



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: **Joanna Grabowska**

Dyscyplina naukowa: **Nauki Chemiczne**

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

Tytuł rozprawy w języku polskim: **Rola wody solwatacyjnej w kształtowaniu aktywności białek z grupy krioprotektantów**

Tytuł rozprawy w języku angielskim: **Role of the solvation water in the shaping of the activity of antifreeze proteins**

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Jan Zielkiewicz	dr inż. Anna Kuffel

Gdańsk, rok 2020



# Spis treści

1. Wprowadzenie .....	1
1.1. Budowa białek przeciwdziałających zamarzaniu .....	2
1.2. Mechanizm funkcjonowania białek przeciwdziałających zamarzaniu .....	5
1.2.1. Odwracalność procesu wiązania białek AFP z lodem .....	6
1.2.2. Mechanizm funkcjonowania białek AFP na poziomie molekularnym .....	8
1.2.3. Rola wody solwatacyjnej w procesie wiązania białek AFP z lodem .....	9
1.3. Oddziaływanie białek AFP z lodem .....	12
1.3.1. Lód heksagonalny i regularny .....	12
1.3.2. Mechanizm krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu .....	14
1.3.3. Wpływ stanu powierzchni lodu na mechanizm krzepnięcia wody na jego powierzchni .....	15
1.3.4. Oddziaływanie białek AFP z lodem .....	17
2. Cel i zakres pracy .....	19
3. Symulacje komputerowe .....	21
3.1. Dynamika molekularna .....	21
3.1.1. Przybliżenie Borna-Oppenheimera .....	22
3.1.2. Pole siłowe .....	23
3.1.3. Algorytmy całkowania równań ruchu .....	25
3.1.4. Krok czasowy .....	27
3.1.5. Algorytm SHAKE .....	28
3.1.6. Kontrola temperatury i ciśnienia .....	28
3.1.7. Periodyczne warunki brzegowe .....	30
3.1.8. Promień odcięcia dla oddziaływań w układzie .....	32
3.2. Procedura symulacyjna .....	33
3.2.1. Wybór modelu wody .....	33
3.2.2. Wybór białka AFP .....	36
3.2.3. Badanie procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu .....	37
3.2.4. Symulacje układu zawierającego jedynie ciekłą wodę .....	39
3.2.5. Badanie mechanizmu oddziaływania białka CfAFP z lodem .....	39



3.2.6. Badanie siły wywieranej na białka CfAFP znajdujące się w pobliżu powierzchni kryształu lodu .....	43
4. Metody analizy rezultatów .....	45
4.1. Entropia statystyczna układu i jej wykorzystanie do opisu struktury wody .....	47
4.1.1. Entropia statystyczna.....	47
4.1.2. Funkcje rozkładu gęstości prawdopodobieństwa i wielocząstkowe funkcje korelacji.....	49
4.1.3. Parametry uporządkowania oparte na koncepcji dwucząstkowych funkcji korelacji.....	51
4.1.4. Rozkład dwucząstkowego wkładu do entropii na część translacyjną, konfiguracyjną i orientacyjną.....	53
4.1.5. Koncepcja map uporządkowania.....	55
4.1.6. Funkcja rozkładu radialnego .....	55
4.2. Parametry empiryczne charakteryzujące strukturę wody.....	56
4.2.1. Właściwości wiązań wodorowych oraz zdefiniowane na ich podstawie parametry strukturalne.....	56
4.2.2. Pozostałe parametry wykorzystywane do opisu struktury wody .....	60
4.3. Anizotropia warstwy solwatacyjnej .....	63
4.4. Śledzenie postępu procesu krzepnięcia wody .....	65
4.4.1. Algorytm CHILL+ .....	66
4.4.2. Parametr $F_4$ .....	69
4.5. Odległość i orientacja cząsteczki białka CfAFP względem lodu.....	70
4.5.1. Odległość białka CfAFP od powierzchni lodu.....	70
4.5.2. Orientacja cząsteczki białka CfAFP względem powierzchni lodu.....	71
4.6. Pomiar siły działającej na cząsteczkę białka.....	72
5. Rezultaty i dyskusja .....	75
5.1. Badanie wpływu wewnętrznego uporządkowania kryształu lodu na proces krzepnięcia wody na jego powierzchni .....	76
5.1.1. Funkcje rozkładu gęstości wody solwatacyjnej lodu .....	78
5.1.2. Postęp procesu krzepnięcia wody w układach symulacyjnych.....	80
5.1.3. Średnia szybkość krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu .....	82
5.1.4. Częstotliwość powstawania lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej w pierwszej warstwie solwatacyjnej powierzchni podstawowej lodu .....	84



5.1.5. Struktura wody solwatacyjnej lodu na wczesnych etapach procesu krzepnięcia i jej wpływ na formę lodu powstającą w tej warstwie.....	86
5.1.6. Pole elektryczne generowane przez kryształ lodu .....	88
5.1.7. Związek między strukturą ciekłej wody a preferencją w stosunku do lodu regularnego w nowo powstającym lodzie.....	93
5.1.8. Podsumowanie .....	99
5.2. Badanie mechanizmu oddziaływania cząsteczki białka CfAFP z powierzchnią lodu .....	100
5.2.1. Budowa układów symulacyjnych .....	100
5.2.2. Wpływ obecności cząsteczki białka CfAFP na proces krzepnięcia wody na powierzchni lodu.....	101
5.2.3. Zmiany strukturalne zachodzące w wodzie solwatacyjnej białka CfAFP i lodu w czasie.....	102
5.2.4. Wizualne porównanie struktury wody solwatacyjnej powierzchni wiążącej białka CfAFP oraz lodu.....	107
5.2.5. Zdalne oddziaływanie między białkiem CfAFP i lodem .....	109
5.3. Badanie siły wywieranej na białko CfAFP przez narastający lód .....	114
5.3.1. Mechanizm powstawania siły w badanych układach.....	115
5.3.2. Rola zmian zachodzących w strukturze wody w mechanizmie generowania siły .....	117
5.3.3. Zmiany strukturalne zachodzące w wodzie zlokalizowanej w obszarze między powierzchniami cząsteczki białka CfAFP i lodu, zachodzące w wyniku zmniejszenia odległości między tymi powierzchniami.....	121
5.4. Molekularny mechanizm adsorpcji białka CfAFP na powierzchni lodu .....	129
5.4.1. Średnia siła działająca na cząsteczki białka znajdujące się w różnych odległościach od powierzchni lodu.....	130
5.4.2. Struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP sąsiadującego z powierzchnią lodu .....	133
6. Wnioski.....	140
Streszczenie .....	144
Abstract.....	145
Podziękowania.....	146
Spis literatury.....	147





# Rozdział 1

## Wprowadzenie

Białka są stosunkowo dużymi i skomplikowanymi związkami chemicznymi, które pełnią kluczową rolę w wielu procesach biologicznych. Nieodłącznym elementem większości z tych procesów jest woda – jej obecność decyduje m.in. o stabilności struktury białek oraz ich aktywności biologicznej<sup>1-5</sup>.

Struktura wody solwatacyjnej białek w wyraźny sposób różni się od struktury czystej wody. Cząsteczki wody, które związane są z powierzchnią białka poprzez wiązania wodorowe, posiadają ograniczoną swobodę ruchu, ponieważ wiązania te są silniejsze niż wiązania powstające między cząsteczkami wody<sup>6</sup>. Z drugiej strony obecność wody w zagłębieniach i rowkach na powierzchni cząsteczek białka może prowadzić do osłabienia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, co zwiększa elastyczność struktury makrocząsteczki<sup>7</sup>. Zachowanie równowagi między sztywnością i elastycznością struktury białek pełni kluczową rolę z punktu widzenia ich aktywności biologicznej.

W inny sposób zachowuje się woda sąsiadująca z obszarami hydrofobowymi białek. W tym przypadku brak jest możliwości tworzenia się wiązań wodorowych między cząsteczkami białka i wody. Hydrofobowy charakter powierzchni sprawia, że struktura wody solwatacyjnej staje się bardziej uporządkowana w porównaniu do wody niezaburzonej obecnością białka, a jej dynamika – spowolniona. Na skutek tego, oddziaływania elektrostatyczne między pobliskimi grupami polarnymi zostają wzmocnione<sup>8</sup>.

Specyficzną grupę białek, zarówno pod względem funkcji, jak i właściwości wody solwatacyjnej, stanowią białka przeciwdziałające zamarzaniu. Związki te posiadają zdolność do wiązania się z powierzchnią kryształów lodu, przez co powstrzymują proces krzepnięcia płynów ustrojowych organizmów żywych. Wydaje się, że kluczową rolę w procesie rozpoznawania i wiązania się białek należących do tej grupy z lodem pełni woda solwatacyjna.

W dalszej części rozdziału przedstawione zostaną ogólne informacje na temat białek z grupy przeciwdziałających zamarzaniu oraz zaprezentowany zostanie aktualny stan wiedzy dotyczącej mechanizmu ich funkcjonowania.

### 1.1. Budowa białek przeciwdziałających zamarzaniu

W latach 50. XX wieku grupa badawcza Scholandera<sup>9</sup> starała się znaleźć odpowiedź na pytanie, w jaki sposób ryby są w stanie przeżyć w wodach Arktyki. Temperatura utrzymuje się tam na poziomie ok.  $-1,7^{\circ}\text{C}$  przez cały rok. Badacze ustalili, że ryby żyją w ciągłym stanie przechłodzenia, mimo iż stężenie jonów obecnych w płynach ustrojowych tych organizmów jest wystarczające, aby obniżyć temperaturę krzepnięcia tylko o ok.  $1^{\circ}\text{C}$ .

Około dwudziestu lat później, DeVries i in.<sup>10,11</sup> odkryli w płynach ustrojowych ryb żyjących w wodach Antarktyki glikoproteiny wykazujące zdolność do obniżania temperatury krzepnięcia roztworu. Naukowcy ustalili, że działanie tych związków nie jest wynikiem występowania efektu koligatywnego.

Od czasu odkrycia glikoprotein wykazujących aktywność przeciwarzmozeniową, znaleziono wiele innych związków chemicznych wykazujących podobne działanie. Związki te znane są pod wspólną nazwą białek/glikoprotein przeciwdziałających zamarzaniu (AF(G)P, ang. *antifreeze (glyco)protein*). Ponadto, natrafiono również na inne związki chemiczne zdolne do oddziaływania z lodem (IBP, ang. *ice-binding proteins*), ale o funkcjach odmiennych od białek przeciwdziałających zamarzaniu. Były to m.in. białka hamujące rekrytalizację<sup>12,13</sup>, ułatwiające wiązanie z lodem (obecne np. w błonie komórkowej niektórych bakterii)<sup>14,15</sup> oraz białka wspomagające nukleację lodu<sup>16,17</sup>.

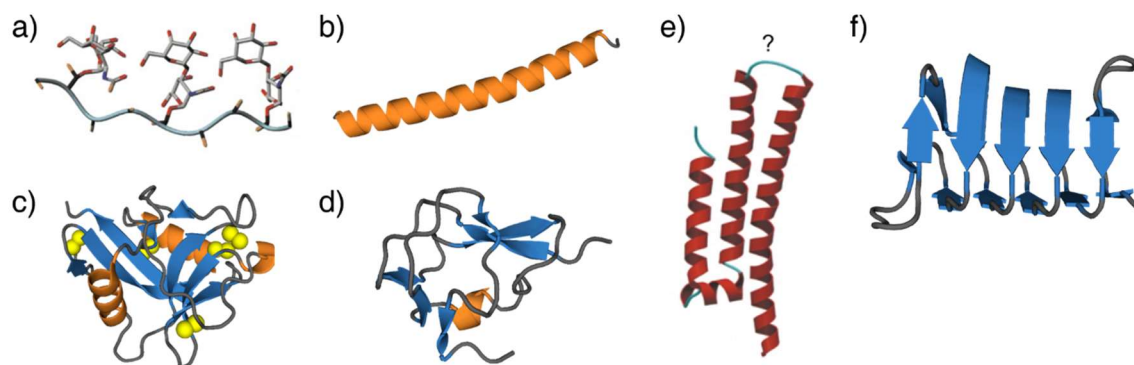
Z upływem czasu, grupa związków chemicznych określanych mianem białek przeciwdziałających zamarzaniu znacznie się powiększyła. Poszczególni jej przedstawiciele charakteryzują się znaczną różnorodnością zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i struktury drugo- i trzeciorzędowej cząsteczek. Białka te dzieli się obecnie na dwie główne grupy – na białka pochodzące z organizmów ryb oraz białka występujące u innych organizmów żywych. Białka występujące u ryb podzielone zostały z kolei na kilka mniejszych klas, biorąc pod uwagę podobieństwa sekwencji aminokwasowej i budowy przestrzennej poszczególnych cząsteczek – wyróżnia się tu glikoproteiny przeciwdziałające zamarzaniu (AFGP) oraz białka przeciwdziałające zamarzaniu typów od I do IV.

Glikoproteiny przeciwdziałające zamarzaniu (Rys. 1.1 a) zbudowane są zazwyczaj z od kilku do kilkudziesięciu powtórzeń tripeptydu Ala-Ala-Thr. Z każdą z grup hydroksylowych treoniny związana jest reszta disacharydowa. Cząsteczki mają postać lewoskrętnych helis, przy czym podstawniki sacharydowe są zlokalizowane po jednej z jej stron. Wśród AFGP wyróżnia się osiem klas związków, które różnią się między sobą wielkością cząsteczek<sup>18</sup>.

Białka przeciwdziałające zamarzaniu typu I (Rys. 1.1 b), podobnie jak AFGP, charakteryzują się wysoką zawartością alaniny w sekwencji aminokwasowej oraz zbudowane są z niewielkich, powtarzających się fragmentów. W roztworze występują w postaci helis<sup>19</sup>. Z kolei



białka typów II i III (Rys. 1.1 c, d) są białkami globularnymi, których sekwencja pozbawiona jest powtórzeń<sup>20,21</sup>. Cechą wyróżniającą białka AFP typu II jest obecność w ich strukturze mostków disiarczkowych, tworzących się z udziałem reszt cysteiny i stabilizujących strukturę przestrzenną cząsteczek<sup>22</sup>. Białka AFP typu III nie posiadają w swojej strukturze cysteiny, charakteryzują się również niższą zawartością alaniny<sup>20</sup>. Grupa IV białek AFP (Rys. 1.1 e) posiada obecnie tylko jednego przedstawiciela. Białko to zostało znalezione w organizmie kura amerykańskiego (*Myoxocephalus octodecemspinosus*)<sup>23,24</sup>.



Rys. 1.1. Główne klasy związków posiadających aktywność przeciwarzamrozeniową: a) jednostka budulcowa AFGP<sup>25</sup>, b) AFP I (PDB: 1WFA), c) AFP II (PDB: 2PY2), d) AFP III (PDB: 1MSI), e) AFP IV<sup>26</sup>, f) hiperaktywne białko AFP (PDB: 1LOS)

Białka AFP występujące w płynach ustrojowych mikroorganizmów i stawonogów mają często postać  $\beta$ -helis<sup>27-29</sup> (Rys. 1.1 f). W odróżnieniu od białek występujących w organizmach ryb, które są w stanie obniżyć temperaturę krzepnięcia płynów ustrojowych o ok. 1 – 1,5°C, białka te charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwarzamrozeniową – nawet o jeden lub dwa rzędy wielkości w porównaniu do białek występujących u ryb (dla tych samych stężeń)<sup>30</sup>. Z tego powodu białka te określane są często mianem białek hiperaktywnych, podczas gdy białka występujące w organizmach ryb nazywane są białkami o umiarkowanej aktywności.

Stopień aktywności białek AFP o umiarkowanej aktywności i hiperaktywnych to nie jedyna cecha różniąca te dwie grupy związków chemicznych. Zaobserwowano na przykład, że kształt kryształów lodu formujących się w roztworach białek należących do tych grup i będących w temperaturze w zakresie działania białek jest różny<sup>31,32</sup>. Obecność w roztworze białek charakteryzujących się umiarkowaną aktywnością prowadzi do powstawania kryształów o charakterystycznym, wydłużonym kształcie (bipiramid heksagonalnych lub igieł), z kolei białka hiperaktywne powodują, że kryształy przyjmują postać heksagonalnych płytek. Kształt powstających w roztworze kryształów lodu jest związany ze zdolnością białek AFP do wiązania się z różnymi płaszczyznami krystalograficznymi lodu<sup>30,32</sup>. Badania pokazały, że białka o umiarkowanej aktywności mogą się wiązać z jedną lub wieloma płaszczyznami kryształu lodu, jednak w przeciwieństwie do białek hiperaktywnych, nie posiadają zdolności do wiązania się z jego

płaszczyzną podstawową<sup>32-36</sup>. Uważa się, że zdolność do wiązania się białek AFP z płaszczyzną podstawową decyduje o ich hiperaktywności<sup>30</sup>.

Powyższy wniosek został jednak niedawno zakwestionowany<sup>37,38</sup>. Okazało się mianowicie, że białko AFP pochodzące z organizmu okrzemki (*Fragilariopsis cylindrus*) posiada zdolność do wiązania się m.in. z płaszczyzną podstawową lodu, a mimo tego wykazuje aktywność biologiczną na poziomie białek o umiarkowanej aktywności. Kształt kryształów lodu powstających w roztworze tego białka odpowiadał kształtowi kryształów tworzących się w obecności poznanych wcześniej białek hiperaktywnych. Jednocześnie zauważono jednak, że wiązanie białka z płaszczyzną podstawową jest częściowo odwracalne, co może być czynnikiem decydującym o obniżonej aktywności<sup>37</sup>.

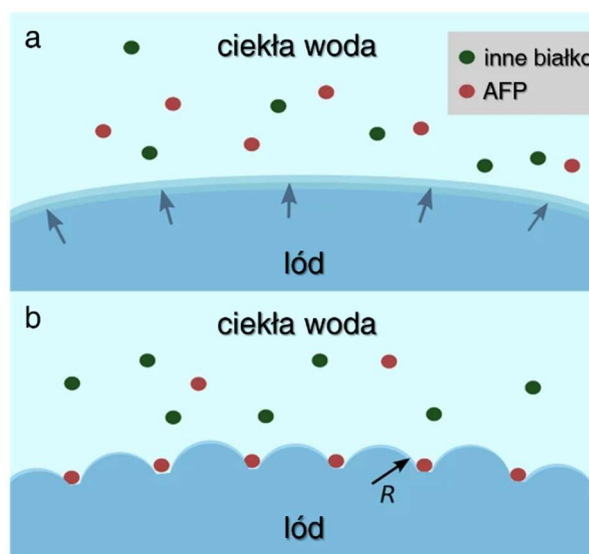
Stosowanie klasyfikacji białek przeciwdziałających zamarzaniu na białka o umiarkowanej aktywności i hiperaktywne wzbudza wątpliwości niektórych badaczy. Pokazano na przykład, że stopień aktywności białek (wyrażany za pomocą szerokości pętli histerezy termicznej, występującej na skutek obecności białek w roztworze) zależy w znacznym stopniu od czasu ekspozycji kryształów lodu w roztworze na obecność białek AFP<sup>33</sup>. Efekt ten spowodowany jest różną szybkością wiązania się poszczególnych białek z różnymi płaszczyznami krystalograficznymi lodu – adsorpcja białek na płaszczyźnie podstawowej jest znacznie wolniejsza niż adsorpcja na innych płaszczyznach krystalograficznych lodu. Z tego też względu, dwie najczęściej stosowane do wyznaczania aktywności białek przeciwdziałających zamarzaniu metody pomiarowe prowadzą często do rozbieżnych wyników<sup>39</sup>. W pomiarach prowadzonych z wykorzystaniem krioskopii nanolitrowej, roztwór zawierający białka AFP ochładzany jest stosunkowo wolno, co daje cząsteczkom zdolnym do wiązania się z płaszczyzną podstawową lodu wystarczająco dużo czasu na adsorpcję na powierzchni kryształów. W efekcie, białka określane mianem białek hiperaktywnych, uzyskują w tym eksperymencie znacznie lepsze wyniki niż białka o umiarkowanej aktywności. W przypadku pomiarów metodami sonokryształizacyjnymi, próbka zamrażana jest bardzo szybko i przy stosunkowo dużym stopniu przechłodzenia roztworu. W tej sytuacji, zdolność do szybkiego wiązania się z powierzchnią kryształów lodu pełni ważniejszą rolę w procesie hamowania procesu krzepnięcia. Aktywność przeciwarzamrozeniowa białek hiperaktywnych wyznaczona z wykorzystaniem sonokryształizacji okazuje się być wyraźnie niższa niż białek o umiarkowanej aktywności<sup>39</sup>.

Z przytoczonych powyżej informacji wynika, że grupa białek przeciwdziałających zamarzaniu charakteryzuje się dużą różnorodnością, zarówno jeśli chodzi o strukturę chemiczną i przestrzenną, jak i o sposób oddziaływania z powierzchnią lodu. Mimo to, białka AFP pełnią w organizmach żywych tę samą rolę, która polega na hamowaniu procesu krzepnięcia płynów ustrojowych, gdy ich temperatura spadnie poniżej zera stopni w skali Celsjusza. Nie jest to jedyna wspólna cecha tej grupy związków. Większość cząsteczek białek AFP posiada na swojej

powierzchni stosunkowo płaski i charakteryzujący się znaczną hydrofobowością obszar, który – jak pokazano<sup>20,28</sup> – odpowiada za wiązanie się z powierzchnią lodu. W obszarze tym, oprócz grup o charakterze hydrofobowym, znajdują się również grupy zdolne do tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami wody na powierzchni lodu. Wydaje się również, że sam mechanizm działania białek AFP należących do różnych grup jest bardzo podobny<sup>40</sup>.

## 1.2. Mechanizm funkcjonowania białek przeciwdziałających zamarzaniu

Od momentu odkrycia białek przeciwdziałających zamarzaniu, podjętych zostało wiele prób wyjaśnienia mechanizmu ich funkcjonowania. Szeroko akceptowany (jednak nie jedyny z proponowanych<sup>41–43</sup>) jest tzw. mechanizm adsorpcji – inhibicji<sup>44</sup>, który zakłada, że cząsteczki białek AFP adsorbują się na powierzchni powstających w płynach ustrojowych organizmów żywych kryształów lodu. Dzięki temu, dalszy wzrost kryształów odbywać się może jedynie w obszarach pomiędzy zaadsorbowanymi cząsteczkami białka, prowadząc tym samym do powstawania nowych, lokalnie zakrzywionych, powierzchni (Rys. 1.2).



Rys. 1.2. Schematyczny rysunek przedstawiający mechanizm funkcjonowania białek AFP<sup>45</sup>. a) Cząsteczki białka AFP adsorbują się na powierzchni narastającego lodu. b) Dalszy wzrost lodu odbywa się jedynie w obszarach między cząsteczkami AFP związanymi z powierzchnią lodu, co prowadzi do powstania lokalnie zakrzywionej granicy faz ciała stałe-ciecz

Zgodnie z efektem Gibbsa – Thomsona<sup>44,46</sup> temperatura współistnienia fazy ciekłej i stałej nad zakrzywioną granicą faz zależy od promienia krzywizny tej granicy, co można opisać równaniem (1.1):



$$T = T_0 \left( 1 + \frac{2\sigma V_{mol}}{r\Delta H_{krzep}} \right) \quad (1.1)$$

gdzie symbolami  $T$  i  $T_0$  oznaczone zostały odpowiednio temperatury równowagi fazowej ciała stałe – ciecz nad zakrzywioną oraz płaską powierzchnią,  $\sigma$  jest napięciem powierzchniowym,  $V_{mol}$  – objętością molową,  $r$  – promieniem krzywizny granicy faz, natomiast  $\Delta H_{krzep}$  jest molową entalpią krzepnięcia cieczy. W związku z tym, że entalpia krzepnięcia przyjmuje wartości ujemne, temperatura równowagi między fazą stałą i ciekłą jest tym niższa, im mniejszy jest promień krzywizny granicy faz.

Jak wspomniałam wcześniej, ograniczenie możliwości narastania lodu na powierzchni kryształów do obszarów między zaadsorbowanymi cząsteczkami białek AFP prowadzi do powstania granicy faz o lokalnie zakrzywionej powierzchni. W efekcie, proces krzepnięcia ciekłej wody będącej w kontakcie z lodem zostaje zahamowany aż do momentu osiągnięcia przez roztwór nowej równowagowej temperatury krzepnięcia. Różnica między równowagową temperaturą krzepnięcia roztworu zawierającego oraz niezawierającego białek AFP nazywana jest histerezą termiczną.

Mimo iż ogólny mechanizm funkcjonowania białek przeciwdziałających zamarzaniu jest szeroko akceptowany, szczegóły samego procesu wiązania się cząsteczek białka z powierzchnią lodu wciąż nie są do końca poznane. W dalszej części rozdziału przedstawiony zostanie aktualny stan wiedzy dotyczącej możliwych mechanizmów zachodzenia tego procesu oraz poruszona zostanie kwestia odwracalności procesu wiązania się białek AFP z lodem.

### 1.2.1. Odwracalność procesu wiązania białek AFP z lodem

Mówiąc o odwracalności (bądź nieodwracalności) procesu wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu należy w pierwszej kolejności sprecyzować, co oznacza w tym kontekście pojęcie „odwracalności”. Wiązanie cząsteczki białka z lodem nazywane jest odwracalnym, jeśli białko ulega desorpcji z powierzchni lodu w krótkim przedziale czasu od momentu jego adsorpcji na tej powierzchni. Z kolei wiązaniem nieodwracalnym określa się sytuację, w której białko pozostaje związane z powierzchnią lodu w dłuższym okresie czasu (zwykle rzędu godzin lub dni). W dalszej części rozdziału pojęcia odwracalności oraz nieodwracalności procesu wiązania będą stosowane właśnie w takim kontekście.

Mechanizm funkcjonowania białek AFP oparty na efekcie Gibbsa – Thomsona wymaga, aby wiązanie cząsteczek białka z lodem było nieodwracalne<sup>35</sup>. W przeciwnym wypadku niemożliwe byłoby całkowite zahamowanie procesu wzrostu kryształów lodu w temperaturach w zakresie histerezy termicznej, gdyż desorpcja białek pozostawiałaby na powierzchni lodu niechronione obszary, w których wzrost lodu musiałby następować<sup>47</sup>. Mimo tego, na przestrzeni lat

pojawiło się w literaturze kilka doniesień, które zdawały się sugerować, że cząsteczki białek AFP wiążą się z lodem w sposób odwracalny lub częściowo odwracalny<sup>37,42,48,49</sup>.

Zasugerowano na przykład<sup>42,43</sup>, że zdolność białek przeciwdziałających zamrażaniu do obniżania temperatury krzepnięcia roztworu jest wynikiem gromadzenia się cząsteczek białka w pobliżu powstających kryształów lodu, co prowadzi do lokalnego wzrostu stężenia roztworu w pobliżu fazy stałej i tym samym obniżenia temperatury krzepnięcia w wyniku działania efektu koligatywnego. Z kolei inni badacze<sup>48</sup> argumentowali, że proces wiązania się białek AFP z lodem jest nieodwracalny jedynie w przypadku cząsteczek, które adsorbują się na powierzchni w pierwszej kolejności i są odpowiedzialne za zahamowanie wzrostu kryształu. Kolejne cząsteczki białka miałyby się natomiast wiązać się w sposób odwracalny. Kolejna hipoteza dotycząca mechanizmu działania białek AFP, zaproponowana przez Kristiansena i Zachariassena<sup>50</sup>, zakładała, że wiązanie białek z lodem może być odwracalne lub nieodwracalne, w zależności od warunków. Według tego modelu, wiązanie białek z lodem powinno być odwracalne w równowagowej temperaturze krzepnięcia roztworu i stawać się nieodwracalne na skutek dalszego obniżania temperatury. W związku z tym, mechanizm wiązania cząsteczek białek AFP z lodem obejmować powinien dwa etapy, z których pierwszy polega na gromadzeniu się cząsteczek białka w pobliżu powstających w roztworze kryształów lodu, a drugi na nieodwracalnym wiązaniu się tych cząsteczek z lodem. Równocześnie autorzy zwrócili uwagę na fakt, że granica między lodem i ciekłą wodą nie jest dobrze zdefiniowana, a co za tym idzie cząsteczki białka będą się raczej gromadzić w obszarze przejściowym między fazą stałą i ciekłą, niż adsorbować na powierzchni lodu<sup>50</sup>. Nieodwracalne wiązanie się białka z lodem następować będzie zatem na skutek zestalenia (zakrzepnięcia) tej warstwy przejściowej.

Najnowsze badania, przeprowadzone z wykorzystaniem różnorodnych technik oraz białek AFP należących do różnych klas, zdają się wskazywać, że wiązanie białek przeciwdziałających zamrażaniu z lodem jest nieodwracalne<sup>32,51-54</sup>.

Jeśli mechanizm działania białek AFP oparty na efekcie Gibbsa-Thomsona jest poprawny, powinno być możliwe zaobserwowanie nie tylko efektu obniżenia temperatury krzepnięcia wody nad zakrzywioną granicą faz, ale również podwyższenia temperatury topnienia powierzchni kryształów lodu. Przez długi okres czasu nie udawało się jednak potwierdzić występowania tego zjawisko, co stało się jedną z przyczyn, dla których mechanizm ten był kwestionowany<sup>50</sup>.

Celik i in.<sup>51</sup> pokazali, że topnienie kryształu lodu pokrytego cząsteczkami białek AFP rozpoczyna się w obszarach między zaadsorbowanymi cząsteczkami, co sprawia, że powierzchnia lodu staje się lokalnie zakrzywiona. Temperatura topnienia lodu w powstałych wgłębieniach jest wyższa niż temperatura topnienia lodu o płaskiej powierzchni, zgodnie z efektem Gibbsa-Thomsona. Jednocześnie zauważono również, że efekt podwyższenia temperatury

topnienia wynikający z obecności białek AFP na powierzchni lodu jest wyraźnie mniejszy niż efekt przeciwny. Postępujący proces topnienia lodu skutkuje stopniowym zmniejszaniem się powierzchni kontaktu między powierzchnią białka i lodem, co prowadzi do desorpcji cząsteczek białka.

Stosując znakowanie białkami GFP (ang. *green fluorescent protein*) pokazano<sup>32,49</sup>, że białka AFP zaadsorbowane na powierzchni kryształu lodu powstrzymują jego wzrost, a ponadto, że nie następuje wymiana cząsteczek białek między powierzchnią lodu i roztworem. Obniżenie temperatury roztworu poza zakres funkcjonowania białek AFP skutkuje natomiast wbudowaniem części zaadsorbowanych cząsteczek białek w strukturę powstającego lodu. Jeden z najbardziej przekonujących dowodów na nieodwracalność wiązania białek AFP z lodem stanowi wynik eksperymentu polegającego na pozbawieniu roztworu otaczającego kryształ lodu pokryty zaadsorbowanymi białkami AFP wolnych cząsteczek białka<sup>52,53</sup>. W tym przypadku cząsteczki białka AFP również były znakowane białkami GFP, co pozwoliło na obserwację zmian ich stężenia w roztworze i na powierzchni kryształów lodu w czasie. Jak pokazano, proces krzepnięcia lodu pozostawał zahamowany również pod nieobecność wolnych cząsteczek AFP, ale co ważniejsze, nie zaobserwowano desorpcji cząsteczek AFP z powierzchni lodu do roztworu.

### 1.2.2. Mechanizm funkcjonowania białek AFP na poziomie molekularnym

Jedną z pierwszych prób wyjaśnienia mechanizmu wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu przypisywała kluczową rolę zdolności tych białek do tworzenia wiązań wodorowych z powierzchnią lodu<sup>47</sup>. Dostyc szybko okazało się jednak, że teoria ta ma wiele mankamentów. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem mutantów białek AFP pokazały, że nieobecność grup hydroksylowych na powierzchni wiążącej białka prowadzi do tylko częściowej utraty aktywności<sup>55,56</sup>. Jednocześnie stwierdzono, że białka pozbawione reszt metylowych w obszarze powierzchni aktywnej całkowicie tracą aktywność przeciwarzmożeniową. Uzyskane wyniki zdawały się więc wskazywać, że oddziaływania hydrofobowe pełnią ważniejszą rolę w procesie wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu. Niedawno przedstawiono jednak kolejne argumenty przemawiające za znaczącą rolą wiązań wodorowych w tym procesie<sup>57</sup>.

Wykorzystując mutanty białek AFP, w których wybrane hydrofobowe aminokwasy w obszarze aktywnym białka zostały zamienione na również hydrofobowe, ale mniejsze aminokwasy, pokazano, że dopasowanie strukturalne białek AFP do powierzchni lodu ma znaczący wpływ na aktywność biologiczną tych białek<sup>58</sup>. Przestrzenne rozmieszczenie reszt aminokwasowych na powierzchni wiążącej białek przeciwdziałających zamarzaniu zapewnia dobre dopasowanie położenia atomów tlenu grup hydroksylowych zlokalizowanych na powierzchni cząsteczek do węzłów sieci krystalicznej lodu<sup>27</sup>. Z drugiej strony, położenie hydrofobowych grup

funkcyjnych na powierzchni białka może stanowić czynnik umożliwiający białkom rozpoznawanie struktury lodu w znaczącym nadmiarze ciekłej wody – pokazano, że grupy te rozmieszczone są w taki sposób, aby mogły zajmować puste przestrzenie w sieci krystalicznej lodu<sup>59</sup>.

Niezależnie od tego, które z oddziaływań – wiązania wodorowe czy oddziaływania hydrofobowe – jest ważniejsze z punktu widzenia procesu wiązania się cząsteczek białek AFP na powierzchni lodu, wydaje się, że oba są niezbędne, aby proces ten zachodził efektywnie. Zapropozowano na przykład<sup>50</sup>, że rolą grup hydrofobowych zlokalizowanych w obszarze powierzchni wiążącej białek jest nadanie odpowiedniej struktury wodzie solwatuującej tą powierzchnię, co ma umożliwić wstępne rozpoznawanie i wiązanie białek z lodem. Z kolei możliwość tworzenia się wiązań wodorowych między powierzchnią białka i lodem zapewnia nieodwracalność tego wiązania.

Do podobnych wniosków, dotyczących roli struktury wody solwatacyjnej białek AFP w procesie wiązania się z lodem, doszli również inni badacze<sup>60</sup>. Zwrócono również uwagę na fakt, że powierzchnia lodu nie ma dobrze zdefiniowanej struktury przestrzennej, a jest ona raczej obszarem o strukturze pośredniej między fazą stałą i ciekłą. W związku z tym proces wiązania się białka AFP z lodem nie powinno się rozważać w kategoriach wiązania białko – ligand. Zasugerowano, że wiązanie cząsteczek białek z lodem następuje w wyniku krzepnięcia wody znajdującej się między lodem a powierzchnią aktywną białka zlokalizowanego w jego pobliżu<sup>60</sup>.

W ostatnich latach zainteresowanie rolą wody solwatacyjnej w procesie wiązania się białek przeciwdziałających zamarzaniu z lodem wyraźnie wzrosło i to właśnie temu tematowi poświęcona została kolejna część tej pracy.

### 1.2.3. Rola wody solwatacyjnej w procesie wiązania białek AFP z lodem

Powierzchnia białek charakteryzuje się znaczną heterogenicznością, zarówno pod względem budowy chemicznej (reszty aminokwasowe o różnej polarności), jak i topografii. W związku z tym, cząsteczki wody sąsiadujące bezpośrednio z powierzchnią białek poddane będą działaniu różnych warunków. Aminokwasy polarne są w stanie tworzyć wiązania wodorowe z otaczającą wodą, co prowadzi do zaburzenia struktury wody solwatacyjnej w porównaniu do struktury czystej wody. Obszary powierzchni białka o charakterze hydrofobowym będą z kolei promować wzmocnienie tetraedrycznej struktury pobliskiej wody. Ponadto, sama obecność cząsteczek substancji rozpuszczonej o znacznym rozmiarze będzie wymuszała zmiany w istniejącej sieci wiązań wodorowych w wodzie. W związku z powyższym, struktura wody solwatacyjnej białek w wyraźny sposób będzie się różnić od struktury czystej wody.

Jedną z cech odróżniających wodę solwatacyjną białek od czystej wody jest jej gęstość. Pokazano<sup>61,62</sup>, że obecność cząsteczki białka wywołuje wzrost gęstości wody solwatacyjnej

sięgający 5-10%. Efekt ten jest skutkiem zmniejszania się odległości między cząsteczkami wody sąsiadującymi z powierzchnią białka oraz zaburzeniem ich tetraedrycznego uporządkowania<sup>62,63</sup>.

W porównaniu do wody solwatacyjnej białek nieposiadających aktywności przeciwzamrozeniowej, woda solwatacyjna białek AFP charakteryzuje się większym uporządkowaniem strukturalnym<sup>64-69</sup>. Pokazano<sup>70</sup>, że obecność na powierzchni wiążącej tych białek reszt aminokwasów o charakterze hydrofobowym modyfikuje strukturę wody nie tylko w najbliższym otoczeniu tych aminokwasów, ale wpływa na strukturę całej wody solwatującej ten obszar białka. W efekcie, aminokwasy polarne zlokalizowane w obszarze aktywnym białek AFP posiadają warstwę solwatacyjną o strukturze charakterystycznej dla aminokwasów niepolarnych (co umożliwia rozpoznanie i wstępne związanie białka z lodem), a jednocześnie mają zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z lodem.

Według niektórych autorów, woda solwatacyjna białek AFP wykazuje wyraźne podobieństwa do struktury lodu<sup>50,64,66,68,71-73</sup>. Nutt i Smith<sup>68</sup> w swojej pracy stwierdzili, że woda solwatacyjna powierzchni aktywnej białek AFP nie tylko jest bardziej uporządkowana w porównaniu z wodą solwatacyjną innych białek lub wodą niezaburzoną obecnością substancji rozpuszczonych, ale tworzy swego rodzaju „matrycę”, o strukturze przypominającej strukturę lodu. Adsorpcja białka na powierzchni lodu polega więc – według tych autorów – na łączeniu się warstwy solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka z warstwą solwatacyjną kryształu lodu oraz następującym po nim krzepnięciu wody wypełniającej obszar między białkiem i lodem. Podobieństwo strukturalne między wodą solwatacyjną białek AFP i lodem zostało wskazane przez Kristiansena i Zachariassena<sup>50</sup> jako przyczyna ułatwionego krzepnięcia wody znajdującej się między białkiem i lodem. Garnham i in.<sup>71</sup> argumentowali, że białka AFP niosą „swoją własny lód”, który może być traktowany jako integralna część samego białka. Z kolei Hudait i in.<sup>74</sup> stwierdzili, że o ile struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka wykazuje pewne podobieństwa do struktury lodu, to nie można jej nazwać „lodopodobną”.

Zdolność powierzchni aktywnej białek AFP do porządkowania wody solwatacyjnej oraz znaczenie wody w procesie wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu badane były z wykorzystaniem mutantów tych białek. Pokazano na przykład<sup>64-67,75-77</sup>, że utrata grup metylowych lub hydroksylowych zlokalizowanych w obszarze wiążącym białek prowadzi nie tylko do wyraźnego obniżenia aktywności biologicznej, ale również do zmniejszenia uporządkowania strukturalnego wody solwatacyjnej tego obszaru.

Dodatkowych argumentów przemawiających za znaczącą rolą wody solwatacyjnej w procesie wiązania się białek AFP z lodem dostarczyły badania z udziałem białek indukujących nukleację lodu (INP, ang. *ice nucleating protein*). Mimo tego, iż białka te posiadają funkcję przeciwną w stosunku do białek AFP, budowa obszaru aktywnego w przypadku obu grup białek jest zadziwiająco podobna. Czynnikiem różnicującym wydaje się tu być rozmiar



powierzchni oddziałującej z powierzchnią lodu<sup>78,79</sup> – w przypadku białek INP jest ona znacznie większa, dzięki czemu białka te są w stanie porządkować swoją wodę solwatacyjną na znacznie większą skalę. Woda ta staje się z kolei zarodkiem krystalizacji fazy stałej. W przypadku białek AFP sytuacja jest bardzo podobna, z tą różnicą, że wielkość obszaru, w którym woda solwatacyjna charakteryzuje się uporządkowaną strukturą jest zbyt mała, aby prowadzić do nukleacji lodu. Efekt ten potwierdzono, wykorzystując fragment białka INP, który w badaniach wykazywał właściwości przeciwwzamrozeniowe, a nie indukujące powstawanie lodu<sup>80</sup>. Pokazano również, że białka AFP mogą ułatwiać nukleację lodu, jeśli ich stężenie w roztworze jest odpowiednio wysokie<sup>81</sup> oraz że modelowe powierzchnie, zbudowane z powtarzających się fragmentów powierzchni aktywnej białek AFP, wykazują działanie charakterystyczne dla białek INP<sup>82</sup>.

Przedstawione powyżej argumenty pokazują zgodny obraz roli wody solwatacyjnej w procesie wiązania się białek AFP (należących do różnych klas) z lodem. Istnieją jednak również badania, które nie są z tymi wnioskami zgodne. Pokazano na przykład<sup>83</sup>, że w przypadku jednego z hiperaktywnych białek AFP woda solwatacyjna powierzchni aktywnej nie wykazuje wysokiego stopnia uporządkowania obserwowanego w przypadku innych białek należących do tej grupy. Zasugerowano, że sama powierzchnia aktywna białka zapewnia wystarczające dopasowanie przestrzenne do powierzchni lodu, a więc modyfikacja struktury wody solwatacyjnej nie jest konieczna, aby białko mogło pełnić swoją funkcję. Niektóre badania<sup>84,85</sup> nie wykazały różnic w strukturze wody solwatacyjnej powierzchni wiążącej białek AFP w porównaniu do struktury wody solwatacyjnej białek nieposiadających aktywności przeciwwzamrozeniowej. Zamiast tego pokazano, że kilka cząsteczek wody zlokalizowanych jest w zagłębieniu na powierzchni aktywnej białka AFP – cząsteczki te nie brały bezpośredniego udziału w procesie wiązania białka z lodem, ale pomagały w utrzymaniu sztywnej struktury powierzchni aktywnej (a tym samym zapewniały dopasowanie strukturalne powierzchni białka do lodu).

Jak widać, w literaturze pojawiają się różnorodne teorie na temat roli wody solwatacyjnej w procesie wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu, a także czasem samego mechanizmu ich działania. Ponadto należy pamiętać, że badania często prowadzone są z wykorzystaniem różnych metod badawczych, co może utrudniać porównywanie uzyskanych w nich wyników. Jedną z najbardziej popularnych metod badawczych wydaje się być dynamika molekularna, która daje możliwość obserwacji zachowania układów na poziomie molekularnym. Metoda ta oferuje szeroki wybór modeli wody oraz parametryzacji prowadzonych symulacji, co z jednej strony pozwala na dopasowanie warunków symulacji do konkretnego zagadnienia badawczego, ale z drugiej utrudnia porównywanie rezultatów i wyciąganie na ich podstawie bardziej ogólnych wniosków.

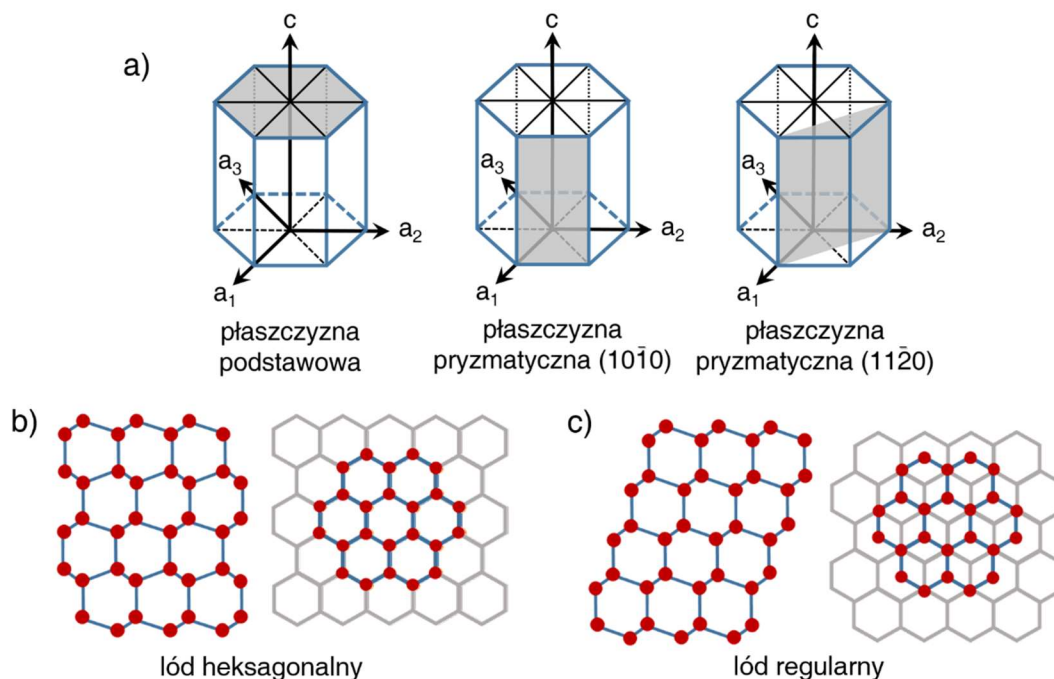
### 1.3. Oddziaływanie białek AFP z lodem

Rolą białek należących do grupy przeciwdziałających zamarzaniu jest hamowanie postępu procesu krzepnięcia wody w płynach ustrojowych organizmów żywych. Aby tego dokonać, cząsteczki białka muszą być w stanie rozpoznać i związać się z powierzchnią kryształów lodu. W poprzednim rozdziale przedstawiłam aktualny stan wiedzy dotyczący roli wody solwatacyjnej białek AFP w tym procesie. Aktualnie, uwaga poświęcona zostanie strukturze lodu oraz mechanizmowi powstawania nowych warstw fazy stałej na powierzchni istniejących kryształów. W dalszej części rozdziału przedstawione zostaną również dane literaturowe dotyczące mechanizmu oddziaływania białek przeciwdziałających zamarzaniu z powierzchnią lodu.

#### 1.3.1. Lód heksagonalny i regularny

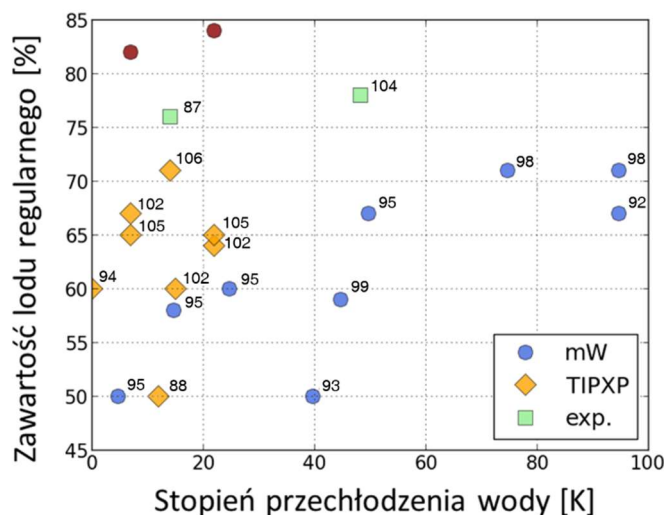
Najczęściej występującą na Ziemi odmianą lodu jest lód heksagonalny. Jak wskazuje na to nazwa, lód ten posiada heksagonalną sieć krystaliczną, w której węzłach zlokalizowane są atomy tlenu cząsteczek wody. Pomiędzy atomami tlenu znajdują się atomy wodoru, które tworzą wiązania wodorowe z pobliskimi atomami tlenu. Lód regularny posiada strukturę bardzo podobną do lodu heksagonalnego – różnicę między tymi dwiema formami stanowi sposób ułożenia warstw w kierunku prostopadłym do osi *c* kryształu (Rys. 1.3). Mimo tego, iż lód regularny charakteryzuje się nieco mniejszą stabilnością w porównaniu do lodu heksagonalnego<sup>86</sup>, badania pokazują, że odmiana ta nie tylko pojawia się (obok lodu heksagonalnego) w nowo powstających kryształach lodu<sup>87-95</sup>, ale często występuje w tych kryształach w przewodzie<sup>87,92,94-99</sup>.

Przeprowadzonych zostało wiele badań mających na celu ustalenie przyczyny tego zjawiska. Zasugerowano na przykład<sup>87</sup>, że proces krzepnięcia wody może postępować zgodnie z tzw. regułą Ostwalda. Reguła ta zakłada, że podczas krzepnięcia cieczy w pierwszej kolejności powstawać będzie taka struktura krystalograficzna, która charakteryzuje się najmniejszą stabilnością. Inna teoria<sup>92,100</sup> odwołuje się do niewielkiej różnicy w stabilności obu form lodu – dzięki temu formy te mogą powstawać z podobnym prawdopodobieństwem, a przewaga zawartości lodu o strukturze regularnej w kryształach lodu może mieć podłoże kinetyczne<sup>92</sup>. Niektóre badania zdają się wskazywać, że znaczenie może tu mieć także czynnik entropowy<sup>99</sup>. Kształt powstających w procesie krzepnięcia zarodków krystalizacji może być przyczyną preferencji względem lodu o strukturze regularnej<sup>101</sup>. Zarodki o wysokiej zawartości lodu o tej strukturze charakteryzują się bardziej regularnym (sferycznym) kształtem, co zapewnia im większą stabilność w porównaniu do zarodków o dużej zawartości lodu heksagonalnego.



Rys. 1.3. Lód heksagonalny i regularny. a) Komórka elementarna kryształu lodu heksagonalnego, z zaznaczonymi trzema płaszczyznami krystalograficznymi (podstawową, pryzmatyczną  $(10\bar{1}0)$  oraz pryzmatyczną  $(11\bar{2}0)$ ). b) Schematyczna reprezentacja struktury lodu heksagonalnego. c) Schematyczna reprezentacja struktury lodu regularnego. Na rysunkach b) i c) przedstawione zostały rzuty w kierunku prostopadłym do osi  $a$  (po lewej stronie) i  $c$  (po prawej stronie)

Badania pokazują, że zawartość lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej zmienia się wraz ze stopniem przechłodzenia wody, w której następuje krystalizacja<sup>95</sup>. Co ważne, podobne rezultaty uzyskuje się zarówno na drodze eksperymentu, jak i symulacji komputerowych (Rys. 1.4). Obserwowane rozbieżności mogą wynikać m.in. z różnic w metodyce prowadzenia badań. Znaczący wpływ na wyniki uzyskiwane z wykorzystaniem symulacji komputerowych może mieć stosowanie okresowych warunków brzegowych oraz wielkość układów symulacyjnych. Ponadto, proces krzepnięcia wody postępuje w sposób chaotyczny<sup>97,102,103</sup>, co sprawia, że wyniki uzyskiwane na podstawie analizy zachowania niewielkiej liczby układów symulacyjnych mogą być mało wiarygodne. Co ciekawe, na podstawie Rys. 1.4 można stwierdzić, że symulacje komputerowe prowadzone z wykorzystaniem jednoatomowego modelu wody mW wykazują niższe zawartości lodu o strukturze regularnej w nowo powstającym lodzie, w porównaniu do symulacji prowadzonych z wykorzystaniem innych modeli wody oraz do badań eksperymentalnych. Z tego też względu należy brać pod uwagę, że również wykorzystywany w badaniach model wody może mieć wpływ na uzyskiwane wyniki.



Rys. 1.4. Zależność zawartości lodu o strukturze regularnej w nowo powstającym lodzie od stopnia przechłodzenia wody. Zielonymi punktami oznaczone zostały dane uzyskane z wykorzystaniem eksperymentalnych metod badawczych<sup>87,104</sup>, natomiast niebieskimi i pomarańczowymi punktami – dane pochodzące z symulacji komputerowych (odpowiednio, z wykorzystaniem modeli wody mW<sup>92,93,95,98,99</sup> oraz modeli wody z rodziny TIPXP<sup>88,94,102,105,106</sup>). Ciemnoczerwone punkty obrazują wyniki uzyskane w ramach tej pracy (Rozdział 5.1.7)

Pomimo rosnącej ilości dostępnych informacji, przyczyna preferencji w stosunku do struktury regularnej lodu w nowo powstającym lodzie wciąż pozostaje niewyjaśniona. Poznanie szczegółów procesu krzepnięcia wody ma znaczenie nie tylko poznawcze, ale jest ważne również z punktu widzenia badań nad mechanizmem działania białek przeciwdziałających zamarzaniu, a dokładniej nad mechanizmem oddziaływania tych białek z powierzchnią lodu. W kolejnej części pracy zaprezentowany zostanie aktualny stan wiedzy dotyczący tego zagadnienia.

### 1.3.2. Mechanizm krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu

Mechanizm powstawania nowej warstwy lodu na powierzchni istniejącego kryształu był przedmiotem wielu badań. Wykorzystując metody dynamiki molekularnej pokazano, że szybkość krzepnięcia wody na różnych płaszczyznach krystalograficznych lodu jest różna<sup>91,97,106–108</sup>. Najwolniej lód powstaje na płaszczyźnie podstawowej. Zaobserwowano, że proces ten przebiega warstwowo<sup>97,106–108</sup> – proces powstawania nowej warstwy lodu rozpoczyna się dopiero po zakrzepnięciu wody w poprzedniej warstwie. W związku z tym, płaszczyzna podstawowa kryształu lodu pozostaje podczas procesu krzepnięcia gładka<sup>108</sup>. Inaczej wygląda proces krzepnięcia wody na płaszczyznach pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ) i ( $11\bar{2}0$ ). Pokazano<sup>95,97,106–108</sup>, że krzepnięcie wody na płaszczyźnie pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) zachodzi dwa do trzech razy szybciej niż na płaszczyźnie podstawowej, a szybkość tego procesu na płaszczyźnie pryzmatycznej ( $11\bar{2}0$ ) jest jeszcze większa. Ponadto zaobserwowano, że w przypadku płaszczyzn pryzmatycznych proces przebiega w sposób

ciągły – wzrost kryształu zachodzi poprzez „przymaranie” pojedynczych cząsteczek wody do jego powierzchni. W efekcie, powierzchnia kryształu lodu staje się nierówna i pofałdowana<sup>107</sup>.

Zaproponowano, że przyczyną, dla której szybkość krzepnięcia wody na płaszczyźnie podstawowej jest zauważalnie mniejsza w porównaniu do płaszczyzn pryzmatycznych (10 $\bar{1}$ 0) i (11 $\bar{2}$ 0) jest sposób wiązania się cząsteczek wody nowej warstwy lodu z kryształem. W przypadku płaszczyzny podstawowej, liczba cząsteczek wody potrzebnych do utworzenia stabilnego zarodka krystalizacji nowej warstwy lodu jest większa niż w przypadku płaszczyzn pryzmatycznych<sup>107</sup>. Z kolei inne badania<sup>106</sup> sugerują, że zmniejszona szybkość krzepnięcia wody na płaszczyźnie podstawowej wynika z konieczności reorganizacji położeń cząsteczek wody w krzepnącej warstwie, w celu dopasowania do sieci krystalicznej istniejącego lodu. Proces ten nie zachodzi w przypadku płaszczyzn pryzmatycznych, gdzie cząsteczki wody układają się na powierzchni kryształu od razu w miejscach odpowiadających położeniom węzłom sieci krystalicznej.

Ważnym czynnikiem, który należy wziąć pod uwagę prowadząc badania nad mechanizmem procesu krzepnięcia wody na istniejącym kryształe lodu jest konstrukcja układu symulacyjnego. Pokazano<sup>103</sup>, że w układach, w których warstwa lodu rozciąga się w całym przekroju pudełka symulacyjnego, wielkość powierzchni kontaktu lodu z ciekłą wodą ma wyraźny wpływ na szybkość krzepnięcia wody. Uważa się, że przyczyna tego zjawiska leży w stosowaniu w symulacjach periodycznych warunków brzegowych. Układy, w których powierzchnia kontaktu wody i lodu jest niewielka, charakteryzują się większym uporządkowaniem ze względu na mniejszy rozmiar powtarzanego w przestrzeni pudełka symulacyjnego. W efekcie, zmiana entropii w wyniku postępu procesu krzepnięcia jest w takim układzie mniejsza, a sam proces krzepnięcia zachodzi szybciej, w porównaniu do układów o większym rozmiarze.

### 1.3.3. Wpływ stanu powierzchni lodu na mechanizm krzepnięcia wody na jego powierzchni

Lód, niezależnie od tego czy posiada strukturę heksagonalną czy regularną, charakteryzuje się pewnym stopniem nieuporządkowania. Nieuporządkowanie to wynika z istnienia różnych sposobów, w jaki cząsteczki wody mogą być zorientowane w sieci krystalicznej lodu. Orientacje te są w kryształe lodu przypadkowe, przez co całkowity moment dipolowy kryształu jest bliski zera. Sytuacja jest nieco odmienna na powierzchni kryształu lodu. Powierzchniowe cząsteczki wody mogą tworzyć maksymalnie trzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody również będącymi fragmentem fazy stałej. Atomy wodoru oraz wolne pary elektronowe atomów tlenu niezaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z cząsteczkami wody w lodzie, układają się na powierzchni kryształu w pewien wzór, który może mieć wpływ na właściwości tej powierzchni. Celowym jest więc pytanie, czy stan powierzchni lodu, opisany za

pomocą ilości i rozmieszczenia „wolnych” wiązań O-H (ang. *dangling O-H bond*) – czyli takich, które nie są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych z cząsteczkami wody w lodzie – ma znaczenie dla procesu krzepnięcia wody na tej powierzchni.

Dostępne w literaturze dane, dotyczące rozmieszczenia „wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu, w większości odnoszą się do powierzchni lodu graniczącej z próżnią. Pokazano na przykład<sup>109</sup>, że obniżenie temperatury kryształu poniżej pewnej krytycznej wartości (szacowanej na 30 K i 70 K odpowiednio dla płaszczyzny podstawowej i pryzmatycznej (10 $\bar{1}$ 0)) prowadzi do porządkowania się „wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu, prowadząc do utworzenia pasmowej struktury. Inne badania<sup>110,111</sup> wskazują jednak, że temperatura przejścia między uporządkowaną i nieuporządkowaną strukturą powierzchni lodu jest znacznie wyższa, a więc struktura pasmowa lodu powinna być obserwowana nawet w temperaturach wyższych od 200 K. Z kolei inni autorzy<sup>112</sup> pokazali, że taka struktura powierzchni lodu nie tylko nie jest strukturą dominującą, ale może w ogóle nie występować w rozważanych temperaturach.

Z zaprezentowanych powyżej informacji wynika, że wśród badaczy nie ma zgody co do preferowanego sposobu uporządkowania „wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu. Pokazano natomiast, że w zależności od stopnia uporządkowania, różnić się może energia powierzchniowa lodu. Okazuje się, że energia ta jest najniższa w przypadku powierzchni o uporządkowanej, pasmowej strukturze<sup>110</sup> oraz że zależy ona w sposób liniowy od stopnia uporządkowania powierzchni<sup>111,113</sup>. Rozważając lokalne zmiany stopnia uporządkowania pokazano<sup>113</sup>, że temperatura topnienia lodu jest wyższa w obszarach o zwiększonym zagęszczeniu „wolnych” wiązań O-H, w porównaniu do reszty powierzchni. Obszary te mogą też charakteryzować się większą reaktywnością<sup>111</sup>.

Na podstawie lokalnego rozmieszczenia „wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu dokonano klasyfikacji potencjalnych miejsc adsorpcji nowych cząsteczek wody (z fazy gazowej) na tej powierzchni<sup>114,115</sup>. „Miejsce adsorpcji” zdefiniowane zostało jako obszar powierzchni lodu obejmujący trzy cząsteczki wody tworzące powierzchnię kryształu znajdujące się najbliżej adsorbującej się cząsteczki. Najbardziej korzystne energie oddziaływań znaleziono dla obszarów, w których jedna lub dwie z cząsteczek wody tworzących miejsce wiązania posiadały „wolne” wiązanie O-H. Były to jednocześnie miejsca, w których zaadsorbowana cząsteczka wody mogły utworzyć najwięcej wiązań wodorowych z powierzchnią lodu. Pokazano również<sup>116</sup>, że na energię oddziaływania cząsteczek wody z powierzchnią lodu ma wpływ nie tylko najbliższe otoczenie (budowa miejsca adsorpcji), ale również stopień uporządkowania całej powierzchni lodu.

Sposób uporządkowania cząsteczek wody w kryształach lodu ma wpływ na natężenie pola elektrycznego generowanego przez kryształ. Wzrost lokalnego zagęszczenia „wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu prowadzi do (lokalnego) wzrostu natężenia pola elektrycznego, co z kolei będzie przekładało się na wyższe energie adsorpcji cząsteczek wody w tym obszarze<sup>116</sup>.

Ponadto, wewnętrzne uporządkowanie kryształu lodu również będzie miało znaczący wpływ na natężenie pola w miejscu adsorpcji<sup>117</sup>.

Przytoczone argumenty pokazują, że stopień uporządkowania „wolnych” wiązań O-H na powierzchni kryształu lodu może mieć wpływ na procesy zachodzące na tej powierzchni. W związku z tym, że większość dostępnych danych dotyczy układów, w których powierzchnia lodu sąsiaduje z próżnią, trudno jest wyciągać na ich podstawie wnioski dotyczące granicy faz ciało stałe – ciecz.

#### 1.3.4. Oddziaływanie białek AFP z lodem

Większość dostępnych danych dotyczących sposobu oddziaływania białek AFP z lodem pochodzi z symulacji komputerowych. Metodyka ta posłużyła na przykład do znalezienia optymalnej orientacji cząsteczek białek AFP względem lodu<sup>67,118</sup>. Z wykorzystaniem dokowania molekularnego pokazano<sup>67,73</sup>, że w przypadku pewnych hiperaktywnych białek AFP, w wiązaniu się białka z lodem pośredniczy kilka cząsteczek wody zlokalizowanych w „kanale” między resztami treoniny na powierzchni aktywnej. Cząsteczki te, określane mianem „zakotwiczonych” (ang. *anchored*), wiążą się za pomocą wiązań wodorowych zarówno z powierzchnią białka, jak i powierzchnią lodu, stabilizując wiązanie cząsteczki białka z kryształem. Dalsze badania pokazały ponadto, że zmodyfikowana wersja białka (w której niektóre reszty treoniny na powierzchni aktywnej zostały zastąpione resztami seryny) wiąże się z powierzchnią lodu bezpośrednio<sup>67</sup>. Symulacje prowadzone w układach, gdzie białka AFP zlokalizowane były bezpośrednio na powierzchni lodu wykorzystano do obserwacji procesu powstawania lokalnie zakrzywionych powierzchni lodu między cząsteczkami tych białek<sup>119</sup>. Pokazano<sup>120</sup>, że obniżenie temperatury układu poniżej zakresu działania białek AFP prowadzi do powstawania „mostków” łączących sąsiadujące ze sobą uwypuklenia powierzchni lodu. W konsekwencji dochodzi do wbudowania cząsteczek AFP w strukturę lodu i do krzepnięcia całego roztworu. Uzyskane rezultaty wskazują więc, że wielkość cząsteczek białek AFP (wysokość i szerokość) ma bezpośredni wpływ na ich aktywność biologiczną.

Symulacje komputerowe umożliwiły również prześledzenie procesu adsorpcji białek AFP na powierzchni lodu na poziomie molekularnym<sup>45</sup>. Po raz kolejny pokazano<sup>121</sup>, że obecność zarówno grup metylowych i hydroksylowych jest niezbędna, aby białka mogły pełnić swoją funkcję. Struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej, mimo iż w pewnym stopniu podobna do struktury lodu, nawet po związaniu białka z lodem pozostaje zniekształcona<sup>74,121,122</sup>.

Struktura warstwy wody znajdującej się w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią aktywną białek AFP zaadsorbowanych na powierzchni lodu jest różna w przypadku różnych płaszczyzn krystalograficznych lodu<sup>74</sup>. W każdym przypadku obserwuje się powstawanie wokół

grup metylowych powierzchni aktywnej pierścieniowych struktur złożonych z cząsteczek wody. Struktury te zakotwiczone są na powierzchni białka poprzez wiązania wodorowe, w których biorą udział grupy hydroksylowe reszt treoniny.



