



Imię i nazwisko autora rozprawy: Marcin Stasiulewicz
Dyscyplina naukowa: Nauki Chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Wpływ oddziaływań sfer hydratacyjnych białek i osmolitów na stabilność białek w roztworze

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Influence of the interactions of the hydration spheres of proteins and osmolytes on the stability of proteins in solution

Promotor	Drugi promotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
prof. dr hab. inż. Janusz Stangret	
Promotor pomocniczy	Kopromotor
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
dr Aneta Panuszko	

Gdańsk, rok 2022

OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Marcin Stasiulewicz

Ja, niżej podpisany(a), oświadczam, iż jestem świadomy(a), że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:
„Wpływ oddziaływań sfer hydratacyjnych białek i osmolitów na stabilność białek w roztworze” do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr. hab. inż. Januszem Stangretem, , promotorem pomocniczym dr Anetą Panuszko.
Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.
Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę/nie wyrażam zgody* na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotnić w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.

OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Marcin Stasiulewicz

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Wpływ oddziaływań sfer hydratacyjnych białek i osmolitów na stabilność białek w roztworze

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Influence of the interactions of the hydration spheres of proteins and osmolytes on the stability of proteins in solution

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: Janusz Stangret

Drugi promotor rozprawy doktorskiej*:

Promotor pomocniczy rozprawy doktorskiej*: Aneta Panuszko

Kopromotor rozprawy doktorskiej*:

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: osmolyty, woda, zwijanie białek, hydratacja, wiązania wodorowe, roztwory wodne, techniki spektroskopowe

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: osmolytes, water, protein folding, hydration, hydrogen bonds, aqueous solutions, spectroscopic techniques

Streszczenie rozprawy w języku polskim: Zjawisko zwijania białek w roztworach osmolitów jest intensywnie badane od wielu lat. Wciąż jednak nie ma zgodności co do mechanizmu stabilizacji/destabilizacji białek. Celem niniejszej pracy było poznanie mechanizmu wpływu osmolitów na stabilność białek. W tym aspekcie przeprowadzone badania były ukierunkowane na poznanie wpływu osmolitów na sferę hydratacyjną białka. W niniejszej pracy zbadałem wpływ przedstawiciela osmolitów stabilizujących – betainy i przedstawiciela osmolitów destabilizujących – mocznika na sfery hydratacyjne wybranych cząsteczek modelujących zwinięte formy białek, biomakrocząsteczek w formie zwiniętej oraz cząsteczek modelujących fragmenty rozwiniętego białka.

Zastosowaną techniką badawczą była spektroskopia oscylacyjna FTIR. Użycie specjalnie opracowanej metody analizy danych widmowych, umożliwiło wyizolowanie widm wody zaburzonej jednocześnie przez obecność cząsteczki modelowej/biomakrocząsteczki i osmolitu. Dostarczyły one informacji o zmianie stanu strukturalno-energetycznego wody w sferze hydratacyjnej cząsteczek modelowych/biomakrocząsteczek będących pod wpływem osmolitu. Interpretacja danych eksperymentalnych pozwoliła na sformułowanie wniosków dotyczących mechanizmu stabilizacji/destabilizacji białek przez osmolyty.

Streszczenie rozprawy w języku angielskim: The phenomena of protein folding in osmolyte solution has been investigated for many years. However, there is no general agreement on the mechanism of protein stabilization/destabilization. The aim of this work was to understand the mechanism of osmolytes influence on the stability of a protein. In this aspect, studies focused on understanding the influence of osmolytes on the hydration sphere of a protein. To achieve this goal, the influence of a representative of stabilizing osmolytes – betaine and a representative of destabilizing osmolytes – urea on the hydration spheres of selected molecules modeling the folded forms of proteins, the biomacromolecules in a folded form and molecules modeling fragments of the unfolded protein was studied.

The utilized research technique was FTIR spectroscopy. The application of method of spectral data analysis led to the isolation of the spectral fraction of those water molecules that were affected simultaneously by the presence of a model molecule/biomacromolecule and an osmolyte molecule. They provided information on the change of the structural-energetic state of water in the hydration sphere of model molecule/biomacromolecule under the influence of osmolyte. Interpretation of the experimental data allowed for the formulation conclusions regarding the mechanism of stabilization/destabilization of protein by osmolytes.

Streszczenie rozprawy w języku, w którym została napisana:**

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku, w którym została napisana:**

* *niepotrzebne skreślić*

** *dotyczy rozpraw doktorskich napisanych w innych językach, niż polski lub angielski*



SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	6
ABSTRACT	7
LISTA SKRÓTÓW	8
SŁOWNIK UŻYTYCH TERMINÓW	9
1. WSTĘP	10
2. CEL I ZAKRES PRACY	12
2.1. Wybór układów badawczych.....	12
3. PRZEGLĄD LITERATURY	15
3.1. Białka i ich hydratacja.....	15
3.2. Hydratacja molekuł hydrofobowych i amfifilowych.....	18
3.3. Wpływ osmolitów na białka.....	21
3.4. Wpływ osmolitów na wodę w układzie z udziałem substancji modelowych.....	26
3.5. Hydratacja peptydu <i>trpzip-1</i>	32
3.6. Hydratacja lizozymu i wpływ osmolitów na jego stabilność.....	32
3.7. Hydratacja mocznika i jego wpływ na białka.....	35
3.8. Hydratacja betainy i jej wpływ na białka.....	39
3.9. Hydratacja stosowanych w pracy cząsteczek modelowych.....	41
3.10. Widma oscylacyjne wody. Poglądy na temat struktury wody ciekłej.....	45
4. METODYKA BADAWCZA	52
4.1. Użyte substancje.....	52
4.2. Przygotowanie roztworów.....	52
4.3. Pomiar widm FTIR.....	53
4.4. Oprogramowanie komputerowe.....	53
4.5. Metoda analizy danych widmowych.....	54
4.5.1. Izolacja widm wody zaburzonej.....	54
4.5.2. Izolacja „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej.....	57
4.5.3. Konstrukcja „syntetycznych” widm wody zaburzonej.....	58
4.5.4. Izolacja widm wody „podwójnie” zaburzonej.....	59
4.5.5. Ilustracja metody izolacji widm wody zaburzonej w układach zawierających dwie substancje rozpuszczone.....	61
4.6. Analiza liczby cząsteczek wody „podwójnie” zaburzonej.....	64
4.7. Interpretacja danych widmowych.....	64
5. WYNIKI BADAŃ	67
5.1. Wpływ osmolitu stabilizującego i destabilizującego na sfery hydratacyjne cząsteczek modelujących stan natywny białka.....	67
5.1.1. Analiza danych widmowych.....	67
5.1.2. Analiza wyników teoretycznych.....	74
5.1.3. Podsumowanie wpływu osmolitów na cząsteczki modelowe.....	75
5.2. Wpływ osmolitu stabilizującego i destabilizującego na sferę hydratacyjną biomakrocząsteczek.....	78
5.2.1. Analiza danych widmowych.....	78
5.2.2. Podsumowanie wpływu osmolitów stabilizujących i destabilizujących na biomakrocząsteczki.....	84
5.3. Wpływ osmolitu stabilizującego i destabilizującego na sfery hydratacyjne modeli fragmentów rozwiniętych białek.....	85



5.3.1. Analiza danych widmowych	85
5.3.2. Konfrontacja wpływu osmolitów na sfery hydratacyjne białek w formie zwiniętej i rozwiniętej.....	92
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE.....	93
7. DOROBEK NAUKOWY	97
8. LITERATURA	99
9. MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE.....	118

STRESZCZENIE

Zjawisko zwijania białek w roztworach osmolitów jest intensywnie badane od wielu lat. Wciąż jednak nie ma zgodności co do mechanizmu stabilizacji/destabilizacji białek. Celem niniejszej pracy było poznanie mechanizmu wpływu osmolitów na stabilność białek. W tym aspekcie przeprowadzone badania były ukierunkowane na poznanie wpływu osmolitów na sferę hydratacyjną białka. W niniejszej pracy zbadalem wpływ przedstawiciela osmolitów stabilizujących – betainy i przedstawiciela osmolitów destabilizujących – mocznika na sfery hydratacyjne wybranych cząsteczek modelujących zwinięte formy białek, biomakrocząsteczek w formie zwiniętej oraz cząsteczek modelujących fragmenty rozwiniętego białka.

Zastosowaną techniką badawczą była spektroskopia oscylacyjna FTIR. Użycie specjalnie opracowanej metody analizy danych widmowych, umożliwiło wyizolowanie widm wody zaburzonej jednocześnie przez obecność cząsteczki modelowej/biomakrocząsteczki i osmolitu. Dostarczyły one informacji o zmianie stanu strukturalno-energetycznego wody w sferze hydratacyjnej cząsteczek modelowych/biomakrocząsteczek będących pod wpływem osmolitu. Interpretacja danych eksperymentalnych pozwoliła na sformułowanie wniosków dotyczących mechanizmu stabilizacji/destabilizacji białek przez osmolity.

ABSTRACT

The phenomena of protein folding in osmolyte solution has been investigated for many years. However, there is no general agreement on the mechanism of protein stabilization/destabilization. The aim of this work was to understand the mechanism of osmolytes influence on the stability of a protein. In this aspect, studies focused on understanding the influence of osmolytes on the hydration sphere of a protein. To achieve this goal, the influence of a representative of stabilizing osmolytes – betaine and a representative of destabilizing osmolytes – urea on the hydration spheres of selected molecules modeling the folded forms of proteins, the biomacromolecules in a folded form and molecules modeling fragments of the unfolded protein was studied.

The utilized research technique was FTIR spectroscopy. The application of method of spectral data analysis led to the isolation of the spectral fraction of those water molecules that were affected simultaneously by the presence of a model molecule/biomacromolecule and an osmolyte molecule. They provided information on the change of the structural-energetic state of water in the hydration sphere of model molecule/biomacromolecule under the influence of osmolyte. Interpretation of the experimental data allowed for the formulation conclusions regarding the mechanism of stabilization/destabilization of protein by osmolytes.

