej. Dla betainy wartości S_v pozostają w okolicach 0 tak samo jak dla układów dwuskładnikowych (betaina-woda).

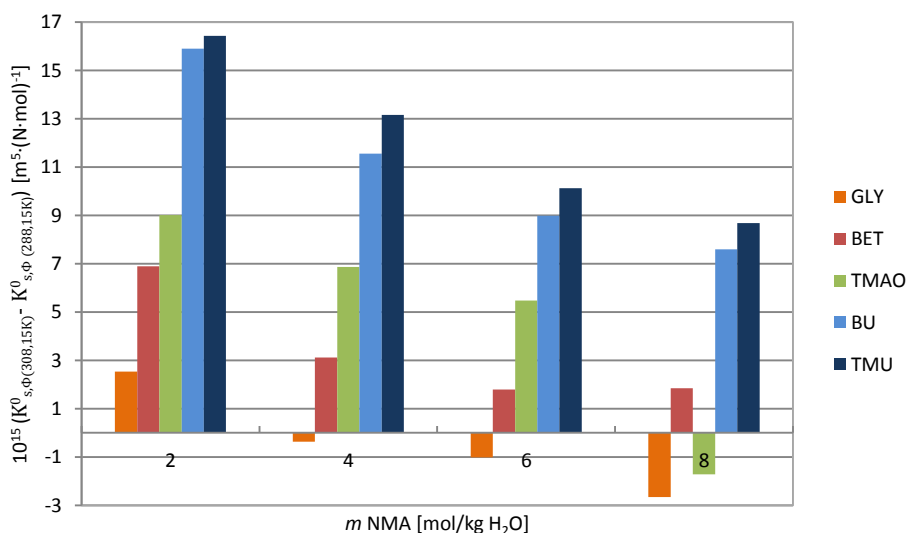
Analizując wartości granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej badanych osmolitów (tabele 13-15) w roztworach wodnych NMA można wyróżnić 3 grupy:

- związki, które mają wartości dodatnie $K_{S,\phi}^0$: BU i TMU i są to destabilizatory białka,
- związki które mają wartości ujemne $K_{S,\phi}^0$: GLY, TMAO i są to stabilizatory białka,



- *N,N,N*-trimetyloglicynę, która dla niższych stężeń NMA w układzie charakteryzuje się niewielkimi wartością $K_{S,\phi}^0$ (ujemnymi w 2 i 4 mol/kg roztworze NMA i dodatnimi w 6 i 8 mol/kg roztworze NMA).

Ze względu na wartości $K_{S,\phi}^0$ w wodnych roztworach NMA, osmolity można uszeregować malejąco: BU=TMU>BET≈0>TMAO>GLY. Widoczne jest podział na wartości ujemne $K_{S,\phi}^0$ dla stabilizatorów i dodatnie dla destabilizatorów. Dodatkowo da się zauważyć, że wartość $K_{S,\phi}^0$ rośnie wraz ze wzrostem stężenia NMA w rozpuszczalniku, ale dla stabilizatorów wzrost ten jest mniejszy. Analizując wpływ temperatury na wartości $K_{S,\phi}^0$ (wykres 16) można stwierdzić, że w przypadku destabilizatorów BU i TMU wpływ ten jest dwukrotnie większy niż w przypadku stabilizatorów. Dla GLY i TMAO w roztworach NMA o wysokich stężeniach wartości $K_{S,\phi}^0$ są wyższe w temperaturze 288,15K niż 308,15K (jedyne ujemne wartości na wykresie 16). Wartości parametru S_K nie wykazują zależności od stężenia NMA. Jego zmiany wraz z temperaturą lub molalnością NMA nie są specyficzne dla grupy stabilizatorów/destabilizatorów.



Wykres 16. Różnica granicznych pozornych molowych ściśliwości abiatacyjnych w 308,15K i 288,15K dla wszystkich analizowanych osmolitów w zależności od stężenia NMA w rozpuszczalniku.

Charakterystycznymi parametrami dla układów trójskładnikowych są za to funkcje przeniesienia granicznej pozornej molowej objętości, $\Delta_t V_\phi^0$, i ściśliwości abiatacyjnej $\Delta_t K_{S,\phi}^0$, które zestawiono w tabeli 16. Dla wszystkich związków i dla wszystkich zmierzonych temperatur, za wyjątkiem glicyny, wartości $\Delta_t V_\phi^0$ są ujemne (rys.10). Glicyna jest związkiem



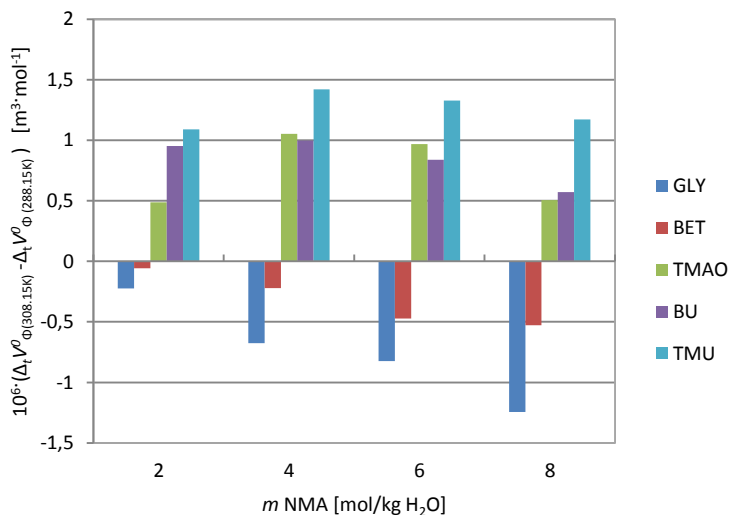
hydrofilowym i dodatnie wartości $\Delta_t V_\phi^0$ mogą być wynikiem zmniejszonego udziału zjawiska elektrostrykcji w wyniku oddziaływań hydrofilo-hydrofilowych pomiędzy cząsteczką glicyny i NMA. Betaina i TMAO są cząsteczkami z grupą hydrofilową i hydrofobową po obu stronach, które w wodzie tworzą zwitteriony i silnie oddziałują z wodą. Dodatek NMA do rozpuszczalnika u obu związków wywołał podobne efekty tj. $\Delta_t V_\phi^0$ są ujemne i zmiana temperatury nie wpływa na nie znacząco. Ujemne wartości $\Delta_t V_\phi^0$ są głównie wynikiem oddziaływań hydrofilo-hydrofilowych i hydrofobo-hydrofobowych pomiędzy tymi cząsteczkami (betainy/TMAO) a cząsteczkami NMA. Najbardziej ujemne wartości otrzymano dla roztworów n-butyloamocznika i *N,N,N',N'*-termetyloamocznika, ale inny jest wpływ stężenia rozpuszczalnika na wartość $\Delta_t V_\phi^0$ dla obu tych związków. Ujemne wartości $\Delta_t V_\phi^0$ można tłumaczyć występowaniem głównie oddziaływań hydrofobo-hydrofobowych pomiędzy cząsteczkami BU-NMA. Wzrost ilości NMA w roztworze prowadzi do zwiększenia znaczenia oddziaływań hydrofilo-hydrofilowych w układzie z BU. W przypadku TMU sytuacja jest odwrotna i wraz ze wzrostem stężenia NMA w układzie zmniejsza się wartość $\Delta_t V_\phi^0$, a wraz z nią umacniają się oddziaływania hydrofobo-hydrofobowe.

Funkcje przeniesienia granicznej pozornej ściśliwości abiatycznej są dodatnie dla wszystkich roztworów we wszystkich temperaturach (wykres 11). Wraz ze wzrostem stężenia NMA dla wszystkich osmotów wartości $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ rosną. Badane osmoty można uszeregować następująco wg. wzrastającej wartości $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ TMAO<BET<GLY<TMU<BU. Najwyższe wartości $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ przyjmują więc destabilizatory białek.

Można też prześledzić wpływ temperatury na wartości $\Delta_t V_\phi^0$ i $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ (odpowiednio wykres 17 i 18). W przypadku wpływu wzrostu temperatury na $\Delta_t V_\phi^0$ można wydzielić dwie grupy:

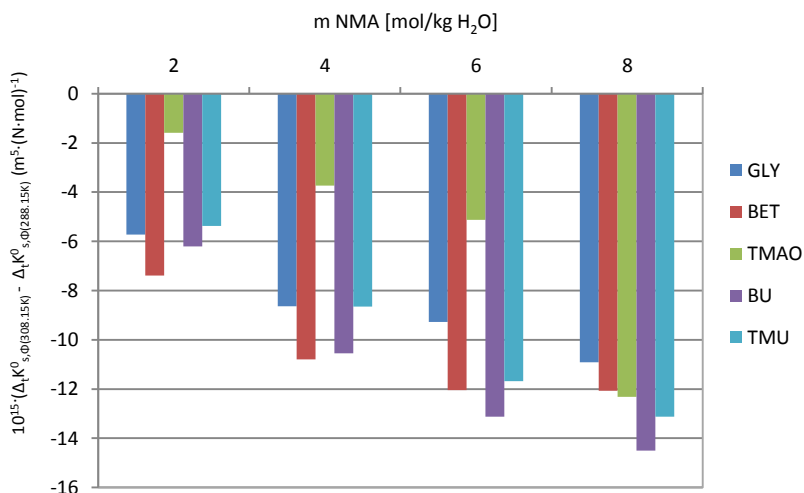
- GLY i BET dla których wzrost temperatury powoduje wzrost $\Delta_t V_\phi^0$,
- BU, TMU i TMAO dla których wzrost temperatury powoduje spadek $\Delta_t V_\phi^0$.





Wykres 17. Różnice między wartością $\Delta_t V_\phi^0$ w 308,15K, a wartością $\Delta_t V_\phi^0$ w 288,15K dla poszczególnych osmolitów w roztworach o określonym stężeniu NMA: glicyna (GLY), N,N,N-trimetyloglicyna (BET), N-tlenek trimetyloaminy (TMAO), n-butyloamocznik (BU), N,N,N',N'-tetrametyloamocznik.

Analizując wpływ temperatury na $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ (wykres 18) wyróżniającym się osmolitem jest TMAO. Dla niskich stężeń NMA w roztworach z TMAO ten wpływ jest początkowo bardzo mały, a dla najwyższego stężenia dodatku amidu wzrasta do poziomu porównywalnego z innymi osmolitami.



Wykres 18. Różnice między wartością $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ w 308,15K, a wartością $\Delta_t K_{S,\phi}^0$ w 288,15K dla poszczególnych osmolitów w roztworach o określonym stężeniu NMA w wodzie, glicyna (GLY), N,N,N-trimetyloglicyna (BET), N-tlenek trimetyloaminy (TMAO), n-butyloamocznik (BU), N,N,N',N'-tetrametyloamocznik.



Wykorzystując teorię McMillan i Mayera oraz funkcje przenoszenia można wyznaczyć udziały poszczególnych oddziaływań między osmolitem a cząsteczkami NMA. Obliczone parametry tych oddziaływań z równań 29-31 znajdują się w tabeli 17. Glicyna jest jedynym osmolitem, spośród badanych, który ma dodatni parametr v_{AB} odpowiadający za wkład oddziaływań osmolit- 1 cząsteczka NMA w funkcji przenoszenia objętości. Dodatkowo da się zauważyć, że dla BU i TMU (grupy destabilizatorów) bezwzględne wartości tego parametru są dużo większe niż dla pozostałych badanych osmolitów, które są stabilizatorami. Parametr v_{ABB} dla wszystkich osmolitów jest dodatni. Dla wszystkich układów, oprócz roztworów TMAO, przypisałam trzy składowe funkcji przenoszenia objętości. Dla wszystkich osmolitów przypisałam po dwa parametry składowe funkcji przeniesienia granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatyycznej i pierwszy z nich k_{AB} jest dodatni (dla destabilizatorów dużo większy niż dla stabilizatorów), drugi k_{ABB} znacznie mniejszy (20-50krotnie) i ujemny.

Badane przeze mnie układy osmolitów w wodzie (glicyna, *N,N,N*-trimetyloglicyna, *N*-tlenek trimetyloglicyny, tauryna) posiadają, jak już zostało to wspomniane w podrozdziale 1.4, właściwości stabilizujące białko. Jak zostało zbadane między innymi w pracy [59], efekt wywołany przez cząsteczkę rozpuszczoną na strukturę otaczającej jej wody, nie jest czynnikiem determinującym jej właściwości stabilizujące. Do tej pory badając parametry wolumetryczne i akustyczne nie udało się znaleźć wyraźnych różnic między osmolitami stabilizującymi i destabilizującym. W zespole, w którym pracowałam, padł pomysł analizy układów trójskładnikowych, które zawierają oprócz wody i osmolitu, również cząsteczkę *N*-metyloacetamidu, która pełni rolę modelu łańcucha głównego białka.

Jedna z różnic pomiędzy destabilizatorami i stabilizatorami jest widoczna w wartościach granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatyycznej, która dla destabilizatorów w całym zakresie badanych stężeń NMA i temperatur jest dodatnia. Dla stabilizatorów natomiast $K_{S,\Phi}^0$ przyjmuje wartości ujemne przy niskich (2 i 4 mol/kg) stężeniach NMA w roztworze.

Kolejną cechą charakterystyczną jest mocniejsza zależność $K_{S,\Phi}^0$ od temperatury dla destabilizatorów w porównaniu do osmolitów stabilizujących.

Warto zauważyć również, że związkami dla których funkcje przeniesienia granicznej pozornej ściśliwości adiabatyycznej ($\Delta_t K_{S,\Phi}^0$), są znacznie wyższe niż dla pozostałych badanych związków, są pochodne mocznika.

Porównując bezwzględne wartości parametrów v_{AB} i k_{AB} można dostrzec, że dla związków obniżających stabilność białka, są one znacznie wyższe niż dla związków zwiększających jego stabilność.

Zastosowanie wodnego roztworu NMA, jako rozpuszczalnika dla osmolitów stabilizujących i destabilizujących umożliwiło rozróżnienie tych związków w prostych badaniach wolumetrycznych i akustycznych.

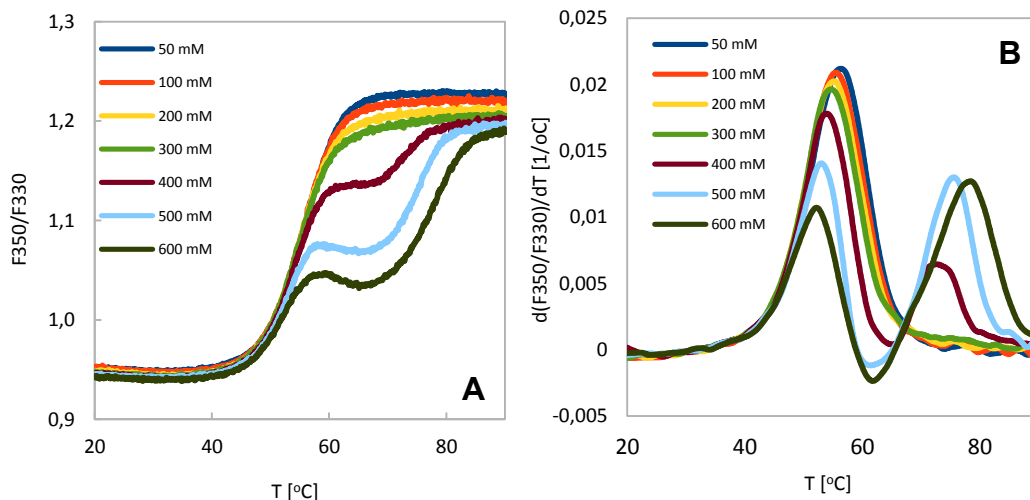


5.3. *Pomiary nanoDSF - wpływ osmolitów na temperaturę denaturacji lizozymu*

Jak zostało to wcześniej wspomniane (podrozdział 4.1.3.) badania dotyczące możliwości powstawania włókien z HEWL w obecności osmolitów zostały przeprowadzone w środowisku kwaśnym przy zachowaniu kontroli siły jonowej. Wiadomo również, że klasyfikacja osmolitów na stabilizatory i destabilizatory białka nie jest jednoznaczna i zależy m.in. od rodzaju białka, stężenia osmolitu, pH i siły jonowej roztworu. Z tego powodu zdecydowano się na zmierzenie temperatury denaturacji HEWL w roztworach odpowiadających tym, w których obserwowany będzie proces mogący prowadzić do powstania amyloidów.

Jednym z czynników wpływających na przebieg procesu denaturacji białka jest stężenie (siła jonowa) i wartościowość jonów wodnego roztworu, która znacznie różniła się dla wykorzystanych osmolitów. Potrzebne więc było przeprowadzenie eksperymentu denaturacji termicznej lizozymu z białka jaja kurzego przy pH=2 dla roztworów o różnej sile jonowej. Wyniki tych badań zaprezentowałam w formie wykresów 19-21. Pierwszy wykres ukazuje stosunek intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w zależności od temperatury (F_{350}/F_{330}), a drugi przedstawia zależność pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F_{350}/F_{330})/\partial(T)$).

Na wykresie zależności stosunku F_{350}/F_{330} od temperatury dla HEWL bez dodatku osmolitów można zauważyć, że proces rozwinięcia lizozymu może być jedno- lub dwustopniowy w zależności od wartości siły jonowej w roztworze. Dla HEWL w roztworze o stężeniu siły jonowej poniżej 300 mM proces ten jest jednoetapowy, w roztworach o sile jonowej 400 mM i wyższej dwustopniowy. Widoczny jest również spadek temperatury pierwszego etapu denaturacji - T_{m1} wraz ze wzrostem siły jonowej. Największe zmiany w procesie denaturacji zachodzą w przedziale 300-400 mM siły jonowej, kiedy to proces z jednostopniowego staje się dwustopniowy i możliwe staje się wyznaczenie temperatury denaturacji drugiego etapu rozwijania białka - T_{m2} .