## Rozdział 2

# Cel i zakres pracy

Białka przeciwdziałające zamrażaniu stanowią obiekt zainteresowania wielu badaczy. Szczególnie ciekawym zagadnieniem jest mechanizm działania związków chemicznych należących do tej – charakteryzującej się dużą różnorodnością (zarówno pod względem budowy chemicznej i przestrzennej poszczególnych przedstawicieli, jak i poziomu ich aktywności) – klasy.

Mechanizm funkcjonowania białek AFP opiera się na ich zdolności do wiązania się z lodem. Cząsteczki białka związane z powierzchnią kryształu ograniczają wielkość obszaru, w którym dochodzić może do krystalizacji wody, co skutkuje powstawaniem lokalnie zakrzywionej granicy faz ciało stałe – ciecz. Zgodnie z efektem Gibbsa – Thomsona, temperatura krzepnięcia wody nad powierzchnią o niewielkim promieniu krzywizny jest niższa niż nad powierzchnią płaską. W efekcie, proces krzepnięcia wody na powierzchni lodu zostaje zahamowany w pewnym przedziale temperatur poniżej zera stopni w skali Celsjusza.

Dwa ważne aspekty przedstawionego powyżej mechanizmu wciąż pozostają niejasne. Po pierwsze: w jaki sposób białka AFP są w stanie rozpoznać fazę stałą w ogromnym nadmiarze ciekłej wody? Pod względem strukturalnym, przechłodzona, ciekła woda oraz nowo powstały lód różnią się od siebie jedynie w niewielkim stopniu. W obu przypadkach cząsteczki wody mają tendencję do układania się w uporządkowany sposób, różnicę stanowi jedynie stopień tego uporządkowania. Ponadto, brak jest ostrej granicy między fazą stałą (lodem) i ciekłą wodą. Fazy te oddzielone są od siebie obszarem przejściowym, o stosunkowo dużej grubości i strukturze pośredniej między lodem i ciekłą wodą. Nie jest więc jasne, jak należy rozumieć pojęcie „adsorpcji na powierzchni lodu”, używane często w kontekście procesu wiązania się białek AFP z lodem. Po drugie, postawić można pytanie, w jaki sposób dochodzi do wiązania cząsteczek białek AFP z powierzchnią lodu oraz dlaczego białka te nie są odpychane od powierzchni narastającej fazy stałej, jak ma to miejsce w przypadku innych (nieposiadających aktywności przeciwarzamrozeniowej) białek.

Zgodnie z aktualnym stanem, ważną rolę w procesach oddziaływania i wiązania się białek przeciwdziałających zamrażaniu z powierzchnią lodu odgrywają efekty solwatacyjne. Z tego też powodu w swojej pracy skupiłam się właśnie na tym zagadnieniu. Celem moich badań była próba odpowiedzi na postawione powyżej pytania dotyczące mechanizmu wiązania się białek AFP

z powierzchnią lodu, ze szczególnym uwzględnieniem roli wody solwatacyjnej białek AFP w tym procesie.

W celu zrealizowania założonych celów, przeprowadziłam badania metodami dynamiki molekularnej. Zaplanowałam i zrealizowałam szereg eksperymentów, pozwalających na systematyczną analizę zachodzących zjawisk. Pierwszy etap badań miał na celu opisanie zmian strukturalnych zachodzących w ciekłej wodzie w obecności kryształu lodu oraz wybranego do badań hiperaktywnego białka AFP. Ponadto, analizie poddany został wpływ obecności cząsteczki białka AFP w sąsiedztwie kryształu lodu na proces krzepnięcia wody na powierzchni tego kryształu (rozdziały 5.1 – 5.2). W drugim etapie badań skupiłam się natomiast na roli, jaką woda solwatacyjna powierzchni wiążącej białka AFP oraz lodu pełni w procesie oddziaływania tego białka z powierzchnią kryształu lodu (rozdziały 5.3 oraz 5.4).

## Rozdział 3

# Symulacje komputerowe

Metody obliczeniowe, obok metod eksperymentalnych, stanowią główne źródło wiedzy dotyczącej mechanizmów funkcjonowania cząsteczek o znaczeniu biologicznym w środowisku wodnym. Ważne miejsce wśród nich zajmuje dynamika molekularna, która – dzięki zastosowaniu metod symulacyjnych – umożliwia śledzenie postępu różnych procesów na poziomie molekularnym.

### 3.1. Dynamika molekularna

Można wyróżnić dwie główne gałęzie metod dynamiki molekularnej: metody klasycznej oraz kwantowej dynamiki molekularnej. W metodach klasycznych cząsteczki traktowane są jak klasyczne obiekty. Atomy budujące cząsteczki reprezentowane są za pomocą kul o pewnym promieniu i masie, natomiast występujące między nimi wiązania wyobrazić sobie można jako sprężyny. W takim modelu dynamikę układu opisać można z wykorzystaniem praw klasycznej mechaniki. Z kolei kwantowa dynamika molekularna bierze pod uwagę kwantową naturę wiązań chemicznych. Funkcje gęstości elektronowej dla elektronów biorących udział w tworzeniu wiązań chemicznych wyznaczone są z wykorzystaniem mechaniki kwantowej, podczas gdy rdzenie atomów (jądro wraz z elektronami wewnętrznych powłok elektronowych) traktowane są w sposób klasyczny. Podejście takie pozwala na prowadzenie symulacji w układach, w których dochodzi do powstawania i zrywania wiązań chemicznych (co nie jest możliwe w przypadku klasycznej dynamiki molekularnej), wymagając jednocześnie bardzo dużej mocy obliczeniowej. Z tego względu stosowalność tej metody ograniczona jest do stosunkowo małych układów symulacyjnych, a więc to klasyczna dynamika molekularna stanowi metodę najczęściej wykorzystywaną w przypadku symulacji układów o znaczeniu biologicznym.

### 3.1.1. Przybliżenie Borna-Oppenheimera

Pełny opis układu złożonego z  $N$  atomów znajdujących się w położeniach  $R = (R_1, R_2, \dots, R_i, \dots, R_N)$ , posiadających  $n$  elektronów zlokalizowanych w położeniach  $r = (r_1, r_2, \dots, r_i, \dots, r_n)$ , wymaga rozwiązania zależnego od czasu równania Schrödingera:

$$\hat{H}\psi = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi \quad (3.1)$$

gdzie symbolem  $\hat{H}$  oznaczony został operator Hamiltona,  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  ( $h$  jest stałą Plancka), natomiast  $\psi$  oznacza funkcję falową zależną od czasu oraz położenia jąder atomów i elektronów. W przypadku, gdy Hamiltonian w równaniu (3.1) nie zależy w sposób jawny od czasu można zapisać:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (3.2)$$

gdzie symbolem  $E$  oznaczono całkowitą energię układu.

Operator Hamiltona zapisać można w postaci następującej sumy wkładów energetycznych:

$$\hat{H} = \hat{T}(R) + \hat{T}(r) + \hat{V}(R) + \hat{V}(r, R) + \hat{V}(r) \quad (3.3)$$

gdzie:

- $\hat{T}(R)$  – energia kinetyczna jąder atomowych,
- $\hat{T}(r)$  – energia kinetyczna elektronów,
- $\hat{V}(R)$  – energia oddziaływań jądro-jądro,
- $\hat{V}(r, R)$  – energia oddziaływań jądro-elektron,
- $\hat{V}(r)$  – energia oddziaływań elektron-elektron.

Jak widać, jeden z członów powyższej sumy zależy jednocześnie od położenia jąder atomowych i elektronów, co uniemożliwia podział Hamiltonianu na część jądrową i elektronową. Problem ten można rozwiązać poprzez zastosowanie przybliżenia Borna-Oppenheimera, które opiera się na założeniu, że masy jąder atomowych są nieskończenie duże w porównaniu do mas elektronów. W związku z tym jądra atomowe, z punktu widzenia elektronów, rozpatrywać można jako obiekty stacjonarne. W konsekwencji, funkcję falową  $\psi$  przedstawić można w postaci iloczynu dwóch czynników:

$$\psi \approx \psi_{el}(r; R)\psi_{nuc}(R) \quad (3.4)$$

gdzie symbolem  $\psi_{el}(r; R)$  oznaczona została funkcja falowa elektronów (zależna od położenia elektronów oraz – parametrycznie – od położenia jąder atomowych), natomiast  $\psi_{nuc}(R)$  oznacza funkcję falową jąder atomowych (zależną tylko od położenia jąder). Funkcja  $\psi_{el}(r; R)$  reprezentuje

stan elektronowy układu, w którym położenia jąder atomowych są ustalone i jest rozwiązaniem elektronowego równania Schrödingera:

$$\hat{H}_{el}\psi_{el}(r; R) = E_{el}(R)\psi_{el}(r; R) \quad (3.5)$$

Wielkość oznaczona w powyższym równaniu jako  $E_{el}(R)$  nazywana jest energią elektronową. Podstawiając równanie (3.4) do równania (3.2) oraz korzystając z zależności (3.5) otrzymać można równanie Schrödingera opisujące ruch jąder atomowych w potencjale generowanym przez elektrony:

$$[\hat{T}(R) + E_{el}(R)]\psi_{nuc} = E\psi_{nuc}(R) \quad (3.6)$$

Zgodnie z twierdzeniem Hellmanna-Feynmana, oczekiwaną wartością gradientu Hamiltonianu jest ujemny gradient energii potencjalnej, czyli siła działająca na jądra atomowe:

$$F_i = -\frac{\partial}{\partial R_i} E_{el}(R), \quad k = 1, 2, 3, \dots, N \quad (3.7)$$

Dzięki znajomości sił działających na jądra atomów znajdujących się w układzie można przewidzieć, jak zmieniać się będą położenia tych jąder w czasie. W metodach kwantowej dynamiki molekularnej stosuje się podejście oparte na wyznaczaniu potencjału, w którym poruszają się jądra atomowe, zgodnie z powyższymi założeniami. Zadanie to jest jednak bardzo wymagające pod względem obliczeniowym, co sprawia, że w praktyce metody te stosuje się tylko dla układów o stosunkowo niewielkiej liczbie atomów.

### 3.1.2. Pole siłowe

W klasycznej dynamice molekularnej potencjał  $E_{el}(R)$  zastępowany jest empiryczną funkcją, pozwalającą opisać (w sposób przybliżony) oddziaływania w układzie na podstawie położenia atomów. Potencjał ten, nazywany polem siłowym ( $V(R)$ ), można przedstawić w postaci następującej sumy:

$$V(R) = V_{bond} + V_{ang} + V_{tors} + V_{impr} + V_{elec} + V_{vdW} \quad (3.8)$$

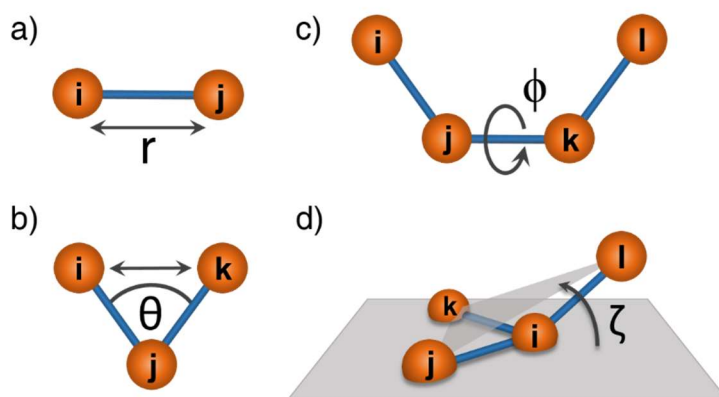
Poszczególne składniki równania (3.8) opisują energię potencjalną oddziaływań wiążących ( $V_b = V_{bond} + V_{ang} + V_{tors} + V_{impr}$ ) i niewiązących ( $V_{nb} = V_{elec} + V_{vdW}$ ) między atomami w układzie. Wkłady wiążące do energii potencjalnej charakteryzują energię oddziaływań między atomami połączonymi ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi – rozważane są tu wkłady pochodzące od oddziaływań zarówno między atomami bezpośrednio ze sobą związanymi ( $V_{bond}$ ), jak i atomami, które oddzielone są od siebie dwoma lub trzema wiązaniami kowalencyjnymi ( $V_{ang}$ ,  $V_{tors}$ ,  $V_{impr}$ ).

Wpływ zmian długości wiązań i kątów płaskich (Rys. 3.1 a, b) na energię potencjalną opisywany jest zwykle z wykorzystaniem potencjałów harmonicznym:

$$V_{bond} = \sum_{r_{ij}} \frac{1}{2} k_{ij}^r (r_{ij} - r_{ij}^0)^2 \quad (3.9)$$

$$V_{ang} = \sum_{\theta_{ijk}} \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (3.10)$$

gdzie  $k_{ij}^r$ ,  $k_{ijk}^\theta$  to stałe siłowe odkształceń dotyczących odpowiednio długości wiązań i kątów płaskich między wiązaniami,  $r_{ij}$  jest odległością między atomami związanymi wiązaniem chemicznym, natomiast  $\theta_{ijk}$  jest kątem między wiązaniami łączącymi atomy  $i$  i  $j$  oraz  $j$  i  $k$ . Wielkości oznaczone symbolami  $r_{ij}^0$  oraz  $\theta_{ijk}^0$  określają wartości równowagowe odpowiednich parametrów.



Rys. 3.1. Schematyczny rysunek przedstawiający parametry wykorzystywane do wyznaczania energii potencjalnej oddziaływań wiążących między atomami w układzie symulacyjnym: a) długość wiązania łączącego dwa atomy, b) kąt płaski między dwoma wiązaniami chemicznymi, c) kąt dwuścienny (torsyjny), d) niewłaściwy kąt torsyjny

Kolejny wkład do energii potencjalnej układu związany jest ze zmianami wielkości kątów dwuściennych między wiązaniami (Rys. 3.1 c), a więc z obrotami wokół wiązań pojedynczych:

$$V_{tors} = \sum_{\phi_{ijkl}} \frac{1}{2} k_{ijkl}^\phi [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_{ijkl}^0)] \quad (3.11)$$

W powyższym równaniu symbolem  $k_{ijkl}^\phi$  oznaczona została stała siłowa,  $\phi_{ijkl}$  jest wielkością kąta dwuściennego,  $n$  określa liczbę minimów energetycznych przypadających na pełen obrót wokół rozpatrywanego wiązania, natomiast  $\phi_{ijkl}^0$  jest czynnikiem fazowym.

Ostatnim z wkładów wiążących do energii potencjalnej układu jest wkład związany ze zmianami niewłaściwych kątów torsyjnych, który – podobnie jak wkłady związane ze zmianami

długości wiązań i kątów płaskich między wiązaniami – opisywany jest z wykorzystaniem potencjału harmonicznego:

$$V_{impr} = \sum_{\zeta_{ijkl}} \frac{1}{2} k_{ijkl}^{\zeta} (\zeta_{ijkl} - \zeta_{ijkl}^0)^2 \quad (3.12)$$

Symbolami  $k_{ijkl}^{\zeta}$ ,  $\zeta_{ijkl}$ ,  $\zeta_{ijkl}^0$  oznaczono w równaniu (3.12) odpowiednio stałą siłową, wielkość niewłaściwego kąta dwuściennego oraz równowagową wielkość niewłaściwego kąta dwuściennego. Niewłaściwy kąt dwuścienny definiowany jest jako kąt między płaszczyzną przechodzącą przez atomy i, j, k oraz płaszczyzną przechodzącą przez atomy j, k, l (Rys. 3.1 d). Wkład do energii potencjalnej  $V_{impr}$  odpowiada m.in. za ograniczenie ruchów zginających, co pozwala na kontrolowanie geometrii układu wiązań (np. dla zachowania płaskiej geometrii wokół atomu o hybrydyzacji  $sp^2$ ), jak również umożliwia zachowanie odpowiedniej chiralności atomów.

Oddziaływania niewiążące w układzie opisywane są jako suma energii oddziaływań van der Waalsa (modelowana z wykorzystaniem potencjału Lennarda-Jonesa, równanie (3.13)) oraz oddziaływań elektrostatycznych (opisanych prawem Coulomba, równanie (3.14)):

$$V_{vdW} = \sum_i^N \sum_{j>i}^N \varepsilon_{ij} \left( \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^6 \right) \quad (3.13)$$

$$V_{elec} = \sum_i^N \sum_{j>i}^N \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon_r r_{ij}} \quad (3.14)$$

W powyższych równaniach symbole  $\varepsilon_{ij}$ ,  $r_{ij}^0$  oznaczają odpowiednio głębokość studni potencjału oraz położenie minimum potencjału dla atomów  $i$  oraz  $j$ ,  $r_{ij}$  określa odległość między atomami  $i$  i  $j$ ,  $q_i$  oraz  $q_j$  są ładunkami cząstkowymi tych atomów, natomiast symbolami  $\varepsilon_0$  oraz  $\varepsilon_r$  oznaczone zostały przenikalność elektryczna próżni oraz stała dielektryczna ośrodka.

Jak wspomniałam wcześniej, pole siłowe jest funkcją, która w sposób przybliżony opisuje oddziaływania międzyatomowe w układzie. Wartości parametrów stosowanych w polach siłowych wyznaczone są eksperymentalnie lub na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych i mogą się różnić w zależności od konkretnych zastosowań.

### 3.1.3. Algorytmy całkowania równań ruchu

Wyznaczenie kolejnych stanów układu w czasie (trajektorii) wymaga rozwiązania klasycznych równań ruchu dla wszystkich cząstek znajdujących się w tym układzie. Jak wspomniałam wcześniej, oddziaływania między tymi cząstkami opisane są za pomocą pola siłowego. Siły działające na każdy atom w układzie można znaleźć wyznaczając gradient funkcji energii potencjalnej ( $V(R)$ ):

$$F_i(t) = -\nabla_i V(R) \quad (3.15)$$

Jednocześnie, zgodnie z drugą zasadą dynamiki Newtona, siła działająca na atom w danej chwili czasu jest proporcjonalna do przyspieszenia:

$$F_i(t) = m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} \quad (3.16)$$

gdzie symbolem  $F_i(t)$  oznaczona została siła działająca na  $i$ -ty atom w układzie,  $m_i$  jest masą tego atomu, natomiast  $r_i(t)$  jest wektorem położenia  $i$ -tego atomu w chwili czasu  $t$ . Wykorzystując równania (3.15) i (3.16) można zapisać następującą równość:

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = -\frac{1}{m_i} \nabla_i V(R), \quad \text{gdzie } i = 1, 2, 3, \dots, N \quad (3.17)$$

Chcąc wyznaczyć trajektorię układu należy znaleźć rozwiązanie układu  $3N$  równań różniczkowych drugiego rzędu. Jedną z częściej stosowanych metod rozwiązywania takich równań jest metoda różnic skończonych, w której pochodna funkcji przybliżana jest za pomocą odpowiednich ilorazów różnicowych. Posiadając informację na temat położenia i prędkości atomów w czasie  $t$ , poszukiwać można zatem położenia i prędkości atomów po upływie pewnego czasu równego  $\delta t$ .

Istnieje wiele algorytmów umożliwiających rozwiązanie powyższego problemu. Z punktu widzenia metod dynamiki molekularnej, preferowane jest stosowanie algorytmów, które pozwalają na szybkie uzyskanie wyniku, umożliwiają stosowanie stosunkowo długiego kroku czasowego oraz w wystarczająco dobry sposób odtwarzają trajektorię układu wyznaczoną za pomocą bardziej dokładnych metod. Wymagania te dobrze spełnia algorytm Verleta, co sprawia, że jest on obecnie wykorzystywany w większości programów służących do prowadzenia symulacji metodami dynamiki molekularnej.

Zasadę działania algorytmu Verleta przedstawić można za pomocą poniższych równań:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = v(t) + \frac{1}{2}\delta t \cdot a(t) \quad (3.18)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t \cdot v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \quad (3.19)$$

$$v(t + \delta t) = v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) + \frac{1}{2}\delta t \cdot a(t + \delta t) \quad (3.20)$$

W pierwszym kroku (równanie (3.18)) wyznaczone są prędkości atomów dla czasu pośredniego między aktualnym ( $t$ ) i następnym ( $t + \delta t$ ) krokiem obliczeniowym:  $v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right)$ , z wykorzystaniem wartości prędkości oraz przyspieszeń atomów w czasie  $t$ . Następnie prędkości te stosowane są do wyznaczenia położenia atomów w czasie  $t + \delta t$  (równanie (3.19)). W ostatnim kroku znajdowane są prędkości atomów w czasie  $t + \delta t$ , co kończy procedurę dla tego kroku obliczeniowego (równanie (3.20)).



Modyfikacją algorytmu Verleta jest algorytm skokowy (ang. *leapfrog algorithm*). W tym przypadku wyznaczenie położenia atomów w kolejnym kroku symulacyjnym przeprowadza się na podstawie następujących równań:

$$v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) = v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + \delta t \cdot a(t) \quad (3.21)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + \delta t \cdot v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right) \quad (3.22)$$

Podobnie jak poprzednio, pierwszy krok polega na wyznaczeniu prędkości atomów w pośrednim czasie  $t + \frac{1}{2}\delta t$ , tym razem wykorzystując prędkości atomów w czasie  $t - \frac{1}{2}\delta t$  oraz ich przyspieszenia w czasie  $t$ . W metodzie tej równania opisujące ewolucję położenia oraz prędkości atomów w czasie są względem siebie przesunięte o pół kroku czasowego ( $\frac{1}{2}\delta t$ ). Prędkości atomów w czasie  $t$  mogą zostać wyznaczone jako średnia arytmetyczna prędkości w momentach czasu  $t - \frac{1}{2}\delta t$  oraz  $t + \frac{1}{2}\delta t$ :

$$v(t) = \frac{v\left(t - \frac{1}{2}\delta t\right) + v\left(t + \frac{1}{2}\delta t\right)}{2} \quad (3.23)$$

#### 3.1.4. Krok czasowy

Stosowanie algorytmów całkowania równań ruchu w dynamice molekularnej w sposób nieunikniony prowadzi do uzyskania trajektorii obarczonych pewnym błędem. Wybór kroku czasowego  $\delta t$  jest jednym z ważniejszych czynników wpływających na wielkość popełnianego błędu. Z jednej strony stosowanie dużych kroków czasowych prowadzi do znacznego przyspieszenia symulacji, albo inaczej, pozwala na uzyskanie trajektorii o tej samej długości w krótszym czasie. W efekcie możliwe jest uzyskanie trajektorii, które obejmują większy obszar przestrzeni fazowej układu. Niestety, algorytmy całkowania stają się niestabilne, gdy zastosowany krok czasowy jest zbyt duży. Na skutek występowania dużych błędów obcięta, ruch cząstek staje się niestabilny, a całkowita energia układu może w gwałtowny sposób rosnać w czasie.

Wybór wielkości kroku czasowego jest limitowany częstotliwością drgań wiązań chemicznych. Najszybsze drgania (o częstotliwości rzędu  $10^{14}$  Hz) obserwowane są dla wiązań, w których tworzenie zaangażowany jest atom wodoru. Standardowo przyjmuje się, że krok czasowy powinien być co najmniej o rząd wielkości krótszy niż okres drgań wiązań o największej częstotliwości – w praktyce oznacza to, iż krok czasowy powinien być mniejszy lub równy 1 fs<sup>123</sup> ( $10^{-15}$  s). W niektórych przypadkach możliwe jest niewielkie zwiększenie kroku czasowego – do 2-4 fs – poprzez zastosowanie procedur wymuszających stałe długości wiązań charakteryzujących się najwyższą częstotliwością drgań (wiązań typu H–X).

### 3.1.5. Algorytm SHAKE

Metodą najczęściej stosowaną w celu nałożenia więzów na długości wiązań chemicznych w symulacjach metodami dynamiki molekularnej jest algorytm SHAKE<sup>124,125</sup>. Zasada działania tego algorytmu opiera się na zastosowaniu pewnej siły działającej wzdłuż wiązania chemicznego i wymuszającej zachowanie określonej długości tego wiązania. W praktyce stosuje się następującą procedurę postępowania.

W pierwszym kroku znajdowane są położenia atomów w czasie  $t + \delta t$  za pomocą standardowych algorytmów całkowania równań ruchu. Na tym etapie żadne więzy nie zostały jeszcze nałożone na długości wiązań, a więc w celu uzyskania pożądanego efektu niezbędne jest wprowadzenie odpowiednich poprawek do położenia atomów. Siła wymuszająca stałe długości wybranych wiązań (działająca wzdłuż tych wiązań w czasie  $t$ ) wyznaczana jest z wykorzystaniem następującego równania:

$$f_{constr}(t) = \frac{\mu}{2\delta t^2} \cdot \frac{(d^2(t) - d_{uc}^2(t + \delta t))}{\bar{d}(t) \cdot \bar{d}_{uc}(t + \delta t)} \cdot \bar{d}(t) \quad (3.24)$$

gdzie  $\bar{d}(t)$  i  $\bar{d}_{uc}(t + \delta t)$  są wektorami wiązania odpowiednio w czasie  $t$  (wiązanie z nałożonymi więzami) i  $t + \delta t$  (wiązanie przed nałożeniem więzów),  $d_{uc}(t + \delta t)$  jest długością wiązania w czasie  $(t + \delta t)$ ,  $d(t)$  jest długością wiązania narzucaną przez więzy, a  $\mu$  jest masą zredukowaną atomów  $i$  oraz  $j$  połączonych wiązaniem  $\left(\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_j}\right)$ . Poprawka położenia atomu  $i$  wynikająca z nałożenia więzów na wiązanie w czasie  $t + \delta t$  jest równa:

$$\Delta r_i(t + \delta t) = \frac{\delta t^2}{m_i} \cdot f_{constr}(t) \quad (3.25)$$

### 3.1.6. Kontrola temperatury i ciśnienia

Jednym z zespołów statycznych często wykorzystywanych w symulacjach prowadzonych metodami dynamiki molekularnej jest zespół izobaryczno-izotermiczny (NpT). W zespole tym liczba cząstek w układzie jest stała, a ciśnienie i temperatura są utrzymywane na zadanym poziomie poprzez zastosowanie termostatów i barostatów.

W symulacjach komputerowych chwilową temperaturę układu ustala się w oparciu o jego energię kinetyczną, co można wyrazić w postaci następującego równania:

$$\frac{3}{2} N k_B T(t) = \frac{1}{2} \sum_i m_i v_i^2 \Rightarrow T(t) = \frac{1}{3N k_B} \sum_i m_i v_i^2 \quad (3.26)$$

gdzie  $N$  jest liczbą cząstek w układzie,  $k_B$  to stała Boltzmanna,  $m_i$  jest masą cząstki, a  $v_i$  jej prędkością. Zadaniem termostatu jest utrzymanie średniej temperatury układu na zadanym poziomie. Jak to wynika z równania (3.26), można tego dokonać poprzez skalowanie prędkości cząstek w układzie. Jeśli temperatura układu w czasie  $t$  wynosi  $T(t)$ , a prędkości zostaną przemnożone przez stały czynnik  $\lambda$ , to zmiana temperatury układu może zostać wyznaczona za pomocą poniższego równania:

$$\Delta T = \frac{1}{3Nk_B} \sum_i m_i (\lambda v_i)^2 - \frac{1}{3Nk_B} \sum_i m_i v_i^2 = (\lambda^2 - 1) \cdot T(t) \quad (3.27)$$

Najłatwiejszym sposobem kontroli temperatury jest więc skalowanie prędkości cząstek w każdym kroku czasowym, z zastosowaniem czynnika  $\lambda = \sqrt{\frac{T_0}{T(t)}}$  (gdzie symbolem  $T_0$  oznaczona została pożądana temperatura układu). Zgodnie z tym podejściem, zmiana temperatury układu, wynikająca ze zdefiniowania nowej temperatury odniesienia ( $T_0$ ), realizowana jest w sposób skokowy, w ramach jednego kroku obliczeniowego. Ponadto, algorytm ten nie dopuszcza możliwości występowania fluktuacji temperatury układu wokół wartości zadanej.

Nieco mniej drastyczne podejście zostało zastosowane w termostacie Berendsena<sup>126</sup> (nazywanym również metodą słabego sprzężenia, ang. *weak-coupling method*). Prędkości, tak jak poprzednio, skalowane są w każdym kroku obliczeniowym, jednak w tym przypadku skalowanie jest przeprowadzone w taki sposób, aby szybkość zmian temperatury była proporcjonalna do różnicy między chwilową (aktualną) temperaturą układu ( $T(t)$ ) i temperaturą odniesienia ( $T_0$ ):

$$\frac{dT(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_T} (T_0 - T(t)) \quad (3.28)$$

gdzie  $\tau_T$  jest stałą sprzężenia termostatu z układem. W efekcie temperatura układu zmienia się wykładniczo w kierunku zadanej temperatury  $T_0$ .

Zachowanie stałego ciśnienia w układzie symulacyjnym osiągnąć można poprzez skalowanie położeń znajdujących się w nim cząstek, co w nieunikniony sposób prowadzi do zmian objętości układu. Barostat Berendsena<sup>126</sup> jest jednym z najczęściej stosowanych w tym celu rozwiązań.

Ciśnienie w układzie w każdym kroku symulacyjnym wyznaczyć można korzystając z następującej zależności:

$$P(t) = \frac{2}{3V(t)} (E_k(t) - W(t)) \quad (3.29)$$

gdzie symbolami  $P(t)$  oraz  $V(t)$  oznaczone zostały odpowiednio ciśnienie i objętość układu w czasie  $t$ , natomiast  $W(t)$  jest średnią diagonalnych elementów tensora wiriału ( $\Xi(t)$ ) Wiriał wyznacza się w następujący sposób:

$$\mathbf{E}(t) = \frac{1}{2} \sum_{i < j} d_{ij}(t) \mathbf{F}_{ij}(t) \quad (3.30)$$

W powyższym równaniu  $d_{ij}(t)$  oznacza odległość między cząstkami  $i$  oraz  $j$ , natomiast  $F_{ij}(t)$  jest siłą wywieraną na cząstkę  $i$  przez cząstkę  $j$ .

Zastosowanie barostatu Berendsena powoduje, że ciśnienie w układzie zmieniać się będzie w sposób opisany równaniem:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{1}{\tau_P} (P_0 - P(t)) \quad (3.31)$$

gdzie  $\tau_P$  jest stałą sprzężenia układu z barostatem, natomiast  $P(t)$  i  $P_0$  to odpowiednio chwilowe (w czasie  $t$ ) ciśnienie panujące w układzie oraz ciśnienie odniesienia. Zmiana ciśnienia wiąże się ze zmianą objętości pudełka symulacyjnego oraz zmianą położenia poszczególnych cząstek w układzie. Podobnie jak w przypadku termostatu Berendsena, definiowany jest tu czynnik skalujący, który przyjmuje postać:

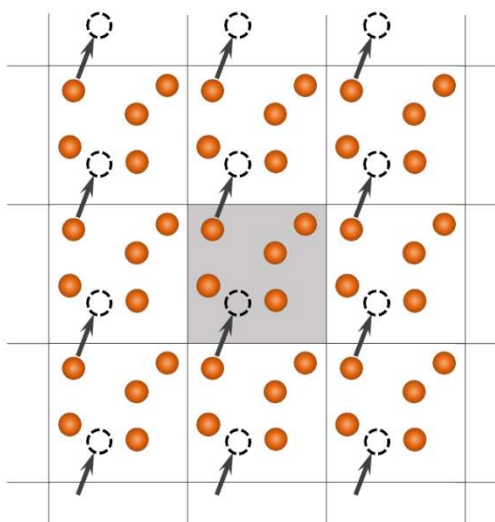
$$\mu = \left( 1 - \frac{\delta t}{\tau_P} (P - P_0) \right)^{\frac{1}{3}} \quad (3.32)$$

i umożliwia wyznaczenie nowych położenia cząstek w układzie.

### 3.1.7. Periodyczne warunki brzegowe

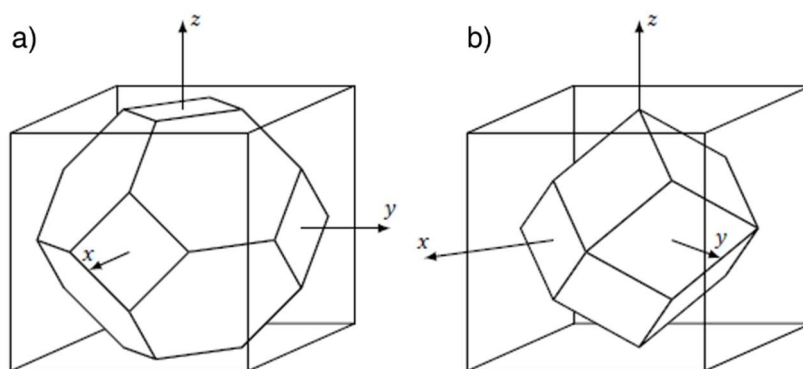
Jednym z problemów, na które należy zwrócić uwagę prowadząc symulacje komputerowe jest wpływ efektów brzegowych na uzyskiwane rezultaty. Wszystkie cząstki w układzie symulacyjnym zamknięte są w pewnym obszarze przestrzeni nazywanym pudełkiem symulacyjnym. Otoczenie cząstek znajdujących się blisko ścian pudełka będzie się różnić w porównaniu do cząstek znajdujących się w głębi pudełka, odmienne będą więc również siły działające na te cząstki. Efekt ten można zniwelować poprzez zastosowanie periodycznych warunków brzegowych (ang. *periodic boundary conditions*). Podejście to polega na powielaniu wyjściowego pudełka symulacyjnego w przestrzeni, co prowadzi do powstania regularnej, nieskończonej sieci (Rys. 3.2).

Ruch cząstek wewnątrz wyjściowego (oryginalnego) pudełka symulacyjnego jest w każdym kroku symulacyjnym odwzorowywany we wszystkich jego periodycznych obrazach – jeśli któraś z cząstek opuści (centralne) pudełko symulacyjne, jedna z jej kopii wnika do pudełka z przeciwnej strony. Oddziaływanie każdej z cząstek z otoczeniem jest wyznaczane na podstawie nie tylko oddziaływań z cząstkami znajdującymi się wewnątrz oryginalnego pudełka, ale również z cząstkami znajdującymi się w jego periodycznych obrazach.



Rys. 3.2. Schematyczny rysunek obrazujący zasadę działania periodycznych warunków brzegowych. Centralne pudełko symulacyjne (zaznaczone szarym kolorem) powielane jest we wszystkich kierunkach w przestrzeni, co sprawia, że każda cząstka opuszczająca centralne pudełko równocześnie wnika do tego pudełka z przeciwnej strony (opuszczając jeden z periodycznych obrazów)

Sześcienne (oraz prostopadłocienne) pudełka symulacyjne są jednymi z najczęściej wykorzystywanych w symulacjach komputerowych. Implementacja periodycznych warunków brzegowych dla tych pudełek jest stosunkowo prosta, co wynika bezpośrednio z ich geometrii. Przykładami innych brył, które stosowane są jako pudełka symulacyjne w symulacjach komputerowych są ścięty oktaedr oraz dwunastościan rombowy (Rys. 3.3). Jedną z zalet tych pudełek symulacyjnych jest kształt zbliżony do sfery. Dzięki temu w wielu przypadkach można ograniczyć liczbę cząsteczek solwatujących większe cząsteczki substancji rozpuszczonej (np. globularne białka), a tym samym zmniejszyć koszt prowadzenia obliczeń. Dla pudełek tych również możliwe jest stosowanie periodycznych warunków brzegowych.



Rys. 3.3. Schematyczna ilustracja prezentująca dwa rodzaje pudełek symulacyjnych<sup>127</sup>: a) pudełko o kształcie ściętego oktaedru, b) pudełko o kształcie dwunastościanu rombowego

### 3.1.8. Promień odcięcia dla oddziaływań w układzie

Stosowanie okresowych warunków brzegowych w symulacjach komputerowych sprawia, że konieczne jest wyznaczenie oddziaływań poszczególnych cząstek w układzie nie tylko z cząstkami znajdującymi się w wyjściowym pudełku symulacyjnym, ale również z cząstkami zlokalizowanymi w okresowych obrazach tego pudełka. W praktyce stosuje się pewne przybliżenia, które ograniczają liczbę wkładów do całkowitej energii oddziaływań cząstek z otoczeniem.

Pierwszą z metod stosowaną w celu uproszczenia obliczeń jest tzw. reguła najbliższego obrazu (ang. *minimum image convention*), która zakłada, że oddziaływania cząstki centralnej z otoczeniem wyznaczone są z udziałem wszystkich cząstek znajdujących się w obszarze o kształcie i rozmiarze odpowiadającym wyjściowemu pudełku symulacyjnemu, przy czym położenie cząstki centralnej stanowi centrum tego obszaru. Mimo iż reguła ta pozwala na znaczące zmniejszenie liczby czynników dających wkład do całkowitej energii oddziaływań, w przypadku dużych układów symulacyjnych, zastosowanie tego przybliżenia nie jest wystarczające.

Największy wkład do energii oddziaływań pochodzi od cząstek znajdujących się najbliżej cząstki centralnej. W przypadku oddziaływań bliskiego zasięgu wprowadza się więc promień odcięcia ( $r_{cut}$ , ang. *cut-off distance*), który określa odległość, powyżej której oddziaływania cząstki centralnej z cząstkami otaczającymi są zaniechane. Wielkość promienia odcięcia powinna być wystarczająco duża, aby błąd popełniany poprzez jego zastosowanie był jak najmniejszy, ale jednocześnie nie może być zbyt duża, aby nie sięgać poza granice obszaru wyznaczonego na podstawie reguły najbliższego obrazu. Stosowanie ostrej granicy (zdefiniowanej przez  $r_{cut}$ ), po przekroczeniu której oddziaływania bliskiego zasięgu są zaniechane, może prowadzić do pojawiania się niepożądanych efektów, takich jak np. wzrost całkowitej energii układu w czasie. Problem ten można rozwiązać wykorzystując funkcję wyłączającą (ang. *switching function*). Metoda ta polega na zdefiniowaniu przedziału odległości od cząstki centralnej ( $r_{on}, r_{cut}$ ), w którym wartości energii oddziaływań są stopniowo zmniejszane poprzez zastosowanie pewnej funkcji wygładzającej. Funkcja ta przypisuje zerowe wartości energiom oddziaływań cząstki centralnej ze wszystkimi cząstkami otaczającymi, które znajdują się w odległości  $r_{cut}$  lub większej od cząstki centralnej.

W przypadku oddziaływań dalekozasięgowych (oddziaływań elektrostatycznych) stosowanie promienia odcięcia prowadzić może do niekontrolowanego wzrostu całkowitej energii układu w czasie oraz niestabilności algorytmów całkowania równań ruchu. Alternatywnym podejściem jest wyznaczenie energii oddziaływań elektrostatycznych jako sumy oddziaływań cząstki centralnej ze wszystkimi cząstkami otaczającymi (zarówno w centralnym pudełku symulacyjnym, jak i jego okresowych obrazach). Suma wkładów wyznaczonych na podstawie

równania Coulomba jest wolno i warunkowo zbieżna, co utrudnia jej stosowanie w symulacjach komputerowych.

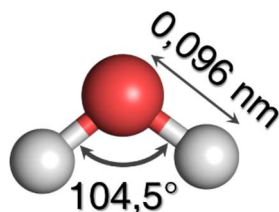
Metodą pozwalającą na przeprowadzenie sumowania w sposób bardziej efektywny jest sumowanie Ewalda (ang. *Ewald summation*). W podejściu tym całkowita energia oddziaływań elektrostatycznych dzielona jest na dwa składniki – opisujące oddziaływania dla odległości cząstka centralna – cząstka otaczająca mniejszych oraz większych od przyjętego promienia odcięcia. Oba te wkłady są bezwzględnie oraz szybciej zbieżne w porównaniu do standardowej procedury.

## 3.2. Procedura symulacyjna

Symulacje komputerowe przeprowadzone w ramach tej pracy zrealizowane zostały z wykorzystaniem programu Sander, będącego częścią pakietu Amber12<sup>128</sup>. W badaniach wykorzystane zostało pole siłowe ff03, które dobrze sprawdza się w symulacji białek. Symulacje prowadzone były w warunkach stałych temperatury i ciśnienia (NpT), które utrzymywane były na zadanym poziomie z wykorzystaniem metody słabego sprzężenia<sup>126</sup> (metody Berendsena), ze stałymi sprzężenia równymi 1 ps. Energie oddziaływań elektrostatycznych szacowane były z wykorzystaniem metody sumowania Ewalda. Promień odcięcia dla oddziaływań niewiązanych wynosił 1,2 nm. Stosując algorytm SHAKE, na długości wiązań chemicznych, w które zaangażowane były atomy wodoru, nałożone zostały więzy. Równania ruchu całkowane były z użyciem stosunkowo niewielkiego kroku czasowego, wynoszącego 2 fs.

### 3.2.1. Wybór modelu wody

Budowa pojedynczej cząsteczki wody jest bardzo prosta – dwa atomy wodoru połączone są wiązaniami kowalencyjnymi z atomem tlenu (Rys. 3.4), a kąt między tymi wiązaniami przyjmuje wartość ok. 104,5°. Długość wiązania tlen – wodór w cząsteczce wody jest równa 0,096 nm. Atom tlenu posiada tetraedryczną geometrię, na skutek obecności dwóch wolnych par elektronowych.



Rys. 3.4. Schematyczny rysunek przedstawiający budowę cząsteczki wody. Na rysunku zaznaczone zostały: długość wiązania tlen-wodór oraz wielkość kąta płaskiego między wiązaniami O-H

Różnica w elektrojemności atomów tlenu i wodoru skutkuje nierównomiernym rozkładem ładunku w obrębie cząsteczki. Z tego powodu, cząsteczka wody jest w stanie tworzyć wiązania wodorowe zarówno z innymi cząsteczkami wody, jak i z polarnymi grupami funkcyjnymi powierzchni białek.

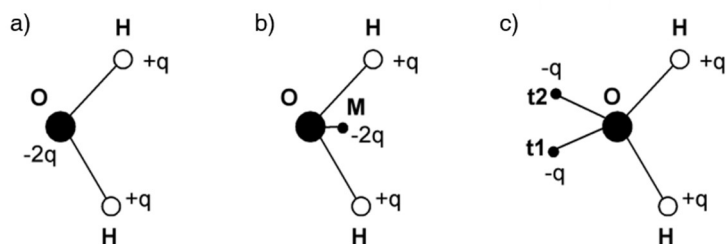
Zdolność do tworzenia wiązań wodorowych ma swoje odbicie w przestrzennej strukturze wody oraz w jej właściwościach fizykochemicznych. W porównaniu do innych rozpuszczalników o podobnej masie cząsteczkowej, woda charakteryzuje się wyraźnie wyższymi wartościami takich wielkości jak np. temperatura wrzenia, napięcie powierzchniowe, lepkość czy pojemność cieplna. Jedną z charakterystycznych cech wody jest też niższa gęstość fazy stałej w porównaniu do ciekłej wody w temperaturze bliskiej temperaturze krzepnięcia.

W fazie stałej, która charakteryzuje się najwyższym stopniem uporządkowania, każda z cząsteczek wody tworzy cztery wiązania wodorowe z sąsiednimi cząsteczkami. Liczba wiązań wodorowych przypadających średnio na jedną cząsteczkę wody w fazie ciekłej jest tylko nieznacznie niższa od tej wartości i zawiera się w przedziale od 3,2 do 3,6<sup>129</sup>. Cząsteczki wody w fazie ciekłej mają tendencję do tworzenia tetraedrycznych struktur, podobnie jak ma to miejsce w przypadku lodu. W odróżnieniu od fazy stałej, struktura ciekłej wody ulega w czasie ciągłym zmianom – wiązania wodorowe między cząsteczkami są zrywane i zastępowane nowymi wiązaniami, a same cząsteczki zmieniają swoje położenia i orientacje względem sąsiadów.

Z powodów pokrótce przedstawionych powyżej, odtworzenie właściwości wody w symulacjach komputerowych nie jest prostym zadaniem. Z biegiem lat pojawiło się wiele modeli wody, wśród których wyróżnić można trzy główne klasy. W modelach sztywnych (ang. *rigid models*), geometria każdej cząsteczki wody jest stała i opisana długością wiązań O-H oraz kątem między tymi wiązaniami. Energie oddziaływań między takimi cząsteczkami wyznaczone są jako suma oddziaływań Lennarda-Jonesa i elektrostatycznych. Modele elastyczne (ang. *flexible models*) różnią się od modeli sztywnych tym, że długości wiązań tlen-wodór oraz kąt między tymi wiązaniami mogą ulegać zmianom. Zmiany geometrii cząsteczki wody symulowane mogą być na przykład z wykorzystaniem potencjału harmonicznego. Modele polaryzowalne (ang. *polarizable models*) pozwalają z kolei na uwzględnienie efektów polaryzacyjnych oraz wielociałowych przy wyznaczaniu energii oddziaływań.

Z punktu widzenia wydajności obliczeniowej, w symulacjach układów o znaczeniu biologicznym (w których liczba cząsteczek wody jest często bardzo duża) najlepiej sprawdzają się modele sztywne. Pierwszy model stosowany na szeroką skalę zaproponowany został przez Stillingera i Rahmanna<sup>130</sup>. Model ten był modelem pięciopunktowym, w którym ładunki rozmieszczone były tetraedrycznie wokół atomu tlenu (Rys. 3.5 c). Do grupy modeli pięciopunktowych należy również zaproponowany później model TIP5P (ang. *5-point transferable intermolecular potential*)<sup>131</sup>.





Rys. 3.5. Schematyczna ilustracja przedstawiająca główne klasy modeli wody stosowanych w symulacjach komputerowych<sup>132</sup>: a) model trzypunktowy, b) model czteropunktowy c) model pięciopunktowy

W rodzinie modeli TIPXP znaleźć można również modele trój- i czteropunktowe (odpowiednio TIP3P oraz TIP4P)<sup>133</sup>. W modelach trójpunktowych ładunki dodatnie i ujemne rozmieszczone są na atomach wodoru i tlenu cząsteczki wody (Rys. 3.5 a). W przypadku modeli czteropunktowych ładunek ujemny został przesunięty poza atom tlenu, znajdując się w punkcie leżącym na dwusiecznej kąta H-O-H cząsteczki wody (Rys. 3.5 b).

Innymi często stosowanymi modelami wody są modele należące do rodziny SPC (ang. *simple point-charge*)<sup>134</sup>. Modele te są – podobnie jak model TIP3P – modelami trójpunktowymi. W ostatnich latach zainteresowaniem cieszy się również sześciopunktowy model wody, w którym połączono idee zastosowane wcześniej w modelach pięcio- i czteropunktowych. Ładunki dodatnie w modelu sześciopunktowym pozostały przypisane do atomów wodoru. Z kolei ładunki ujemne rozmieszczono w miejscach odpowiadających położeniu wolnych par elektronowych tlenu oraz w punkcie leżącym na dwusiecznej kąta H-O-H.

Zupełnie inne podejście zastosowane zostało w przypadku modelu wody mW (ang. *monatomic Water*)<sup>135</sup>. Cząsteczka wody reprezentowana jest w tym modelu przez pojedynczy atom, którego parametryzacja sprzyja tetraedrycznemu układowi się atomów względem siebie. Wiązania wodorowe modelowane są jako oddziaływania bliskiego zasięgu, z wykorzystaniem dodatkowego, zależnego od kąta, potencjału.

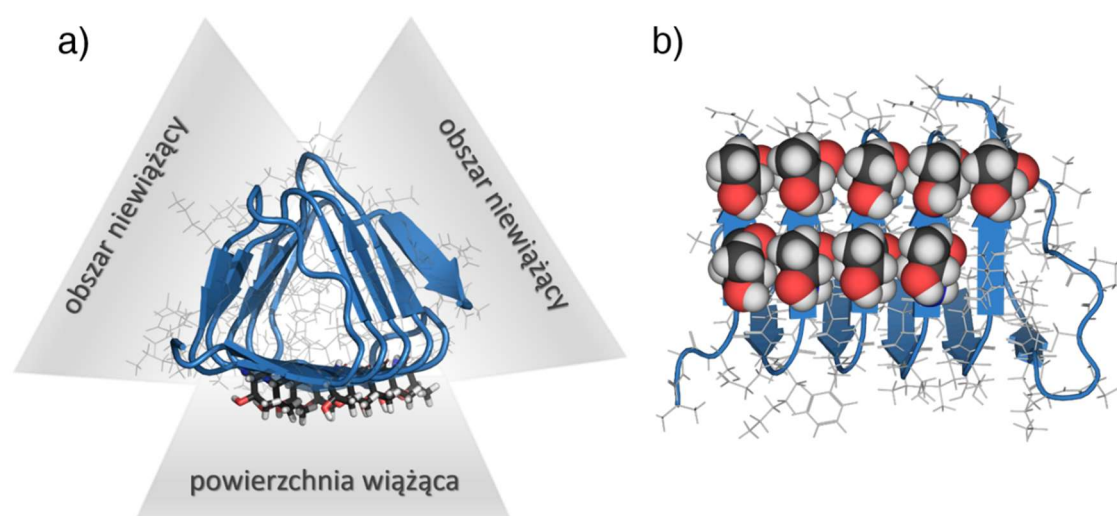
Biorąc pod uwagę charakter prowadzonych przeze mnie badań (dotyczących mechanizmu wiązania się białek przeciwdziałających zamarzaniu z powierzchnią lodu), wybrany model wody powinien dobrze opisywać zachowanie wody w temperaturach w pobliżu punktu krzepnięcia. Jedną z modyfikacji modelu wody TIP4P jest model TIP4P/Ice<sup>136</sup>. Model ten został stworzony z myślą o symulacjach wody w warunkach współistnienia fazy stałej i ciekłej. Temperatura krzepnięcia modelu TIP4P/Ice w dobry sposób odwzorowuje rzeczywistą temperaturę krzepnięcia – różnica między nimi wynosi ok. 1°C. Model ten z powodzeniem stosowany był już wcześniej do badania procesu krzepnięcia wody<sup>99,116,137</sup> oraz mechanizmu funkcjonowania białek AFP<sup>138–140</sup>. Mając na uwadze te zalety, model ten zastosowany został w przeprowadzonych przeze mnie badaniach.

### 3.2.2. Wybór białka AFP

Grupa związków chemicznych określanych mianem białek przeciwdziałających zamrażaniu jest bardzo różnorodna, m.in. pod względem rozmiaru, budowy chemicznej i struktury drugo- i trzeciorzędowej jej przedstawicieli. W zależności od rodzaju, białka te mogą wykazywać różny poziom aktywności biologicznej.

Głównym celem tej pracy było poznanie szczegółów mechanizmu wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu. Białko wybrane do badań powinno więc charakteryzować się stosunkowo wysoką aktywnością biologiczną, aby ułatwić opis zachodzących w układzie zjawisk.

Jednym z białek AFP spełniających powyższe kryterium jest białko CfAFP, pochodzące z organizmu wyłogówki (łac. *Choristoneura fumiferana*). Cząsteczka tego białka posiada trzy, dobrze zdefiniowane, powierzchnie (Rys. 3.6 a), z których jedna bierze udział w procesie wiązania się białka z lodem – w dalszej części pracy obszar ten nazywany będzie powierzchnią wiążącą lub aktywną. Pozostałe dwie powierzchnie nie posiadają zdolności do wiązania się z lodem, w związku z czym określane będą mianem powierzchni nieaktywnych.



Rys. 3.6. Budowa cząsteczki białka CfAFP. a) Obszary aktywne i nieaktywne cząsteczki białka. Reszty treoniny zlokalizowane w obszarze powierzchni wiążącej zaznaczone zostały grubszymi liniami. b) Widok na płaszczyznę wiążącą cząsteczki białka – reszty treoniny przedstawione zostały za pomocą sfér (kolorem czerwonym oznaczone zostały atomy tlenu, kolorem czarnym – atomy węgla, natomiast kolorem białym – atomy wodoru)

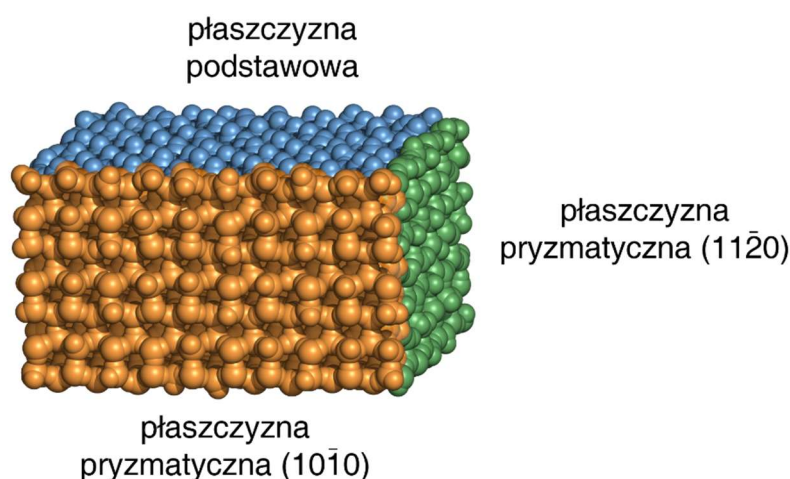
Jedną z cech charakterystycznych hiperaktywnych białek AFP jest obecność stosunkowo płaskiej powierzchni wiążącej, na której w równomierny sposób rozmieszczone są reszty treoniny. W przypadku białka CfAFP, w obszarze aktywnym znajduje się dziewięć takich reszt. Grupy hydroksylowe i metylowe reszt treoniny tworzą na powierzchni aktywnej cząsteczki swego rodzaju „rusztowanie” (Rys. 3.6 b), które z jednej strony wspomaga proces porządkowania się wody

solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki, a z drugiej umożliwia tworzenie się wiązań wodorowych między powierzchnią cząsteczki białka i lodem.

### 3.2.3. Badanie procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu

#### A. Przygotowanie układów

Przygotowanie układów symulacyjnych rozpoczęte zostały od skonstruowania kryształu lodu. Wyjściowa struktura lodu heksagonalnego pobrana została z krystalograficznej bazy danych Inorganic Crystal Structure Database, FIZ Karlsruhe. Na jej podstawie zbudowany został prostopadłościenny kryształ lodu zawierający 1330 cząsteczek wody i którego ściany stanowiły płaszczyzny podstawowa, pryzmatyczna ( $10\bar{1}0$ ) i pryzmatyczna ( $11\bar{2}0$ ) (Rys. 3.7). Na tym etapie przygotowania kryształ charakteryzował się wysokim stopniem wewnętrznego uporządkowania (pod względem kierunków wektorów momentów dipolowych cząsteczek wody).



Rys. 3.7. Budowa prostopadłościennego kryształu lodu, skonstruowanego w ramach badań. Na rysunku zaznaczone zostały płaszczyzny krystalograficzne lodu, które stanowiły ściany kryształu: podstawowa (oznaczona kolorem niebieskim), pryzmatyczna ( $10\bar{1}0$ ) (kolor pomarańczowy) oraz pryzmatyczna ( $11\bar{2}0$ ) (kolor zielony)

W kolejnym kroku kryształ umieszczony został w prostopadłościennym pudełku symulacyjnym w taki sposób, aby odległość powierzchni kryształu od ścian pudełka wynosiła 3 nm w przypadku płaszczyzn podstawowych oraz 1,5 nm dla pozostałych płaszczyzn. Następnie pudełko wypełnione zostało ciekłą wodą TIP4P/Ice (do układu dodanych zostało 15 858 cząsteczek wody).

Tak przygotowany układ poddany został minimalizacji energii, a plik wynikowy wykorzystany został po pierwsze jako podstawa do stworzenia serii niezależnych układów symulacyjnych, różniących się między sobą orientacjami cząsteczek wody budujących kryształ

lodu, a po drugie jako plik referencyjny dla położenia atomów tlenu cząsteczek wody budujących kryształ lodu.

Dalsze przygotowanie układów do symulacji przeprowadzone zostało w kilku etapach. W pierwszym z nich, zminimalizowany układ poddano dwunastu następującym po sobie symulacjom w warunkach stałego ciśnienia (1 bar) i temperatury (270 K). Symulacje prowadzone były z zastosowaniem okresowych warunków brzegowych. Czas trwania pojedynczej symulacji wynosił 900 ps (z krokiem czasowym równym 2 fs). Punktem startowym dla każdej kolejnej symulacji był stan układu (położenia atomów) po zakończeniu symulacji poprzedniej, a prędkości początkowe cząsteczek za każdym razem nadawane były losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmana. Atomy tlenu cząsteczek wody budujących kryształ lodu były w czasie trwania symulacji przytrzymywane ze stałą siłą równą 10 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>). W wyniku przeprowadzonych symulacji uzyskanych zostało dwanaście plików wynikowych, z których każdy posłużył jako plik startowy w kolejnym etapie przygotowania układów do właściwych symulacji.

Każdy z układów symulacyjnych uzyskanych w sposób opisany powyżej został poddany serii dziesięciu następujących po sobie symulacji. Warunki prowadzenia symulacji pozostały w większości niezmienione w stosunku do poprzedniego etapu. Modyfikacji poddana została długość pojedynczej symulacji (300 ps) oraz wielkość stałej siłowej wykorzystywanej do przytrzymywania atomów tlenu cząsteczek wody budujących kryształ lodu (2 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>)). Po zakończeniu tego etapu obliczeń, liczba plików wynikowych (a tym samym układów symulacyjnych) wyniosła sto dwadzieścia.

Uzyskane układy poddano w kolejnym kroku modyfikacji, która miała na celu uzyskanie układów symulacyjnych różniących się nie tylko pod względem położenia i orientacji cząsteczek ciekłej wody, ale również pod względem orientacji cząsteczek wody budujących kryształ lodu. Ponadto, w celu zbadania wpływu ilości „wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu na proces krzepnięcia wody na tej powierzchni, przygotowano dwie serie układów symulacyjnych – RAND (w których orientacje cząsteczek wody w kryształach były przypadkowe) oraz ASYM (które charakteryzowały się wysokim stopniem uporządkowania wewnętrznego kryształów lodu).

Układy typu RAND przygotowane zostały z układów uzyskanych w poprzednim etapie procedury, poprzez nadanie losowych orientacji wszystkim cząsteczkom wody budującym kryształ lodu. Ponadto, w celu zapewnienia większej niezależności układów, również orientacje cząsteczek ciekłej wody zostały nadane losowo. Po zakończeniu procedury randomizacji, układy zostały poddane równoważeniu w warunkach stałego ciśnienia (1 bar) i temperatury (270 K), w czasie 600 ps. W przypadku układów typu ASYM pominięta została procedura randomizacji orientacji cząsteczek wody tworzących kryształ lodu, podczas gdy orientacje cząsteczek ciekłej wody zostały nadane losowo, podobnie jak to miało miejsce dla układów typu RAND. W wyniku takiego postępowania uzyskano nowe układy symulacyjne, w których znajdowały się kryształy lodu

charakteryzujące się wysokim stopniem uporządkowania wewnętrznego. W następnym kroku przeprowadzone zostało równoważenie uzyskanych układów symulacyjnych, z zachowaniem warunków zastosowanych dla układów typu RAND. Podczas równoważenia, orientacje niektórych cząsteczek wody budujących kryształy lodu uległy zmianie, co doprowadziło do uzyskania serii różnorodnych (pod względem budowy wewnętrznej kryształu lodu) układów symulacyjnych, charakteryzujących się średnimi zawartościami „wolnych” wiązań O-H na powierzchni kryształu wynoszącymi 78% i 22% dla dwóch płaszczyzn podstawowych lodu oraz 65 i 32% dla dwóch płaszczyzn pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ).

### B. Właściwe symulacje

Wszystkie układy przygotowane w opisany powyżej sposób poddane zostały właściwym symulacjom komputerowym. Badania prowadzone były w warunkach stałego ciśnienia i temperatury, z zastosowaniem periodycznych warunków brzegowych, w temperaturach w zakresie 250 – 270 K. Atomy tlenu cząsteczek wody budujących kryształy lodu były w czasie trwania symulacji przytrzymywane ze stałą siłą równą  $2 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$ . Długość każdej z symulacji wynosiła 60 ns.

#### 3.2.4. Symulacje układu zawierającego jedynie ciekłą wodę

Prostopadłościennie pudełko symulacyjne, wypełnione zostało ciekłą wodą TIP4P/Ice (12 665 cząsteczek). Proces równoważenia prowadzony był przez 2 ns w temperaturze 300 K, w warunkach stałego ciśnienia i temperatury. Właściwe symulacje przeprowadzone zostały dla kilku temperatur w zakresie 250 – 300 K, a długość pojedynczej symulacji wynosiła 2,4 ns.

#### 3.2.5. Badanie mechanizmu oddziaływania białka CfAFP z lodem

Kolejnym krokiem badań było przeprowadzenie symulacji komputerowych w układach, które zawierały zarówno kryształ lodu, jak i cząsteczki białka CfAFP. W celu poznania szczegółów procesu oddziaływania białka z lodem jeszcze przed ich związaniem, cząsteczki białka umieszczone zostały w pewnej odległości od powierzchni kryształu. Ponadto, badania prowadzone były równolegle w trzech typach układów: w układach zawierających jedynie kryształ lodu i ciekłą wodę, w układach, gdzie znajdowały się zarówno kryształ lodu, jak i cząsteczki białka CfAFP, zanurzone w ciekłej wodzie, oraz w układach, gdzie obecne były jedynie cząsteczki białka CfAFP i ciekła woda.

Aby możliwe było bezpośrednie porównanie rezultatów uzyskanych w wyniku prowadzenia symulacji w układach zawierających i niezawierających cząsteczek białek oraz aby

uwzględnić nowe informacje dotyczące wpływu uporządkowania cząsteczek wody wewnątrz kryształu na zachodzące procesy (uzyskane w wyniku badań nad procesem krzepnięcia wody na powierzchni lodu i opisane w Rozdziale 5.1), przeprowadzona została nowa seria symulacji komputerowych układów zawierających jedynie kryształ lodu i ciekłą wodę. Aby ograniczyć koszt prowadzenia obliczeń (zmniejszając objętość układów, a więc również liczbę cząsteczek ciekłej wody w nich zawartych), wszystkie badania przeprowadzone zostały w pudełkach symulacyjnych o kształcie ściętego oktaedru.

### A. Przygotowanie układów

#### Kryształ lodu w ciekłej wodzie

Wyjściowy kryształ lodu heksagonalnego skonstruowany został z 3275 cząsteczek wody TIP4P/Ice. Kształt kryształu był niemal sześcienny, długość każdej z krawędzi wynosiła ok. 4,5 nm. Ścianami kryształu były płaszczyzny podstawowa, pryzmatyczna ( $10\bar{1}0$ ) i pryzmatyczna ( $11\bar{2}0$ ).

Kryształ lodu umieszczony został w pudełku symulacyjnym o kształcie ściętego oktaedru, po czym pudełko wypełnione zostało ciekłą wodą TIP4P/Ice (do układu dodanych zostało 45 834 cząsteczki wody). Tak przygotowany układ symulacyjny został powielony sto dwadzieścia razy, po czym każdy z nowych układów został niezależnie zrównoważony w warunkach stałego ciśnienia (1 bar) i temperatury. Na początku każdej symulacji, prędkości cząsteczek w układzie nadawane były losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmann. Proces równoważenia przebiegał w dwóch etapach, z których pierwszy (ok. 1,7 ns) przeprowadzony został w temperaturze 300 K, natomiast drugi (ok. 1,6 ns) – w temperaturze 280 K. W obu przypadkach położenia atomów tlenu cząsteczek wody budujących kryształy lodu były przytrzymywane z zastosowaniem siły harmoniczej, ze stałymi siłowymi wynoszącymi odpowiednio 5 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>) i 2 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>).