LISTA SKRÓTÓW

AIMD	symulacje <i>ab initio</i> metodą dynamiki molekularnej
FTIR	spektroskopia fourierowska w podczerwieni
GLY	glicyna
NAGMA	<i>N</i> -acetylo-glicyno-metyloamid
NALMA	<i>N</i> -acetylo-leucyno-metylamid
NATA	<i>N</i> -acetylotryptofanoamid
NMA	<i>N</i> -metyloacetamid
NMG	<i>N</i> -metyloglicyna
RDF	funkcja rozkładu radialnego
SDF	funkcja przestrzennego rozkładu
TMAO	<i>N</i> -tlenek trimetyloaminy
TMG	<i>N,N,N</i> -trimetyloglicyna
U	mocznik
HDO	woda półciężka
MCR	metoda wielowymiarowej dekonwolucji krzywych
DMG	dimetyloglicyna
EXAFS	<i>extended X-Ray Absorption Fine Structure</i>
SFG	spektroskopia generowania częstotliwości sumarycznych
PNIPAM	poli(<i>N</i> -izopropyloakryloamid)
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
RNA	kwasy rybonukleinowe
NAM	kwasy <i>N</i> -acetylmuraminowe
NAG	<i>N</i> -acetyloglukozamina
GdnHCl	chlorowodorek guanidyny
DFT	teoria funkcjonału gęstości
SKSS	model Schellman, Kresheck, Sheraga i Stokes
REMD	symulacja metodą dynamiki molekularnej replik temperaturowych
QM/MM	mechanika kwantowa/mechanika molekularna
LDL	woda o niskiej gęstości
HDL	woda o małej gęstości
<i>hewl</i>	lizozym z białka jaja kurzego
RDG	funkcja zredukowanego gradientu gęstości

SŁOWNIK UŻYTYCH TERMINÓW

Woda zaburzona – woda będąca pod wpływem substancji rozpuszczonej w roztworze wodnym, spektralnie różna od wody czystej.

Parametr N – liczba moli (lub cząsteczek) wody zaburzonej przez 1 mol (lub jedną cząsteczkę) substancji rozpuszczonej.

„Eksperymentalna” woda zaburzona – woda zaburzona przez dwie substancje rozpuszczone w roztworze. Zawiera ona w sobie udział wody zaburzonej osobno przez każdą z substancji oraz udział wody będącej pod jednoczesnym wpływem dwóch substancji rozpuszczonych. Odpowiadają jej „eksperymentalne” widma wody zaburzonej.

„Syntetyczna” woda zaburzona – woda zaburzona przez dwie substancje rozpuszczone przy braku oddziaływań między ich sferami hydratacyjnymi (hipotetyczny stan roztworu). Odpowiadają jej „syntetyczne” widma wody zaburzonej, skonstruowane przez zsumowanie konturów widmowych wody zaburzonej przez czyste składniki z uwzględnieniem liczby zaburzonych przez nie cząsteczek wody oraz stosunku liczby moli obu składników.

Woda „podwójnie” zaburzona – woda będąca pod jednoczesnym wpływem dwóch różnych substancji rozpuszczonych. Odpowiadają jej widma wody „podwójnie” zaburzonej.

„Współdzielona” woda zaburzona – woda „podwójnie” zaburzona utworzona w wyniku nakładania się sfer hydratacyjnych obu substancji rozpuszczonych. Odpowiadają jej „współdzielone” widma wody zaburzonej.

Woda „nadmiarowa” – woda „podwójnie” zaburzona utworzona przez cząsteczki wody, pochodzące z otaczającego rozpuszczalnika, łączące sfery hydratacyjne obu substancji rozpuszczonych (tzw. woda „mostkująca”). Odpowiadają jej „nadmiarowe” widma wody zaburzonej.



1. WSTĘP

Wszystkie znane kluczowe dla życia procesy biologiczne wymagają obecności wody [1]. Proces zwijania białek do ich aktywnej natywnej formy zachodzi tylko w obecności wody. Natywna forma białka jest w delikatnej równowadze z formą zdenaturowaną. Stabilność i struktura aktywnych białek zależy od współdziałania interakcji między fragmentami białka oraz między powierzchnią białek z cząsteczkami wody. Może ona być zaburzona przez obecność innych substancji rozpuszczonych, zmianę temperatury lub ciśnienia.

Osmolity są małymi cząsteczkami organicznymi mogącymi wpływać na stabilność białek [2]. Ze względu na ich wpływ na białka można je podzielić na dwie grupy – stabilizatory i destabilizatory. Osmolity stabilizujące zapobiegają utracie aktywności biologicznej białek pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska, podczas gdy osmolity destabilizujące ułatwiają ich denaturację. Mechanizm wpływu osmolitów jest badany od wielu lat, jednak wciąż nie jest on do końca poznany. Według jednej z najpopularniejszych teorii, interakcje osmolitów stabilizujących i łańcuchów głównych białek są niekorzystne, zarówno z postacią form zwiniętych jak i zdenaturowanych białek. W rezultacie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek. W wyniku większego, niekorzystnego, efektu entropowego w przypadku rozwiniętych białek, związanego z występowaniem większej objętości wykluczonej, równowaga reakcji zwijania jest przesunięta w stronę formy zwiniętej [3–7]. Siłą napędową reakcji denaturacji wywieranej przez osmolity destabilizujące jest natomiast efekt entalpowy związany z ich bezpośrednim oddziaływaniem z powierzchnią białek [4,8]. W przypadku formy rozwiniętej białek, liczba miejsc z którymi denaturaty mogą oddziaływać jest większa w porównaniu do formy zwiniętej. Inne hipotezy stanowią, że stabilizacja lub destabilizacja białek jest skutkiem oddziaływań pośrednich, wynikających ze zmiany właściwości wody w obecności osmolitów [9–15]. Część autorów wskazuje, że stabilizacja białek jest efektem współdziałania oddziaływań pośrednich i bezpośrednich [10,16].

Wcześniejsze prace członków Zespołu naukowego, w którym realizowałem badania w ramach pracy doktorskiej wskazywały na dużą rolę mechanizmu pośredniego, określającego stabilność białek, polegającego na zmianie właściwości wody solwatacyjnej, a tym samym zmianie trwałości sfery hydratacyjnej



biomakrocząsteczek pod wpływem osmolitów [17]. Badaniu tego zagadnienia poświęciłem swoją pracę, wykorzystując w tym celu spektroskopię w podczerwieni.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem mojej pracy było poznanie mechanizmu wpływu osmolitów na stabilność białek w zakresie efektów związanych z ich sferą hydratacyjną. Jego osiągnięcie zamierzałem zrealizować z wykorzystaniem widm oscylacyjnych w podczerwieni z zastosowaniem techniki rozcieńczania izotopowego HDO w H₂O w temperaturze 25°C. Zanalizowanie danych widmowych w kontekście postawionego celu wymagało opracowania metody pozwalającej na wyodrębnienie udziału widmowego wody solwatacyjnej cząsteczki centralnej (białka, peptydu, cząsteczki modelowej) będącej pod wpływem sfery hydratacyjnej osmolitu. Wyodrębnione widmo wody „podwójnie zaburzonej”, przez jednoczesny wpływ cząsteczki centralnej i osmolitu, można porównać z widmem wody zaburzonej jedynie przez cząsteczkę centralną (bez obecności osmolitu w roztworze). Uzyskane różnice widmowe można interpretować w aspekcie zmiany stanu energetyczno-strukturalnego wody solwatacyjnej cząsteczki centralnej wywołanej obecnością osmolitu w roztworze.

2.1. Wybór układów badawczych

1) Jako przedstawiciela osmolitów stabilizujących do badań wybrałem *N,N,N*-trimetyloglicynę (TMG), natomiast jako przedstawiciela osmolitów destabilizujących wybrałem mocznik. Z wcześniejszych prac Zespołu badawczego, w którym wykonywałem swoją pracę wynika, że woda hydratacyjna wielu zbadanych osmolitów stabilizujących (aminokwasów, metylo pochodnych glicyny) [18,19], wykazuje duże wzajemne podobieństwo a także podobieństwo do sfery hydratacyjnej referencyjnego białka (lizozymu z białka jaja kurzego). Wyjątkiem od tej reguły jest tauryna [20]. Z drugiej strony osmolity destabilizujące (mocznik i jego alkilowe pochodne) [21] również wykazują względem siebie podobieństwo sfer hydratacyjnych. Stan wody hydratacyjnej osmolitów destabilizujących różni się jednak istotnie względem wody hydratacyjnej osmolitów stabilizujących oraz białka.

2) Do przetestowania nowo opracowanej metody analizy danych widmowych wybrałem jako cząsteczki centralne – związki modelowe względem charakterystycznych cech powierzchni białek w stanie zwiniętym. Są to *N*-metyloacetamid (NMA) oraz dimetylosulfotlenek (DMSO). Z wcześniejszych badań członków grupy badawczej, do której należałem wiedziałem, że NMA jest dobrym modelem do badania sfery hydratacyjnej białek [22]. Ustaliliśmy też, że istotny wpływ



na właściwości wody w sferze hydratacyjnej tej cząsteczki ma bezpośrednia bliskość położenia grupy polarnej i hydrofobowej w jej budowie [23]. Promuje ona tworzenie wzmocnionej, klatratopodobnej, sieci wiązań wodorowych wokół grupy hydrofobowej tej cząsteczki. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziliśmy także podobny wpływ analogicznego usytuowania polarnej i niepolarnych grup w cząsteczce DMSO na jej hydratację [24]. Powierzchnia peptydów i białek w zwiniętej formie charakteryzuje się bliską odległością fragmentów polarnych i niepolarnych. Kooperacja wiązań wodorowych między cząsteczkami wody oddziałującymi z grupą hydrofilową oraz cząsteczkami wody zlokalizowanymi przy powierzchni hydrofobowej skutkuje zakotwiczeniem u wspólnionej sieci wiązań wodorowych wody na grupie hydrofilowej oraz jej dynamiczną stabilizacją. Dlatego przy wyborze substancji modelowych względem zwiniętych form białek kierowałem się kryterium podobieństwa charakteru ich powierzchni do powierzchni białek, charakteryzujących się bezpośrednim sąsiedztwem grup hydrofilowych i hydrofobowych.

3) Do realizacji części zasadniczej swojej pracy wybrałem jako cząsteczki centralne – realne biomakrocząsteczki w formie zwiniętej: prosty peptyd *trpzip-1* oraz białko lizozym z białka jaja kurzego (*hewl*). *Trpzip-1* jest prostym peptydem przybierającym formę β -zakrętu, jego sekwencja jest dobrze poznana, peptyd ten cechuje się stabilną strukturą drugorzędową w roztworze. Lizozym jest małym białkiem globularnym o dobrze poznanej strukturze i jest często używany jako model w badaniu procesu zwijania białek. Obie biomakrocząsteczki występują w formie natywnej w 25°C, nawet przy najwyższej molalności mocznika użytej w moich badaniach. Mój wybór został podyktowany także tym, że hydratacja *trpzip-1* [25] i lizozymu [22] była zbadana wcześniej przez członków Zespołu naukowego, w którego pracy brałem udział.