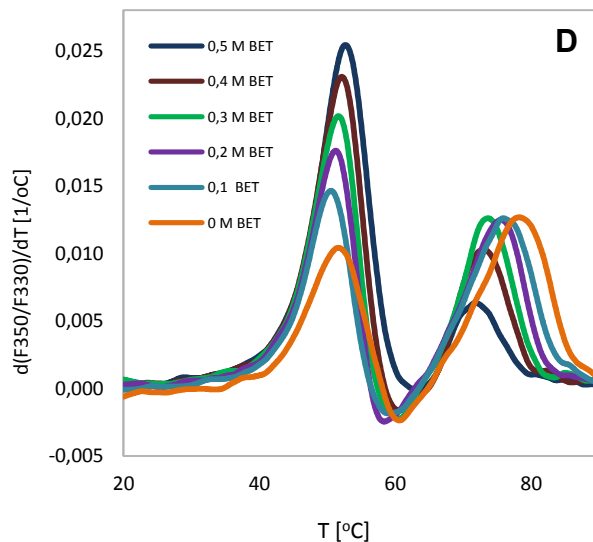
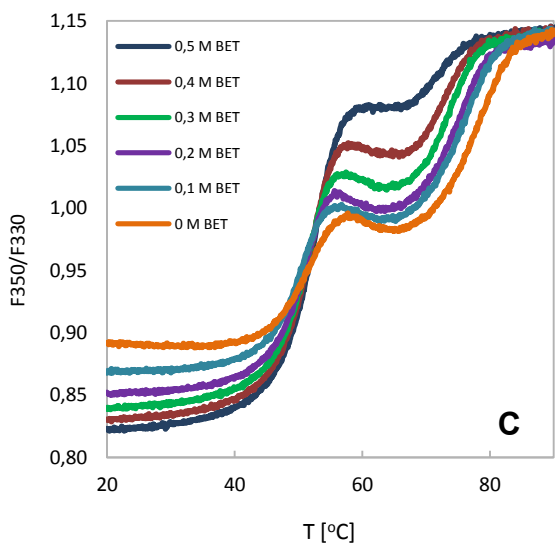
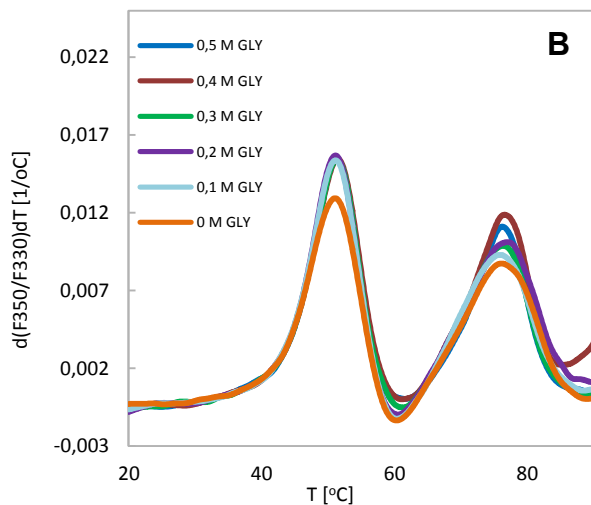
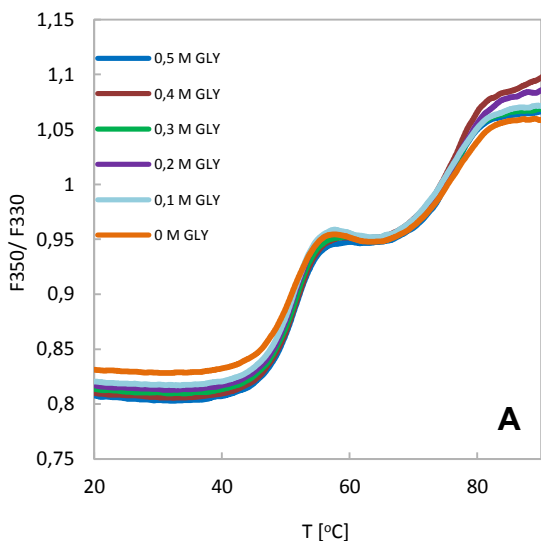


Wykres 19 . A: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnej sile jonowej, B: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnej sile jonowej.

Dla każdego wybranego do tej części eksperymentu osmolitu zbadalam przebieg denaturacji termicznej mając na uwadze, że roztwory:

- *N,N,N,N'*-tetrametylomocznik i *n*-butylomocznik charakteryzowały się siłą jonową około 210 mM
- Glicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny, tauryny wykazywały siłą jonową około 600 mM
- TMAO charakteryzowały się siłą jonową około 500 mM.

Wyniki przedstawiono poniżej na wykresach 20-22, oddzielnie dla każdego osmolitu. Wartości temperatury denaturacji obliczyłam w programie PR.Analysis i zestawiałam w tabeli 20. W przypadku wyznaczania T_{m1} szacunkowy błąd wynosi około 1°C, a dla wyznaczania T_{m2} około 2°C. Powtarzalność wyników jest na zadowalającym poziomie.

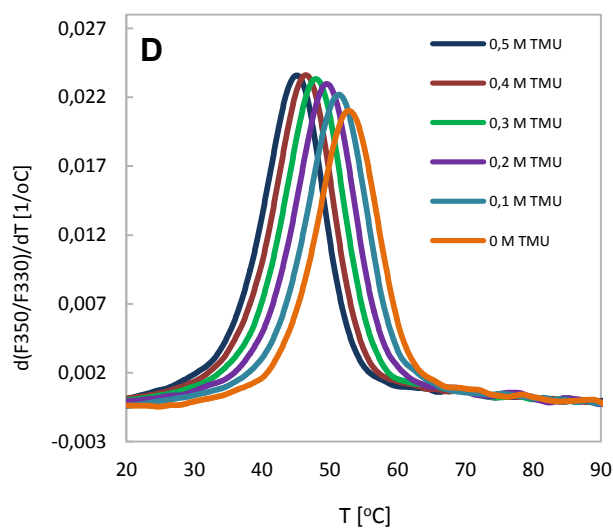
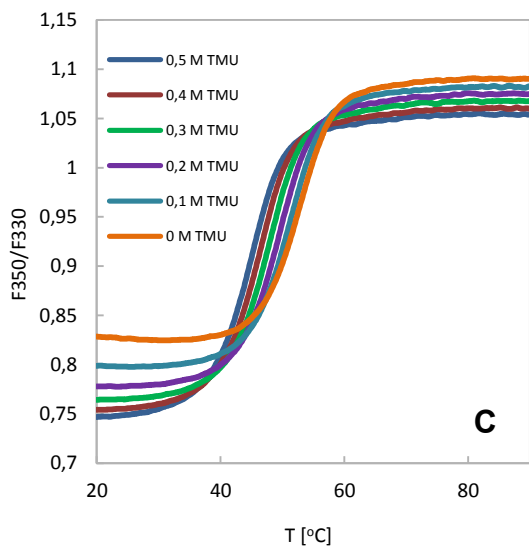
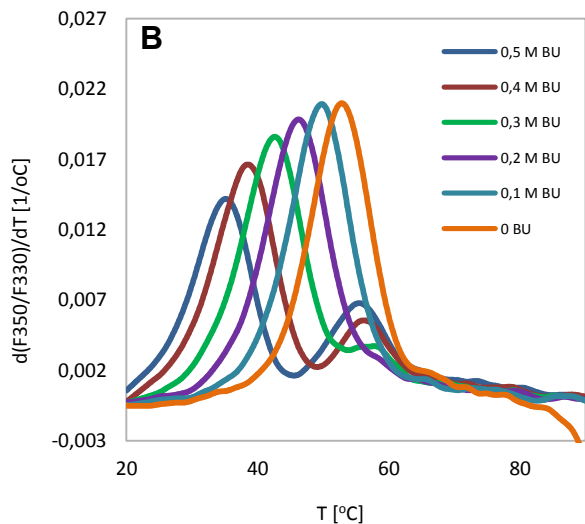
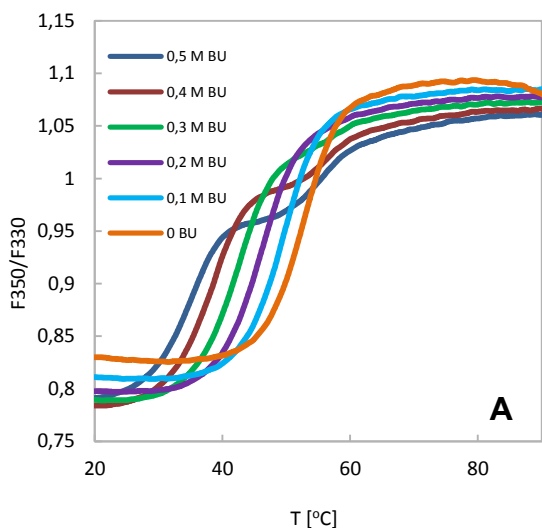


Wykres 20. A: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnym stężeniu glicyny,

B: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnym stężeniu glicyny,

C: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnym stężeniu N,N,N-trimetyloglicyny,

D: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnym stężeniu N,N,N-trimetyloglicyny.



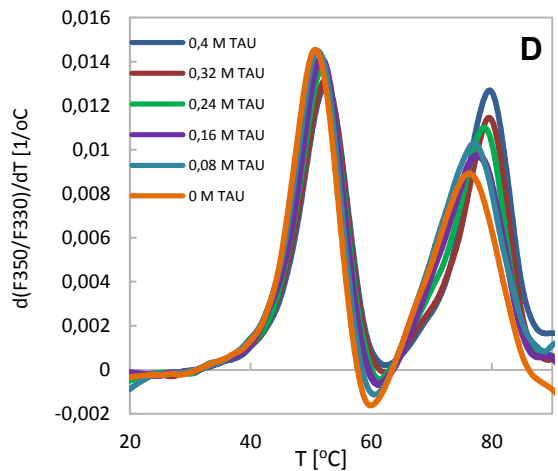
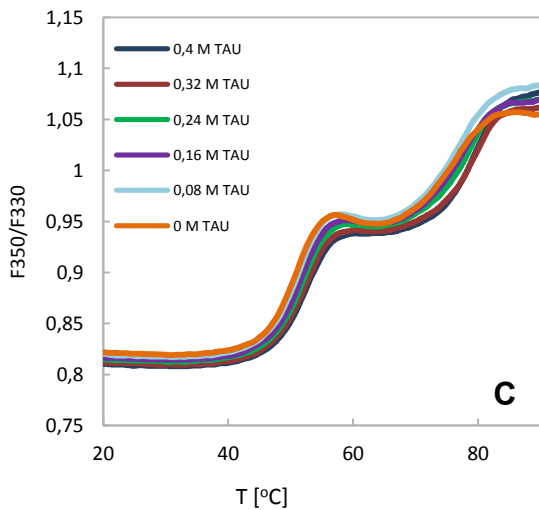
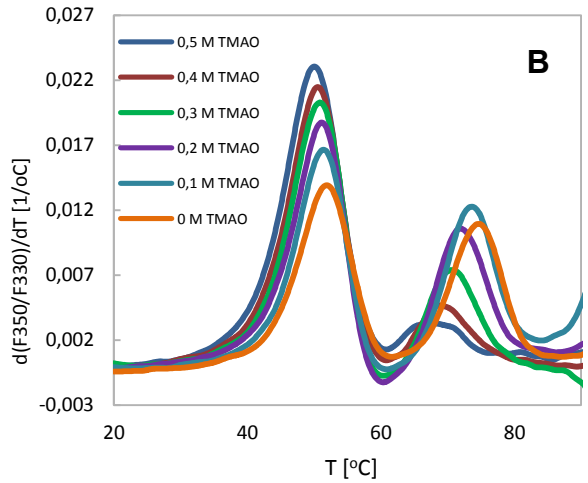
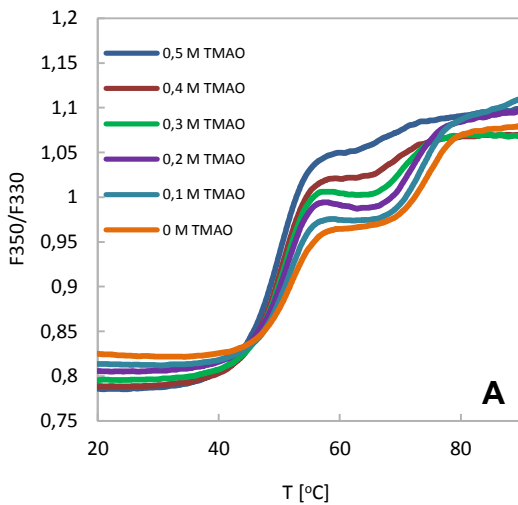
Wykres 21. A: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnym stężeniu n-butyloczynnika,

B: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnym stężeniu n-butyloczynnika,

C: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnym stężeniu N,N,N',N'-tetrametyloczynnika,

D: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnym stężeniu N,N,N',N'-tetrametyloczynnika.





Wykres 22. A: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnym TMAO, B: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnym stężeniu TMAO, C: zależność stosunku intensywności fluorescencji przy 350 nm do jej intensywności przy 330 nm w funkcji temperatury dla roztworów HEWL o różnym stężeniu tauryny, D: wykres zależności pierwszej pochodnej tego stosunku od temperatury ($\partial(F350/F330)/\partial(T)$) dla roztworów HEWL o różnym stężeniu tauryny.

Tabela 20. Temperatury denaturacji dla HEWL w zależności od stężenia i rodzaju dodatku.

Stężenie dodatku [mM]	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]	Stężenie dodatku [mM]	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]
Glicyna			N,N,N-trimetyloglicyna		TMAO		
0	51,1	76,5	51,5	78,3	0	51,9	74,8
100	51,1	75,9	50,4	76,2	100	51,4	73,7
200	51,1	76,8	50,9	75,3	200	51,1	72,1
300	51,3	76,3	51,4	73,7	300	50,8	70,7
400	51,4	76,7	51,9	72,9	400	50,5	69,1
500	51,3	76,3	52,6	71,8	500	50,0	-
n-butylomocznik			N,N,N',N'-tetrametylomocznik		Tauryna		
0	52,8	-	52,8	-	0	51,3	75,5
100	49,7	-	51,3	-	80	51,3	76,2
200	46,3	-	49,6	-	160	51,6	77,4
300	42,5	-	47,9	-	240	52,0	78,6
400	38,5	56,3	46,4	-	320	52,6	79,4
500	35,0	55,3	45,1	-	400	52,5	79,3

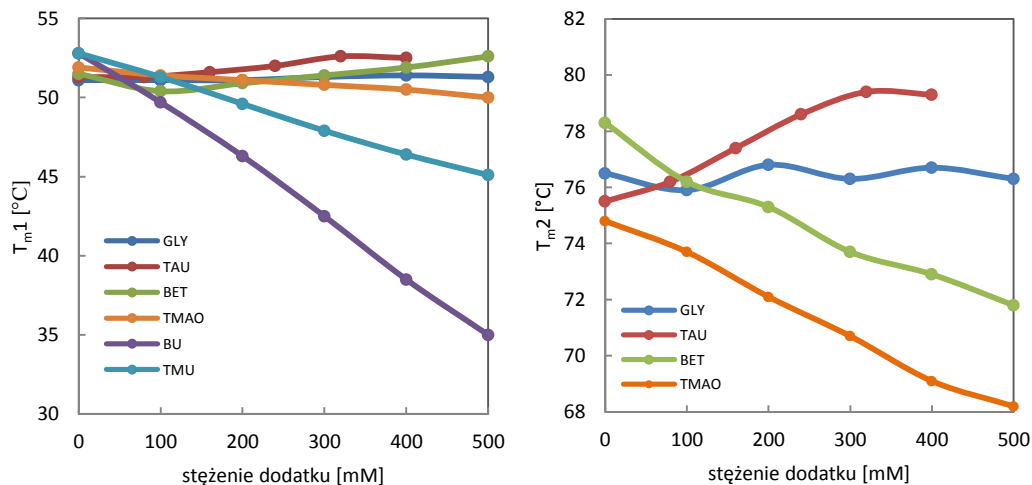
W literaturze jest niewiele doniesień, z którymi można porównać otrzymane przeze mnie wyniki. W publikacji [189] na podstawie pomiarów DSC, stwierdzono, że T_m dla wodnych roztworów lizozymu przy pH z zakresu 2-8 i sile jonowej do 500 mM jest stała i wynosi około 75°C. Dodatkowo artykuł ten wskazuje, że w tych warunkach denaturacja jest procesem wyłącznie jednostopniowym. Z drugiej strony zmierzone T_m dla roztworów lizozymu przez Sabulala pozostają w zgodzie z moimi, ale pojawiają się rozbieżności w przypadku wodnych roztworów HEWL z glicyną [190]. Różnice te mogą być wynikiem różnicy sił jonowych i pH roztworów, których wartości autorzy tej publikacji nie podali.

Badane roztwory białka w obecności różnych osmolitów charakteryzują się różnymi krzywymi denaturacji. Przedstawione wyniki pokazują, że w zależności od warunków, denaturacja HEWL może być jednostopniowa (dla wodnych roztworów z TMU, częściowo BU i częściowo TMAO) lub dwustopniowa (dla roztworów z: glicyną, betainą, tauryną, wysokimi stężeniami BU, niskimi stężeniami TMAO). Zjawisko to spowodowane jest przede wszystkim różnicami w sile jonowej roztworów, a nie samym rodzajem osmolitu. Przy niskich wartościach siły jonowej proces denaturacji HEWL w roztworze o pH=2 jest jednostopniowy.

W przypadku roztworów HEWL z dodatkiem glicyny i tauryny, wpływ tych osmolitów na przebieg krzywych denaturacji białka jest niewielki, w porównaniu do innych badanych



związków, które zauważalnie zmieniają przebieg procesu denaturacji termicznej HEWL. Zmiany w T_{m1} i T_{m2} wraz ze wzrostem stężenia dodatku przedstawiłam kolejno na wykresach 23 A i 23B.



Wykres 23. Po lewej: zmiany pierwszej temperatury denaturacji HEWL, T_{m1} , w zależności od stężenia dodatku osmolitu, po prawej: zmiany T_{m2} denaturacji HEWL w zależności od stężenia dodatku osmolitu.

Dla roztworów lizozymu z dodatkiem glicyny różnice w temperaturach denaturacji są praktycznie niezauważalne, dla tauryny niewielkie i wskazują na właściwości stabilizujące HEWL w tych warunkach. Mogłoby się wydawać, że w tych roztworach siła jonowa jest tak duża, że dodatek jakiegokolwiek związku nie będzie znacząco wpływał na zmiany w przebiegu procesu, ale kolejne roztwory, w których siła jonowa jest wysoka (około 600 mM) to roztwory HEWL z *N,N,N*-trimetyloglicyną, w których zmiany w krzywych denaturacji pod wpływem zmieniającego się stężenia betainy, są widoczne. Po początkowym spadku wartości T_{m1} przy niskich stężeniach betainy, następuje jej wzrost o około 1°C dla najwyższego stężenia dodatku w stosunku do roztworu bez dodatku. T_{m2} za to spada wraz ze wzrostem stężenia betainy. Dla najwyższego stężenia betainy w roztworze T_{m2} jest niższa o około 6°C w odniesieniu do drugiej temperatury denaturacji HEWL bez dodatku osmolitu. Jak można zobaczyć na wykresie 20 C dodatek betainy powoduje zwiększenie skoku stosunku fluorescencji (F350/F330) dla pierwszego stopnia, a zmniejsza skok (F350/F330) dla drugiego stopnia. Oznacza to, że wraz ze wzrostem stężenia dodatku betainy zmniejsza się znaczenie drugiego stopnia denaturacji. Patrząc na te wyniki trudno jest określić czy w podanych warunkach (pH=2 i sile jonowej około 600 mM) *N,N,N*-trimetyloglicyna jest destabilizatorem czy stabilizatorem lizozymu.