Po równoważeniu, układy zostały poddane procedurze randomizacji, w której każdej cząsteczce wody budującej kryształ lodu nadana została losowa orientacja przestrzenna. W przypadku każdego ze stu dwudziestu układów, procedurę wykonano dwadzieścia razy, a uzyskane w ten sposób układy poddano krótkiemu równoważeniu (20 ps, w warunkach stałego ciśnienia i temperatury, na początku symulacji prędkości nadawane były cząsteczkom losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmann, a atomy tlenu cząsteczek wody budujących kryształ lodu były przytrzymywane ze stałą siłą równą 50 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>)). Spośród dwudziestu układów uzyskanych w procesie randomizacji dla każdego ze stu dwudziestu wyjściowych układów, do dalszych badań wybrano ten, który charakteryzował się najmniejszym całkowitym momentem dipolowym zawartego w nim kryształu lodu. Postępowanie takie pozwoliło na zminimalizowanie wpływu pola elektrycznego, generowanego przez kryształy lodu, na zachodzące procesy – jak pokazały rezultaty uzyskane w wyniku prowadzenia badań nad procesem krzepnięcia wody na

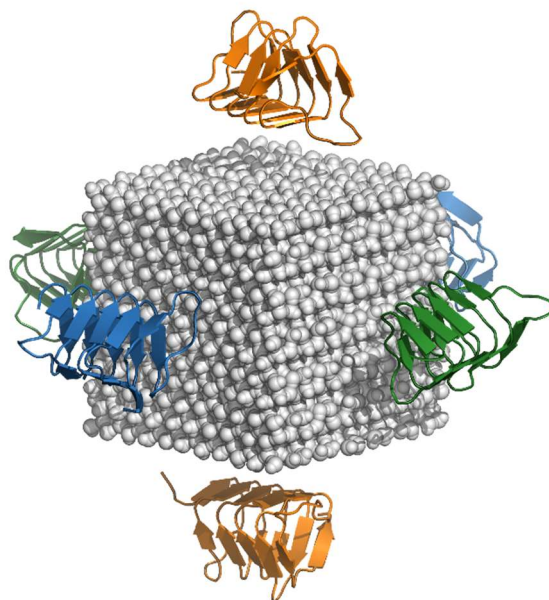
powierzchni kryształu lodu (które zostały przedstawione w Rozdziale 5.1.6) wpływ ten może być niekiedy znaczący.

W następnym kroku, uzyskane układy zostały poddane ponownemu równoważeniu w 280 K. Atomy tlenu cząsteczek wody tworzących kryształ lodu były w czasie jego trwania przytrzymywane ze stałą siłą równą  $5 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$  (50 ps), a następnie ze stałą siłą równą  $2 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$  (5 ps).

### Kryształ lodu oraz cząsteczki białka CfAFP w ciekłej wodzie

Struktura cząsteczki białka CfAFP (pochodzącego z organizmu wyłogówki, łac. *Choristoneura fumiferana*) pochodziła z bazy Protein Data Bank (PDB ID: 1L0S). Oryginalny plik zawierał jedną jodowaną tyrozynę, która nie jest obecna w formie natywnej białka, a więc została ona zamieniona na tyrozynę. W następnym kroku do struktury dodane zostały wszystkie brakujące reszty aminokwasowe i atomy.

Układ symulacyjny zbudowano w taki sposób, że w jego centrum znajdował się kryształ lodu, a przy każdej ze ścian kryształu umieszczono cząsteczkę białka CfAFP. Odległość między powierzchnią białka i powierzchnią lodu wynosiła w każdym przypadku ok. 1,1 nm. Cząsteczki białka zorientowane zostały w taki sposób, aby ich powierzchnia aktywna skierowana była w kierunku płaszczyzn podstawowych i pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ) oraz aby obszar nieaktywny sąsiedował z płaszczyznami pryzmatycznymi ( $11\bar{2}0$ ) (Rys. 3.8). Całość umieszczona została w pudełku symulacyjnym o kształcie ściętego oktaedru.



Rys. 3.8. Budowa układu symulacyjnego. Sześć cząsteczek białka CfAFP umieszczonych zostało w sąsiedztwie ścian kryształu lodu, w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. Cząsteczki sąsiadujące z poszczególnymi płaszczyznami krystalograficznymi lodu zostały oznaczone różnymi kolorami, według schematu: płaszczyzna podstawowa – kolor niebieski, płaszczyzna pryzmatyczna ( $10\bar{1}0$ ) – kolor pomarańczowy, płaszczyzna pryzmatyczna ( $11\bar{2}0$ ) – kolor zielony

W związku z tym, że wybrane do badań białko nie jest obojętne elektrycznie, do układu dodane zostały również przeciwjony (12 jonów chlorkowych). Jak pokazują badania<sup>141,142</sup>, obecność jonów może mieć znaczący wpływ na zachowanie ciekłej wody. Aby zminimalizować ryzyko wystąpienia niepożądanych efektów, jony chlorkowe rozmieszczone zostały w pobliżu ścian pudełka symulacyjnego oraz były w trakcie trwania symulacji przytrzymywane w położeniach referencyjnych, ze stałą siłową równą  $0,5 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ .

W następnym kroku układ wypełniony został wodą TIP4P/Ice (do układu dodanych zostało 48 432 cząsteczki wody) oraz powielony sto dwadzieścia razy. Każdą z kopii poddawano następnie równoważeniu przez ok. 1,2 ns w warunkach stałego ciśnienia (1 bar) i temperatury (300 K). Prędkości nadawane były cząsteczkom losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmann. Atomy tlenu cząsteczek wody tworzących kryształ lodu były w trakcie trwania symulacji przytrzymywane ze stałą siłową wynoszącą  $5 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ , atomy  $C_{\alpha}$  łańcuchów węglowych białek przytrzymywane były ze stałą siłową równą  $2 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ , natomiast jony chlorkowe – ze stałą siłową równą  $0,5 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ .

W następnym kroku, orientacje cząsteczek wody budujących kryształ lodu zostały w każdym z układów dopasowane do odpowiadających im orientacji w układach niezawierających białek (odpowiednie współrzędne atomów wodoru zostały podmienione). Tak zmodyfikowane układy zostały poddane równoważeniu w temperaturze 280 K, w trzech etapach. Etap pierwszy polegał na przeprowadzeniu symulacji, podczas których wszystkie atomy cząsteczek wody tworzących kryształ lodu oraz atomy łańcucha węglowego cząsteczek białka były przytrzymywane w położeniach referencyjnych (ze stałymi siłowymi wynoszącymi odpowiednio  $10 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$  i  $0,05 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ ). Przytrzymywane były również jony chlorkowe (ze stałą siłową wynoszącą  $0,5 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ ).

W kolejnym etapie, trwającym ok. 1,2 ns, wyłączone zostało przytrzymywanie atomów wodoru cząsteczek wody budujących kryształ lodu, a stała siłowa, z jaką przytrzymywane były atomy tlenu, została zredukowana do wartości  $2 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{\AA}^2)$ . Ostatni etap równoważenia polegał na przeprowadzeniu krótkiej symulacji, w której atomy białka nie były przytrzymywane. Dzięki takiemu postępowaniu, cząsteczki te mogły swobodnie się poruszać, umożliwiając uzyskanie układów symulacyjnych zróżnicowanych pod względem położenia i orientacji cząsteczek białka względem kryształu lodu.

### *Białka CfAFP w ciekłej wodzie*

Oprócz opisanych powyżej układów przygotowano również układy zawierające jedynie cząsteczki białka CfAFP oraz ciekłą wodę. Procedura przygotowania układów symulacyjnych była podobna do opisanej powyżej, z tą różnicą, iż w układzie nie znalazł się kryształ lodu. Atomy węgla łańcucha węglowego były w trakcie symulacji przytrzymywane ze stałą siłową równą  $0,005$



kcal/(mol·Å<sup>2</sup>), w celu uniknięcia nadmiernego zbliżania się cząsteczek białka do siebie. Sto dwadzieścia kopii układu było – jak poprzednio – równoważone najpierw w temperaturze 300 K, a następnie w 280 K.

## B. Właściwe symulacje

Przygotowane układy symulowano w warunkach stałego ciśnienia (1 bar) i temperatury (250 i 265 K). Czas trwania symulacji wynosił 18 ns. Symulacje w układach zawierających cząsteczki białka sąsiadujące z lodem prowadzono bez przytrzymywania atomów białek. We wszystkich układach zawierających kryształ lodu atomy tlenu cząsteczek wody budujących kryształ były w trakcie trwania symulacji przytrzymywane ze stałą siłą wynoszącą 2 kcal/(mol·Å<sup>2</sup>).

### 3.2.6. Badanie siły wywieranej na białka CfAFP znajdujące się w pobliżu powierzchni kryształu lodu

#### A. Przygotowanie układów

Układy do tego etapu badań przygotowane zostały poprzez modyfikację układów startowych zawierających kryształ lodu oraz sześć cząsteczek białka CfAFP, przygotowanych w sposób opisany w poprzednim rozdziale. W pierwszym kroku skonstruowane zostały nowe pliki referencyjne, w których cząsteczki białka sąsiadujące z płaszczyznami podstawowymi i pryzmatycznymi (10 $\bar{1}$ 0) zostały przesunięte w kierunku prostopadłym do powierzchni kryształu lodu o pewną wartość  $d$ . W ten sposób otrzymano nowe serie układów symulacyjnych o zmienionej odległości między cząsteczkami białka i powierzchnią lodu. Szczegóły dotyczące tej procedury przedstawione zostały w tabeli poniżej.

Tabela 3.1. Szczegóły dotyczące przygotowania układów symulacyjnych do badań. Przygotowane zostały trzy serie układów, z której każda zawierała sto dwadzieścia układów symulacyjnych. W ramach każdej z serii, cząsteczki białka znajdujące się w sąsiedztwie naprzeciwległych płaszczyzn podstawowych i pryzmatycznych (10 $\bar{1}$ 0) (oznaczone jako CfAFP 1 oraz CfAFP 2) zostały przesunięte w kierunku powierzchni lodu o pewną odległość  $d$  – odległości te (dla każdej z przygotowanych serii układów) zebrane zostały w tabeli. Ujemne wartości wskazują, że cząsteczki białka zostały przysunięte do powierzchni lodu, podczas gdy wartości dodatnie – że zostały od tej powierzchni odsunięte.

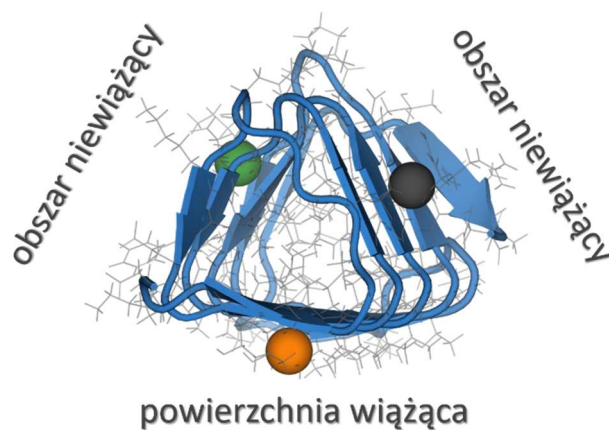
	CfAFP 1	CfAFP 2
Seria 1.	0 nm	-0,2 nm
Seria 2.	-0,1 nm	+0,1 nm
Seria 3.	-0,3 nm	-0,4 nm

Wykorzystując przygotowane pliki referencyjne, przeprowadzono symulacje komputerowe układów startowych, w których atomy C <sub>$\alpha$</sub>  i N szkieletu białkowego były

przytrzymywane ze stałą siłą równą  $0,05 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$  (100 ps) oraz ze stałą siłą równą  $0,1 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$  (kolejne 2,4 ns). Dzięki takiemu postępowaniu białka znajdujące się w układach startowych zostały przesunięte do nowych położenia (odpowiadającym położeniom atomów w plikach referencyjnych) – uzyskane w ten sposób układy symulacyjne posłużyły do przeprowadzenia właściwych symulacji. W trakcie trwania wszystkich symulacji atomy tlenu cząsteczek wody tworzących kryształ lodu oraz jony chlorkowe również były przytrzymywane.

### B. Właściwe symulacje

Symulacje dla wszystkich trzystu sześćdziesięciu układów prowadzone były w warunkach stałego ciśnienia (1 bar) i temperatury (250 K). W czasie trwania symulacji atomy tlenu cząsteczek wody budujących kryształ lodu oraz jony chlorkowe były przytrzymywane ze stałymi siłowymi równymi odpowiednio  $2 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$  i  $0,5 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$ . Ponadto, w przypadku każdej cząsteczki białka w układzie, jeden z atomów był przytrzymywany ze stałą siłą wynoszącą  $10 \text{ kcal}/(\text{mol}\cdot\text{Å}^2)$ . Przytrzymywane atomy wybrano w taki sposób, aby znajdowały się na środku powierzchni białka, która sąsiadowała z powierzchnią kryształu lodu (Rys. 3.9) – w przypadku białek zwróconych powierzchnią aktywną w kierunku lodu był to jeden z atomów węgla reszty treoniny zlokalizowanej w centralnej części tej powierzchni (THR 36), natomiast dla dwóch pozostałych białek wybrane zostały atom węgla argininy (ARG 41) oraz atom węgla treoniny (THR 46).



Rys. 3.9. Cząsteczka białka CfAFP, z zaznaczonymi obszarami wiążącym i niewiążącymi oraz atomami, które były przytrzymywane (z wykorzystaniem potencjału harmonicznego) podczas symulacji komputerowych

## Rozdział 4

# Metody analizy rezultatów

Głównym celem przeprowadzonych badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie, jaką rolę w procesie oddziaływania i wiązania się białek przeciwdziałających zamarzaniu z powierzchnią lodu pełni woda. Aktualny stan wiedzy wyraźnie wskazuje na to, że decydującym czynnikiem mogą być specyficzne właściwości strukturalne wody. Istnieje wiele narzędzi służących do badania struktury wody. Aby wybrać spośród nich te, które najlepiej sprawdzą się w rozważanym przypadku, warto w pierwszej kolejności zastanowić się, co kryje się pod pojęciem „struktury” wody i jakie informacje będą najbardziej przydatne z punktu widzenia rozważań nad mechanizmem funkcjonowania białek przeciwdziałających zamarzaniu.

Struktura substancji jest odzwierciedleniem jej wewnętrznego uporządkowania. W większości przypadków substancje nie znajdują się ani w stanie idealnego uporządkowania, ani w stanie całkowitego nieuporządkowania.

Krystaliczne ciało stałe może być przykładem substancji charakteryzującej się bardzo wysokim stopniem uporządkowania, a co za tym idzie, niską entropią. Ta sama substancja, występująca w formie wysoce rozrzedzonego gazu, nie będzie wykazywać żadnego uporządkowania, natomiast entropia takiego układu będzie wysoka. Ciekły stan skupienia jest stanem pośrednim między tymi dwoma, skrajnymi, przypadkami. Ciecze wykazują pewien stopień uporządkowania, jednak uporządkowanie to ma zasięg lokalny. Ponadto, na skutek dużej mobilności cząstek, uporządkowanie to zmienia się zarówno w czasie, jak i w przestrzeni (również w układach jednorodnych i izotropowych). Strukturą cieczy można więc nazwać pewien średni stopień uporządkowania cząstek w cieczy, który determinuje jej właściwości fizyczne.

Obecność w cieczy (będącej rozpuszczalnikiem) cząsteczek substancji rozpuszczonej będzie zawsze skutkować zaburzeniem struktury tej cieczy. Z jednej strony ciecz wykazywać będzie tendencję do zachowania własnej struktury, z drugiej – istnienie oddziaływań między cząstkami cieczy i cząstkami substancji rozpuszczonej będzie prowadzić do pojawiania się pewnych zmian strukturalnych. Bezpośrednie oddziaływanie cząstek rozpuszczalnika z cząstkami substancji rozpuszczonej nazywane jest solwatacją.

Struktura cieczy solwatuującej cząstki substancji rozpuszczonej będzie w oczywisty sposób różna od struktury cieczy niezaburzonej obecnością substancji rozpuszczonej. Efekt ten

przejawiać się będzie nie tylko jako zmiana własności makroskopowych roztworu w porównaniu do czystej cieczy (takich jak np. gęstość czy lepkość), ale będzie również wpływać na zachowanie cząsteczek substancji rozpuszczonej w roztworze, m.in. na ich zdolność do oddziaływania ze sobą. Podkreśla to znaczącą rolę efektów solwatacyjnych i uzasadnia, dlaczego badania struktury cieczy zawartej w bezpośrednim sąsiedztwie substancji rozpuszczonej są tak ważne.

Sformułowane powyżej w sposób ogólny zagadnienie struktury cieczy w prosty sposób przenieść można na rozważania dotyczące roli wody solwatacyjnej w procesie wiązania się białek przeciwdziałających zamarzaniu z powierzchnią kryształu lodu. Problemem pozostaje jednak wybór metody pozwalającej na ilościowe scharakteryzowanie struktury wody, która sprawdzać się będzie zarówno w badaniach nad strukturą wody niezaburzonej obecnością białka, jak i w przypadku wody solwatującej białko.

Najbardziej racjonalnym podejściem wydaje się wykorzystanie oferowanego przez termodynamikę statystyczną związku między uporządkowaniem układu i jego entropią statystyczną. Związek ten opiera się na koncepcji wielocząstkowych funkcji korelacji, których stosowanie ograniczone jest niestety wieloma problemami natury technicznej. Z tego też powodu w literaturze znaleźć można również szereg parametrów empirycznych, które stosowane są do opisu lokalnej struktury wody. Parametry te, mimo iż umożliwiają wyciąganie wniosków na temat zmian zachodzących w strukturze wody, posiadają pewne mankamenty ograniczające ich stosowalność.

Stosownie do powyższych uwag, opis metod wykorzystywanych przeze mnie w celu analizy struktury wody podzielony został na dwie główne części: część dotyczącą metod opartych na związku entropii statystycznej z uporządkowaniem strukturalnym układu (Rozdział 4.1) oraz część poświęconą opisowi empirycznych parametrów strukturalnych (Rozdział 4.2). W dalszej części rozdziału poruszony zostanie również problem wpływu obecności objętości wykluczonej (cząsteczki białka) na wielkości charakteryzujące w sposób ilościowy strukturę wody (Rozdział 4.3).

Oprócz metod wykorzystywanych bezpośrednio do opisu struktury wody solwatacyjnej białka CfAFP, w badaniach zastosowałam również szereg parametrów wspomagających, pozwalających na dokonanie całościowego opisu zachodzących zjawisk. Metody te, zaprezentowane w Rozdziałach 4.4 – 4.6, obejmują m.in. narzędzia pozwalające na śledzenie postępu procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu oraz zmian położeń i orientacji cząsteczek białka CfAFP sąsiadującego z powierzchnią lodu w czasie.

Analiza rezultatów przeprowadzona została w całości z wykorzystaniem własnego oprogramowania, zaś użyte przeze mnie metody analizy opisane zostały szczegółowo poniżej. Wykresy zamieszczone w pracy sporządzone zostały z wykorzystaniem języka programowania Python. Do wizualizacji fragmentów układów symulacyjnych zastosowane zostały programy PyMOL<sup>143</sup> oraz VMD<sup>144</sup>.

## 4.1. Entropia statystyczna układu i jej wykorzystanie do opisu struktury wody

### 4.1.1. Entropia statystyczna

Jak wspomniałam wcześniej, rozważania dotyczące stopnia uporządkowania (oraz nieuporządkowania) wody nie byłyby kompletne bez odwołania się do pojęcia entropii. Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Boltzmanna, entropia układu makroskopowego ( $S$ ) jest proporcjonalna do logarytmu naturalnego z liczby stanów mikroskopowych, jakie mogą być zrealizowane przez ten układ ( $W$ ). Zależność tę można zapisać jako:

$$S = k_B \ln W \quad (4.1)$$

gdzie  $k_B$  oznacza stałą Boltzmanna. Zliczenie wszystkich możliwych stanów mikroskopowych jakie może przyjąć dany układ staje się tym trudniejsze, im większa jest liczba cząstek w układzie. Rozwiązaniem tego problemu jest zastąpienie dyskretnego rozkładu stanów rozkładem ciągłym.

Jeśli układ składa się z  $N$  cząstek, z których każda opisana jest za pomocą trzech zmiennych określających położenie oraz trzech zmiennych określających pęd, to w każdej chwili czasu pozycja i pęd wszystkich cząstek w układzie jest reprezentowana przez jeden punkt w  $6N$ -wymiarowej przestrzeni – punkt ten opisuje stan układu. Przestrzeń, w której znajduje się ten punkt nazywana jest przestrzenią fazową. Zmiana położenia punktu (stanu układu) w przestrzeni fazowej w czasie wyznacza trajektorię układu. Jeśli objętość przestrzeni fazowej (która zawiera w sobie wszystkie możliwe stany mikroskopowe układu) oznaczona zostanie symbolem  $\Omega$ , to równanie (4.1) można przedstawić w następującej formie:

$$S = k_B \ln \Omega \quad (4.2)$$

Prawdopodobieństwo, że układ znajdzie się w jednym z możliwych stanów mikroskopowych opisywane jest funkcją rozkładu gęstości prawdopodobieństwa  $\rho$ :

$$\rho = \frac{1}{Q} e^{-\frac{E}{kT}} \quad (4.3)$$

gdzie symbolem  $Q$  oznaczona została suma statystyczna układu, którą można przedstawić jako:

$$Q = \int e^{-\frac{E}{kT}} d\Omega = \frac{1}{\sigma^N N! h^{6N}} \int e^{-\frac{E}{kT}} d\bar{q} d\bar{p} d\bar{\omega} d\bar{J} \quad (4.4)$$

gdzie:

- $N!$  – człon uwzględniający nierozróżnialność cząstek,
- $\sigma^N$  – liczba symetrii; liczba nierozróżnialnych orientacji cząstki,

$\bar{q}, \bar{\omega}, \bar{p}, \bar{J}$  – wektory definiujące kolejno położenia, orientacje, pędy i momenty pędów wszystkich cząstek w układzie.

Wyrażając całkowitą energię układu ( $E$ ) w formie sumy energii potencjalnej ( $U$ ) oraz kinetycznej ruchu translacyjnego ( $E_{trans}$ ) i rotacyjnego ( $E_{rot}$ ), sumę statystyczną przedstawić można w postaci iloczynu trzech czynników:

$$Q = \frac{1}{\sigma^N N! h^{6N}} \int e^{-\frac{E_{trans} + E_{rot} + U}{kT}} d\bar{q} d\bar{p} d\bar{\omega} d\bar{J} = Q_{trans} * Q_{rot} * Q_U \quad (4.5)$$

gdzie:

$$Q_{trans} = \frac{1}{h^{3N}} \int e^{-\frac{E_{trans}}{k_B T}} d\bar{p} = \frac{1}{\lambda_T^{3N}} \quad (4.6)$$

$$Q_{rot} = \frac{1}{h^{3N}} \int e^{-\frac{E_{rot}}{k_B T}} d\bar{J} = \frac{1}{\lambda_{rot}^N} \quad (4.7)$$

$$Q_U = \frac{1}{\sigma^N N!} \int e^{-\frac{U}{k_B T}} d\bar{q} d\bar{\omega} \quad (4.8)$$

Funkcja rozkładu gęstości  $\rho$  spełnia warunek (4.9):

$$\int \rho d\Omega = 1 \quad (4.9)$$

Uwzględniając, że wartość  $\int d\Omega$  wynosi  $\Omega$ , powyższe równanie przekształcić można do postaci:

$$\Omega = \frac{1}{\bar{\rho}} \Rightarrow \ln \Omega = -\ln \bar{\rho} \quad (4.10)$$

Następnie wiedząc, że średnia statystyczna dowolnej funkcji może zostać wyrażona w postaci:

$$\bar{f} = \int f \rho d\Omega \quad (4.11)$$

entropię układu wyrazić można w formie przedstawionej poniżej:

$$S = -k_B \int \rho \ln \rho d\Omega \quad (4.12)$$

Jak widać, entropię wyznaczyć można na podstawie znajomości średniej wartości logarytmu funkcji rozkładu gęstości prawdopodobieństwa. Zagadnienie to zostanie rozwinięte w dalszej części rozdziału.

#### 4.1.2. Funkcje rozkładu gęstości prawdopodobieństwa i wielocząstkowe funkcje korelacji

Gęstość prawdopodobieństwa znalezienia układu zawierającego  $N$  rozróżnialnych cząstek w pewnym mikroskopowym stanie, który opisany jest poprzez położenia, orientacje, pędy i momenty pędów znajdujących się w tym układzie cząstek, jest równa:

$$P = \frac{e^{-\frac{E}{kT}}}{\int e^{-\frac{E}{kT}} d\bar{q} d\bar{p} d\bar{\omega} d\bar{J}} \quad (4.13)$$

W sytuacji, gdy interesuje nas prawdopodobieństwo przyjęcia przez cząstki w układzie określonych położenia i orientacji, podczas gdy wartości ich pędów i momentów pędów są dowolne, równanie (4.13) należy scałkować po wszystkich pędach i momentach pędu. W efekcie uzyskuje się równanie w postaci:

$$P^{(N)} = \int \frac{e^{-\frac{(E_{trans}+E_{rot}+U)}{kT}}}{\int e^{-\frac{(E_{trans}+E_{rot}+U)}{kT}} d\bar{q} d\bar{p} d\bar{\omega} d\bar{J}} d\bar{p} d\bar{J} = \frac{e^{-\frac{U}{kT}}}{\int e^{-\frac{U}{kT}} d\bar{q} d\bar{\omega}} \quad (4.14)$$

W powyższym równaniu energia układu ( $E$ ) została przedstawiona w postaci sumy energii kinetycznej translacji ( $E_{trans}$ ) i rotacji ( $E_{rot}$ ) oraz energii potencjalnej ( $U$ ).

Jeśli cząstki w układzie są nierozróżnialne, to gęstość prawdopodobieństwa wyrażoną równaniem (4.14) należy pomnożyć przez czynnik  $N! \sigma^N$ , co prowadzi do równania:

$$f^{(N)} = \frac{\sigma^N N! e^{-\frac{U}{kT}}}{\int e^{-\frac{U}{kT}} d\bar{q} d\bar{\omega}} \quad (4.15)$$

gdzie:

- $N!$  – czynnik uwzględniający nierozróżnialność cząstek,
- $\sigma^N$  – liczba symetrii; liczba nierozróżnialnych orientacji cząstki.

Możemy następnie zapytać, jakie jest prawdopodobieństwo, że  $n$  spośród wszystkich  $N$  cząstek w układzie przyjmie określone położenia i orientacje, podczas gdy w przypadku pozostałych  $N - n$  położenia i orientacje będą dowolne. Jednocześnie, podobnie jak poprzednio zakładamy, że pędy i momenty pędów wszystkich cząstek są dowolne. Gęstość prawdopodobieństwa uzyskać można wówczas całkując równanie (4.14) po wszystkich położeniach i orientacjach  $N - n$  cząstek:

$$P^{(n)} = \int P_N d\bar{q}_{N-n} d\bar{\omega}_{N-n} = \int \frac{e^{-\frac{U}{kT}}}{\int e^{-\frac{U}{kT}} d\bar{q} d\bar{\omega}} d\bar{q}_{N-n} d\bar{\omega}_{N-n} \quad (4.16)$$

Dla  $n = 0$ , co odpowiada sytuacji, gdy położenia i orientacje wszystkich cząstek w układzie są dowolne, gęstość prawdopodobieństwa  $P^{(0)}$  będzie oczywiście równa jedności.

Podobnie jak poprzednio, rozważyć można sytuację, gdy cząstki w układzie są nierozróżnialne. Gęstość prawdopodobieństwa można w takim przypadku wyrazić za pomocą poniższego równania:

$$f^{(n)} = \frac{1}{\sigma^{N-n}(N-n)!} \int f_N d\bar{q}_{N-n} d\bar{\omega}_{N-n} \quad (4.17)$$

W układzie izotropowym, prawdopodobieństwo znalezienia pojedynczej cząstki nie zależy od jej położenia oraz orientacji. W związku z tym można zapisać:

$$\int f^{(1)} d\bar{q}_1 d\bar{\omega}_1 = f^{(1)} \int d\bar{q}_1 d\bar{\omega}_1 = f^{(1)} * V * \Omega \quad (4.18)$$

gdzie:

$$V = \int d\bar{q}_1 = \int_{z=0}^Z \int_{y=0}^Y \int_{x=0}^X dq_x dq_y dq_z \quad (4.19)$$

$$\Omega = \int d\bar{\omega}_1 = \int_{\alpha=0}^{\pi} \int_{\beta=0}^{2\pi} \int_{\gamma=0}^{2\pi} \sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma = 8\pi^2 \quad (4.20)$$

Korzystając z równania (4.18) oraz wiedząc, że funkcja  $f^{(n)}$  spełnia warunek normalizacji:  $\int f^{(n)} d\bar{q}_n d\bar{\omega}_n = \frac{N!}{(N-n)!} \sigma^n$ , można przedstawić funkcję  $f^{(1)}$  w następującej formie:

$$f^{(1)} = \frac{N\sigma}{V\Omega} = d \frac{\sigma}{\Omega} \quad (4.21)$$

gdzie symbolem  $d$  oznaczona została gęstość liczbowa cząstek w układzie.

Jednocząstkową funkcję gęstości prawdopodobieństwa można następnie zastosować w celu znalezienia postaci funkcji  $f^{(N)}$ . Prawdopodobieństwo przyjęcia przez wszystkie cząstki w układzie określonych położenia i orientacji przedstawić można w postaci iloczynu  $N$  funkcji  $f^{(1)}$  opisujących prawdopodobieństwo znalezienia poszczególnych cząstek w pewnych położeniach i orientacjach oraz dodatkowego czynnika zależnego od położenia i orientacji wszystkich cząstek w układzie.

$$f^{(N)} = f^{(1)}(\bar{q}_1, \bar{\omega}_1) * \dots * f^{(1)}(\bar{q}_N, \bar{\omega}_N) * g^{(N)}(\bar{q}, \bar{\omega}) = \left(d \frac{\sigma}{\Omega}\right)^N * g^{(N)}(\bar{q}, \bar{\omega}) \quad (4.22)$$

Czynnik  $g^{(N)}$  nazywany jest  $N$ -cząstkową funkcją korelacji. Funkcję tą wyrazić można w postaci iloczynu  $(N-1)$ -cząstkowych funkcji korelacji, reprezentujących wszystkie możliwe kombinacje oddziaływań  $N-1$  cząstek w układzie, oraz czynnika poprawkowego  $(\delta g^{(N)})$  opisującego oddziaływania  $N$ -cząstkowe. Kontynuując to rozumowanie, każdą



z  $(N - 1)$ -cząstkowych funkcji korelacji przedstawić można jako iloczyn  $(N - 2)$ -cząstkowych funkcji korelacji oraz poprawki uwzględniającej oddziaływania  $(N - 1)$ -cząstkowe. Postępowanie takie pozwala na przedstawienie funkcji  $g^{(N)}$  w postaci iloczynu dwucząstkowych funkcji korelacji oraz odpowiednich czynników poprawkowych, które uwzględniają oddziaływania wyższych rzędów (trój-, cztero-, pięcio-, ...,  $N$ -cząstkowych).

W jednorodnym i izotropowym układzie wszystkie dwucząstkowe funkcje korelacji oraz czynniki poprawkowe uwzględniające oddziaływania wielocząstkowe są jednakowe. W takim przypadku równanie opisujące  $N$ -cząstkową funkcję korelacji przyjmuje następującą postać:

$$g^{(N)}(\bar{q}_1 \dots \bar{q}_N) = [g^{(2)}]_{(2)}^{(N)} * [\delta g^{(3)}]_{(3)}^{(N)} * [\delta g^{(4)}]_{(4)}^{(N)} * \dots * [\delta g^{(N)}] \quad (4.23)$$

Równanie przedstawione powyżej można następnie podstawić do równania (4.22) oraz obustronnie zlogarytmować, uzyskując:

$$\ln f^{(N)}(\bar{q}_1 \dots \bar{q}_N) = N \ln f^{(1)} + \binom{N}{2} \ln g^{(2)} + \binom{N}{3} \ln \delta g^{(3)} + \dots + \ln \delta g^{(N)} \quad (4.24)$$

Powyzszą zależność wykorzystać można następnie w równaniu (4.12) opisującym entropię statystyczną układu, co umożliwi przedstawienie jej w formie sumy wkładów zależnych od wielocząstkowych funkcji korelacji.

### 4.1.3. Parametry uporządkowania oparte na koncepcji dwucząstkowych funkcji korelacji

Korzystając z wyprowadzonych dotychczas zależności entropię układu, wyrażoną za pomocą równania (4.12), przekształcić można do postaci:

$$\begin{aligned} S &= -k \int \rho \ln \rho d\Omega = \\ &= \frac{-k}{\sigma^N N! h^{6N}} \int e^{-\frac{E_{trans}}{kT}} \cdot e^{-\frac{E_{rot}}{kT}} \cdot \lambda_{rot}^N \cdot \lambda_{rot}^N \cdot f^{(N)} \cdot \\ &\quad \cdot \ln \left( e^{-\frac{E_{trans}}{kT}} \cdot e^{-\frac{E_{rot}}{kT}} \cdot \lambda_{trans}^{3N} \cdot \lambda_{rot}^N \cdot f^{(N)} \right) d\bar{q} d\bar{\omega} d\bar{p} d\bar{J} = \\ &= \frac{-k \lambda_{trans}^{3N} \lambda_{rot}^N}{\sigma^N N! h^{3N}} \int e^{-\frac{E_{trans}}{kT}} \cdot e^{-\frac{E_{rot}}{kT}} \cdot f^{(N)} \cdot \\ &\quad \cdot \left[ \ln \left( \lambda_{trans}^{3N} \lambda_{rot}^N \right) - \frac{E_{trans}}{kT} - \frac{E_{rot}}{kT} + \ln f^{(N)} \right] d\bar{q} d\bar{\omega} d\bar{p} d\bar{J} \end{aligned} \quad (4.25)$$

Po scałkowaniu oraz uwzględnieniu, że  $\int f^{(N)} d\bar{q} d\bar{\omega} = N! \sigma^n$  i zależności (4.22) i (4.23) uzyskuje się równanie w postaci:

$$S = \left[ 3kN - kN \ln \left( \lambda_{trans}^3 \lambda_{rot} d \frac{\sigma}{\Omega} \right) \right] - \frac{k}{\Omega^2 2!} d^2 \int g^{(2)} \ln g^{(2)} d\bar{q}_2 d\bar{\omega}_2 + \quad (4.26)$$

$$- \frac{k}{\Omega^3 3!} d^3 \int g^{(3)} \ln \delta g^{(3)} d\bar{q}_3 d\bar{\omega}_3 - \dots - \frac{k}{\Omega^N N!} d^N \int g^{(N)} \ln \delta g^{(N)} d\bar{q} d\bar{\omega}$$

Powyższe równanie pokazuje, że całkowitą entropię układu przedstawić można w postaci sumy wkładów zależnych od wielocząstkowych funkcji korelacji oraz wkładu od nich niezależnego. Metoda ta zaproponowana została po raz pierwszy przez Green'a<sup>145</sup> i była później stosowana przez wielu autorów.

Należy zwrócić uwagę, że część równania (4.26) niezależna od wielocząstkowych funkcji korelacji nie jest równa entropii gazu doskonałego. W przypadku gazu doskonałego całkowity wkład do entropii pochodzący od korelacji wielocząstkowych wynosi  $k_B N$  ( $k_B$  na każdą cząstkę gazu). Oznacza to, iż każdy z członów zależnych od wielocząstkowych funkcji korelacji w równaniu (4.26) zawiera w sobie część odpowiadającą wkładowi do entropii gazu doskonałego. Jeśli wkłady te zostaną odjęte od poszczególnych składników sumy zależnych od wielocząstkowych funkcji korelacji oraz oznaczone – wraz ze składnikiem równania (4.26) niezależnym od wielocząstkowych funkcji korelacji – symbolem  $s^{id}$ , to całkowitą entropię układu można będzie przedstawić w postaci sumy entropii gazu doskonałego oraz entropii nadmiarowej  $s^{ex}$ :

$$S = s^{id} + s^{ex} = s^{id} + s^{(2)} + s^{(3)} + \dots + s^{(N)} \quad (4.27)$$

Jak pokazano powyżej, entropię nadmiarową można z kolei rozbić na sumę wkładów do entropii pochodzących od korelacji dwu-, trój-, cztero-, pięcio-, ...,  $N$ -cząstkowych. W porównaniu do równania (4.26) składniki sumy –  $s^{(n)}$  – zostały pomniejszone o wartości odpowiadające poszczególnym wkładom do entropii gazu doskonałego, zależnym od wielocząstkowych funkcji korelacji.

Zastosowanie pełnego wyrażenia na entropię w badaniach jest utrudnione na skutek jego złożoności obliczeniowej. W praktyce stosowane jest tzw. przybliżenie dwucząstkowe<sup>146,147</sup>, w którym wkłady pochodzące od oddziaływań wyższych rzędów (począwszy od trójcząstkowych) są pomijane. Trudno jest oszacować błąd popełniany na skutek stosowania w obliczeniach przybliżenia dwucząstkowego, uważa się jednak<sup>148</sup>, że wkład dwucząstkowy stanowi nawet do 85-90% całkowitej entropii nadmiarowej. Z tego też powodu wkład dwucząstkowy stanowi przydatne narzędzie wykorzystywane do opisu struktury wody.

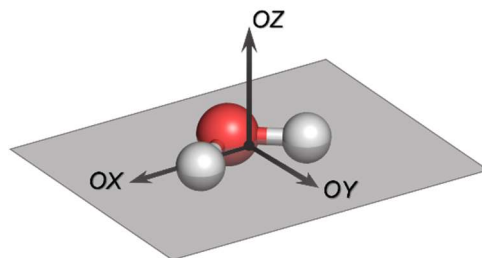
#### 4.1.4. Rozkład dwucząstkowego wkładu do entropii na część translacyjną, konfiguracyjną i orientacyjną

Jak pokazano wcześniej, wkład do entropii pochodzący od oddziaływań dwucząstkowych wyznacza się z wykorzystaniem dwucząstkowych funkcji korelacji  $g^{(2)}$ . Wartości tych funkcji zależą od sześciu współrzędnych położenia ( $q_1 = (q_{1x}, q_{1y}, q_{1z})$ ,  $q_2 = (q_{2x}, q_{2y}, q_{2z})$ ) i sześciu kątów opisujących orientację cząstek ( $\omega_1 = (\alpha_1, \beta_1, \gamma_1)$ ,  $\omega_2 = (\alpha_2, \beta_2, \gamma_2)$ ):

$$s^{(2)} = -\frac{k_B}{\Omega^2 2!} \frac{N^2}{V^2} \int [g^{(2)} \ln g^{(2)} - g^{(2)} + 1] dq_1 dq_2 d\omega_1 d\omega_2 \quad (4.28)$$

Jeśli rozważaniom poddawana jest jednorodna, izotropowa ciecz, funkcję  $g^{(2)}(q_1, q_2, \omega_1, \omega_2)$  zastąpić można funkcją  $g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$ , gdzie  $r$  oznacza odległość między cząstkami,  $\varphi$  oraz  $\theta$  są współrzędnymi kątowymi, które niosą informację o wzajemnym położeniu środków mas cząsteczek w sferycznym układzie współrzędnych, natomiast  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  opisują orientację cząsteczki otaczającej względem cząstki centralnej.

Aby wyznaczyć współrzędne pary cząsteczek wody w sferycznym układzie współrzędnych, cząsteczkom tym przypisuje się wewnętrzny układ współrzędnych. Początek tego układu znajduje się w środku masy danej cząsteczki, kierunki osi są natomiast zbieżne z kierunkami głównych osi tensora bezwładności – osiom OX i OZ przypisuje się odpowiednio wartości najmniejszą i największą głównego momentu bezwładności cząsteczki wody (Rys. 4.1).



Rys. 4.1. Schematyczny rysunek obrazujący położenie wewnętrznego układu współrzędnych względem cząsteczki wody

Dwucząstkową funkcję korelacji  $g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma)$  można przedstawić w postaci iloczynu trzech członów:

$$g^{(2)}(r, \varphi, \theta, \alpha, \beta, \gamma) = g_{tra}^{(2)}(r) * g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta | r) * g_{ort}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma | r, \varphi, \theta) \quad (4.29)$$

gdzie  $g_{tra}^{(2)}(r)$ ,  $g_{conf}^{(2)}(\varphi, \theta | r)$ ,  $g_{ort}^{(2)}(\alpha, \beta, \gamma | r, \varphi, \theta)$  stanowią odpowiednio czynniki translacyjny, konfiguracyjny i orientacyjny dwucząstkowej funkcji korelacji. Czynniki translacyjny odpowiada funkcji rozkładu radialnego, jest więc miarą prawdopodobieństwa znalezienia cząsteczki w pewnej odległości ( $r$ ) od cząsteczki centralnej, w porównaniu do sytuacji, gdy nie ma korelacji między

położeniami cząsteczek. Czynniki konfiguracyjny opisuje stosunek prawdopodobieństwa znalezienia cząsteczki w kierunku wyznaczonym przez kąty  $\varphi$  oraz  $\theta$  w analizowanym układzie do prawdopodobieństwa znalezienia cząstki znajdującej się w tym samym obszarze, ale gdy brak jest korelacji między położeniami cząsteczek opisywanymi za pomocą kątów  $\varphi$  oraz  $\theta$ . Ostatni z czynników, czynnik orientacyjny, odpowiada stosunkowi prawdopodobieństwa znalezienia cząsteczki charakteryzującej się określoną orientacją względem cząsteczki centralnej do prawdopodobieństwa znalezienia cząstki o tej samej orientacji, w sytuacji, gdy wszystkie orientacje są jednakowo prawdopodobne.

Korzystając z zależności wiążącej dwucząstkowy wkład do entropii z dwucząstkowymi funkcjami korelacji można wyznaczyć równania opisujące wkłady translacyjny, konfiguracyjny oraz orientacyjny do dwucząstkowego wkładu do entropii nadmiarowej<sup>149</sup>:

$$s_{tra}^{(2)} = -\frac{k_B N^2}{2! V} \int \left[ g_{tra}^{(2)}(r) \ln \left( g_{tra}^{(2)}(r) - g_{tra}^{(2)}(r) + 1 \right) \right] 4\pi r^2 dr \quad (4.30)$$

$$s_{conf}^{(2)} = -\frac{k_B N^2}{2! V} \int \left[ g_{tra}^{(2)}(r) * g_{conf}^{(2)}(v|r) \ln \left( g_{conf}^{(2)}(v|r) \right) \right] r^2 dr dv \quad (4.31)$$

$$s_{ort}^{(2)} = -\frac{k_B N^2}{2! \Omega V} \int \left[ g_{tra}^{(2)}(r) * g_{conf}^{(2)}(v|r) * g_{ort}^{(2)}(\omega|r, v) \ln \left( g_{ort}^{(2)}(\omega|r, v) \right) \right] r^2 dr dv d\omega \quad (4.32)$$

gdzie  $v = (\varphi, \theta)$ ,  $\omega = (\alpha, \beta, \gamma)$ ,  $dv = \sin\theta d\varphi d\theta$ ,  $d\omega = \sin\alpha d\alpha d\beta d\gamma$ .

Zdefiniowane powyżej zależności posłużyć mogą do zdefiniowania parametrów charakteryzujących strukturę wody.

Wartość dwucząstkowego wkładu do nadmiarowej entropii ( $s^{(2)}$ ) zmienia się najszybciej dla niewielkich odległości od cząstki centralnej ( $r$ ). Po przekroczeniu pewnej odległości granicznej ( $r_{cut}$ ) uporządkowanie strukturalne cieczy zanika, a w związku z tym można założyć, że wartości  $s^{(2)}$  nie ulegają dalszym zmianom. W przypadku ciekłej wody graniczną odległość stanowi  $r_{cut} = 0,58 \text{ nm}$ <sup>149</sup>, co odpowiada zasięgowi drugiej warstwy solwatacyjnej cząsteczki centralnej.

W przeprowadzonych w ramach tej pracy obliczeniach, wartość dwucząstkowego wkładu do entropii nadmiarowej wyznaczana była z uwzględnieniem cząsteczek znajdujących się w odległości do 0,58 nm od cząsteczki centralnej. Uzyskane w ten sposób wielkości są w dalszej części pracy określane mianem parametrów uporządkowania i oznaczane symbolami  $s_{tra}$ ,  $s_{conf}$  i  $s_{ort}$ .

Jak pokazano<sup>149</sup>, parametry charakteryzujące uporządkowanie konfiguracyjne i orientacyjne ciekłej wody symulowanej w różnych temperaturach są od siebie liniowo zależne. W związku z tym zaproponowano stosowanie parametru  $s_{conf}$  jako uproszczonej miary całkowitego uporządkowania strukturalnego (konfiguracyjnego i orientacyjnego)<sup>150</sup>. Uzyskane dotychczas rezultaty pokazały przydatność tak zdefiniowanych parametrów w opisie struktury wody solwatacyjnej białek przeciwdziałających zamarzaniu<sup>69,142</sup>.

#### 4.1.5. Koncepcja map uporządkowania

Wygodnym narzędziem pozwalającym na obserwację zmian strukturalnych zachodzących w cieczach na skutek działania różnych czynników są mapy uporządkowania. Pozwalają one przedstawić uporządkowanie cząstek w układzie w postaci punktu na płaszczyźnie – jedna ze współrzędnych opisuje uporządkowanie translacyjne (zależne od odległości między cząstkami), a druga uporządkowanie orientacyjne (charakteryzujące wzajemną orientację cząstek). W literaturze można znaleźć przykłady, w których do konstrukcji map uporządkowania wykorzystywane były różne parametry uporządkowania<sup>151–154</sup>.

W niniejszej pracy mapy uporządkowania sporządzone były z wykorzystaniem parametrów uporządkowania opartych na opisanym powyżej podziale dwucząstkowego wkładu do entropii na dwie składowe: translacyjną i konfiguracyjną ( $s_{tra}$  i  $s_{conf}$ ). Metoda ta była już wcześniej z powodzeniem stosowana do badania uporządkowania wody solwatacyjnej białek<sup>69,142</sup>.

#### 4.1.6. Funkcja rozkładu radialnego

Funkcja rozkładu radialnego opisuje względne prawdopodobieństwo znalezienia cząstki w odległości  $r$  od cząstki centralnej, w odniesieniu do sytuacji, gdy brak jest korelacji między położeniami cząstek w układzie. Jak pokazano wcześniej, funkcja ta wywodzi się z koncepcji dwucząstkowych wkładów do entropii i stanowi część dwucząstkowej funkcji korelacji zależną jedynie od odległości ( $g_{tra}^{(2)}(r)$ ).

Funkcję rozkładu radialnego wyznaczyć można korzystając z następującej zależności:

$$g(r) = \frac{1}{\rho} \cdot \frac{dN(r)}{4\pi r^2 dr} \quad (4.33)$$

gdzie symbolem  $\rho$  oznaczona została gęstość liczbowa cząstek w układzie, natomiast  $dN(r)$  jest liczbą cząstek znajdujących się w obszarze ograniczonym dwoma sferami zlokalizowanymi w odległościach  $r$  oraz  $r + dr$  od punktu odniesienia (cząstki centralnej).

Z punktu widzenia badań nad strukturą wody solwatacyjnej białka, czyli układu wysoce anizotropowego, bardziej przydatnym narzędziem będzie zmodyfikowana postać zdefiniowanej powyżej funkcji<sup>142</sup>. Zamiast pytać o liczbę cząsteczek wody znajdujących się w pewnym przedziale odległości od punktu odniesienia, można zapytać o liczbę cząsteczek znajdujących się w zadanym przedziale odległości od pewnej powierzchni (np. cząsteczki białka lub kryształu lodu). W praktyce, zliczana była liczba cząsteczek wody zawartych w warstwie solwatacyjnej, których odległość od najbliższego atomu leżącego na rozważanej powierzchni zawierała się w przedziale od  $r$  do  $r + dr$ . Stosując takie postępowanie, wyznaczone zostały zmiany liczby cząsteczek wody w funkcji odległości od powierzchni, zarówno dla rzeczywistej warstwy solwatacyjnej ( $n_{solv}(r)$ ), jak

również dla warstwy solwatacyjnej o tym samym kształcie i rozmiarze, ale wypełnionej wodą niezaburzoną obecnością białka i lodu ( $n_{bulk}(r)$ , szczegóły dotyczące procedury przygotowania takiej warstwy solwatacyjnej opisane zostały w Rozdziale 4.3). Następnie, zdefiniowana została funkcja rozkładu gęstości w postaci:

$$g(r) = \frac{n_{solv}(r)}{n_{bulk}(r)} \quad (4.34)$$

## 4.2. Parametry empiryczne charakteryzujące strukturę wody

### 4.2.1. Właściwości wiązań wodorowych oraz zdefiniowane na ich podstawie parametry strukturalne

Cząsteczki wody posiadają zdolność do wiązania się ze sobą, przy czym wiązanie to charakteryzuje się silnymi właściwościami kierunkowymi. Jest to cecha, która odróżnia wodę od innych, prostych cieczy, takich jak np. stopione metale i jednocześnie odpowiada za wiele charakterystycznych właściwości wody. W dalszej części niniejszego rozdziału omówione zostaną zagadnienia związane z definicją wiązania wodorowego, a także sposoby wykorzystania tej definicji w celu scharakteryzowania struktury wody.

#### A. Definicja wiązania wodorowego

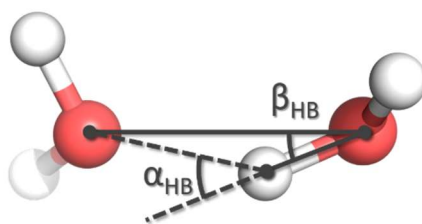
W najbardziej ogólnym ujęciu wiązanie wodorowe zdefiniować można jako przyciągające oddziaływanie występujące między atomem wodoru połączonym wiązaniem kowalencyjnym z atomem o wyższej elektroujemności oraz atomem (będącym częścią tej samej bądź innej cząsteczki) charakteryzującym się wysoką gęstością elektronową<sup>155</sup>. Istnienie takiego oddziaływania warunkowane jest nie tylko charakterem oddziałujących cząsteczek (lub ich fragmentów), ale również ich wzajemnym położeniem i orientacją.

Kryteria stosowane w celu stwierdzenia istnienia wiązania wodorowego podzielić można na dwie kategorie: kryteria energetyczne oraz kryteria geometryczne. Definicje wiązania wodorowego konstruowane są na ich podstawie poprzez wprowadzenie pewnych wartości granicznych oraz przyjęcie założenia, że przekroczenie tych wartości skutkuje zerwaniem wiązania wodorowego. Poniżej zaprezentowane zostały najczęściej spotykane w literaturze definicje wiązania wodorowego, stosowane w odniesieniu do wody.

Zgodnie z energetyczną definicją wiązania wodorowego, wiązanie tworzy się między cząsteczkami, jeśli energia ich wzajemnego oddziaływania jest mniejsza niż pewna wartość graniczna  $E_{cut}$ <sup>130</sup>. Wartość graniczną wyznacza się w oparciu o rozkład energii oddziaływań par cząsteczek danego typu. Rozkład ten charakteryzuje się obecnością dwóch maksimów, z których

jedno zlokalizowane jest w okolicy zera i odpowiada słabym oddziaływaniom przyciągającym i odpychającym, natomiast drugie zawiera w sobie oddziaływania o niższej energii, w których zawierają się m.in. wiązania wodorowe. Maksyma te oddzielone są od siebie minimum, którego położenie wyznacza wartość graniczną  $E_{cut}$ .

Definicje geometryczne wiązania wodorowego oparte są na kryteriach odległościowych lub kryteriach kąto-odległościowych. W pierwszym z tych przypadków pod uwagę brana może być odległość tlen-tlen lub tlen-wodór sąsiadujących ze sobą cząsteczek wody<sup>129,156</sup>. Wartość graniczną tych dwóch wielkości wyznacza położenie minimum funkcji rozkładu radialnego odpowiednio tlen-tlen lub tlen-wodór. Tą prostą definicję można rozszerzyć wprowadzając dodatkowy warunek, określający graniczną wielkość kąta opisującego wzajemną orientację sąsiadujących ze sobą cząsteczek wody, dla której zakłada się istnienie wiązania wodorowego<sup>157,158</sup>. Dwa kąty stosowane w tym celu najczęściej to kąty  $\alpha_{HB}$  i  $\beta_{HB}$  – ich definicje, w sposób graficzny, przedstawione zostały na Rys. 4.2. W porównaniu do definicji opartych jedynie na odległości między atomami sąsiadujących ze sobą cząsteczek wody, definicje typu odległość-kąt uwzględniają kierunkowość wiązań wodorowych.

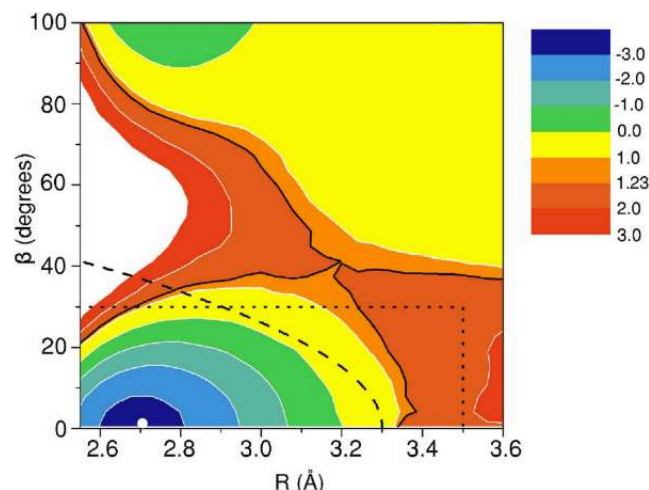


Rys. 4.2. Schematyczny rysunek przedstawiający definicje kątów  $\alpha_{HB}$  i  $\beta_{HB}$

Zmodyfikowana wersja geometrycznej definicji wiązania wodorowego zaproponowana została przez Werneta i in.<sup>159</sup> W celu stwierdzenia obecności wiązania wodorowego autorzy zastosowali funkcję wiążącą maksymalną odległość dzielącą atomy tlenu cząsteczek wody ( $r_{OO}$ ) z wielkością kąta  $\beta_{HB}$  – postać tej funkcji przedstawiona została poniżej:

$$r_{OO} \leq -0,000044\beta_{HB}^2 + 0,33 \text{ [nm]}^{159} \quad (4.35)$$

Przewagę przestawionej powyżej definicji wiązania wodorowego nad standardową definicją typu odległość-kąt zaobserwować można analizując wykres zależności potencjału średniej siły dla par cząsteczek wody od odległości  $r_{OO}$  oraz wielkości kąta  $\beta_{HB}$  (Rys. 4.3)<sup>129</sup>.



Rys. 4.3. Wykres konturowy funkcji  $W(R, \beta) = -k_B T \ln g(R, \beta)$  (w jednostkach  $k_B T$ ), gdzie  $g(R, \beta)$  jest stosunkiem liczby atomów tlenu zlokalizowanych w odległości od  $R$  do  $R + dR$  od atomu tlenu centralnej cząsteczki wody przy założeniu, że wielkość kąta  $\beta$  mieści się w zakresie od  $\beta$  do  $\beta + d\beta$  oraz liczby atomów tlenu, które byłyby obecne w danym przedziale, gdyby cząsteczki wody ze sobą nie oddziaływały. Linia kropkową zaznaczony został zakres istnienia wiązania wodorowego określony za pomocą definicji podanej przez Luzara i Chandlera<sup>157</sup>, natomiast linią przerywaną zakres istnienia wiązania wodorowego opisany z wykorzystaniem definicji zaproponowanej przez Werneta i in.<sup>159</sup> (w temperaturze 300 K, dla wody SPC/E). Białym punktem oznaczone zostało położenie globalnego minimum funkcji  $W(R, \beta)$ . Czarna linia, odpowiadająca wartościom równym  $1,23 k_B T$ , przechodzi przez punkty siodłowe i została wskazana przez Kumara i in.<sup>129</sup> jako dobra granica zakresu istnienia wiązania wodorowego w wodzie – wykres został zaczerpnięty właśnie z tej pracy

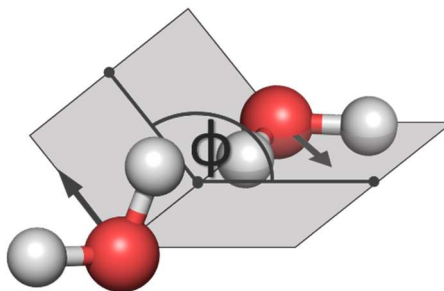
Na wykresie czarną ciągłą linią biegnącą wokół minimum zaznaczono granicę między stanem związanym i niezwiązanym pary cząsteczek wody, wyznaczoną z zastosowaniem potencjału średniej siły. Z kolei liniami kropkową i przerywaną zaznaczono granice wyznaczone odpowiednio na podstawie standardowej definicji typu odległość-kąt oraz definicji zaproponowanej przez Werneta i in. Jak widać, lepsze dopasowanie do zakresu istnienia wiązania wodorowego wyznaczonego na podstawie potencjału średniej siły zapewnia definicja Werneta i in. – z tego też względu definicją stosowaną w ramach tej pracy jest ta właśnie definicja wiązania wodorowego. Ponadto zdecydowałam się również na rozszerzenie geometrycznej definicji wiązania wodorowego o dodatkowy warunek, który zapewnia, że całkowita energia oddziaływania (suma energii oddziaływań elektrostatycznych i Lennarda – Jonesa) między dwiema cząsteczkami wody jest ujemna.

## B. Geometria układu dwóch cząsteczek wody połączonych wiązaniem wodorowym

Dwie z wielkości stosowanych do opisu geometrii układu składającego się z dwóch, połączonych wiązaniem wodorowym, cząsteczek wody –  $\alpha_{HB}$  i  $\beta_{HB}$  – zostały wspomniane powyżej, przy okazji omawiania definicji wiązania wodorowego (Rys. 4.2). Innym narzędziem pozwalającym na dokonanie analizy wzajemnej orientacji cząsteczek wody związanych wiązaniem



wodorowym jest kąt dwuścienny  $\phi_{HB}$ . Jest to kąt zawarty między dwiema przecinającymi się płaszczyznami, z których każda zawiera dwa wektory:  $\overline{OO}$  (wektor łączący atomy tlenu dwóch cząsteczek wody związanych wiązaniem wodorowym) oraz  $\overline{OD}$  (który leży na dwuściennej kąta H-O-H cząsteczki wody). Definicja kąta  $\phi_{HB}$  przedstawiona została w sposób graficzny na Rys. 4.4.

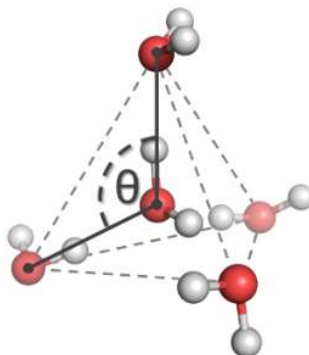


Rys. 4.4. Schematyczny rysunek przedstawiający definicję kąta dwuściennego  $\phi_{HB}$

### C. Inne parametry opisujące strukturę wody i zdefiniowane z użyciem koncepcji wiązania wodorowego

Stosowanie parametrów opisujących geometrię pojedynczych wiązań wodorowych nie jest wystarczające dla scharakteryzowania struktury wody. Jak wspomniałam wcześniej, wiązania wodorowe charakteryzują się silną kierunkowością i to właśnie przestrzenne rozmieszczenie tych wiązań wokół cząsteczek wody stanowić będzie punkt wyjścia do analizy struktury wody.

W związku z powyższym celowe wydaje się wprowadzenie parametrów odzwierciedlających przestrzenne rozmieszczenie wiązań wodorowych wokół cząsteczek. Jednym z takich parametrów jest rozkład kątów  $\theta$ . Kąt  $\theta$  zdefiniowany jest jako kąt zawarty między wektorami łączącymi atom tlenu cząsteczki centralnej z atomami tlenu sąsiednich (związanymi wiązaniami wodorowymi z cząsteczką centralną) cząsteczek wody (Rys. 4.5).



Rys. 4.5. Schematyczny rysunek przedstawiający definicję kąta  $\theta$

W wodzie charakteryzującej się wysokim stopniem uporządkowania, populacja kątów  $\theta$  o wielkości bliskiej  $109^\circ$  jest większa niż w przypadku wody o mniej uporządkowanej strukturze.

Innym parametrem uporządkowania wykorzystywanym do opisu struktury wody jest parametr  $\zeta$ . W tym przypadku analizie poddawana jest odległość między pierwszą i drugą warstwą solwatacyjną poszczególnych cząsteczek wody w analizowanym obszarze przestrzeni. Parametr  $\zeta$  zaproponowany został przez Russo i Tanakę<sup>160</sup> jako narzędzie pozwalające na oszacowanie zawartości w wodzie wysokoobjętościowych, uporządkowanych struktur, których istnienie (w otoczeniu występujących w znacznym nadmiarze nieuporządkowanych cząsteczek wody) zostało zaproponowane przez tych samych autorów.

Zgodnie z definicją, parametr uporządkowania  $\zeta$  wyznacza się poprzez znalezienie różnicy między odległością cząsteczki wody najdalej położonej od cząsteczki centralnej i jednocześnie związanej z nią wiązaniem wodorowym oraz odległością cząsteczki wody będącej najbliższym niezwiązanym wiązaniem wodorowym sąsiadem cząsteczki centralnej od cząsteczki centralnej. W wodzie o uporządkowanej strukturze odległość między pierwszą i drugą warstwą solwatacyjną jest większa niż w wodzie charakteryzującej się mniejszym uporządkowaniem. Na podstawie rozkładu parametru  $\zeta$  można więc wnioskować o stopniu uporządkowania wody.

#### 4.2.2. Pozostałe parametry wykorzystywane do opisu struktury wody

##### A. Wskaźnik lokalnej struktury (LSI)

Podobnie jak funkcja rozkładu gęstości, wskaźnik lokalnej struktury<sup>161,162</sup> (LSI, ang. *local structure index*) jest miarą niejednorodności rozkładu cząstek wokół cząstki centralnej. Do opisu lokalnej struktury wody wykorzystywane są w tym przypadku odległości między centralną cząsteczką wody i jej najbliższymi sąsiadami (a dokładniej między atomami tlenu tych cząsteczek). Definicję parametru LSI przedstawia wzór (4.36):

$$LSI = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\Delta(j) - \bar{\Delta})^2 \quad (4.36)$$

gdzie:

- $n$  – liczba cząsteczek wody znajdujących się w odległości do 0,37 nm od cząsteczki centralnej; cząsteczki te uporządkowane są według wzrastającej odległości od cząsteczki centralnej ( $r_1 < r_2 < r_3 < \dots < r_j < \dots < r_n < r_{n+1}$ ),
- $r_j$  – odległość między cząsteczką centralną i j-tą cząsteczką wody sąsiadującą z cząsteczką centralną,

$\Delta(j)$  – różnica między odległościami dwóch kolejnych cząsteczek wody od cząsteczki centralnej;  $\Delta(j) = r_{j+1} - r_j$ ,

$\bar{\Delta}$  – średnia różnica między odległościami dwóch kolejnych cząsteczek wody od cząsteczki centralnej;  $\bar{\Delta} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \Delta(j)$ .

Małe wartości wskaźnika lokalnej struktury wskazują na równomierne (pod względem odległości od cząsteczki centralnej) rozmieszczenie cząsteczek wody wokół cząsteczki centralnej. Pojawianie się w wodzie struktur o stosunkowo dużym stopniu uporządkowania (wysokiej tetradryczności) prowadzi do wyraźnego rozdzielania pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej centralnej cząsteczki wody, co prowadzi do zwiększania się wartości parametru LSI.

### B. Średnia energia oddziaływania cząsteczek wody z najbliższym otoczeniem

Jednym ze sposobów na monitorowanie zmian strukturalnych zachodzących w wodzie jest śledzenie zmian średniej energii oddziaływania cząsteczek wody z ich najbliższym otoczeniem. W ramach prowadzonych badań, energia ta została oszacowana na podstawie całkowitej energii oddziaływań (sumy oddziaływań elektrostatycznych i Lennarda-Jonesa) poszczególnych cząsteczek wody znajdujących się w analizowanym obszarze przestrzeni z atomami, które zlokalizowane były w odległości do 1,0 nm od tych cząsteczek. Energia oddziaływań wyznaczona dla cząsteczek znajdujących się w warstwie solwatacyjnej białka rozdzielona została na dwie składowe – energię oddziaływań cząsteczek wody z otaczającą wodą ( $E_{WW}$ ) oraz energię oddziaływań cząsteczek wody z powierzchnią białka ( $E_{PW}$ ). W sposób analogiczny przeprowadzone zostały również obliczenia dla wody solwatacyjnej kryształu lodu, z tą różnicą, że na całkowitą energię oddziaływań składały się w tym przypadku oddziaływań woda-woda ( $E_{WW}$ ) oraz woda-lód ( $E_{IW}$ ). Znalezione wielkości, odpowiadające poszczególnym cząsteczkom wody, posłużyły następnie do wyznaczenia odpowiednich wartości średnich.