4) Biomakrocząsteczek wymienionych w punkcie 3 (a także innych peptydów i białek) nie można badać w temperaturze pokojowej (25°C) w formie rozwiniętej. Cząsteczki te po zdenaturowaniu termicznym i ochłodzeniu mają zaburzoną i nie zdefiniowaną budowę, agregują i ulegają częściowej renaturacji. W związku z powyższym zmuszony zostałem do zastosowania jako cząsteczek centralnych związków modelowych względem fragmentów rozwiniętej formy białek. Uzasadnionym wyborem wydawała się glicyna (GLY) i *N*-metyloglicyna (NMG). GLY nie ma w swojej budowie typowej grupy hydrofobowej położonej w bezpośrednim sąsiedztwie grupy polarnej. Nasze obserwacje wskazują, że grupa -CH₂-, otoczona



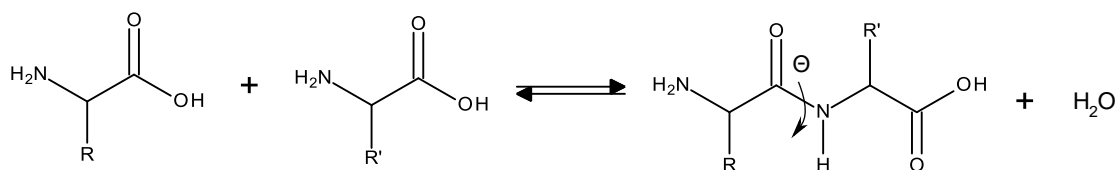
przez fragmenty polarne, nie jest wystarczająca do zorganizowania wokół siebie struktur hydratacyjnych charakterystycznych dla grup niepolarnych. Wyniki innych badaczy wspierają ten pogląd [26]. W przypadku NMG grup hydrofobowa znajduje się w większej odległości od grupy polarnej. Biorę oczywiście pod uwagę to, że zastosowane modele względem rozwiniętych form białek mają znaczące ograniczenia wynikające z wielkości i innej budowy w stosunku do biomakrocząsteczek. Dlatego też uzyskane wyniki dla modeli form rozwiniętych białek należy traktować z pewną rezerwą.

W swoich badaniach nie stosowałem buforów, ponieważ mają duży wpływ na sferę hydratacyjną innych cząsteczek obecnych w roztworze [27]. Dodatkowo ich obecność bardzo skomplikowałaby interpretację wyników widmowych.

3. PRZEGLĄD LITERATURY

3.1. Białka i ich hydratacja

Białka są cegiełkami życia. Są niezbędne we wszystkich procesach zapewniających funkcjonowanie organizmów takich jak transport tlenu przez hemoglobinę, funkcje strukturalne, enzymatyczne, receptorowe itd. [28]. Pod względem strukturalnym są biopolimerami złożonymi z aminokwasów białkowych, których sekwencja determinuje pierwszorzędową strukturę białka. W skład aminokwasów białkowych wchodzi dwadzieścia różnych α -aminokwasów. Różnią się one podstawnikami położonymi przy atomie węgla α . Z wyjątkiem glicyny, wszystkie aminokwasy są enancjomerami. W naturze występują prawie wyłącznie aminokwasy o konfiguracji L [29]. Aminokwasy w peptydach i białkach są związane ze sobą wiązaniami peptydowymi. Tworzenie wiązań peptydowych zachodzi w wyniku reakcji grup karboksylowych i grup aminowych aminokwasów. Reakcja ta dla dwóch aminokwasów może być zapisana schematycznie w następujący sposób:



Kąt dwuścienny θ w grupie $\text{H}-\text{N}-\text{C}=\text{O}$ wynosi około 180° , atomy wodoru i tlenu znajdują się w niej w pozycji *trans*, która jest stabilniejsza o około $90 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ w stosunku do konfiguracji *cis* [30]. Wiązanie peptydowe $-\text{NH}-\text{CO}-$ ma ograniczoną możliwość obrotu ze względu na jego częściowo podwójny charakter [28], który wynika z delokalizacji elektronu wiązania podwójnego w grupie karbonylowej na wiązanie $\text{C}-\text{N}$. Brak możliwości swobodnego obrotu wokół tego wiązania wpływa na dostępność konfiguracji struktur wyższego rzędu dla zwijających się białek [28]. Reszty aminokwasowe związane wiązaniami peptydowymi tworzą łańcuch główny białka. Ich sekwencja tworzy I rzędową strukturę białka.

W czasie zwijania białka jego krótkie fragmenty przyjmują uporządkowaną strukturę przestrzenną, nazywaną strukturą drugorzędową. Podstawowymi jej elementami są α -helisy i β -kartki oraz łączące je pętle i β -skrety. Konformacja przestrzenna α -helisy i β -kartek jest głównie wynikiem obecności wiązań wodorowych



między grupami aminowymi wiązań peptydowych i grupami karboksylowymi reszt aminokwasów.

Sposób wzajemnego ułożenia elementów struktur drugorzędowych określa strukturę trzeciorzędową białek. Elementy struktury trzeciorzędowej białek tworzą domeny, zdolne do pełnienia funkcji chemicznych i fizycznych.

Struktura czwartorzędowa określa sposób ułożenia oraz liczbę i typy jednostek polipeptydowych budujących białko oligomeryczne. Struktury trzecio- i czwartorzędowe są stabilizowane oddziaływaniami hydrofobowymi, wiązaniami wodorowymi, mostkami solnymi oraz wiązaniami disiarczkowymi. Ze względu na złożoną budowę cząsteczek białek, nie jest jasne w jakim stopniu poszczególne rodzaje oddziaływań wpływają na osiągnięcie form natywnych przez białka.

Zwinięte białka globularne składają się z rdzenia, w którym znajdują się w większości reszty hydrofobowe, a na powierzchni w przeważającej większości grupy hydrofilowe. Trzeba jednak pamiętać o tym, że część grup polarnych i naładowanych też znajduje się we wnętrzu białka, tak samo jak i niektóre grupy hydrofobowe znajdują się na powierzchni białek [31]. Nie można więc stwierdzić jednoznacznie, że wnętrze białek jest czysto hydrofobowe, a jego powierzchnia całkowicie hydrofilowa.

Większość białek globularnych ulega spontanicznemu zwijaniu do formy natywnej w odpowiednich warunkach [32]. Molekularny mechanizm zwijania białek jest wciąż badany. Jako elementy odpowiedzialne za ten proces są wskazywane wiązania wodorowe. Wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe mogą być destabilizujące, stabilizujące, częściowo stabilizujące lub częściowo destabilizujące. Ważną rolę w utrzymaniu i zachowaniu prawidłowej struktury białek mają oddziaływania hydrofobowe [1,33–36]. Jednak ich istota nie jest wciąż w pełni zrozumiana. Według hipotezy Kauzmann'a [37], w środowisku wodnym wokół hydrofobowych fragmentów białek tworzą się uporządkowane struktury lodopodobne lub klatratopodobne złożone z cząsteczek wody. Źródłem przyciągania fragmentów hydrofobowych, prowadzącym do ich zbliżenia w środowisku wodnym (asocjacja hydrofobowa) jest korzystny efekt entropowy związany z uwolnieniem do wody objętościowej uporządkowanych cząsteczek wody zlokalizowanych przy powierzchni białek. Jednak nie ma zgody co do poglądu, czy zorganizowane struktury wody rzeczywiście powstają [38]. Jednym z problemów w tym zakresie jest brak



uniwersalnych kryteriów pozwalających określić strukturę wody. Autorzy przyjmują różne kryteria, za pomocą których definiują strukturę wody [39].

Wszystkie niezbędne do życia procesy biologiczne wymagają obecności wody. Tylko w jej obecności zachodzi proces związania białek do ich aktywnych form natywnych [40–42]. Cząsteczki wody stanowią integralną część białek i nawet w warunkach bezwodnych trwale „związane” cząsteczki wody stanowią około 10% masy białka [1]. Jednak taka ilość wody nie jest wystarczająca do pokrycia powierzchni białka warstwą hydratacyjną. Do osiągnięcia aktywności biologicznej 1 g białka wymagane jest co najmniej 0,4 g wody [42].

Białka w stanie natywnym znajdują się w stanie delikatnej równowagi ze stanem zdenaturowanym. Równowaga między stanem natywnym a zdenaturowanym białek może być zaburzona przez zmianę temperatury, ciśnienia lub przez obecność substancji rozpuszczonych [43–45]. Różnica entalpii swobodnej między tymi formami wynosi ok. 5 – 20 kcal·mol⁻¹ w zależności od rodzaju białka [46,47]. Stabilność i struktura aktywnych białek zależy od równowagi oddziaływań między jego fragmentami oraz od oddziaływań białka z wodą hydratacyjną [37,41,48,49]. Właściwości termodynamiczne wody solwatacyjnej są z kolei wypadkową równowagi oddziaływań woda-woda, woda-substancja rozpuszczona oraz zmian entropii wywołanej formowaniem i deformacją uporządkowanej sieci wiązań wodorowych. Obecność białek, które charakteryzują się dużą powierzchnią, wymusza modyfikacje lokalnej sieci wiązań wodorowych wody. Części hydrofilowe białek mogą tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, natomiast wokół hydrofobowych fragmentów może tworzyć się uporządkowana sieć wiązań wodorowych.

Z wykorzystaniem symulacji metodą dynamiki molekularnej Makarov i współautorzy [50] zbadali hydratację białek. Wyznaczyli oni na powierzchni mioglobiny miejsca aktywne do tworzenia wiązań wodorowych. Czas przebywania cząsteczek wody przy powierzchni białka, w miejscach w których potencjalnie mogą tworzyć się wiązania wodorowe był podobny do tego w miejscach nieaktywnych. Natomiast w szczelinach i wklęsłościach powierzchni białka czasy te były o wiele dłuższe [50]. Autorzy ci ustalili, że w przypadku mioglobuliny przy powierzchni czasy przebywania cząsteczek wody są krótsze niż 10 ps, natomiast we wklęsłościach sięgają 450 ps [50]. Podobny efekt dotyczył czasu reorientacji cząsteczek wody [51].



Cząsteczki wody we wklęsłościach tworzą mniej wiązań wodorowych między sobą w porównaniu do wody objętościowej. Ponadto, cząsteczki wody wokół grup hydrofilowych są bardziej ruchliwe względem tych będących w pobliżu grup hydrofobowych. Despa i współautorzy [52] wskazywali na istnienie lokalnej ustrukturyzowanej wody zlokalizowanej wokół części hydrofobowych białek. Dynamika takiej wody jest spowolniona, co powoduje także spowolnienie reorientacji dipoli wody i zmniejszenie podatności elektrycznej w ich otoczeniu. W efekcie zmniejsza się w tym obszarze przenikalność elektryczna. Powoduje to zwiększenie sił oddziaływań kulombowskich między grupami polarnymi, znajdującymi się między grupami hydrofobowymi. Pozwala to na stwierdzenie, że grupy hydrofobowe pośredniczą w oddziaływaniu między grupami hydrofilowymi znajdującymi się w pobliżu reszt aminokwasowych oraz w oddziaływaniu wewnątrzcząsteczkowych w miejscach kontaktu reszt aminokwasów.