W roztworach HEWL z TMAO (wykresy 22 A i B) siła jonowa jest również wysoka i wynosi około 500 mM. Podobnie jak dla betainy na wykresach $(F350/F330)=f(T)$ widać spadek udziału drugiego skoku wraz ze wzrostem stężenia osmolitu. Dla najwyższego stężenia dodatku (500mM TMAO) denaturację lizozymu można uznać za 1 stopniową i nie wyznaczona została T_{m2} . W podanych warunkach wraz ze wzrostem stężenia dodatku TMAO, spada zarówno pierwsza T_{m1} jak i druga T_{m2} temperatura przejścia. Różnice między T_{m1} dla HEWL bez dodatku i w obecności 400 mM TMAO (w roztworach w których denaturacja białka jest jeszcze dwustopniowa) wynosi około 1,5°C, dla T_{m2} różnica wynosi około 4,7°C.

Denaturantami białka, których wpływ na proces rozfałdowania HEWL zbadano były pochodne mocznika: *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik i *n*-butylomocznik (wykres 21 ABCD). Dla obu związków siła jonowa w roztworze białka wynosiła około 210 mM. Zarówno dla roztworów lizozymu z BU jak i TMU następuje wyraźny spadek T_{m1} wraz ze wzrostem stężenia dodatku. Dla roztworu białka zawierających 500 mM BU spadek ten wynosi około 17°C a dla roztworów z 500 mM TMU prawie 8°C.

W tych specyficznych warunkach wybrane pochodne mocznika można określić jako destabilizatory. Pośród zbadanych związków w podanych warunkach właściwości stabilizujące wykazuje tylko tauryna.



5.4. Badanie procesu tworzenia się włókien amyloidowych w roztworach osmolitów

W poniższej części zaprezentowane zostaną wyniki śledzenia zmian zachodzących w strukturze lizozymu z białka jaja kurzego pod wpływem wodnych roztworów osmolitów w różnych stężeniach inkubowanych przez 10 dni w 45°C przy pH=2.

Lizozym z białka jaja kurzego bez dodatku osmolitu

Moim roztworem odniesienia będzie roztwór lizozymu o pH=2 i odpowiedniej sile jonowej, takiej jak w roztworze z dodatkiem osmolitu. Z tego powodu na początku zestawię dane dla poszczególnych technik eksperymentalnych dla roztworu HEWL, bez dodatku osmolitu, do którego będę odnosić pozostałe wyniki.

- **Spektroskopia fluorescencyjna w obecności tioflawiny T:**

W moich badaniach wykorzystałam zdolność tetrahydrotiofenu do wiązania się ze strukturami beta-kartek w białku, co pozwala zbadać wpływ osmolitów na przebieg procesu amyloidogenezy HEWL. Początkowa intensywność fluorescencji ThT dla obu roztworów lizozymu jest na podobnym poziomie, końcowa po 10 dniach inkubacji również (tabela 21). Widoczna jest natomiast różnica w przyroście intensywności fluorescencji w początkowej fazie inkubacji próbek, do dnia 3. Próbką białka o wyższej sile jonowej bardzo szybko osiąga maksymalną intensywność fluorescencji, a dla próbki o niższej sile jonowej wzrost ten jest stopniowy, nie tak gwałtowny.

Tabela 21. Zmiany w intensywności fluorescencji w obecności tioflawiny T dla roztworów HEWL o pH=2 i ustalonej sile jonowej, podczas inkubacji w 45°C przez określoną liczbę dni.

Liczba dni	Intensywność fluorescencji (485 nm)	
	Siła jonowa [mM]	
	600	200
0	198±4	219±11
3	860±39	384±6
7	762±34	-
10	837±30	881±34

- **Spektroskopia dichroizmu kołowego:**

Początkowe zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych są na podobnym poziomie w lizozymie w roztworze o niższej i wyższej sile jonowej (tabela 22). Wydaje się, że



w roztworze z większym dodatkiem jonów szybciej zachodzi proces, w którym zmniejsza się udział alfa helis na rzecz wzrostu udziału beta kartek i struktur nieuporządkowanych.

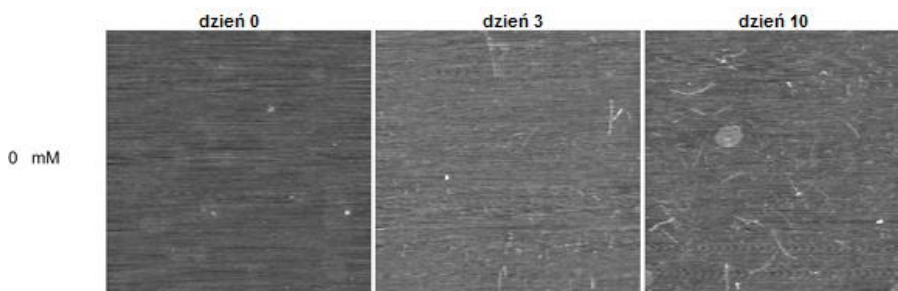
Tabela 22. Zmiany w zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych w roztworach HEWL o pH=2 i ustalonej sile jonowej, podczas inkubacji w 45°C przez określoną liczbę dni.

Dzień	Stężenie dodatku	Alfa helisy [%]	Beta kartki [%]	Zwroty i struktura nieuporządkowana [%]
Próbka bez dodatków zawartość jonów wysoka (600mM)				
0	0	37	17	47
3	0	33	16	51
7	0	31	17	51
10	0	31	17	51
Próbka bez dodatków zawartość jonów niska (200mM)				
0	0	36	15	48
3	0	35	17	47
10	0	33	13	53

W próbce o sile jonowej 200 mM po 10 dniach widoczny jest spadek zawartości beta-kartek i alfa helis i wzrost struktury nieuporządkowanej w stosunku do początku inkubacji. Struktura II-rzędowa lizozymu z białka jaja kurzego inkubowanego w roztworze bez dodatku osmolitu, ale sile jonowej około 200 mM, podlega małym, ale zauważalnym zmianom. Udział procentowy struktur alfa-helikalnych maleje wraz z upływem czasu inkubacji, podczas gdy udział struktur nieuporządkowanych rośnie. Co ciekawe, nie jest widoczny wzrost zawartości beta-kartek. Pozostałe pomiary (AFM czy spektroskopia fluorescencyjna) potwierdzają obecność włókien w inkubowanym roztworze białka bez dodatków osmolitu. Wysoka siła jonowa (600mM) nie zmienia znacząco początkowej struktury łańcucha polipeptydowego. Po 7 dniach natomiast zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych w lizozymie stabilizuje się i pozostaje niezmienna do końca eksperymentu.

- Mikroskopia sił atomowych (AFM)

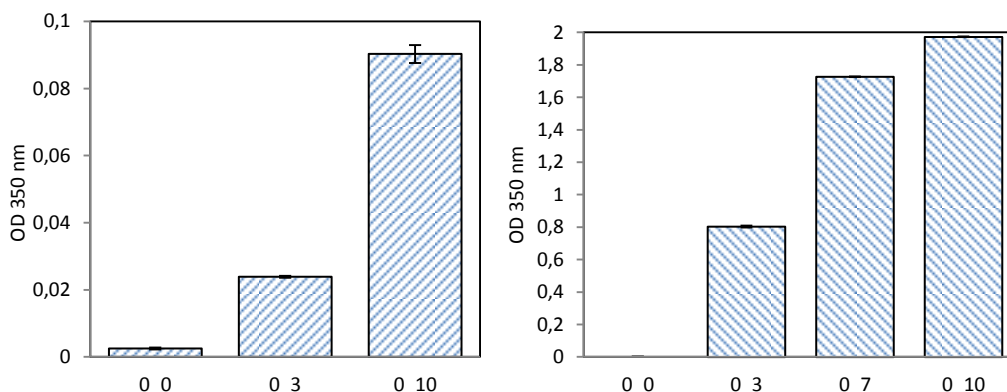
W przypadku roztworów HEWL o sile jonowej około 200 mM po 10 dniach inkubacji w temp. 45°C widoczne są liczne i cienkie włókna (rys. 24).



Rysunek 24. Obrazy AFM roztworu HEWL w roztworze o pH=2, sile jonowej 200 mM w trakcie trwania inkubacji [191].

- Turbidymetria

Dla dwóch roztworów HEWL o różnych stężeniach siły jonowej, wraz z upływem czasu inkubacji w podwyższonej temperaturze, zwiększa się gęstość optyczna (wykres 24). Dla próbek o wyższej sile jonowej wartość gęstości optycznej po 10 dniach jest około 20-krotnie wyższa.



Wykres 24. Wykres gęstości optycznej dla 350 nm dla roztworów lizozymu bez dodatku osmolitu. Po lewej dla roztworów o sile jonowej 200 mM, po prawej dla 600 mM. Oznaczenie próbek: stężenie dodatku_czas inkubacji, np. 0_7 to roztwór lizozymu bez dodatku osmolitu po 7 dniach inkubacji.

Lizozym w roztworach osmolitów

- Spektroskopia fluorescencyjna w obecności tioflawiny T

Wyniki spektroskopii fluorescencyjnej w obecności tioflawiny T z dla roztworów z zawierających osmolity przedstawiono w tabeli 23 i 24. Ze względu na różną siłę jonową próbek zawierających białko bez dodatku dla BU/TMU i BET/GLY fluorescencja tych roztworów jest różna. Jak już wcześniej wspomniałam, dla próbki HEWL bez dodatku osmolitu przy niższej zawartości jonów (tabela 24) widoczny jest stopniowy wzrost fluorescencji wraz z upływem czasu, a dla wyższej zawartości jonów (tabela 23) między 0 a 3 dniem następuje gwałtowny skok intensywności fluorescencji i fluorescencja do końca eksperymentu utrzymuje się na stałym poziomie. Dziesiątego dnia dla wszystkich próbek HEWL w roztworze bez osmolitów, bez względu na siłę jonową w układzie, wartość fluorescencji jest zbliżona i wynosi około 850 jednostek.



Tabela 23. Intensywność fluorescencji roztworów HEWL w obecności ThT w wodnym roztworze betainy 400 mM i glicyny 400mM przy długości fali 485nm w trakcie inkubacji 0,3,7 i 10 dnia.

Liczba dni	Intensywność fluorescencji (485 nm)		
	Stężenie dodatku [mM]		
	0	400 BET	400 GLY
0	198±4	223±7	216±9
3	860±39	647±21	694±31
7	762±34	798±32	781±17
10	837±30	862±33	1006±30

Tabela 24. Intensywność fluorescencji wodnych roztworów HEWL w obecności ThT dla roztworów z dodatkiem BU lub TMU w różnych stężeniach przy długości fali 485nm w trakcie inkubacji 0, 3 i 10 dnia.

Liczba dni	Intensywność fluorescencji (485 nm)						
	TMU				BU		
	Stężenie dodatku [mM]						
	0	50	250	500	50	250	500
0	219±11	194±5	186±5	170±4	162±4	147±1	143±2
3	384±6	327±6	536±10	801±27	339±2	990±18	845±59
10	881±34	683±32	1032±18	866±23	1076±19	1876±43	1981±28

Dla wszystkich próbek roztworów białka wartość fluorescencji ThT wzrasta wraz z czasem inkubacji. Dodatek glicyny lub *N,N,N*-trimetyloglicyny do układu powoduje niewielkie zmiany w intensywności fluorescencji w porównaniu do próbki białka bez dodatku. Jediną różnicą dla próbek białka z dodatkiem glicyny lub *N,N,N*-trimetyloglicyny jest mniejszy wzrost fluorescencji pomiędzy 0 a 3 dniem w porównaniu do próbek HEWL bez dodatku. W przypadku roztworów HEWL zawierających pochodne mocznika (tabela 24) obserwowany jest różny wzrost fluorescencji między 0 a 3 dniem w zależności od stężenia dodatku. Dodatek 50 mM *n*-butylomocznika lub *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika do roztworu nie powoduje dużych zmian w intensywności fluorescencji lizozymu w roztworze wodnym. Dla stężeń 250 mM lub 500 mM BU i TMU natomiast widoczne są znaczne zmiany w intensywności fluorescencji roztworów białka. Charakterystyczny wydaje się również ciągły i duży wzrost intensywności fluorescencji w roztworach białka zawierających *n*-butylomocznik, co nie jest widoczne dla roztworów zawierających *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik. Najwyższe wartości fluorescencji roztworów białka po 3 dniach dla poszczególnych osmolitów osiągnięto dla roztworów z dodatkiem 250mM *n*-bulomocznika (choć dla 500mM BU wartości też są wysokie) i TMU 500mM, ponadto wartości te są ponad dwukrotnie wyższe niż dla odpowiadającej im próbek HEWL bez osmolitu. Dziesiątego dnia inkubacji wartości fluorescencji dla roztworów lizozymu z dodatkiem BU (250mM, 500mM) są dwukrotnie wyższe niż dla próbki bez dodatku, wzrost, ale mniejszy, obserwowany jest też dla próbek HEWL z TMU czy GLY. Najmniejsze zmiany występują dla roztworów białka zawierających



lub *N,N,N*-trimetyloglicynę, gdzie różnica między próbką lizozymu bez dodatków i z dodatkami po 10 dniach inkubacji jest bardzo niewielka. Warto zauważyć, że w przypadku roztworów lizozymu bez dodatku osmolitu o wysokim stężeniu jonów po 3 dniach inkubacji intensywność fluorescencji stabilizuje się. Oznacza to, że czas inicjowania fibrylacji jest krótszy niż ten okres czasu. Roztwory białka z dodatkiem BET lub GLY nie osiągają stanu plateau, co oznacza, że oba aminokwasy wydłużają czas inicjowania fibrylacji i zmniejszają początkową ilość formowanych amyloidów. Wysokie wartości fluorescencji lizozymu w obecności BU świadczą natomiast, że jego obecność skraca czas inicjowania fibrylacji (tzw. lag-time) i zwiększa efektywność procesu amyloidogenezy. *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik wpływa również na skrócenie czasu inicjowania fibrylacji, jednak nie w takim stopniu jak *n*-butyloleucyn. Wartości fluorescencji dla roztworów białka zawierających glicynę i *N,N,N*-trimetyloglicynę są podobne, ale kolejne badania wskazują, na znaczne różnice między procesami zachodzącymi w ich obecności. BET nie wpływa istotnie na proces amyloidogenezy, co potwierdzają małe różnice między fluorescencją roztworów HEWL bez i z dodatkiem tego osmolitu.

- Spektroskopia dichroizmu kołowego

Do obserwowania zmian w strukturze HEWL pod wpływem osmolitów wykorzystano spektroskopię dichroizmu kołowego w zakresie UV. Mimo, że wszystkie próbki były rozcieńczone wodą, w przypadku roztworów zawierających BU i TMU w stężeniu 500 mM zawartość związków absorbujących światło była za wysoka, co spowodowało że napięcie fotopowielacza znajdującego się w aparacie było zbyt wysokie i niemożliwe było zarejestrowanie poprawnych widma CD. Dla roztworów HEWL z glicyną i *N,N,N*-trimetyloglicyną o stężeniu 400mM nie było problemów technicznych z pomiarem. Największe zmiany w strukturze HEWL pod wpływem obecności osmolitu zarejestrowano dla BU (tabela 25). Formowaniu się włókien amyloidowych towarzyszy zwiększanie się zawartości beta-kartek i zmniejszanie się zawartości alfa-helis w białku.

W przypadku roztworów białka zawierających *N,N,N*-trimetyloglicynę lub glicynę przez cały czas trwania eksperymentu zachodzą zmiany w strukturze lizozymu. Dla roztworów białka z dodatkiem glicyny lub betainy widać wyraźny spadek zawartości alfa-helis i mniejszy, ale widoczny wzrost zawartości struktur nieuporządkowanych. Nie widać natomiast dużych zmian w ilości beta-kartek w białku, co powinno być charakterystyczne w przypadku powstawania włókien amyloidowych. Największe zmiany widoczne są w lizozymie pod wpływem dodatku 250 mM BU. Obecność tego osmolitu znacznie obniża zawartość alfa-helis w lizozymie (33% bez dodatku, 22% z dodatkiem 250mM BU po 10 dniach) i zwiększa zawartość beta-kartek (13% bez dodatku kontra 21% z dodatkiem 250mM BU po 10 dniach).

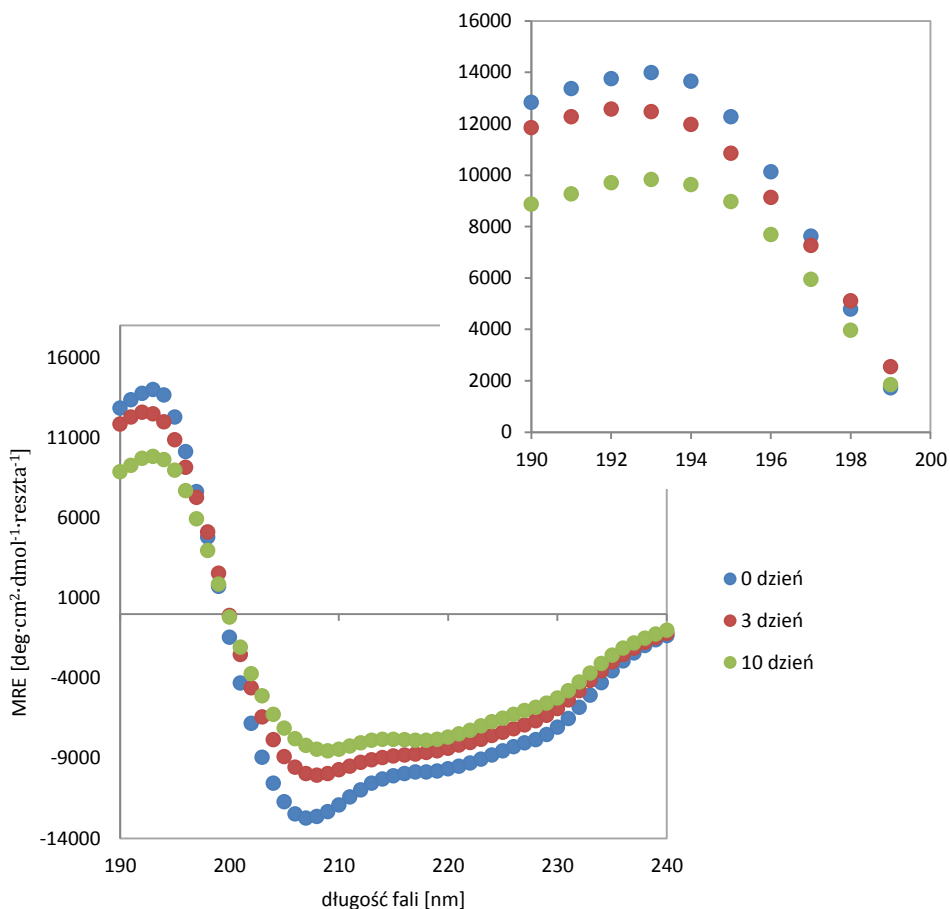


Mniejsze stężenie BU tj. 50mM jest za niskie by wpłynąć na zmiany w HEWL. W obecności TMU nie widać różnic w udziałach struktur drugorzędowych w białku w stosunku do próbki bez dodatku osmolitu. Poniżej przedstawiono widma CD dla wodnych roztworów białka z BU dla stężenia 250 mM zmieniające się wraz z czasem inkubacji, ponieważ dla tego stężenia widoczne są największe zmiany (wykres 25).