### C. Średnia entropia cząsteczki wody

Jak wspomniałam wcześniej, wyznaczenie entropii układu w sposób ścisły jest bardzo kosztowne obliczeniowo. Celowym wydaje się więc poszukiwanie takich metod, które umożliwią szacowanie entropii w sposób uproszczony. Jedno z podejść, które opracowane zostało z myślą o wyznaczeniu entropii cieczy, zaproponowane zostało przez Lin i in.<sup>163-165</sup> – metoda ta wykorzystana została w badaniach prowadzonych w ramach tej pracy. Poniżej zaprezentowane zostały jej główne założenia.

Na gruncie termodynamiki statystycznej, entropię układu wyrazić można z wykorzystaniem sumy statystycznej ( $Q$ ), jako:

$$S = k_B \ln Q + k_B T \frac{\partial \ln Q}{\partial T} \quad (4.37)$$

W ramach przybliżenia harmonicznego, mody normalne drgań w układzie opisane mogą zostać za pomocą zbioru  $3N$  oscylatorów harmonicznym, co w konsekwencji pozwala na wyrażenie sumy statystycznej  $Q$  w postaci sum statystycznych  $q_i$ , odpowiadających poszczególnym modom normalnym. Zakładając, że wszystkie drgania w układzie są niezależnymi drganiami harmonicznymi, sumę statystyczną wyznaczyć można na podstawie zależności (4.38):

$$\ln Q = \int_0^{\infty} DoS(v) W(v) dv \quad (4.38)$$

gdzie  $DoS(v)$  oznacza funkcję gęstości stanów (ang. *density of states function*), natomiast  $W(v)$  jest odpowiednią funkcją ważącą.

Metoda wyznaczania entropii cieczy zaproponowana przez Lina i in. oparta została na obserwacji, że funkcję gęstości stanów dla fazy ciekłej uzyskać można w wyniku złożenia funkcji odpowiadających stanom stałemu i gazowemu:

$$DoS_{ciecz}(v) = DoS_{gaz}(v) + DoS_{c.stałe}(v) \quad (4.39)$$

Model ten autorzy nazwali termodynamicznym modelem dwufazowym (ang. *two-phase thermodynamic model*).

Funkcje gęstości stanów wyznaczyć można na podstawie funkcji autokorelacji prędkości ( $C(t)$ ):

$$DOS(v) = \frac{2}{k_B T} \lim_{\tau \rightarrow \infty} \int_{-\tau}^{\tau} C(t) e^{-ivt} dt \quad (4.40)$$

W przypadku cieczy, których cząsteczki składają się z wielu atomów, całkowitą funkcję gęstości stanów można rozłożyć na sumę wkładów translacyjnego ( $DoS_{tra}(v)$ ), rotacyjnego ( $DoS_{rot}(v)$ ) oraz związanego z wewnętrznymi drganiami cząsteczek ( $DoS_{vib}(v)$ ). Wkład translacyjny wyznaczany jest na podstawie prędkości środków mas wszystkich cząsteczek w układzie, natomiast wkład rotacyjny – na podstawie ich prędkości kątowych. Wkłady te wyznaczane są na podstawie zależności (4.40) i odpowiednich funkcji autokorelacji prędkości:

$$C(t) = \frac{1}{N_t N_{mol}} \sum_{j=1}^{N_t} \sum_{i=1}^{N_{mol}} [v_i(t) \cdot v_i(0)] \quad (4.41)$$

W powyższym równaniu symbolami  $N_t$  i  $N_{mol}$  zostały oznaczone odpowiednio liczba zbadanych przedziałów czasowych o długości  $t$  oraz liczba cząsteczek wody z obszarze poddawanych analizie, natomiast wektory  $v_i(0)$  i  $v_i(t)$  są prędkościami cząsteczek w czasie  $t = 0$  oraz po upływie czasu  $t$ . W przypadku funkcji autokorelacji prędkości translacyjnej, wektory te opisują prędkości translacyjne środków mas cząsteczek, natomiast w przypadku funkcji autokorelacji prędkości rotacyjnej – prędkości rotacji kątowej wokół środków mas.

Scałkowanie funkcji  $DoS_{tra}(v)$  lub  $DoS_{rot}(v)$  dla częstotliwości w zakresie od 0 do  $\infty$  prowadzi do uzyskania całkowitej liczby stopni swobody układu –  $3N_{mol}$ . Jedną część tej wielkości –  $f \cdot 3N$  – pochodzi od wkładu opisywanego funkcją gęstości stanów dla ciała stałego ( $DoS_{c.stale}(v)$ ), podczas gdy druga część –  $(1 - f) \cdot 3N$  – od wkładu opisywanego funkcją gęstości stanów dla gazu ( $DoS_{gaz}(v)$ ). Czynnikiem  $f$  występujący w tych zależnościach został przez Lin i in.<sup>163–165</sup> nazwany czynnikiem płynności (ang. *fluidicity factor*).

Wkład  $DoS_{gaz}(v)$  do funkcji gęstości stanów (translacyjnej lub orientacyjnej), wyznaczyć można jako funkcję rozkładu gęstości płynu opisanego z wykorzystaniem modelu twardych sfer:

$$DoS_{gaz}(v) = \frac{DoS_0}{1 + \left(\frac{DoS_0 v}{12fN}\right)^2} \quad (4.42)$$

gdzie  $DoS_0$  jest równe wartości translacyjnej funkcji gęstości stanów dla  $v = 0$ .

Czynnikiem płynności  $f$  określa, jaka część funkcji gęstości stanów odpowiadającej fazie ciekłej opisana jest funkcjami  $DoS_{gaz}(v)$  oraz  $DoS_{c.stale}(v)$ . Z tego też względu, wielkość ta spełniać musi dwa warunki:

- 1) jeśli temperatura układu jest wysoka i/lub jego gęstość jest niska, układ powinien wykazywać cechy gazu opisanego modelem twardych kul – w takiej sytuacji czynnik  $f$  przyjmować powinien wartość 1;
- 2) jeśli gęstość układu jest wysoka, a układ znajduje się w stanie stałym, czynnik  $f$  przyjmować powinien wartość 0.

W związku z powyższym, Lin i in. zaproponowali, aby parametr  $f$  zdefiniować w oparciu o współczynniki dyfuzji:

$$f = \frac{D}{D_0} \quad (4.43)$$

gdzie  $D$  jest współczynnikiem dyfuzji układu, natomiast  $D_0$  – współczynnikiem dyfuzji wyznaczonym dla gazu pod zerowym ciśnieniem.

Stosując powyższe założenia, wyznaczyć można odpowiednie funkcje gęstości stanów, a następnie całkowitą entropię układu, jako sumę wkładów translacyjnego i rotacyjnego.

### 4.3. Anizotropia warstwy solwatacyjnej

Wiele z dostępnych parametrów wykorzystywanych do opisu struktury wody zawodzi, gdy rozważania dotyczą warstwy solwatacyjnej makromolekuł. Parametry te charakteryzują otoczenie poszczególnych cząsteczek wody, w którego skład wchodzi – w przypadku czystej wody

– sąsiadujące cząsteczki wody, rozmieszczone w, średnio rzecz biorąc, równomierny sposób wokół cząsteczki centralnej. Można sobie łatwo wyobrazić, że pozbawienie cząsteczek wody części ich warstw solwacyjnych (na przykład w wyniku obecności cząsteczki substancji rozpuszczonej o dużym rozmiarze) będzie prowadzić do zmiany wartości parametrów opisujących strukturę wody. Na przykład pojęcie tetraedryczności, które definiowane jest w odniesieniu do czterech, zlokalizowanych najbliżej cząsteczki centralnej, cząsteczek wody, traci swój sens dla cząsteczki wody znajdującej się w bezpośrednim sąsiedztwie powierzchni białka.

Zgodnie z przedstawioną powyżej argumentacją, analizując różnice (opisane za pomocą parametrów strukturalnych) między strukturą wody niezaburzonej obecnością substancji rozpuszczonych oraz strukturą wody solwacyjnej białka, uzyskuje się wynik, na który składają się dwa odmienne efekty. Pierwszy z nich to zmiana struktury wody wynikająca z obecności cząsteczki białka. Drugi natomiast jest efektem „geometrycznym”, pojawiającym się w wyniku przejścia od układu izotropowego, jakim jest czysta woda, do układu anizotropowego, w którym pewien obszar staje się niedostępny dla cząsteczek wody z powodu obecności cząsteczki białka. W związku z tym pojawia się pytanie, w jaki sposób można oddzielić od siebie te dwa efekty, aby uzyskać informację na temat wpływu obecności cząsteczki białka na strukturę sąsiadującej z nim wody.

Niezależnie od zastosowanej definicji, warstwa solwacyjna białka charakteryzuje się pewnym kształtem i rozmiarem. Jak zostało to już wspomniane wcześniej, niektóre z cząsteczek wody znajdujących się w tym obszarze sąsiadują bezpośrednio z powierzchnią białka, co sprawia, że ich otoczenie staje się anizotropowe. W efekcie, wielkości charakteryzujące strukturę wody przyjmować będą odmienne wartości niż w wodzie niezaburzonej obecnością białka, ale niekoniecznie będzie to wynik zmian strukturalnych, jakie zaszły w wodzie na skutek obecności cząsteczki białka.

Aby stwierdzić, w jakim stopniu efekt „wykluczonej objętości” (wywołany obecnością cząsteczki białka) odpowiada za zmiany wartości parametrów strukturalnych, rozważyć można fikcyjny układ, w którym cząsteczka białka nie posiada żadnego wpływu na strukturę sąsiadującej z nią wody. W takim przypadku woda solwacyjna posiadałaby strukturę czystej wody, a jedynym czynnikiem mającym wpływ na wartości parametrów uporządkowania byłaby asymetria środowiska. Dokonanie porównania między taką – fikcyjną – oraz rzeczywistą warstwą solwacyjną białka, pozwoliłoby więc na uchwycenie faktycznych zmian strukturalnych zachodzących w wodzie w obecności białka.

W praktyce przedstawione powyżej rozumowanie można zastosować w następujący sposób. Wokół cząsteczki białka (lub pewnej jej części) definiowany jest obszar stanowiący jej warstwę solwacyjną. Następnie, dla wszystkich cząsteczek wody znajdujących się w tym obszarze, przeprowadzana jest analiza struktury wody, wykorzystująca wybrane parametry

strukturalne ( $X_{solv}$ ). W kolejnym kroku cząsteczka białka zostaje przeniesiona do układu, w którym symulacjom poddana została czysta (pozbawiona substancji rozpuszczonych) woda, o tej samej temperaturze, w której prowadzono symulacje białka w wodzie. Cząsteczki wody zajmujące tę samą przestrzeń co przeniesiona do nowego układu cząsteczka białka są usuwane. W efekcie powstaje układ, w którym cząsteczka białka otoczona jest wodą o strukturze niezaburzonej jego obecnością. W następnym kroku dla cząsteczki białka znajdujany jest obszar odpowiadający wielkością i kształtem rzeczywistej warstwie solwatacyjnej oraz analizowana jest (z wykorzystaniem tych samych parametrów) struktura znajdującej się w nim wody ( $X_{bulk}$ ). Ostatni etap analizy polega na znalezieniu różnicy ( $\Delta X$ ) między wielkościami parametrów strukturalnych opisujących strukturę wody wypełniającej rzeczywistą oraz fikcyjną (wypełnioną wodą niezaburzoną obecnością białka) warstwę solwatacyjną białka:

$$\Delta X = X_{solv} - X_{bulk} \quad (4.44)$$

Jak wspomniano powyżej, w wyniku przeniesienia cząsteczki białka do układu zawierającego jedynie wodę, niektóre cząsteczki wody muszą zostać usunięte, ponieważ zajmują tę samą przestrzeń co cząsteczka białka. W praktyce procedura polega na usunięciu tych cząsteczek wody, których środki mas znajdują się w odległości mniejszej od pewnej odległości granicznej ( $d_0$ ) od któregośkolwiek z atomów białka. Można się spodziewać, że wybór wartości  $d_0$  będzie miał wpływ na kształt granicy między powierzchnią białka i jego wodą solwatacyjną, a co za tym idzie również na rezultaty uzyskiwane za pomocą przedstawionej procedury. Jak pokazano<sup>166</sup>, dla  $d_0$  w zakresie 0,15 – 0,19 nm, wybór konkretnej wartości nie ma jakościowego wpływu na wyniki prowadzonej analizy, niewielkim zmianom ulegają jedynie wartości liczbowe. Jako optymalną wartość wskazano w tej pracy  $d_0 = 0,17 \text{ nm}$  i wartość ta stosowana była również we wszystkich badaniach przeprowadzonych w ramach tej pracy.

Przedstawiona powyżej procedura pozwala na dokonanie porównania między właściwościami strukturalnymi wody solwatacyjnej białka oraz wody niezaburzonej jego obecnością. Najważniejszą zaletą tej metody jest uniezależnienie się od efektów geometrycznych (takich jak kształt i rozmiar warstwy solwatacyjnej) wpływających na wartości parametrów strukturalnych stosowanych do opisu struktury wody, co pozwala na opisanie zmian strukturalnych zachodzących w wodzie na skutek obecności cząsteczki białka.

#### 4.4. Śledzenie postępu procesu krzepnięcia wody

W poprzednich rozdziałach opisane zostały metody pozwalające na uchwycenie zmian strukturalnych zachodzących w wodzie solwatacyjnej białka CfAFP wraz z postępowaniem procesu krzepnięcia wody na powierzchni znajdującego się w sąsiedztwie kryształu lodu. Analiza nie

byłaby jednak kompletna bez narzędzi pozwalających na dokonanie ilościowej oceny postępu procesu krzepnięcia.

W literaturze znaleźć można wiele metod pozwalających na dokonanie rozróżnienia między cząsteczkami wody należącymi do faz ciekłej i stałej. Zaproponowano na przykład<sup>107</sup>, że za część fazy stałej można uznać cząsteczkę wody, która sąsiaduje z czterema innymi cząsteczkami wody oddalonymi od cząsteczki centralnej o mniej niż 0,34 nm i jest z nimi związana wiązaniami wodorowymi. Inna metoda<sup>91</sup> polega na monitorowaniu liczby wiązań wodorowych tworzących się z udziałem danej cząsteczki wody w czasie 20 ps. Jeśli średnia liczba wiązań wodorowych pozostaje w tym czasie większa niż 3,3, można założyć, że cząsteczka ta należy do fazy stałej. Oprócz liczby wiązań wodorowych, można również monitorować zmiany położenia cząsteczki wody w czasie<sup>97</sup>. Jeśli zmiany położenia w czasie 100 ps są niewielkie, cząsteczka stanowi część lodu. Inna metoda wykorzystuje natomiast parametry uporządkowania oparte na harmonikach sferycznych, które stanowią rozwiązanie różniczkowego równania Laplace'a we współrzędnych sferycznych<sup>93,167,168</sup>. Definicja tych parametrów uporządkowania przedstawia się następująco:

$$q_{lm}(i) = \frac{1}{N_b(i)} \sum_{j=1}^{N_b(i)} Y_{lm}(r_{ij}) \quad (4.45)$$

W powyższym wzorze symbolem  $N_b$  oznaczona została liczba sąsiadów cząsteczki centralnej,  $l$  jest liczbą naturalną ( $l = 0, 1, 2, \dots, n$ ), natomiast  $m$  przyjmuje wartości od  $-l$  do  $l$ . Funkcje oznaczone symbolem  $Y_{lm}(r_{ij})$  to harmoniki sferyczne, podczas gdy  $r_{ij}$  jest wektorem łączącym cząsteczkę centralną ( $i$ ) z cząsteczką otaczającą ( $j$ ).

Forma tego parametru zaproponowana przez Steinhardta<sup>169</sup>, w której  $l$  przyjmuje wartości 4 lub 6, jest wykorzystywana najczęściej. Zaletą stosowania parametrów Steinhardta do opisu stopnia uporządkowania wody jest możliwość przypisania analizowanych cząsteczek wody nie tylko do fazy stałej lub ciekłej, ale również do konkretnej struktury krystalograficznej lodu. Niestety, uzyskiwane przy pomocy tej metody wyniki mogą być w niektórych przypadkach niejednoznaczne.

#### 4.4.1. Algorytm CHILL+

Parametry uporządkowania stały się podstawą bardziej zaawansowanej i dającej lepsze rezultaty metody, zaproponowanej przez Moore'a i in.<sup>170</sup> Zauważono mianowicie, że w przechłodzonej wodzie cząsteczki wody mają tendencję do układania się wokół cząsteczek centralnych w sposób podobny do sposobu uporządkowania cząsteczek w lodzie, a więc w narożach tetraedru, co utrudnia dokonanie rozróżnienia między fazą stałą i ciekłą z zastosowaniem parametrów uporządkowania. Zaproponowano więc, aby w miejsce parametrów uporządkowania



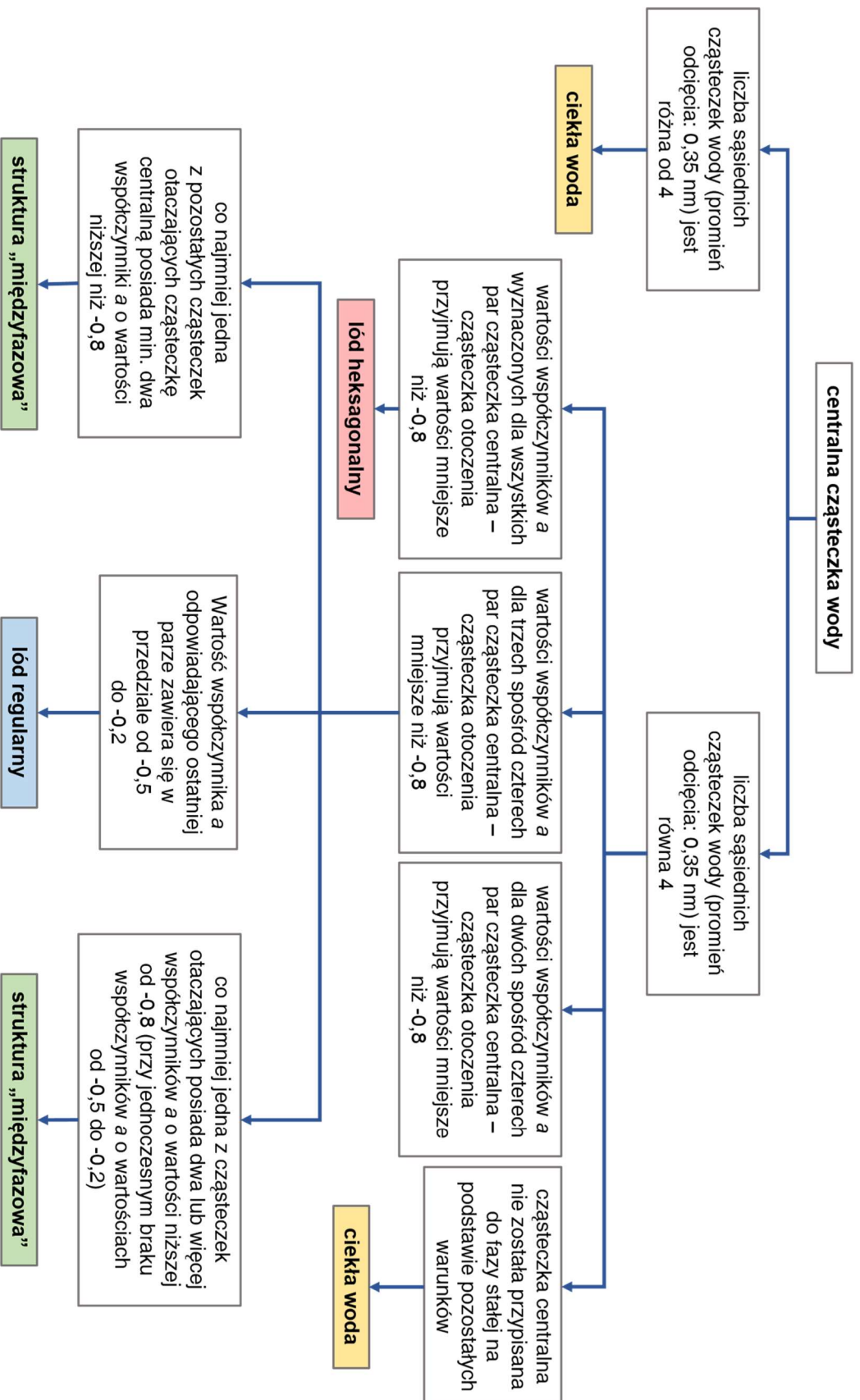
zastosować współczynnik korelacji tych parametrów – postępowanie takie pozwala na porównanie zgodności między stopniem uporządkowania otoczenia wybranej cząsteczki centralnej oraz stopniem uporządkowania otoczenia cząsteczek sąsiadujących z cząsteczką centralną. Na tej podstawie, z dużą dozą pewności, można przypisać daną cząsteczkę wody do fazy ciekłej lub stałej, a jeśli cząsteczka okaże się częścią fazy stałej – można również określić formę lodu, której część stanowi ta cząsteczka (heksagonalną, regularną lub „międzyfazową”, będącą strukturą przejściową między lodem i ciekłą wodą)<sup>170</sup>.

Współczynnik korelacji  $a$ , stanowiący podstawę zaprezentowanej powyżej metody, zdefiniowany jest w następujący sposób:

$$a(i, j) = \frac{\sum_{m=-l}^l q_{lm}(i) \cdot q_{lm}^*(j)}{\left(\sum_{m=-l}^l q_{lm}(i) \cdot q_{lm}^*(i)\right)^{\frac{1}{2}} \cdot \left(\sum_{m=-l}^l q_{lm}(j) \cdot q_{lm}^*(j)\right)^{\frac{1}{2}}} \quad (4.46)$$

gdzie symbolem  $q_{lm}$  oznaczona została funkcja opisująca lokalny parametr uporządkowania, natomiast  $q_{lm}^*$  jest funkcją sprzężoną do funkcji  $q_{lm}$ . W metodzie tej, nazwanej przez autorów algorytmem CHILL, funkcję  $q_{lm}$  wyznacza się dla  $l = 3$ . Analizę rozpoczyna się od znalezienia wartości parametru  $a$  dla każdej pary cząsteczka centralna – cząsteczka otaczająca w analizowanym obszarze przestrzeni. Następnie, poszczególne cząsteczki wody przypisuje się do odpowiedniej klasy na podstawie kryteriów podanych przez autorów metody<sup>170</sup> i zaprezentowanych w formie schematu na Rys.4.6.

Wyjściowy algorytm CHILL został z czasem zmodyfikowany<sup>171</sup>, co pozwoliło na identyfikowanie z jego wykorzystaniem również struktur klatratowych pojawiających się w wodzie – nowa wersja algorytmu (CHILL+) została zastosowana w mojej pracy jako metoda pozwalająca na rozróżnienie cząsteczek wody będących częścią fazy ciekłej i stałej.



Rys.4.6: Schemat przedstawiający reguły wyboru, pozwalające na przypisanie cząsteczek wody do fazy stałej (lód heksagonalny, regularny lub struktura „międzyfazowa”) lub ciekłej, na podstawie wartości parametrów *a* wyznaczonych dla par cząsteczka centralna – cząsteczka otaczająca.

#### 4.4.2. Parametr $F_4$

Jak pokazano powyżej, istnieje kilka różnych metod pozwalających na określenie stanu skupienia, w jakim znajdują się poszczególne cząsteczki wody. Spośród nich na szczególną uwagę zasługuje algorytm CHILL+, który charakteryzuje się wysoką skutecznością, jak również pozwala na rozróżnianie różnych struktur krystalograficznych lodu. Niestety, metoda ta całkowicie zawodzi, gdy woda w analizowanym obszarze sąsiaduje bezpośrednio z cząsteczką białka. Jednym z pierwszych kryteriów, które brane są pod uwagę w analizie z zastosowaniem algorytmu CHILL+ jest liczba cząsteczek znajdujących się w otoczeniu cząsteczki centralnej. Cząsteczki znajdujące się w pobliżu powierzchni białka nie posiadają pełnej warstwy solwatacyjnej, jak ma to miejsce w przypadku czystej wody – w takim przypadku wiele cząsteczek jest automatycznie klasyfikowanych jako ciekła woda, niezależnie od faktycznego stanu skupienia. Idąc dalej tym tropem można zauważyć, że również cząsteczki wody znajdujące się w nieco większej odległości od powierzchni białka mogą zostać błędnie przypisane do klas. W przypadku, gdy cząsteczka wody nie zostanie zidentyfikowana jako część lodu o strukturze heksagonalnej bądź regularnej, analizowane jest dalsze otoczenie cząsteczki centralnej („sąsiedzi sąsiadów”), co pozwala na określenie, czy cząsteczka ta jest częścią struktury „międzyfazowej” lodu. Obecność białka w sąsiedztwie cząsteczek wody należących do pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej cząsteczki centralnej może więc i tym razem powodować błędne przypisanie cząsteczki do fazy ciekłej.

Parametrem, który w pewnym stopniu pozwala przezwyciężyć zaprezentowane powyżej trudności, jest parametr  $F_4$ <sup>172</sup>. Rozróżnienie cząsteczek wody należących do fazy ciekłej i stałej dokonywane jest w tym przypadku na podstawie wielkości kątów torsyjnych H-O...O-H powstających między parami cząsteczek wody związanych wiązaniami wodorowymi. Dla każdej cząsteczki wody w analizowanym obszarze przestrzeni znajdowane są wszystkie cząsteczki wody, z którymi cząsteczka centralna tworzy wiązania wodorowe. Następnie wyznaczana jest wartość parametru  $F_4$  dla poszczególnych cząsteczek wody zgodnie ze wzorem :

$$F_4(i) = \frac{\sum_{j=1}^n \cos 3\phi(j)}{n} \quad (4.47)$$

gdzie symbolem  $\phi(j)$  oznaczona jest wielkość kąta torsyjnego zawartego między cząsteczką centralną ( $i$ ) i cząsteczką otaczającą ( $j$ ), a  $n$  jest liczbą cząsteczek związanych z cząsteczką centralną wiązaniami wodorowymi. W następnym kroku wyznaczana jest wartość średnia parametru  $F_4$  dla cząsteczek wody w analizowanym obszarze i to właśnie ta wartość stanowi podstawę do określenia stanu skupienia wody – ciekła woda charakteryzuje się wartością  $F_4$  wynoszącą 0,011, natomiast wartość -0,386 odpowiada strukturze heksagonalnej lodu<sup>173</sup>.

Parametr  $F_4$  został zaprojektowany z myślą o badaniach hydratów metanu<sup>172-174</sup>, jednak był również z powodzeniem stosowany do opisu struktury wody solwatacyjnej białek z grupy

przeciwdziałających zamarzaniu<sup>67,73</sup>. Należy jednak zwrócić uwagę, że – w odróżnieniu od algorytmu CHILL+ – parametr  $F_4$  nie umożliwia przypisania stanu skupienia poszczególnym cząsteczkom w analizowanej warstwie wody, a raczej opisuje stan skupienia w całym obszarze poddawany analizie.

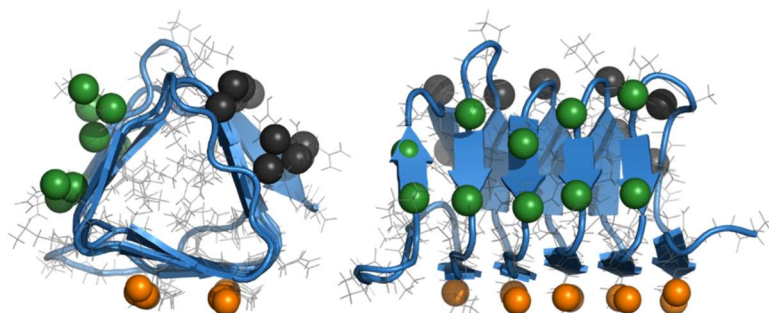
### 4.5. Odległość i orientacja cząsteczki białka CfAFP względem lodu

Struktura ciekłej, przechłodzonej wody, znajdującej się w kontakcie z powierzchnią kryształu lodu, ulega w czasie ciągłym zmianom. Zmiany te spowodowane są oczywiście postępującym procesem krzepnięcia. Można się spodziewać, że gdy w pobliżu powierzchni lodu umieszczona zostanie cząsteczka białka CfAFP, to zmiany strukturalne zachodzące w (ciekłej) wodzie zlokalizowanej między cząsteczką białka i lodem będą mogły stać się przyczyną zmian położenia tej cząsteczki względem lodu. Efekt ten śledzić można poprzez wyznaczenie zmian w czasie wzajemnych odległości oraz orientacji cząsteczki białka i lodu, co umożliwia dokonanie oceny zakresu i kierunku zachodzących w układzie zmian.

Jak wspomniałam wcześniej, granica między powierzchnią kryształu i ciekłą wodą nie jest dobrze zdefiniowana, z tego też względu stosowane powszechnie określenia takie jak „powierzchnia lodu”, czy „adsorpcja na powierzchni lodu” są jedynie pewnym uproszczeniem stanu rzeczywistego. W dalszej części pracy pojęcie „powierzchni lodu” stosowane będzie przeze mnie w odniesieniu do powierzchni kryształów lodu, znajdujących się w analizowanych układach symulacyjnych na początku symulacji.

#### 4.5.1. Odległość białka CfAFP od powierzchni lodu

Odległość cząsteczek białka CfAFP od powierzchni lodu została zdefiniowana jako średnia odległość wybranych atomów zlokalizowanych na powierzchni białka od płaszczyzny dopasowanej do położenia atomów tlenu cząsteczek wody budujących powierzchnię kryształu lodu. W przypadku powierzchni aktywnej białka, średnia odległość wyznaczana została z wykorzystaniem atomów tlenu reszt treoniny zlokalizowanych w obrębie tej powierzchni (Rys. 4.7, pomarańczowe sfery). Dla obszarów nieaktywnych wybranych zostało kilka atomów znajdujących się na powierzchni białka i leżących (w przybliżeniu) na jednej płaszczyźnie (Rys. 4.7, zielone i czarne sfery).



Rys. 4.7. Atomy wybrane w celu wyznaczenia średniej odległości powierzchni cząsteczki białka CfAFP od powierzchni lodu. Kolorem pomarańczowym zaznaczone zostały atomy zlokalizowane w obszarze powierzchni aktywnej, natomiast kolorem zielonym i czarnym – atomy leżące w obszarach nieaktywnych białka

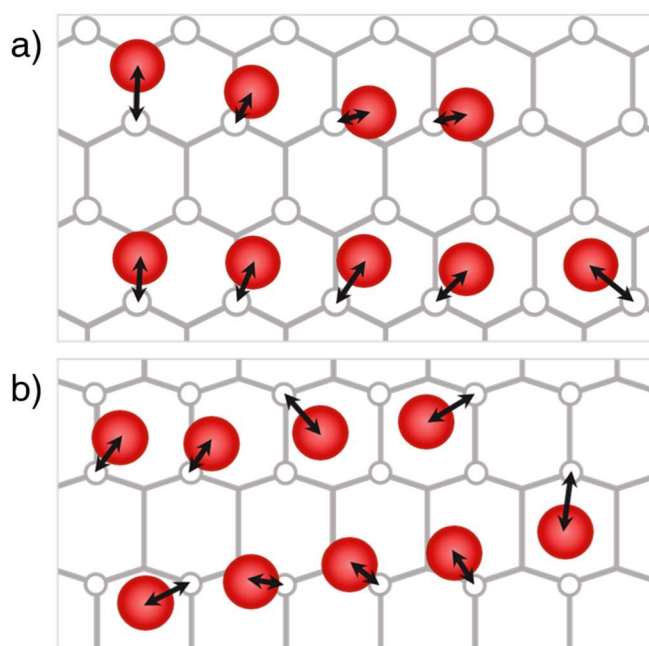
#### 4.5.2. Orientacja cząsteczki białka CfAFP względem powierzchni lodu

Cząsteczki białka CfAFP mogą przyjmować różne orientacje względem sieci krystalicznej lodu. Jednym z etapów w procesie przygotowania układów symulacyjnych zawierających kryształ lodu oraz cząsteczki białka była krótka symulacja prowadzona w temperaturze powyżej punktu krzepnięcia wody TIP4P/Ice, w trakcie której cząsteczki białka nie były przytrzymywane. Celem takiego postępowania było uzyskanie układów, które różniły się między sobą wzajemną orientacją cząsteczek białka i lodu.

Sposób wzajemnego ułożenia cząsteczki białka i lodu, zdefiniowany jako rozmieszczenie atomów tlenu reszt treoniny powierzchni aktywnej białka CfAFP względem położenia atomów tlenu cząsteczek wody budujących powierzchnię kryształu lodu, łatwo jest zobrazować w formie graficznej. Problem pojawia się, gdy liczba układów poddanych analizie jest stosunkowo duża – liczba symulacji komputerowych przeprowadzonych w układach zawierających kryształ lodu i cząsteczki białka CfAFP (w których cząsteczki białka nie były przytrzymywane w trakcie właściwych symulacji) wynosiła sto dwadzieścia, a w każdym z tych układów znajdowały się cztery cząsteczki białka zwrócone powierzchnią aktywną w kierunku powierzchni lodu. Ponadto, celowym wydaje się prowadzenie analizy zmian wzajemnych orientacji cząsteczek białka względem lodu w czasie. Ilość danych do analizy była więc zbyt duża, aby możliwe było przeprowadzenie analizy wizualnej. W związku z tym zastosowane zostało alternatywne podejście, którego szczegóły przedstawione zostały poniżej.

W pierwszym kroku położenia atomów tlenu reszt treoniny powierzchni aktywnej białka CfAFP rzutowane zostały na płaszczyznę wyznaczoną przez atomy tlenu cząsteczek wody budujących najbardziej zewnętrzną warstwę lodu (Rys. 4.8). Położenia atomów tlenu znajdujących się na powierzchni lodu stanowiły punkty odniesienia dla dalszej analizy. W kolejnym kroku wyznaczone zostały odchylenia położenia rzutów atomów białka na powierzchnię lodu od najbliższych leżących punktów odniesienia oraz odpowiadająca im wartość średnia. Wielkość tak wyznaczonego

średniego odchylenia niesie informację o zgodności położenia atomów tlenu na powierzchni białka z położeniami węzłów sieci krystalicznej znajdującego się w sąsiedztwie lodu.



Rys. 4.8. Schematyczny rysunek obrazujący sposób wyznaczenia odchylenia położenia rzutów atomów tlenu reszt treoniny powierzchni aktywnej białka CfAFP na powierzchnię lodu (czerwone kule) od punktów odniesienia (atomów tlenu cząsteczek wody budujących najbardziej zewnętrzną warstwę kryształu lodu, szare okręgi), dla cząsteczki białka sąsiadującej z a) płaszczyzną podstawową oraz b) płaszczyzną pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu

## 4.6. Pomiar siły działającej na cząsteczkę białka

W poprzednim rozdziale opisane zostały metody śledzenia zmian położenia białka CfAFP względem powierzchni kryształu lodu związanych z postępującym procesem krzepnięcia wody. Jeśli odległość białka od powierzchni lodu faktycznie ulega zmianom w czasie, można zadać pytanie, jaka siła będzie wywierana na to białko przez narastający lód, jeśli możliwość zmiany położenia białka zostanie ograniczona.

W celu znalezienia odpowiedzi na to pytanie przeprowadzone zostały symulacje komputerowe, w których jeden z atomów zlokalizowanych na powierzchni cząsteczki białka był w czasie trwania symulacji przytrzymywany w punkcie odniesienia, z wykorzystaniem potencjału harmonicznego. Pomiar siły działającej na cząsteczki białka CfAFP zlokalizowane w pewnej odległości od powierzchni lodu oraz zmiany tej siły w czasie przeprowadzony został z wykorzystaniem metody zaproponowanej przez Hwanga i in.<sup>175</sup>. Metoda ta pozwala na znalezienie gradientu energii swobodnej na podstawie zmian położenia cząstki w układzie, a tym samym na wyznaczenie siły działającej na tę cząstkę zgodnie z równaniem:

$$\vec{F}(\vec{r}) = -\nabla E \quad (4.48)$$

gdzie  $\vec{F}(\vec{r})$  oznacza siłę działającą na cząstkę w położeniu  $\vec{r}$ , natomiast  $\nabla E$  jest gradientem energii swobodnej.

W przypadku jednowymiarowym, energia swobodna cząstki w położeniu  $x$  będzie równa  $E(x)$ . Chcąc znaleźć gradient energii w punkcie odniesienia  $x_0$ , cząstkę należy przytrzymać w tym położeniu z wykorzystaniem potencjału harmonicznego – całkowitą energię swobodną cząstki w położeniu  $x$  ( $E_{tot}(x)$ ) będzie można w takim przypadku opisać za pomocą równania (4.49):

$$E_{tot}(x) = E(x) + \frac{k}{2}(x - x_0)^2 \quad (4.49)$$

gdzie  $k$  jest stałą sprężystości. Wyrażenie na energię swobodną cząstki znajdującej się w położeniu  $x$  można rozwinąć w wielomian Taylora drugiego rzędu:

$$E(x) = E(x_0) + (x - x_0) \cdot E'(x_0) + \frac{(x - x_0)^2}{2} \cdot E''(x_0) \quad (4.50)$$

Korzystając z zależności  $y = x - x_0$  równanie (4.49) można przedstawić w postaci:

$$E_{tot}(x) \cong E(x_0) + E'(x_0) \cdot y + \frac{1}{2}(k + E''(x_0)) \cdot y^2 \quad (4.51)$$

Średnie wartości  $\langle y \rangle$  i  $\langle y^2 \rangle$  można wyznaczyć korzystając z równań (4.52) i (4.53):

$$\langle y \rangle = \frac{\int y \cdot e^{-\frac{E_{tot}(x)}{k_B T}} dy}{\int e^{-\frac{E_{tot}(x)}{k_B T}} dy} \quad (4.52)$$

$$\langle y^2 \rangle = \frac{\int y^2 \cdot e^{-\frac{E_{tot}(x)}{k_B T}} dy}{\int e^{-\frac{E_{tot}(x)}{k_B T}} dy} \quad (4.53)$$

gdzie przyjęto, że:

$$e^{-\frac{E_{tot}(x)}{k_B T}} \sim e^{-\frac{E'(x_0) \cdot y + \frac{1}{2}(k + E''(x_0)) \cdot y^2}{k_B T}} \quad (4.54)$$

oraz  $k_B$  oznacza stałą Boltzmann, a  $T$  – temperaturę. Jako że równanie (4.54) jest funkcją Gaussa, równania (4.52) i (4.53) można zatem rozwiązać analitycznie – ostatecznie równania te przyjmują postać:

$$\langle y \rangle = \langle x - x_0 \rangle = -\frac{E'(x_0)}{k + E''(x_0)} \quad (4.55)$$

$$\langle y^2 \rangle = \frac{k_B T - E'(x_0)^2}{k + E''(x_0)} \quad (4.56)$$

Wykorzystując wyrażenie na wariancję zmiennej  $y$ :

$$\langle y^2 \rangle - \langle y \rangle^2 = \text{var}(x - x_0) = \frac{k_B T}{k + E''} \quad (4.57)$$

oraz równanie (4.55) można wyznaczyć postać  $E'(x_0)$ :

$$E'(x_0) = -\frac{\langle x - x_0 \rangle}{\text{var}(x - x_0)} \cdot k_B T \quad (4.58)$$

Przeniesienie powyższych rozważań na przypadek trójwymiarowy prowadzi do następującego równania na  $i$ -ty składnik siły działającej na cząstkę znajdującą się w położeniu  $\vec{r}_0$ :

$$F_i(\vec{r}_0) = \frac{\partial}{\partial r_i} E(\vec{r}_0) = \frac{k_B T}{\text{var}(r_i - r_{0i})} \cdot \langle r_i - r_{0i} \rangle, i = x, y, z \quad (4.59)$$

gdzie  $\vec{r}_0 = [x_0, y_0, z_0]$  oznacza położenie referencyjne cząstki, a  $\vec{r} = [x, y, z]$  – jej aktualne (w momencie analizy) położenie.

W celu ułatwienia interpretacji wyników, każdej z cząsteczek białka CfAFP w badanych układach przypisywany został układ współrzędnych zdefiniowany w taki sposób, aby oś  $z$  była prostopadła do powierzchni kryształu lodu, z którą sąsiaduje dane białko oraz aby oś skierowana była od powierzchni lodu w kierunku białka. W efekcie uzyskane wartości siły (a dokładniej jej składowej prostopadłej do powierzchni lodu) stają się dodatnie, gdy siła działająca na białko jest odpychająca oraz ujemne, gdy siła jest przyciągająca.



## Rozdział 5

# Rezultaty i dyskusja

W poprzednich rozdziałach zaprezentowałam aktualny stan wiedzy dotyczącej mechanizmu funkcjonowania białek przeciwdziałających zamrażaniu, a także pokazałam, że jeden z kluczowych elementów tego mechanizmu – proces wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu – wciąż nie został do końca wyjaśniony.

Oddziaływania typu białko – ligand są w naturze spotykane na każdym kroku. Lód nie jest jednak typowym ligandem. Jego struktura jedynie w niewielkim stopniu różni się od struktury przechłodzonej, ciekłej wody, która – w warunkach funkcjonowania białek AFP – występuje w otoczeniu w ogromnym nadmiarze. Natychmiast nasuwa się więc pytanie, w jaki sposób cząsteczki białka AFP są w stanie rozpoznać fazę stałą? Kolejną kwestią, którą należy wziąć pod uwagę jest fakt, że granica między lodem i ciekłą wodą nie jest ostra. W związku z tym, określanie procesu wiązania się białka z lodem mianem „adsorpcji na powierzchni lodu” może być mylące i nie oddawać w pełni istoty zachodzącego procesu.

Powyższe argumenty pokazują, że aby w pełni opisać i zrozumieć proces wiązania się białek przeciwdziałających zamrażaniu z lodem, niezbędne jest przeprowadzenie szczegółowej analizy dotyczącej procesów zachodzących w pobliżu powierzchni lodu w warunkach funkcjonowania białek AFP, ale pod nieobecność tych białek. Z tego też względu, pierwsza część przeprowadzonych przeze mnie badań skupiała się właśnie na tym zagadnieniu. Szczególną uwagę zwróciłam na strukturę wody znajdującej się w kontakcie z powierzchnią lodu oraz na zmiany tej struktury w czasie. Uzyskane rezultaty (przedstawione w rozdziale 5.1) stały się punktem wyjścia w procesie planowania dalszych eksperymentów, a także stanowiły punkt odniesienia w analizie układów zawierających cząsteczki białka CfAFP.

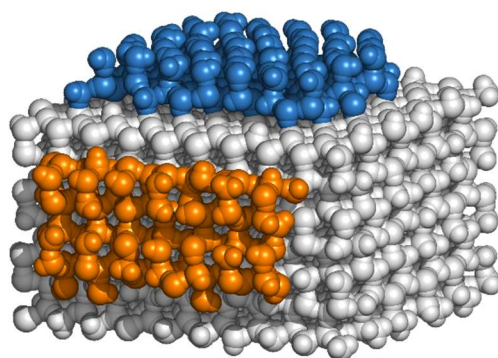
Kolejnym krokiem, jaki podjęłam w celu poznania mechanizmu procesu wiązania się białek AFP z lodem (a dokładniej jednego z ich przedstawicieli – hiperaktywnego białka CfAFP), było sprawdzenie, w jaki sposób struktura wody sąsiadującej z kryształem lodu zmienia się na skutek obecności w jego otoczeniu cząsteczki białka AFP oraz w jaki sposób obecność lodu wpływa na cząsteczkę białka (Rozdziały 5.2 – 5.4). Uzyskane rezultaty dostarczyły ważnych wskazówek dotyczących roli wody solwatacyjnej w procesie oddziaływania badanego białka z lodem i pozwoliły na poznanie szczegółów mechanizmu wiązania się tego białka z lodem.

## 5.1. Badanie wpływu wewnętrznego uporządkowania kryształu lodu na proces krzepnięcia wody na jego powierzchni

Jak wspomniałam wcześniej, mechanizm funkcjonowania białek przeciwdziałających zamrażaniu opiera się na ich zdolności do rozpoznawania i oddziaływania z powierzchnią lodu. Szczegóły procesu krzepnięcia wody na powierzchni już istniejącego kryształu, a także wpływ różnych czynników na ten proces, mogą więc mieć znaczenie z punktu widzenia mechanizmu wiązania się białek należących do tej grupy z lodem.

Stan powierzchni lodu, opisany poprzez liczbę i rozmieszczenie „wolnych” wiązań O-H, może mieć istotny wpływ na proces powstawania kolejnych warstw lodu<sup>113–116</sup>. Większość dostępnych w literaturze danych dotyczy granicy faz lód-próżnia – w takich warunkach jedynym czynnikiem mającym wpływ na proces adsorpcji cząsteczek wody na powierzchni lodu jest energia oddziaływania tych cząsteczek z lodem. Z tego też względu, bezpośrednie przeniesienie wniosków wyciągniętych na podstawie tych badań na układy lód-ciekła woda może być problematyczne.

W celu zbadania, jaki wpływ na proces krzepnięcia wody na powierzchni lodu ma stan jego powierzchni, przeprowadziłam symulacje komputerowe układów składających się z prostopadłościennego kryształu lodu zanurzonego w ciekłej wodzie (Rys. 5.1). Taka konstrukcja układu pozwoliła na uniknięcie efektów związanych ze stosowaniem okresowych warunków brzegowych (jak pokazano<sup>103</sup>, w przypadku, gdy lód rozciąga się w całym przekroju pudełka symulacyjnego, wielkość układu wpływa na kinetykę procesu krzepnięcia wody). Z drugiej strony, obecność ostrych krawędzi kryształu również może mieć wpływ na uzyskiwane wyniki. Aby zminimalizować ten efekt, analizie poddałam wodę solwatacyjną lodu znajdującą się w odległości co najmniej 0,5 nm od krawędzi kryształu lodu (Rys. 5.1).



Rys. 5.1. Zasięg obszarów, w których prowadzona była analiza struktury wody solwatacyjnej kryształu lodu. Na rysunku pokazane zostały trzy pierwsze warstwy solwatacyjne płaszczyzn podstawowej (kolor niebieski) i pryzmatycznej (10 $\bar{1}$ 0) (kolor pomarańczowy) lodu

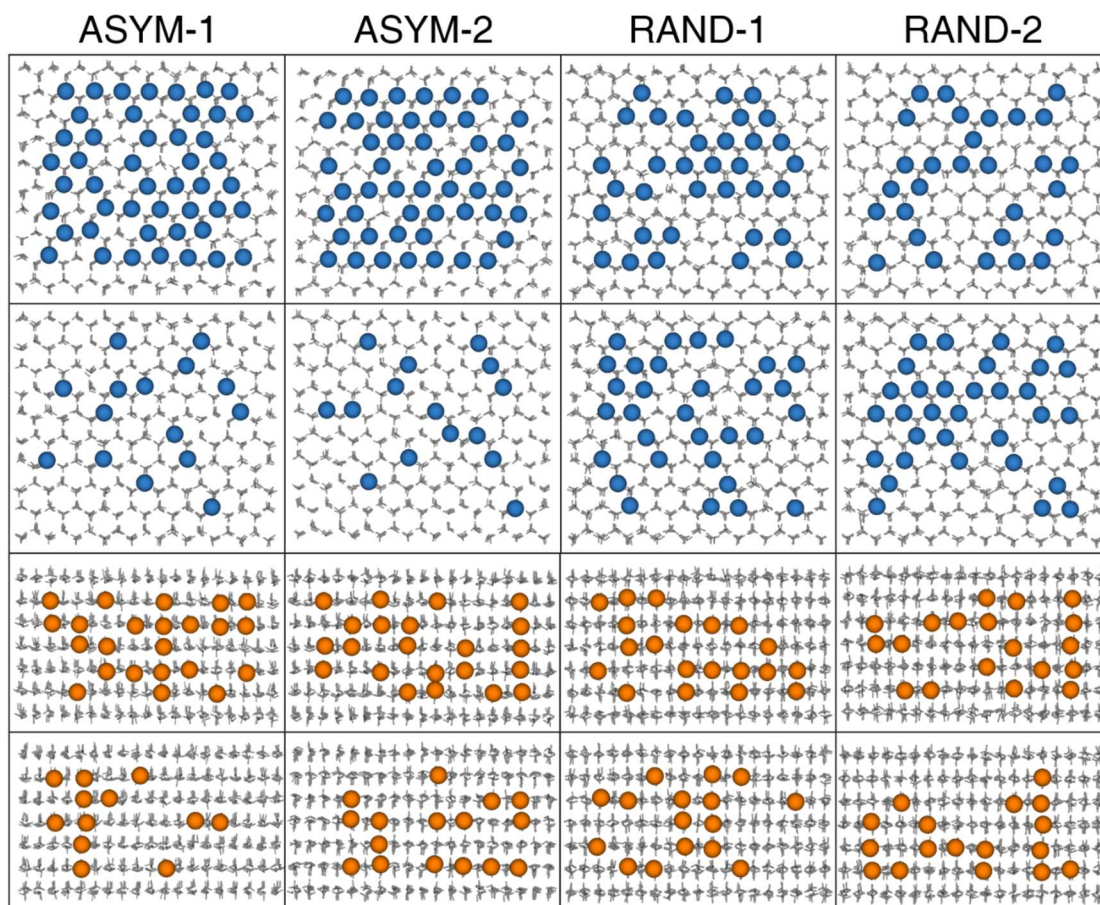
Badania nad procesem narastania lodu z fazy gazowej (resublimacji) wskazują, że sposób zorientowania cząsteczek wody budujących powierzchnię kryształu lodu ma pewien wpływ na

przebieg tego procesu. Jednym z czynników, które mogą być odpowiedzialne za ten efekt, jest fakt występowania na powierzchni lodu wiązań O-H, które skierowane są „na zewnątrz”, prostopadle do powierzchni kryształu. Wiązania te określane są mianem „wolnych” wiązań O-H (ang. *dangling O-H bonds*), ponieważ nie tworzą one wiązań wodorowych z cząsteczkami wody zlokalizowanymi wewnątrz kryształu lodu. Ponadto, zgodna orientacja większej liczby cząsteczek wody tworzących powierzchnię lodu skutkuje pojawieniem się pola elektrycznego, które wpływać może na przebieg procesu tworzenia się nowych warstw lodu na tej powierzchni. Wpływ pola elektrycznego na proces krzepnięcia wody badany był wcześniej przez innych badaczy<sup>116,117,176</sup>, ale nie w kontekście powstawania nowych warstw lodu na powierzchni istniejącego kryształu.

W związku z powyższym, do badań wybrałam dwa typy układów. W układach typu RAND, kryształ lodu znajdujący się w centrum pudełka symulacyjnego był nieuporządkowany pod względem orientacji tworzących go cząsteczek wody. Układy typu ASYM zawierały z kolei kryształy lodu, które charakteryzowały się znaczącym stopniem wewnętrznego uporządkowania momentów dipolowych cząsteczek wody. W każdej z tych grup znalazło się sto dwadzieścia układów symulacyjnych o podobnej konstrukcji – poszczególne układy różniły się pod względem orientacji poszczególnych cząsteczek wody w kryształach lodu oraz położenia i orientacji cząsteczek ciekłej wody (szczegóły dotyczące przygotowania układów symulacyjnych opisane zostały w Rozdziale 3.2.3). Badania przeprowadziłam dla kilku temperatur w zakresie 250 – 270 K.

Pierwszy etap przeprowadzonej przeze mnie analizy miał na celu scharakteryzowanie stanu powierzchni kryształów lodu znajdujących się w układach poddanych symulacjom. „Wolne” wiązanie O-H zdefiniowałam jako wiązanie, które tworzy z płaszczyzną wyznaczoną przez powierzchnię kryształu lodu kąt większy niż  $45^\circ$ . Stosując tę definicję, wyznaczyłam średnią liczbę „wolnych” wiązań O-H na płaszczyznach podstawowych i pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ) kryształów lodu. W przypadku układów ASYM, średnia procentowa zawartość „wolnych” wiązań O-H wyniosła  $78\pm 8\%$  oraz  $22\pm 4\%$  dla dwóch płaszczyzn podstawowych i  $65\pm 5\%$  oraz  $32\pm 4\%$  dla dwóch płaszczyzn pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ) kryształu. W układach typu RAND średnie wartości bliskie były 50% dla wszystkich rozważanych powierzchni kryształów.

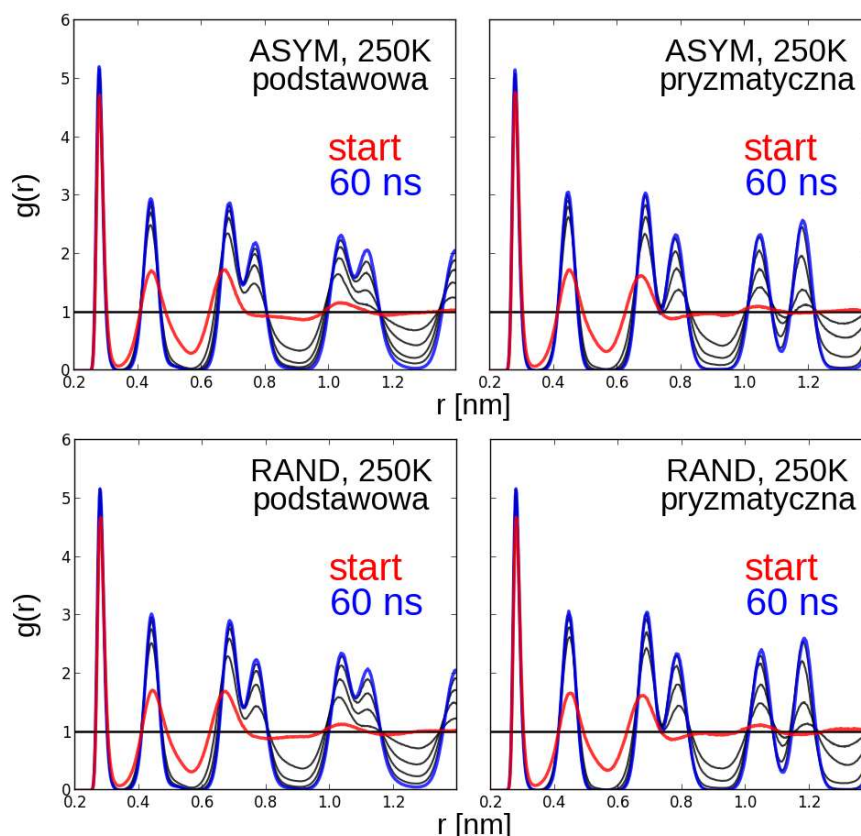
W ramach obu grup, zawartość „wolnych” wiązań O-H w poszczególnych układach różniła się tylko w niewielkim stopniu. Rozmieszczenie tych wiązań na powierzchni lodu było jednak w przypadku każdego układu odmienne, co zaprezentowane zostało (na przykładzie kilku wybranych układów symulacyjnych) na Rys. 5.2. Ponadto stwierdziłam, że stan powierzchni poszczególnych kryształów lodu pozostawał praktycznie niezmienny w trakcie trwania całej symulacji (60 ns).



Rys. 5.2. Rozmieszczenie „wolnych” wiązań O-H na powierzchni kryształu lodu, w kilku wybranych układach symulacyjnych. Kolorami niebieskim (płaszczyzna podstawowa) oraz pomarańczowym (płaszczyzna przyzmatyczna ( $10\bar{1}0$ )) zaznaczone zostały położenia atomów tlenu cząsteczek wody, które posiadały „wolne” wiązanie O-H. W kolumnach ASYM-1 i ASYM-2 zaprezentowany został stan powierzchni lodu w dwóch wybranych układach symulacyjnych typu ASYM, natomiast w kolumnach RAND-1 i RAND-2 – stan powierzchni lodu w wybranych układach symulacyjnych typu RAND

### 5.1.1. Funkcje rozkładu gęstości wody solwatacyjnej lodu

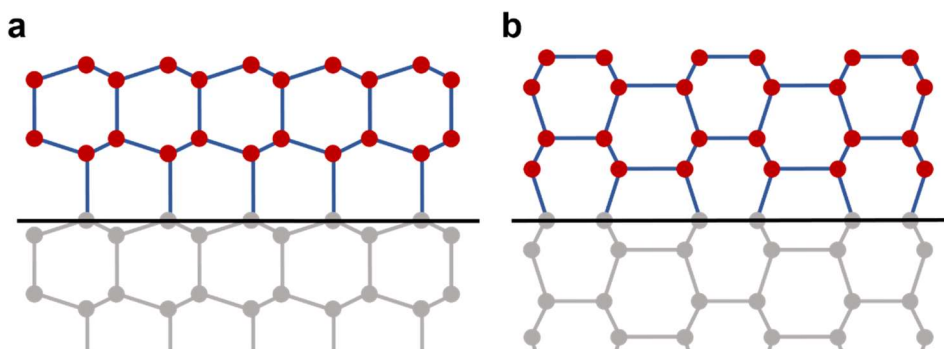
Posiadając informacje na temat stanu powierzchni kryształów lodu znajdujących się w badanych układach symulacyjnych, rozpoczęłam analizę zmian strukturalnych zachodzących w wodzie solwatacyjnej lodu w czasie. Pierwszym z narzędzi, które wykorzystałam do analizy tej struktury, były funkcje rozkładu gęstości (sposób ich wyznaczania przedstawiony został w Rozdziale 4.1.6). Obliczenia przeprowadziłam w każdym z przygotowanych układów symulacyjnych, a następnie wyznaczyłam odpowiednie średnie rozkłady, oddzielnie dla układów typu RAND i ASYM. Na Rys. 5.3 zamieszczony został wykres przedstawiający rezultaty uzyskane w przypadku układów symulowanych w temperaturze 250 K.



Rys. 5.3. Średni przebieg funkcji rozkładu gęstości w układach typu ASYM (górny rząd) i RAND (dolny rząd), dla wody solwacyjnej płaszczyzn podstawowej (lewa kolumna) i pryzmatycznej (10 $\bar{1}0$ ) (prawa kolumna). Kolorem czerwonym zaznaczony został średni przebieg funkcji na początku symulacji, kolorem niebieskim – na końcu symulacji, natomiast kolorem czarnym – przebieg funkcji w różnych (pośrednich) momentach czasu. Dane przedstawione zostały dla układów symulowanych w temperaturze 250 K

Przebieg funkcji rozkładu gęstości pozwala prześledzić postęp procesu krzepnięcia w wodzie solwacyjnej lodu. Jak można zaobserwować, cząsteczki ciekłej wody miały tendencję do układania się w warstwy – wraz z postępem symulacji, odpowiadające tym warstwom piki ulegały wyostrzeniu. Po upływie 60 ns (niebieska linia na Rys. 5.3), we wszystkich przypadkach zaobserwować można było wyraźne rozseparowanie dwóch pierwszych pików, co wskazuje na wysoki stopień zaawansowania procesu krzepnięcia w odpowiadającym im warstwach solwacyjnych. Można ponadto zauważyć, że położenia pików nieco się różniły w przypadku płaszczyzn podstawowej i pryzmatycznej (10 $\bar{1}0$ ), co wynika bezpośrednio ze struktury (a więc sposobu ułożenia cząsteczek wody) lodu powstającego na tych płaszczyznach (Rys. 5.4).

Położenia dwóch pierwszych pików na Rys. 5.3 wykorzystałam do zdefiniowania zasięgu dwóch pierwszych warstw solwacyjnych powierzchni lodu. Wartości te, wynoszące odpowiednio 0,35 oraz 0,58 nm, wykorzystałam w dalszej części analizy.



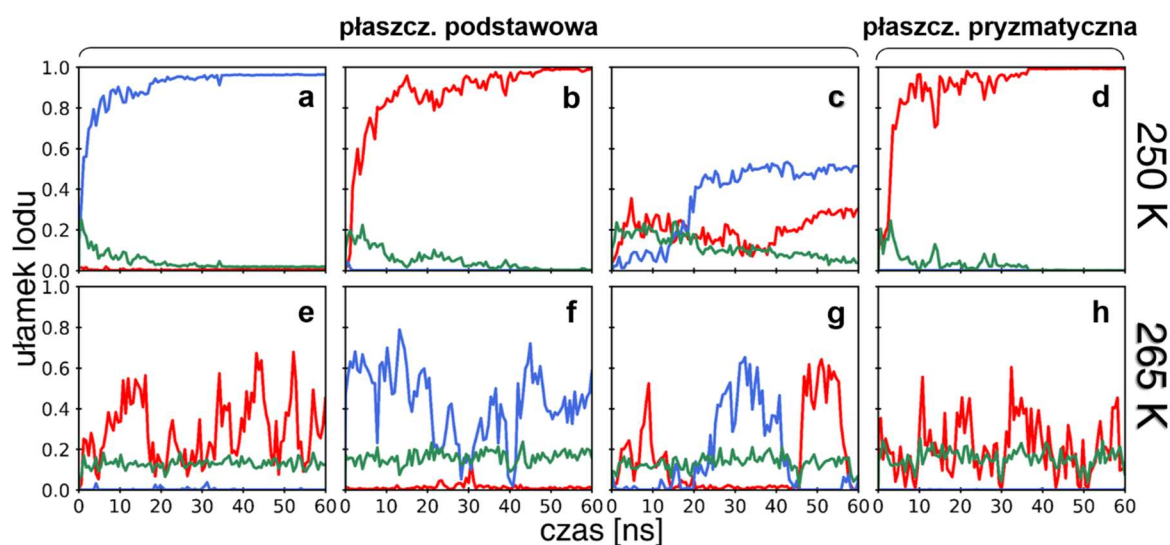
Rys. 5.4. Schematyczny rysunek obrazujący sposób układania się cząsteczek wody w warstwach lodu powstających na płaszczyznach a) podstawowej i b) pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) (powierzchnie tych płaszczyzn zaznaczone zostały czarnymi liniami). Na rysunku pokazane zostały tylko położenia atomów tlenu cząsteczek wody

### 5.1.2. Postęp procesu krzepnięcia wody w układach symulacyjnych

Funkcje rozkładu gęstości pozwoliły na wyciągnięcie kilku ogólnych wniosków dotyczących procesu krzepnięcia wody na powierzchni lodu. Aby uzyskać bardziej szczegółowe informacje, przeprowadziłam analizę z wykorzystaniem algorytmu CHILL<sup>+171</sup>, którego zastosowanie umożliwiła śledzenie postępu procesu krzepnięcia wody na poziomie molekularnym. W związku z tym, że największych zmian spodziewać się można w wodzie solwatacyjnej sąsiadującej bezpośrednio z powierzchnią lodu, analizę przeprowadziłam dla pierwszej warstwy solwatacyjnej kryształu.

Stosując algorytm CHILL+ sprawdziłam, jak proces krzepnięcia postępował w poszczególnych układach symulacyjnych. Na Rys. 5.5 przedstawiłam – na przykładzie wybranych układów symulacyjnych – różne, zaobserwowane przeze mnie, sposoby zachowania się układów.

W temperaturze 250 K, proces krzepnięcia postępował stosunkowo szybko, prowadząc (w większości przypadków) do całkowitego zakrzepnięcia pierwszej warstwy solwatacyjnej lodu w trakcie 60 ns trwania symulacji. Powstający na płaszczyźnie podstawowej kryształu lód posiadał strukturę heksagonalną lub regularną, jedynie w kilku przypadkach zaobserwowałam jednoczesne powstawanie obu struktur lodu (jeden z takich przypadków obrazuje Rys. 5.5 c). Wyniki te stoją z zgodzie z danymi literaturowymi, które wskazują, że warstwy lodu o mieszanej strukturze powstają na powierzchni kryształu przy dużym stopniu przechłodzenia wody oraz że częstotliwość ich występowania zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia przechłodzenia wody<sup>95</sup>. Ponadto, w większości układów symulowanych w temperaturze 250 K, proces krzepnięcia przebiegał bez zakłóceń, a końcowa struktura lodu była taka sama, jak struktura lodu występująca w przewodzie w początkowych etapach symulacji (Rys. 5.5 a, b).