Występowanie hydratacji hydrofobowej jest ogólnie niezbędnym warunkiem asocjacji hydrofobowej i w jej szczególnym przypadku osiągnięcia natywnych form białek w roztworach wodnych [53,54]. Substancje czysto hydrofobowe ulegają oczywiście tego typowi hydratacji [55], jednak wysoki koszt entropowy sprawia, że są one bardzo słabo rozpuszczalne. Obecność grup hydrofilowych w budowie cząsteczek charakteryzujących się mieszaną budową hydrofilowo-hydrofobową może zapewnić relatywnie dobrą rozpuszczalność w wodzie i jednocześnie nie wyklucza obecności fragmentów odpowiadających za hydratację hydrofobową. Badania z użyciem symulacji metodą dynamiki molekularnej wskazują na kooperację grup polarnych i niepolarnych w tworzeniu rozległej sieci silnych wiązań wodorowych strukturalnie lodopodobnej wody [56].

3.2. Hydratacja molekuł hydrofobowych i amfifilowych

Klasyczny model hydratacji molekuł hydrofobowych (*iceberg formation model*) został opisany przez Franka i Evansa [57]. Według tego modelu obecność niepolarnych cząsteczek w roztworze powoduje modyfikacje sieci wiązań wodorowych otaczającej wody. Cząsteczki wody tworzą wtedy zorganizowaną (*lodopodobną*) strukturę wokół hydrofobowej molekuly. Jej tworzenie odbywa się kosztem entropii, wynikającej z ograniczenia translacji i rotacji cząsteczek wody tworzących klatkę. Słuszność tego modelu hydratacji jest jednak przedmiotem dyskusji. Według Blokzija

i Engbertsa [58] wokół molekuł hydrofobowych nie tworzy się sieć wzmocnionych wiązań wodorowych cząsteczek wody. W ich obecności sieć cząsteczek wody utrzymuje swoją strukturę. Część autorów kwestionuje słuszność hipotezy Franka i Evansa na podstawie wyników otrzymanych za pomocą symulacji metodą dynamiki molekularnej [39,58,59] oraz metod eksperymentalnych – EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) [60] oraz rozpraszania neutronów [61,62].

Wyniki ostatnich badań wspierają jednak hipotezę Franka i Evansa. Grdadolnik i współautorzy [55] wykorzystali pasmo drgań OD wody półciężkiej HDO do scharakteryzowania wpływu hydrofobowych substancji, takich jak metan, etan, krypton i ksenon, na otaczającą wodą (eksperyment przeprowadzony przy podwyższonym ciśnieniu). Obserwowane przesunięcie położenia pasma OD w stronę niższych częstotliwości było porównywalne do tego, które występuje w lodzie I_h . Świadczy to o powstaniu lodopodobnej struktury wody w sferach hydratacyjnych tych molekuł o energiach wiązań wodorowych podobnych do tych obserwowanych w lodzie. Obserwacje te zostały potwierdzone przez innych autorów w badaniach nad hydratacją metanu i ksenonu z użyciem spektroskopii Ramana połączonej z analizą MCR (metodą wielowymiarowej dekonwolucji krzywych) [63]. Wyniki wcześniejszych eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem spektroskopii generowania częstotliwości sumarycznych (*sum frequency generation spectroscopy*, SFG) [64] wskazywały na osłabienie wiązań wodorowych przy powierzchniach międzyfazowych w obecności cząsteczek hydrofobowych (CCl_4/H_2O and heksan/ H_2O), jednak nowsze badania [65] wskazują na większe uporządkowanie i większą energię wiązań wodorowych D_2O w obecności heksanu, heptanu i polidimetylosiloksanu.

Baldwin i Rose [66] wyznaczyli entalpię swobodną przeniesienia alkanów z wody do różnych rozpuszczalników organicznych, bazując na pomiarach ich rozpuszczalności. Wyznaczenie entalpii swobodnych pozwoliło im, wykorzystując zmodyfikowaną metodę Nozaki-Tanforda [67], na wyznaczenie hydrofobowości tych alkanów. Wyniki te powiązali z energetyką hydratacji alkanów. Badania te potwierdziły hipotezę Jorgensena i współautorów [68] o powstawaniu zorganizowanej sfery hydratacyjnej wokół hydrofobowych fragmentów alkanów. Jest ona efektem oddziaływań van der Waalsa fragmentów hydrofobowych z atomem tlenu cząsteczek wody. W czasie tego typu hydratacji następuje zmniejszenie entropii hydratacji, wynikającej z większego stopnia uporządkowania cząsteczek wody wokół fragmentów



hydrofobowych. Powstawanie takich zorganizowanych sfer wspiera hipotezę Kauzmanna o entropowym źródle oddziaływań hydrofobowych (rozdział 3.1).

Na podstawie spektroskopii Ramana połączonej z analizą MCR zaobserwowano występowanie temperatury przejścia, w której bardziej zorganizowana struktura wody o wzmocnionej sieci wiązań wodorowych wokół cząsteczek substancji rozpuszczonych jest zastępowana strukturą mniej zorganizowaną. Takie zachowanie przejawiają sfery hydratacyjne metanu, alkoholi, CO₂ i CO [69–71].

Badania nad hydratacją metanu i metanolu z użyciem spektroskopii Ramana połączonej z analizą MCR dają niejasny obraz dotyczący wpływu obecności grupy hydroksylowej na sferę hydratacyjną grupy hydrofobowej [63]. Wykazano, że tetraedryczność cząsteczek wody wokół metanu jest znacznie większa w porównaniu do metanolu, co wskazywałoby na burzący wpływ grupy OH metanolu. Oszacowania dotyczące temperatury przejścia struktur bardziej zorganizowanych, o wzmocnionej sieci wiązań wodorowych, w struktury mniej zorganizowane wykazały jednak, że wyższą temperaturą cechuje się roztwór metanolu w wodzie w stosunku do metanu. Takie zjawisko wskazuje jednak na działanie stabilizujące grupy hydroksylowej. Z tego opisu wynika, że w obecności grupy polarnej powstaje mniej zorganizowana struktura w stosunku do analogicznego odpowiednika będącego cząsteczką w „pełni” hydrofobową. Jednak nadal te struktury są bardziej zorganizowane w stosunku do tych obserwowanych w wodzie czystej. Obecność grupy polarnej dodatkowo stabilizuje taką strukturę w stosunku do zmian temperatury. Zbadano też hydratację dłuższych cząsteczek kwasów organicznych i alkoholi oraz wpływ zmiany temperatury na stopień uporządkowania cząsteczek wody i energię wiązań wodorowych wokół fragmentów niepolarnych [72]. Zauważono, że widma wody hydratacyjnej części hydrofobowej kwasu *n*-pentanowego oraz butanolu są bardzo podobne pod względem konturu. Zawierają one wąską składową położoną przy 3660 cm⁻¹, której odpowiadają niewiążące grupy OH (*dangling groups*) oraz dwie szersze składowe (3450 i 3200 cm⁻¹). Wpływ grupy polarnej na hydratację wokół sąsiadujących grup hydrofobowych jest krótkiego zasięgu i jest on największy w przypadku najbliższej zlokalizowanej grupy [72]. W naszej grupie badawczej również zaobserwowaliśmy współdziałanie grup polarnej i hydrofobowej w tworzeniu sieci wzmocnionych wiązań wodorowych wody [23,24]



3.3. Wpływ osmolitów na białka

Osmolity są małymi cząsteczkami organicznymi wykorzystywanymi przez organizmy żywe do utrzymania w komórkach równowagi wodno-elektrolitycznej [73]. Wykazują one zdolność do regulacji ciśnienia osmotycznego i stąd wzięły swoją nazwę. Pozwalają na przeciwstawienie się organizmom żywym niekorzystnym warunkom środowiska, takim jak: wysokie lub niskie pH, duże zasolenie, wysoka lub niska temperatura [73–75]. Do osmolitów zaliczane są poliole (glicerol, sacharoza), aminokwasy i ich pochodne (tauryna, β -alanina), metyloaminy (betaina, *N*-tlenek trimetyloaminy), oraz mocznik i jego alkilowe pochodne [73]. Ze względu na właściwości osmolitów w stosunku do białek mogą być one podzielone na osmolity stabilizujące i destabilizujące strukturę białek. [73,75]. Osmolity stabilizujące przeciwdziałają denaturacji białek w warunkach stresu środowiskowego wywołanego między innymi: wysoką temperaturą, dużym zasoleniem [75]. Wykazują zdolność do cofania nieprawidłowo zwiniętych białek do form prawidłowych oraz zapobiegają agregacji białek [76]. Osmolity te nie zakłócają aktywności enzymatycznej białek oraz integralności błon komórkowych. Ze względu na wpływ na funkcjonowanie białek, wśród osmolitów stabilizujących mogą być wyróżnione osmolity kompatybilne [73,77] (poliole, aminokwasy i ich pochodne) i przeciwdziałające [78,79] (metyloaminy). Kompatybilne osmolity nie wykazują większego wpływu na funkcjonowanie białek, utrzymują jednak stabilność białek w sytuacji stresu środowiskowego. Natomiast osmolity przeciwdziałające, dodatkowo, nasilają fałdowanie białek i zapobiegają ich denaturacji przez mocznik. Do osmolitów stabilizujących przeciwdziałających zalicza się betaina (*N,N,N*-trimetyloglicyna, TMG), która jest wykorzystywana przez organizmy żywe do utrzymania turgoru komórkowego oraz funkcji enzymatycznej białek w warunkach dużego zasolenia [80,81]. Wykazano jej działanie jako krioprotektanta komórek prokariotów [82]. Betaina przeciwdziała denaturacji białek spowodowanej obecnością osmolitów destabilizujących [78]. Osmolity destabilizujące przesuwają natomiast równowagę reakcji fałdowania białek w stronę formy zdenaturowanej [83,84]. Do tej grupy są zaliczane: chlorowodorek guanidyny oraz mocznik i jego pochodne. Jednak niektóre gatunki ssaków akumulują mocznik w swoich nerkach i wykorzystują jako osmoprotektant [80,85]. Wykryto go również w organizmach niektórych ryb, w których istnieje w obecności osmolitów stabilizujących mających zdolność do hamowania jego właściwości denaturujących.