Tabela 25. Wyniki CD. Zawartość procentowa różnych struktur drugorzędowych utworzonych z HEWL w obecności BET, GLY, BU i TMU o różnych stężeniach w trakcie trwania procesu inkubacji.

Dzień	Stężenie dodatku	Alfa helisy [%]	Beta kartki [%]	Zwroty i struktura nieuporządkowana [%]
Próbka bez dodatków zawartość jonów wysoka (600mM)				
0	0	37	17	47
3	0	33	16	51
7	0	31	17	51
10	0	31	17	51
N,N,N-trimetyloglicyna				
0	400 mM	36	17	47
3	400 mM	35	16	49
7	400 mM	34	16	51
10	400 mM	30	17	53
Glicyna				
0	400 mM	37	13	50
3	400 mM	33	17	50
7	400 mM	31	17	52
10	400 mM	29	19	51
Próbka bez dodatków zawartość jonów niska (200mM)				
0	0	36	15	48
3	0	35	17	47
10	0	33	13	53
n-butylomocznik				
0	50 mM	36	13	50
3	50 mM	36	14	50
10	50 mM	32	15	53
0	250 mM	37	10	53
3	250 mM	29	18	51
10	250 mM	22	21	55
N,N,N',N'-tetrametylomocznik				
0	50 mM	36	14	48
3	50 mM	35	16	48
10	50 mM	33	14	52
0	250 mM	36	14	49
3	250 mM	34	15	50
10	250 mM	32	14	54





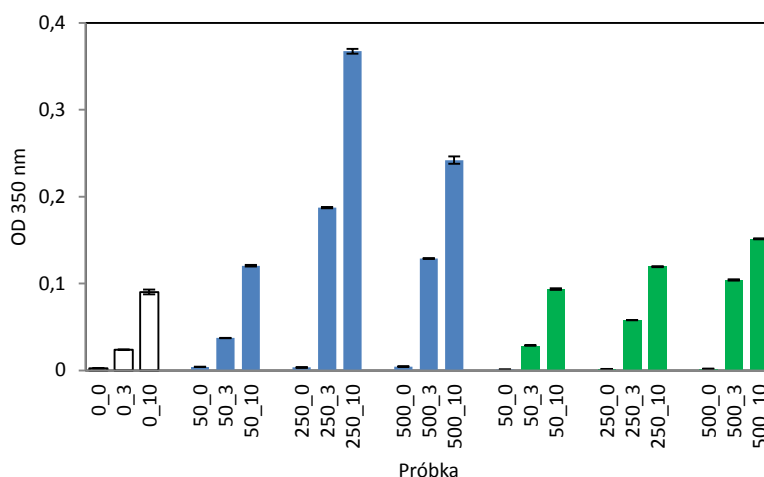
Wykres 25. Zmiany w widma CD dla HEWL w roztworze BU o stężeniu 250 mM w trakcie trwania inkubacji.

- Turbidymetria

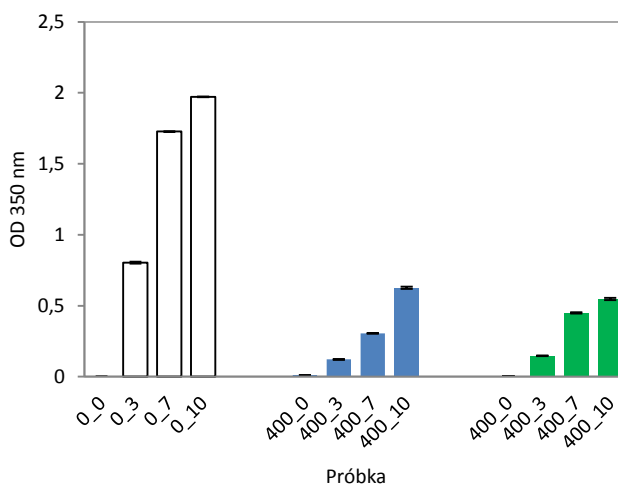
Zmiany w rozpraszaniu światła badano poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali równej 350 nm (z ang. optical density – OD). Wyniki pokazano w postaci wykresów 26 i 27, oddzielnie dla roztworów białka z denaturantami i stabilizatorami ze względu na różnice w zawartości jonów w obu grupach. *N*-butylomocznik jest jedynym związkiem spośród badanych, którego dodatek do roztworu HEWL powoduje wyraźny wzrost rozproszenia w stosunku do próbki kontrolnej. Dla białka w obecności TMU wzrost ten występuje, ale jest niewielki, dla roztworów białka w obecności glicyny i *N,N,N*-trimetyloglicyny widać natomiast spadek wartości rozproszenia w stosunku do roztworu białka



bez dodatku. W roztworze białka w obecności TMU im wyższe stężenie osmolitu tym większy jest przyrost rozproszenia, a dla roztworów białka z BU największy przyrost występuje dla próbki o stężeniu 250 mM (wykres 26). Tak jak w poprzednich pomiarach białko w obecności BU ulega takim przemianom, które mogłyby wskazywać na przyspieszanie procesu fibrylacji w jego obecności. Dla HEWL w obecności TMU te zmiany są również widoczne, ale w dużo mniejszym stopniu.



Wykres 266. Wykres gęstości optycznej dla 350 nm dla roztworów lizozymu: bez dodatku osmolitu (białe słupki) z dodatkiem *n*-butylomocznika (niebieskie słupki) i *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika (zielone). Oznaczenia próbek: stężenie dodatku_liczba dni inkubacji.



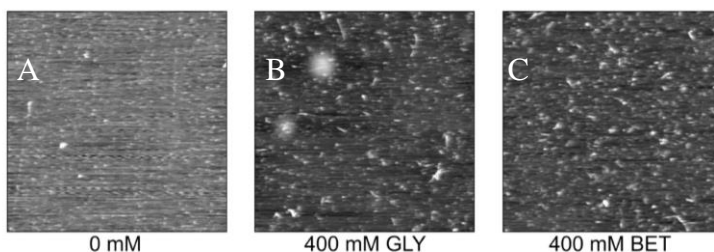
Wykres 277. Wykres gęstości optycznej dla 350 nm dla roztworów lizozymu: bez dodatku osmolitu (białe słupki) z dodatkiem *N,N,N*-trimetyloglicyny (niebieskie słupki) i glicyny (zielone). Oznaczenia próbek: stężenie dodatku_liczba dni inkubacji np. niebieski słupek 400_7 odpowiada rozproszeniu roztworu betainy 400 mM po 7 dniach inkubacji.



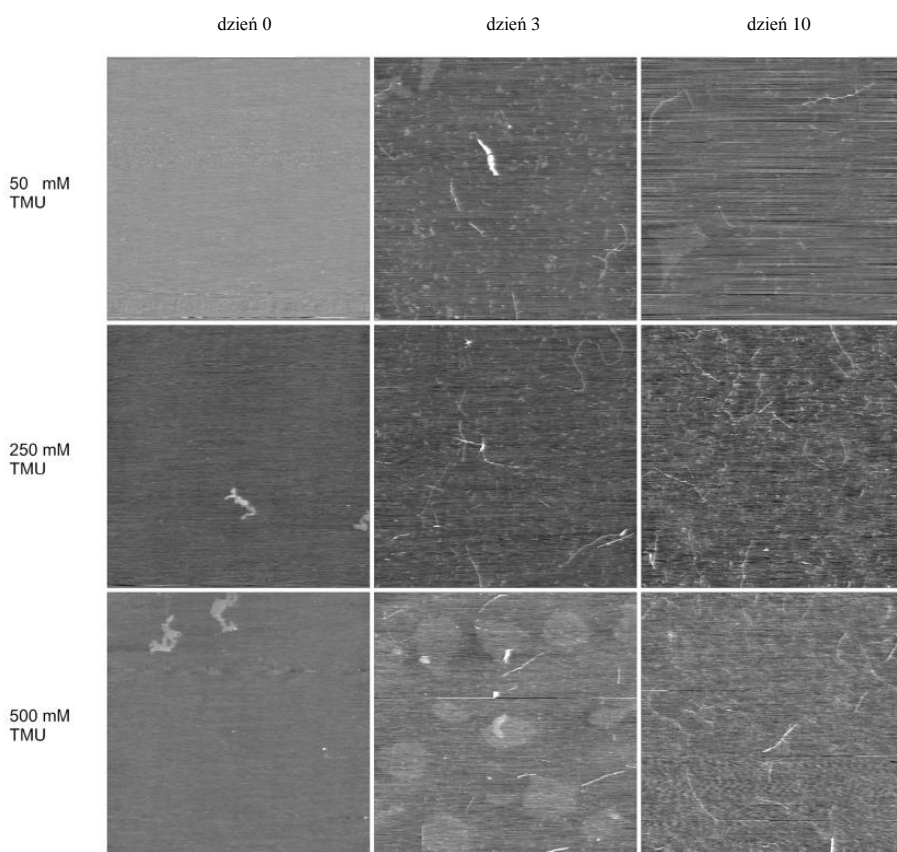
W 3 dniu inkubacji dla HEWL z dodatkiem *N,N,N*-trimetyloglicyny lub glicyny wartość rozproszenia jest mniejsza w stosunku do próbki bez osmolitu (wykres 27). Sygnał zarejestrowany po 10 dniach inkubacji lizozymu w roztworze glicyny lub *N,N,N*-trimetyloglicyny jest trzykrotnie niższy niż dla roztworów białka bez dodatków.

- Mikroskopia sił atomowych (AFM)

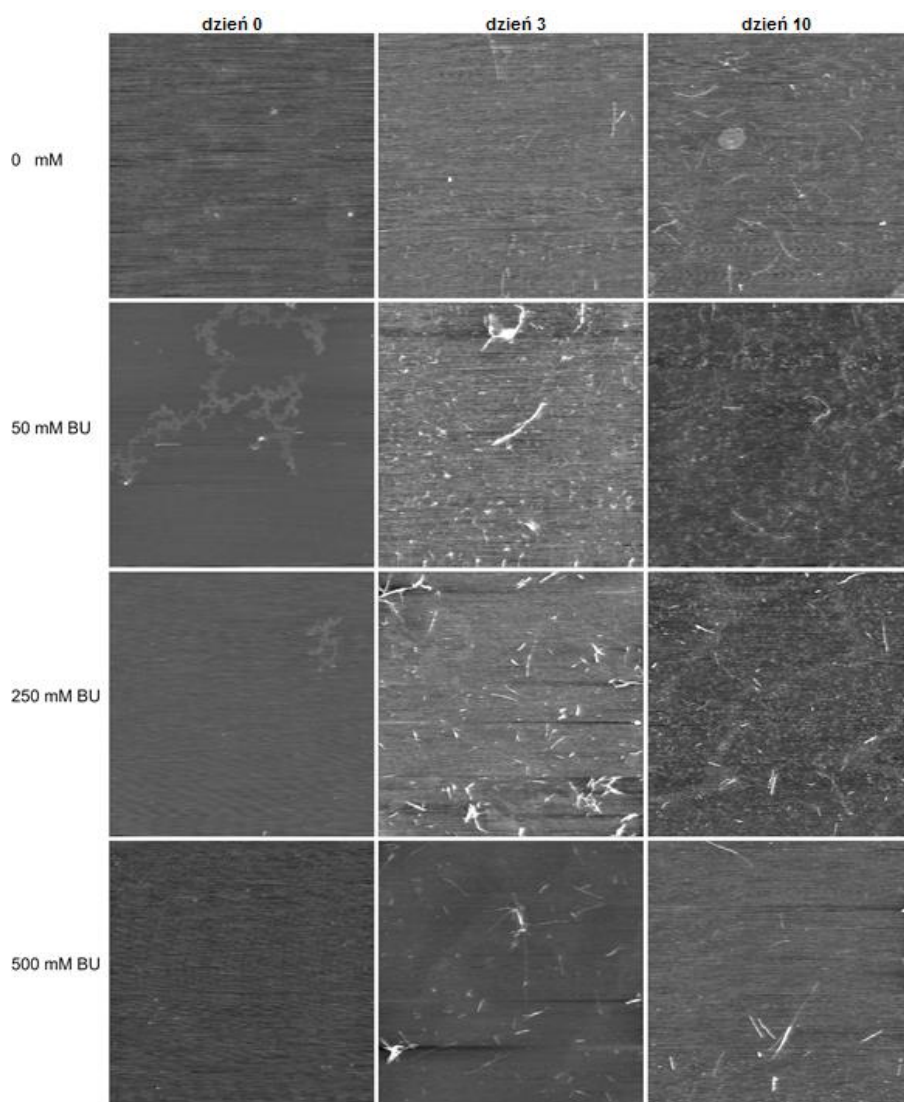
Morfologię amyloidów analizowano z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM). Otrzymane obrazy pokazano na rysunkach 25-27. Skany AFM dla HEWL w obecności BU i TMU potwierdza powstawanie amyloidów. Na obrazach dla roztworów lizozymu zawierających glicynę i *N,N,N*-trimetyloglicynę widoczne są prawdopodobnie oligomery białka i pojedyncze krótkie włókna. Białko w roztworze bez dodatku osmolitu, o sile jonowej 200 mM w trakcie trwania inkubacji tworzy włókna. Na obrazach dla lizozymu w obecności BU i TMU widoczne są trzy rodzaje amyloidów: (i) krótkie do długości 0,2 μm ; (ii) średnie do 0,8 μm i (iii) dłuższe około 2-3 μm . Dla HEWL w obecności BU i TMU nie są obserwowalne duże zmiany w morfologii powstałych włókien w zależności od stężenia dodatku. Wydaje się, że najwięcej najdłuższych włókien występuje dla najwyższego stężenia dodatku po 10 dniach inkubacji. Po 10 dniach inkubacji białka w roztworze 500 mM BU lub TMU nie jest obserwowana obecność populacji najkrótszych włókien. Dla roztworów HEWL o wyższej sile jonowej, bez dodatku osmolitu nie są widoczne amyloidy, ale zaobserwowano dużo sferycznych oligomerów. W roztworach zawierających 400 mM glicyny, po 10 dniach inkubacji, obecne są pojedyncze, średniej długości (0,7-0,9 μm) włókna lizozymu o grubości około 5 nm. Dodatek 400 mM BET spowodowała podobne zmiany w białku, choć powstałe pojedyncze włókna wydają się być krótsze (0,4-0,7 μm), grubsze 4-7,5 nm i w mniejszej ilości.



Rysunek 25. Obrazy z AFM roztworów HEWL po 10 dniach inkubacji: A: bez dodatku, B: z dodatkiem 400 mM glicyny, C: z dodatkiem 400 mM *N,N,N*-trimetyloglicyny [198]



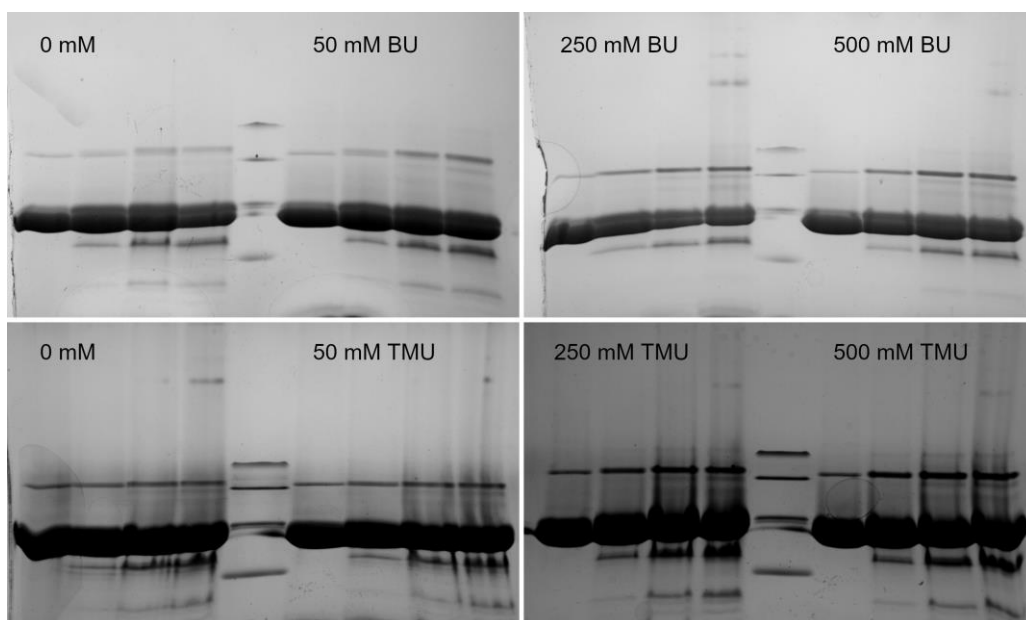
Rysunek 26. Obrazy AFM roztworów HEWL z dodatkiem TMU w trakcie trwania inkubacji [191].