Rys. 5.5. Zmiany w czasie zawartości lodu o strukturze heksagonalnej (linie czerwone) i regularnej (linie niebieskie), a także struktury pośredniej między fazą stałą i ciekłą (linie zielone) w pierwszej warstwie solwacyjnej płaszczyzn podstawowej (a-c oraz e-g) i przyrmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) (d oraz h) kryształu lodu. Wyniki przedstawione zostały dla kilku wybranych układów, symulowanych w temperaturze 250 K (górny rząd) i 265 K (dolny rząd)

Wraz ze wzrostem temperatury, końcowa zawartość lodu (po 60 ns symulacji) w pierwszej warstwie solwacyjnej lodu stawała się coraz mniejsza – proces krzepnięcia postępował tylko do momentu osiągnięcia pewnego stanu stacjonarnego, w którym zarodki nowej warstwy lodu pozostawały w dynamicznej równowadze z ciekłą wodą (Rys. 5.5, dolny rząd). Przyczyną takiego zachowania się układów w temperaturach bliskich temperaturze topnienia lodu był stosunkowo niewielki rozmiar powierzchni kryształu lodu. Wielkość stabilnego zarodka krystalizacji nowej warstwy lodu zależy od temperatury wody – jest on tym mniejszy, im niższa temperatura zachodzenia procesu krzepnięcia. Jak pokazano wcześniej<sup>95</sup> (dla jednoatomowego modelu wody mW), liczba cząsteczek wody potrzebnych do utworzenia stabilnego zarodka nowej warstwy lodu w temperaturze 270 K (3 K poniżej temperatury topnienia modelu) wynosi ok. 180-280. W badanych przeze mnie układach, pojedyncza warstwa lodu zawierała jedynie 190 cząsteczek wody (w przypadku płaszczyzny podstawowej). Oznacza to, iż w temperaturach bliskich temperatury topnienia lodu, powstanie zarodka nowej warstwy lodu o rozmiarze wystarczającym dla utworzenia pełnej warstwy lodu, było mało prawdopodobne. Jak zostało pokazane na Rys. 5.5, proces krzepnięcia w wyższych z badanych temperatur był mniej stabilny. W trakcie symulacji dochodziło niekiedy do całkowitego roztopienia powstałego wcześniej zarodka nowej warstwy lodu, po czym następowało powstanie nowego zarodka, o takiej samej lub innej strukturze krystalograficznej (przykład takiego zachowania układu zaprezentowano na Rys. 5.5 g).

W przypadku płaszczyzny przyrmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) jedyną formą lodu, która może powstawać, jest lód heksagonalny. Podobnie jak miało to miejsce w przypadku płaszczyzny

podstawowej, postęp procesu krzepnięcia był bardziej stabilny w niższych temperaturach (Rys. 5.5 d i g).

Przedstawione powyżej obserwacje opisują zachowanie układów zarówno typu ASYM, jak i RAND. Na tym etapie analizy nie stwierdziłam wyraźnych różnic w postępie procesu krzepnięcia zachodzącego w tych dwóch typach układów.

### 5.1.3. Średnia szybkość krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu

Powyżej pokazałam, jak przebiega proces krzepnięcia wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej kryształu lodu w poszczególnych układach symulacyjnych. W kolejnym kroku analizy rozważać będę średnie zachowanie układów symulacyjnych w zależności od typu układu (RAND oraz ASYM), płaszczyzny krystalograficznej, na której krzepła woda, a także – w przypadku płaszczyzny podstawowej lodu – również struktury nowo powstającego lodu.

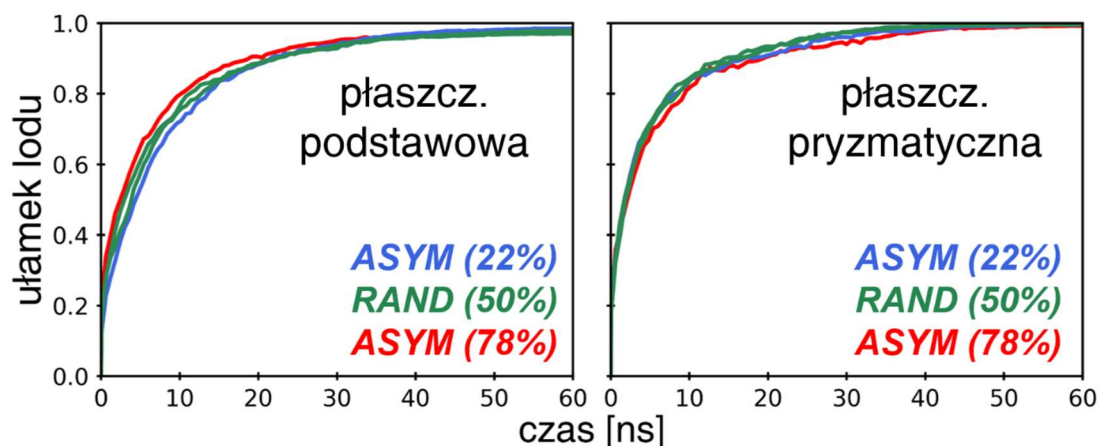
Jednym ze wskaźników, który może zostać wykorzystany do opisu przebiegu procesu krzepnięcia wody, jest szybkość tego procesu. Dane dostępne w literaturze wskazują, że szybkości krzepnięcia lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej na płaszczyźnie podstawowej kryształu są sobie równe oraz że proces ten postępuje do dwóch razy szybciej na płaszczyźnie pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ), w porównaniu do płaszczyzny podstawowej lodu. Nie są natomiast dostępne informacje dotyczące wpływu stanu powierzchni lodu na szybkość procesu krzepnięcia.

Jak wspomniałam wcześniej, na skutek niewielkiego rozmiaru kryształu lodu, proces krzepnięcia zachodził do końca jedynie w najniższej z badanych przeze mnie temperatur, mianowicie w temperaturze 250 K. Z tego też względu analizie poddałam zmiany średniej zawartości lodu w czasie dla układów symulowanych właśnie w tej temperaturze – wartości średnie wyznaczone zostały na podstawie wyników uzyskanych we wszystkich stu dwudziestu symulowanych układach. W przypadku każdej warstwy solwatacyjnej, całkowita zawartość lodu w danym momencie czasu wyznaczona została jako suma zawartości poszczególnych form lodu w tej warstwie. Na Rys. 5.6 zaprezentowałam wyniki uzyskane w przypadku płaszczyzny podstawowej i pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) lodu w układach typu RAND i ASYM.

Przedstawione na wykresach rezultaty pokazują, że szybkość powstawania lodu w pierwszej warstwie solwatacyjnej kryształu, nie zależy w znaczącym stopniu od stopnia uporządkowania (ASYM lub RAND) kryształu lodu. Analizie poddałam również ewentualny wpływ stanu powierzchni (opisywanego liczbą i ułożeniem „wolnych” wiązań O-H na tej powierzchni) na proces krzepnięcia. Uzyskane rezultaty pokazały, że czynnik ten zdaje się nie mieć wpływu na szybkość postępu procesu krzepnięcia wody. Porównując wyniki uzyskane dla płaszczyzn podstawowej i pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) lodu można zauważyć, że szybkość krzepnięcia



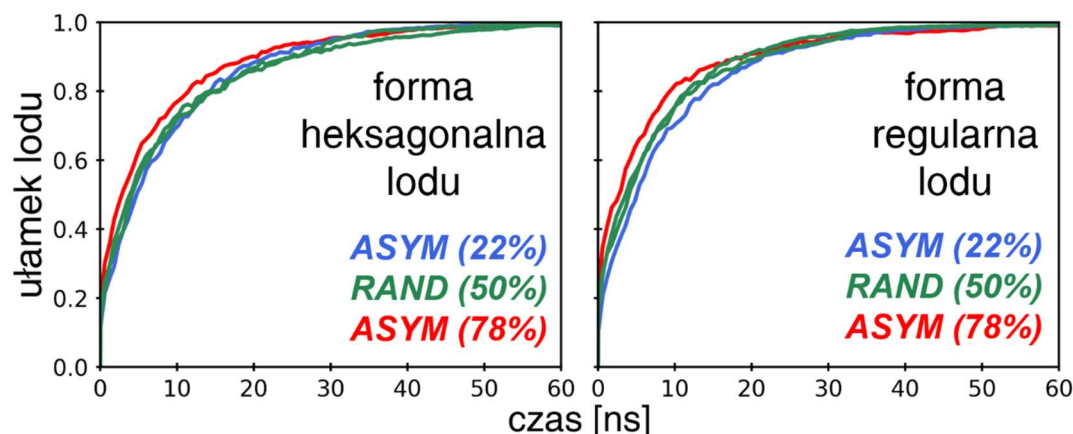
w pierwszych momentach symulacji, była większa w przypadku płaszczyzny przyzmatycznej. Fakt ten zgodny jest z danymi dostępnymi w literaturze<sup>95,97,106–108</sup>.



Rys. 5.6. Zmiany w czasie średniej zawartości lodu w pierwszej warstwie solwatacyjnej płaszczyzn podstawowej i przyzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) kryształu lodu, w układach typu ASYM i RAND. Linia zielona przedstawia wyniki uzyskane dla dwóch przeciwległych ścian kryształu lodu w układach typu RAND, gdzie zawartość „wolnych” wiązań O-H była bliska 50%. Kolorem czerwonym i niebieskim oznaczone zostały wyniki uzyskane dla powierzchni lodu w układach ASYM, dla których średnie zawartości „wolnych” wiązań O-H wynosiły odpowiednio ok. 78% i ok. 22%

Na powierzchni płaszczyzny podstawowej kryształu powstać mogą dwie formy lodu, przy czym badania pokazały, że lód regularny powstaje częściej niż lód heksagonalny<sup>87,92,94–99</sup>. Przyczyna tego zjawiska nie została dotychczas wyjaśniona. Badając szybkość procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu warto więc sprawdzić, czy preferencja w stosunku do jednej z form lodu ma związek z różnicą szybkości ich powstawania, a także, czy jest ona pochodną stanu powierzchni lub stopnia uporządkowania samego lodu.

Jak pokazałam wcześniej, w temperaturze 250 K obserwuje się stabilny wzrost zarodków nowej warstwy lodu, powstających na początku symulacji. Mając ten fakt na uwadze, zbiór układów badawczych (symulowanych w tej temperaturze) podzieliłam na dwie grupy, w zależności od formy lodu, jaka obecna była na powierzchni kryształu po zakończeniu procesu krzepnięcia – układy, w których powstał jednocześnie lód o strukturze heksagonalnej i regularnej nie były brane pod uwagę. Dla każdej z grup wykonałam następnie wykresy przedstawiające zmiany średniej zawartości lodu o danej strukturze w czasie (Rys. 5.7).



Rys. 5.7. Zmiany w czasie średniej zawartości lodu w pierwszej warstwie solwacyjnej płaszczyzny podstawowej kryształu lodu, w układach typu ASYM i RAND, oddzielnie dla układów, w których powstawała forma heksagonalna i regularna lodu. Linia zielona przedstawia wyniki uzyskane dla dwóch przeciwległych ścian kryształu lodu w układach typu RAND, gdzie zawartość „wolnych” wiązań O-H była bliska 50%. Kolorem czerwonym i niebieskim oznaczone zostały wyniki uzyskane dla powierzchni lodu w układach typu ASYM, dla których średnie zawartości „wolnych” wiązań O-H wynosiły odpowiednio ok. 78% i 22%

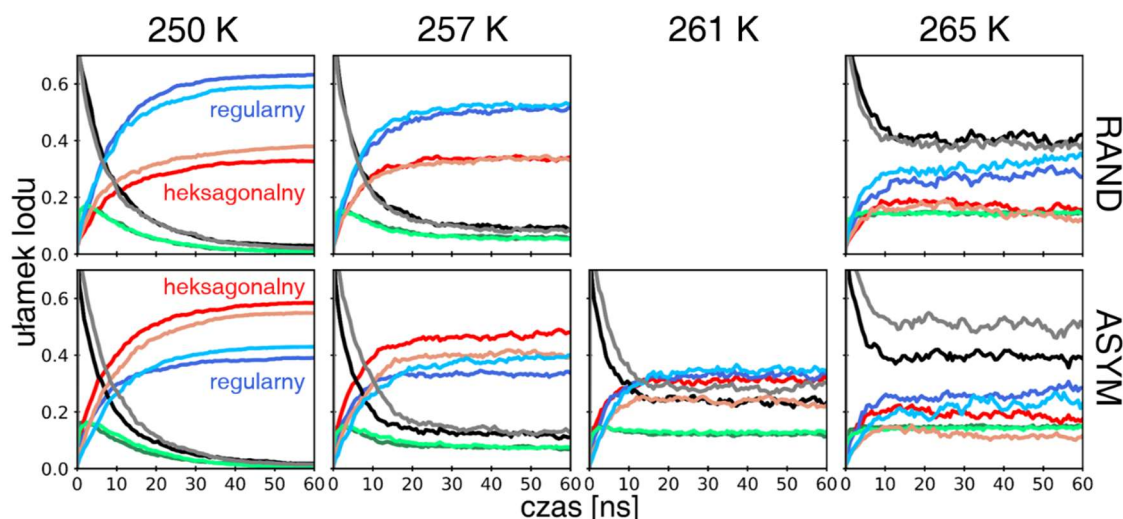
Z przeprowadzonej analizy wynika, że szybkości krzepnięcia lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej na powierzchni kryształu lodu są podobne. Można ponadto zauważyć, że szybkości te nie zależą od typu układu, w jakim prowadzone były badania (a także od zawartości „wolnych” wiązań O-H). Obserwowane na wykresach niewielkie różnice zawierają się w zakresie odchyień standardowych wartości średnich. Oznacza to, iż struktura kryształu lodu (jego wewnętrzne uporządkowanie) oraz stan jego powierzchni, nie wpływają na kinetykę procesu krzepnięcia.

Na podstawie przedstawionych powyżej wyników można więc stwierdzić, że preferencja w stosunku do formy regularnej lodu w nowo powstającym lodzie nie jest wynikiem różnic w szybkości powstawania obu rozważanych form lodu.

#### 5.1.4. Częstotliwość powstawania lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej w pierwszej warstwie solwacyjnej powierzchni podstawowej lodu

W poprzednim rozdziale poruszone zostało zagadnienie istnienia preferencji w stosunku do formy regularnej w nowo powstającym lodzie. Jak pokazałam, efekt ten nie jest skutkiem różnicy w szybkości powstawania form heksagonalnej i regularnej lodu. Postawić można jednak pytanie, czy wewnętrzna struktura kryształu lodu, na powierzchni którego zachodzi proces krzepnięcia wody, ma wpływ na częstotliwość powstawania tych dwóch form lodu.

Dla układów typu RAND i ASYM wykonałam wykresy zmian średniej zawartości lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej w czasie (Rys. 5.8). Analizę przeprowadziłam w kilku temperaturach w zakresie 250 – 270 K.



Rys. 5.8. Zmiany w czasie średniej zawartości lodu o strukturze heksagonalnej (kolor czerwony), regularnej (kolor niebieski) i pośredniej między fazą stałą i ciekłą (kolor zielony) oraz ciekłej wody (kolor czarny) w pierwszej warstwie solwatacyjnej płaszczyzny podstawowej kryształu lodu. Przedstawione wyniki obrazują zmiany zachodzące w dwóch typach układów: RAND (górny rząd) i ASYM (dolny rząd), symulowanych w kilku temperaturach w zakresie 250 – 265 K. Ciemniejsze i jaśniejsze odcienie kolorów odpowiadają przeciwnym ścianom kryształu lodu – w przypadku układów typu ASYM kolorem ciemniejszym zaznaczone zostały wyniki uzyskane dla płaszczyzny charakteryzującej się zawartością „wolnych” wiązań O-H na poziomie ok. 78%, natomiast kolorem jaśniejszym – zawartością ok. 22%. Dla układów typu RAND zawartość „wolnych” wiązań O-H była na obu powierzchniach lodu podobna i równa ok. 50%. Dla większej przejrzystości, zakres osi OY został zmieniony (w porównaniu do poprzednich wykresów)

Pierwszą obserwacją, jaką można poczynić na podstawie uzyskanych wyników jest odmienne zachowanie się układów typu ASYM i RAND w dwóch najniższych z badanych temperatur, tj. 250 i 257 K. W układach typu RAND, lód o strukturze regularnej pojawiał się wyraźnie częściej niż lód o strukturze heksagonalnej. Jest to rezultat zgodny z dostępnymi danymi literaturowymi, które wskazują na istnienie preferencji względem formy regularnej w nowo powstającym lodzie. W układach typu ASYM sytuacja była odwrotna – zaobserwować można tam wyraźną preferencję w kierunku powstawania lodu heksagonalnego. Co więcej, porównanie rezultatów uzyskanych w przypadku układów ASYM dla powierzchni lodu charakteryzujących się różnymi zawartościami „wolnych” wiązań O-H prowadzi do wniosku, że stosunek zawartości lodu regularnego do heksagonalnego powstającego na powierzchni kryształu nie zależy od stanu tej powierzchni.

Z powyższych obserwacji wynika, że wewnętrzna struktura kryształu lodu posiada pewien wpływ na proces krzepnięcia wody na płaszczyźnie podstawowej tego kryształu.

Jednocześnie, efekt ten wydaje się być niezależny od stanu powierzchni lodu (zawartości „wolnych” wiązań O-H).

W wyższych temperaturach różnice między układami typu ASYM i RAND zanikają. W temperaturze 265 K, stosunek zawartości lodu regularnego i heksagonalnego w obu przypadkach wynosił ok. 1,7. Można przypuszczać, że w temperaturach bliskich temperaturze topnienia lodu, wpływ czynnika decydującego o zmianie preferencji w stosunku do jednej z form lodu w układach typu ASYM, zostaje zminimalizowany na skutek przyspieszenia ruchów termicznych cząstek w układzie. W efekcie, układy te zachowują się w sposób podobny do układów typu RAND. Otwartym pytaniem pozostaje jednak przyczyna zwiększonej częstotliwości powstawania lodu o strukturze heksagonalnej w układach typu ASYM w najniższych z badanych temperatur.

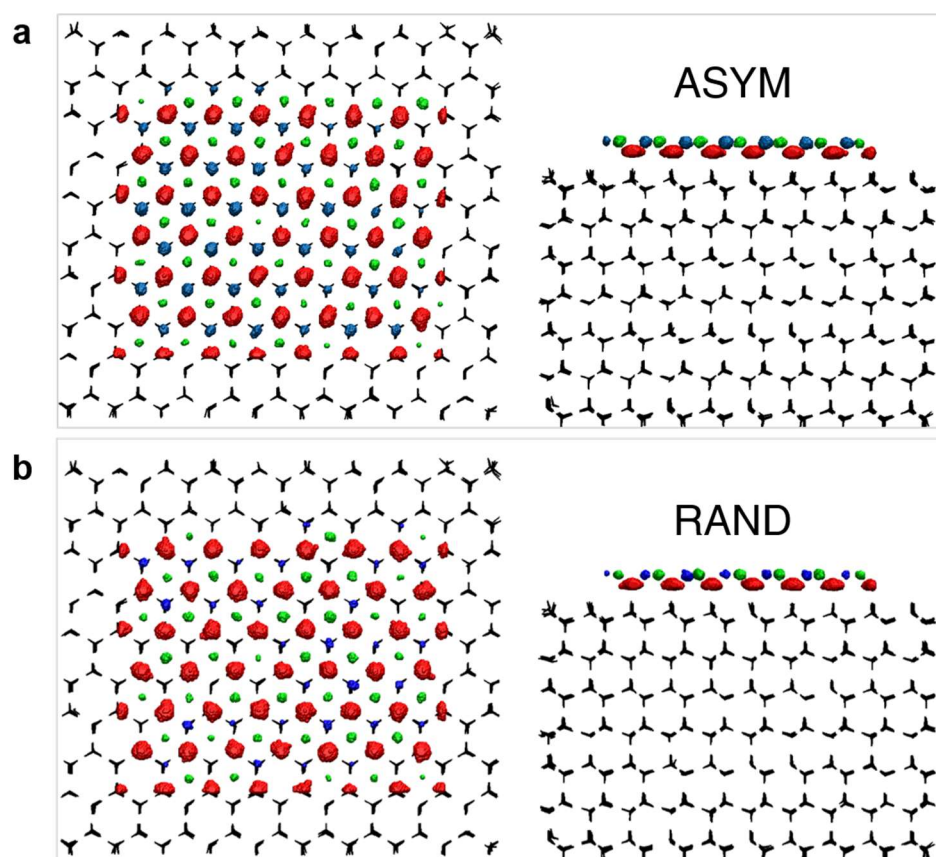
### 5.1.5. Struktura wody solwatacyjnej lodu na wczesnych etapach procesu krzepnięcia i jej wpływ na formę lodu powstającą w tej warstwie

Pokazałam wcześniej, że w przypadku układów symulowanych w temperaturze 250 K struktura lodu, która pojawiała się na płaszczyźnie podstawowej kryształu jako pierwsza, w większości przypadków pozostawała formą dominującą przez cały czas trwania symulacji. Siła napędowa procesu krzepnięcia była w tej temperaturze wystarczająca, aby na powierzchni kryształu, mimo jej niewielkiego rozmiaru, powstały pełne warstwy lodu. W efekcie, końcowa struktura lodu powstającego na płaszczyźnie podstawowej, w dużym stopniu uzależniona była od struktury wody solwatacyjnej na samym początku symulacji. W tak niskiej temperaturze ruchy termiczne cząsteczek wody stają się wolniejsze, co wraz ze znaczną szybkością postępu procesu krzepnięcia powoduje, że struktura ciekłej wody znajdującej się w kontakcie z powierzchnią lodu może się zmienić tylko w ograniczonym zakresie, zanim powstanie lód.

Zgodnie z powyższą argumentacją, analiza struktury ciekłej wody sąsiadującej z powierzchnią lodu (a dokładniej z jego płaszczyzną podstawową) na najwcześniejszych etapach procesu krzepnięcia może dostarczyć przydatnych informacji dotyczących mechanizmu powstawania nowych warstw lodu o strukturze regularnej lub heksagonalnej.

Sposób układania się cząsteczek wody solwatacyjnej lodu zbadałam poprzez znalezienie obszarów nad powierzchnią kryształu, które zajmowane były przez te cząsteczki najczęściej. Analizę przeprowadziłam dla ciekłej wody znajdującej się w odległości do 0,58 nm od płaszczyzny podstawowej lodu (a dokładniej – od płaszczyzny wyznaczonej atomami tlenu cząsteczek wody tworzących powierzchnię lodu), dla pierwszych 0,06 ns symulacji prowadzonych w temperaturze 250 K. Obszar nad powierzchnią kryształu podzieliłam na niewielkie fragmenty, z krokiem równym 0,01 nm, po czym wyznaczyłam średnią liczbę cząsteczek wody znajdujących się w danym

obszarze przestrzeni w trakcie trwania symulacji (biorąc pod uwagę wszystkie układy symulacyjne danego typu). Uzyskane rezultaty przedstawiłam następnie, w sposób graficzny, na Rys. 5.9.



Rys. 5.9. Obszary przestrzeni nad płaszczyzną podstawową kryształu lodu, które zajmowane były najczęściej przez cząsteczki wody w pierwszych 60 ps symulacji w temperaturze 250 K, w układach typu a) ASYM b) i RAND. Kolorem czerwonym oznaczone zostały miejsca typu P1, kolorem niebieskim – P2, a kolorem zielonym – P3. Cząsteczki wody budujące kryształ lodu przedstawione zostały w postaci czarnych linii. Po lewej stronie rysunku zaprezentowany został widok na płaszczyznę podstawową lodu, po prawej natomiast – widok od strony płaszczyzny pryzmatycznej ( $11\bar{2}0$ )

Z powyższego rysunku wynika, że niektóre miejsca w przestrzeni zajmowane były przez cząsteczki wody znajdujące się w warstwie solwatacyjnej lodu częściej niż inne. Obszary te można podzielić na trzy kategorie. Do pierwszej z nich (określanej w dalszej części tekstu jako P1) należą miejsca zlokalizowane najbliżej powierzchni lodu i znajdujące się ponad węzłami sieci krystalicznej lodu heksagonalnego. Cząsteczki wody, które znajdowały się w tych miejscach, były w stanie tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody budującymi najbardziej zewnętrzną warstwę kryształu lodu.

Kolejną grupę miejsc (P2) stanowiły te obszary nad powierzchnią lodu, które znajdowały się nieco dalej od powierzchni lodu niż miejsca P1 i zlokalizowane były ponad pozostałymi węzłami sieci krystalicznej lodu heksagonalnego. Miejsca te zajmowane były przez cząsteczki wody ok. 10 razy rzadziej niż miejsca P1 w trakcie pierwszych 60 ps symulacji. Cząsteczki wody,

które zajmowały miejsca typu P2 były w stanie tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody znajdującymi się w miejscach P1. Lokalizacja obszarów P1 i P2 odpowiadała natomiast położeniom węzłów sieci krystalicznej lodu heksagonalnego, gdyby powstał on w analizowanej warstwie solwatacyjnej.

Do ostatniej grupy obszarów często zajmowanych przez cząsteczki wody należą obszary zlokalizowane ponad środkami sześciocłonowych pierścieni sieci krystalicznej lodu. Podobnie jak miejsca typu P2, obszary te były zlokalizowane w nieco większej odległości od powierzchni lodu niż miejsca P1, były również znacznie od nich rzadziej zajmowane przez cząsteczki wody. Miejsca P3 wraz z miejscami P1 odpowiadają swoją lokalizacją położeniom węzłów sieci krystalicznej lodu o strukturze regularnej, jeśli struktura taka utworzyłaby się w wodzie solwatacyjnej kryształu.

Prawdopodobieństwa zajmowania przez cząsteczki wody obszarów P2 i P3 były nieco różne dla układów typu RAND i ASYM. W przypadku układów RAND, stosunek obsadzeni P3/P2 wynosił ok. 1,96, podczas gdy dla układów ASYM stosunek ten był równy ok. 0,4. Wyniki te stoją w zgodzie z wynikami uzyskanymi w wyniku analizy stosunku zawartości lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej w układach symulacyjnych. Oznacza to, iż sposób, w jaki cząsteczki wody układają się w pobliżu powierzchni lodu na najwcześniejszych etapach procesu krzepnięcia, znajduje odbicie w strukturze lodu powstającego na tej powierzchni.

### 5.1.6. Pole elektryczne generowane przez kryształ lodu

Przeprowadzone dotychczas badania pozwoliły na uzyskanie cennych informacji dotyczących procesu krzepnięcia wody. Jak pokazałam w poprzednim rozdziale, stosunek obsadzeń miejsc P3 i P2 znaleziony dla początkowych etapów procesu krzepnięcia wody na powierzchni lodu, różnił się dla układów symulacyjnych typu ASYM i RAND. Kryształ lodu w układach typu ASYM posiadał płaszczyzny podstawowe, które w sposób wyraźny różniły się od siebie pod względem zawartości „wolnych” wiązań O-H. Mimo tego, stosunek obsadzeni P3/P3 był dla obu stron kryształu lodu podobny – w przypadku powierzchni o małej (22%) i dużej (78%) zawartości „wolnych” wiązań O-H, wielkości te wynosiły odpowiednio 0,42 i 0,39. Oznacza to, iż stan powierzchni, opisany za pomocą zawartości „wolnych” wiązań O-H, nie jest czynnikiem decydującym o zwiększonej częstotliwości powstawania lodu o strukturze heksagonalnej w układach typu ASYM. Wydaje się, iż znaczenie może mieć tu raczej wewnętrzne uporządkowanie całego kryształu lodu.

Fakt istnienia wewnętrznego uporządkowania cząsteczek wody (a dokładniej – ich orientacji) posiada znaczenie z punktu widzenia natężenia i kierunku pola elektrycznego generowanego przez ten kryształ. Pole to powstaje w wyniku sumowania się elektrycznych

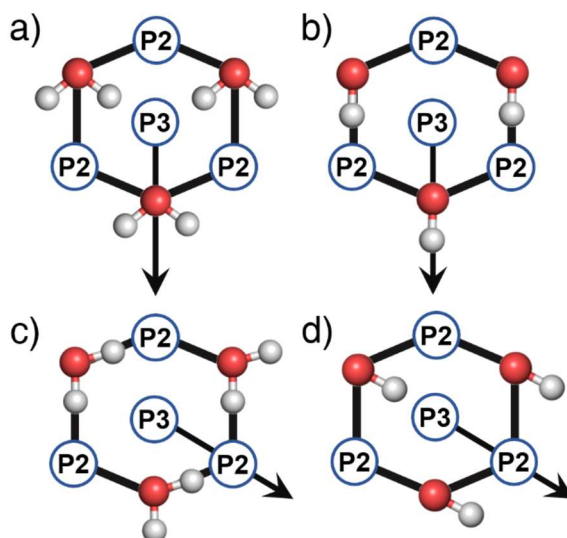
momentów dipolowych cząsteczek wody tworzących lód i generowane było przez kryształy zarówno w układach typu ASYM, jak i RAND (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Średnie natężenie pola elektrycznego generowanego przez kryształ lodu w obszarze trzech pierwszych warstw solwatacyjnych płaszczyzn podstawowych kryształu. W tabeli oddzielnie podane zostały rezultaty uzyskane dla płaszczyzn podstawowych kryształów charakteryzujących się wysoką (78%) i niską (22%) zawartością „wolnych” wiązań O-H. W związku z tym, że obie płaszczyzny podstawowe kryształów w układach typu RAND wykazywały podobną zawartość „wolnych” wiązań O-H, płaszczyzny te poddane zostały analizie wspólnie

	0,17-0,35 nm [V/nm]	0,35-0,58 nm [V/nm]	0,58-0,73 nm [V/nm]
ASYM (22%)	5,8	4,1	3,3
RAND (50%)	5,6	2,2	1,1
ASYM (78%)	7,5	4,5	3,6

Średnie natężenie pola elektrycznego było w obu typach układów porównywalne dla niewielkich odległości od powierzchni lodu (w zakresie od 0,17 do 0,35 nm). W większej odległości od powierzchni lodu, natężenie pola było jednak ok. dwa razy większe w układach typu ASYM, w porównaniu do układów RAND. Co ważne, kierunek średniego wektora pola elektrycznego, wyraźnie różnił się w układach typu RAND i ASYM. W układach RAND wektor ten skierowany był niemal prostopadle do powierzchni lodu, podczas gdy w układach typu ASYM był on skierowany bardziej ukośnie. Składowe średnich wektorów pola, równoległe do powierzchni kryształu, charakteryzowały się więc różnymi długościami. Jest to ważny wniosek, ponieważ orientacje cząsteczek wody zlokalizowanych w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu decydują o formie lodu, jaka może powstać na płaszczyźnie podstawowej kryształu. Jeśli więc generowane przez kryształ lodu pole elektryczne będzie w stanie wpływać na orientacje cząsteczek wody w warstwie solwatacyjnej, będzie również decydować o powstającej w tej warstwie formie lodu.

Wpływ kierunku wektora pola elektrycznego (a dokładniej jego składowej równoległej do płaszczyzny podstawowej lodu), działającego na cząsteczki wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu, na preferencję względem miejsc zajmowanych przez cząsteczki wody w drugiej warstwie solwatacyjnej lodu (P2 lub P3), a tym samym również na preferencję w stosunku do jednej z form lodu, zobrazowany został schematycznie na Rys. 5.10.



Rys. 5.10. Schematyczny rysunek przedstawiający wpływ kierunku pola elektrycznego działającego na cząsteczki wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu na ich orientację względem sieci krystalicznej lodu. Rysunki a) i c) obrazują sytuację, gdy cząsteczki wody należące do najbardziej zewnętrznej warstwy kryształu lodu posiadają „wolne” wiązania O-H, podczas gdy rysunki b) i d) odpowiadają sytuacji, gdy cząsteczki te nie posiadają „wolnych” wiązań O-H. Symbolami P2 i P3 oznaczone zostały położenia miejsc najczęściej zajmowanych przez cząsteczki wody zlokalizowane w drugiej warstwie solwatacyjnej lodu (i odpowiadających położeniom węzłów sieci krystalicznej odpowiednio lodu heksagonalnego i regularnego)

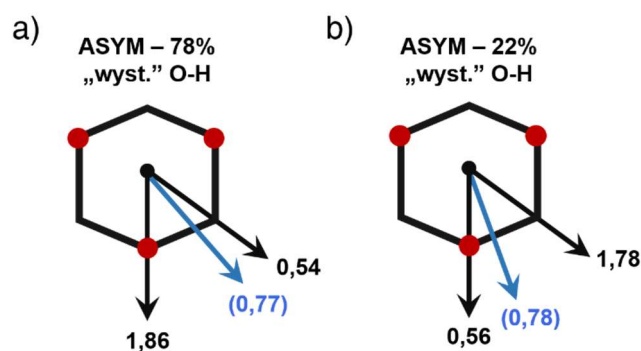
Aby doszło do zakrzepnięcia wody na płaszczyźnie podstawowej lodu, cząsteczki wody znajdujące się w pierwszej warstwie solwatacyjnej kryształu muszą utworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody budującymi najbardziej zewnętrzną warstwę lodu. Jeśli cząsteczka wody należąca do powierzchni lodu posiada „wolne” wiązanie O-H, cząsteczka wody solwatacyjnej układać się będzie z stosunku do niej w taki sposób, że płaszczyzna przechodząca przez wszystkie jej atomy będzie niemal równoległa do powierzchni lodu (Rys. 5.10 a i c). Z kolei w przypadku, gdy cząsteczka wody budująca powierzchnię lodu nie posiada „wolnego” wiązania O-H, jeden z atomów wodoru cząsteczki wody należącej do warstwy solwatacyjnej będzie skierowany w kierunku powierzchni lodu, natomiast płaszczyzna przechodząca przez atomy tej cząsteczki będzie prostopadła do powierzchni lodu (Rys. 5.10 b i d).

Założmy, że wszystkie cząsteczki wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu przyjmą orientację zgodne z kierunkiem działającego na nie pola elektrycznego. Rozważmy następnie dwie skrajne sytuacje, w których składowa wektora pola równoległa do powierzchni lodu skierowana jest w sposób przedstawiony na Rys. 5.10 (tj. w kierunku od środka pierścienia do narożnika, w którym obecny jest atom tlenu cząsteczki wody budującej najbardziej zewnętrzną warstwę lodu - Rys. 5.10 a i b lub od środka pierścienia w kierunku narożnika pierścienia, w którym zlokalizowany jest atom tlenu należący do wewnętrznej warstwy lodu - Rys. 5.10 c i d). Sposób ułożenia cząsteczek wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu (w miejscach P1) będzie w tych dwóch przypadkach zależeć zarówno od kierunku wektora pola elektrycznego, jak i od obecności



„wolnych” wiązań O-H na powierzchni lodu. Jak można zaobserwować na Rys. 5.10, cząsteczki wody zorientowane zgodnie z kierunkiem działającego na nie pola elektrycznego, połączone wiązaniami wodorowymi z cząsteczkami wody tworzącymi powierzchnię lodu, mogą promować powstawanie struktury heksagonalnej (gdy atomy wodoru tych cząsteczek zwrócone są w kierunku miejsc typu P2) lub regularnej (gdy atomy wodoru zwrócone są w kierunku miejsc P3), w zależności od tego, czy zlokalizowane poniżej (budujące powierzchnię lodu) cząsteczki wody posiadają „wolne” wiązania O-H.

Bazując na powyższych rozważaniach można się zastanowić, która ze struktur lodu byłaby preferowana w przypadku badanych przeze mnie układów symulacyjnych typu ASYM, gdyby wszystkie cząsteczki wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej płaszczyzny podstawowej kryształu układały się zgodnie z kierunkiem działającego na nie pola elektrycznego. Analizie poddałam więc sposób rozmieszczenia „wolnych” wiązań O-H na powierzchniach kryształów lodu we wszystkich stu dwudziestu układach symulacyjnych i zakładając, że wszystkie cząsteczki wody w pierwszej warstwie solwatacyjnej (zlokalizowane w miejscach P1) układać się będą zgodnie z kierunkami pola przedstawionymi na Rys. 5.10, oszacowałam preferencję w stosunku do miejsc typu P2 i P3 w drugiej warstwie solwatacyjnej lodu. Uzyskany stosunek obsadzeń miejsc P3 i P2 podany został na Rys. 5.11, obok czarnych wektorów, wskazujących kierunki działania pola.



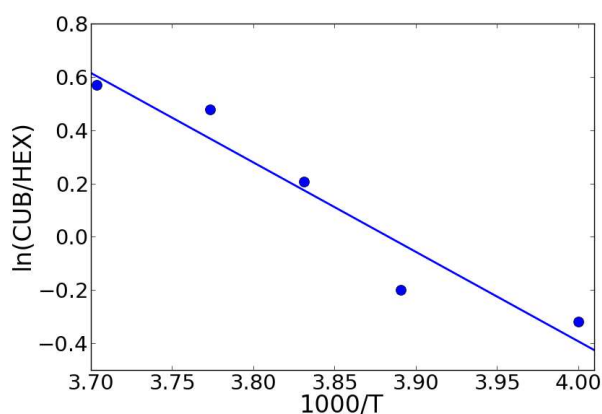
Rys. 5.11. Wpływ kierunku działania pola elektrycznego na średni stosunek liczby miejsc adsorpcji na powierzchni lodu sprzyjających powstawaniu lodu regularnego i heksagonalnego w badanych układach typu ASYM. Kolorem czerwonym oznaczone zostały położenia atomów tlenu cząsteczek wody znajdujących się na powierzchni kryształu lodu. Czarne strzałki wskazują kierunki działania pola elektrycznego, dla których wyznaczony został stosunek liczby miejsc adsorpcji sprzyjających powstaniu formy regularnej i heksagonalnej lodu. Niebieskie strzałki obrazują średni kierunek działania pola elektrycznego w badanych układach typu ASYM, a liczba podana w nawiasie jest szacunkową wartością charakteryzującą stosunek obsadzeń miejsc faworyzujących powstawanie lodu regularnego i heksagonalnego dla pola działającego w tym kierunku

Znając kierunek składowej średniego wektora pola elektrycznego w rzeczywistości generowanego przez kryształy lodu w badanych układach symulacyjnych, równoległej do płaszczyzn podstawowych tych kryształów, oszacowałam następnie stosunek obsadzeń miejsc typu P3 i P2 w analizowanych układach symulacyjnych (oddzielnie dla płaszczyzn charakteryzujących się wysoką oraz niską zawartością „wolnych” wiązań O-H). Uzyskane wyniki, wynoszące w obu

przypadkach ok. 0,8, są porównywalne z rzeczywistym stosunkiem obsadzeń tych miejsc w drugiej warstwie solwacyjnej lodu, wyznaczonym dla układów symulowanych w temperaturze 250 K (Rozdział 5.1.5). Wydaje się więc, iż kierunek wektora pola elektrycznego generowanego przez kryształ lodu, posiada wpływ na prawdopodobieństwo powstania lodu o danej strukturze w warstwie solwacyjnej kryształu.

Jak można było zaobserwować na Rys. 5.8, wzrost temperatury w symulowanych układach prowadził do zwiększania się stosunku zawartości lodu regularnego do heksagonalnego w układach typu ASYM. Oznacza to, iż kierujący wpływ pola elektrycznego (zwiększający prawdopodobieństwo powstawania formy heksagonalnej lodu) był znacznie mniejszy w wyższych temperaturach. O sposobie ułożenia cząsteczek wody w warstwie solwacyjnej lodu wydają się więc decydować dwa czynniki. Jednym z nich jest kierujący wpływ pola elektrycznego, przejawiający się ostatecznie preferencją w stosunku do jednej z dwóch form lodu – czynnik ten nie jest sam w sobie zależny od temperatury. Drugim są natomiast bezwładne ruchy termiczne cząsteczek wody, przeciwdziałające porządkującemu wpływowi pola elektrycznego. Wraz ze wzrostem temperatury, czynnik ten staje się coraz bardziej dominujący.

Jeśli przedstawiona powyżej argumentacja, dotycząca wpływu pola elektrycznego na prawdopodobieństwo powstawania obu form lodu na powierzchni kryształu, jest poprawna, należy oczekiwać, że stosunek zawartości lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej w układach typu ASYM będzie się zmieniał z temperaturą zgodnie z zależnością Arrheniusa. Rezultaty zaprezentowane na Rys. 5.12 pokazują, że jest tak w rzeczywistości.



Rys. 5.12. Zależność od temperatury stosunku średniej zawartości lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej w pierwszej warstwie solwacyjnej lodu w układach typu ASYM, przedstawiona w postaci zależności Arrheniusa.

Wpływ zewnętrznego pola elektrycznego na proces krzepnięcia wody badany był wcześniej zarówno poprzez eksperyment<sup>177-179</sup>, jak i symulacje komputerowe<sup>137,176,180,181</sup>. Niektóre z danych dostępnych w literaturze zdają się stać w sprzeczności z zaprezentowanymi powyżej wnioskami. Uważa się na przykład, że pole elektryczne o natężeniu przekraczającym  $10^9$  V/m



ułatwia nukleację lodu oraz prowadzi do podwyższenia jego temperatury topnienia<sup>176</sup>. Pokazano również<sup>180</sup>, że proces krzepnięcia wody uwięzionej między dwiema gładkimi płytkami i poddanej działaniu pola elektrycznego o natężeniu ok.  $5 \cdot 10^5$  V/m (skierowanego równoległe do powierzchni płytek), prowadzi do powstawania lodu o strukturze regularnej. Co ciekawe, w obszarach układu symulacyjnego, gdzie pole elektryczne nie było obecne, powstawał zarówno lód regularny, jak i heksagonalny.

Przeprowadzone przeze mnie badania w sposób wyraźny różniły się od tych przedstawionych powyżej. W układach poddawanych analizie w ramach tej pracy, pole elektryczne generowane było przez kryształ lodu, który jednocześnie stanowił matrycę dla krzepnącej warstwy wody. Zarówno natężenie, jak i kierunek pola elektrycznego generowanego przez kryształ i działającego na poszczególne cząsteczki wody w warstwie solwatacyjnej lodu mogły się zmieniać, w zależności od lokalnego uporządkowania cząsteczek wody w lodzie. Z tego też względu wydaje się prawdopodobne, że uzyskane przeze mnie wyniki nie są sprzeczne z rezultatami publikowanymi przez innych autorów, zaś wspomniane rozbieżności są wynikiem odmiennych warunków prowadzenia badań.

Jak wspomniałam wcześniej, w układach typu RAND zależność stosunku średniej zawartości lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej lodu od temperatury nie występowała – we wszystkich badanych układach stosunek ten wynosił w przybliżeniu 1,7. Natężenie pola elektrycznego działającego na cząsteczki wody w warstwie solwatacyjnej lodu było podobne do tego, obserwowanego w układach typu ASYM. Zgodnie z argumentacją przedstawioną wcześniej, efekt ten może być związany z różnymi kierunkami wektorów pola elektrycznego generowanego przez kryształ lodu w układach typu ASYM i RAND, a dokładniej z długością jego składowej równoległej do płaszczyzny podstawowej lodu. Przyczyna, dla której lód o strukturze regularnej powstaje w układach typu RAND (a także w rzeczywistych układach) w przewodzie wciąż pozostaje jednak niewyjaśniona. Istnieje możliwość, iż efekt ten związany jest nie tyle z oddziaływaniem krzepnącej warstwy wody z powierzchnią kryształu lodu, co z otaczającą ciekłą wodą<sup>182</sup>.

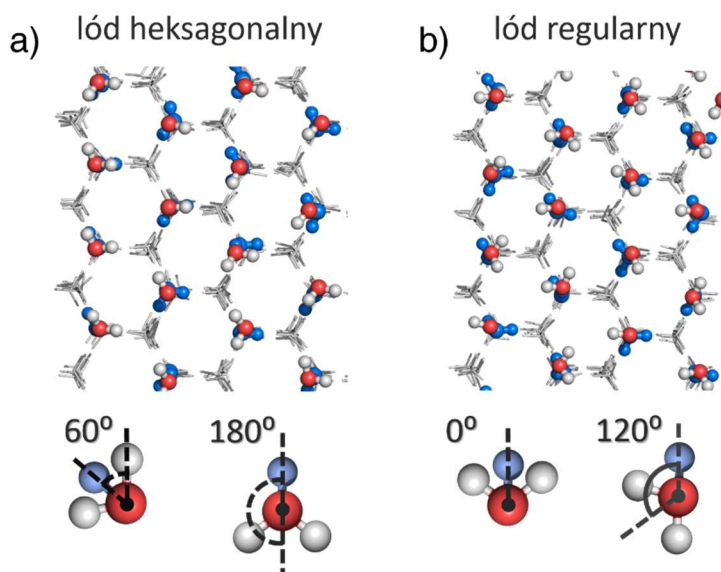
#### 5.1.7. Związek między strukturą ciekłej wody a preferencją w stosunku do lodu regularnego w nowo powstającym lodzie

Dane dostępne w literaturze oraz przedstawione powyżej wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań pokazują, że w nowo powstającym lodzie forma regularna lodu jest preferowana w stosunku do formy heksagonalnej. Prowadzone dotychczas badania, mające na celu wyjaśnienie tej preferencji<sup>92,95,100,101</sup> skupiały się głównie na aspekcie energetycznym procesu krzepnięcia. Poniżej zaprezentowane zostanie odmienne podejście, skupiające się na strukturze ciekłej,

przechłodzonej wody oraz na związku tej struktury z prawdopodobieństwem powstawania w krzepnącej wodzie lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej.

W kryształach lodu, każda cząsteczka wody związana jest wiązaniami wodorowymi z czterema sąsiednimi cząsteczkami. Trzy z tych cząsteczek zlokalizowane są w tej samej warstwie lodu (rozpatrując warstwy prostopadłe do osi  $c$  kryształu), w której znajduje się rozpatrywana cząsteczka centralna. Wzajemne orientacje cząsteczek tworzących te pary są jednakowe w przypadku struktur heksagonalnej i regularnej lodu. Ostatnie z wiązań wodorowych tworzy się między cząsteczką centralną a cząsteczką wody znajdującą się w sąsiedniej warstwie lodu, a wzajemna orientacja tych cząsteczek jest różna dla lodu o strukturze heksagonalnej i regularnej.

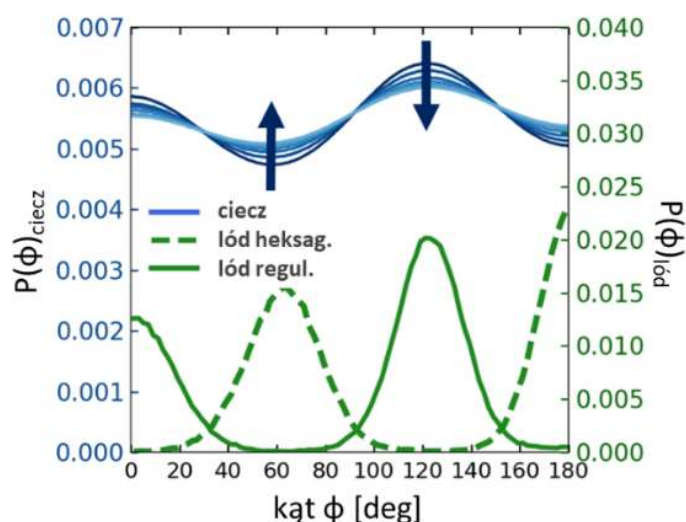
Dogodnym narzędziem pozwalającym na dokonanie analizy wzajemnych orientacji par cząsteczek wody związanych wiązaniami wodorowymi jest wielkość kąta dwuściennego  $\phi$  (jego definicja przedstawiona została w Rozdziale 4.2.1). W idealnym kryształach lodu, kąt  $\phi$  dla cząsteczek wody związanych wiązaniami wodorowymi i leżących w sąsiednich warstwach lodu przyjmuje wartości  $60^\circ$  lub  $180^\circ$  w przypadku lodu heksagonalnego oraz  $0^\circ$  lub  $120^\circ$  w przypadku lodu regularnego (Rys. 5.13).



Rys. 5.13 Sposób układania się cząsteczek wody w dwóch sąsiadujących ze sobą warstwach lodu. Cząsteczki wody, których atom tlenu oznaczony został kolorem czerwonym, a atomy wodoru – kolorem białym, stanowią część najbardziej zewnętrznej warstwy lodu. Bezpośrednio pod nimi znajdują się natomiast cząsteczki wody budujące zewnętrzną część leżącej poniżej warstwy lodu. Cząsteczki czerwono-białe i niebieskie związane są wiązaniami wodorowymi – wielkości kątów dwuściennych odpowiadających tym parom są różne w zależności od struktury lodu. W przypadku lodu heksagonalnego kąty  $\phi$  przyjmują wartości bliskie  $60^\circ$  lub  $180^\circ$ , natomiast dla lodu regularnego wartości te wynoszą ok.  $0^\circ$  lub  $120^\circ$ . Jako punkt odniesienia pokazano na rysunku położenia cząsteczek wody tworzących leżące głębiej warstwy lodu (kolor szary)

W nowo powstającym lodzie, w którym cząsteczki wody nie są jeszcze idealnie uporządkowane, rozkłady wielkości kąta  $\phi$  charakteryzują się stosunkowo dużą szerokością

(Rys. 5.14). Mimo tego, już na tym etapie procesu krzepnięcia zaobserwować można charakterystyczne cechy obu struktur lodu.



Rys. 5.14. Rozkład wielkości kątów dwuściennych  $\phi$  w układach zawierających czystą wodę (niebieskie linie) oraz w nowo powstałych warstwach lodu (kolor zielony) o strukturze heksagonalnej (linia przerywana) oraz regularnej (linia ciągła). Gradient kolorów zastosowany w przypadku wyników dotyczących ciekłej wody obrazuje zmiany rozkładu kątów dwuściennych z temperaturą – linią najjaśniejszą oznaczone zostały rezultaty uzyskane dla wody symulowanej w temperaturze 300 K, natomiast linią najciemniejszą – w temperaturze 250 K (kierunek wzrostu temperatury zaznaczony został również za pomocą strzałek)

Analizę rozkładu kątów  $\phi$  przeprowadzić można również dla ciekłej wody (symulowanej według procedury opisanej w części pracy dotyczącej metodyki badań). Jak można zaobserwować na Rys. 5.14, w ciekłej wodzie występuje preferencja względem pewnych wartości kątów  $\phi$ . Położenia maksimum na tym wykresie odpowiadają wielkościom kątów charakterystycznym dla struktury regularnej lodu. Istnienie obserwowanej preferencji może więc być przyczyną, dla której lód o strukturze regularnej występuje w przewodzie w nowo powstającym lodzie. Ponadto zauważyć można, że obserwowana preferencja staje się bardziej wyraźna wraz z obniżaniem się temperatury wody. Podobny trend występuje w przypadku prawdopodobieństwa powstawania lodu o strukturze regularnej z przechłodzonej wody – im niższa temperatura wody, tym prawdopodobieństwo to staje się wyższe (Rys. 1.4).

Wykorzystując rozkłady kątów  $\phi$  w ciekłej wodzie, oszacować można prawdopodobieństwo, że dwie cząsteczki wody, połączone wiązaniem wodorowym, przyjmą taką wzajemną orientację, jaka pojawia się w lodzie o strukturze regularnej lub heksagonalnej. Aby tego dokonać, funkcje przedstawione na Rys. 5.14 i odpowiadające ciekłej wodzie scałkowałam wokół wielkości kątów charakterystycznych dla obu struktur lodu ( $\pm 10^\circ$  wokół wartości idealnych). Uzyskane prawdopodobieństwa dla badanych temperatur zebrane zostały w Tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Prawdopodobieństwa przyjęcia przez dwie cząsteczki wody (w ciekłej wodzie) związane wiązaniem wodorowym orientacji odpowiadającej orientacji par cząsteczek wody w lodzie o strukturze heksagonalnej ( $p_{hex}$ ) i regularnej ( $p_{cub}$ ) oraz stosunek tych prawdopodobieństw, w różnych temperaturach

Temperatura [K]	$p_{hex}$	$p_{cub}$	$p_{cub}/p_{hex}$
250	0,1440	0,1856	1,2889
260	0,1472	0,1820	1,2365
265	0,1486	0,1806	1,2159
270	0,1494	0,1799	1,2040
280	0,1513	0,1777	1,1744
290	0,1529	0,1761	1,1512
300	0,1539	0,1752	1,1385

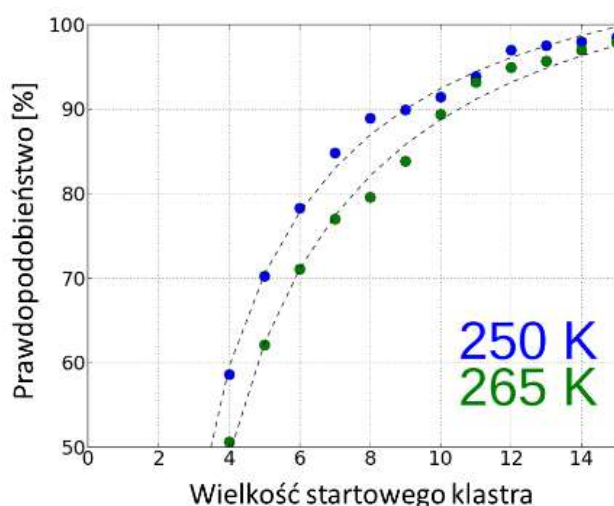
Gdyby każda z par cząsteczek wody związanych wiązaniem wodorowym, o wzajemnej orientacji odpowiadającej jednej ze struktur lodu (w dalszej części pracy określanych odpowiednio jako „hex” – w odniesieniu do lodu heksagonalnego oraz „cub” – w odniesieniu do lodu regularnego), stawała się zarodkiem krystalizacji nowej warstwy lodu na powierzchni kryształu, wtedy stosunek prawdopodobieństw zaprezentowanych w Tabeli 5.2 powinien odpowiadać stosunkowi prawdopodobieństw powstawania lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej. Sytuacja wygląda jednak inaczej – jak pokazali Choi i in.<sup>106</sup>, w trakcie tworzenia się nowej warstwy lodu na płaszczyźnie podstawowej lodu dochodzi do rywalizacji klastrów cząsteczek wody będących zarodkami struktury heksagonalnej i regularnej. Jedynie klastry o wystarczającej wielkości mają szansę stać się zarodkami nowej warstwy lodu. W dalszej części badań podjęłam więc próbę oszacowania minimalnej wielkości takiego klastra.

Do badań wykorzystałam układy zbudowane z kryształu lodu zanurzonego w ciekłej wodzie (przygotowane według procedury opisanej w Rozdziale 3.2.5). W każdym ze stu dwudziestu układów symulowanych w temperaturach 250 i 265 K sprawdziłam, jak zmienia się zawartość cząsteczek wody związanych wiązaniami wodorowymi z płaszczyzną podstawową kryształu i przyjmujących orientacje (względem cząsteczek wody w lodzie) podobne do tych obserwowanych w lodzie heksagonalnym i regularnym. Na tej podstawie, poszczególne cząsteczki wody solwatacyjnej przypisane zostały do jednej z trzech klas: „hex”, „cub” lub „inne”. Jako kryterium podobieństwa wykorzystałam wielkość kąta  $\phi$  tworzącego się między cząsteczkami wody w warstwie solwatacyjnej kryształu oraz cząsteczkami wody w lodzie. Cząsteczki ciekłej wody przypisywane były do klas „cub” lub „hex” jeśli wielkość kąta  $\phi$  zawarta była w przedziale  $\pm 10^\circ$  wokół wartości charakterystycznych dla obu struktur. Z kolei cząsteczki wody niespełniające tego kryterium przypisywane były do klasy „inne”. Dzięki takiemu postępowaniu, ze wszystkich

cząsteczek wody solwujących płaszczyzny podstawowe kryształu lodu wybrane zostały te, które posiadały optymalną orientację, aby stać się częścią zarodka nowej warstwy lodu o danej strukturze. Na koniec wyznaczona została wielkość klastrow składających się z cząsteczek wody solwacyjnej przypisanych do klas „cub” i „hex” na różnych etapach symulacji, we wszystkich analizowanych układach symulacyjnych.

W celu oszacowania wielkości klastra, który stanowi zarodek nowej warstwy lodu, zastosowałam następujące postępowanie. W przypadku każdego układu symulacyjnego znalazłam moment czasu, w którym klastr o wielkości  $N$  cząsteczek pojawiał się po raz pierwszy. Następnie, porównałam strukturę tego klastra (strukturę początkową) ze strukturą lodu obecnego w rozważanej warstwie solwacyjnej po zakończeniu symulacji. Na tej podstawie oszacowałam prawdopodobieństwo powstania nowej warstwy lodu o strukturze odpowiadającej strukturze startowego klastra, dla klastrow składających się z  $N$  cząsteczek wody.

Opisaną powyżej procedurę zastosowałam dla wielkości klastra ( $N$ ) w zakresie od czterech do piętnastu cząsteczek wody, a wyniki zaprezentowałam na Rys. 5.15.



Rys. 5.15. Zależność prawdopodobieństwo powstania nowej warstwy lodu o strukturze zgodnej ze strukturą startowego klastra od wielkości tego klastra, w temperaturach 250 i 265 K

Uzyskane wyniki wskazują, że prawdopodobieństwo powstania warstwy lodu o strukturze takiej samej jak struktura startowego klastra rośnie wraz ze wzrostem wielkości tego klastra. Zgodnie z oczekiwaniami, rezultaty uzyskane dla dwóch różnych temperatur nieco się od siebie różnią. Prawdopodobieństwa uzyskane w układach symulowanych w wyższej temperaturze były niższe dla tych samych wielkości startowego klastra. Bazując na uzyskanych wynikach przyjąłam, że minimalna wielkość klastra może zostać oszacowana na 9 i 10 cząsteczek wody, odpowiednio dla temperatur 250 i 265 K, co odpowiada prawdopodobieństwu powstania pełnej warstwy lodu o strukturze odpowiadającej strukturze startowego klastra bliskiemu lub wyższemu niż 90%. Wielkości te wykorzystałam następnie w dalszej części analizy.

Jeśli struktura ciekłej wody (opisana za pomocą rozkładu wielkości kątów  $\phi$ ) jest odpowiedzialna za preferencję w stosunku do lodu o strukturze regularnej w nowo powstającym lodzie, efekt ten powinno się dać zaobserwować za pomocą prostego modelu statystycznego.

Aby to sprawdzić, zbudowana została matryca, która odtwarzała położenia węzłów sieci krystalicznej płaszczyzny podstawowej lodu heksagonalnego (która jest identyczna jak płaszczyzna (111) lodu regularnego). Wielkość tej matrycy była taka sama jak wielkość płaszczyzny podstawowej kryształów lodu w badanych wcześniej układach symulacyjnych. Założono, że – tak jak ma to miejsce w rzeczywistych układach – każdy z tych węzłów może utworzyć jedno wiązanie wodorowe z cząsteczką ciekłej wody. W następnym kroku do każdego węzła przypisana została cząsteczka ciekłej wody, której orientacja („cub”, „hex” lub „inne”) nadana została na podstawie prawdopodobieństw uzyskanych w trakcie analizy struktury przechłodzonej wody (Tabela 5.2). Po przypisaniu wszystkim cząsteczkom orientacji, wyznaczone zostały wielkości klastrów o strukturze „cub” i „hex”, które utworzyły się na powierzchni matrycy.

Jak argumentowałam wcześniej, pojawienie się na powierzchni lodu klastra o minimalnej wielkości (wyznaczonej wcześniej) determinuje dalszy proces krzepnięcia, prowadząc do powstania warstwy lodu o takiej samej strukturze jak struktura startowego klastra. Na tej podstawie, wielokrotnie powtarzając opisaną powyżej procedurę w celu uzyskania wiarygodnej statystyki oraz przyjmując minimalne wielkości klastra równe 9 i 10 dla temperatur 250 i 265 K, oszacowałam prawdopodobieństwa powstania minimalnego klastra (a tym samym warstwy lodu) o strukturze regularnej, które wynosiły 84 i 82%, odpowiednio w temperaturze 250 i 265 K.

Zgodnie z oczekiwaniami, prawdopodobieństwo powstania lodu o strukturze regularnej przewidziane przez model jest wyższe niż prawdopodobieństwo powstania lodu o strukturze heksagonalnej. Uzyskane wyniki są jednak nieco wyższe niż wartości eksperymentalne (Rys. 1.4). Fakt ten nie powinien jednak dziwić biorąc pod uwagę, że zaproponowany model jest bardzo prosty i bierze pod uwagę tylko jeden czynnik mający wpływ na orientacje cząsteczek wody w warstwie solwatacyjnej lodu, mianowicie prawdopodobieństwo przyjęcia przez pary cząsteczek wody pewnych wzajemnych orientacji. Z drugiej jednak strony model spełnił swoją funkcję, pokazując, że już niewielkie różnice w rozkładzie prawdopodobieństwa wielkości kątów  $\phi$  w ciekłej wodzie mogą przełożyć się na znaczące różnice w zawartości lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej w nowo powstającym lodzie. W świetle tych ograniczeń, wartości przewidziane przez model stosunkowo dobrze odpowiadają rzeczywistej zawartości lodu o obu strukturach w nowo tworzących się kryształach (Rys. 1.4).



### 5.1.8. Podsumowanie

Głównym celem tej części przeprowadzonych przeze mnie badań było poznanie szczegółów procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu. Był to pierwszy, wstępny etap badań zmierzających w kierunku poznania mechanizmu oddziaływania białek przeciwdziałających zamarzaniu z powierzchnią lodu. W literaturze pojawiają się odmienne, a czasem nawet sprzeczne ze sobą informacje dotyczące procesu krzepnięcia wody. Ponadto, wiele z dostępnych danych dotyczy warunków znacznie odbiegających od warunków funkcjonowania białek przeciwdziałających zamarzaniu.

Kryształ lodu, mimo posiadania uporządkowanej sieci krystalicznej, charakteryzuje się wewnętrznym nieuporządkowaniem położenia atomów wodoru cząsteczek wody. Na skutek tego nieuporządkowania, również powierzchnia lodu, a więc obszar, który bezpośrednio oddziałuje z białkami AFP, może posiadać zróżnicowaną strukturę. W literaturze można znaleźć prace, które sugerują, że stan powierzchni lodu może mieć wpływ na proces adsorpcji cząsteczek wody na tej powierzchni. Badania te dotyczą jednak sytuacji, gdy kryształ lodu znajduje się w próżni, i jedynie kilka pojedynczych cząsteczek wody może oddziaływać z jego powierzchnią.

Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że stan powierzchni lodu nie ma wielkiego znaczenia z punktu widzenia procesu krzepnięcia, gdy kryształ lodu zanurzony jest w ciekłej wodzie. W wyniku procesu krzepnięcia wody, na płaszczyźnie podstawowej lodu tworzyć się może lód o strukturze heksagonalnej lub regularnej. Ważnym czynnikiem mającym wpływ na częstotliwość powstawania tych dwóch form lodu, szczególnie przy dużym stopniu przechłodzenia wody, wydaje się być obecność pola elektrycznego generowanego przez kryształ lodu (a dokładniej – jego kierunek). Fakt ten należy wziąć więc pod uwagę planując eksperymenty, w których efekt ten może odgrywać istotną rolę.

Mógłby to być również ważny aspekt mojej pracy, zważywszy, że cząsteczka badanego przeze mnie białka CfAFP posiada własny moment dipolowy. Dotychczas w literaturze nie był brany pod uwagę wpływ pola elektrycznego na mechanizm funkcjonowania białek z grupy AFP. Zauważyć jednak należy, że natężenie pola elektrycznego generowanego przez moment dipolowy cząsteczki białka CfAFP jest znacznie mniejsze (o rzędy wielkości) w stosunku do tego obserwowanego w Tabeli 5.1. Tym samym uzyskane przeze mnie wyniki pozwalają na w pełni uzasadnione pominięcie czynnika związanego z oddziaływaniem momentu dipolowego cząsteczki białka na mechanizm jego (przeciwdziałającej zamarzaniu) funkcjonalności biologicznej.

Analiza szybkości krzepnięcia wody na płaszczyznach podstawowej i pryzmatycznej (10 $\bar{1}$ 0) potwierdziła wyniki uzyskane wcześniej przez innych badaczy. Proces krzepnięcia postępował w pobliżu płaszczyzny pryzmatycznej wyraźnie szybciej niż w przypadku płaszczyzny podstawowej. Ponadto pokazałam, że stan powierzchni lodu oraz wewnątrz uporządkowanie

kryształu lodu (a co za tym idzie obecność pola elektrycznego) nie ma wpływu na szybkość procesu krzepnięcia.