Pomimo wieloletnich badań mechanizm oddziaływania osmolitów na stabilność białek nie został do tej pory jednoznacznie wyjaśniony. Osmolity stabilizujące są z reguły wykluczane z powierzchni białek [86], dlatego nie oddziałują bezpośrednio z ich powierzchnią. Często są zlokalizowane w ich pierwszych lub drugich sferach hydratacyjnych. Jedną z teorii zakłada, że wykluczanie jest głównie efektem silnej higroskopijności osmolitów stabilizujących [87,88]. Natomiast niektórzy autorzy wskazują na zwiększenie napięcia powierzchniowego roztworu po dodaniu osmolitów stabilizujących do roztworu białek [86].

Asakura i Oosawa [89,90] zaproponowali jeden z pierwszych mechanizmów stabilizacji makromolekuł przez cząsteczki substancji rozpuszczonej, tzw. model „twardej sfery”. Tłumaczyli za jego pomocą wpływ substancji rozpuszczonej na koagulację koloidów. Według tych autorów małe cząsteczki substancji rozpuszczonej są wykluczane z powierzchni cząsteczek koloidów lub makrocząsteczek z powodu ograniczeń sterycznych, które są niezależne od temperatury. Efektem tego jest powstanie wolnej objętości wokół makromolekuł lub koloidów. Większa objętość wykluczenia ma miejsce w przypadku roztworu formy rozwiniętej makromolekuł. Sytuacja ta jest niekorzystna entropowo w porównaniu do roztworu niezawierającego rozwiniętych makromolekuł. Dążenie do zmniejszenia niekorzystnego efektu entropowego prowadzi do zminimalizowania objętości wykluczonej dla substancji rozpuszczonej w roztworze, co przesunęło równowagę reakcji denaturacji białka w kierunku formy zwiniętej lub asocjacji cząsteczek koloidów. W tym modelu siłą napędową zwijania makromolekuł lub asocjacji koloidów jest niekorzystny efekt entropowy związany z większą objętością wykluczoną dla rozwiniętej/rozproszanej formy białka/koloidu w porównaniu do jego formy zwiniętej/zasocjowanej. Ustalono także, że w stosunku do niektórych cząsteczek wykluczenie jest wypadkowym efektem dwóch przeciwstawnych zjawisk: wykluczenia w wyniku ograniczeń sterycznych i oddziaływań przyciągających [91–98]. Zmiana entalpii swobodnej w wyniku dodania substancji rozpuszczonej została przez autorów powiązana z komponentem entalpowym odpowiadającym za przyciąganie cząsteczki substancji rozpuszczonej. Komponent ten jest nazywany w literaturze jako *sticky* lub *soft*. Najprawdopodobniej jest on skutkiem złożonych interakcji makromolekuł, cząsteczek substancji rozpuszczonych i wody. Wykluczenie cząsteczek substancji rozpuszczonych jest wynikiem dominującego wpływu efektu entropowego nad efektem entalpowym związanym z oddziaływaniami

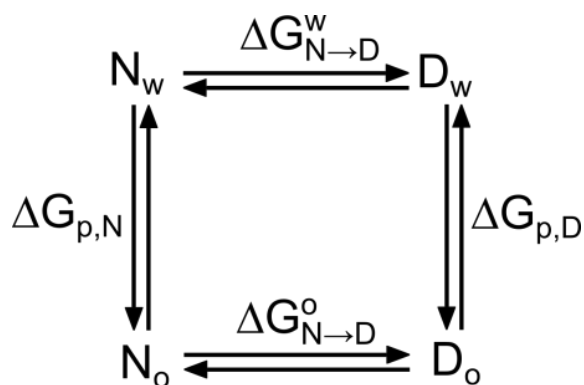


przyciągającymi makromolekuła-substancja rozpuszczona. Późniejsze rozwinięcie teorii Asakury i Oosawy [54] bierze pod uwagę oddziaływania przyciągające i odpychające makromolekuły i cząsteczek substancji rozpuszczonych.

Część autorów wskazuje, że osmolity stabilizujące są wykluczane z otoczenia białek w wyniku występowania niekorzystnych oddziaływań osmolitów stabilizujących z łańcuchem głównym białek [4,12,99–106]. Zjawisko to zostało nazwane efektem osmofobowym [100]. Z kolei bezpośrednio, korzystne, oddziaływania osmolitów denaturujących z białkami powodują ich destabilizację [107]. Stwierdzono także, że interakcje łańcucha głównego białek są korzystniejsze z polarnymi fragmentami cząsteczek osmolitów w porównaniu do fragmentów niepolarnych [101]. Na podstawie badań z wykorzystaniem symulacji metodą dynamiki molekularnej zostało stwierdzone wykluczanie TMAO w przypadku powierzchni oligoglicyny jako modelu łańcucha głównego białka [108]. Podobne wyniki otrzymano w przypadku badania oddziaływania tego samego osmolitu z białkiem synukleina [109] oraz polimerem poli(*N*-izopropylakryloamidem) (PNIPAM), również za pomocą symulacji metodą dynamiki molekularnej [110]. Stwierdzono też, że betaina jest wykluczana z powierzchni białka domeny wiążącej HTH DNA [107]. W badaniach z wykorzystaniem zmodyfikowanego hydrofobowo polisacharydu zauważono wykluczanie osmolitów stabilizujących – gliceryny, TMAO, proliny, betaina, sorbitolu z jego powierzchni [111]. Wskazuje to na stabilizujący wkład grup hydrofobowych reszt aminokwasowych białka w obecności osmolitu stabilizującego. Jako przyczynę wykluczania osmolitów autorzy wskazali zmiany w strukturze wody wokół dwóch powierzchni – hydrofobowej modelu i osmolitu, która uniemożliwia jednoczesną optymalną hydratację dwóch powierzchni w bliskiej odległości. Z drugiej strony przy zastosowaniu spektroskopii NMR zostały zaobserwowane silne oddziaływania modelowej cząsteczki cykloalanyloglicyny ze stabilizującym osmolitem TMAO [112]. W naszym Zespole zaobserwowano, z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni, że tauryna oddziałuje bezpośrednio z powierzchnią lizozymu [113]. Przeczy to twierdzeniu, że wszystkie osmolity stabilizujące są wykluczane z powierzchni białek. Badania z wykorzystaniem spektroskopii FTIR oraz symulacji metodą dynamiki molekularnej dostarczyły dowodów na obecność bezpośrednich oddziaływań osmolitu stabilizującego L-proliny z lizozymem [113]. Dominującą rolę w tych interakcjach pełni grupa karboksylowa tego osmolitu.



„Model przeniesienia Tanforda” [114] służy do analizy różnic entalpii swobodnych stanu zwiniętego i rozwiniętego białka w stanie równowagi w roztworze wodnym i roztworze zawierającym osmolit. Pozwolił on na określenie stopnia stabilizacji lub destabilizacji białka przez osmolit. Zespół Bolena [3] wykorzystał ten model do scharakteryzowania oddziaływań osmolitów z białkami. W swoich badaniach autorzy opierali się na założeniu, że osmolity stabilizujące oddziałują niekorzystnie z powierzchnią białek, natomiast osmolity destabilizujące oddziałują korzystnie. Entalpia swobodna przeniesienia, ΔG_p , białka z roztworu wody do roztworu osmolitu jest używana do scharakteryzowania interakcji białko-rozpuszczalnik. Dodatnie wartości ΔG_p oznaczają, że białko jest solwofobowe podczas przeniesienia z wody do roztworu osmolitu, natomiast ujemne wartości tego parametru oznaczają, że jest solwofilowe. „Model przeniesienia” może być przedstawiony za pomocą cyklu termodynamicznego (Rys. 1). Z jego pomocą można porównać różnicę entalpii swobodnej reakcji rozwijania białek w roztworach wodnych, $\Delta G_{N \rightarrow D}^W$, i roztworach zawierających osmolity, $\Delta G_{N \rightarrow D}^O$. Na podstawie cyklu termodynamicznego wynika równanie $\Delta G_{N \rightarrow D}^O - \Delta G_{N \rightarrow D}^W = \Delta G_{p,D} - \Delta G_{p,N}$. Parametry $\Delta G_{p,N}$ i $\Delta G_{p,D}$ odpowiadają entalpii swobodnej przeniesienia białka w formie natywnej i białka w formie zdenaturowanej (rozwiętej) z roztworu wodnego do roztworu zawierającego osmolit. Dodatnia wartość entalpii swobodnej przeniesienia białka z roztworu wodnego do zawierającego osmolit świadczą o stabilizacji białka przez osmolit, natomiast ujemna wartość o jego destabilizacji. Wartości $\Delta G_{p,N}$ i $\Delta G_{p,D}$ zostały wyznaczone dla aminokwasów, ich reszt kwasowych oraz fragmentów łańcucha głównego [99,115,116]. Różnice $\Delta G_{N \rightarrow D}^O - \Delta G_{N \rightarrow D}^W$ i zarazem $\Delta G_{p,D} - \Delta G_{p,N}$ odpowiadają wartości tak zwanemu parametrowi m , który jest miarą efektywności osmolitu w stabilizacji lub destabilizacji danego białka. Ujemne wartości tego parametru oznaczają, że dany osmolit jest destabilizatorem białka, natomiast jego dodatnia wartość wskazuje na właściwości stabilizujące osmolitów.



Rys. 1. Cykl termodynamiczny wynikający z Modelu Przeniesienia Tanforda [114]. N oznacza białko w stanie natywnym a D białko rozwinięte (zdenaturowane).

Założenie addytywności entalpii swobodnej przeniesienia grup (*group transfer free energy, GTFE*) reszt aminokwasowych i łańcucha głównego pozwala na oszacowanie $\Delta G_{p,N}$ i $\Delta G_{p,D}$. Auton i Bolen [116] podzielili udziały w entalpii swobodnej przeniesienia białka na reszty aminokwasowe i łańcuch główny białek. Pozwoliło im to na stwierdzenie, że wkład entalpii swobodnej przeniesienia łańcucha głównego białka ankiryiny kontroluje kierunek przesunięcia równowagi reakcji zwijania-rozwijania tego białka zarówno w przypadku osmolitu stabilizującego – N -tlenku trimetyloaminy (TMAO) oraz osmolitu destabilizującego – mocznika. Ciekawą obserwacją było to, że suma wkładu entalpii swobodnej przeniesienia reszt aminokwasowych była przeciwna do kierunku przesuwania równowagi reakcji zwijania/rozwijania białka w stosunku do wkładu entalpii swobodnej łańcucha głównego białka w obecności osmolitu stabilizującego lub osmolitu destabilizującego. Podsumowując, wkład entalpii swobodnej przeniesienia reszt aminokwasowych promował denaturację białka w obecności TMAO, z kolei mocznik jej zapobiegał. Decydujący wpływ miał jednak udział entalpii swobodnej przeniesienia łańcucha głównego białka na reakcję zwijania \leftrightarrow rozwijania białka i to on decydował o jej kierunku.