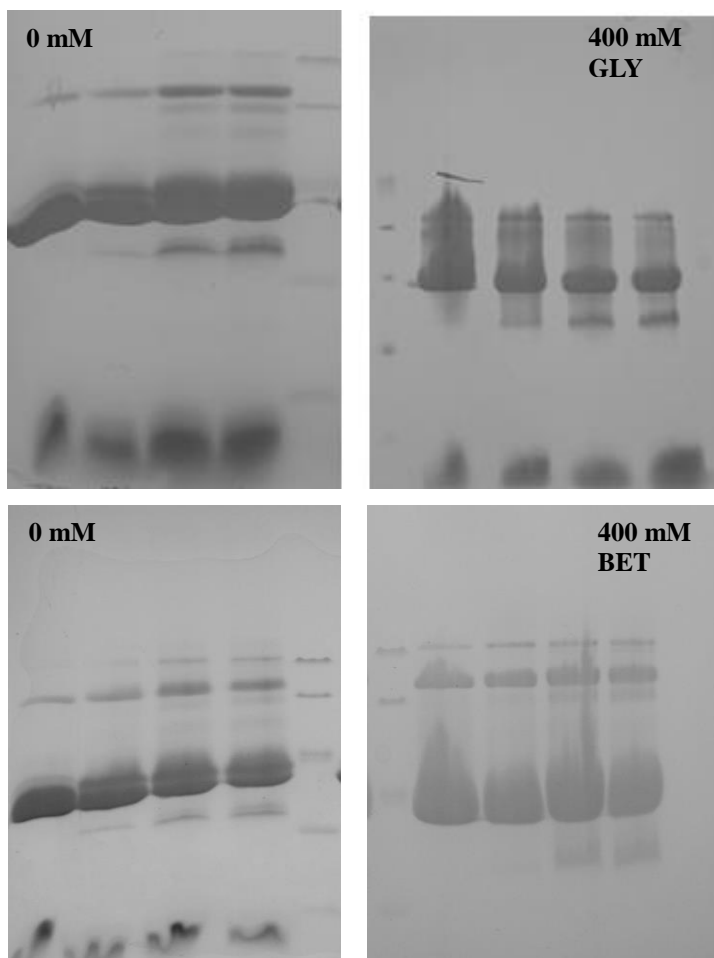
Rysunek 27. Obrazy AFM roztworów HEWL bez dodatku i z dodatkiem BU w trakcie trwania inkubacji [191].

- Rozdział elektroforetyczny lizozymu

Wyniki elektroforezy żelowej ukazano na rysunkach 28 i 29. Oprócz dużej frakcji lizozymu, inkubowane próbki zawierają również fragmenty białka powstałe w wyniku hydrolizy i kowalencyjnie związane dimery HEWL. Dla wszystkich próbek występowanie hydrolizy i dimeryzacji białka rośnie wraz z czasem inkubacji. W przypadku próbek z dodatkiem BU lub TMU wykryto dwa rodzaje fragmentów białkowych: pierwszy niewiele mniejszy od białka natywnego (pasma zaraz pod 14kDa) i fragmenty mniejsze niż 10 kDa. Intensywność pasm poniżej 14 kDa wzrasta wraz z czasem inkubacji, jednak obecność osmoliwów nie wpływa znacząco na intensywność pasma. Stężenie dimerów HEWL wzrasta za to zarówno z czasem inkubacji jak i stężeniem dodatku. Agregaty większe niż dimery są widoczne w roztworach z dodatkiem BU, TMU inkubowanych przez 10 dni. Dla roztworów z wysokim stężeniem jonów (rys 29.) pasma poniżej 10 kDa są praktycznie nieobecne, za to widoczne są pasma odpowiadające dimerom i trimerom (obecność trimerów jest bardziej widoczna dla roztworów zawierających BET).



Rysunek 28. Żele SDS-PAGE dla próbek inkubowanych w obecności BU i TMU w 45°C. Kolejne linie licząc od lewej odpowiadają: 0, 0,7, 3 i 10 dni inkubacji. Wielkości prążków markera odpowiadają kolejno 40, 25, 15 i 10 kDa. Masa lizozymu 14,3 kDa [191].



Rysunek 29. Żele SDS-PAGE dla próbek inkubowanych w obecności GLY i BET w 45°C. Kolejne linie licząc od lewej odpowiadają: 0,3,7 i 10 dnia inkubacji. Wielkości prążków markera odpowiadają kolejno: 40,25,15 i 10 kDa. Masa lizozymu 14,3 kDa [198].

Podsumowanie wyników dotyczących badań wpływu osmolitów na amyloidogenezę

W tabeli 26 przedstawiłam najważniejsze różnice pomiędzy roztworami lizozymu z dodatkiem wybranych osmolitów podsumowujące powyższe badania.

Tabela 26. Tabela podsumowująca wyniki badań procesu formowania się włókien z HEWL w obecności wybranych osmolitów

osmolit	Spektroskopia fluorescencyjna	Spektroskopia dichroizmu kołowego	AFM	Turbidymetria
GLY	Niewielki wpływ na intensywność fluorescencji	Spadek zawartości α -helis, brak zmian w zawartości β -kartek, wzrost zawartości struktury nieuporządkowanej	Sferyczne oligomery pojedyncze, średniej długości (0,7-0,9 μm) włókna lizozymu o grubości około 5 nm	Spadek rozproszenia
BET	znikomy wpływ na intensywność fluorescencji	Spadek zawartości α -helis, brak zmian w zawartości β -kartek, wzrost zawartości struktury nieuporządkowanej	Sferyczne oligomery, włókna krótsze (0,4-0,7 μm), grubsze 4-7,5 nm i w mniejszej ilości	Spadek rozproszenia
BU	Znaczny wzrost intensywności fluorescencji nawet przy najniższym badanym stężeniu dodatku	Obniżenie zawartości α -helis, zwiększona zawartość β -kartek przy stężeniu powyżej 250 mM	Większa ilość włókien, widoczne 3 rodzaje amyloidów	Wyraźny wzrost rozproszenia
TMU	Widoczny niewielki wzrost intensywności fluorescencji dla roztworów z 250 i 500mM dodatku	Brak różnic w stosunku do HEWL bez dodatku	Większa ilość włókien, widoczne 3 rodzaje amyloidów	Niewielki wzrost rozproszenia



6. Podsumowanie i wnioski końcowe

Przedstawione powyżej wyniki moich badań pozwoliły na zrealizowanie postawionych celów. W każdej z trzech części badań udało się znaleźć właściwości, które pozwoliły na zróżnicowanie osmolitów zgodnie z ich cechami stabilizującymi/destabilizującymi białko, co do tej pory nie było proste. Stało się to możliwe między innymi dzięki zastosowaniu *N*-metyloacetamidu jako modelu łańcucha głównego białka. Technikami wykorzystanymi w mojej rozprawie były:

- spektroskopia FT-IR: układy zawierające NMA (kilka stężeń)-woda-jeden z osmolitów (kilka stężeń): glicyna, *N,N,N*-trimetyloglicyna, TMAO, *n*-butylomocznik, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik,
- pomiary wolumetryczne i akustyczne: układy zawierające NMA (kilka stężeń)- wodę i jeden z wybranych osmolitów: glicyna, *N,N,N*-trimetyloglicyna, TMAO, *n*-butylomocznik, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik
- typowe techniki do obserwowania procesu powstawania włókien amyloidowych takie jak: spektroskopia dichroizmu kołowego, spektroskopia fluorescencyjna, mikroskopia sił atomowych, pomiary rozproszenia światła, rozdział elektroforetyczny białka do badań roztworów (o ustalonym pH i stężeniu siły jonowej) zawierających lizozym z białka jaja kurzego z jednym osmolitem z grupy: glicyna, *N,N,N*-trimetyloglicyna, *n*-butylomocznik, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik,

Do analizy widm zmierzonych w podczerwieni wykorzystano najnowszą technikę analizy danych PARAFAC stosowaną w Katedrze Chemii Fizycznej PG, ponieważ tradycyjna metoda - widm różnicowych - nie dawała jednoznacznych wyników. Głównym wnioskiem wynikającym z analizy pomiarów spektroskopowych FTIR układów osmolit-woda- NMA jest bardzo mały wpływ (lub jego brak) osmolitów stabilizujących na strukturę oscylacyjną widma NMA. Denaturanty natomiast wyraźnie zmieniają widma NMA, co przejawia się między innymi w pojawieniu się nowych pasm na widmach NMA w układach osmolit-NMA-woda w stosunku do widm NMA w wodzie. Warto podkreślić, że w przypadku roztworów ze stabilizatorami jeden z czynników zawsze odtwarzał widmo zmienności NMA. Świadczy to o tym, że obecność dodatkowego składnika nie wpływa na strukturę



NMA w sposób znaczący i nadal największe zmiany w jego strukturze wywoływane są przez obecność innych cząsteczek NMA. W układach zawierających destabilizatory żadne z widm czynników nie przypominało widma zmienności NMA, czyli zmiany jego stężenia nie są główną przyczyną zmian w jego strukturze. Oznacza to, że być może cząsteczka NMA jest zaangażowana w oddziaływania z cząsteczką destabilizatora.

Pomiary wolumetryczne i akustyczne, które pozwalają na obserwowanie makroskopowych zmian zachodzących w roztworach zawierających osmolit i NMA, również wykazały że właściwości obu grup tzn stabilizatorów i destabilizatorów wyraźnie się różnią. Szczególnie ciekawa wydaje się analiza granicznych pozornych molowych ściśliwości adiabatycznych. Parametr ten dla denaturantów białka w całym zakresie badanych stężeń i temperatur przyjmuje tylko wartości dodatnie. Dla osmolitów stabilizujących przy niskich stężeniach NMA jest ujemne. Dodatkowo zmiana wartość granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej z temperaturą jest dwa razy większa dla destabilizatorów niż stabilizatorów. Charakterystyczne jest również przyjmowanie najwyższych wartości funkcji przeniesienia granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej dla roztworów zawierających badane osmolity o właściwościach destabilizujących. Różnice zaobserwowałam również w wartościach współczynników oddziaływań z teorii McMillan-Mayer'a: v_{AB} , v_{ABB} i k_{AB} . Wartości v_{AB} dla roztworów zawierających stabilizatory są dodatnie lub mało ujemne (w badanym zakresie stężeń NMA i temperatur), a dla roztworów z destabilizatorami są wyłącznie ujemne. Wartości v_{ABB} dla roztworów z osmolitami stabilizującymi oscylują koło 0, dla roztworów z destabilizatorami bezwzględne wartości v_{ABB} są wyższe. Parametr k_{AB} nie jest tak różnicujący jak v_{AB} i v_{ABB} , choć dla roztworów destabilizatorów przyjmuje wartości wyższe niż dla roztworów ze osmolitami stabilizującymi.

Powstawanie włókien amyloidowych z HEWL w obecności osmolitów należących do grupy stabilizatorów i destabilizatorów obserwowałam za pomocą kilku technik. Na podstawie otrzymanych wyników mogę stwierdzić, że zawartość stabilizatorów w wodnym roztworze lizozymu ma niewielki wpływ na intensywność fluorescencji ThT badanego układu, co odróżnia je od destabilizatorów. Widoczne są również różnice w obrazach AFM, na których widoczne są białkowe sferyczne oligomery tworzone w obecności stabilizatorów lub trzy populacje włókien białkowych, które powstają w roztworach lizozymu z denaturantami. Badania rozproszenia światła wykazały natomiast, że w przypadku roztworów z osmolitami



destabilizującymi następuje wzrost rozproszenia wraz ze czasem inkubacji, w przeciwieństwie do osmolitów stabilizujących, dla roztworów których zaobserwowałam spadek rozproszenia w stosunku do próbki bez dodatku. Niestety w powyższych badaniach spektroskopia dichroizmu kołowego wykazała małą czułość, co również jest ważnym wnioskiem. Jest to technika mało wrażliwa na zmiany w zawartości beta-kartek, które to mogą świadczyć o powstawaniu włókien i za jej pomocą nie dało się różnicować osmolitów.

Poniżej przedstawiam obserwacje dodatkowe, które udało się zauważyć przy okazji moich badań.

Analiza pomiarów spektroskopowych w podczerwieni wskazuje, że:

- w cząsteczce *N,N,N*-trimetyloglicyny pasmo karbonylowe jest pasmem najwrażliwszym na obecność cząsteczek *N*-metyloacetamidu,
- TMAO zmienia strukturę wody, która wpływa na strukturę NMA,
- cząsteczka NMA w obecności *n*-butylomocznika lub *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika nie reaguje na obecność zwiększającej się ilość cząsteczek NMA,
- cząsteczka *n*-butylomocznik lub *N,N,N',N'*-tetrametylomocznika nie reaguje na obecność zwiększającej się ilość cząsteczek moczników.

Pomiary wolumetryczne i akustyczne ujawniają:

1. Dla układów 2-składnikowych (wodne roztwory NMA, glicyny, *N,N,N*-trimetyloglicyny, TMAO i tauryny):

- różny wpływ stężenia dodatku na gęstość wybranych roztworów. Dla układów zawierających wodę i glicynę/taurynę/*N,N,N*-trimetyloglicynę widać wyraźny wzrost gęstości roztworu wraz ze wzrostem stężenia substancji rozpuszczonej, w przypadku wodnych roztworów TMAO wzrost ten jest niewielki w porównaniu do wcześniej wspomnianych układów. Roztwór wodny *N*-metyloacetamid jest jedynym związkiem spośród badanych, dla którego wraz ze zwiększającym się stężeniem substancji rozpuszczonej, gęstość maleje.

- liniowy charakter zależności pozornych objętości molowych ze stężeniem dodatku. Znak S_v odzwierciedla charakter oddziaływań między cząsteczkami substancji rozpuszczonej. Dodatnie wartości tegoż parametru świadczą o oddziaływaniach hydrofilowych pomiędzy rozpuszczonymi cząsteczkami, a ujemne o



oddziaływaniach hydrofobowych. Stąd dla glicyny i tauryny otrzymałam duże i dodatnie wartości parametru S_p , dla NMA i TMAO ujemne wartości S_p , dla N,N,N -trimetyloglicyny bliskie 0.

- Wartości granicznej pozornej objętości molowej oraz wartości granicznej pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej zgodnie z oczekiwaniami rosną ze wzrostem temperatury dla wszystkich wybranych związków. Parametr S_p natomiast maleje dla badanych cząsteczek wraz z rosnącą temperaturą pomiaru, co również nie jest niespodzianką. Nietypowe jest natomiast, że dla tauryny, jako jedynej spośród wybranych związków parametr S_K początkowo maleje a następnie rośnie wraz ze zwiększającą się temperatura. Dla pozostałych związków widoczny jest spadek wartości S_K ze wzrostem temperatury.

- najniższe graniczne liczby hydratacyjne otrzymano dla cząsteczki NMA, najwyższe dla dużej cząsteczki N,N,N -trimetyloglicyny. Zgodnie z oczekiwaniami, wraz ze wzrostem temperatury układu wartości S_n^0 maleje dla wszystkich badanych związków. Wpływ temperatury na wartości granicznej liczby hydratacyjnej jest mniejszy przy mocniejszych oddziaływaniach substancja rozpuszczona – woda (np. glicyna), a silniejszy przy słabszych oddziaływaniach (np. NMA-woda).

- na podstawie pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej można stwierdzić czy związek jest hydrofilowy czy hydrofobowy. Wyższa ściśliwość oznacza większą hydrofobowość substancji rozpuszczonej. Dzięki prostemu porównaniu analogów strukturalnych można wnioskować na temat charakteru różniących ich fragmentów cząsteczki. Tauryna jest aminokwasem sulfonowym i wartość jej pozornej molowej ściśliwości nie jest tak ujemna jak dla aminokwasów z grupą karboksylową. Na tej podstawie można wnioskować, że grupa sulfonowa tauryny oddziałuje słabiej z cząsteczkami wody w porównaniu do grupy karboksylowej obecnej w aminokwasach.

- możliwe jest ustalenie właściwości cząsteczki na podstawie 4 kryteriów wyznaczonych na podstawie badań wolumetrycznych oraz szybkości dźwięku. Zgodnie z nimi w roztworach glicyny i tauryny przeważają oddziaływania hydrofilowe, NMA osłabia strukturę wody, w roztworach N,N,N -trimetyloglicyny występują silne oddziaływania woda-betaina, a TMAO wykazuje właściwości zarówno hydratacji hydrofobowej jak i silnych oddziaływań specyficznych pomiędzy cząsteczkami wody a cząsteczkami TMAO.



2. Dla układów 3-składnikowe (woda+NMA+ jeden z osmolitów: glicyna, *N,N,N*-trimetyloglicyna, TMAO, *n*-butylomocznik, *N,N,N',N'*-tetrametylomocznik)

- dla wszystkich badanych układów widoczny jest wzrost gęstości przy jednoczesnym spadku szybkości rozchodzenia się dźwięku w roztworach wraz ze spadkiem temperatury pomiaru, wzrostem stężenia dodatku osmolitu, wzrostem stężenia NMA w rozpuszczalniku.

- można zaobserwować liniowe zależności pozornej molowej objętości molowej i pozornej molowej ściśliwości adiabatycznej ze zmianą stężenia substancji rozpuszczonej. Wartości bezwzględne parametru S_v są dość małe dla wszystkich związków i niewiele zmieniają się z temperaturą i stężeniem NMA. Jest to nietypowe, gdyż przy tak dużych zmianach stężenia NMA w rozpuszczalniku spodziewałam się widzieć większe zmiany w wartości S_v . Znak wartości S_v dla glicyny, *N,N,N*-trimetyloglicyny, TMAO, TMU pozostaje taki same jak w przypadku układów dwuskładnikowych i jedynie dla BU ma dodatnią wartość w układach 3-składnikowych, a ujemną w 2-składnikowych.

- dla większości związków V_ϕ^0 i $K_{s,\phi}^0$ jednoznacznie wzrastają wraz ze wzrostem temperatury pomiaru ($K_{s,\phi}^0$ spada wraz ze wzrostem temperatury dla roztworów glicyny w 4-8 mol/kg NMA i TMAO w 8 mol/kg NMA). Nie zawsze natomiast V_ϕ^0 wzrasta wraz ze stężeniem NMA w rozpuszczalniku. Wzrost wartości $K_{s,\phi}^0$ dla destabilizatorów jest większy niż dla stabilizatorów białka.

- wartości funkcji przeniesienia granicznej pozornej objętości, $\Delta_t V_\phi^0$, i ściśliwości adiabatycznej $\Delta_t K_{s,\phi}^0$, są na tyle charakterystyczne, że zostały opisane już na początku tego rozdziału.