Analiza strukturalna przeprowadzona dla ciekłej wody oraz nowo powstałego lodu pozwoliła na znalezienie związku między strukturą cieczy a prawdopodobieństwem powstawania w przechłodzonej wodzie lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej. Za pomocą prostego modelu udało się potwierdzić, że tendencja par cząsteczek w ciekłej wodzie (połączonych wiązaniami wodorowymi) do przyjmowania pewnych wzajemnych orientacji, może być przyczyną obserwowanej preferencji względem formy regularnej w nowo powstającym lodzie.

Podsumowując, przedstawione powyżej rezultaty pozwalają nie tylko na lepsze zrozumienie procesu krzepnięcia wody na powierzchni lodu oraz jego zależności od budowy kryształu, ale zwracają również uwagę na konieczność starannego przygotowania kryształu lodu używanego w badaniach metodami symulacji komputerowych.

## 5.2. Badanie mechanizmu oddziaływania cząsteczki białka CfAFP z powierzchnią lodu

### 5.2.1. Budowa układów symulacyjnych

Jednym z wniosków wynikających z badań nad mechanizmem krzepnięcia wody na powierzchni lodu jest fakt, że konstrukcja kryształu lodu (jego uporządkowanie wewnętrzne, a co za tym idzie – charakterystyka generowanego przez niego pola elektrycznego) ma wpływ na proces krzepnięcia pobliskiej wody.

Można się spodziewać, że kryształy lodu charakteryzujące się dalekozasięgowym uporządkowaniem orientacji cząsteczek wody będą występować w naturze bardzo rzadko. Lokalnie, uporządkowanie takie może jednak występować, co skutkować będzie pojawianiem się pola elektrycznego wpływającego na strukturę pobliskiej (ciekłej) wody. Aby ograniczyć wpływ tego efektu na uzyskiwane wyniki, kryształy lodu znajdujące się w układach symulacyjnych wykorzystanych w tej części badań, poddałam procedurze randomizacji (dokładny opis procedury przygotowania układów zamieszczony został w Rozdziale 3.2.5).

Jak to zostało opisane w szczegółach w rozdziale poświęconym procedurze symulacyjnej, w badaniach wykorzystywałam trzy typy układów: układy zbudowane z kryształu lodu zanurzonego w ciekłej wodzie, układy, w których umieszczonych zostało sześć cząsteczek białka CfAFP w odległości około 1,1 nm od powierzchni lodu, a białka te zwrócone były obszarami aktywnymi (cząsteczki białka zlokalizowane w pobliżu płaszczyzn podstawowych i pryzmatycznych  $(10\bar{1}0)$ ) lub nieaktywnymi (cząsteczki białka sąsiadujące z płaszczyznami pryzmatycznymi  $(11\bar{2}0)$ ) w kierunku lodu oraz układy zawierające cząsteczki białka CfAFP zanurzone w ciekłej wodzie.

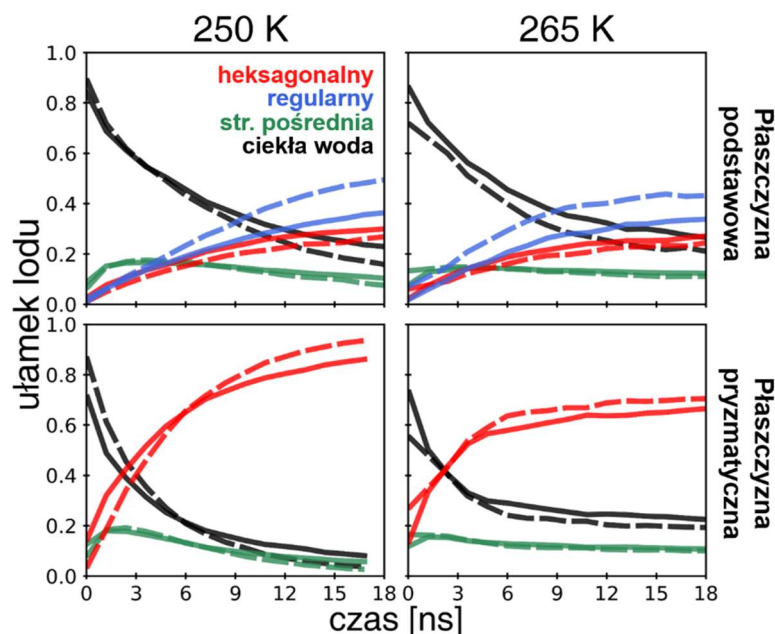
Wszystkie układy poddane zostały symulacjom w takich samych warunkach, aby możliwe było porównanie uzyskanych wyników między układami różnego typu. Poniżej zaprezentowane zostały rezultaty przeprowadzonej analizy.

### 5.2.2. Wpływ obecności cząsteczki białka CfAFP na proces krzepnięcia wody na powierzchni lodu

Badania pokazały, że właściwości wody znajdującej się w sąsiedztwie powierzchni lodu (wody solwatacyjnej) różnią się od właściwości czystej wody (niezaburzonej obecnością lodu). Badania przeprowadzone metodami eksperymentalnymi<sup>183</sup> i symulacje komputerowe<sup>184,185</sup> wskazują, że zasięg zmian wywołanych obecnością fazy stałej może sięgać nawet dwóch nanometrów. Także woda solwatacyjna białek (w tym również białek przeciwdziałających zamarzaniu) posiada inne właściwości strukturalne niż czysta woda. W tym przypadku pokazano<sup>142,186–188</sup>, że zmiany obserwuje się do odległości ok. 1 nm od powierzchni białka. W efekcie, kiedy białko CfAFP znajdzie się w niewielkiej odległości od powierzchni lodu, warstwy solwatacyjne białka i lodu mogą zacząć się nakładać już przy odległości białko-lód przekraczającej ok. 2 nm.

Jeden z zaproponowanych w literaturze mechanizmów funkcjonowania białek przeciwdziałających zamarzaniu<sup>50,68</sup> zakłada, że proces krzepnięcia ciekłej wody znajdującej się w obszarze między powierzchnią aktywną białka i lodem jest ułatwiony w porównaniu do wody niezaburzonej obecnością białka. Aby to sprawdzić przeprowadziłam analizę zmian w czasie średniej zawartości lodu w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu (w odległości do 0,35 nm od jego powierzchni), w obecności i pod nieobecność cząsteczek białka CfAFP (Rys. 5.16). Tak jak poprzednio, zawartość lodu monitorowana była z wykorzystaniem algorytmu CHILL+<sup>171</sup>. Badania przeprowadzone zostały dla układów symulowanych w dwóch temperaturach, mianowicie 250 K i 265 K. Odległość cząsteczek białka od powierzchni lodu była we wszystkich układach bliska 1,1 nm.

Na podstawie danych zaprezentowanych na Rys. 5.16 wyciągnąć można dwa wnioski. Po pierwsze, obecność cząsteczki białka CfAFP w pobliżu powierzchni lodu nie skutkowało zwiększeniem szybkości postępu procesu krzepnięcia wody na powierzchni tego kryształu, w porównaniu do układów niezawierających cząsteczek białka. Przeciwnie, wydaje się nawet, że proces ten postępował nieco wolniej. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy może być spowolnienie ruchliwości cząsteczek wody uwięzionych między dwiema, charakteryzującymi się stosunkowo dużym rozmiarem, powierzchniami<sup>187,189</sup>.



Rys. 5.16. Zmiany w czasie średniej zawartości lodu o strukturze heksagonalnej (kolor czerwony), regularnej (kolor niebieski) i pośredniej między fazą stałą i ciekłą (kolor zielony) oraz ciekłej wody (kolor czarny) w pierwszej warstwie solwatacyjnej płaszczyzny podstawowej i przyrząmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) kryształu lodu, w przypadku, gdy w pobliżu kryształu lodu obecne są cząsteczki białka CfAFP (linie ciągłe) oraz gdy białko nie jest obecne (linie przerywane). Odległość cząsteczek białka od powierzchni lodu wynosiła ok. 1,1 nm

Drugi wniosek dotyczy częstotliwości powstawania w pobliżu płaszczyzny podstawowej kryształu formy heksagonalnej i regularnej lodu. Obecność cząsteczki białka w zauważalny sposób zmieniła stosunek zawartości obu form w pierwszej warstwie solwatacyjnej lodu – częstotliwość powstawania formy heksagonalnej uległa zwiększeniu.

Jedną z możliwych przyczyn obserwowanych różnic może być odmienna struktura wody solwatacyjnej białka CfAFP w porównaniu ze strukturą wody solwatacyjnej lodu. Nakładanie się warstw solwatacyjnych oddziałujących ze sobą powierzchni prowadziłyby w efekcie do zmiany struktury wody w całym obszarze przestrzeni między cząsteczką białka i lodem. Aby sprawdzić, czy efekt ten faktycznie występuje, przeprowadziłam analizę zmian strukturalnych zachodzących w wodzie solwatacyjnej białka na skutek obecności w jego otoczeniu kryształu lodu – wyniki tej analizy przedstawiłam w kolejnej części tej pracy.

### 5.2.3. Zmiany strukturalne zachodzące w wodzie solwatacyjnej białka CfAFP i lodu w czasie

Przeprowadzenie analizy zmian strukturalnych zachodzących w wodzie solwatacyjnej lodu oraz białka CfAFP wymaga zastosowania takiego narzędzia, które będzie możliwe do zastosowania w obu tych przypadkach. Algorytm CHILL+, który z powodzeniem wykorzystany został przeze mnie do obserwacji postępu procesu krzepnięcia wody będącej w kontakcie z lodem,

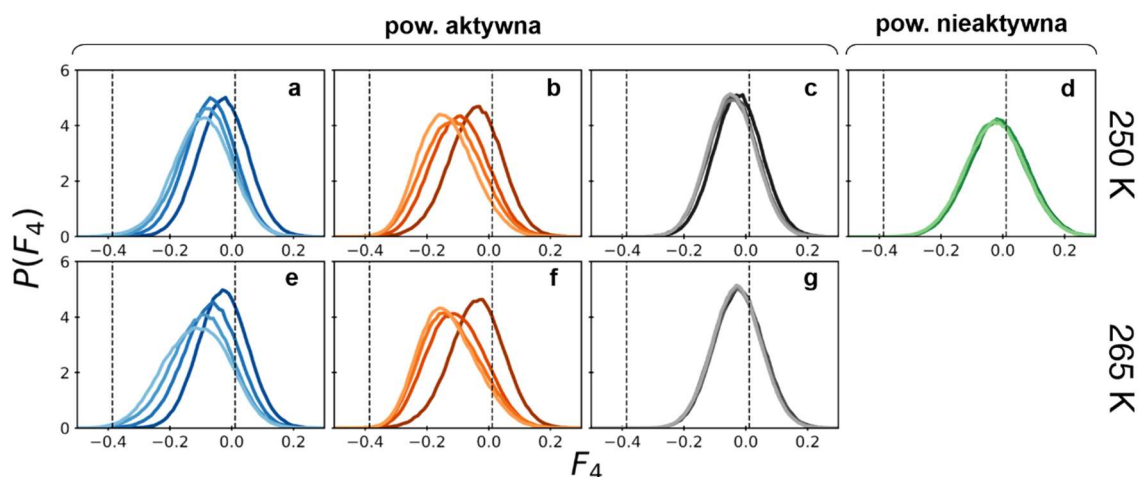
zawodzi w przypadku analizy wody solwatacyjnej białka. Konstrukcja tego parametru opiera się na analizie otoczenia poszczególnych cząsteczek wody, o zasięgu do dwóch warstw solwatacyjnych od cząsteczki centralnej. Obecność cząsteczki białka sprawia więc, że rezultaty uzyskiwane za pomocą tego algorytmu są niepoprawne (jest to wynik obecności tzw. „wykluczonej objętości” – zagadnienie to dyskutowane było w Rozdziale 4.3).

W związku z powyższym, analiza przeprowadzona została z wykorzystaniem innych parametrów opisujących strukturę wody – parametru  $F_4^{172-174}$ , który pozwala uzyskać informację na temat wzajemnej orientacji par cząsteczek wody połączonych wiązaniami wodorowymi w całej warstwie solwatacyjnej, oraz energii oddziaływań między cząsteczką wody i jej najbliższym otoczeniem (definicje obu parametrów zostały przedstawione w Rozdziale 4.2.2). Należy jednak zaznaczyć, że parametry te są mniej czułe na zmiany strukturalne niż algorytm CHILL+. W związku z tym istnieje możliwość, że różne uporządkowania strukturalne mogą być charakteryzowane przez podobne wartości wybranych parametrów. Mimo tych zastrzeżeń, zarówno parametr  $F_4$ , jak i średnia energia oddziaływań cząsteczki wody z otoczeniem, stanowią przydatne narzędzia umożliwiające dokonanie opisu właściwości strukturalnych wody solwatacyjnej.

#### **A. Wpływ obecności kryształu lodu na strukturę wody solwatacyjnej cząsteczki białka CfAFP**

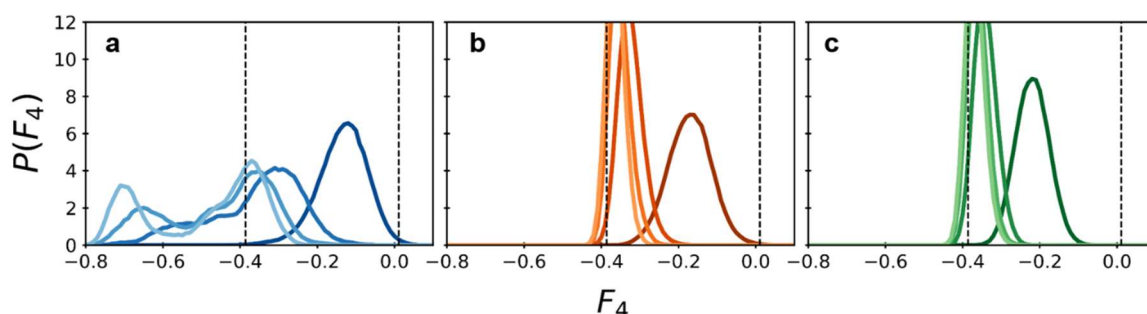
Analiza struktury wody solwatacyjnej białka CfAFP z wykorzystaniem parametru  $F_4$  przeprowadzona została w obszarze do 0,4 nm od powierzchni białka (lub lodu), oddzielnie dla obszarów aktywnego oraz nieaktywnego białka. Uzyskane rezultaty, w formie średnich rozkładów wartości parametru  $F_4$ , przedstawione zostały na Rys. 5.17.

Pierwsze dwa wykresy w każdym wierszu obrazują zmiany średniego rozkładu wartości parametru  $F_4$  w warstwie solwatacyjnej cząsteczki białka CfAFP zwróconej powierzchnią aktywną w kierunku płaszczyzny podstawowej i pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Na wykresach zaobserwować można, że maksimum rozkładu przesuwało się wraz z upływem czasu w kierunku bardziej ujemnych wartości parametru. Jak wspomniałam przy okazji przedstawiania definicji parametru  $F_4$ , wartości bliskie zera odpowiadają strukturze ciekłej wody, natomiast wartości ujemne wskazują na obecność bardziej uporządkowanej, przypominającej lód, struktury.



Rys. 5.17. Zmiany w czasie średnich rozkładów wartości parametru  $F_4$  dla warstw solwacyjnych powierzchni aktywnej i nieaktywnej cząsteczki białka CfAFP. Na wykresach a) oraz e) przedstawione zostały wyniki uzyskane dla wody solwacyjnej powierzchni aktywnej sąsiadującej z płaszczyzną podstawową lodu, na wykresach b) oraz f) – dla wody solwacyjnej powierzchni aktywnej sąsiadującej z płaszczyzną pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ), natomiast na wykresach c) i g) – dla wody solwacyjnej powierzchni aktywnej, która nie sąsiadowała z lodem. Na wykresie d) przedstawione zostały wyniki uzyskane dla wody solwacyjnej obszaru nieaktywnego białka CfAFP, który sąsiaduje z płaszczyzną pryzmatyczną ( $11\bar{2}0$ ) lodu. Skala kolorystyczna obrazuje zmiany zachodzące w warstwach solwacyjnych w czasie: najciemniejsze linie obrazują średni rozkład wartości parametru  $F_4$  na początku symulacji, natomiast najjaśniejsze – po 18 ns symulacji. Dla porównania na wykresach zaznaczone zostały liniami przerywanymi średnie wartości parametru  $F_4$  dla ciekłej wody (0,011) oraz lodu heksagonalnego (-0,384), wyznaczone przez innych badaczy<sup>173</sup>

Podobny kierunek zmian zaobserwować można również badając strukturę warstwy solwacyjnej kryształu lodu (Rys. 5.18). W tym przypadku, proces postępował jednak znacznie szybciej. Ponadto, średni rozkład wartości parametru  $F_4$  uzyskany dla wody solwacyjnej płaszczyzny podstawowej lodu posiadał dwa maksima – jest to wynik powstawania w badanych układach lodu o strukturze regularnej i heksagonalnej.



Rys. 5.18. Zmiany w czasie średnich rozkładów wartości parametru  $F_4$  w pierwszej warstwie solwacyjnej kryształu lodu. Na wykresach przedstawione zostały wyniki uzyskane dla warstw solwacyjnych płaszczyzn a) podstawowej, b) pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) oraz c) pryzmatycznej ( $11\bar{2}0$ ). Skala kolorystyczna obrazuje zmiany zachodzące w warstwach solwacyjnych w czasie: najciemniejsze linie obrazują średni rozkład wartości parametru  $F_4$  na początku symulacji, natomiast najjaśniejsze – po 18 ns symulacji. Dla porównania na wykresach zaznaczone zostały liniami przerywanymi średnie wartości parametru  $F_4$  dla ciekłej wody (0,011) oraz lodu heksagonalnego (-0,384), wyznaczone przez innych badaczy<sup>173</sup>

Rezultaty uzyskane dla wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP, które nie sąsiaduje z powierzchnią lodu są odmienne. W tym przypadku (wykresy c i g na Rys. 5.17) nie obserwuje się zmian średnich rozkładów parametru  $F_4$  w czasie. Podobne zachowanie zaobserwować można również w warstwie solwatacyjnej obszarów nieaktywnych białka (wykres d na Rys. 5.17).

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że obecność kryształu lodu w niewielkiej odległości (ok. 1,1 nm) od powierzchni wiążącej białka CfAFP wpływa na strukturę wody solwatacyjnej tej powierzchni. Kierunek obserwowanych zmian, tj. stopniowe upodobnianie się struktury wody solwatacyjnej do struktury lodu, pozwala przypuszczać, że białko jest w stanie związać się z powierzchnią lodu na skutek „przymarznienia” do powierzchni kryształu. Zmiany strukturalne nie zachodzą jednak tak szybko, jak na w wodzie solwatacyjnej kryształu lodu.

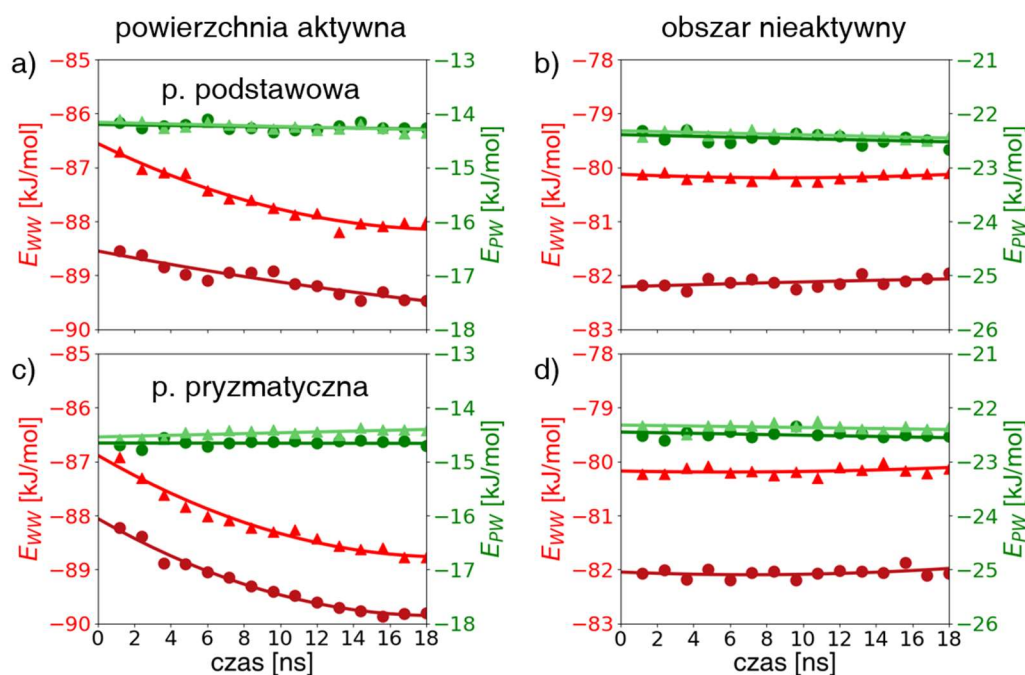
### **B. Średnia energia oddziaływania cząsteczki wody w warstwie solwatacyjnej z najbliższym otoczeniem**

Podobnie jak w przypadku badań z wykorzystaniem parametru  $F_4$ , energia oddziaływań cząsteczek wody solwatacyjnej z otoczeniem wyznaczona została dla cząsteczek znajdujących się w odległości do 0,4 nm od powierzchni białka. Analiza przeprowadzona została dla tych cząsteczek białka, które zwrócone były powierzchniami aktywnymi w kierunku płaszczyzn podstawowej i przyrządycznej ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Uzyskane rezultaty przedstawione zostały na Rys. 5.19, oddzielnie dla wody solwatacyjnej obszaru aktywnego i nieaktywnego białka.

W przypadku warstwy solwatacyjnej obszarów nieaktywnych cząsteczek białka CfAFP, średnia energia oddziaływań cząsteczki wody z otoczeniem nie była zależna od czasu (Rys. 5.28 b i d). Średnia energia oddziaływań cząsteczki wody z atomami białka ( $E_{PW}$ ) okazała się być w tym przypadku niższa od średniej energii oddziaływań wyznaczonej dla wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka. Rezultaty te potwierdzają, że obszary nieaktywne białka charakteryzują się wyższą hydrofilowością.

Rezultaty uzyskane dla wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka różniły się w zależności od tego, czy powierzchnia ta sąsiadowała z powierzchnią lodu czy też nie. Gdy kryształ lodu był nieobecny, energie oddziaływań  $E_{PW}$  i  $E_{WW}$  pozostawały stałe w czasie, podobnie jak miało to miejsce w przypadku wody solwatacyjnej obszarów nieaktywnych. Z kolei w sytuacji, gdy powierzchnia wiążąca sąsiadowała z powierzchnią lodu, średnia energia oddziaływań  $E_{WW}$  obniżała się wraz z upływem czasu, natomiast średnia energia oddziaływań cząsteczki wody z atomami białka wciąż pozostawała od czasu niezależna. Brak zmian wartości energii  $E_{PW}$  w czasie, gdy cząsteczka białka sąsiaduje z powierzchnią lodu może oznaczać, że struktura części warstwy solwatacyjnej znajdującej się w bezpośrednim kontakcie z atomami powierzchni wiążącej białka jest w pewien sposób „uformowana” jeszcze zanim białko znajdzie się w sąsiedztwie lodu,

a co za tym idzie nie zmienia się w dużym stopniu w trakcie procesu wiązania się cząsteczki białka z lodem.

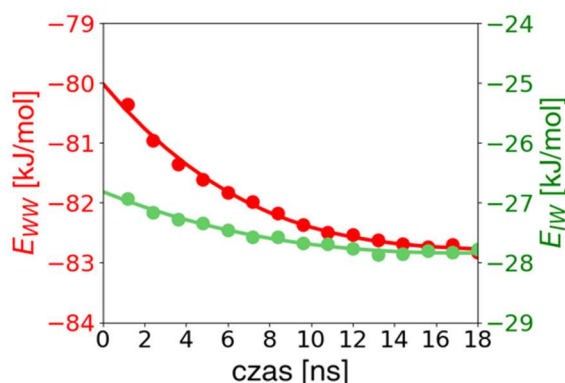


Rys. 5.19. Zmiany w czasie średniej energii oddziaływań cząsteczki wody zlokalizowanej w warstwie solwacyjnej białka CfAFP z otaczającą wodą (czerwone punkty) oraz z powierzchnią białka (zielone punkty). Średnie energie oddziaływań wyznaczone zostały oddzielnie dla wody solwacyjnej powierzchni aktywnej białka (lewa kolumna, rys. a) i c)) i wody solwacyjnej obszaru nieaktywnego białka (prawa kolumna, rys. b) i d)). Analizie poddano układy, w których cząsteczki białka zwrócone były powierzchnią aktywną w kierunku płaszczyzn podstawowej (górny wiersz, a) i b)) i pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) lodu (dolny wiersz, c) i d)). Przedstawione rezultaty dotyczą symulacji prowadzonych w dwóch temperaturach: 250 K (ciemnoczerwone i ciemnoniebieskie punkty) oraz 265 K (jasnoczerwone i jasnozielone punkty)

Powyższy wniosek przywołuje na myśl koncepcję Garnhama i in.<sup>71</sup>, według której białka AFP „niosą swój własny lód”, związany z powierzchnią aktywną cząsteczki. Z drugiej strony zaobserwować można, że energia oddziaływań woda-woda w warstwie solwacyjnej powierzchni aktywnej maleje wraz z postępem symulacji, gdy białko sąsiaduje z lodem. W obszarze tym zachodzi więc proces reorganizacji struktury wody, który indukowany jest obecnością kryształu lodu i zachodzi w wyniku oddziaływania warstw solwacyjnych lodu i białka.

Rezultaty uzyskane dla warstwy solwacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP można również porównać ze zmianami średniej energii oddziaływań z otoczeniem cząsteczki wody zlokalizowanej w warstwie solwacyjnej kryształu lodu, pod nieobecność cząsteczki białka w jego sąsiedztwie (Rys. 5.20).





Rys. 5.20 Zmiany w czasie średniej energii oddziaływań cząsteczki wody zlokalizowanej w warstwie solwatacyjnej płaszczyzny podstawowej lodu z otaczającą wodą (czerwone punkty) oraz z cząsteczkami wody tworzącymi lód (zielone punkty). Zaprezentowane rezultaty dotyczą symulacji prowadzonych w temperaturze 265 K

Jak można zaobserwować, warstwy solwatacyjne powierzchni aktywnej białka CfAFP sąsiadującej z lodem oraz lodu wykazują zarówno pewne podobieństwa, jak i różnice. W obu przypadkach wraz z upływem czasu dochodziło do obniżania się średniej energii oddziaływań  $E_{WW}$ , co świadczy o postępującym procesie porządkowania się cząsteczek wody w tej warstwie – proces ten postępował jednak wyraźnie szybciej w warstwie solwatacyjnej lodu. Wyraźną różnicę między uzyskanymi rezultatami stanowi przebieg krzywych opisujących zmiany w czasie energii oddziaływań cząsteczki wody z powierzchniami cząsteczki białka i lodu. Średnia energia oddziaływań  $E_{IW}$  okazała się maleć w czasie. Nie jest to wynik zaskakujący, ponieważ w warunkach prowadzenia symulacji na powierzchni lodu postępuje proces krzepnięcia wody. Sytuacja była inna w przypadku wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka, gdzie wartości energii oddziaływań woda-białko nie zmieniały się w czasie. Ponadto, zmiany strukturalne zachodziły w wodzie solwatacyjnej kryształu niezależnie od tego, czy w jego sąsiedztwie znajdowało się białko czy nie – w wyniku postępującego procesu krzepnięcia. Z kolei struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP zmieniała się w czasie jedynie w obecności kryształu lodu, na skutek nakładania się tej warstwy na warstwę solwatacyjną kryształu lodu. Na podstawie uzyskanych rezultatów można więc stwierdzić, że woda solwatacyjna powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP, mimo pewnych podobieństw, nie zachowuje się w taki sam sposób jak woda solwatacyjna lodu.

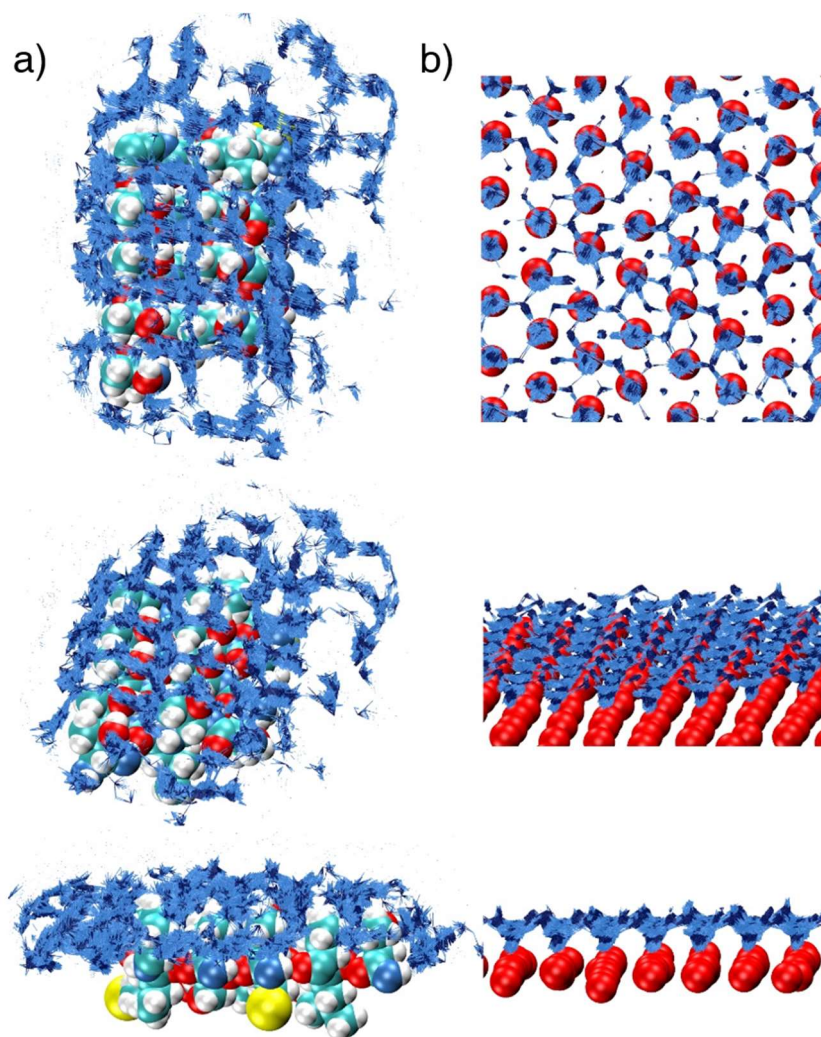
#### 5.2.4. Wizualne porównanie struktury wody solwatacyjnej powierzchni wiążącej białka CfAFP oraz lodu

Przedstawione powyżej rezultaty prezentują podobieństwa i różnice występujące między wodą solwatacyjną powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP oraz lodu za pomocą parametrów opisujących uporządkowanie strukturalne. W tej części pracy warstwy solwatacyjne

zostaną porównane w sposób wizualny. Można tego dokonać znajdując położenia i orientacje cząsteczek wody należących do warstw solwatacyjnych, które są preferowane przez cząsteczki ciekłej wody. Do badań wybrane zostały dwa typy układów: zawierający kryształ lodu zanurzony w ciekłej wodzie oraz zawierający cząsteczki CfAFP w ciekłej wodzie (bez kryształu lodu), symulowane w temperaturze 250 K. Analizie poddany został początkowy fragment symulacji o długości 60 ps.

Na Rys. 5.21 przedstawione zostały uzyskane rezultaty. Obrazy odpowiadające wodzie solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka oraz lodu nie są identyczne, posiadają jednak pewne cechy wspólne. Pewne obszary, w przypadku obu warstw solwatacyjnych, były preferowane przez cząsteczki wody. W przypadku wody solwatacyjnej białka zauważyć można obecność wyraźnych pierścieni tworzących się wokół grup metylowych reszt treoniny – pierścienie te przypominają swoją strukturą sześciocłonowe pierścienie powstające na powierzchni kryształu lodu. Niektóre wiązania O-H cząsteczek wody należących do tej warstwy solwatacyjnej układały się prostopadle do powierzchni białka, stanowiąc potencjalne miejsca wiązania z warstwą solwatacyjną lodu.

Analizując uzyskane obrazy, można się spodziewać, że nakładanie się na siebie warstw solwatacyjnych powierzchni aktywnej cząsteczki białka i lodu prowadzić będzie do powstania większej, uporządkowanej struktury, wypełniającej cały obszar między cząsteczką białka i lodem, jeszcze zanim dojdzie do ich ostatecznego związania. Obserwowane podobieństwo między badanymi warstwami solwatacyjnymi jest przyczyną, dla której takie nakładanie może nastąpić. Ponadto można przypuszczać, że aby doszło do połączenia się otoczek solwatacyjnych, cząsteczka białka CfAFP musi się ustawić w odpowiedni sposób względem matrycy lodu. W innym przypadku obie struktury nie będą do siebie pasować, a cząsteczka białka nie będzie się mogła związać na powierzchni kryształu.

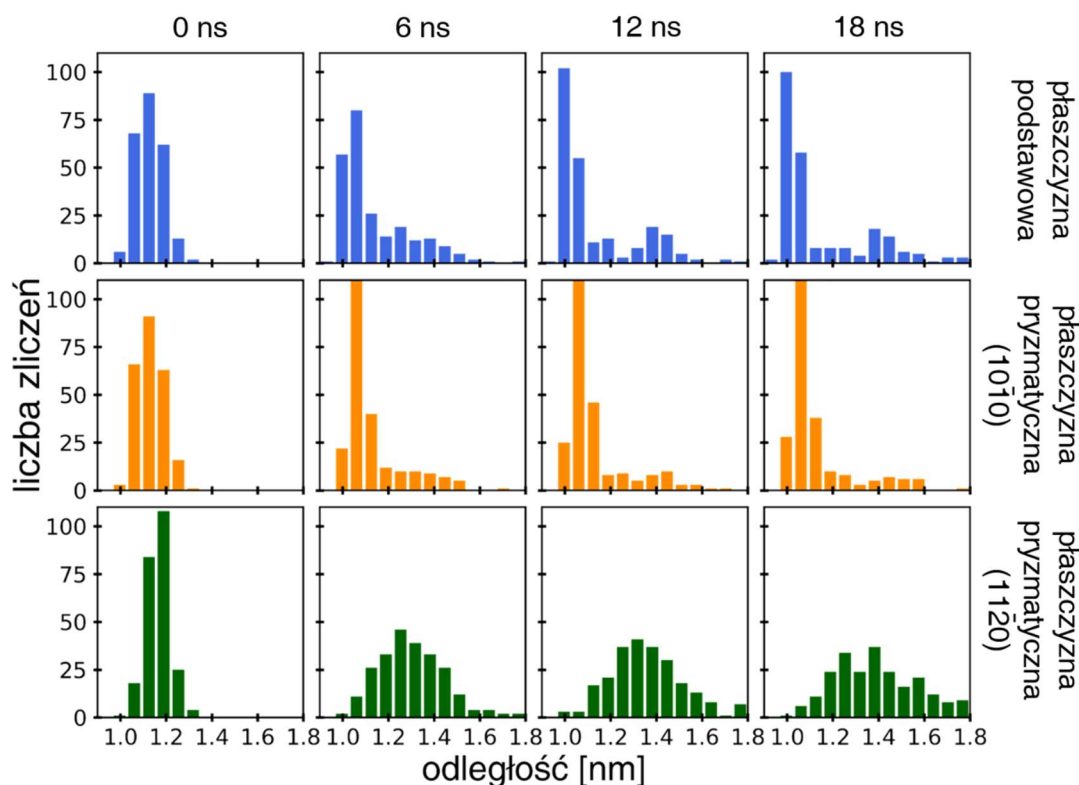


Rys. 5.21. Struktura wody solwacyjnej a) powierzchni wiążącej białka CfAFP, symulowanego w wodzie w temperaturze 250 K (po ok. 1 ns po rozpoczęciu symulacji) oraz b) płaszczyzny podstawowej kryształu lodu, zanurzonej w ciepłej wodzie i symulowanej w temperaturze 265 K (po ok. 1,2 ns po rozpoczęciu symulacji). Niebieskie linie obrazują najbardziej prawdopodobne położenia i orientacje cząsteczek wody znajdujących się w analizowanych warstwach solwacyjnych

### 5.2.5. Zdalne oddziaływanie między białkiem CfAFP i lodem

Na podstawie uzyskanych dotychczas rezultatów można przypuszczać, że aby białko CfAFP mogło związać się z powierzchnią lodu, musi ono przyjąć odpowiednią orientację względem sieci krystalicznej lodu. Tylko w takim przypadku możliwe będzie połączenie się warstw solwacyjnych powierzchni aktywnej białka i lodu, pozwalając na wstępne związanie się oddziałujących ze sobą powierzchni za pośrednictwem oddzielającej je ciepłej wody. Aby sprawdzić, czy preferencja w stosunku do pewnych położenia cząsteczki białka względem kryształu lodu faktycznie występuje, przeprowadzona została analiza zmian odległości białko-lód oraz dopasowania orientacji cząsteczki białka do matrycy lodu w czasie.

Rozkład odległości powierzchni aktywnej cząsteczek białka od lodu dla płaszczyzn podstawowych, pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ) i pryzmatycznych ( $11\bar{2}0$ ) w różnych momentach czasu przedstawiony został na Rys. 5.22.

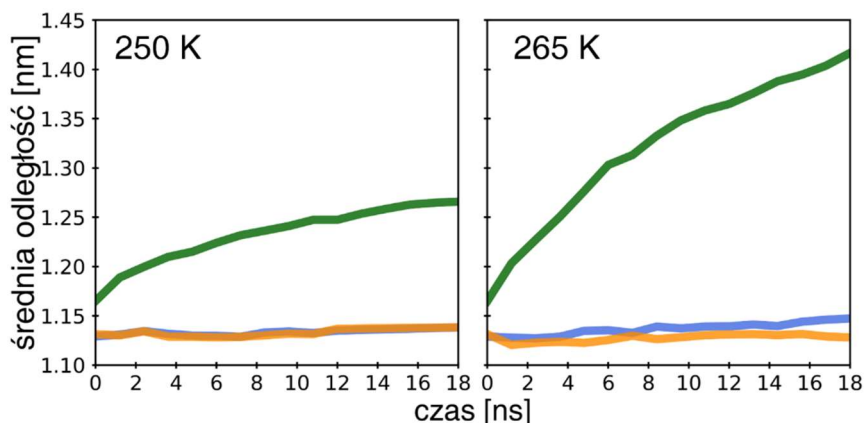


Rys. 5.22. Histogramy obrazujące zmiany w czasie rozkładów odległości powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP od płaszczyzn podstawowej, pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) i pryzmatycznej ( $11\bar{2}0$ ) kryształu lodu (każdy wykonany dla 240 cząsteczek białka znajdujących się w 120 układach symulacyjnych). Przedstawione dane dotyczą układów symulowanych w temperaturze 265 K

Na początku symulacji cząsteczki białka we wszystkich układach symulacyjnych znajdowały się w odległości (średnio) ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. W układach, w których cząsteczki białka zwrócone były powierzchnią aktywną w kierunku lodu, zaobserwować można, że wraz z upływem czasu niektóre cząsteczki zaczęły zbliżać się do powierzchni lodu, inne natomiast odsuwały się od niej. W każdym z analizowanych momentów czasu, najliczniejszą grupę cząsteczek stanowiły jednak te, które znajdowały się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. Jednocześnie, średnia odległość między białkiem i lodem pozostawała w tych układach niemal stała w czasie (Rys. 5.23).

Inaczej było w przypadku cząsteczek białka, które zwrócone były w kierunku lodu obszarem nieaktywnym. Wyraźnie można tam było zaobserwować zwiększanie się w czasie populacji cząsteczek, w przypadku których odległość białko-lód była wyraźnie większa od początkowej wartości. Jak można zaobserwować na Rys. 5.23, średnia odległość cząsteczek białka

od powierzchni lodu stosunkowo szybko wzrastała w czasie, szczególnie w przypadku układów symulowanych w temperaturze 265 K.



Rys. 5.23. Zmiany w czasie średnich odległości cząsteczki białka CfAFP od powierzchni kryształu lodu. Wyniki przedstawiono dla białek zwróconych powierzchnią aktywną w kierunku płaszczyzn podstawowej (linia niebieska) i pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) (linia pomarańczowa) lodu oraz białek zwróconych obszarem nieaktywnym w kierunku płaszczyzny ( $11\bar{2}0$ ) lodu (linia zielona). Zaprezentowane dane dotyczą układów symulowanych w dwóch temperaturach – 250 i 265 K

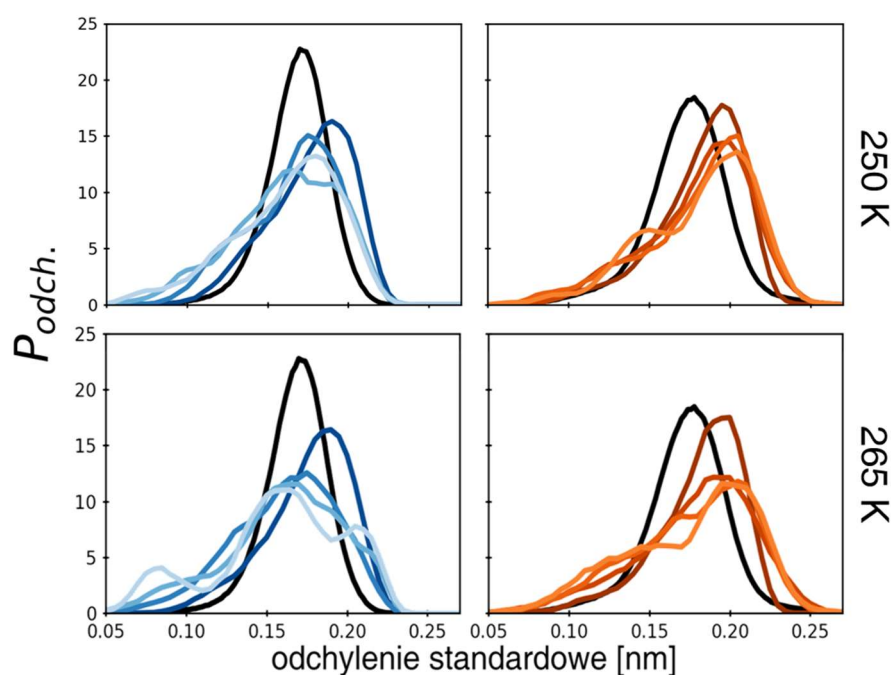
Na podstawie zaprezentowanych powyżej rezultatów można stwierdzić, że cząsteczki białka, które zwrócone były w kierunku lodu powierzchnią aktywną, były niejako „przytrzymywane” w miejscu, w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. Mechanizm tego procesu opiera się prawdopodobnie na wspomnianym wcześniej procesie nakładania się na siebie warstw solwatacyjnych białka i lodu. Łącząc się, warstwy te stabilizują położenie białka względem lodu, co stanowi wstępny etap wiązania się białka z lodem.

Jak wspomniano wcześniej, można zakładać, że nie tylko położenia cząsteczek białka, ale również ich orientacje względem lodu, nie powinny być przypadkowe, aby mogło dojść do wiązania się białka z powierzchnią kryształu. W literaturze pokazano<sup>26,27,40</sup>, że najbardziej optymalny sposób ułożenia cząsteczki białka AFP względem lodu (z punktu widzenia procesu adsorpcji tego białka na powierzchni kryształu) to taki, który pozwala na utworzenie się wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi reszt treoniny powierzchni aktywnej oraz cząsteczkami wody w lodzie. Oznacza to, iż atomy tlenu grup hydroksylowych reszt treoniny powierzchni aktywnej powinny układać się w miejscach stanowiących węzły sieci krystalicznej lodu.

Znany jest fakt, że proces krzepnięcia wody postępuje w różny sposób w przypadku różnych płaszczyzn krystalograficznych lodu – cząsteczki wody mogą się układać tylko w jeden sposób na płaszczyźnie pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ), natomiast w przypadku płaszczyzny podstawowej powstawać mogą dwie formy lodu. Położenia atomów tlenu najbardziej zewnętrznej warstwy kryształu lodu (o danej strukturze krystalograficznej) wybrane zostały jako punkty odniesienia

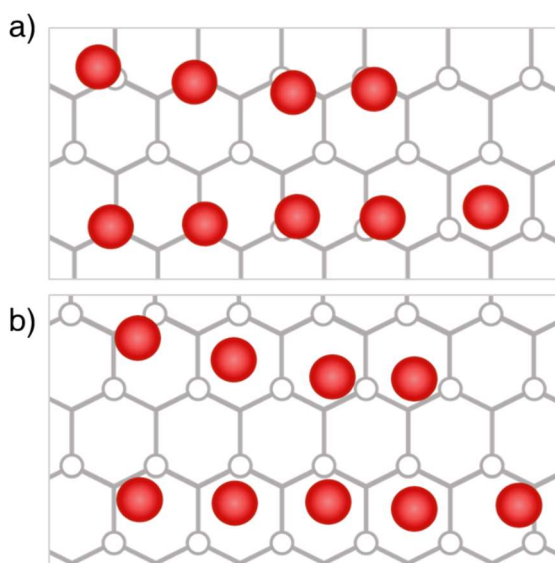
w analizie wzajemnego dopasowania orientacji białka i lodu. Jako parametr opisujący dopasowanie przestrzenne powierzchni aktywnej białka do sieci krystalicznej lodu zastosowane zostały średnie odchylenia rzutów położeń atomów tlenu grup hydroksylowych powierzchni aktywnej białka na powierzchnię lodu od położeń punktów odniesienia (Rozdział 4.5.2).

Wyniki analizy, w formie rozkładów wartości średniego odchylenia, przedstawiono na Rys. 5.24. Dla porównania, skonstruowano również histogramy dla układów, w których położenia i orientacje cząsteczek białka generowane były losowo. W tym celu cząsteczki białka (współrzędne atomów pochodziły z symulacji komputerowych) były obracane wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni lodu i przechodzącej przez środek powierzchni aktywnej tych białek o losowy kąt oraz przesuwane wzdłuż losowego wektora równoległego do powierzchni lodu. Uzyskane w ten sposób nowe położenia atomów tlenu grup hydroksylowych reszt treoniny powierzchni aktywnej białka były rzutowane na matrycę stanowiącą zewnętrzną warstwę kryształu lodu (oddzielnie dla płaszczyzny podstawowej i pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ )). Procedura ta powtarzana była wielokrotnie, a wyniki przedstawione zostały w formie odpowiednich histogramów (Rys. 5.24, czarna linia).



Rys. 5.24. Zmiany w czasie rozkładów odchyleń standardowych rzutów położeń atomów tlenu grup hydroksylowych powierzchni aktywnej białek CfAFP na powierzchnię lodu od położeń punktów odniesienia (położeń atomów tlenu cząsteczek wody tworzących najbardziej zewnętrzną warstwę kryształu lodu). Skala kolorystyczna obrazuje zmiany zachodzące w czasie – najciemniejsze linie obrazują rozkład wartości odchyleń standardowych na początku symulacji, natomiast najjaśniejsze – po 18 ns symulacji. Obliczenia przeprowadzone zostały oddzielnie dla białek sąsiadujących z płaszczyznami podstawowymi i pryzmatycznymi ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Rozkład odpowiadający sytuacji, gdy brak jest oddziaływań między białkami a lodem (gdy orientacja białka względem powierzchni lodu była przypadkowa) oznaczono czarną linią. Przedstawione dane dotyczą symulacji prowadzonych w temperaturze 265 K

Powyższe wykresy pokazują, że wraz z upływem czasu kształt oraz położenia maksimów rozkładów średniego odchylenia standardowego zmieniały się. Przebieg krzywej odpowiadającej początkowi symulacji był – co oczywiste – zdeterminowany sposobem przygotowania układów do symulacji. Co ciekawe, zmiany zachodzące w rozkładach wraz z postępem czasu nie zmierzały w kierunku osiągnięcia rozkładu przypadkowego (gdzie brak jest preferencji w stosunku do orientacji cząsteczki białka CfAFP względem lodu). Zamiast tego zaobserwować można stopniowe poszerzanie się histogramów i zwiększanie się liczebności układów, w których średnie odchylenie standardowe położenia rzutów wybranych atomów tlenu powierzchni cząsteczki białka od punktów odniesienia (atomów tlenu powierzchni lodu) było wyraźnie mniejsze lub większe od wartości uzyskanych w układach, gdzie położenia białka względem lodu były przypadkowe. Wartości takie odpowiadają sytuacjom, w których atomy tlenu grup hydroksylowych reszt treoniny na powierzchni aktywnej znajdują się ponad atomami tlenu zewnętrznej warstwy lodu (Rys. 5.25 a), lub przeciwnie, zlokalizowane są ponad pustymi przestrzeniami między atomami tlenu cząsteczek wody budujących powierzchnię lodu (Rys. 5.25 b).



Rys. 5.25. Schematyczny rysunek obrazujący odchylenia rzutów położenia atomów tlenu reszt treoniny powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP na płaszczyznę podstawową lodu (czerwone koła) od położenia referencyjnych (położenia atomów tlenu cząsteczek wody budujących najbardziej zewnętrzną warstwę lodu – szare okręgi). W sytuacji, gdy atomy tlenu na powierzchni aktywnej białka znajdują się ponad położeniami referencyjnymi (rysunek a)), wartość wyznaczonego odchylenia standardowego jest stosunkowo niewielka. Z kolei gdy atomy te znajdują się ponad środkami pierścieni sieci krystalicznej lodu (rysunek b)) odchylenia te przyjmują stosunkowo wysokie wartości.

Uzyskane wyniki stanowią dowód istnienia zdalnego oddziaływania między cząsteczką białka CfAFP i powierzchnią lodu. Oddziaływania te zachodzą za pośrednictwem ciekłej wody, której rola polega na wspomaganie procesu wiązania się białka z lodem. Woda znajdująca się między powierzchnią białka i lodem musi posiadać taką strukturę, która umożliwi jej późniejszą

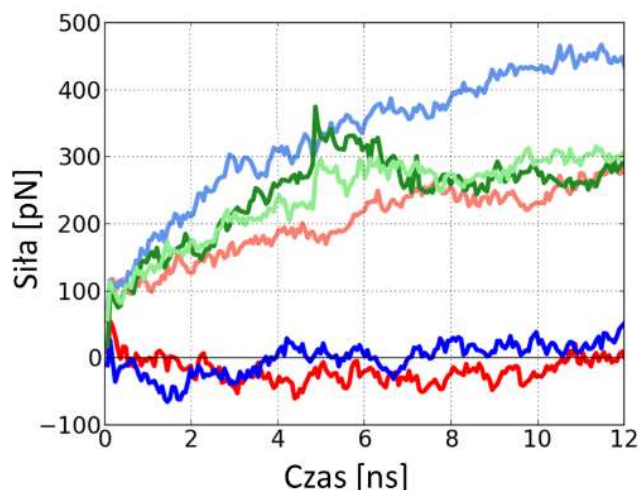
przemianę w lód. Gdy położenie białka względem lodu jest nieodpowiednie lub gdy struktura wody solwatacyjnej białka nie jest w wystarczającym stopniu podobna do struktury lodu (jak ma to miejsce np. w przypadku wody solwatacyjnej obszaru nieaktywnego cząsteczki białka CfAFP), niemożliwe będzie powstanie takiej uporządkowanej struktury. W takiej sytuacji dochodzić będzie do zmiany położenia i/lub orientacji białka względem lodu lub do odepchnięcia cząsteczki od powierzchni kryształu.

### 5.3. Badanie siły wywieranej na białko CfAFP przez narastający lód

Powyżej pokazano, że białka AFP posiadają zdolność do oddziaływania z powierzchnią kryształów lodu za pośrednictwem ciekłej wody. Zarówno podobieństwo strukturalne wody solwatacyjnej lodu i białka, jak i dopasowanie przestrzenne dwóch oddziałujących ze sobą powierzchni (a co za tym idzie również dopasowanie przestrzenne ich warstw solwatacyjnych) wydają się mieć decydujące znaczenie w początkowych etapach procesu wiązania się białek AFP z lodem. Badania, które przedstawione zostaną w ramach tej części pracy, dotyczyć będą szczegółów procesu zdalnego oddziaływania białka CfAFP z lodem. Podjęta zostanie próba odpowiedzi na pytanie, dlaczego badane białko jest w stanie wiązać się z powierzchnią lodu za pośrednictwem powierzchni aktywnej oraz dlaczego inne białka (nieposiadające aktywności przeciwwamrozeniowej) są przez lód odpychane.

Badaniom poddane zostały układy, w których cząsteczki białka CfAFP zlokalizowane były w dwóch różnych odległościach od powierzchni lodu (ok. 0,9 nm i ok. 1,1 nm). Cząsteczki sąsiadujące z płaszczyznami podstawowymi i pryzmatycznymi ( $10\bar{1}0$ ) były zorientowane powierzchniami aktywnymi w kierunku lodu, podczas gdy cząsteczki znajdujące się w sąsiedztwie płaszczyzn pryzmatycznych ( $11\bar{2}0$ ) zwrócone były w kierunku lodu obszarami nieaktywnymi. W przypadku każdego białka, jeden z atomów był w trakcie trwania symulacji przytrzymywany w położeniu referencyjnym. Postępowanie takie pozwoliło na śledzenie zmian w czasie (średniej) siły działającej na cząsteczki białka, powstającej w wyniku oddziaływania warstw solwatacyjnych białka i lodu oraz postępującego na powierzchni kryształu procesu krzepnięcia. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawione zostały na Rys. 5.26.





Rys. 5.26. Zmiany w czasie średniej siły działającej w kierunku prostopadłym do powierzchni kryształu lodu na cząsteczki białka CfAFP – kolorem czerwonym oznaczone zostały wyniki uzyskane dla cząsteczek białka zlokalizowanych przy płaszczyznach podstawowych kryształu, kolorem niebieskim – dla cząsteczek sąsiadujących z płaszczyznami pryzmatycznymi ( $10\bar{1}0$ ), a kolorem zielonym – dla cząsteczek sąsiadujących z płaszczyznami pryzmatycznymi ( $11\bar{2}0$ ). W każdym przypadku ciemniejsza linia odpowiada wynikom uzyskanym dla cząsteczek białka znajdujących się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu, a linia jaśniejsza – wynikom dla białek zlokalizowanych w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu

Jak można zaobserwować, rezultaty przedstawione na powyższym wykresie podzielić można na dwie grupy. Pierwsza z nich zawiera wyniki uzyskane dla cząsteczek białka CfAFP, które znajdowały się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu oraz zwrócone były obszarem aktywnym w kierunku kryształu. Średnia siła działająca na te cząsteczki pozostawała podczas symulacji niemal stała i była bliska zera. W przypadku pozostałych cząsteczek białka (cząsteczek zorientowanych powierzchnią aktywną w kierunku lodu i znajdujących się w odległości ok. 0,9 nm od jego powierzchni oraz cząsteczek zwróconych obszarem nieaktywnym w kierunku lodu) zaobserwować można natomiast wyraźny wzrost wartości średniej siły w czasie. Ponadto, siła ta przyjmowała dodatnie wartości, co oznacza, zgodnie z definicją przedstawioną w Rozdziale 4.6, że siła ta usiłowała odepchnąć cząsteczki białka od powierzchni lodu.

### 5.3.1. Mechanizm powstawania siły w badanych układach

Znany jest fakt, że obecność białek nieposiadających właściwości przeciwwamrozeniowych zaburza strukturę pobliskiej wody oraz że woda solwacyjna takich białek nie krzepnie nawet w bardzo niskich temperaturach<sup>190,191</sup>. Podobny efekt występuje również w przypadku obszarów nieaktywnych białek AFP, nawet w sytuacji, gdy warstwa solwacyjna powierzchni aktywnej oraz pozostała woda w roztworze ulegnie przemianom w lód<sup>190,191</sup>. Efekt ten może być związany z „burzeniem” struktury wody znajdującej się z sąsiedztwie powierzchni białka, co prowadzi do wzrostu jej gęstości i utrudnia przejście w stan stały.

Wzrost gęstości wody znajdującej się w kontakcie z powierzchnią białek niewykazujących aktywności przeciwwamrozeniowej został opisany<sup>63</sup> z wykorzystaniem modelu charakteryzującego strukturę wody i zaproponowanego przez Tanakę<sup>192–194</sup>. Zgodnie z tym modelem, efektywny potencjał oddziaływań międzycząsteczkowych w cieczy może zostać przedstawiony w postaci sumy dwóch członów: izotropowego ( $V_{iso}(r)$ ) oraz anizotropowego ( $V_{aniso}(r, \Omega)$ ). Potencjał izotropowy zależy jedynie od odległości ( $r$ ) między oddziałującymi cząsteczkami i dąży do obniżenia energii układu poprzez zwiększenie upakowania przestrzennego cząsteczek. Na potencjał anizotropowy oddziaływań ma wpływ zarówno odległość między cząsteczkami, jak i ich wzajemna orientacja w przestrzeni ( $\Omega$ ). Człon ten indukuje powstawanie uporządkowanych struktur o niskiej energii. W przypadku wody, część anizotropowa potencjału oddziaływań odzwierciedla zdolność cząsteczek do tworzenia wiązań wodorowych. Biorąc pod uwagę silnie zaznaczone właściwości kierunkowe wiązań wodorowych tworzących się między cząsteczkami wody można się spodziewać, że struktury takie będą się charakteryzować stosunkowo dużą objętością. Jednocześnie, energia ich stabilizacji jest na tyle niewielka, że są one podatne na rozpad w wyniku ruchów termicznych. W efekcie, struktury uporządkowane pojawiają się w wodzie w niewielkiej ilości, która silnie zależy od temperatury.

Tanaka w swoich pracach nie sprecyzował, jaką postać przyjmują postulowane przez niego uporządkowane struktury. Jednymi z najprostszych struktur, które z przyczyn geometrycznych pozbawione są naprężeń, a co za tym idzie charakteryzują się zwiększoną stabilnością (w stosunku do wody nieuporządkowanej), są pierścienie pięcio- i sześcioczłonowe. Można się więc spodziewać, że pierścienie te stanowią będą (niekoniecznie jedyne) elementy składowe struktur Tanaki.

Powstawanie uporządkowanych struktur może być w pewnych sytuacjach ułatwione – można się na przykład spodziewać, że obecność w przechłodzonej wodzie kryształu lodu będzie indukować powstawanie w jego sąsiedztwie takich struktur, które są komplementarne ze strukturą lodu. Z kolei w innych przypadkach, zachodzić może proces odwrotny, prowadząc do zmniejszenia się zawartości uporządkowanych struktur w wodzie. Efekt ten występuje na przykład w wodzie solwatacyjnej białek nieposiadających aktywności przeciwwamrozeniowej<sup>63</sup>, gdzie struktury charakteryzujące się wysokim stopniem uporządkowania są niszczone, co prowadzi do wzrostu gęstości wody solwatacyjnej oraz zapobiega jej krzepnięciu. Ten sam efekt może być również odpowiedzialny za odpychanie cząsteczek białka CfAFP, zwróconych obszarem nieaktywnym w kierunku lodu, od powierzchni kryształu. W wyniku niedopasowania strukturalnego warstw solwatacyjnych białka i lodu, w układzie pojawia się siła, która usiłuje odepchnąć białko od rosnącego kryształu, umożliwiając tym samym tworzenie się w wodzie nowych, wysokoobjętościowych struktur.

Sytuacja wygląda inaczej w przypadku, gdy cząsteczki białka AFP zwrócone są w kierunku lodu powierzchnią aktywną. Jak pokazałam wcześniej, woda solwacyjna powierzchni aktywnej posiada strukturę w pewnym stopniu przypominającą strukturę wody solwacyjnej lodu. Z tego powodu można się spodziewać, że w pobliżu powierzchni aktywnej białek AFP, struktury charakteryzujące się wysokim stopniem uporządkowania nie są niszczone, jak ma to miejsce w przypadku białek nieposiadających aktywności przeciwwamrozeniowej (oraz powierzchni nieaktywnych białek AFP). W wyniku postępu procesu krzepnięcia, warstwa solwacyjna powierzchni aktywnej może więc zostać wbudowana w strukturę lodu, o ile pozwala na to położenie i orientacja białka względem lodu. Efekt ten można z łatwością dostrzec na Rys. 5.26 – siła odpychająca białka zorientowane powierzchnią aktywną w kierunku lodu pojawiła się w tych układach, w których odległość białko–lód wynosiła ok. 0,9 nm. Powstawanie postulowanych przez Tanakę struktur o wysokiej objętości wymaga, aby pobliskie cząsteczki wody miały możliwość ułożenia się w uporządkowany sposób – jeśli odległość między białkiem i lodem jest zbyt mała, powstawanie takich struktur staje się znacznie utrudnione. Problem ten nie występuje w przypadku białek znajdujących się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. Średnia wartość siły działającej na te cząsteczki była bliska zera, co stoi w zgodności ze wcześniejszymi wynikami, które pokazały, że średnia odległość od powierzchni lodu nieprzytrzymywanych cząsteczek białka CfAFP (znajdujących się na początku symulacji w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu), pozostawała w trakcie trwania symulacji niemal stała.

### 5.3.2. Rola zmian zachodzących w strukturze wody w mechanizmie generowania siły

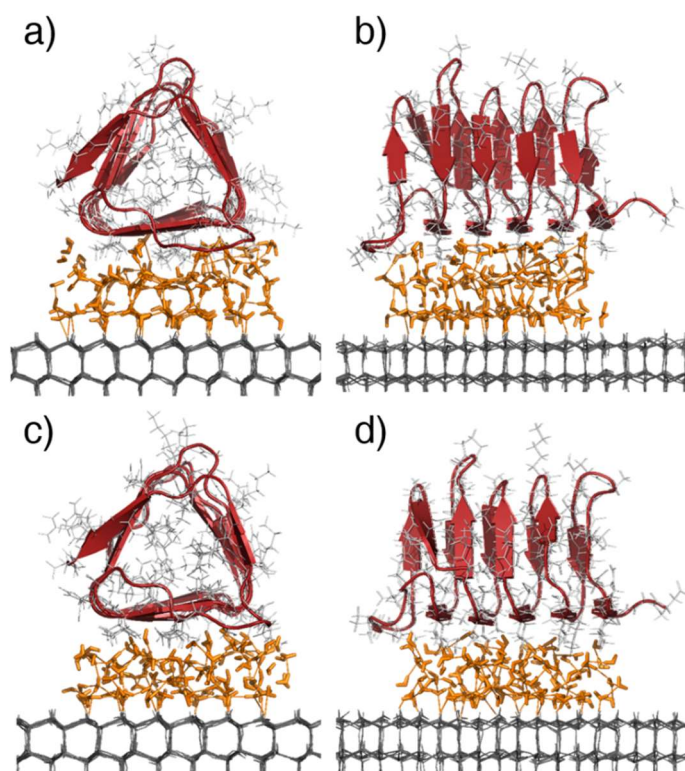
Przedstawione powyżej rezultaty pokazują, że zmniejszenie odległości między powierzchnią aktywną białka CfAFP i lodem, prowadzi do pojawienia się w układzie siły, która usiłuje odepchnąć od siebie oddziałujące powierzchnie. Zgodnie z przedstawioną dotychczas argumentacją, należy się spodziewać, że przyczyną powstawania tej siły są zmiany strukturalne zachodzące w wodzie znajdującej się między powierzchniami cząsteczki białka i lodu, gdy odległość między tymi powierzchniami nie jest optymalna.

Wartości siły działającej na cząsteczki białka w badanych układach symulacyjnych wyznaczone zostały poprzez analizę odchyień położenia jednego z atomów białka, przytrzymwanego z wykorzystaniem siły harmoniczej o znanej wielkości, od położenia referencyjnego. Tę samą siłę powinno dać się również wyznaczyć badając zmiany entalpii swobodnej układu, zachodzące na skutek zmiany odległości cząsteczki białka od powierzchni lodu.

W przypadku analizowanych układów, wyznaczenie wartości entalpii swobodnych całych układów jest utrudnione, z powodu znacznej ich wielkości (a co za tym idzie, liczby

znajdujących się w nim atomów). Ponadto, poszukiwana zmiana wartości entalpii swobodnej, wywołana stosunkowo niewielką zmianą stanu układu, będzie bardzo mała w porównaniu do całkowitej entalpii swobodnej układu.