Według teorii pośredniego wpływu osmolitów na białko, stabilizacja lub destabilizacja białek następuje poprzez zmianę właściwości struktury wody, rozumianą jako zmianę długości wiązań wodorowych wody oraz zmianę stopnia uporządkowania cząsteczek wody [9–15]. Niektóre badania wskazują na współdziałanie mechanizmu bezpośredniego z mechanizmem pośrednim w procesie stabilizacji białek [10,16]. Z badań z wykorzystaniem spektroskopii FTIR i skaningowej kalorymetrii różnicowej przeprowadzonych w naszym Zespole wynikało, że wszystkie osmolity, zarówno

stabilizujące i destabilizujące, wzmacniają wodę w swojej sferze hydratacyjnej w porównaniu do wody czystej [17]. Pierwsze kryterium rozróżniające osmolity pod względem ich właściwości w stosunku do białek i ich wpływu na wodę w swoich sferach hydratacyjnych wyłoniło się po analizie różnic funkcji rozkładu odległości tlen-tlen między cząsteczkami wody zaburzonej przez osmolity i funkcji rozkładu odległości tlen-tlen między cząsteczkami wody czystej. Stwierdzono, że osmolity stabilizujące charakteryzują się podobieństwem sfer hydratacyjnych ze sferą hydratacyjną białka. Natomiast woda w sferze hydratacyjnej osmolitów destabilizujących była strukturalnie różna od wody hydratacyjnej białko. Zarówno sfery hydratacyjne osmolitów stabilizujących, jak i białek wykazywały się zmniejszonym prawdopodobieństwem występowania populacji średnich odległości między cząsteczkami wody odpowiadających najbardziej prawdopodobnej odległości $O\cdots O$ w wodzie czystej. (2,83 Å). W sferach hydratacyjnych osmolitów destabilizujących występowało zaś większe prawdopodobieństwo występowania tego typu odległości w stosunku do wody czystej. Drugie kryterium wyłoniło się po analizie wartości szerokości połówkowych pasm wody czystej oraz wody zaburzonej przez osmolity. Opierając się na wyznaczonych parametrach widm, autorzy zauważyli, że widma wody zaburzonej przez osmolity stabilizujące mają większą szerokość połówkową pasma w porównaniu do widma wody czystej. Z kolei widma wody zaburzonej przez osmolity destabilizujące cechują się mniejszą szerokością konturu pasma od konturu pasma wody czystej. Kryterium szerokości połówkowej jest miarą strukturalnej i energetycznej dystrybucji stanów wody ma więc związek z entropowym stanem wody hydratacyjnej. Porównanie szerokości połówkowej pasma wody zaburzonej i wody czystej pozwala więc na przewidzenie kierunku wpływu substancji rozpuszczonej na stałą równowagi denaturacja białka.

3.4. Wpływ osmolitów na wodę w układzie z udziałem substancji modelowych

Złożona struktura polipeptydów i białek spowodowała, że w badaniach wykorzystywano proste układy modelowe. Jako cząsteczki modelowe stosowano: cząsteczki czysto hydrofobowe, takie jak neopentan [117,118], amidy takie jak NMA oraz mniejsze peptydy [15,103,119–123]. Wyniki dotyczące wpływu osmolitów stabilizujących i destabilizujących na wodę w układach zawierających cząsteczki



modelowe pochodzą głównie z badań teoretycznych [13,15,103,119,120,122–125]. Niewiele jest prac eksperymentalnych w tym temacie [126–128].

Cechą charakterystyczną budowy peptydów i białek jest bliskość położenia grup hydrofilowych i hydrofobowych. Interesująca w tym kontekście jest hydratacja cząsteczek czysto hydrofobowych w obecności osmolitów. Wykonano symulacje oddziaływań między wszystkimi cząsteczkami wody w roztworze substancji czysto hydrofobowej – neopentanu, w obecności osmolitu stabilizującego (betainy) lub osmolitu destabilizującego (mocznika) [117]. Wykazano skrócenie długości wiązań wodorowych między cząsteczkami wody w układzie neopentan-betaina oraz neopentan-mocznik [117,118].

NMA jest najprostszą cząsteczką zawierającą wiązanie peptydowe dlatego też jest rozpatrywany jako minimalny model szkieletu peptydowego. Dodatkowo zawiera dwie grupy hydrofobowe (CH_3). Z wykorzystaniem symulacji metodą dynamiki molekularnej został zbadany wpływ osmolitów na strukturę wody w układzie z NMA [13,15,103,119,120,122–124]. Badania te dotyczyły ogólnego wpływu dodania osmolitu na oddziaływania między wszystkimi cząsteczkami wody w takich układach. W efekcie przedstawiono wyniki dotyczące uśrednionego efektu wywieranego przez osmolity na cząsteczki wody będącej pod wpływem jednej z substancji rozpuszczonej, cząsteczek wody będących pod jednoczesnym wpływem dwóch substancji rozpuszczonych oraz na wodę czystą. W badaniach nad wpływem osmolitów na strukturę wody w układach NMA + osmolit (TMAO, trehaloza) stwierdzono, że wraz ze zwiększaniem stężenia osmolitów stabilizujących następuje wzmacnianie wiązań wodorowych między cząsteczkami wody w roztworach NMA [13,120,124]. Wei i współautorzy [15] stwierdzili, że TMAO wzmacnia strukturę tetraedryczną wody w obecności NMA. Wykazali także, że mocznik ma mały wpływ na długość wiązań wodorowych między cząsteczkami wody oraz rozkład kątów między nimi w układzie z NMA. Interesującą obserwacją dokonaną przez tych autorów jest to, że dodatek mocznika do wody czystej w małym stopniu wpływa na długość wiązań wodorowych wody i rozkład kątów między cząsteczkami wody, natomiast TMAO zwiększa populację silnych wiązań wodorowych i wzmacnia tetraedryczną strukturę wody. Wykazano, że betaina i inne osmolity stabilizujące (TMAO i trehaloza) są wykluczane z otoczenia NMA. Zaobserwowano dehydratację NMA pod wpływem TMAO [122]. Stwierdzono też, że TMAO ma niewielki wpływ na lokalną gęstość wody wokół

cząsteczki NMA, poza sferą hydratacyjną grupy NH, gdzie występował zwiększenie lokalnej gęstości wody. W obecności TMAO zmniejszała się liczba hydratacyjna grup metylowych NMA [119]. W badaniach hydratacji układów NMA zauważono zwiększenie hydratacji grup hydrofobowych NMA pod wpływem trehalozy [123,124] oraz w obecności betainy [103]. Zbadano wpływ osmolitu destabilizującego mocznika na oddziaływania w sferze hydratacyjnej NMA [103,123] i stwierdzono, że powodował on zmniejszenie hydratacji NMA w porównaniu do układów zawierających jedynie wodę i NMA.

W badaniach wykorzystujących symulacje metodą dynamiki molekularnej [15,103,125] zbadano wpływ osmolitów na oddziaływania bezpośrednie cząsteczek wody i osmolitów z NMA. Na podstawie analizy funkcji rozkładu radialnego [103] stwierdzono, że wiązania wodorowe między wodą i NMA są silniejsze w układach zawierających betainę w porównaniu do tych zawierających tylko NMA i wodę. TMAO [15,125] i betaina [103] zwiększają siłę oddziaływania grupy karbonylowej NMA i wody. Dodatkowo [103] stwierdzono, że siła tych oddziaływań zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia betainy w układzie z NMA. W innych badaniach [103] zaobserwowano osłabianie przez mocznik (w roztworach o stężeniu mocznika wynoszącym 8 M) wiązań wodorowych między protonem aminowym NMA i wodą. Ustalono też, że po dodaniu mocznika zwiększa się prawdopodobieństwo oddziaływań $H_{NMA}-O_{woda}$ w układach zawierających NMA [125]. Ponadto zauważono, że większe prawdopodobieństwo występowania wiązań wodorowych występuje między tlenem grupy karbonylowej i wodą niż atomami wodoru grupy aminowej NMA i wodą.

Interpretacja wyników uzyskanych dla układów modelowych prostych dipeptydów oraz tripeptydów może być przydatna przy próbie opisanie bardziej złożonych układów, takich jak helisy, zakręty i białka. Wyniki badań dotyczące krótkich peptydów pochodziły z symulacji metodą dynamiki molekularnej [126,127,129–131]. Zbadano hydratację peptydu NATA (*N*-acetylotryptofanoamidu) w obecności osmolitów destabilizujących: mocznika i chlorowodoru guanidyny oraz osmolitu stabilizującego – proliny [129,130]. Zaobserwowano, że jony guanidynowe były wykluczane z powierzchni dipeptydu NATA. Ustalono, że chlorowodorek guanidyny nieznacznie zwiększał siłę wiązań wodorowych między cząsteczkami wody oraz powodował zmniejszenie liczby oddziaływań woda-woda [129]. Mocznik oddziaływał bezpośrednio z powierzchnią peptydu [130]. Stwierdzono, że nie zmieniał



on dynamiki wiązań wodorowych między cząsteczkami wody. Ponadto zaobserwowano zwiększanie przez mocznik siły wiązań wodorowych cząsteczki wody z peptydem [129]. Ustalono, że prolina zwiększała siłę wiązań wodorowych między cząsteczkami wody w roztworze zawierającym peptyd NATA oraz wiązań wodorowych cząsteczek wody z tym peptydem [129]. Przeprowadzono badania hydratacji amfifilowego peptydu NALMA (*N*-acetylo-leucyno-metylamidu) w obecności osmolitu stabilizującego – glicerolu oraz DMSO przy wysokim stężeniu, w którym wykazuje właściwości destabilizujące [126]. Wykazano zwiększenie liczby cząsteczek wody wokół grup hydrofobowych w obecności glicerolu, natomiast w obecności DMSO (w stężeniu denaturującym) obserwowane było zmniejszenie hydratacji [126]. W roztworze wodnym zawierającym NALMA były zachowane wiązania wodorowe między grupami karbonylowymi peptydu i cząsteczkami wody w obecności glicerolu jak i DMSO. Wyniki te potwierdzają badania dyfrakcji neutronowej [127]. Wyniki badań dotyczących hydratacji tripeptydu Gly-Ala-Phe w obecności glicerolu lub mocznika [131] wskazywały na silniejsze zorganizowanie struktury wody wokół peptydu w obecności glicerolu niż w roztworze wodnym zawierającym jedynie tripeptyd. Zauważono też, że glicerol był wykluczany z powierzchni peptydu. Najsilniejszy efekt wykluczania miał miejsce w otoczeniu reszty alaniny. Więcej oddziaływań między cząsteczkami wody i tripeptydem występowało w układzie tripeptyd – glicerol, w porównaniu do układu samego tripeptydu z wodą. Z kolei w obecności mocznika oddziaływania alaniny z cząsteczkami wody były zastępowane przez bezpośrednie oddziaływania reszty alaniny z cząsteczkami mocznika.