Pomiary nanoDSF pokazują, że:

- proces denaturacji lizozymu w roztworze o pH=2 może być jedno lub dwustopniowy w zależności od siły jonowej w roztworze. Poniżej 300mM siły jonowej denaturacja HEWL jest jednoetapowa,

- przy pH=2 i sile jonowej 600 mM nie da się jednoznacznie stwierdzić czy *N,N,N*-trimetyloglicyna jest stabilizatorem czy destabilizatorem HEWL



Mikroskopia sił atomowych wykorzystana w badaniu procesu formowania się włókien amyloidowych wskazuje, że w przypadku inkubacji lizozymu z dodatkiem n-butylo-mocznika i TMU powstają 3 rodzaje amyloidów, w przypadku dodatku HEWL z dodatkiem glicyny: sferyczne oligomery i pojedyncze, średniej długości (0,7-0,9 μm) włókna lizozymu o grubości około 5 nm, w przypadku dodatku TMAO: sferyczne oligomery, oraz krótsze (0,4-0,7 μm) i grubsze 4-7,5 nm włókna w małej ilości.

Zarówno dla roztworów lizozymu z glicyną i TMAO spektroskopia dichroizmu kołowego wskazuje na spadek zawartości alfa-helis, brak zmian w zawartości β -kardek, wzrost zawartości struktury nieuporządkowanej. Dla roztworów lizozymu z TMU nie widać natomiast różnic między zawartością poszczególnych struktur w białku z i bez dodatku tej pochodnej mocznika.

7. Dorobek naukowy

Emilia Kaczkowska, Jarosław Wawer, Magdalena Tyczyńska, Małgorzata Józwiak, Joanna Krakowiak- The interaction parameters for solutions of n-butylurea in aqueous solutions of *N*-methylacetamide – The volumetric and compressibility studies between 288.15 K and 308.15 K- *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2020, 149,106143. IF (2019)=2,888

Emilia Kaczkowska, Jarosław Wawer, Magdalena Tyczyńska, Małgorzata Józwiak, Agnieszka Boruń, Joanna Krakowiak - The hydration properties of protein stabilizer, trimethylamine-*N*-oxide in aqueous solutions of *N*-methylacetamide—The volumetric and compressibility studies between 288.15 and 308.15 K – *Thermochimica Acta*, 2020, 685, 178535. IF (2019)=2,762

Jarosław Wawer, Emilia Kaczkowska, Jakub Karczewski, Marcin Olszewski, Danuta Augustin-Nowacka, Joanna Krakowiak – Amyloid fibril formation in the presence of water structure-affecting solutes- *Biophysical Chemistry*, 2019, 254, 106265. IF(2019)=1,995

Emilia Kaczkowska, Jarosław Wawer, Magdalena Tyczyńska, Małgorzata Józwiak, Joanna Krakowiak - The hydration of selected biologically relevant molecules – the temperature effect on apparent molar volume and compression, *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 274, 345-352. IF(2019)=5,065

Karol A. Biernacki, Emilia Kaczkowska, Piotr Bruździak, “Aqueous solutions of NMA, Na₂HPO₄, and NaH₂PO₄ as models for interaction studies in phosphate–protein systems,” *Journal of Molecular Liquids*, 2018, 265, 361–371. IF(2019)=5,065

Piotr Bruździak, Aneta Panuszko, Emilia Kaczkowska, Barnaba Piotrowski, Anna Daghniir, Sebastian Demkowicz, Janusz Stangret - Taurine as a water structure breaker and protein stabilizer, *Amino Acids*, 2018, 50, 125-140. IF(2019)=3,063

Aneta Panuszko, Piotr Bruździak, Emilia Kaczkowska, Janusz Stangret, “General Mechanism of Osmolytes’ Influence on Protein Stability Irrespective of the Type of Osmolyte Cosolvent,” *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120, 11159–11169. IF(2019)= 2,857

Piotr Bruździak, Beata Adamczak, Emilia Kaczkowska, Jacek Czub, Janusz Stangret, “Are stabilizing osmolytes preferentially excluded from the protein surface? FTIR and MD studies,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, 17, 23155–23164, 2015. IF(2019)= 3,430

Sumaryczny IF=27,125

Parametry wg: <https://www.scopus.com/> z dnia 05.11.2020r

Indeks Hirscha: 5

Liczba cytowani: 70



w przygotowaniu:

Emilia Kaczkowska, Jarosław Wawer, Magdalena Tyczyńska, Małgorzata Józwiak, Joanna Krakowiak - Understanding the interactions between protein stabilizers and the peptide bond through the analysis of the volumetric and compressibility properties for the model systems, *Journal of Chemical Thermodynamics*

Jarosław Wawer, Emilia Kaczkowska, Jakub Karczewski, Marcin Olszewski, Marek Tchórzewski, Przemysław Grela, Danuta Augustin-Nowacka, Joanna Krakowiak - Influence of stabilizing osmolytes, glycine and betaine, on amyloid fibril formation, *International Journal of Biological Macromolecules*



8. Bibliografia

1. Shamsi, T. N., Athar, T., Parveen, R. & Fatima, S. A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments. *Int. J. Biol. Macromol.* 105, 993–1000 (2017).
2. Muntau, A., Leandro, J., Staudigl, M., Mayer, F. & Gersting, S. W. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, (2014).
3. Denny, R. A., Gavrin, L. K. & Saiah, E. Recent developments in targeting protein misfolding diseases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 23, 1935–1944 (2013).
4. Bolshette, N. B. *et al.* Protein folding and misfolding in the neurodegenerative disorders: A review. *Rev. Neurol. (Paris)*. 170, 151–161 (2014).
5. Patel, R., Kumari, M. & Khan, A. B. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 3701–3720 (2014).
6. Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P. & Prasad, S. M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4056–4075 (2015).
7. Atkinson, N. J. & Urwin, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523–3543 (2012).
8. Yancey, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208, 2819 LP – 2830 (2005).
9. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. & Somero, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science (80-)*. 217, 1214 LP – 1222 (1982).
10. Yancey, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208, 2819–2830 (2005).
11. Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D. & Loening, S. A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 25, 3957–3958 (1997).
12. Schnoor, M. *et al.* Characterization of the synthetic compatible solute homocysteine as a potent PCR enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 867–872 (2004).
13. Hethke, C., Bergerat, A., Hausner, W., Forterre, P. & Thomm, M. Cell-Free Transcription at 95°: Thermostability of Transcriptional Components and DNA Topology Requirements of *Pyrococcus* Transcription. *Genetics* 152, 1325 LP – 1333 (1999).
14. Rabbani, G. & Choi, I. Roles of osmolytes in protein folding and aggregation in cells and their biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 109, 483–491 (2018).
15. Vagenende, V., Yap, M. G. S. & Trout, B. L. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry* 48, 11084–11096 (2009).
16. Kar, K. & Kishore, N. Enhancement of thermal stability and inhibition of protein aggregation by osmolytic effect of hydroxyproline. *Biopolymers* 87, 339–351 (2007).



17. Dasgupta, M. & Kishore, N. Selective inhibition of aggregation/fibrillation of bovine serum albumin by osmolytes: Mechanistic and energetics insights. *PLoS One* 12, e0172208–e0172208 (2017).
18. Choudhary, S., Kishore, N. & Hosur, R. V. Inhibition of insulin fibrillation by osmolytes: Mechanistic Insights. *Sci. Rep.* 5, 17599 (2015).
19. Altenburg, T., Goldenbogen, B., Uhlendorf, J. & Klipp, E. Osmolyte homeostasis controls single-cell growth rate and maximum cell size of *Saccharomyces cerevisiae*. *npj Syst. Biol. Appl.* 5, 34 (2019).
20. Kashanian, S., Paknejad, M., Ghobadi, S., Omidfar, K. & Ravan, H. Effect of Osmolytes on the Conformational Stability of Mouse Monoclonal Antidigoxin Antibody in Long-Term Storage. *Hybridoma* 27, 99–106 (2008).
21. Roberts, C. J., Nesta, D. P. & Kim, N. Effects of Temperature and Osmolytes on Competing Degradation Routes for an IgG1 Antibody. *J. Pharm. Sci.* 102, 3556–3566 (2013).
22. Salazar, A., Keusgen, M. & von Hagen, J. Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino Acids* 48, 1161–1171 (2016).
23. Senesi, P., Luzi, L., Montesano, A., Mazzocchi, N. & Terruzzi, I. Betaine supplement enhances skeletal muscle differentiation in murine myoblasts via IGF-1 signaling activation. *J. Transl. Med.* 11, 174 (2013).
24. Baltz, J. M. & Tartia, A. P. Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. *Hum. Reprod. Update* 16, 166–176 (2009).
25. Eiberweiser, A., Nazet, A., Kruchinin, S. E., Fedotova, M. V & Buchner, R. Hydration and Ion Binding of the Osmolyte Ectoine. *J. Phys. Chem. B* 119, 15203–15211 (2015).
26. Foster, A. R., El Chami, C., O'Neill, C. A. & Watson, R. E. B. Osmolyte transporter expression is reduced in photoaged human skin: Implications for skin hydration in aging. *Aging Cell* 19, e13058 (2020).
27. Gavrovskaya, L. K., Selina, E. N., Rodionova, O. M., Nezhinskaya, G. I. & Saponov, N. S. The Influence of a Taurinamide Derivative on Skin Wound Healing in Rats: The Experimental Study BT - Taurine 6. in (eds. Oja, S. S. & Saransaari, P.) 529–533 (Springer US, 2006).
28. Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. & Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17R-27R (2003).
29. Mendoza, S. M., Boyd, R. D., Ferket, P. R. & van Heugten, E. Effects of dietary supplementation of the osmolyte betaine on growing pig performance and serological and hematological indices during thermoneutral and heat-stressed conditions¹. *J. Anim. Sci.* 95, 5040–5053 (2017).
30. Prasad, S., Khadatare, P. B. & Roy, I. Effect of chemical chaperones in improving the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4603–4609 (2011).
31. de Marco, A. Osmolytes as Chemical Chaperones to Use in Protein Biotechnology. *Protein Aggregation in Bacteria* 77–92 (2014) doi:doi:10.1002/9781118845363.ch3.
32. Wu, B. *et al.* Expression, refolding and purification of a human interleukin-17A variant. *Cytokine* 53, 107–114 (2011).
33. Yoon, H.-J. *et al.* NF-AT5 is a critical regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 1843–1852 (2011).
34. Chen, G. *et al.* Protective effects of taurine against oxidative stress in the heart of MsrA knockout mice. *J. Cell. Biochem.* 113, 3559–3566 (2012).
35. Hasan, T. *et al.* Osmolytes in vaccine production, flocculation and storage: a



- critical review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 15, 514–525 (2019).
36. Haretskaya, M. V & Sheibak, V. M. Hepatoprotective properties of taurine during carbon tetrachloride intoxication. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 8, 286–292 (2014).
 37. Włodarczyk, S. R., Custódio, D., Pessoa, A. & Monteiro, G. Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 131, 92–98 (2018).
 38. Włodarczyk, S. R., Costa-Silva, T. A., Pessoa-Jr, A., Madeira, P. & Monteiro, G. Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-Asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi*. *Process Biochem.* 81, 123–131 (2019).
 39. Timasheff, S. N. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9721–9726 (2002).
 40. Bolen, D. W. & Rose, G. D. Structure and Energetics of the Hydrogen-Bonded Backbone in Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 339–362 (2008).
 41. Makhatadze, G. I. & Privalov, P. L. Protein interactions with urea and guanidinium chloride: A calorimetric study. *J. Mol. Biol.* 226, 491–505 (1992).
 42. Bolen, D. W. & Baskakov, I. V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. Edited by D. Draper. *J. Mol. Biol.* 310, 955–963 (2001).
 43. Zangi, R., Zhou, R. & Berne, B. J. Urea's Action on Hydrophobic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 1535–1541 (2009).
 44. Street, T. O., Bolen, D. W. & Rose, G. D. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13997–14002 (2006).
 45. Ahmed, M., Namboodiri, V., Mathi, P., Singh, A. K. & Mondal, J. A. How Osmolyte and Denaturant Affect Water at the Air–Water Interface and in Bulk: A Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation (HD-VSFG) and Hydration Shell Spectroscopic Study. *J. Phys. Chem. C* 120, 10252–10260 (2016).
 46. Canchi, D. R., Jayasimha, P., Rau, D. C., Makhatadze, G. I. & Garcia, A. E. Molecular Mechanism for the Preferential Exclusion of TMAO from Protein Surfaces. *J. Phys. Chem. B* 116, 12095–12104 (2012).
 47. Auton, M. & Bolen, D. W. Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15065–15068 (2005).
 48. Ma, J., Pazos, I. M. & Gai, F. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8476–8481 (2014).
 49. Wallqvist, A., Covell, D. G. & Thirumalai, D. Hydrophobic interactions in aqueous urea solutions with implications for the mechanism of protein denaturation. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 427–428 (1998).
 50. Bruździak, P., Adamczak, B., Kaczkowska, E., Czub, J. & Stangret, J. Are stabilizing osmolytes preferentially excluded from the protein surface? FTIR and MD studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 23155–23164 (2015).
 51. Guo, F. & Friedman, J. M. Osmolyte-Induced Perturbations of Hydrogen Bonding between Hydration Layer Waters: Correlation with Protein Conformational Changes. *J. Phys. Chem. B* 113, 16632–16642 (2009).
 52. Bennion, B. J. & Daggett, V. Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: A chemical chaperone at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 6433–6438 (2004).
 53. Soper, A. K., Castner, E. W. & Luzar, A. Impact of urea on water structure: a



- clue to its properties as a denaturant? *Biophys. Chem.* 105, 649–666 (2003).
54. Bennion, B. J. & Daggett, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5142–5147 (2003).
 55. Paul, S. & Patey, G. N. Structure and Interaction in Aqueous Urea–Trimethylamine-N-oxide Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 4476–4482 (2007).
 56. Zou, Q., Bennion, B. J., Daggett, V. & Murphy, K. P. The Molecular Mechanism of Stabilization of Proteins by TMAO and Its Ability to Counteract the Effects of Urea. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 1192–1202 (2002).
 57. Gekko, K. & Timasheff, S. N. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry* 20, 4667–4676 (1981).
 58. Maclagan, R. G. A. R., Malardier-Jugroot, C., Whitehead, M. A. & Lever, M. Theoretical Studies of the Interaction of Water with Compensatory and Noncompensatory Solutes for Proteins. *J. Phys. Chem. A* 108, 2514–2519 (2004).
 59. Batchelor, J. D., Olteanu, A., Tripathy, A. & Pielak, G. J. Impact of Protein Denaturants and Stabilizers on Water Structure. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1958–1961 (2004).
 60. Di Michele, A. *et al.* Modulation of Hydrophobic Effect by Cosolutes. *J. Phys. Chem. B* 110, 21077–21085 (2006).
 61. Panuszko, A., Bruździak, P., Kaczkowska, E. & Stangret, J. General Mechanism of Osmolytes' Influence on Protein Stability Irrespective of the Type of Osmolyte Cosolvent. *J. Phys. Chem. B* 120, 11159–11169 (2016).
 62. Bruździak, P., Panuszko, A. & Stangret, J. Influence of osmolytes on protein and water structure: A step to understanding the mechanism of protein stabilization. *J. Phys. Chem. B* 117, 11502–11508 (2013).
 63. Platts, L. & Falconer, R. J. Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins. *Int. J. Pharm.* 486, 131–135 (2015).
 64. Liu, Y. & Bolen, D. W. The Peptide Backbone Plays a Dominant Role in Protein Stabilization by Naturally Occurring Osmolytes. *Biochemistry* 34, 12884–12891 (1995).
 65. Kumar, N. & Kishore, N. Protein stabilization and counteraction of denaturing effect of urea by glycine bet. *Biophys. Chem.* 189, 16–24 (2014).
 66. Singh, L. R., Poddar, N. K., Dar, T. A., Kumar, R. & Ahmad, F. Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin. *Life Sci.* 88, 117–125 (2011).
 67. Abe, Y., Ohkuri, T., Yoshitomi, S., Murakami, S. & Ueda, T. Role of the osmolyte taurine on the folding of a model protein, hen egg white lysozyme, under a crowding condition. *Amino Acids* 47, 909–915 (2015).
 68. Bruździak, P. *et al.* Taurine as a water structure breaker and protein stabilizer. *Amino Acids* 50, 125–140 (2018).
 69. Lambert, I. H., Kristensen, D. M., Holm, J. B. & Mortensen, O. H. Physiological role of taurine--from organism to organelle. *Acta Physiol. (Oxf)*. 213, 191–212 (2015).
 70. Lin, T.-Y. & Timasheff, S. N. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry* 33, 12695–12701 (1994).



71. Liao, Y.-T., Manson, A. C., DeLyser, M. R., Noid, W. G. & Cremer, P. S. Trimethylamine N -oxide stabilizes proteins via a distinct mechanism compared with betaine and glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 2479–2484 (2017).
72. Wei, H., Fan, Y. & Gao, Y. Q. Effects of urea, tetramethyl urea, and trimethylamine n-oxide on aqueous solution structure and solvation of protein backbones: A molecular dynamics simulation study. *J. Phys. Chem. B* 114, 557–568 (2010).
73. Kumar, S., Sharma, D. & Kumar, R. Effect of urea and alkylureas on the stability and structural fluctuation of the M80-containing Ω -loop of horse cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1844, 641–655 (2014).
74. Poklar, N., Vesnaver, G. & Lapanje, S. Interactions of α -chymotrypsinogen A with alkylureas. *Biophys. Chem.* 57, 279–289 (1996).
75. Poklar, N., Vesnaver, G. & Lapanje, S. Studies by UV spectroscopy of thermal denaturation of β -lactoglobulin in urea and alkylurea solutions. *Biophys. Chem.* 47, 143–151 (1993).
76. Poklar, N., Vesnaver, G. & Lapanje, S. Thermodynamics of denaturation of α -chymotrypsinogen A in aqueous urea and alkylurea solutions. *J. Protein Chem.* 14, 709–719 (1995).
77. Merlini, G. & Bellotti, V. Lysozyme: A paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clin. Chim. Acta* 357, 168–172 (2005).
78. Chayen, N. E. & Saridakis, E. Is lysozyme really the ideal model protein? *J. Cryst. Growth* 232, 262–264 (2001).
79. Panuszko, A. *et al.* Hydration of simple amides. FTIR Spectra of HDO and theoretical studies. *J. Phys. Chem. B* 112, 2483–2493 (2008).
80. Panuszko, A., Nowak, M. G., Bruździak, P., Stasiulewicz, M. & Stangret, J. Amides as models to study the hydration of proteins and peptides — spectroscopic and theoretical approach on hydration in various temperatures. *J. Mol. Liq.* 278, 706–715 (2019).
81. Mennucci, B. & Martinez, J. M. How to Model Solvation of Peptides? Insights from a Quantum-mechanical and Molecular Dynamics Study of N-Methylacetamide. 1. Geometries, Infrared, and Ultraviolet Spectra in Water. *J. Phys. Chem. B* 109, 9818–9829 (2005).
82. Allison, S. K., Bates, S. P., Crain, J. & Martyna, G. J. Solution Structure of the Aqueous Model Peptide N-Methylacetamide. *J. Phys. Chem. B* 110, 21319–21326 (2006).
83. Chand, A., Chettiyankandy, P., Pattanayak, S. K. & Chowdhuri, S. Effects of trimethylamine-N-oxide (TMAO) on aqueous N-methylacetamide solution: A comparison of different force fields of TMAO. *J. Mol. Liq.* 225, 926–935 (2017).
84. Faginas-Lago, N., Lombardi, A. & Albertí, M. Aqueous N-methylacetamide: New analytic potentials and a molecular dynamics study. *J. Mol. Liq.* 224, 792–800 (2016).
85. Dyshin, A. A., Eliseeva, O. V & Kiselev, M. G. Density and Viscosity of N-Methylacetamide–Calcium Chloride Mixtures over the Temperature Range from 308.15 to 328.15 K at Atmospheric Pressure. *J. Chem. Eng. Data* 62, 4128–4132 (2017).
86. Di Gioacchino, M., Bruni, F. & Ricci, M. A. N-Methylacetamide Aqueous Solutions: A Neutron Diffraction Study. *J. Phys. Chem. B* 123, 1808–1814 (2019).