W związku z powyższym, obliczenia przeprowadzono w sposób przybliżony, zakładając, że całkowita zmiana entalpii swobodnej, wywołana zmianą odległości między cząsteczką białka i lodem, spowodowana była zmianami zachodzącymi w warstwie wody oddzielającej oddziałujące ze sobą powierzchnie (Rys. 5.27). Zmiana entalpii swobodnej wyznaczona została w dwóch krokach – w pierwszym z nich oszacowana została zmiana entropii wody zlokalizowanej w obszarze między białkiem i lodem, a następnie wkład entropowy do entalpii swobodnej układu, w drugim natomiast – zmiana entalpii w tym samym obszarze. Ostatni etap analizy stanowiła próba odtworzenia wartości siły działającej na cząsteczkę białka, w wyniku zmniejszenia jej odległości od powierzchni lodu.



Rys. 5.27. Zasięg obszaru, w którym znajdowały się cząsteczki wody poddawane analizie, w przypadku układów różniących się odległością cząsteczki białka od powierzchni lodu. Na rysunkach a) i b) przedstawiony został zasięg analizowanej warstwy wody dla układów, w którym odległość białko-lód wynosiła ok. 1,1 nm, natomiast na rysunkach c) i d) – dla układów, w których odległość białko-lód była bliska 0,9 nm.

### A. Średnia entropia wody zlokalizowanej w obszarze między powierzchnią aktywną białka CfAFP i lodem

W rozpatrywanych układach, cząsteczki białka CfAFP są oddzielone od powierzchni lodu warstwą ciekłej wody. Z punktu widzenia wkładu entropowego do entalpii swobodnej układu

( $-T\Delta S$ ), proces asocjacji białka i lodu powinien być promowany – uwolnienie do roztworu cząsteczek wody znajdujących się między dwiema powierzchniami (i tworzących w pewnym stopniu uporządkowaną strukturę) powinno być źródłem zysku entropowego.

Średnią entropię wody znajdującej się między powierzchniami białka i lodu, a także średnią entropię wody niezaburzonej obecnością białka i lodu, oszacowałam z wykorzystaniem metody zaproponowanej przez Lin i in.<sup>163,165</sup> (Rozdział 4.2.2.C) Wyniki uzyskane dla wody znajdującej się między cząsteczką białka i lodem w przypadku różnych odległości białko–lód okazały się być bardzo podobne i wynosiły ok. 36.0 J/(mol·K) oraz 35.6 J/(mol·K), odpowiednio dla wody zlokalizowanej między cząsteczką białka i płaszczyznami podstawową oraz pryzmatyczną (10 $\bar{1}$ 0) lodu. Entropia wody niezaburzonej obecnością białka i lodu ( $S_{bulk}$ ) wynosiła natomiast 38.5 J/(mol·K).

Wkład entropowy do zmiany entalpii swobodnej układu, spowodowanej zmianą odległości cząsteczki białka od lodu, oszacowałam stosując następujące rozumowanie. W układach, w których odległość cząsteczki białka od powierzchni lodu wynosiła ok. 1,1 nm,  $N_{1,1}$  cząsteczek wody znajdowało się w obszarze między powierzchniami białka i lodu. Średnia wartość entropii, przypadająca na cząsteczkę wody znajdującą się w tym obszarze, równa była  $S_{1,1}$ . Zmniejszenie odległości cząsteczki białka od lodu do 0,9 nm spowodowało, że niektóre z cząsteczek znalazły się poza rozpatrywanym obszarem – liczba cząsteczek wody wciąż znajdujących się między powierzchniami cząsteczki białka i lodu wynosiła w tym przypadku  $N_{0,9}$ . Zakładając, że wartości średniej entropii przypadającej na jedną cząsteczkę wody usuniętą z obszaru między cząsteczką białka i lodem (przeniesioną w głąb roztworu) oraz cząsteczkę wciąż znajdującą się w tym obszarze wynosiły odpowiednio  $S_{bulk}$ , i  $S_{0,9}$ , entropię układu, w którym cząsteczka białka znajduje się w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu oszacować można jako:  $N_{0,9} \cdot S_{0,9} + \Delta N \cdot S_{bulk}$ , gdzie  $\Delta N$  oznacza liczbę cząsteczek usuniętych z obszaru między powierzchniami cząsteczki białka i lodu, na skutek zmniejszenia się odległości między nimi.

Znając entropię układów, w których odległość cząsteczki białka od powierzchni lodu wynosiła 1,1 nm oraz 0,9 nm, wkład entropowy do zmiany entalpii swobodnej, wywołanej zwiększeniem się odległości między powierzchniami cząsteczki białka i lodu, można oszacować wykorzystując poniższą zależność:

$$-T\Delta S = -T \cdot [N_{1,1} \cdot S_{1,1} - (N_{0,9} \cdot S_{0,9} + \Delta N \cdot S_{bulk})] \quad (5.1)$$

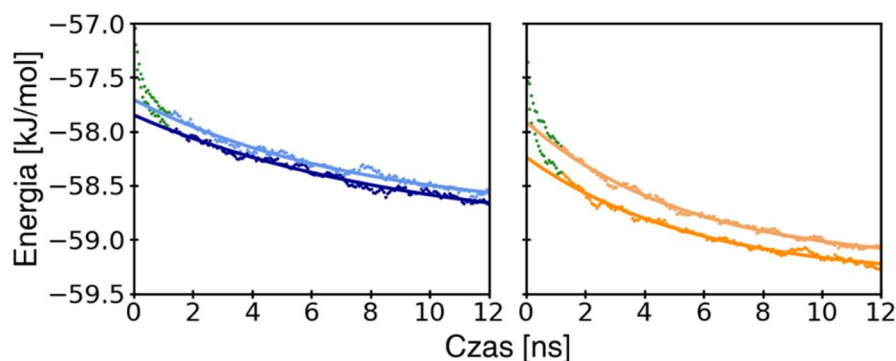
W przypadku układów, w których cząsteczka białka sąsiadowała z płaszczyzną podstawową lodu, liczba cząsteczek wody znajdujących się w obszarze między cząsteczką białka i lodem wynosiła ok. 127 dla układów, w których odległość białko–lód była bliska 1,1 nm oraz ok. 100 w przypadku układów, gdzie odległość ta wynosiła ok. 0,9. Wielkości uzyskane dla

układów, w którym cząsteczki białka zlokalizowane były w pobliżu płaszczyzny pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) kryształów, wynosiły odpowiednio ok. 128 i ok. 101.

Wielkości wkładu entropowego, uzyskane w wyniku przeprowadzonych obliczeń, wynosiły ok. 17 kJ/mol oraz ok. 19 kJ/mol dla układów, w których cząsteczki białka sąsiadowały z płaszczyznami podstawową i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Wartości te odpowiadają sile przyciągającej rzędu 140 pN i 170 pN. Rezultaty te stoją w zgodzie z oczekiwaniami przedstawionym na początku tego rozdziału – wkład entropowy promuje asocjację cząsteczki białka z powierzchnią lodu. Jednocześnie należy zauważyć, że wyniki zaprezentowane na Rys. 5.26 wyraźnie wskazują, że na cząsteczki białka znajdujące się w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu działa siła odpychająca, a nie przyciągająca. Dowodzi to, że źródłem siły odpychającej jest wyłącznie wkład entalpowy do entalpii swobodnej układu – zagadnienie to dyskutowane jest poniżej.

### B. Średnia energia oddziaływań cząsteczki wody zlokalizowanej w obszarze między powierzchnią aktywną białka CfAFP i lodem z otoczeniem

Wartość wkładu entalpowego do entalpii swobodnej układu daje się oszacować poprzez wyznaczenie średniej energii oddziaływań z otoczeniem tych cząsteczek wody, które znajdują się pomiędzy cząsteczką białka i lodem. W celu wyznaczenia tej energii, dla każdej cząsteczki wody obliczona została energia oddziaływań z atomami leżącymi w promieniu 1 nm od analizowanej cząsteczki. Na energię oddziaływań składały się oddziaływania elektrostatyczne oraz oddziaływania Lennarda-Jonesa. Uzyskane wyniki przedstawione zostały na Rys. 5.28.



Rys. 5.28. Zmiany w czasie średniej energii oddziaływań cząsteczki wody z otoczeniem, dla cząsteczek białka CfAFP zlokalizowanych w pobliżu płaszczyzn podstawowych kryształu lodu (niebieskie linie) oraz pryzmatycznych ( $10\bar{1}0$ ) (pomarańczowe linie) i zwróconych w kierunku kryształu powierzchnią aktywną. W obu przypadkach ciemniejszą linią oznaczono wyniki uzyskane dla białek znajdujących się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu, a linią jaśniejszą – w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu

Na wykresie wyraźnie można dostrzec spadek średniej energii oddziaływań, będący skutkiem zwiększenia się odległości białko-lód. Stopniowy spadek energii w czasie, obserwowany

we wszystkich analizowanych przypadkach, był natomiast wynikiem postępującego procesu krzepnięcia.

Na podstawie uzyskanych danych można oszacować wkład entalpowy do zmiany entalpii swobodnej układu, zachodzącej na skutek odsunięcia się cząsteczki białka CfAFP od powierzchni lodu, w sposób analogiczny do zastosowanego w przypadku wyznaczenia wkładu entropowego do entalpii swobodnej. Wartość energii oddziaływań, wyznaczona dla wody niezaburzonej obecnością białka i lodu ( $E_{bulk}$ ), wynosiła 57,1 kJ/mol. Wartości energii odpowiadające odległościom białko-lód równym 0,9 nm i 1,1 nm oszacowane zostały z wykorzystaniem równań linii trendu przedstawionych na Rys. 5.28. Ostatecznie, uzyskane wartości wkładu entalpowego do zmiany entalpii swobodnej układu wynosiły 36 kJ/mol dla wody sąsiadującej z płaszczyzną podstawową lodu oraz 66 kJ/mol dla wody sąsiadującej z płaszczyzną (10 $\bar{1}$ 0), co odpowiada sile odpychającej rzędu 300 pN i 550 pN. Jeśli od uzyskanych wartości odjęty zostanie (oszacowany wcześniej) wkład entropowy do zmiany entalpii swobodnej, uzyskane wartości powinny odpowiadać wartości średniej siły, która działa na cząsteczkę białka znajdującą się w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu i która stara się to białko odepchnąć od powierzchni kryształu. Uzyskane w ten sposób wartości (160 i 380 pN, odpowiednio dla płaszczyzny podstawowej i przyrmatycznej (10 $\bar{1}$ 0)) są zbliżone do wyników uzyskanych dzięki pomiarom średniej siły działającej na cząsteczkę białka w badanych układach symulacyjnych (Rys. 5.26). Należy jednak pamiętać, że przedstawione powyżej obliczenia są jedynie pewnym przybliżeniem stanu rzeczywistego. Pod uwagę nie brano na przykład oddziaływań dalekozasięgowych, a analiza przeprowadzona została dla stosunkowo niewielkiego wycinka układu, z założeniem, że zarówno cząsteczki białka, jak i pozostała woda znajdująca się w układzie, nie ulegają zmianom.

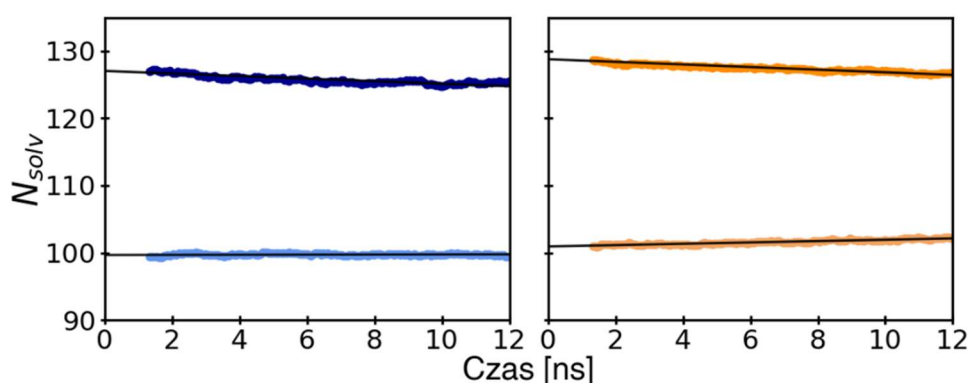
### 5.3.3. Zmiany strukturalne zachodzące w wodzie zlokalizowanej w obszarze między powierzchniami cząsteczki białka CfAFP i lodu, zachodzące w wyniku zmniejszenia odległości między tymi powierzchniami.

Przedstawione w poprzednim rozdziale rozważania potwierdzają, że zmiany strukturalne zachodzące w wodzie zlokalizowanej między powierzchniami cząsteczek białka i lodu są przyczyną powstawania w układzie siły, która próbuje odepchnąć cząsteczkę białka od powierzchni lodu, jeżeli znajdzie się ona zbyt blisko powierzchni kryształu. Zgodnie z zaproponowanym przeze mnie wcześniej mechanizmem, zmiany te mogą być wynikiem niedopasowania strukturalnego nakładających się na siebie warstw solwatacyjnych białka i lodu (jak ma to miejsce w przypadku oddziaływania białka nieposiadającego aktywności przeciwarzamrozeniowej z lodem) lub przyjęcia przez białko nieoptymalnej pozycji względem powierzchni lodu. Oba te efekty powinny być możliwe do zaobserwowania za pomocą parametrów charakteryzujących strukturę.

W dalszej części rozdziału zaprezentowane zostały wyniki analizy struktury wody solwatacyjnej cząsteczek białka CfAFP, zwróconych obszarami aktywnym i nieaktywnym w kierunku powierzchni lodu, a dokładniej zmian tej struktury wywołanej zmianą odległości cząsteczek białka od lodu.

### A. Zmiany liczby cząsteczek wody w obszarze między powierzchnią aktywną białka CfAFP i lodem w czasie

Liczba cząsteczek wody znajdujących się w obszarze między cząsteczką białka i lodem jest silnie zależna od odległości między nimi. Efekt ten wspomniany był już wcześniej, przy okazji szacowania wkładów entalpowego i entropowego do entalpii swobodnej układu. Z drugiej strony, można się również spodziewać, że liczba cząsteczek wody zawartych w analizowanym obszarze (Rys. 5.27) będzie się zmniejszać w czasie, w wyniku postępującego procesu krzepnięcia. Przeprowadzona przeze mnie analiza pokazała, że w układach, w których odległość między cząsteczką białka i lodem wynosiła ok. 1,1 nm, efekt ten faktycznie występował, chociaż był on bardzo niewielki (ciemniejsze linie na Rys. 5.29). Co ciekawe, liczba cząsteczek wody znajdujących się w obszarze między białkiem i lodem, gdy odległość białko-lód była bliska 0,9 nm, pozostawała niemal stała w czasie lub nieco wzrastała (jaśniejsze linie na Rys. 5.29).

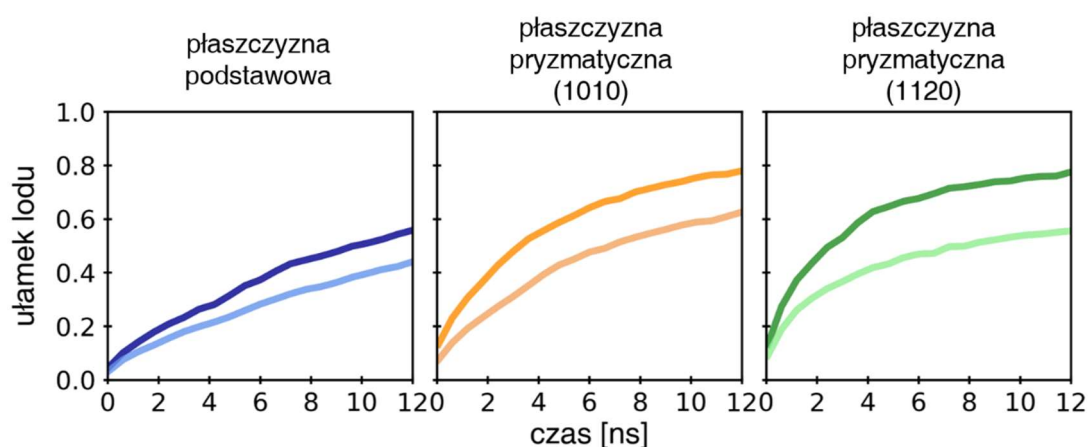


Rys. 5.29. Zmiany w czasie średniej liczby cząsteczek wody znajdujących się w obszarze między cząsteczkami białka i lodem, dla cząsteczek zlokalizowanych w pobliżu płaszczyzn podstawowych kryształu lodu (niebieskie linie) oraz przyrządnych ( $10\bar{1}0$ ) (pomarańczowe linie) i zwróconych w kierunku kryształu powierzchnią aktywną. W obu przypadkach ciemniejszą linią oznaczono wyniki uzyskane dla białek znajdujących się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu, a linią jaśniejszą – w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu

Jak można zobaczyć na Rys. 5.30, proces krzepnięcia wody, mimo iż spowolniony w porównaniu z układami, gdzie odległość białka od lodu była większa, postępował w tych układach w czasie. Można więc podejrzewać, że oczekiwany spadek liczby cząsteczek wody w rozpatrywanym obszarze (będący wynikiem krzepnięcia wody) był kompensowany wzrostem gęstości wody w sąsiedztwie białka. Wniosek ten stoi w zgodzie z modelem zaprezentowanym wcześniej i dotyczącym destabilizacji i niszczenia uporządkowanych struktur zbudowanych



z cząsteczek wody, obecnych w obszarze między powierzchniami cząsteczki białka i lodu, gdy odległość między nimi nie jest optymalna.



Rys. 5.30. Zmiany w czasie średniej zawartości lodu w pierwszej warstwie solwatacyjnej kryształu, z którym sąsiadowały cząsteczki białka CfAFP. Na wykresach przedstawione zostały rezultaty uzyskane w przypadku wody solwatacyjnej płaszczyzn podstawowej (kolor niebieski), pryzmatycznej (10 $\bar{1}$ 0) (kolor pomarańczowy) oraz pryzmatycznej (11 $\bar{2}$ 0) (kolor zielony). W każdym przypadku ciemniejszą linią oznaczone zostały wyniki odpowiadające układom, w których w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni kryształu obecna była cząsteczka białka CfAFP, z kolei linią jaśniejszą – rezultaty dotyczące układów, w których odległość między powierzchnią kryształu i cząsteczką białka była bliska 0,9 nm. Rezultaty uzyskane zostały z wykorzystaniem algorytmu CHILL+<sup>171</sup>

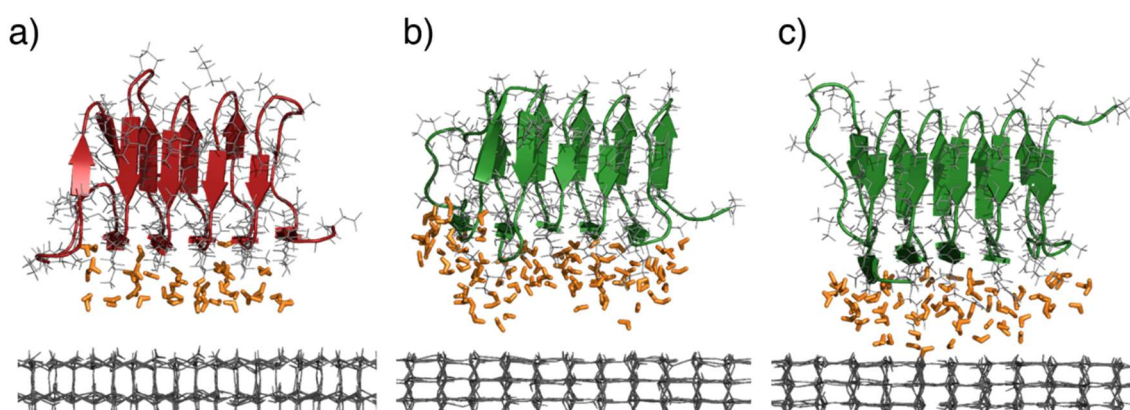
## B. Średnia geometria i energia wiązań wodorowych tworzących się między cząsteczkami wody w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP sąsiadującego z powierzchnią lodu

Warstwa solwatacyjna powierzchni aktywnej białka CfAFP wykazuje pewien stopień uporządkowania, co pokazane zostało na przykład przy okazji porównania struktury wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej i lodu (Rozdział 5.2.4). Gdy białko zbliża się do powierzchni lodu, dwie warstwy solwatacyjne zaczynają ze sobą oddziaływać i nakładać się na siebie, co prowadzi do zmiany struktury całej wody znajdującej się w obszarze między cząsteczką białka i lodem. Kierunek tych zmian zależy od odległości oraz orientacji białka względem sieci krystalicznej lodu.

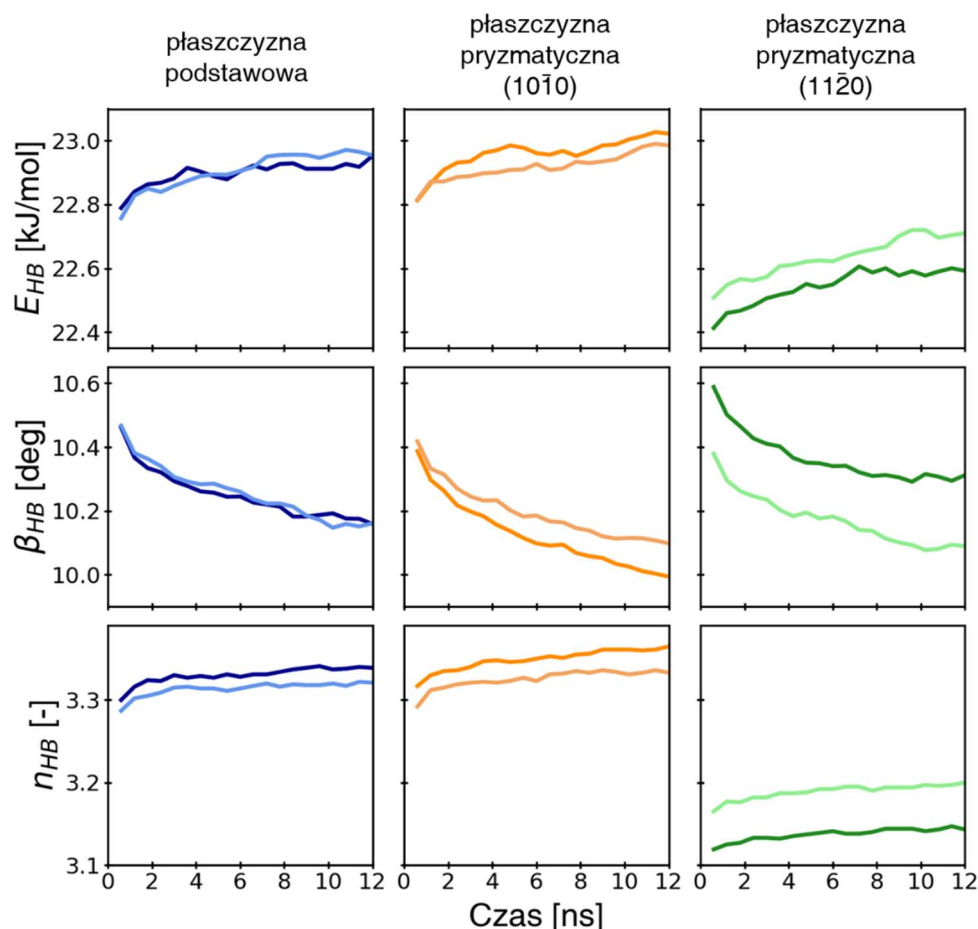
Struktura warstwy solwatacyjnej zarówno lodu, jak i powierzchni aktywnej białka AFP, stabilizowana jest dzięki obecności wiązań wodorowych między cząsteczkami wody. Można się więc spodziewać, że analiza zależności średniej liczby i średniej energii wiązań wodorowych w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP od odległości białko–lód pozwoli pośrednio wnioskować o względnej ilości uporządkowanych, wysokoobjętościowych struktur w badanych warstwach solwatacyjnych.

Analizie poddałam te cząsteczki wody, które znajdowały się w odległości nie większej niż 0,4 nm od atomów tworzących powierzchnię białka (obszar ten przedstawiony został na

Rys. 5.31). Uzyskane wyniki, zaprezentowane na Rys. 5.32, wydają się częściowo zgadzać z przedstawionymi powyżej założeniami. Zmniejszenie odległości białko-lód prowadziło do niewielkiego wzrostu średniej wielkości kąta  $\beta_{HB}$  oraz do (również niewielkiego) spadku średniej energii wiązań wodorowych w analizowanych warstwach solwacyjnych. Ponadto, średnia liczba wiązań wodorowych również lekko zmalała. Porównując te rezultaty z wynikami analizy przeprowadzonej dla warstw solwacyjnych obszarów nieaktywnych białka CfAFP zwróconych w kierunku powierzchni lodu można zauważyć, że (dla odległości białko-lód wynoszącej ok. 1,1 nm) średnia wielkość kąta  $\beta_{HB}$  jest wyższa, a średnia energia wiązań wodorowych oraz ich liczba jest niższa w porównaniu do wody solwacyjnej powierzchni aktywnej białek zwróconych w kierunku lodu tą właśnie powierzchnią. Rezultaty te są zgodne z założeniem o zmniejszonej liczbie uporządkowanych, wysokoobjętościowych struktur w pobliżu powierzchni „zwykłego” białka (nieposiadającego aktywności przeciwwamrozeniowej) oraz w pobliżu powierzchni aktywnej białka AFP, gdy odległość tej powierzchni od lodu nie jest optymalna.



Rys. 5.31. Zasięg poddawanych analizie warstw solwacyjnych powierzchni cząsteczek białka CfAFP sąsiadujących z powierzchnią kryształu lodu. Na rysunku a) przedstawiony został obszar poddawany analizie w układach, w których cząsteczka białka zwrócona była powierzchnią aktywną w kierunku lodu, natomiast rysunku b) i c) dotyczą układów, w których cząsteczki białka zwrócone były obszarami nieaktywnymi w kierunku lodu (i znajdowały się w odległościach wynoszących odpowiednio ok. 1,1 nm oraz ok. 0,9 nm od powierzchni lodu). We wszystkich przypadkach przyjęte zostało to samo kryterium wyboru cząsteczek wody należących do warstw solwacyjnych cząsteczki białka – analizie poddawane były te cząsteczki wody, których atomy tlenu znajdowały się w odległości mniejszej niż 0,4 nm od któregośkolwiek z atomów białka tworzącego jego powierzchnię (zwróconą w kierunku kryształu lodu).



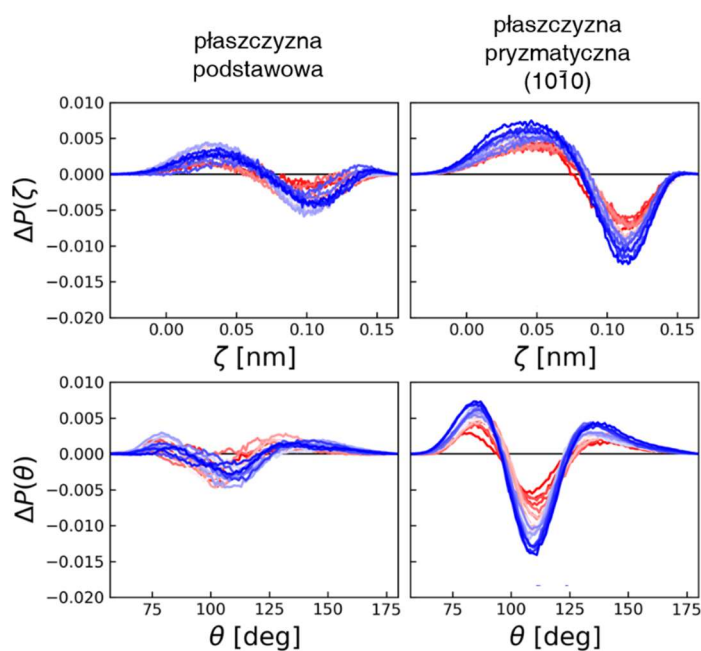
Rys. 5.32. Zmiany w czasie a) średniej energii wiązań wodorowych, b) średniej wielkości kąta  $\beta_{HB}$ , c) średniej liczby wiązań wodorowych przypadających na cząsteczkę wody, w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczek białka CfAFP, zlokalizowanych w pobliżu płaszczyzn podstawowych (linie niebieskie), pryzmatycznych (1010) (linie pomarańczowe) oraz w warstwie solwatacyjnej obszaru nieaktywnego białka sąsiadującego z płaszczyzną pryzmatyczną (1120) kryształu lodu. W obu przypadkach ciemniejszą linią oznaczone zostały wyniki uzyskane dla układów, w których cząsteczki białek znajdowały się w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu, a linią jaśniejszą – wyniki dla układów, w których odległość między cząsteczką białka i lodem była bliska 0,9 nm

Analiza wyników uzyskanych dla warstwy solwatacyjnej obszaru nieaktywnego białka dla odległości białko-lód wynoszącej ok. 0,9 nm jest nieco trudniejsza. W odróżnieniu od powierzchni aktywnej białka CfAFP, obszar nieaktywny posiada nieregularną powierzchnię – łańcuchy boczne aminokwasów sięgają czasem niemal powierzchni lodu (Rys. 5.31 c). W związku z tym warstwa solwatacyjna, zdefiniowana w sposób wskazany powyżej, a więc jako woda znajdująca się w odległości do 0,4 nm od powierzchni białka, zawierać będzie w sobie niekiedy cząsteczki wody znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie lodu. Z tego powodu parametry wykorzystane w analizie wiązań wodorowych wskazują w tym przypadku na wzmocnienie sieci wiązań wodorowych w porównaniu do sytuacji, gdy białko znajdowało się w większej odległości od lodu. Można więc dostrzec, że rezultaty uzyskane w tym przypadku nie

są – jak może się wydawać na pierwszy rzut oka – sprzeczne z zaprezentowanymi powyżej wnioskami.

### C. Lokalne uporządkowanie cząsteczek wody w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP sąsiadującego z powierzchnią lodu

Kolejny krok analizy struktury wody solwatacyjnej cząsteczek białka CfAFP sąsiadujących z powierzchnią lodu stanowiła analiza lokalnego uporządkowania cząsteczek wody w tych warstwach. Do opisu średniej geometrii wiązań wodorowych w wodzie wykorzystany został rozkład kątów  $\theta$ , czyli kątów między wektorami łączącymi atomy tlenu cząsteczek wody, które są związane wiązaniami wodorowymi. Wyniki analizy przedstawiłam, w postaci rozkładów różnicowych, na Rys. 5.33. Wykresy te powstały poprzez odjęcie rezultatów uzyskanych w przypadku układów, w których odległość cząsteczki białka od lodu wynosiła ok. 1,1 nm, od rezultatów charakteryzujących układy, z których odległość ta była równa ok. 0,9 nm.



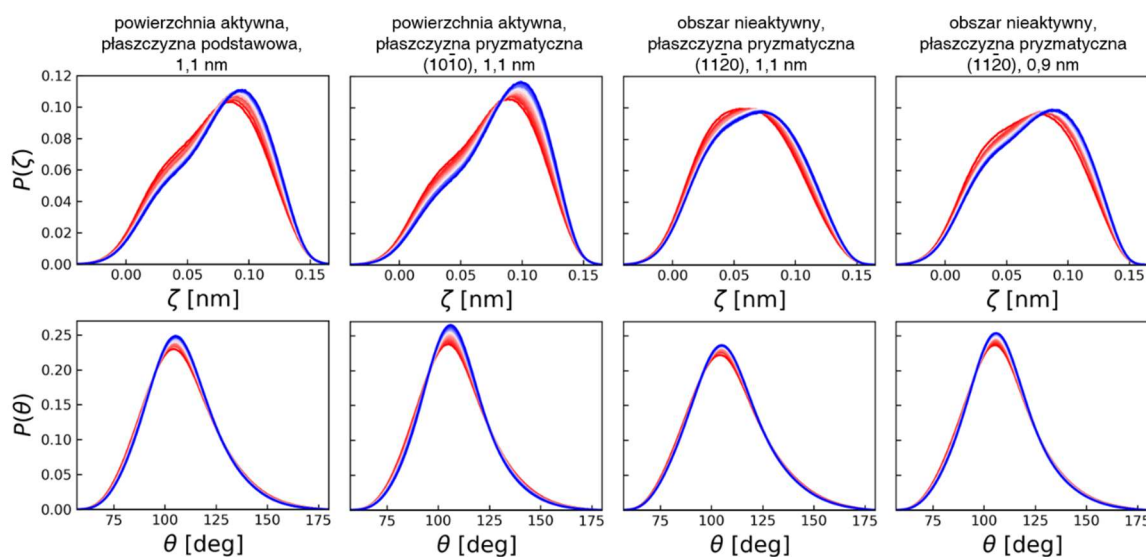
Rys. 5.33. Zmiany w czasie średnich rozkładów różnicowych parametru uporządkowania  $\zeta$  (górny rząd) oraz kątów  $\theta$  (dolny rząd), dla cząsteczek białek CfAFP zlokalizowanych w sąsiedztwie płaszczyzn podstawowej i przyzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) kryształu lodu. Kolorami oznaczono zmiany rozkładów w czasie (kolor ciemnoczerwony – początek symulacji, kolor ciemnoniebieski – koniec symulacji)

Rozkłady różnicowe obrazują, jak zmniejszenie odległości białko-lód wpłynęło na strukturę wody solwatacyjnej powierzchni aktywnych cząsteczek białka CfAFP. Dodatnie wartości dla kątów  $\theta$  mniejszych od  $90^\circ$  i większych niż  $130^\circ$  oraz ujemne wartości dla kątów bliskich  $109^\circ$  wskazują na zmniejszenie uporządkowania strukturalnego wody w analizowanym obszarze. Rezultaty te stoją w zgodzie z uzyskanymi wcześniej wynikami, a także z założeniem o destrukcji uporządkowanych struktur obecnych w wodzie na skutek nieoptymalnej odległości białko-lód.

Innym parametrem, również pozwalającym na scharakteryzowanie struktury wody, jest parametr  $\zeta$ . Został on zaproponowany przez Russo i Tanakę<sup>160</sup>, którzy zauważyli, że w wodzie charakteryzującej się wysokim stopniem uporządkowania, dochodzi do wyraźnej separacji pierwszej i drugiej warstwy solwatacyjnej poszczególnych cząsteczek wody. Efekt ten jest ściśle związany z tetraedryczną strukturą takiej wody.

Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem parametru  $\zeta$  (której wyniki również przedstawione zostały na Rys. 5.33) prowadzi do podobnych wniosków, jak analiza rozkładów kątów  $\theta$ . Dla mniejszej z badanych odległości białko-lód zaobserwować można zmniejszenie się populacji cząsteczek wody, dla których odległości między pierwszą i drugą warstwą solwatacyjną w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP były stosunkowo duże, co wskazuje na zaburzenie tetraedrycznej struktury wody w tym obszarze.

Porównanie wyników uzyskanych dla warstw solwatacyjnych białek zlokalizowanych w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu i zwróconych powierzchnią aktywną w kierunku kryształu z wynikami uzyskanymi dla warstw solwatacyjnych obszarów nieaktywnych białka (również sąsiadujących z lodem) pokazało – zgodnie z oczekiwaniami – że woda solwatacyjna obszarów nieaktywnych charakteryzuje się mniejszym uporządkowaniem (Rys. 5.34). Można więc przypuszczać, że liczebność uporządkowanych, wysokoobjętościowych struktur zaproponowanych przez Tanakę, podobnie jak w przypadku warstw solwatacyjnych powierzchni aktywnych białek znajdujących się w odległości ok. 0,9 nm od powierzchni lodu, jest w tym przypadku zmniejszona.



Rys. 5.34. Zmiany w czasie średnich rozkładów parametru uporządkowania  $\zeta$  (górny rząd) oraz kątów  $\theta$  (dolny rząd) dla warstw solwatacyjnych powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP sąsiadujących z płaszczyznami podstawową i pryzmatyczną  $10\bar{1}0$  lodu (odległość cząsteczki białka od lodu wynosiła ok. 1,1 nm) oraz dla warstw solwatacyjnych obszarów nieaktywnych cząsteczki sąsiadującej z płaszczyzną  $11\bar{2}0$  lodu (odległości białko-lód wynosiły ok. 0,9 nm i ok. 1,1 nm). Kolorami oznaczono zmiany rozkładów w czasie (kolor ciemnoczerwony – początek symulacji, kolor ciemnoniebieski – koniec symulacji)

#### **D. Porównanie struktury wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białek CfAFP sąsiadujących z płaszczyzną podstawową i pryzmatyczną lodu**

Przedstawione powyżej wnioski są prawdziwe dla warstw solwatacyjnych powierzchni aktywnych białek sąsiadujących zarówno z płaszczyzną podstawową, jak i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Można jednak zauważyć, że wyniki uzyskiwane z wykorzystaniem różnych metod są w większości przypadków bardziej wyraziste w przypadku białka zlokalizowanego przy płaszczyźnie pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ). Jak to pokazano na samym początku dyskusji, siła działająca na cząsteczkę białka przy tej płaszczyźnie (dla odległości białko-lód wynoszącej ok. 0,9 nm) jest około dwukrotnie większa w porównaniu do białka sąsiadującego z płaszczyzną podstawową lodu.

Znany jest fakt, że proces krzepnięcia wody na płaszczyźnie pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) postępuje około dwukrotnie szybciej niż na płaszczyźnie podstawowej. Mechanizm tego procesu, a dokładniej sposób, w jaki cząsteczki wody układają się na powierzchni lodu jest różny dla tych dwóch płaszczyzn. Krzepnięcie wody na płaszczyźnie podstawowej zachodzi „warstwa po warstwie”, a ponadto prowadzić może do powstania lodu o strukturze heksagonalnej lub regularnej. Z tego powodu, położenia cząsteczek wody w krzepnącej warstwie mogą ulegać zmianie w trakcie postępu procesu krzepnięcia. W przypadku płaszczyzny pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ), cząsteczki wody mogą się układać na powierzchni lodu tylko w jeden sposób. Ponadto, proces krzepnięcia postępuje w trzech wymiarach, co oznacza, że krzepnięcie kolejnej warstwy lodu może się rozpocząć jeszcze zanim poprzednia warstwa wody zmieni się w lód. Można więc oczekiwać, że położenia cząsteczek wody w warstwie solwatacyjnej płaszczyzny pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ) lodu będą stosunkowo dobrze zdefiniowane już w początkowej fazie krzepnięcia, podczas gdy w pobliżu płaszczyzny podstawowej wciąż mogą następować pewne zmiany położenia cząsteczek wody. Dzięki temu, w obecności białka CfAFP, którego odległość od powierzchni lodu nie jest optymalna, woda znajdująca się między powierzchnią aktywną tego białka i płaszczyzną podstawową lodu może posiadać więcej możliwości dopasowania się do istniejących warunków, co przekłada się na średnio mniejszą siłę odpychającą działającą na cząsteczkę białka oraz mniejsze różnice strukturalne między wodą solwatacyjną białek znajdujących się w odległościach ok. 0,9 nm i ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. Z drugiej strony, w przypadku płaszczyzny podstawowej również ilość lodu powstającego w badanym obszarze jest mniejsza w porównaniu do płaszczyzny pryzmatycznej ( $10\bar{1}0$ ), a więc nacisk wywierany na cząsteczkę białka także będzie zmniejszony.

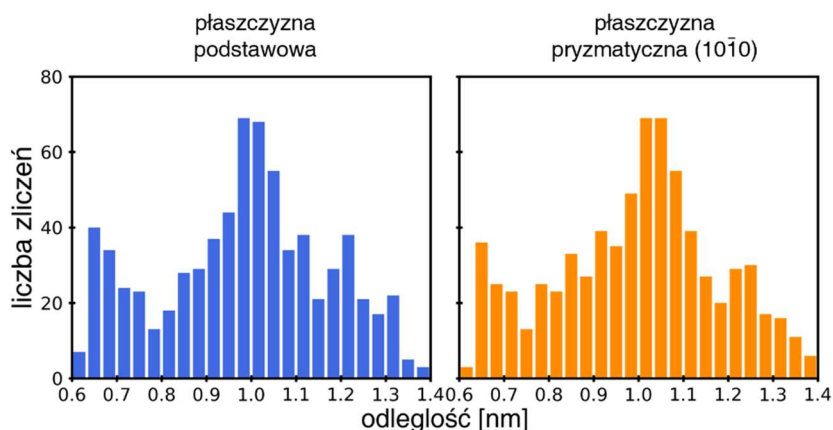
## 5.4. Molekularny mechanizm adsorpcji białka CfAFP na powierzchni lodu

Przedstawione dotychczas rezultaty wskazują, że cząsteczka białka CfAFP jest w stanie w sposób zdalny (za pośrednictwem cząsteczek ciekłej wody) oddziaływać z powierzchnią lodu. W efekcie, zarówno odległość od lodu, jak i orientacja cząsteczki białka względem jego sieci krystalicznej, mogą być korygowane już we wczesnych etapach procesu wiązania się białka z lodem – odpowiedzialna jest za to siła, która działa na cząsteczkę białka, kiedy jej położenie względem lodu nie jest optymalne.

Zaproponowałam poprzednio, że wspomniana powyżej siła powstaje w analizowanych układach w wyniku zmian strukturalnych zachodzących w ciekłej wodzie oddzielającej cząsteczkę białka od powierzchni lodu. Zaprezentowałam również rezultaty, które zdają się potwierdzać to twierdzenie.

Przedstawione w poprzednim rozdziale rozważania dotyczyły układów, w których cząsteczki białka umieszczone były (średnio) w odległościach ok. 0,9 nm i ok. 1,1 nm od powierzchni lodu. W celu dokonania bardziej szczegółowego opisu zachodzących zjawisk, a także uzyskania dodatkowych argumentów przemawiających za poprawnością zaproponowanego przeze mnie mechanizmu powstawania siły, postanowiłam przeprowadzić dodatkową serię symulacji komputerowych. Zbiór układów symulacyjnych rozszerzyłam o układy, w których odległości cząsteczek białka CfAFP od lodu zawierały się w przedziale od 0,6 nm do 1,4 nm (rozkład odległości we wszystkich przygotowanych układach został zaprezentowany na Rys. 5.35). Dzięki temu, całkowita liczba układów symulacyjnych (łącznie z poprzednimi stu dwudziestoma) wzrosła do trzystu sześćdziesięciu. W każdym z tych układów, cztery cząsteczki białka były zwrócone powierzchnią aktywną w kierunku lodu – dwie z nich sąsiadowały z płaszczyzną podstawową, a dwie kolejne z płaszczyzną pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu. W efekcie, analizie poddałam po siedemset dwadzieścia cząsteczek białka CfAFP sąsiadujących z lodem w przypadku obu płaszczyzn krystalograficznych.

Dzięki dodatkowym symulacjom, możliwe stało się przeprowadzenie bardziej szczegółowej analizy dotyczącej wpływu odległości cząsteczki białka od powierzchni lodu na strukturę wody solwatacyjnej znajdującej się między oddziałującymi ze sobą powierzchniami.



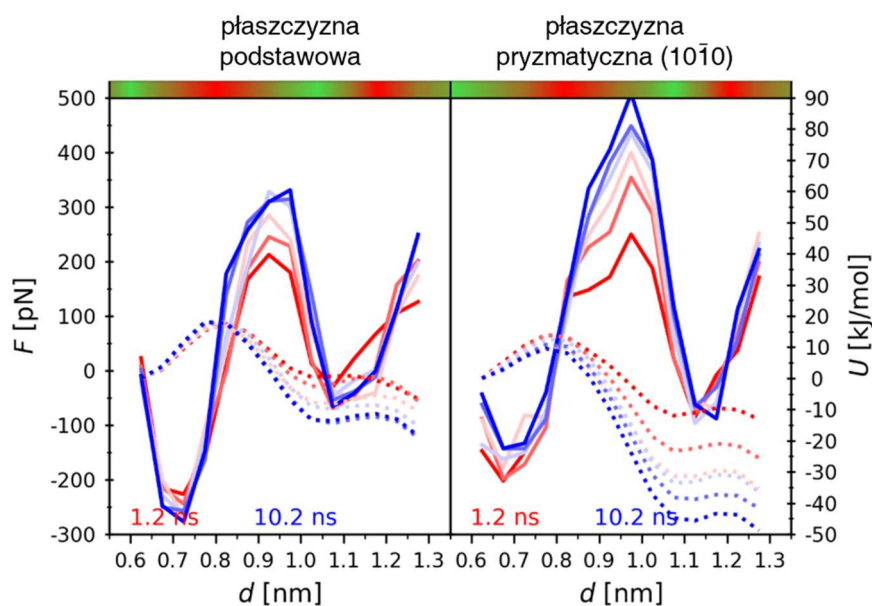
Rys. 5.35. Rozkłady odległości cząsteczek białka CfAFP od powierzchni lodu w układach symulacyjnych poddawanych analizie, uzyskane dla układów, w których cząsteczki białka sąsiadowały z płaszczyznami podstawową (kolor niebieski) i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) (kolor pomarańczowy) lodu

#### 5.4.1. Średnia siła działająca na cząsteczki białka znajdujące się w różnych odległościach od powierzchni lodu

Tak jak poprzednio, analiza układów badawczych rozpoczęta została od wyznaczenia średniej siły działającej na cząsteczki białka zlokalizowane w sąsiedztwie kryształu lodu. Dzięki dużej liczbie badanych układów, możliwe było w miarę dokładne wyznaczenie wartości średniej siły działającej na cząsteczki białka znajdujące się w różnych odległościach od powierzchni lodu, co z kolei pozwoliło na wyznaczenie krzywej obrazującej zależność entalpii swobodnej układu od odległości cząsteczki CfAFP od powierzchni lodu. Uzyskane rezultaty przedstawione zostały na Rys. 5.36.

Jak można zaobserwować, siła zmieniała się wraz z odległością białko-lód w sposób cykliczny. Na wykresach wyraźnie widoczne są dwa maksima, w których na cząsteczki białka działała znaczna siła odpychająca, oraz dwa minima, w których siła była przyciągająca. W ramach opisanych w Rozdziale 5.2 badań, w których cząsteczki białka CfAFP znajdujące się w sąsiedztwie lodu nie były przytrzymywane, pokazałam, że białka zorientowane obszarem nieaktywnym w kierunku lodu, są od niego odpychane ze średnią szybkością ok. 0,01 – 0,02 nm/ns (wartości te oszacować można na podstawie Rys. 5.23), co odpowiada sile rzędu kilkuset pN (zgodnie z danymi przedstawionymi na Rys. 5.26). W literaturze można znaleźć dane wskazujące, że siła tego samego rzędu jest w stanie przemieszczać białko większe od CfAFP ze znaczną szybkością<sup>195</sup>. Można się więc spodziewać, że siła o tej wartości (przyciągająca lub odpychająca) rzeczywiście zdolna jest pozycjonować cząsteczkę białka względem powierzchni lodu.





Rys. 5.36. Zmiany w czasie zależności średniej siły działającej na cząsteczkę białka CfAFP od odległości między cząsteczką białka i lodem (linia ciągła), dla cząsteczek białka sąsiadujących z płaszczyznami podstawową i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Na wykresie przedstawiono również uzyskane na tej podstawie profile energetyczne (linia przerywana). Skala kolorystyczna obrazuje zmiany zachodzące w czasie – najciemniejsza linia czerwona odpowiada результатам uzyskanym po 1,2 ns symulacji, natomiast najciemniejsza linia niebieska – na końcu symulacji (krok czasowy między poszczególnymi liniami wynosi 1,8 ns). Czerwono-zielona skala kolorystyczna, umieszczona ponad wykresami, wskazuje przybliżone położenia minimów i maksimów na profilach energetycznych

Siła działająca na cząsteczki białka jest proporcjonalna do gradientu entalpii swobodnej układu. Na podstawie posiadanych danych oszacowany został przebieg krzywej zależności entalpii swobodnej od odległości białko-lód (Rys. 5.36, przerywane linie). W rozważanym zakresie odległości, zależność ta posiada dwa wyraźne maksima (odpowiadające odległościom białko-lód ok. 0,80 – 0,85 nm oraz 1,15 – 1,20 nm) oraz dwa minima (1,05 – 1,10 nm oraz ok. 0,6 nm). Jedno ze znalezionych minimów energetycznych przypada w zakresie odległości ok. 1,05 – 1,10 nm – jest to zakres, dla którego zaobserwowałam wcześniej stabilizację położeń względem powierzchni kryształu lodu nieprzytrzymywanych cząsteczek białka CfAFP, zwróconych powierzchnią aktywną w kierunku lodu (Rozdział 5.2.5). Położenie pierwszego z minimów energetycznych przypada natomiast w zakresie odległości białko-lód, który nie jest w całości pokryty w ramach prowadzonych badań, a więc jego dokładne położenie oraz głębokość nie są znane. Niemniej jednak obecność tego minimum na wykresie entalpii swobodnej jest wyraźnie zauważalna.

Przedstawione powyżej rezultaty porównać można z wynikami badań przeprowadzonych przez Mochizukiego i Matsumoto<sup>196</sup>. Autorzy badali zmiany energii swobodnej oddziaływań pomiędzy dwiema sąsiadującymi ze sobą cząsteczkami jednego z hiperaktywnych białek AFP w funkcji odległości między tymi cząsteczkami. Cząsteczki białka zorientowane były względem siebie swoimi powierzchniami aktywnymi. Kształt profilu energetycznego uzyskanego przez tych

autorów był podobny do profilu energetycznego przedstawionego na Rys. 5.36. Również odległość między maksimami oraz minimami okazała się być podobna i wynosiła ok 0,35 nm. Podobny przebieg krzywej sugeruje, że mechanizm odpowiedzialny za generowanie siły działającej na oddziałujące ze sobą powierzchnię jest w obu przypadkach podobny.

Przebieg profilu energetycznego, przedstawiony na Rys. 5.36, porównać można również z wynikami uzyskanymi przez Hudaita i in.<sup>74</sup>, dotyczącymi energii wiązania się kilku hiperaktywnych białek AFP oraz INP z powierzchnią lodu. Uzyskany przez autorów profil energetyczny charakteryzował się kształtem zbliżonym do uzyskanego przeze mnie, a energie wiązania się białek z lodem przyjmowały wartości rzędu kilkudziesięciu kJ/mol. Głębokość minimów energetycznych znalezionych w ramach przeprowadzonych przeze mnie badań okazała się być znacznie mniejsza. Jest to zrozumiałe, ponieważ analizowany przeze mnie układ był znacząco odmienny od tego, który analizowali Hudait i in. Autorzy zainteresowani byli stanem związanym białka i lodu, podczas gdy rezultaty przedstawione na Rys. 5.36 dotyczą sytuacji, gdy białko wciąż pozostaje oddzielone od powierzchni lodu warstwą ciekłej wody. W trakcie trwania symulacji, w wodzie tej zachodzą zmiany strukturalne, będące wynikiem postępującego procesu krzepnięcia – można to wyraźnie zaobserwować, śledząc zmiany przebiegu profilu energetycznego w czasie.

Sam kształt profilu energetycznego, wyjaśnić można biorąc pod uwagę specyficzne właściwości wody. Wiązania wodorowe, tworzące się między cząsteczkami wody, charakteryzują się silnymi właściwościami kierunkowymi. Powstające z ich udziałem uporządkowane struktury, posiadają stosunkowo dużą objętość. Struktury takie mogą więc istnieć tylko wtedy, gdy mają wystarczająco dużo przestrzeni. Jeśli odległość cząsteczki białka od powierzchni lodu stanie się zbyt mała, można się spodziewać, że struktury takie ulegną deformacji, lub nawet destrukcji. Do deformacji prowadzić może również nadmierne zwiększenie odległości między powierzchniami cząsteczki białka i lodu. W efekcie, na krzywej zależności entalpii swobodnej układu od odległości dzielącej cząsteczkę białka i lód, zaobserwować można obecność pojawiających się cyklicznie minimów i maksimów energetycznych.

Na podstawie przebiegu profilu energetycznego można wyciągnąć jeszcze jeden ciekawy wniosek. W literaturze, proces wiązania się białek AFP z powierzchnią lodu często określany jest mianem „adsorpcji”, co sugeruje, że proces ten zachodzi poprzez bezpośredni kontakt powierzchni białka z powierzchnią lodu. Uzyskane wyniki wskazują jednak, że wysokość bariery energetycznej oddzielającej dwa minima widoczne na Rys. 5.36 jest zbyt duża, aby cząsteczka białka była w stanie ją pokonać (w rozważanym zakresie temperaturowym). Wydaje się więc, że cząsteczka ta będzie się raczej zatrzymywać w pewnej odległości od powierzchni lodu, a pełne związanie białka z lodem zachodzić będzie w wyniku zakrzepnięcia warstwy ciekłej wody oddzielającej ją od powierzchni kryształu. Efekt „przytrzymywania” cząsteczki białka w odległości ok. 1,1 nm od powierzchni lodu

(która odpowiada położeniu minimum energetycznego na Rys. 5.36) zaobserwowałam podczas badań nad procesem oddziaływania nieprzytrzymywanych cząsteczek białek CfAFP z lodem (Rozdział 5.2). Uzyskane rezultaty przywodzą na myśl model procesu wiązania się białek AFP z lodem zaproponowany przez Wierzbickiego i in.<sup>60</sup>, który zakładał, że cząsteczki białka pozycjonują się na granicy faz między lodem i wodą. Inni autorzy<sup>50,68</sup> sugerowali również, że wiązanie białek należących do tej grupy z lodem zachodzi w wyniku krzepnięcia ciekłej wody oddzielającej cząsteczki tych białek od lodu. Uzyskane przeze mnie rezultaty stoją w zgodzie z tymi założeniami.

#### 5.4.2. Struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP sąsiadującego z powierzchnią lodu

Zgodnie z powyższą argumentacją, kształt profilu energetycznego przedstawionego na Rys. 5.36 powinien być ściśle związany ze strukturą wody zawartej w obszarze między cząsteczką białka i lodem. Kilka argumentów przemawiających za poprawnością tego założenia przedstawionych zostało przeze mnie w poprzedniej części pracy. Poniżej, rozważania te zostaną uzupełnione o dodatkowe informacje oraz rozszerzone na całą dostępną bazę układów symulacyjnych.

Warstwa wody, która oddziela cząsteczki białka CfAFP od powierzchni lodu jest silnie heterogeniczna. Obecność powierzchni cząsteczki białka po jednej, zaś powierzchni lodu po drugiej stronie, utrudnia opis jej właściwości strukturalnych, co było już dyskutowane wcześniej (Rozdział 4.3). W literaturze znaleźć można parametrów stosowanych do opisu struktury wody, z których każdy posiada pewne ograniczenia. Z tej też przyczyny, w przeprowadzonej analizie zastosowałam równolegle kilka z nich, starając się w jak najpełniejszy sposób opisać strukturę wody w analizowanym obszarze. Uzyskane wyniki zaprezentowane zostaną (w funkcji odległości białko-lód oraz czasu) w dalszej części rozdziału.

##### A. Mapy uporządkowania

Strukturę ciekłej wody można scharakteryzować z wykorzystaniem tzw. map uporządkowania<sup>151,152</sup>. Położenie każdego punktu na takiej mapie obrazuje wartości różnych parametrów uporządkowania opartych na koncepcji dwucząstkowych funkcji korelacji. Pierwsza ze składowych –  $s_{tra}$  – charakteryzuje wkład pochodzący od uporządkowania translacyjnego, opisywanego funkcją rozkładu radialnego. Druga składowa –  $s_{conf}$  – opisuje natomiast wkład pochodzący od uporządkowania orientacyjnego, uwzględniając preferencje wzajemnych orientacji sąsiadujących ze sobą cząsteczek wody (szczegółowy opis tych parametrów zamieszczony został w Rozdziale 4.1). Mapy uporządkowania, charakteryzujące zmiany strukturalne zachodzące

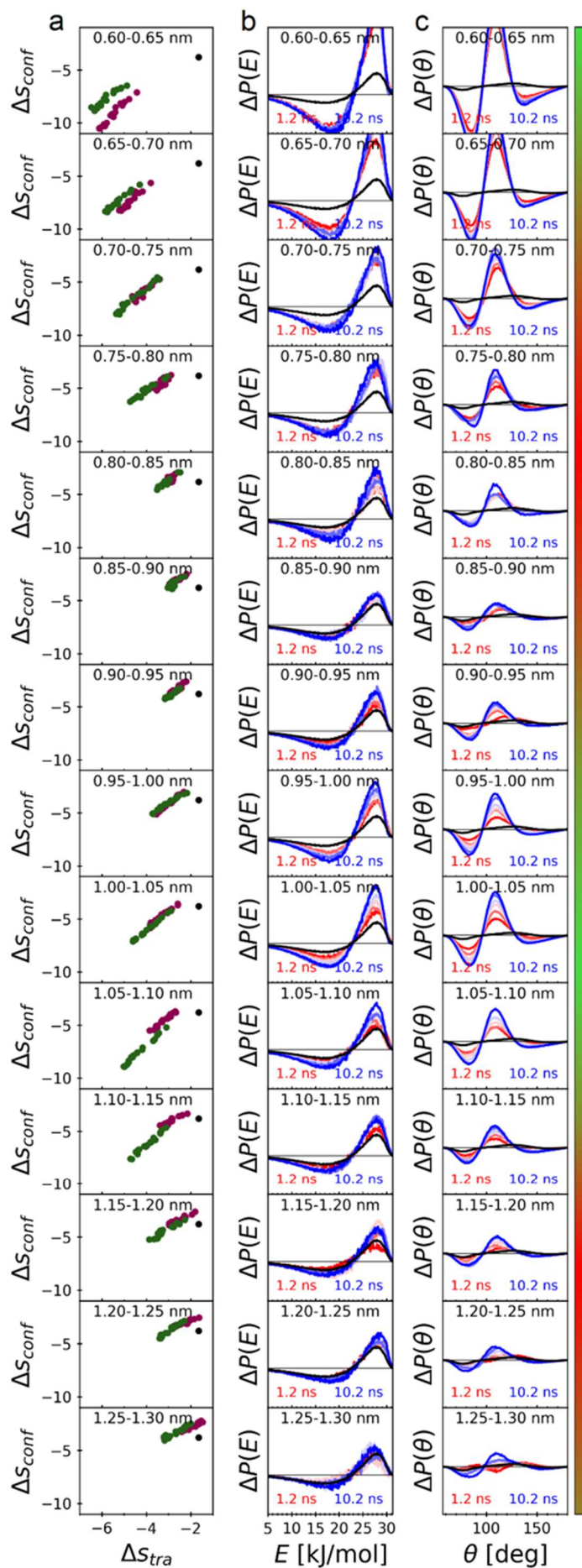
w wodzie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP w czasie, przedstawione zostały na Rys. 5.37 a.

Wraz z postępem procesu krzepnięcia, punkty reprezentujące stan układu (uporządkowanie strukturalne wody) przemieszczają się na płaszczyźnie mapy w kierunku bardziej ujemnych wartości. W sytuacji, gdy odległość białko-lód była bliska położeniu minimum na wykresie zależności entalpii swobodnej od odległości, zmiany strukturalne zachodziły w wodzie solwatacyjnej stosunkowo szybko. Kierunek tych zmian (zmniejszanie się wartości  $\Delta s_{tra}$  i  $\Delta s_{conf}$  w czasie) wskazuje na postęp procesu krzepnięcia w tej warstwie wody. Szybkość tego procesu i stopień uporządkowania strukturalnego wody solwatacyjnej okazały się być wyraźnie mniejsze po oddaleniu się od minimum energetycznych. Zaobserwować można również, że zachowanie układów, w których białka sąsiadują z płaszczyznami podstawową i przyrmatyczną ( $10\bar{1}0$ ), jest nieco inne, co sugeruje, że sposób porządkowania się cząsteczek wody w warstwach solwatacyjnych również jest w tych dwóch przypadkach nieco odmienny. Znany jest jednak fakt<sup>27</sup>, że białka CfAFP adsorbują się do obu rozważanych płaszczyzn krystalograficznych lodu. Z tego też względu można przypuszczać, że woda solwatacyjna, mimo iż w charakteryzuje się stosunkowo wysokim stopniem uporządkowania, może dostosowywać swoją strukturę do płaszczyzny lodu, z którą oddziałuje<sup>74</sup>.

### B. Właściwości wiązań wodorowych

Mapy uporządkowania, mimo iż pozwalają na śledzenie postępu procesu reorganizacji struktury wody, nie dają dużo informacji na temat szczegółowego charakteru uporządkowania strukturalnego wody. W celu uzyskania dodatkowych informacji przeprowadziłam więc również analizę wybranych właściwości wiązań wodorowych, takich jak ich średnia energia oraz geometria (Rys. 5.37 b i c).

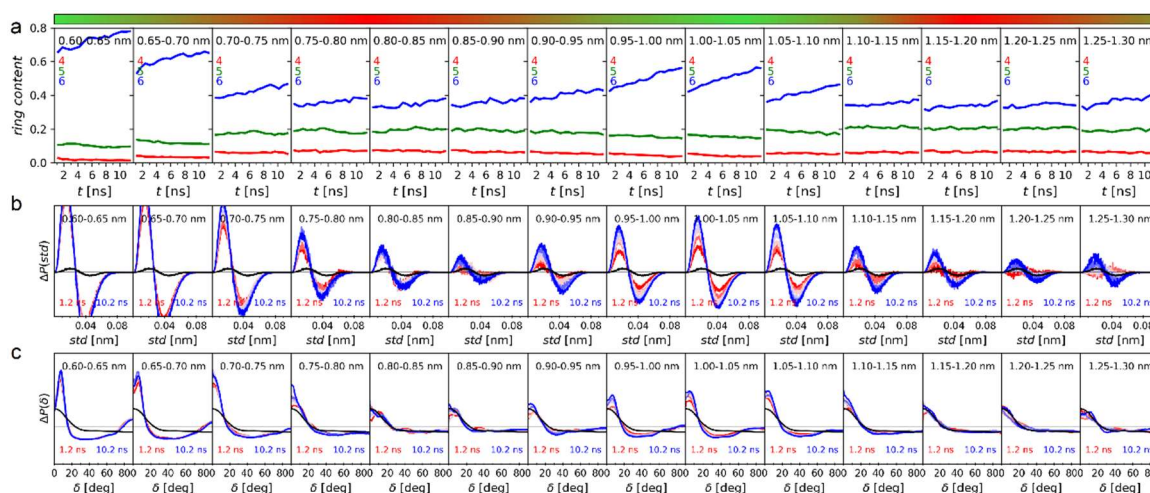
Śledząc zmiany zachodzące w rozkładach różnicowych tych wielkości wraz ze zmieniającą się odległością białko-lód, można zaobserwować wyraźną cykliczność, podobnie jak miało to miejsce w przypadku map uporządkowania. Najmniejsze różnice między wodą solwatacyjną i wodą niezaburzoną obecnością białka i lodu odpowiadają odległościom białko-lód wynoszącym ok. 0,9 nm oraz ok. 1,2 nm. Są to jednocześnie odległości, w których średnia siła działająca na cząsteczki białka była najwyższa (Rys. 5.36). Należy jednak zwrócić uwagę, że stopień uporządkowania wody solwatacyjnej, mimo, że jest niższy niż w przypadku pozostałych odległości, to wciąż pozostaje wyższy niż w wodzie niezaburzonej obecnością białka i lodu.