Złożoność układów zawierających białka prowadziły do rozważenia prostszych układów, które mogły służyć jako uproszczone modele do badania hydratacji w układach białek z osmolitami. Wykonano symulacje metodą dynamiki molekularnej w układzie zawierającym modelowy peptyd złożony z 15 aminokwasów w obecności mocznika lub TMAO [132]. Zaobserwowano zwiększenie gęstości wody wokół peptydu w otoczeniu TMAO, natomiast zmniejszanie w obecności mocznika. Na podstawie badań wykazano, że oba osmolity mogą oddziaływać z peptydem, przy czym liczba cząsteczek TMAO znajdujących się w pierwszej sferze hydratacyjnej peptydu jest mniejsza w porównaniu do cząsteczek mocznika. Mocznik wykazywał powinowactwo do atomów tlenu łańcucha głównego białka i dodatnio naładowanych



reszt aminokwasowych, natomiast TMAO oddziaływał z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasowymi i atomami wodoru łańcucha głównego.

Badania przedstawione przeze mnie powyżej w tym rozdziale zawierały charakterystykę ogólnego wpływu osmolitów na całą wodę w roztworze zawierającym także cząsteczkę centralną. Obraz ten może być mylący, ponieważ nie musi oznaczać zmiany właściwości wody w sferze hydratacyjnej cząsteczki centralnej w podobny uśredniony sposób. Dlatego też przewidywanie wpływu osmolitów na stabilność białek na podstawie ich zdolności do wzmacniania lub osłabiania struktury wody prowadzi do błędnych wniosków. Większość osmolitów stabilizujących wzmacnia strukturę. Jednak są wśród nich wyjątki takie jak tauryna [20], która w ogólnym efekcie osłabia strukturę wody. Zawiera ona w swojej budowie grupę sulfonową, która osłabia strukturę wody oraz grupę aminową wzmacniającą strukturę wody. Wpływ grupy sulfonowej jest decydujący na ogólną charakterystykę oddziaływań między cząsteczkami wody w roztworze. Sfera hydratacyjna białka charakteryzuje się wzmocnioną energią wiązań wodorowych wody. Dodatek tauryny zorientowanej grupą aminową do powierzchni białka powoduje dodatkowe wzmocnienie sfery hydratacyjnej białka. W następstwie takiej orientacji cząsteczki tauryny, obserwowany jest efekt kooperatywności wiązań wodorowych między cząsteczkami wody w sferze hydratacyjnej grupy aminowej tauryny oraz między cząsteczkami wody zlokalizowanymi blisko powierzchni białka. Często osmolity destabilizujące są rozpatrywane jako substancje mające osłabiający wpływ na wiązania wodorowe w wodzie. Jednak mocznik, który jest osmolitem destabilizującym białko ma niewielki wzmacniający wpływ na wodę [133]. Jego alkilowe pochodne natomiast, będące również osmolitami destabilizującym wzmacniają wyraźnie strukturę wody i jednocześnie są silniejszymi destabilizatorami niż mocznik [21]. Z opisu, który przedstawiłem wyżej wynika, że konieczne jest wyznaczenie wpływu osmolitów na oddziaływania między cząsteczkami wody wewnątrz sfery hydratacyjnej cząsteczki centralnej.

Jedyne znane mi prace eksperymentalne w których w wyizolowano udział cząsteczek wody znajdujących się pod jednoczesnym wpływem obu substancji pochodziły z badań naszego Zespołu [128,134,135]. Użyto w nich spektroskopię FTIR [128,134,135] oraz analizę chemometryczną [128,134] danych widmowych do wyizolowania jednoczesnego wpływu tych dwóch substancji na cząsteczki wody. Widma ekstrapolowano do bardzo dużego rozcieńczenia. Badania w układzie NMA-

Na_2HPO_4 przeprowadzono dla różnych ułamków molowych NMA (obliczanych względem Na_2HPO_4 , z pominięciem wody). Ustalono, że przy ułamkach molowych $x_{\text{NMA}} = 0,2, 0,80, 0,85, 0,90$ i $0,95$ występowały współdzielone cząsteczki wody między sferami hydratacyjnymi obu substancji rozpuszczonych. Energia wiązań wodorowych między cząsteczkami wody współdzielonej była większa zarówno w porównaniu do wody zaburzonej przez NMA, jak i również w porównaniu do wody zaburzonej przez Na_2HPO_4 . Dla ułamków molowych $x_{\text{NMA}} = 0,4, 0,50, 0,60$ występowały cząsteczki wody nadmiarowej łączące dwie sfery hydratacyjne NMA i Na_2HPO_4 . Wiązania wodorowe między cząsteczkami tej wody były słabsze niż między cząsteczkami wody w sferze hydratacyjnej NMA lub Na_2HPO_4 .

Członkowie naszego Zespołu zbadali eksperymentalnie hydratację w sferze hydratacyjnej peptydów: diglicyny i NAGMA (*N*-acetylo-glicyno-metyloamidu) w obecności TMAO lub mocznika z wykorzystaniem spektroskopii FTIR [136]. Na podstawie analizy chemometrycznej stwierdzono, że TMAO wzmacnia wiązania wodorowe w sferach hydratacyjnych obu peptydów, przy czym efekt ten jest silniejszy w stosunku do diglicyny. Obecność współdzielonych cząsteczek wody w układach diglicyna–TMAO oraz NAGMA–TMAO wskazywała na akumulację tego osmolitu w sferze hydratacyjnej peptydów. W przypadku układu diglicyna–mocznik kontakt sfer hydratacyjnych peptydu i osmolitu odbywał się poprzez dodatkowe („nadmiarowe”) cząsteczki wody, tzw. mostkujące cząsteczki wody, łączące sfery hydratacyjne obu substancji. Świadczyło to o wykluczeniu mocznika ze sfery hydratacyjnej tego peptydu. Ponadto, wiązania wodorowe między „nadmiarowymi” cząsteczkami były słabsze od tych w sferze hydratacyjnej diglicyny oraz były podobne pod względem strukturalnym i energetycznym do wody czystej. W przypadku peptydu NAGMA sfera hydratacyjna mocznika była włączana do sfery hydratacyjnej peptydu. W tej sytuacji mocznik oddziaływał bezpośrednio z peptydem. W efekcie, sfera hydratacyjna peptydu NAGMA zawierała dwie populacje cząsteczek wody: osłabioną i wzmocnioną względem wody zaburzonej jedynie przez peptyd NAGMA. Większy udział populacji cząsteczek wody o większej energii wiązań wodorowych powodował, że w ogólnym efekcie sfera hydratacyjna peptydu była nieznacznie wzmocniona.

Trzecia publikacja w tym zakresie powstała z moim udziałem [135]. Wyniki widmowe FTIR zostały w niej opracowane już nową metodą, opisaną w ramach tej pracy, umożliwiającą śledzenie zmian hydratacji cząsteczki modelowej w funkcji



stężenia osmolitu. Publikacja dotyczyła układów cząsteczek modelowych: NMA oraz DMSO w obecności osmolitu stabilizującego - betainy lub osmolitu destabilizującego - mocznika. Przeprowadzone badania są fragmentem mojej pracy doktorskiej i zostały przedstawione w dalszej części dysertacji.

3.5. Hydratacja peptydu *trpzip-1*

Trpzip-1 jest prostym peptydem wykorzystanym w moich badaniach. Ma on postać beta zakrętu o sekwencji SWTWEGNKWTWK (kod jednoliterowy sekwencji aminokwasów) i masie 1,609 kDa [137,138]. Wykazuje on właściwości zwiniętych białek oraz jest rozpuszczalny w wodzie [138]. Ma stabilną strukturę drugorzędową. Jego właściwości termodynamiczne (ΔG , ΔH i ΔC_p), dotyczące reakcji zwijania/rozwijania uśrednione i przeliczone na jedną resztę aminokwasową są porównywalne z odpowiednimi właściwościami przeliczonymi na jedną resztę aminokwasową w większych białkach. Z użyciem skaningowej kalorymetrii różnicowej zaobserwowano jego dwustopniowy proces denaturacji poprzedzony oligomeryzacją [25]. W temperaturze niższej niż 50°C peptyd występuje w swojej podstawowej strukturze. Wykazano z użyciem spektroskopii FTIR [25], że struktura wody zarówno wokół formy zwiniętej (w temperaturze 25°C) oraz wokół formy zdenaturowanej (w temperaturze 55-65°C) jest wzmocniona w stosunku do wody czystej o odpowiadającej temperaturze. Zaobserwowano efekt kooperatywności energetycznej między wiązaniami wodorowymi otaczającymi fragmenty hydrofilowe i hydrofobowe w formie zwiniętej. Stwierdzono także, że sfera hydratacyjna wokół rozwiniętego peptydu charakteryzuje się większą populacją wiązań wodorowych o średniej długości O...O (ok. 2,80 Å) w stosunku do sfery hydratacyjnej wokół peptydu zwiniętego w temperaturze 25°C [25]. W literaturze nie ma publikacji dotyczących wpływu osmolitów na stabilność peptydu *trpzip-1*.

3.6. Hydratacja lizozymu i wpływ osmolitów na jego stabilność

Lizozym jest białkiem globularnym wykorzystanym w moich badaniach, o masie około 14,3 kDa, składającym się ze 129 aminokwasów [28]. Należy on do grupy enzymów nazywanych glikozydazami [28]. Katalizuje on rozpad wiązania glikozydowego pomiędzy cząsteczkami kwasu *N*-acetylmuraminowego (NAM)



i *N*-acetyloglukozaminą (NAG) łańcuchów polisacharydowych ściany komórkowej niektórych bakterii oraz pomiędzy resztami NAG w chitynie [28].

Z wykorzystaniem spektroskopii dielektrycznej określono, że w monowarstwie na powierzchni lizozymu występuje 165 cząsteczek wody [139]. Podobną wartość uzyskano używając spektrometrii terahercowej (174 ± 40) [140] oraz spektroskopii Ramana (158 ± 8) [141]. Większą liczbę cząsteczek wody w sferze hydratacyjnej lizozymu, wynoszącą 259, wyznaczono stosując rozpraszanie neutronów [142] i promieni rentgena [143]. W stanie częściowej denaturacji lizozymu, w tzw. stanie stopionym (stan *molten globule*), w którym α -helisy są nierozwinięte (73°C) wykryto 212 ± 11 cząsteczek wody [141].