87. Chand, A. & Chowdhuri, S. Behaviour of aqueous N-methylacetamide solution in presence of ethanol and 2,2,2 tri-fluoroethanol: Hydrogen bonding structure and dynamics. *J. Mol. Liq.* 224, 1370–1379 (2016).
88. Dudik, J. M., Johnson, C. R. & Asher, S. A. UV resonance Raman studies of acetone, acetamide, and N-methylacetamide: models for the peptide bond. *J. Phys. Chem.* 89, 3805–3814 (1985).
89. Stangret, J. & Gampe, T. Hydration Sphere of Tetrabutylammonium Cation. FTIR Studies of HDO Spectra. *J. Phys. Chem. B* 103, 3778–3783 (1999).
90. Biernacki, K. A., Kaczkowska, E. & Bruździak, P. Aqueous solutions of NMA, Na₂HPO₄, and NaH₂PO₄ as models for interaction studies in phosphate–protein systems. *J. Mol. Liq.* 265, 361–371 (2018).
91. ELLIOTT, A. & AMBROSE, E. J. Structure of Synthetic Polypeptides. *Nature* 165, 921–922 (1950).
92. Krimm, S. & Bandekar, J. Vibrational Spectroscopy and Conformation of Peptides, Polypeptides, and Proteins. in (eds. Anfinsen, C. B., Edsall, J. T. & Richards, F. M. B. T.-A. in P. C.) vol. 38 181–364 (Academic Press, 1986).
93. Arrondo, J. L. R. & Goñi, F. M. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 367–405 (1999).
94. Viganò, C., Manciu, L., Buyse, F., Goormaghtigh, E. & Ruyschaert, J.-M. Attenuated total reflection IR spectroscopy as a tool to investigate the structure, orientation and tertiary structure changes in peptides and membrane proteins. *Pept. Sci.* 55, 373–380 (2000).
95. Singh, B. R. Basic Aspects of the Technique and Applications of Infrared Spectroscopy of Peptides and Proteins. in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins* vol. 750 1–2 (American Chemical Society, 1999).
96. Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A. & Yu, S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat. Protoc.* 10, 382–396 (2015).
97. Haris, P. I. & Chapman, D. The conformational analysis of peptides using fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 37, 251–263 (1995).
98. Bruździak, P., Panuszko, A., Piotrowski, B. & Stangret, J. Structural changes of a simple peptide—Trpzip-1—in aqueous solutions and the corresponding hydration phenomena under the influence of temperature. *J. Mol. Liq.* 277, 532–540 (2019).
99. Bruździak, P. *et al.* Taurine as a water structure breaker and protein stabilizer. *Amino Acids* 50, 125–140 (2018).
100. Krakowiak, J. & Wawer, J. Effect of temperature and ionic strength on volumetric and acoustic properties of solutions of urea alkyl derivatives in aqueous NaCl. *J. Chem. Thermodyn.* 90, 232–241 (2015).
101. Krakowiak, J. & Wawer, J. Hydration of urea and its derivatives - Volumetric and compressibility studies. *J. Chem. Thermodyn.* 79, 109–117 (2014).
102. Mezei, M., Mehrotra, P. K. & Beveridge, D. L. Monte Carlo Computer Simulation of the Aqueous Hydration of the Glycine Zwitterion at 25°C. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2, 1–27 (1984).
103. Kameda, Y., Ebata, H., Usuki, T., Uemura, O. & Misawa, M. Hydration Structure of Glycine Molecules in Concentrated Aqueous Solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67, 3159–3164 (1994).
104. Kokpol, S. U., Doungdee, P. B., Hannongbua, S. V., Rode, B. M. & Limtrakul, J. P. Ab initio study of the hydration of the glycine zwitterion. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* 84, 1789–1792 (1988).
105. Parsons, M. T. & Koga, Y. Hydration number of glycine in aqueous solution:

- An experimental estimate. *J. Chem. Phys.* 123, (2005).
106. Li, T., Cui, Y., Mathaga, J., Kumar, R. & Kuroda, D. G. Hydration and vibrational dynamics of betaine (N,N,N-trimethylglycine). *J. Chem. Phys.* 142, (2015).
 107. Munroe, K. L., Magers, D. H. & Hammer, N. I. Raman Spectroscopic Signatures of Noncovalent Interactions Between Trimethylamine N-oxide (TMAO) and Water. *J. Phys. Chem. B* 115, 7699–7707 (2011).
 108. Meersman, F., Bowron, D., Soper, A. K. & Koch, M. H. J. Counteraction of urea by trimethylamine N-oxide is due to direct interaction. *Biophys. J.* 97, 2559–2566 (2009).
 109. Sarma, R. & Paul, S. The effect of aqueous solutions of trimethylamine-N-oxide on pressure induced modifications of hydrophobic interactions. *J. Chem. Phys.* 137, 94502 (2012).
 110. Panuszko, A., Bruździak, P., Zielkiewicz, J., Wyrzykowski, D. & Stangret, J. Effects of Urea and Trimethylamine-N-oxide on the Properties of Water and the Secondary Structure of Hen Egg White Lysozyme. *J. Phys. Chem. B* 113, 14797–14809 (2009).
 111. Krakowiak, J., Wawer, J. & Panuszko, A. The hydration of the protein stabilizing agents: Trimethylamine-N-oxide, glycine and its N-methyl derivatives – The volumetric and compressibility studies. *J. Chem. Thermodyn.* 60, 179–190 (2013).
 112. Rezus, Y. L. A. & Bakker, H. J. Observation of Immobilized Water Molecules around Hydrophobic Groups. *Phys. Rev. Lett.* 99, 148301 (2007).
 113. Rezus, Y. L. A. & Bakker, H. J. Destabilization of the Hydrogen-Bond Structure of Water by the Osmolyte Trimethylamine N-Oxide. *J. Phys. Chem. B* 113, 4038–4044 (2009).
 114. Hunger, J., Ottosson, N., Mazur, K., Bonn, M. & Bakker, H. J. Water-mediated interactions between trimethylamine-N-oxide and urea. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 298–306 (2015).
 115. Larini, L. & Shea, J.-E. Double Resolution Model for Studying TMAO/Water Effective Interactions. *J. Phys. Chem. B* 117, 13268–13277 (2013).
 116. Knake, L., Schwaab, G., Kartaschew, K. & Havenith, M. Solvation Dynamics of Trimethylamine N-Oxide in Aqueous Solution Probed by Terahertz Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 119, 13842–13851 (2015).
 117. Sharp, K. A., Madan, B., Manas, E. & Vanderkooi, J. M. Water structure changes induced by hydrophobic and polar solutes revealed by simulations and infrared spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 114, 1791–1796 (2001).
 118. Della Gatta, G., Badea, E., Józwiak, M. & Del Vecchio, P. Thermodynamics of solvation of urea and some monosubstituted N-alkylureas in water at 298.15 K. *J. Chem. Eng. Data* 52, 419–425 (2007).
 119. Almásy, L., Len, A., Székely, N. K. & Pleštil, J. Solute aggregation in dilute aqueous solutions of tetramethylurea. *Fluid Phase Equilib.* 257, 114–119 (2007).
 120. Egorov, G. I. & Makarov, D. M. Volumetric properties of the water + tetramethylurea mixture over the temperature range from 274.15 to 333.15 K at atmospheric pressure. *J. Mol. Liq.* 278, 279–289 (2019).
 121. Tielrooij, K. J., Hunger, J., Buchner, R., Bonn, M. & Bakker, H. J. Influence of concentration and temperature on the dynamics of water in the hydrophobic hydration shell of tetramethylurea. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15671–15678 (2010).
 122. Fernandez, J. & Lilley, T. H. Aqueous solutions containing amino acids and peptides. Part 28.—Enthalpy of interaction of some amides with glycine and



- α -alanine: interactions of the zwitterionic group of α -amino acids with hydrophobic groups and peptide groups. *J. Chem. Soc. {,} Faraday Trans.* 88, 2503–2509 (1992).
123. Kong, Z., Liu, C., Jiang, L., Mo, J. & Ma, L. Volumetric Properties of Glycine, L-Alanine, and L-Serine in Formamide–Water Mixtures at 298.15 K. *J. Chem. Eng. Data* 59, 2595–2601 (2014).
 124. Palecz, B. The enthalpies of interaction of glycine with some amides and ureas in water at 25°C. *J. Solution Chem.* 24, 537–550 (1995).
 125. Wawer, J. & Krakowiak, J. Structural changes of water caused by non-electrolytes: Volumetric and compressibility approach for urea-like analogues. *J. Mol. Liq.* 259, 112–123 (2018).
 126. McMillan, W. G. & Mayer, J. E. The Statistical Thermodynamics of Multicomponent Systems. *J. Chem. Phys.* 13, 276–305 (1945).
 127. Sukenik, S. & Harries, D. Insights into the disparate action of osmolytes and macromolecular crowders on amyloid formation. *Prion* 6, 26–31 (2012).
 128. Muttathukattil, A. N. & Reddy, G. Osmolyte Effects on the Growth of Amyloid Fibrils. *J. Phys. Chem. B* 120, 10979–10989 (2016).
 129. Murray, B. *et al.* Cosolute Effects on Amyloid Aggregation in a Nondiffusion Limited Regime: Intrinsic Osmolyte Properties and the Volume Exclusion Principle. *Langmuir* 31, 4246–4254 (2015).
 130. Yang, D.-S., Yip, C. M., Huang, T. H. J., Chakrabarty, A. & Fraser, P. E. Manipulating the Amyloid- β Aggregation Pathway with Chemical Chaperones. *J. Biol. Chem.* 274, 32970–32974 (1999).
 131. Venkatraman, A. *et al.* Effect of osmolytes on in-vitro aggregation properties of peptides derived from TGFBIp. *Sci. Rep.* 10, 4011 (2020).
 132. Chhabra, G., Chandra, N. & Swaminathan, R. Osmolytes: Key Players in Regulating Protein Aggregation BT - Cellular Osmolytes: From Chaperoning Protein Folding to Clinical Perspectives. in (eds. Rajendrakumar Singh, L. & Dar, T. A.) 97–119 (Springer Singapore, 2017). doi:10.1007/978-981-10-3707-8_5.
 133. Close, W. *et al.* Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nat. Commun.* 9, 1–7 (2018).
 134. Stromer, T. & Serpell, L. C. Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. *Microsc. Res. Tech.* 67, 210–217 (2005).
 135. Adamcik, J. *et al.* Understanding amyloid aggregation by statistical analysis of atomic force microscopy images. *Nat. Nanotechnol.* 5, 423 (2010).
 136. Riek, R. & Eisenberg, D. S. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* 539, 227–235 (2016).
 137. Dobson, C. M. Protein Folding and Misfolding: Neurodegenerative Diseases. 7, (2009).
 138. Cherny, I. & Gazit, E. Amyloids: Not only pathological agents but also ordered nanomaterials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47, 4062–4069 (2008).
 139. Knowles, T. P. J. & Buehler, M. J. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nat. Nanotechnol.* 6, 469 (2011).
 140. Munishkina, L. A., Ahmad, A., Fink, A. L. & Uversky, V. N. Guiding Protein Aggregation with Macromolecular Crowding. *Biochemistry* 47, 8993–9006 (2008).
 141. Chiti, F. & Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366 (2006).
 142. Bemporad, F. & Chiti, F. Protein misfolded oligomers: Experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. *Chem. Biol.* 19, 315–327 (2012).



143. Bemporad, F. *et al.* Sequence and structural determinants of amyloid fibril formation. *Acc. Chem. Res.* 39, 620–627 (2006).
144. Ignatova, Z. & Gierasch, L. M. Inhibition of protein aggregation &in vitro& and &in vivo& by a natural osmoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13357 LP – 13361 (2006).
145. Mittal, S. & Singh, L. R. Macromolecular crowding decelerates aggregation of a β -rich protein, bovine carbonic anhydrase: a case study. *J. Biochem.* 156, 273–282 (2014).
146. Tanaka, M. *et al.* Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 10, 148 (2004).
147. Takai, E. *et al.* Cysteine inhibits amyloid fibrillation of lysozyme and directs the formation of small worm-like aggregates through non-covalent interactions. *Biotechnol. Prog.* 30, 470–478 (2014).
148. Brudar, S. & Hribar-Lee, B. The role of buffers in wild-type hewl amyloid fibril formation mechanism. *Biomolecules* 9, (2019).
149. Samuel, D. *et al.* Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci.* 9, 344–352 (2008).
150. Choudhary, S. & Kishore, N. Addressing Mechanism of Fibrillization/Aggregation and Its Prevention in Presence of Osmolytes: Spectroscopic and Calorimetric Approach. *PLoS One* 9, e104600 (2014).
151. Welch, W. J. & Brown, C. R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress and Chaperones* vol. 1 109–115 (1996).
152. Sato, S., Ward, C. L., Krouse, M. E., Wine, J. J. & Kopito, R. R. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J. Biol. Chem.* 271, 635–638 (1996).
153. Tamarappoo, B. K. & Verkman, A. S. Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J. Clin. Invest.* 101, 2257–2267 (1998).
154. Arora, A., Ha, C. & Park, C. B. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett.* 564, 121–125 (2004).
155. Choudhary, S. & Kishore, N. Interactions of some short peptides with the osmolyte trimethylamine N-oxide in aqueous solution: Physico-chemical insights. *J. Chem. Thermodyn.* 52, 36–42 (2012).
156. Qin, Z., Sun, Y., Jia, B. & Wang, D. Kinetic Mechanism of Thioflavin T Binding onto the Amyloid Fibril of Hen Egg White Lysozyme. (2017) doi:10.1021/acs.langmuir.7b00221.
157. Biancalana, M. & Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 1405–1412 (2010).
158. Lindgren, M., Sörgjerd, K. & Hammarström, P. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. *Biophys. J.* 88, 4200–4212 (2005).
159. Yushchenko, D. A., Fauerbach, J. A., Thirunavukkuarasu, S., Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. Fluorescent ratiometric MFC probe sensitive to early stages of β -Synuclein aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 7860–7861 (2010).
160. Celej, M. S., Caarls, W., Demchenko, A. P. & Jovin, T. M. A Triple-Emission Fluorescent Probe Reveals Distinctive Amyloid Fibrillar Polymorphism of Wild-Type α -Synuclein and Its Familial Parkinson's Disease Mutants. *Biochemistry* 48, 7465–7472 (2009).



161. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1751, 119–139 (2005).
162. Micsonai, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E3095–E3103 (2015).
163. Wei, Y., Thyparambil, A. A. & Latour, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1844, 2331–2337 (2014).
164. Li, H., Oberhauser, A. F., Fowler, S. B., Clarke, J. & Fernandez, J. M. Atomic force microscopy reveals the mechanical design of a modular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6527–6531 (2000).
165. Goldsbury, C. & Green, J. Time -Lapse Atomic Force Microscopy in the Characterization of Amyloid-Like Fibril Assembly and Oligomeric Intermediates BT - Amyloid Proteins: Methods and Protocols. in (ed. Sigurdsson, E. M.) 103–128 (Humana Press, 2005). doi:10.1385/1-59259-874-9:103.
166. Kim, B.-H. *et al.* Single-Molecule Atomic Force Microscopy Force Spectroscopy Study of A β -40 Interactions. *Biochemistry* 50, 5154–5162 (2011).
167. Pires, R. H., Saraiva, M. J., Damas, A. M. & Kellermayer, M. S. Z. Structure and assembly–disassembly properties of wild-type transthyretin amyloid protofibrils observed with atomic force microscopy. *J. Mol. Recognit.* 24, 467–476 (2011).
168. Sneideris, T., Milto, K. & Smirnovas, V. Polymorphism of amyloid-like fibrils can be defined by the concentration of seeds. *PeerJ* 3, e1207 (2015).
169. Amara, C. Ben, Eghbal, N., Oulahal, N., Degraeve, P. & Gharsallaoui, A. Properties of lysozyme/sodium alginate complexes for the development of antimicrobial films. *Food Res. Int.* 89, 272–280 (2016).
170. Dissanayake, M., Ramchandran, L., Donkor, O. N. & Vasiljevic, T. Denaturation of whey proteins as a function of heat, pH and protein concentration. *Int. Dairy J.* 31, 93–99 (2013).
171. Mirigian, M., Mukherjee, K., Bane, S. L. & Sackett, D. L. Chapter 14 - Measurement of In Vitro Microtubule Polymerization by Turbidity and Fluorescence. in *Microtubules*, (eds Correia, J. J. & Wilson, L. B. T.-M. in C. B.) vol. 115 215–229 (Academic Press, 2013).
172. Hall, D. *et al.* Protein aggregate turbidity: Simulation of turbidity profiles for mixed-aggregation reactions. *Anal. Biochem.* 498, 78–94 (2016).
173. Ryan, K. N. *et al.* Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts. *Food Hydrocoll.* 27, 411–420 (2012).
174. No Title. <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3->
175. Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392–400 (2008).
176. Whitmore, L. & Wallace, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–W673 (2004).
177. Bundesanstalt, P. T. & Natzionale, I. E. Wyznaczenie modeli wielomianowych obiektów z danych eksperymentalnych. (1995).
178. Wawer, J. & Krakowiak, J. Structural changes of water caused by non-



- electrolytes: Volumetric and compressibility approach for urea-like analogues. *J. Mol. Liq.* 259, 112–123 (2018).
179. Krakowiak, J., Wawer, J. & Panuszko, A. Densimetric and ultrasonic characterization of urea and its derivatives in water. *J. Chem. Thermodyn.* 58, 211–220 (2013).
 180. Giaquinto, A. R., Lindstrom, R. E., Swarbrick, J. & LoSurdo, A. Amide-water interactions in cosolvent systems. I. Solubilities and apparent molar volumes of methyl paraben. *J. Solution Chem.* 6, 687–701 (1977).
 181. Krakowiak, J., Wawer, J. & Panuszko, A. The hydration of the protein stabilizing agents: Trimethylamine-N-oxide, glycine and its N-methyl derivatives – The volumetric and compressibility studies. *J. Chem. Thermodyn.* 60, 179–190 (2013).
 182. Tyrrell, H. J. V & Kennerley, M. Viscosity B-coefficients between 5° and 20° for glycolamide, glycine, and N-methylated glycines in aqueous solution. *J. Chem. Soc. A Inorganic, Phys. Theor.* 2724–2728 (1968) doi:10.1039/J19680002724.
 183. Zhao, H. Viscosity B-coefficients and standard partial molar volumes of amino acids, and their roles in interpreting the protein (enzyme) stabilization. *Biophys. Chem.* 122, 157–183 (2006).
 184. BS Lark, K. B. Apparent Molal Volumes & Apparent Molal Expansibilities of Glycine in Aqueous Solutions. *Indian J. Chem.* 22A, 192–194 (1983).
 185. B S LARK, K. B. Surj. S. Partial Molal Volumes of Transfer of Glycine & dl-Alanin from Water to Aqueous Sodium Chloride Solution. *Indian J. Chem.* 22A, 534–537 (1986).
 186. Caron, G., Gélinas, N. & Desnoyers, J. E. Effect of geometry on the thermodynamic properties of micellar systems: trialkylamine oxides in water. *Can. J. Chem.* 64, 1573–1580 (1986).
 187. Cabani, S., Conti, G., Matteoli, E. & Tiné, M. R. Volumetric properties of amphiphilic molecules in water. Part 2.—Thermal expansibility and compressibility related to the formation of zwitterionic structures. *J. Chem. Soc. {,} Faraday Trans. 1* 77, 2385–2394 (1981).
 188. Hepler, L. G. Thermal expansion and structure in water and aqueous solutions. *Can. J. Chem.* 47, 4613–4617 (1969).
 189. Brudar, S. & Hribar-Lee, B. The Role of Buffers in Wild-Type HEWL Amyloid Fibril Formation Mechanism. *Biomolecules* 9, (2019).
 190. Sabulal, B. & Kishore, N. Differential scanning calorimetric study of the interactions of some stabilizing amino acids and oligopeptides with hen egg white lysozyme. *J. Chem. Soc. {,} Faraday Trans.* 91, 2101–2106 (1995).
 191. Wawer, J. *et al.* Amyloid fibril formation in the presence of water structure-affecting solutes. *Biophys. Chem.* 254, 106265 (2019).
 192. Auton, M., Rösger, J., Sinev, M., Holthausen, L. M. F. & Bolen, D. W. Osmolyte effects on protein stability and solubility: A balancing act between backbone and side-chains. *Biophys. Chem.* 159, 90–99 (2011).
 193. Chatani, E. & Yamamoto, N. Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophys. Rev.* 10, 527–534 (2018).
 194. Bemporad, F. & Chiti, F. Protein misfolded oligomers: Experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationships. *Chem. Biol.* 19, 315–327 (2012).
 195. Singh, P. K., Mora, A. K. & Nath, S. Ultrafast fluorescence spectroscopy reveals a dominant weakly-emissive population of fibril bound thioflavin-T. *Chem. Commun.* 51, 14042–14045 (2015).
 196. <http://www.ifpan.edu.pl/ON->



2/on22/modernoptics/lectures/notatki/12polaryzacja_print.pdf.

<http://www.ifpan.edu.pl/ON-2/on22/modernoptics/lec>.

197. Hoffmann, S. V., Fano, M. & van de Weert, M. Circular Dichroism Spectroscopy for Structural Characterization of Proteins BT - Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. in (eds. Müllertz, A., Perrie, Y. & Rades, T.) 223–251 (Springer New York, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-4029-5_6.
198. Wawer, J. *et al.* Influence of stabilizing osmolytes, glycine and betaine, on amyloid fibril formation. *Int. J. Biol. Macromol.* in prepara, (2020).

9. Materiały uzupełniające

Tabela 27. Zmierzone wartości gęstości i szybkości dźwięku roztworów **glicyny** w wodnym roztworze NMA w 3 temperaturach i przy różnym dodatku NMA w rozpuszczalniku.

T/K	288,15	298,15	308,15	288,15	298,15	308,15
m_{GLY} $l/(mol \cdot kg^{-1})$	$d/(kg \cdot m^{-3})$			$u/(m \cdot s^{-1})$		
w 2 mol/kg roztworze NMA						
0	1000,647	997,688	993,925	1556,2	1570,1	1578,9
0,1467	1005,302	1002,246	998,430	1563,1	1576,8	1585,4
0,2368	1008,118	1005,021	1001,158	1567,3	1580,8	1589,3
0,2776	1009,380	1006,256	1002,382	1569,2	1582,6	1591,0
0,3160	1010,551	1007,402	1003,512	1571,0	1584,2	1592,6
0,3466	1011,487	1008,331	1004,426	1572,3	1585,6	1593,9
w 4 mol/kg roztworze NMA						
0	1003,632	999,531	994,962	1618,5	1619,7	1617,7
0,1856	1009,382	1005,264	1000,605	1626,0	1627,1	1625,0
0,2347	1010,876	1006,742	1002,068	1627,9	1629,0	1626,9
0,2745	1012,078	1007,964	1003,249	1629,4	1630,5	1628,3
0,3139	1013,252	1009,124	1004,399	1630,9	1631,9	1629,8
0,3441	1014,152	1010,012	1005,281	1632,1	1633,1	1630,9
w 6 mol/kg roztworze NMA						
0	1006,308	1001,405	995,996	1659,0	1651,1	1641,3
0,1463	1010,705	1005,768	1000,344	1663,8	1656,0	1646,3
0,1860	1011,881	1006,935	1001,495	1665,1	1657,4	1647,6
0,2354	1013,334	1008,378	1002,944	1666,7	1659,0	1649,3
0,2750	1014,499	1009,531	1004,093	1668,0	1660,3	1650,6
0,3138	1016,503	1011,520	1006,077	1670,2	1662,6	1653,0
0,3442	1015,622	1010,647	1005,207	1669,2	1661,6	1651,9
w 8 mol/kg roztworze NMA						
0	1008,377	1002,704	996,639	1685,0	1670,5	1654,7
0,1462	1012,623	1006,944	1000,889	1688,9	1674,6	1659,1
0,1856	1013,756	1008,077	1002,022	1690,0	1675,8	1660,3
0,2340	1015,144	1009,460	1003,406	1691,3	1677,2	1661,7
0,2744	1016,284	1010,600	1004,545	1692,4	1678,3	1662,9
0,3130	1017,384	1011,695	1005,637	1693,5	1679,4	1664,0



Tabela 28. Zmierzone wartości gęstości i szybkości dźwięku roztworów **N,N,N-trimetyloglicyny** w wodnym roztworze NMA w 3 temperaturach i przy różnym dodatku NMA w rozpuszczalniku.

T/K	288,15	298,15	308,15	288,15	298,15	308,15
m BET /(mol·kg ⁻¹)	$d/(kg·m^{-3})$			$u/(m·s^{-1})$		
w 2 mol/kg roztworze NMA						
0	1000,630	997,679	993,919	1555,9	1569,8	1578,7
0,1427	1003,422	1000,375	996,555	1566,3	1579,4	1587,6
0,1821	1004,181	1001,114	997,272	1569,2	1582,0	1590,1
0,2304	1005,111	1002,011	998,146	1572,7	1585,2	1593,0
0,2717	1005,888	1002,764	998,883	1575,7	1588,0	1595,6
0,3099	1006,607	1003,460	999,561	1578,4	1590,6	1598,0
0,3402	1007,165	1003,999	1000,091	1580,6	1592,5	1599,8
w 4 mol/kg roztworze NMA						
0	1003,734	999,706	995,039	1620,0	1620,8	1618,6
0,1848	1007,340	1003,223	998,497	1632,0	1632,2	1629,4
0,2338	1008,272	1004,132	999,392	1635,2	1635,2	1632,2
0,2744	1009,046	1004,885	1000,131	1637,9	1637,7	1634,6
0,3136	1009,782	1005,601	1000,837	1640,5	1640,1	1636,8
0,3443	1010,353	1006,159	1001,388	1642,4	1641,9	1638,5
w 6 mol/kg roztworze NMA						
0	1006,431	1001,483	996,040	1660,6	1652,4	1642,2
0,1442	1009,199	1004,211	998,747	1669,0	1660,5	1650,0
0,1841	1009,965	1004,964	999,489	1671,6	1662,8	1652,3
0,2331	1010,881	1005,864	1000,382	1674,3	1665,5	1654,9
0,2729	1011,631	1006,601	1001,112	1676,8	1667,8	1657,1
0,3125	1012,366	1007,323	1001,828	1679,1	1670,1	1659,2
0,3434	1012,926	1007,877	1002,378	1680,9	1671,7	1660,8
w 8 mol/kg roztworze NMA						
0	1008,507	1002,782	996,671	1686,4	1671,5	1655,4
0,1444	1011,226	1005,477	999,359	1694,4	1679,2	1662,8
0,1841	1011,968	1006,212	1000,092	1696,6	1681,3	1664,9
0,2328	1012,850	1007,087	1000,965	1699,1	1683,8	1667,3
0,2736	1013,594	1007,825	1001,699	1701,4	1685,9	1669,4
0,3126	1014,301	1008,528	1002,403	1703,5	1688,0	1671,4
0,3433	1014,833	1009,058	1002,936	1704,9	1689,4	1672,8



Tabela 29. Zmierzone wartości gęstości i szybkości dźwięku roztworów **TMAO** w wodnym roztworze NMA w 3 temperaturach i przy różnym dodatku NMA w rozpuszczalniku.

T/K	288,15	298,15	308,15	288,15	298,15	308,15
m TMAO /(mol·kg ⁻¹)	$d/(kg·m^{-3})$			$u/(m·s^{-1})$		
w 2 mol/kg roztworze NMA						
0	1000,615	997,663	993,911	1555,4	1569,4	1578,4
0,1466	1001,202	998,200	994,420	1566,7	1579,5	1587,5
0,2359	1001,556	998,530	994,722	1573,4	1585,5	1592,9
0,2765	1001,730	998,692	994,871	1576,7	1588,4	1595,5
0,3158	1001,892	998,843	995,012	1579,8	1591,1	1598,0
0,3468	1002,003	998,941	995,106	1581,8	1593,0	1599,7
w 4 mol/kg roztworze NMA						
0	1003,652	999,655	995,040	1618,4	1619,6	1617,7
0,1448	1004,336	1000,282	995,600	1628,9	1629,1	1626,3
0,1857	1004,532	1000,461	995,770	1632,0	1631,8	1628,8
0,2338	1004,775	1000,663	995,961	1635,5	1635,0	1631,6
0,2745	1004,943	1000,838	996,126	1638,4	1637,6	1634,0
0,3145	1005,131	1001,011	996,288	1641,3	1640,2	1636,4
0,3445	1005,268	1001,138	996,409	1643,4	1642,1	1638,1
w 6 mol/kg roztworze NMA						
0	1006,410	1001,473	996,033	1660,1	1652,0	1642,0
0,1447	1007,121	1002,129	996,658	1669,9	1660,9	1650,1
0,2326	1007,547	1002,527	997,037	1675,7	1666,1	1654,8
0,2730	1007,735	1002,701	997,205	1678,3	1668,5	1657,1
0,3125	1007,926	1002,880	997,373	1680,9	1670,9	1659,2
0,3426	1008,055	1003,004	997,494	1682,8	1672,6	1660,8
w 8 mol/kg roztworze NMA						
0	1008,433	1002,737	996,655	1685,5	1670,8	1654,9
0,1441	1009,079	1003,362	997,266	1693,7	1678,5	1662,1
0,1833	1009,274	1003,543	997,439	1696,1	1680,7	1664,1
0,2317	1009,490	1003,747	997,635	1698,9	1683,2	1666,5
0,2716	1009,673	1003,923	997,806	1701,2	1685,4	1668,5
0,3111	1009,851	1004,092	997,967	1703,5	1687,4	1670,4
0,3414	1009,991	1004,225	998,100	1705,3	1689,1	1671,9



Tabela 30. Zmierzone wartości gęstości i szybkości dźwięku roztworów *n*-butylomocznika w wodnym wodnym NMA w 3 temperaturach i przy różnym dodatku NMA w rozpuszczalniku.

T/K	288,15	298,15	308,15	288,15	298,15	308,15
<i>m</i> BU /(mol·kg ⁻¹)	<i>d</i> /(kg·m ⁻³)			<i>u</i> /(m·s ⁻¹)		
w 2 mol/kg roztworze NMA						
0	1000,611	997,667	993,909	1555,3	1569,3	1578,3
0,1441	1001,873	998,734	994,809	1566,2	1578,3	1585,6
0,1842	1002,209	999,015	995,044	1569,1	1580,6	1587,4
0,2339	1002,609	999,353	995,323	1572,5	1583,4	1589,6
0,2736	1002,930	999,617	995,547	1575,1	1585,5	1591,3
0,3130	1003,254	999,893	995,780	1577,7	1587,6	1593,0
0,3440	1003,513	1000,109	995,958	1579,8	1589,3	1594,3
w 4 mol/kg roztworze NMA						
0	1003,716	999,691	995,035	1619,5	1620,5	1618,3
0,1435	1004,880	1000,681	995,862	1626,6	1626,1	1622,6
0,1833	1005,183	1000,925	996,070	1628,5	1627,6	1623,8
0,2318	1005,557	1001,247	996,333	1630,7	1629,3	1625,0
0,2728	1005,834	1001,476	996,526	1632,3	1630,5	1626,0
0,3118	1006,148	1001,740	996,746	1634,1	1631,9	1627,0
0,3426	1006,369	1001,925	996,898	1635,3	1632,9	1627,7
w 6 mol/kg roztworze NMA						
0	1006,364	1001,441	996,017	1659,6	1651,6	1641,6
0,1451	1007,375	1002,297	996,736	1663,9	1654,8	1643,9
0,1852	1007,645	1002,523	996,927	1665,0	1655,6	1644,4
0,2348	1007,958	1002,784	997,143	1666,3	1656,5	1645,0
0,2757	1008,218	1003,002	997,326	1667,2	1657,2	1645,5
0,3154	1008,463	1003,208	997,496	1668,1	1657,9	1645,9
0,3464	1008,652	1003,366	997,630	1668,8	1658,3	1646,1
w 8 mol/kg roztworze NMA						
0	1008,370	1002,703	996,641	1684,8	1670,3	1654,6
0,1429	1009,176	1003,389	997,222	1686,7	1671,5	1655,1
0,1830	1009,394	1003,571	997,375	1687,2	1671,8	1655,2
0,2318	1009,668	1003,798	997,562	1687,8	1672,2	1655,4
0,2721	1009,863	1003,967	997,708	1688,0	1672,3	1655,4
0,3113	1010,061	1004,134	997,849	1688,4	1672,4	1655,4
0,3420	1010,204	1004,254	997,949	1689,1	1673,0	1655,8



Tabela 31. Zmierzone wartości gęstości i szybkości dźwięku roztworów **N,N,N',N'-tetrametylomocznika** w wodnym roztworze NMA w 3 temperaturach i przy różnym dodatku NMA w rozpuszczalniku

T/K	288,15	298,15	308,15	288,15	298,15	308,15
m TMU (mol·kg ⁻¹)	$d/(kg·m^{-3})$			$u/(m·s^{-1})$		
w 2 mol/kg roztworze NMA						
0	1000,626	997,677	993,918	1555,6	1569,6	1578,5
0,1462	1001,259	998,141	994,233	1565,9	1577,7	1584,8
0,1874	1001,436	998,256	994,317	1568,7	1580,0	1586,6
0,2359	1001,654	998,429	994,429	1572,0	1582,5	1588,5
0,2772	1001,840	998,569	994,523	1574,9	1584,9	1590,3
0,3179	1002,014	998,696	994,610	1577,3	1586,8	1591,8
0,3492	1002,156	998,801	994,683	1579,4	1588,4	1593,0
w 4 mol/kg roztworze NMA						
0	1003,735	999,711	995,040	1620,0	1620,8	1618,6
0,1442	1004,381	1000,156	995,355	1627,4	1626,5	1622,7
0,1846	1004,566	1000,324	995,468	1629,4	1628,1	1623,9
0,2338	1004,785	1000,486	995,579	1631,8	1629,9	1625,2
0,2743	1004,971	1000,622	995,675	1633,7	1631,4	1626,3
0,3140	1005,145	1000,751	995,763	1635,6	1632,8	1627,3
0,3450	1005,281	1000,852	995,834	1637,0	1633,9	1628,1
w 6 mol/kg roztworze NMA						
0	1006,353	1001,435	996,010	1659,6	1651,6	1641,6
0,1430	1006,930	1001,858	996,305	1664,6	1655,2	1644,1
0,1816	1007,086	1001,976	996,383	1665,9	1656,2	1644,8
0,2310	1007,287	1002,121	996,485	1667,6	1657,5	1645,6
0,2716	1007,445	1002,237	996,562	1668,9	1658,1	1646,2
0,3106	1007,596	1002,349	996,639	1670,2	1659,3	1646,8
0,3410	1007,719	1002,437	996,698	1671,2	1660,1	1647,2
w 8 mol/kg roztworze NMA						
0	1008,359	1002,692	996,634	1684,8	1670,4	1654,6
0,1432	1008,835	1003,040	996,864	1687,9	1672,4	1655,8
0,1828	1008,971	1003,138	996,930	1688,8	1673,0	1656,1
0,2316	1009,135	1003,256	997,008	1689,8	1673,7	1656,4
0,2714	1009,274	1003,357	997,073	1690,7	1674,3	1656,7
0,3114	1009,390	1003,440	997,127	1691,4	1674,7	1656,9
0,3424	1009,483	1003,506	997,169	1692,0	1675,0	1657,1