Rys. 5.37. (poprzednia strona) Wybrane właściwości strukturalne wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczek białka CfAFP, zwróconych powierzchnią aktywną w kierunku kryształu lodu. a) Mapy uporządkowania, uzyskane z zastosowaniem parametrów uporządkowania strukturalnego opartych na koncepcji dwucząstkowych funkcji korelacji (w  $J/(\text{mol}\cdot\text{K})$ ). Rezultaty przedstawione zostały jako różnice względem wyników uzyskanych dla warstwy solwatacyjnej wypełnionej wodą niezaburzoną obecnością cząsteczki białka i lodu. Przebieg punktów obrazuje zmiany w czasie (12 ns) wartości parametrów uzyskanych dla układów, w których cząsteczki białka sąsiadowały z płaszczyznami podstawową (kolor zielony) i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Czarny punkt reprezentuje uporządkowanie wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP, kiedy nie sąsiaduje ono z lodem. b) Zmiany w czasie średnich rozkładów różnicowych energii wiązań wodorowych tworzących się między cząsteczkami wody w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białek CfAFP sąsiadujących z powierzchnią lodu. c) Zmiany w czasie średnich rozkładów różnicowych kątów  $\theta$ , wyznaczonych dla warstwy solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczek białka CfAFP sąsiadujących z powierzchnią lodu. Rezultaty przedstawione na wykresach b) i c) dotyczą układów, w których cząsteczki białka sąsiadowały z płaszczyzną podstawową lodu – rezultaty uzyskane w przypadku cząsteczek białka sąsiadujących z płaszczyzną pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu były jakościowo podobne. Linia czarna zaznaczone zostały na tych wykresach rezultaty uzyskane dla wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka, która nie sąsiaduje z powierzchnią lodu. Skala kolorystyczna obrazuje zmiany zachodzące w czasie – najciemniejsza linia czerwona odpowiada rezultatom uzyskanym po 1,2 ns symulacji, natomiast najciemniejsza linia niebieska – na końcu symulacji (krok czasowy między poszczególnymi liniami wynosi 1,8 ns). Czerwono-zielona skala kolorystyczna, umieszczona po prawej stronie, wskazuje przybliżone położenia minimów i maksimów na profilach energetycznych

### **C. Zmiany liczby i orientacji pierścieni zbudowanych z cząsteczek wody połączonych wiązaniami wodorowymi w wodzie solwatacyjnej cząsteczki białka CfAFP**

Przedstawione powyżej obserwacje są w pełni zgodne z proponowanym przeze mnie w Rozdziale 5.3.1 wyjaśnieniem mechanizmu oddziaływania cząsteczki białka CfAFP z lodem, odwołującym się do modelu Tanaki<sup>192–194</sup>. Model ten zakłada istnienie w ciekłej wodzie w równowadze uporządkowanych (wysokoobjętościowych) struktur, tworzących się z udziałem wiązań wodorowych, oraz nieuporządkowanej wody. W ramach modelu nie zdefiniowano, jaką formę przyjmują proponowane struktury o wysokiej objętości. Można jednak przypuszczać, że mogą nimi być (albo stanowić ich części składowe) na przykład pierścienie pięcio- i sześcioczołowe, które (z przyczyn geometrycznych) charakteryzują się stosunkowo niską energią. Dalsza część analizy struktury wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białek CfAFP polegała więc na poszukiwaniu pierścieni powstających z udziałem cząsteczek wody połączonych wiązaniami wodorowymi. Zmiany średniej liczby takich pierścieni (przypadającej na jedną cząsteczkę wody w warstwie solwatacyjnej) w czasie, dla różnych odległości białko-lód, zaprezentowane zostały na Rys. 5.38 a.



Rys. 5.38. Zmiany w czasie wybranych parametrów charakteryzujących wodę solwacyjną powierzchni aktywnej cząsteczek białka CfAFP sąsiadujących z powierzchnią lodu. a) Zmiany w czasie średniej liczby pierścieni cztero-, pięcio- i sześcioczłonowych obecnych w wodzie solwacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka (zwróconej w kierunku powierzchni lodu), przypadających na cząsteczkę wody. b) Zmiany w czasie rozkładów różnicowych odchyżeń standardowych położenia atomów tlenu sześcioczłonowych pierścieni od średniej odległości tych atomów od środka pierścienia c) Zmiany w czasie rozkładów różnicowych kątów między wektorami: prostym do płaszczyzny wyznaczonej położeniami atomów tlenu tego pierścienia oraz przechodzącym przez atomy C reszty THR 36 oraz CA reszty GLY 44 białka (wektor ten jest w przybliżeniu prostym do powierzchni aktywnej cząsteczki białka), uzyskanych dla warstwy solwacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP, zwróconej tą powierzchnią w kierunku płaszczyzny podstawowej lodu. Rezultaty przedstawione na wykresach dotyczą układów, w których cząsteczki białka sąsiadowały z płaszczyzną pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu były jakościowo podobne. Linia czarną zaznaczone zostały na tych wykresach rezultaty uzyskane dla wody solwacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka, która nie sąsiaduje z powierzchnią lodu. Skala kolorystyczna obrazuje zmiany zachodzące w czasie – najciemniejsza linia czerwona odpowiada rezultatom uzyskanym po 1,2 ns symulacji, natomiast najciemniejsza linia niebieska – na końcu symulacji (krok czasowy między poszczególnymi liniami wynosi 1,8 ns). Czerwono-zielona skala kolorystyczna, umieszczona ponad wykresem, wskazuje przybliżone położenia minimów i maksimów na profilach energetycznych

Wraz z postępowaniem procesu krzepnięcia, liczba pierścieni sześcioczłonowych w wodzie solwacyjnej powierzchni aktywnej białka wzrastała. Fakt ten jest zrozumiały, biorąc pod uwagę, że pierścienie takie stanowią element struktury lodu. W warstwie solwacyjnej obecne były również pierścienie pięcioczłonowe. Ich obecność nie jest zaskakująca, ponieważ, jak pokazano<sup>74</sup>, pierścienie te są jednym z elementów warstwy przejściowej łączącej powierzchnię aktywną białek AFP z kryształem lodu w stanie związanym. Zaprezentowane rezultaty wskazują, że pierścienie takie są obecne w warstwie solwacyjnej powierzchni aktywnej już na wczesnym etapie procesu wiązania się cząsteczki białka CfAFP z lodem, a ponadto, ich liczba tylko w niewielkim stopniu zmienia się w czasie. Fakt ten przywodzi na myśl przedstawione wcześniej rezultaty dotyczące zmian średniej energii oddziaływań cząsteczek wody solwacyjnej z powierzchnią białka. Energia ta, podobnie jak liczba pierścieni pięcioczłonowych, nie ulegała zmianie w czasie, mimo postępującego procesu krzepnięcia wody. Argumentowałam wtedy, że woda znajdująca się w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią aktywną białka, posiada strukturę wystarczająco dobrą

z punktu widzenia procesu wiązania się białka z lodem jeszcze zanim białko znajdzie się w sąsiedztwie lodu. W efekcie, w obszarze tym nie zachodzą dalsze zmiany strukturalne. Rezultaty dotyczące zmian zawartości pierścieni pięciocząłowych w wodzie solwatacyjnej białka, wraz z wiedzą dotyczącą obecności tych pierścieni w warstwie wody graniczącej z powierzchnią białka w stanie związanym, zdają się potwierdzać te wnioski.

Aby woda solwatacyjna białka sąsiadującego z lodem mogła bez przeszkód zakrzepnąć, pierścienie sześciocząłowe formujące się w tej warstwie powinny być zorientowane w odpowiedni sposób zarówno względem sieci krystalicznej sąsiadującego z nią lodu, jak i powierzchni białka. Analiza zmian średniej orientacji pierścieni sześciocząłowych względem powierzchni lodu w czasie została przeprowadzona z wykorzystaniem wielkości kąta tworzącego się między wektorem normalnym do płaszczyzny dopasowanej do położenia atomów tlenu cząsteczek wody tworzących poszczególne pierścienie sześciocząłowe i wektorem (w przybliżeniu) prostopadłym do powierzchni lodu oraz powierzchni aktywnej cząsteczki białka. Rezultaty przeprowadzonej analizy, w postaci wykresów różnicowych średnich rozkładów tego kąta, przedstawione zostały na Rys. 5.38 b.

Podobnie jak poprzednio, zaobserwować można różnice między wynikami uzyskanymi dla układów, w których odległości między cząsteczkami białka i powierzchnią lodu były różne. Gdy cząsteczka białka znajdowała się w optymalnej odległości od powierzchni lodu, pewne orientacje pierścieni sześciocząłowych względem powierzchni lodu i białka były preferowane. W przypadku odległości białko-lód, które odpowiadają maksimum energetycznym przedstawionym na Rys. 5.36, orientacje przyjmowane przez pierścienie były bardziej losowe (podobnie jak ma to miejsce w czystej wodzie). Ponadto, same pierścienie okazały się być wyraźnie bardziej zdeformowane niż pierścienie powstające w warstwie solwatacyjnej białek usytuowanych w optymalnej odległości od lodu. Miarą deformacji pierścieni zastosowaną do analizy było średnie odchylenie położenia atomów tlenu cząsteczek wody tworzących pierścienie od średniej odległości między środkiem pierścienia i atomami tlenu. Należy jednak zwrócić uwagę, że wyniki uzyskane z zastosowaniem tego parametru mogą być w niektórych przypadkach mylące, jako że np. w przypadku idealnego pierścienia o konformacji łódkowej, parametr ten przyjmuje niezerową wartość. Jednakże, celem analizy (podobnie jak w przypadku innych omawianych wcześniej parametrów) było porównanie rezultatów uzyskanych dla rzeczywistej i fikcyjnej (wypełnionej wodą niezaburzoną obecnością białka i lodu) warstwy solwatacyjnej, a więc wielkość ta wciąż może zostać zastosowana jako przybliżona miara deformacji struktury pierścieni. Jak można zaobserwować na Rys. 5.38 c, uzyskane rezultaty stoją w zgodzie z wynikami wcześniejszych analiz, wykazując cykliczną zmienność z odległością białko-lód.

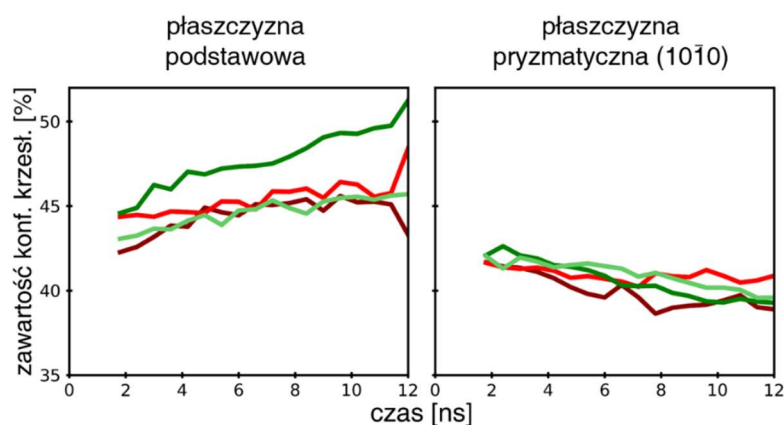
Jak wynika z rezultatów przedstawionych na Rys. 5.38 c, średnia orientacja pierścieni względem powierzchni białka jest w podobna w warstwach solwatacyjnych cząsteczek



sąsiadujących z płaszczyznami podstawową i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) lodu. Analiza konformacji pierścieni sześciocłonowych powstających w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP wskazuje jednak na występowanie pewnych różnic w strukturze tej warstwy, w zależności od płaszczyzny krystalograficznej lodu, z którą sąsiaduje cząsteczka białka.

Konformacje pierścieni sześciocłonowych wyznaczone zostały poprzez znalezienie płaszczyzn najlepiej dopasowanych do położenia atomów tlenu cząsteczek wody tworzących poszczególne pierścienie i wyznaczenie liczby atomów tlenu znajdujących się po obu stronach tych płaszczyzn. Jeśli pierścień przyjmuje konformację krzesłową, liczba atomów tlenu znajdujących się po obu stronach płaszczyzny powinna wynosić odpowiednio cztery i dwa, podczas gdy dla konformacji łódkowej – po trzy po każdej stronie pierścienia.

Uzyskane wyniki, w formie wartości średnich, przedstawione zostały na Rys. 5.39. Jak wspomniałam wcześniej, rezultaty różniły się w zależności od tego, z którą płaszczyzną krystalograficzną sąsiadowały poddawane analizie cząsteczki białka. Nie jest to jednak wynik zaskakujący, ponieważ – jak wielokrotnie wspomniałam wcześniej – proces krzepnięcia postępuje na rozważanych płaszczyznach krystalograficznych lodu w odmienny sposób, a to z kolei przekładać się może na obserwowane różnice. Ponadto, pokazano również<sup>74</sup>, że struktura warstwy wody będącej w kontakcie z powierzchnią aktywną białka, gdy białko to związane jest z lodem, jest nieco inna w przypadku wiązania z płaszczyznami podstawową i pryzmatyczną ( $10\bar{1}0$ ) kryształu. Na tej podstawie, a także na podstawie uzyskanych wyników, można wyciągnąć wniosek, że struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka, mimo stosunkowo wysokiego uporządkowania, wykazuje pewną „elastyczność”, co umożliwia jej dopasowywanie się do struktury lodu, z którym oddziałuje.



Rys. 5.39. Zmiany w czasie średniej zawartości pierścieni o konformacji krzesłowej w warstwie solwatacyjnej powierzchni aktywnej białka CfAFP sąsiadującego z powierzchnią lodu. Liniami zielonymi zaznaczone zostały wyniki uzyskane w przypadku układów, w których odległość cząsteczki białka od powierzchni lodu odpowiadała położeniom minimum energetycznych na profilu energetycznym (Rys. 5.26): linia jaśniejsza – minimum dla odległości ok. 0,6 nm, linia ciemniejsza – minimum dla odległości ok. 1,1 nm, natomiast liniami czerwonymi – rezultaty odpowiadające odległościom białko-lód bliskim położeniom maksimum energetycznych: linia jaśniejsza – maksimum dla odległości ok. 0,8 nm, linia ciemniejsza – maksimum dla odległości ok. 1,2 nm).

## Rozdział 6

# Wnioski

Celem niniejszej pracy było znalezienie odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób białka przeciwdziałające zamarzaniu są w stanie rozpoznać fazę stałą w ogromnym nadmiarze ciekłej wody oraz poznanie szczegółów mechanizmu procesu wiązania się tych białek z powierzchnią lodu. Aby to osiągnąć zaplanowałam i przeprowadziłam szereg symulacji komputerowych, które pozwoliły mi na uzyskanie nowych danych dotyczących tych zagadnień.

Badania rozpoczęłam od analizy postępu procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu. Uzyskane przeze mnie rezultaty pokazały, że stan powierzchni kryształu lodu (charakteryzowany zawartością „wolnych” wiązań O-H) nie ma wielkiego wpływu na przebieg tego procesu. Jednocześnie pokazałam również, że przebieg procesu krzepnięcia może zależeć od stopnia wewnętrznego uporządkowania kryształu lodu, a dokładniej od kierunku i natężenia pola elektrycznego generowanego przez ten kryształ. Analiza struktury wody solwatacyjnej lodu oraz porównanie jej ze strukturą ciekłej, przechłodzonej wody, pozwoliła mi na wyciągnięcie wniosków dotyczących przyczyny preferencji względem formy regularnej w nowo powstającym lodzie.

Najważniejszą część mojej pracy stanowią badania nad mechanizmem wiązania się cząsteczki białka CfAFP z powierzchnią lodu. Jak pokazałam, cząsteczka białka zaczyna oddziaływać z lodem już gdy znajduje się w odległości od jego powierzchni przekraczającej 1 nm. Kluczową rolę w tym procesie pełni ciekła woda wypełniająca obszar między powierzchniami cząsteczki białka i kryształu lodu. Stosując różne parametry charakteryzujące strukturę wody pokazałam, że struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP jest w pewnym stopniu podobna do struktury wody solwatacyjnej kryształu. Istnienie takiego podobieństwa decyduje o tym, że białka AFP – w przeciwieństwie do białek nieposiadających aktywności przeciwwzrosteniowej – są w stanie związać się z powierzchnią lodu.

Jeden z zaproponowanych w literaturze mechanizmów funkcjonowania białek AFP zakłada, że proces krzepnięcia wody znajdującej się między cząsteczką białka AFP i lodem jest ułatwiony, w porównaniu do sytuacji, gdy białko jest nieobecne. Aby to sprawdzić, porównałam szybkość procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu w tych dwóch sytuacjach. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że model ten nie jest poprawny. Proces krzepnięcia nie tylko

nie postępował szybciej w obecności cząsteczek białka CfAFP, ale okazał się być nawet nieco spowolniony w porównaniu do sytuacji, gdy białko było nieobecne w otoczeniu kryształu.

Jak pokazała analiza zmian w czasie odległości i orientacji cząsteczek białka CfAFP względem powierzchni lodu, cząsteczki białka wykazywały tendencje do przyjmowania pewnych, nieprzypadkowych, położeń względem sieci krystalicznej lodu. Zaproponowałam, że efekt ten związany jest z nakładaniem się warstw solwatacyjnych lodu i powierzchni wiążącej cząsteczki białka, które przebiegać może w sposób niezakłócony tylko w przypadku, gdy oddziałujące ze sobą powierzchnie są względem siebie zorientowane w odpowiedni. Założenie to znalazło poparcie w wynikach analizy zmian strukturalnych zachodzących w czasie w ciekłej wodzie wypełniającej obszar między cząsteczką białka i lodem.

Uzyskane przeze mnie rezultaty wyraźnie wskazywały na istnienie zdalnego oddziaływania między cząsteczką białka CfAFP i powierzchnią lodu. W celu dalszego zgłębienia tego zagadnienia przeprowadziłam badania, w których cząsteczki białka zlokalizowane zostały w różnych odległościach od powierzchni lodu. W odróżnieniu od poprzednich eksperymentów, możliwość zmiany położenia cząsteczek białka w czasie została w sposób sztuczny ograniczona, poprzez przytrzymanie jednego z ich powierzchniowych atomów w położeniu referencyjnym. Dzięki temu możliwe było sprawdzenie, w jaki sposób struktura wody solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki CfAFP zmienia się wraz z jej odległością od powierzchni lodu oraz skorelowanie tych zmian z przebiegiem krzywej obrazującej zmiany entalpii swobodnej układu w funkcji odległości.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na wyciągnięcie kilku ciekawych wniosków dotyczących roli wody solwatacyjnej w procesie oddziaływania i wiązania się cząsteczki białka CfAFP z powierzchnią lodu. Pokazałam mianowicie, że niedopasowanie odległości cząsteczki białka względem lodu skutkuje pojawianiem się w układzie siły (przyciągającej lub odpychającej), której zadaniem jest skorygowanie położenia tej cząsteczki. Stosując założenia modelu wody zaproponowanego przez Tanakę, podjęłam próbę wyjaśnienia zaobserwowanego zjawiska. Według tego modelu, w stanie ciekłym cząsteczki wody zdolne są do łączenia się w uporządkowane, stosunkowo stabilne energetycznie agregaty, charakteryzujące się dużą objętością własną. Agregaty te występują w niewielkiej liczbie i otoczone są, występującymi w ogromnym nadmiarze, nieuporządkowanymi cząsteczkami wody. W związku z tym, że są one stosunkowo stabilne energetycznie, ich deformacja lub destrukcja wiązać się będzie z nakładem energii. Jest to przyczyna, dla której, przy próbie zmiany odległości cząsteczki białka od powierzchni lodu, pojawia się stosowna siła przeciwdziałająca tej zmianie.

W pobliżu powierzchni lodu, powstawanie uporządkowanych struktur jest ułatwione, ponieważ powierzchnia kryształu stanowi matrycę, na której struktury te mogą się nadbudowywać. Jak zostało wielokrotnie pokazane w literaturze, struktura wody solwatacyjnej powierzchni

aktywnej białek AFP jest bardziej uporządkowana niż struktura wody niezaburzonej obecnością substancji rozpuszczonych. Jak pokazałam, wynika to z faktu, że zarodki takich uporządkowanych struktur tworzą się również na powierzchni aktywnej białka AFP. Kiedy białko AFP zbliża się do powierzchni lodu, warstwy solwatacyjne lodu i białka zaczynają ze sobą oddziaływać. Jeśli odległość oddziałujących ze sobą powierzchni będzie optymalna, warstwy solwatacyjne będą w stanie bez przeszkód połączyć się ze sobą, tworząc większą strukturę.

Przeprowadzone badania pozwoliły mi na przedstawienie szeregu rezultatów, potwierdzających słuszność przedstawionego powyżej mechanizmu. Wykorzystując parametry uporządkowania oparte na koncepcji dwucząstkowych funkcji korelacji oraz dokonując opisu geometrii wiązań wodorowych powstających w wodzie solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka sąsiadującego w powierzchnią lodu pokazałam, że struktura wody zmienia się w sposób cykliczny wraz z odległością cząsteczki białka od lodu. Podobną tendencję zaobserwowałam również podczas analizy zmian wielkości siły wywieranej na cząsteczki białka CfAFP sąsiadujące z powierzchnią lodu wraz ze zmieniającą się odległością między powierzchniami białka i lodu. Pokazałam również, że w wodzie solwatacyjnej powierzchni aktywnej cząsteczki białka powstają sześciocłonowe pierścienie, zbudowane z cząsteczek wody połączonych wiązaniami wodorowymi, oraz że szybkość powstawania tych pierścieni uzależniona jest od położenia cząsteczki białka względem powierzchni lodu.

W wyniku przeprowadzonych badań udało mi się znaleźć odpowiedź na pytanie, w jaki sposób cząsteczka białka CfAFP jest w stanie rozpoznać fazę stałą, mimo iż znajduje się ona w otoczeniu ogromnej ilości ciekłej, przechłodzonej wody, jedynie w niewielkim stopniu różniącej się pod względem struktury od lodu. Jak pokazałam, jest to możliwe dzięki istnieniu pewnych podobieństw strukturalnych między warstwami solwatacyjnymi lodu i powierzchni aktywnej cząsteczki białka CfAFP. W efekcie, warstwy te mogą ze sobą oddziaływać, jak również, w odpowiednich warunkach, łączyć się ze sobą, co prowadzi do powstania większej, uporządkowanej struktury. Konsekwencją tego jest stabilizacja położenia cząsteczki białka względem powierzchni lodu, jeśli położenie to jest optymalne z punktu widzenia procesu wiązania się cząsteczki białka z lodem, jak również pojawianie się siły korygującej położenie cząsteczki, gdy odległość białka od lodu jest nieodpowiednia.

Ważnym wnioskiem wynikającym z przeprowadzonych badań jest również fakt, że cząsteczka białka CfAFP nie może bezpośrednio adsorbować się na powierzchni kryształu lodu, ponieważ wymagałoby to pokonania wysokiej bariery energetycznej. Zamiast tego, białko będzie się raczej umiejscawiać w pewnej odległości od powierzchni lodu, optymalnej z punktu widzenia postępującego w ciekłej wodzie procesu krzepnięcia. Do ostatecznego związania się cząsteczki białka z powierzchnią lodu będzie dochodzić w wyniku całkowitego zakrzepnięcia wody oddzielającej je od powierzchni lodu.

Zaprezentowane w pracy rezultaty badań zostały opublikowane w pięciu publikacjach naukowych:

1. Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. *The accretion of the new ice layer on the surface of hexagonal ice crystal and the influence of the local electric field on this process* J. Chem. Phys. 2017, 147, 174502
2. Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. *Molecular dynamics study on the role of solvation water in the adsorption of hyperactive AFP to the ice surface* Phys. Chem. Chem. Phys. 2018, 20, 25365
3. Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. *Role of the Solvation Water in Remote Interactions of Hyperactive Antifreeze Proteins with the Surface of Ice* J. Phys. Chem. B 2019, 123, 8010
4. Grabowska, J. *Why is the cubic structure preferred in newly formed ice?* Phys. Chem. Chem. Phys. 2019, 21, 18043
5. Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. *Interfacial water controls the process of adsorption of hyperactive antifreeze proteins onto the ice surface* J. Mol. Liq. 2020, 306, 112909

# Streszczenie

Białka przeciwdziałające zamarzaniu (AFP) posiadają zdolność do hamowania wzrostu kryształów lodu powstających w płynach ustrojowych organizmów żywych narażonych na działanie temperatur niższych od 0°C, poprzez wiązanie się z powierzchnią tych kryształów. W ramach mojej pracy, stosując metody dynamiki molekularnej, starałam się poznać szczegóły mechanizmu zachodzenia tego procesu. Aby to osiągnąć, przeprowadziłam szereg symulacji komputerowych układów o różnej budowie. W pierwszym etapie badań skupiłam się na mechanizmie procesu krzepnięcia wody na powierzchni kryształu lodu i pokazałam, że stopień wewnętrznego uporządkowania kryształu może mieć znaczący wpływ na ten proces. Następnie, przeprowadziłam analizę zmian strukturalnych zachodzących w wodzie wypełniającej obszar między powierzchnią aktywną cząsteczki białka CfAFP i lodem. Na tej podstawie stwierdziłam, że cząsteczka białka jest w stanie zdalnie oddziaływać z powierzchnią lodu, już gdy odległość między tą cząsteczką i lodem przekracza 1 nm. Jak pokazałam, efekt ten związany jest z nakładaniem się warstw solwacyjnych cząsteczki białka i lodu, i jest przyczyną występowania preferencji względem pewnych wzajemnych odległości i orientacji cząsteczki białka i lodu. Kiedy ułożenie cząsteczki białka względem lodu nie jest optymalne, w układzie pojawia się siła – odpychająca lub przyciągająca – która koryguje jej położenie. Dzięki temu cząsteczka białka może przyjąć taką orientację, która umożliwi jej późniejsze związanie się z lodem.

# Abstract

Antifreeze proteins (AFPs) have the ability to stop the growth of the crystals of ice which are formed in the bodily fluids of the living organisms exposed to temperatures lower than  $0^{\circ}\text{C}$  by binding to the surface of ice crystals. In my work – with the use of molecular dynamics – I tried to learn the details of the mechanism of this process. To achieve this, I carried out a number of computer simulations of different systems. In the first part of my research, I focused on the mechanism of the process of water solidification on the ice crystal surface and showed that the degree of internal ordering of the crystal can have a significant impact on this process. Next, I analyzed the structural changes which occur in liquid water located in the area between the active plane of CfAFP protein and ice. On this basis, I found that the protein molecule is able to remotely interact with the ice surface (via liquid water) when the distance between this molecule and ice exceeds 1 nm. As I have shown, this effect is associated with the overlapping of solvation layers of the protein and ice, which is the reason for the preference for certain mutual distances and orientations of the protein molecule and ice. When the arrangement of the protein molecule relative to the ice is not optimal, a force appears in the system (repulsive or attractive) which corrects the positioning of the molecule. Thanks to this effect, the protein molecule can adopt such an orientation that will allow it to bind to the surface of ice later.

# Podziękowania

Praca została wykonana z wykorzystaniem Infrastruktury PLGrid.

Obliczenia wykonano na komputerach Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej

Część pracy powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr UMO-2017/27/N/ST4/02519, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.



# Spis literatury

- (1) Israelachvili, J.; Wennerström, H. Role of Hydration and Water Structure in Biological and Colloidal Interactions. *Nature* **1996**, *379*, 219–225.
- (2) Breiten, B.; Lockett, M. R.; Sherman, W.; Fujita, S.; Al-Sayah, M.; Lange, H.; Bowers, C. M.; Heroux, A.; Krilov, G.; Whitesides, G. M. Water Networks Contribute to Enthalpy/Entropy Compensation in Protein–Ligand Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15579–15584.
- (3) Conti Nibali, V.; Havenith, M. New Insights into the Role of Water in Biological Function: Studying Solvated Biomolecules Using Terahertz Absorption Spectroscopy in Conjunction with Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12800–12807.
- (4) Jungwirth, P. Biological Water or Rather Water in Biology? *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 2449–2451.
- (5) Ball, P. Water Is an Active Matrix of Life for Cell and Molecular Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, 13327–13335.
- (6) Chakraborty, S.; Sinha, S. K.; Bandyopadhyay, S. Low-Frequency Vibrational Spectrum of Water in the Hydration Layer of a Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 13626–13631.
- (7) Olano, L. R.; Rick, S. W. Hydration Free Energies and Entropies for Water in Protein Interiors. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7991–8000.
- (8) Despa, F.; Fernández, A.; Berry, R. S. Dielectric Modulation of Biological Water. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 228104.
- (9) Scholander, P. F.; van Dam, L.; Kanwisher, J. W.; Hammel, H. T.; Gordon, M. S. Supercooling and Osmoregulation in Arctic Fish. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1957**, *49*, 5–24.
- (10) DeVries, A. L.; Wohlschlag, D. E. Freezing Resistance in Some Antarctic Fishes. *Science* **1969**, *163*, 1073–1075.
- (11) DeVries, A. L. Glycoproteins as Biological Antifreeze Agents in Antarctic Fishes. *Science* (80-. ). **1971**, *172*, 1152–1155.
- (12) Sidebottom, C.; Buckley, S.; Pudney, P.; Twigg, S.; Jarman, C.; Holt, C.; Telford, J.; McArthur, A.; Worrall, D.; Hubbard, R.; et al. Heat-Stable Antifreeze Protein from Grass. *Nature* **2000**, *406*, 256–256.
- (13) Hassas-Roudsari, M.; Goff, H. D. Ice Structuring Proteins from Plants: Mechanism of Action and Food Application. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 425–436.

- (14) Guo, S.; Garnham, C. P.; Whitney, J. C.; Graham, L. A.; Davies, P. L. Re-Evaluation of a Bacterial Antifreeze Protein as an Adhesin with Ice-Binding Activity. *PLoS One* **2012**, *7*, e48805.
- (15) Vance, T. D. R.; Olijve, L. L. C.; Campbell, R. L.; Voets, I. K.; Davies, P. L.; Guo, S. Ca<sup>2+</sup>-Stabilized Adhesin Helps an Antarctic Bacterium Reach out and Bind Ice. *Biosci. Rep.* **2014**, *34*, 357–368.
- (16) Zachariassen, K. E.; Kristiansen, E. Ice Nucleation and Antinucleation in Nature. *Cryobiology* **2000**, *41*, 257–279.
- (17) Duman, J. G. Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annu. Rev. Physiol.* **2001**, *63*, 327–357.
- (18) Harding, M. M.; Anderberg, P. I.; Haymet, A. D. J. “Antifreeze” Glycoproteins from Polar Fish. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1381–1392.
- (19) Sicheri, F.; Yang, D. S. C. Ice-Binding Structure and Mechanism of an Antifreeze Protein from Winter Flounder. *Nature* **1995**, *375*, 427–431.
- (20) Jia, Z.; DeLuca, C. I.; Chao, H.; Davies, P. L. Structural Basis for the Binding of a Globular Antifreeze Protein to Ice. *Nature* **1996**, *384*, 285–288.
- (21) Nishimiya, Y.; Kondo, H.; Takamichi, M.; Sugimoto, H.; Suzuki, M.; Miura, A.; Tsuda, S. Crystal Structure and Mutational Analysis of Ca<sup>2+</sup>-Independent Type II Antifreeze Protein from Longsnout Poacher, *Brachyopsis Rostratus*. *J. Mol. Biol.* **2008**, *382*, 734–746.
- (22) Liu, Y.; Li, Z.; Lin, Q.; Kosinski, J.; Seetharaman, J.; Bujnicki, J. M.; Sivaraman, J.; Hew, C.-L. Structure and Evolutionary Origin of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Herring Type II Antifreeze Protein. *PLoS One* **2007**, *2*, e548.
- (23) Deng, G.; Andrews, D. W.; Laursen, R. A. Amino Acid Sequence of a New Type of Antifreeze Protein, from the Longhorn Sculpin *Myoxocephalus Octodecimspinosus*. *FEBS Lett.* **1997**, *402*, 17–20.
- (24) Gauthier, S. Y.; Scotter, A. J.; Lin, F.-H.; Baardsnes, J.; Fletcher, G. L.; Davies, P. L. A Re-Evaluation of the Role of Type IV Antifreeze Protein. *Cryobiology* **2008**, *57*, 292–296.
- (25) Tachibana, Y.; Fletcher, G. L.; Fujitani, N.; Tsuda, S.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. Antifreeze Glycoproteins: Elucidation of the Structural Motifs That Are Essential for Antifreeze Activity. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 856–862.
- (26) Jia, Z.; Davies, P. L. Antifreeze Proteins: An Unusual Receptor–Ligand Interaction. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 101–106.
- (27) Graether, S. P.; Kuiper, M. J.; Gagné, S. M.; Walker, V. K.; Jia, Z.; Sykes, B. D.; Davies, P. L.  $\beta$ -Helix Structure and Ice-Binding Properties of a Hyperactive Antifreeze Protein from an Insect. *Nature* **2000**, *406*, 325–328.
- (28) Marshall, C. B.; Daley, M. E.; Graham, L. A.; Sykes, B. D.; Davies, P. L. Identification of the Ice-Binding Face of Antifreeze Protein from *Tenebrio Molitor*. *FEBS Lett.* **2002**, *529*,

- 261–267.
- (29) Kondo, H.; Hanada, Y.; Sugimoto, H.; Hoshino, T.; Garnham, C. P.; Davies, P. L.; Tsuda, S. Ice-Binding Site of Snow Mold Fungus Antifreeze Protein Deviates from Structural Regularity and High Conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 9360–9365.
- (30) Scotter, A. J.; Marshall, C. B.; Graham, L. A.; Gilbert, J. A.; Garnham, C. P.; Davies, P. L. The Basis for Hyperactivity of Antifreeze Proteins. *Cryobiology* **2006**, *53*, 229–239.
- (31) Grandum, S.; Yabe, A.; Nakagomi, K.; Tanaka, M.; Fumio Takemura; Kobayashi, Y.; Frivik, P.-E. Analysis of Ice Crystal Growth for a Crystal Surface Containing Adsorbed Antifreeze Proteins. *J. Cryst. Growth* **1999**, *205*, 382–390.
- (32) Pertaya, N.; Marshall, C. B.; Celik, Y.; Davies, P. L.; Braslavsky, I. Direct Visualization of Spruce Budworm Antifreeze Protein Interacting with Ice Crystals: Basal Plane Affinity Confers Hyperactivity. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 333–341.
- (33) Drori, R.; Celik, Y.; Davies, P. L.; Braslavsky, I. Ice-Binding Proteins That Accumulate on Different Ice Crystal Planes Produce Distinct Thermal Hysteresis Dynamics. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140526.
- (34) Antson, A. A.; Smith, D. J.; Roper, D. I.; Lewis, S.; Caves, L. S. D.; Verma, C. S.; Buckley, S. L.; Lillford, P. J.; Hubbard, R. E. Understanding the Mechanism of Ice Binding by Type III Antifreeze Proteins. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 875–889.
- (35) Knight, C. A. A.; Cheng, C. C. C.; DeVries, A. L. L. Adsorption of Alpha-Helical Antifreeze Peptides on Specific Ice Crystal Surface Planes. *Biophys. J.* **1991**, *59*, 409–418.
- (36) Chen, G.; Jia, Z. Ice-Binding Surface of Fish Type III Antifreeze. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1602–1608.
- (37) Kondo, H.; Mochizuki, K.; Bayer-Giraldi, M. Multiple Binding Modes of a Moderate Ice-Binding Protein from a Polar Microalga. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 25295–25303.
- (38) Bayer-Giraldi, M.; Sasaki, G.; Nagashima, K.; Kipfstuhl, S.; Vorontsov, D. A.; Furukawa, Y. Growth Suppression of Ice Crystal Basal Face in the Presence of a Moderate Ice-Binding Protein Does Not Confer Hyperactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 7479–7484.
- (39) Olijve, L. L. C.; Meister, K.; DeVries, A. L.; Duman, J. G.; Guo, S.; Bakker, H. J.; Voets, I. K. Blocking Rapid Ice Crystal Growth through Nonbasal Plane Adsorption of Antifreeze Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 3740–3745.
- (40) Davies, P. L.; Baardsnes, J.; Kuiper, M. J.; Walker, V. K. Structure and Function of Antifreeze Proteins. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2002**, *357*, 927–935.
- (41) Banach, M.; Konieczny, L.; Roterman, I. Why Do Antifreeze Proteins Require a Solenoid? *Biochimie* **2018**, *144*, 74–84.
- (42) Ba, Y.; Wongsakhaluang, J.; Li, J. Reversible Binding of the HPLC6 Isoform of Type I Antifreeze Proteins to Ice Surfaces and the Antifreeze Mechanism Studied by Multiple Quantum Filtering–Spin Exchange NMR Experiment. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 330–

- 331.
- (43) Flores, A.; Quon, J. C.; Perez, A. F.; Ba, Y. Mechanisms of Antifreeze Proteins Investigated via the Site-Directed Spin Labeling Technique. *Eur. Biophys. J.* **2018**, *47*, 611–630.
- (44) Raymond, J. A.; DeVries, A. L. Adsorption Inhibition as a Mechanism of Freezing Resistance in Polar Fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74*, 2589–2593.
- (45) Kuiper, M. J.; Morton, C. J.; Abraham, S. E.; Gray-Weale, A. The Biological Function of an Insect Antifreeze Protein Simulated by Molecular Dynamics. *Elife* **2015**, *4*, e05142.
- (46) Yeh, Y.; Feeney, R. E. Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 601–618.
- (47) Knight, C. A.; Driggers, E.; DeVries, A. L. Adsorption to Ice of Fish Antifreeze Glycopeptides 7 and 8. *Biophys. J.* **1993**, *64*, 252–259.
- (48) Zepeda, S.; Yokoyama, E.; Uda, Y.; Katagiri, C.; Furukawa, Y. In Situ Observation of Antifreeze Glycoprotein Kinetics at the Ice Interface Reveals a Two-Step Reversible Adsorption Mechanism. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 3666–3672.
- (49) Pertaya, N.; Marshall, C. B.; DiPrinzio, C. L.; Wilen, L.; Thomson, E. S.; Wettlaufer, J. S.; Davies, P. L.; Braslavsky, I. Fluorescence Microscopy Evidence for Quasi-Permanent Attachment of Antifreeze Proteins to Ice Surfaces. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 3663–3673.
- (50) Kristiansen, E.; Zachariassen, K. E. The Mechanism by Which Fish Antifreeze Proteins Cause Thermal Hysteresis. *Cryobiology* **2005**, *51*, 262–280.
- (51) Celik, Y.; Graham, L. A.; Mok, Y.-F.; Bar, M.; Davies, P. L.; Braslavsky, I. Superheating of Ice Crystals in Antifreeze Protein Solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 5423–5428.
- (52) Celik, Y.; Drori, R.; Pertaya-Braun, N.; Altan, A.; Barton, T.; Bar-Dolev, M.; Groisman, A.; Davies, P. L.; Braslavsky, I. Microfluidic Experiments Reveal That Antifreeze Proteins Bound to Ice Crystals Suffice to Prevent Their Growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 1309–1314.
- (53) Drori, R.; Davies, P. L.; Braslavsky, I. When Are Antifreeze Proteins in Solution Essential for Ice Growth Inhibition? *Langmuir* **2015**, *31*, 5805–5811.
- (54) Hawes, T. C. A Root Bond between Ice and Antifreeze Protein. *Cryobiology* **2016**, *73*, 147–151.
- (55) Chao, H.; Houston, M. E.; Hodges, R. S.; Kay, C. M.; Sykes, B. D.; Loewen, M. C.; Davies, P. L.; Sönnichsen, F. D. A Diminished Role for Hydrogen Bonds in Antifreeze Protein Binding to Ice. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14652–14660.
- (56) Haymet, A. D. J.; Ward, L. G.; Harding, M. M. Winter Flounder “Antifreeze” Proteins: Synthesis and Ice Growth Inhibition of Analogues That Probe the Relative Importance of Hydrophobic and Hydrogen-Bonding Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 941–948.
- (57) Kong, C. H. Z.; Leung, I. K. H.; Sarojini, V. Synthetic Insect Antifreeze Peptides Modify Ice Crystal Growth Habit. *CrystEngComm* **2017**, *19*, 2163–2167.

- (58) Baardsnes, J.; Davies, P. L. Contribution of Hydrophobic Residues to Ice Binding by Fish Type III Antifreeze Protein. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2002**, *1601*, 49–54.
- (59) Howard, E. I.; Blakeley, M. P.; Haertlein, M.; Haertlein, I. P.; Mitschler, A.; Fisher, S. J.; Siah, A. C.; Salvay, A. G.; Popov, A.; Dieckmann, C. M.; et al. Neutron Structure of Type-III Antifreeze Protein Allows the Reconstruction of AFP-Ice Interface. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 724–732.
- (60) Wierzbicki, A.; Dalal, P.; Cheatham, T. E.; Knickelbein, J. E.; Haymet, A. D. J.; Madura, J. D. Antifreeze Proteins at the Ice/Water Interface: Three Calculated Discriminating Properties for Orientation of Type I Proteins. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1442–1451.
- (61) Svergun, D. I.; Richard, S.; Koch, M. H. J.; Sayers, Z.; Kuprin, S.; Zaccai, G. Protein Hydration in Solution: Experimental Observation by x-Ray and Neutron Scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 2267–2272.
- (62) Merzel, F.; Smith, J. C. Is the First Hydration Shell of Lysozyme of Higher Density than Bulk Water? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 5378–5383.
- (63) Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Why the Solvation Water around Proteins Is More Dense than Bulk Water. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12113–12124.
- (64) Chakraborty, S.; Jana, B. Conformational and Hydration Properties Modulate Ice Recognition by Type I Antifreeze Protein and Its Mutants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 11678–11689.
- (65) Midya, U. S.; Bandyopadhyay, S. Role of Polar and Nonpolar Groups in the Activity of Antifreeze Proteins: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 9389–9398.
- (66) Meister, K.; Strazdaite, S.; DeVries, A. L.; Lotze, S.; Olijve, L. L. C.; Voets, I. K.; Bakker, H. J.; Klein, M. L. Observation of Ice-like Water Layers at an Aqueous Protein Surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 17732–17736.
- (67) Chakraborty, S.; Jana, B. Optimum Number of Anchored Clathrate Water and Its Instantaneous Fluctuations Dictate Ice Plane Recognition Specificities of Insect Antifreeze Protein. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 3056–3067.
- (68) Nutt, D. R.; Smith, J. C. Dual Function of the Hydration Layer around an Antifreeze Protein Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13066–13073.
- (69) Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Structure of Solvation Water around the Active and Inactive Regions of a Type III Antifreeze Protein and Its Mutants of Lowered Activity. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 075101.
- (70) Gallagher, K. R.; Sharp, K. A. Analysis of Thermal Hysteresis Protein Hydration Using the Random Network Model. *Biophys. Chem.* **2003**, *105*, 195–209.

- (71) Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Davies, P. L. Anchored Clathrate Waters Bind Antifreeze Proteins to Ice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 7363–7367.
- (72) Hakim, A.; Nguyen, J. B.; Basu, K.; Zhu, D. F.; Thakral, D.; Davies, P. L.; Isaacs, F. J.; Modis, Y.; Meng, W. Crystal Structure of an Insect Antifreeze Protein and Its Implications for Ice Binding. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 12295–12304.
- (73) Chakraborty, S.; Jana, B. Molecular Insight into the Adsorption of Spruce Budworm Antifreeze Protein to an Ice Surface: A Clathrate-Mediated Recognition Mechanism. *Langmuir* **2017**, *33*, 7202–7214.
- (74) Hudait, A.; Odendahl, N.; Qiu, Y.; Paesani, F.; Molinero, V. Ice-Nucleating and Antifreeze Proteins Recognize Ice through a Diversity of Anchored Clathrate and Ice-like Motifs. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4905–4912.
- (75) Yang, C.; Sharp, K. A. The Mechanism of the Type III Antifreeze Protein Action: A Computational Study. *Biophys. Chem.* **2004**, *109*, 137–148.
- (76) Yang, C.; Sharp, K. A. Hydrophobic Tendency of Polar Group Hydration as a Major Force in Type I Antifreeze Protein Recognition. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *59*, 266–274.
- (77) Brotzakis, Z. F.; Voets, I. K.; Bakker, H. J.; Bolhuis, P. G. Water Structure and Dynamics in the Hydration Layer of a Type III Anti-Freeze Protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 6996–7006.
- (78) Graether, S. P.; Jia, Z. Modeling *Pseudomonas Syringae* Ice-Nucleation Protein as  $\alpha\beta$ -Helical Protein. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1169–1173.
- (79) Garnham, C. P.; Campbell, R. L.; Walker, V. K.; Davies, P. L. Novel Dimeric  $\beta$ -Helical Model of an Ice Nucleation Protein with Bridged Active Sites. *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 36.
- (80) Kobashigawa, Y.; Nishimiya, Y.; Miura, K.; Ohgiya, S.; Miura, A.; Tsuda, S. A Part of Ice Nucleation Protein Exhibits the Ice-Binding Ability. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 1493–1497.
- (81) Wilson, P. W.; Osterday, K. E.; Heneghan, A. F.; Haymet, A. D. J. Type I Antifreeze Proteins Enhance Ice Nucleation above Certain Concentrations. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34741–34745.
- (82) Midya, U. S.; Bandyopadhyay, S. Interfacial Water Arrangement in the Ice-Bound State of an Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir* **2017**, *33*, 5499–5510.
- (83) Meister, K.; Lotze, S.; Olijve, L. L. C.; DeVries, A. L.; Duman, J. G.; Voets, I. K.; Bakker, H. J. Investigation of the Ice-Binding Site of an Insect Antifreeze Protein Using Sum-Frequency Generation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1162–1167.
- (84) Modig, K.; Qvist, J.; Marshall, C. B.; Davies, P. L.; Halle, B. High Water Mobility on the Ice-Binding Surface of a Hyperactive Antifreeze Protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**,

- 12, 10189.
- (85) Persson, F.; Söderhjelm, P.; Halle, B. The Spatial Range of Protein Hydration. *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 215104.
- (86) Tanaka, H.; Okabe, I. Thermodynamic Stability of Hexagonal and Cubic Ices. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *259*, 593–598.
- (87) Carignano, M. A. Formation of Stacking Faults during Ice Growth on Hexagonal and Cubic Substrates. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 501–504.
- (88) Malkin, T. L.; Murray, B. J.; Brukhno, A. V.; Anwar, J.; Salzmann, C. G. Structure of Ice Crystallized from Supercooled Water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 4020–4020.
- (89) Malkin, T. L.; Murray, B. J.; Salzmann, C. G.; Molinero, V.; Pickering, S. J.; Whale, T. F. Stacking Disorder in Ice I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 60–76.
- (90) Murray, B. J.; Bertram, A. K. Formation and Stability of Cubic Ice in Water Droplets. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 186–192.
- (91) Carignano, M. a. A.; Baskaran, E.; Shepson, P. B. B.; Szleifer, I. Molecular Dynamics Simulation of Ice Growth from Supercooled Pure Water and from Salt Solution. In *Annals of Glaciology*; 2006; Vol. 44, pp 113–117.
- (92) Moore, E. B.; Molinero, V. Is It Cubic? Ice Crystallization from Deeply Supercooled Water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 20008.
- (93) Li, T.; Donadio, D.; Russo, G.; Galli, G. Homogeneous Ice Nucleation from Supercooled Water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 19807.
- (94) Benet, J.; MacDowell, L. G.; Sanz, E. A Study of the Ice-Water Interface Using the TIP4P/2005 Water Model. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 22159–22166.
- (95) Hudait, A.; Qiu, S.; Lupi, L.; Molinero, V. Free Energy Contributions and Structural Characterization of Stacking Disordered Ices. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 9544–9553.
- (96) Johari, G. P. Water's Size-Dependent Freezing to Cubic Ice. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 194504.
- (97) Seo, M.; Jang, E.; Kim, K.; Choi, S.; Kim, J. S. Understanding Anisotropic Growth Behavior of Hexagonal Ice on a Molecular Scale: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 154503.
- (98) Johnston, J. C.; Molinero, V. Crystallization, Melting, and Structure of Water Nanoparticles at Atmospherically Relevant Temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6650–6659.
- (99) Lupi, L.; Hudait, A.; Peters, B.; Grünwald, M.; Gotchy Mullen, R.; Nguyen, A. H.; Molinero, V. Role of Stacking Disorder in Ice Nucleation. *Nature* **2017**, *551*, 218–222.
- (100) Zaragoza, A.; Conde, M. M.; Espinosa, J. R.; Valeriani, C.; Vega, C.; Sanz, E. Competition between Ices Ih and Ic in Homogeneous Water Freezing. *J. Chem. Phys.* **2015**, *143*, 134504.
- (101) Haji-Akbari, A.; Debenedetti, P. G. Direct Calculation of Ice Homogeneous Nucleation Rate

- for a Molecular Model of Water. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 10582–10588.
- (102) Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. The Accretion of the New Ice Layer on the Surface of Hexagonal Ice Crystal and the Influence of the Local Electric Field on This Process. *J. Chem. Phys.* **2017**, *147*, 174502.
- (103) Rozmanov, D.; Kusalik, P. G. Temperature Dependence of Crystal Growth of Hexagonal Ice (Ih). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 15501.
- (104) Amaya, A. J.; Pathak, H.; Modak, V. P.; Laksmono, H.; Loh, N. D.; Sellberg, J. A.; Sierra, R. G.; McQueen, T. A.; Hayes, M. J.; Williams, G. J.; et al. How Cubic Can Ice Be? *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 3216–3222.
- (105) Grabowska, J.; Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Molecular Dynamics Study on the Role of Solvation Water in the Adsorption of Hyperactive AFP to the Ice Surface. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 25365–25376.
- (106) Choi, S.; Jang, E.; Kim, J. S. In-Layer Stacking Competition during Ice Growth. *J. Chem. Phys.* **2014**, *140*, 014701.
- (107) Nada, H.; Furukawa, Y. Anisotropy in Growth Kinetics at Interfaces between Proton-Disordered Hexagonal Ice and Water: A Molecular Dynamics Study Using the Six-Site Model of H<sub>2</sub>O. *J. Cryst. Growth* **2005**, *283*, 242–256.
- (108) Carignano, M. A.; Shepson, P. B.; Szleifer, I. Molecular Dynamics Simulations of Ice Growth from Supercooled Water. *Mol. Phys.* **2005**, *103*, 2957–2967.
- (109) Fletcher, N. H. Reconstruction of Ice Crystal Surfaces at Low Temperatures. *Philosophical Magazine B*. 1992, pp 109–115.
- (110) Buch, V.; Groenzin, H.; Li, I.; Shultz, M. J.; Tosatti, E. Proton Order in the Ice Crystal Surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 5969–5974.
- (111) Pan, D.; Liu, L.-M.; Tribello, G. A.; Slater, B.; Michaelides, A.; Wang, E. Surface Energy and Surface Proton Order of the Ice Ih Basal and Prism Surfaces. *J. Phys. Condens. Matter* **2010**, *22*, 074209.
- (112) Avidor, N.; Allison, W. Helium Diffraction as a Probe of Structure and Proton Order on Model Ice Surfaces. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 4520–4523.
- (113) Bishop, C. L.; Pan, D.; Liu, L. M.; Tribello, G. A.; Michaelides, A.; Wang, E. G.; Slater, B. On Thin Ice: Surface Order and Disorder during Pre-Melting. *Faraday Discuss.* **2009**, *141*, 277–292.
- (114) Batista, E. R.; Jónsson, H. Diffusion and Island Formation on the Ice Ih Basal Plane Surface. *Comput. Mater. Sci.* **2001**, *20*, 325–336.
- (115) Thierfelder, C.; Hermann, A.; Schwerdtfeger, P.; Schmidt, W. G. Strongly Bonded Water Monomers on the Ice Ih Basal Plane: Density-Functional Calculations. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2006**, *74*, 1–5.
- (116) Sun, Z.; Pan, D.; Xu, L.; Wang, E. Role of Proton Ordering in Adsorption Preference of



- Polar Molecule on Ice Surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 13177–13181.
- (117) Pedersen, A.; Wikfeldt, K. T.; Karssemeijer, L.; Cuppen, H.; Jónsson, H. Molecular Reordering Processes on Ice (0001) Surfaces from Long Timescale Simulations. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 234706.
- (118) Nada, H.; Furukawa, Y. Growth Inhibition Mechanism of an Ice–Water Interface by a Mutant of Winter Flounder Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Study. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7111–7119.
- (119) Midya, U. S.; Bandyopadhyay, S. Operation of Kelvin Effect in the Activities of an Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 3079–3087.
- (120) Naullage, P. M.; Qiu, Y.; Molinero, V. What Controls the Limit of Supercooling and Superheating of Pinned Ice Surfaces? *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 1712–1720.
- (121) Hudait, A.; Qiu, Y.; Odendahl, N.; Molinero, V. Hydrogen-Bonding and Hydrophobic Groups Contribute Equally to the Binding of Hyperactive Antifreeze and Ice-Nucleating Proteins to Ice. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7887–7898.
- (122) Chakraborty, S.; Jana, B. Ordered Hydration Layer Mediated Ice Adsorption of a Globular Antifreeze Protein: Mechanistic Insight. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 19298–19310.
- (123) Kim, S. Issues on the Choice of a Proper Time Step in Molecular Dynamics. *Phys. Procedia* **2014**, *53*, 60–62.
- (124) Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- (125) Forester, T. R.; Smith, W. SHAKE, Rattle, and Roll: Efficient Constraint Algorithms for Linked Rigid Bodies. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 102–111.
- (126) Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular Dynamics with Coupling to an External Bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- (127) Allen, M. P.; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*; Oxford University Press, 2017; Vol. 1.
- (128) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; et al. *Amber 12. Reference Manual*; University of California: San Francisco, 2012.
- (129) Kumar, R.; Schmidt, J. R.; Skinner, J. L. Hydrogen Bonding Definitions and Dynamics in Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 204107.
- (130) Stillinger, F. H.; Rahman, A. Improved Simulation of Liquid Water by Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **1974**, *60*, 1545–1557.
- (131) Mahoney, M. W.; Jorgensen, W. L. A Five-Site Model for Liquid Water and the

- Reproduction of the Density Anomaly by Rigid, Nonpolarizable Potential Functions. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 8910–8922.
- (132) Kalinichev, A. G. Molecular Simulations of Liquid and Supercritical Water: Thermodynamics, Structure, and Hydrogen Bonding. *Rev. Mineral. Geochemistry* **2001**, *42*, 83–129.
- (133) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- (134) Berendsen, H. J. C.; Grigera, J. R.; Straatsma, T. P. The Missing Term in Effective Pair Potentials. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 6269–6271.
- (135) Molinero, V.; Moore, E. B. Water Modeled As an Intermediate Element between Carbon and Silicon †. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4008–4016.
- (136) Abascal, J. L. F.; Sanz, E.; García Fernández, R.; Vega, C. A Potential Model for the Study of Ices and Amorphous Water: TIP4P/Ice. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 234511.
- (137) Yan, J. Y.; Patey, G. N. Molecular Dynamics Simulations of Ice Nucleation by Electric Fields. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 7057–7064.
- (138) Kar, R. K.; Bhunia, A. Will It Be Beneficial To Simulate the Antifreeze Proteins at Ice Freezing Condition or at Lower Temperature? *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 11485–11495.
- (139) Lee, H. Structures, Dynamics, and Hydrogen-Bond Interactions of Antifreeze Proteins in TIP4P/Ice Water and Their Dependence on Force Fields. *PLoS One* **2018**, *13*, e0198887.
- (140) Calvaresi, M.; Höfinger, S.; Zerbetto, F. Local Ice Melting by an Antifreeze Protein. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2046–2052.
- (141) Kim, J. S.; Yethiraj, A. A Diffusive Anomaly of Water in Aqueous Sodium Chloride Solutions at Low Temperatures. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 1729–1735.
- (142) Kuffel, A.; Czapiewski, D.; Zielkiewicz, J. Unusual Structural Properties of Water within the Hydration Shell of Hyperactive Antifreeze Protein. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 055103.
- (143) Schrödinger. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1. LCC.
- (144) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- (145) Green, H. S. *The Molecular Theory of Fluids*; North-Holland Pub. Co.: Amsterdam, 1952.
- (146) Lazaridis, T.; Paulaitis, M. E. Entropy of Hydrophobic Hydration: A New Statistical Mechanical Formulation. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3847–3855.
- (147) Lazaridis, T.; Karplus, M. Orientational Correlations and Entropy in Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 4294–4316.
- (148) Saija, F.; Saitta, A. M.; Giaquinta, P. V. Statistical Entropy and Density Maximum Anomaly in Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 3587–3589.
- (149) Zielkiewicz, J. Two-Particle Entropy and Structural Ordering in Liquid Water. *J. Phys.*

- Chem. B* **2008**, *112*, 7810–7815.
- (150) Czapiewski, D.; Zielkiewicz, J. Structural Properties of Hydration Shell around Various Conformations of Simple Polypeptides. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 4536–4550.
- (151) Truskett, T. M.; Torquato, S.; Debenedetti, P. G. Towards a Quantification of Disorder in Materials: Distinguishing Equilibrium and Glassy Sphere Packings. *Phys. Rev. E* **2000**, *62*, 993–1001.
- (152) Esposito, R.; Saija, F.; Marco Saitta, A.; Giaquinta, P. V. Entropy-Based Measure of Structural Order in Water. *Phys. Rev. E* **2006**, *73*, 040502.
- (153) Errington, J. R.; Debenedetti, P. G. Relationship between Structural Order and the Anomalies of Liquid Water. *Nature* **2001**, *409*, 318–321.
- (154) Giovambattista, N.; Debenedetti, P. G.; Sciortino, F.; Stanley, H. E. Structural Order in Glassy Water. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **2005**, *71*, 1–12.
- (155) Arunan, E.; Desiraju, G. R.; Klein, R. A.; Sadlej, J.; Scheiner, S.; Alkorta, I.; Clary, D. C.; Crabtree, R. H.; Dannenberg, J. J.; Hobza, P.; et al. Definition of the Hydrogen Bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 1637–1641.
- (156) Buch, V. Growth and Structure of Amorphous Ice Condensates: A Computational Study. II. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 3814–3823.
- (157) Luzar, A.; Chandler, D. Effect of Environment on Hydrogen Bond Dynamics in Liquid Water. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 928–931.
- (158) Kuo, I.-F. W.; Mundy, C. J. An Ab Initio Molecular Dynamics Study of the Aqueous Liquid-Vapor Interface. *Science (80-. )*. **2004**, *303*, 658–660.
- (159) Wernet, P.; Nordlund, D.; Bergmann, U.; Cavalleri, M.; Odellius, N.; Ogasawara, H.; Näslund, L. Å.; Hirsch, T. K.; Ojamäe, L.; Glatzel, P.; et al. The Structure of the First Coordination Shell in Liquid Water. *Science (80-. )*. **2004**, *304*, 995–999.
- (160) Russo, J.; Tanaka, H. Understanding Water's Anomalies with Locally Favoured Structures. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3556.
- (161) Shiratani, E.; Sasai, M. Growth and Collapse of Structural Patterns in the Hydrogen Bond Network in Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 7671–7680.
- (162) Shiratani, E.; Sasai, M. Molecular Scale Precursor of the Liquid–Liquid Phase Transition of Water. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 3264–3276.
- (163) Lin, S.-T.; Blanco, M.; Goddard, W. A. The Two-Phase Model for Calculating Thermodynamic Properties of Liquids from Molecular Dynamics: Validation for the Phase Diagram of Lennard-Jones Fluids. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 11792–11805.
- (164) Jana, B.; Pal, S.; Maiti, P. K.; Lin, S.-T.; Hynes, J. T.; Bagchi, B. Entropy of Water in the Hydration Layer of Major and Minor Grooves of DNA. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19611–19618.
- (165) Lin, S.-T.; Maiti, P. K.; Goddard, W. A. Two-Phase Thermodynamic Model for Efficient

- and Accurate Absolute Entropy of Water from Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8191–8198.
- (166) Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. The Importance of the Shape of the Protein-Water Interface of a Kinesin Motor Domain for Dynamics of the Surface Atoms of the Protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 5561.
- (167) Lechner, W.; Dellago, C. Accurate Determination of Crystal Structures Based on Averaged Local Bond Order Parameters. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 114707.
- (168) Brukhno, A. V.; Anwar, J.; Davidchack, R.; Handel, R. Challenges in Molecular Simulation of Homogeneous Ice Nucleation. *J. Phys. Condens. Matter* **2008**, *20*, 494243.
- (169) Steinhardt, P. J.; Nelson, D. R.; Ronchetti, M. Bond-Orientational Order in Liquids and Glasses. *Phys. Rev. B* **1983**, *28*, 784–805.
- (170) Moore, E. B.; de la Llave, E.; Welke, K.; Scherlis, D. a; Molinero, V. Freezing, Melting and Structure of Ice in a Hydrophilic Nanopore. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4124–4134.
- (171) Nguyen, A. H.; Molinero, V. Identification of Clathrate Hydrates, Hexagonal Ice, Cubic Ice, and Liquid Water in Simulations: The CHILL+ Algorithm. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 9369–9376.
- (172) Rodger, P. M.; Forester, T. R.; Smith, W. Simulations of the Methane Hydrate/Methane Gas Interface near Hydrate Forming Conditions Conditions. *Fluid Phase Equilib.* **1996**, *116*, 326–332.
- (173) Rodger, P. M. Methane Hydrate: Melting and Memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *912*, 474–482.
- (174) Jiménez-Ángeles, F.; Firoozabadi, A. Nucleation of Methane Hydrates at Moderate Subcooling by Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 11310–11318.
- (175) Hwang, W.; Lang, M. J.; Karplus, M. Force Generation in Kinesin Hinges on Cover-Neck Bundle Formation. *Structure* **2008**, *16*, 62–71.
- (176) Yan, J. Y.; Overduin, S. D.; Patey, G. N. Understanding Electrofreezing in Water Simulations. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 074501.
- (177) Ehre, D.; Lavert, E.; Lahav, M.; Lubomirsky, I. Water Freezes Differently on Positively and Negatively Charged Surfaces of Pyroelectric Materials. *Science (80-. )*. **2010**, *327*, 672–675.
- (178) Belitzky, A.; Mishuk, E.; Ehre, D.; Lahav, M.; Lubomirsky, I. Source of Electrofreezing of Supercooled Water by Polar Crystals. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 43–46.
- (179) Carpenter, K.; Bahadur, V. Electrofreezing of Water Droplets under Electrowetting Fields. *Langmuir* **2015**, *31*, 2243–2248.
- (180) Yan, J. Y.; Patey, G. N. Heterogeneous Ice Nucleation Induced by Electric Fields. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2555–2559.
- (181) Yan, J. Y.; Patey, G. N. Ice Nucleation by Electric Surface Fields of Varying Range and

- Geometry. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 144501.
- (182) Takahashi, T.; Kobayashi, T. The Role of the Cubic Structure in Freezing of a Supercooled Water Droplet on an Ice Substrate. *J. Cryst. Growth* **1983**, *64*, 593–603.
- (183) Beaglehole, D.; Wilson, P. Thickness and Anisotropy of the Ice-Water Interface. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11053–11055.
- (184) Karim, O. A.; Haymet, A. D. J. The Ice/Water Interface: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 6889–6896.
- (185) Hayward, J. A.; Haymet, A. D. J. The Ice/Water Interface: Orientational Order Parameters for the Basal, Prism, {2021}, and {2110} Interfaces of Ice Ih. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 3712–3719.
- (186) Meister, K.; Ebbinghaus, S.; Xu, Y.; Duman, J. G.; DeVries, A.; Gruebele, M.; Leitner, D. M.; Havenith, M. Long-Range Protein-Water Dynamics in Hyperactive Insect Antifreeze Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 1617–1622.
- (187) Kuffel, A.; Zielkiewicz, J. Properties of Water in the Region between a Tubulin Dimer and a Single Motor Head of Kinesin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4527.
- (188) Kuffel, A.; Czapiewski, D.; Zielkiewicz, J. Unusual Dynamic Properties of Water near the Ice-Binding Plane of Hyperactive Antifreeze Protein. *J. Chem. Phys.* **2015**, *143*, 135102.
- (189) Hua, L.; Huang, X.; Zhou, R.; Berne, B. J. Dynamics of Water Confined in the Interdomain Region of a Multidomain Protein. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 3704–3711.
- (190) Siemer, A. B.; Huang, K.-Y.; McDermott, A. E. Protein–Ice Interaction of an Antifreeze Protein Observed with Solid-State NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 17580–17585.
- (191) Tompa, K.; Bánki, P.; Bokor, M.; Kamasa, P.; Lasanda, G.; Tompa, P. Interfacial Water at Protein Surfaces: Wide-Line NMR and DSC Characterization of Hydration in Ubiquitin Solutions. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2789–2798.
- (192) Tanaka, H. Simple Physical Explanation of the Unusual Thermodynamic Behavior of Liquid Water. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 5750–5753.
- (193) Tanaka, H. Two-Order-Parameter Description of Liquids: Critical Phenomena and Phase Separation of Supercooled Liquids. *J. Phys. Condens. Matter* **1999**, *11*, L159–L168.
- (194) Tanaka, H. Simple Physical Model of Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 799–809.
- (195) Kuffel, A.; Szałachowska, M. The Significance of the Properties of Water for the Working Cycle of the Kinesin Molecular Motor. *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 235101.
- (196) Mochizuki, K.; Matsumoto, M. Collective Transformation of Water between Hyperactive Antifreeze Proteins: RiAFPs. *Crystals* **2019**, *9*, 188.