Na podstawie badań teoretycznych [143–145] i eksperymentalnych [142,146] ustalono, że warstwa hydratacyjna lizozymu ma większą gęstość w stosunku do wody czystej zarówno w przypadku formy zwiniętej [144] jak i zdenaturowanej [145].

Wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej umożliwiło zaobserwowanie zmniejszenia udziału tetraedrycznie zorganizowanych cząsteczek wody w układzie lizozym-woda w porównaniu do wody objętościowej [141]. Zjawisko to występuje w większym stopniu w temperaturze 90°C , w obecności zdenaturowanego lizozymu, w porównaniu do temperatury 25°C , w której lizozym występuje w stanie podstawowym.

Na podstawie badań kalorymetrycznych, NMR oraz FTIR hydratacji lizozymu [147] stwierdzono, że w temperaturze około 47°C cząsteczki wody hydratacyjnej lizozymu tracą możliwość tworzenia stabilnych wiązań wodorowych, a ich czas życia zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury. Obserwowane jest wtedy załamanie występowania tetraedrycznej struktury sieci wiązań wodorowych wody. Temperatura ta jest górną granicą istnienia lizozymu w formie zwiniętej. W temperaturze odpowiadającej denaturacji białka (ok. 77°C) następuje zerwanie wiązań wodorowych między fragmentami białka, cząsteczki wody hydratacyjnej stają się wolne, a ich współczynnik samodyfuzji odpowiada wodzie czystej.

Wyniki badań nad denaturacją temperaturową lizozymu pokazują, że w pewnym zakresie temperatur możliwe jest odzyskanie prawidłowej struktury przestrzennej przez częściowo rozwinięte białko. Proces denaturacji temperaturowej



przebiega w dwóch etapach, w czasie których lizozym znajduje się w trzech stanach: podstawowym, przejściowym i zdenaturowanym [147–151]. W stanie przejściowym (40-60°C) cząsteczki białka ulegają szybkim przemianom i występują w wielu strukturach konformacyjnych w wyniku konkurencji oddziaływań hydrofilowych i hydrofobowych. Na tym etapie możliwy jest powrót lizozymu do formy podstawowej. Jednak ze względu na niestabilność lizozymu w takich strukturach, proces zwijania może ulec zaburzeniu prowadząc do osiągnięcia złej struktury trójwymiarowej [147]. Przekroczenie temperatury denaturacji powoduje nieodwracalne zniszczenie struktury lizozymu objawiające się utratą rozpuszczalności i agregacją [147]. W strukturze lizozymu obserwowany jest wówczas gwałtowny wzrost udziału antyrównoległych β -kardek i spadek udziału α -helis [147]. Białko traci wtedy swoją aktywność biologiczną. Według Meersmana i współautorów [152] w temperaturze między 20-60°C struktura drugo- i trzeciorzędowa lizozymu jest relatywnie stabilna. Nie są obserwowane struktury przejściowe podczas rozwijania lizozymu w tym zakresie temperatur. Powyżej 70°C następuje częściowe, odwracalne rozwijanie białka. Natomiast po przekroczeniu temperaturze 80°C lizozym zostaje trwale zdenaturowany.

Osmolity stabilizujące podwyższają temperaturę denaturacji lizozymu [153–155] i generalnie wraz ze wzrostem ich stężenia zwiększa się odporność temperaturowa lizozymu [76,154,155]. Według Arakawy i współautorów [153] najskuteczniejszym osmolitem stabilizującym w stosunku do lizozymu jest tauryna, następnie glicyna i seryna. Na podstawie badań z wykorzystaniem skaningowej kalorymetrii różnicowej [19] stabilizujący wpływ osmolitów przebiega w następującym porządku: TMAO < TMG < GLY < DMG < NMG. Ponadto, zauważono, że intensywność efektu stabilizującego tych osmolitów jest skorelowana z najbardziej prawdopodobną odległością między cząsteczkami wody, R_{OO^o} , w ich sferach hydratacyjnych [19]. TMAO cechował się największą wartością R_{OO^o} między cząsteczkami wody w swojej sferze hydratacyjnej, natomiast NMG najmniejszą wartością w tym szeregu [19]. Santoro i współautorzy [76] wskazują, że w przypadku obecności betainy (pH \approx 6, 55 mM NaCl, bufor cytrynianowy) efekt stabilizacji lizozymu osiąga maksimum przy stężeniu betainy równym 4 M, po czym zmniejsza się. Z kolei wpływ glicyny na stabilność lizozymu w zakresie niskich stężeń osmolitu jest mały: do stężenia glicyny wynoszącego 0,01 M, białko jest przez nią nieznacznie destabilizowane, od 0,01 M do 0,1 M w niewielkim stopniu stabilizowane. Silniejszy efekt stabilizacji lizozymu jest



widoczny przy stężeniach glicyny $> 0,1 \text{ M}$ ($\text{pH} = 7$) [156]. Na podstawie badań spektroskopowych FTIR [113], członkowie naszego Zespołu badawczego sprawdzili czy osmolity stabilizujące – TMAO i prolina – były wykluczane ze sfery hydratacyjnej lizozymu. Okazało się, że zgodnie z przewidywaniami, TMAO był wykluczany ze sfery hydratacyjnej lizozymu, podczas gdy prolina oddziaływała bezpośrednio z cząsteczką tego białka. Zaprzecza to powszechnemu przekonaniu [4,12,99–106], o tym że osmolity stabilizujące są zawsze wykluczane ze sfery hydratacyjnej białka. Wynika z tego, że kryterium wykluczania lub bezpośredniego oddziaływania osmolitu z powierzchnią białka nie powinno być używane do przewidywania właściwości stabilizacyjnych lub destabilizacyjnych osmolitu. W innej pracy eksperymentalnej członków naszego Zespołu zbadano hydratację tauryny (osmolit stabilizujący) i trimetylotauryny oraz ich wpływ na stabilność lizozymu. Stwierdzono, że tauryna wykazuje właściwości stabilizujące w stosunku do lizozymu oraz ogólnie osłabia wodę w swojej sferze hydratacyjnej w stosunku do wody czystej. Temperatura denaturacji lizozymu w obecności mocznika i jego pochodnych oraz chlorowodoru guanidyny obniża się wraz ze wzrostem stężenia osmolitów [155–158]. Na podstawie badań spektralnych przeprowadzonych w naszym Zespole stwierdzono, że alkilowe pochodne mocznika (osmoliy destabilizujące): *N*-metylomocznik, *N*-etylomocznik, *N*-*n*-butylomocznik, *N,N'*-dimetylomocznik, *N,N'*-dietylomocznik, *N,N,N,N'*-tetrametylomocznik wzmacniają strukturę wody w swojej sferze hydratacyjnej stosunku do wody czystej i wszystkie są denaturantami lizozymu. Ustalono, że arginina jest stabilizatorem lizozymu do stężenia 100 mM, natomiast przy wyższych stężeniach – destabilizatorem [156]. Stwierdzono także antyagregacyjne właściwości mocznika, argininy oraz chlorowodoru guanidyny w stosunku do stanu natywnego oraz zdenaturowanego lizozymu [159].

3.7. Hydratacja mocznika i jego wpływ na białka

Mocznik jest osmolitem destabilizującym wykorzystanym w moich badaniach. Jest pierwszą zsyntetyzowaną organiczną substancją chemiczną (w roku 1828) z substratów nieorganicznych [160]. W roztworze wodnym mocznik zwiększa rozpuszczalność węglowodorów, utrudnia powstawanie miceli, zmniejsza lepkość i hamuje żelowanie roztworów celulozy.



Struktura i dynamika roztworów mocznika jest przedmiotem wieloletnich badań. Stosowano różne metody eksperymentalne: pomiar ultradźwięków [161,162], rozproszenia rentgenowskiego [163], dyfrakcji neutronów [164], spektroskopii dielektrycznej [165], terahercowej [166], w podczerwieni [167] i ramanowskiej [168], optycznego zjawiska Kerra [169] oraz NMR [170]. Przeprowadzono również badania teoretyczne metodami: symulacji dynamiki molekularnej [171], Monte Carlo [172,173], obliczenia *ab initio* [174] oraz za pomocą teorii funkcyjności gęstości (DFT) [175].

Istnieją różne modele hydratacji mocznika. Według Franka i Franka [176] mocznik zakłóca strukturę rozpuszczalnika. Wskazywali oni na istnienie w roztworze dwóch rodzajów wody: o wyższej gęstości, wolnych cząsteczek wody niezwiązanych wiązaniami wodorowymi, oraz o niższej gęstości i strukturze tetraedrycznej. Według autorów tej hipotezy mocznik tworzy roztwory doskonałe z wodą „gęstą” i jest wykluczony z wody tetraedrycznej. W wyniku tego cząsteczki mocznika są otaczane przez wodę o mniej uporządkowanej strukturze. Według tego modelu mocznik powoduje zwiększenie udziału wody słabo zorganizowanej kosztem wody o strukturze tetraedrycznej i w tym sensie wykazuje właściwości „burzące” strukturę wody. Badania z wykorzystaniem symulacji metodą Monte Carlo oraz metodą dynamiki molekularnej [172,177] wskazują na zmniejszanie liczby wiązań wodorowych wody w otoczeniu mocznika. Idrissi i współautorzy [178] postulują, na podstawie symulacji metodą dynamiki molekularnej, że struktura wody ulega znacznemu osłabieniu wraz z dodatkiem mocznika. Wyniki te znajdują potwierdzenie w niektórych pracach eksperymentalnych [169,179]. Z kolei badania metodami wolumetrycznymi i inne symulacje komputerowe [133,180,181] sugerują wzmacnianie struktury wody przez mocznik.

Model SKSS (Schellman, Kresheck, Sheraga i Stokes) [182,183] przypisuje właściwości roztworów mocznika dimeryzacji lub oligomeryzacji jego cząsteczek. Według modelu SKSS w roztworze wodnym następuje samoagregacja mocznika, a struktura otaczającej wody nie ulega znaczącej zmianie. Spektroskopia w podczerwieni [167] oraz badania dyfrakcji neutronów [164] sugerują obecność kompleksów składających się nawet z 16 merów związanych ze sobą wiązaniami wodorowymi. Również symulacje metodą Monte Carlo sugerują tworzenie klastrów mocznika w roztworach wodnych [172,173]. Pomiary ultradźwiękowe [161,162], rozpraszania rentgenowskiego [163], spektroskopii ramanowskiej [168] oraz



dielektrycznej [165] nie potwierdziły agregacji cząsteczek mocznika wynikającej z modelu SKSS. Dodatkowo obliczenia kwantowo mechaniczne nie wskazują na istnienie stabilnych cyklicznych dimerów mocznika w roztworach wodnych [175]. Na słuszność modelu SKSS wskazuje jednak wiele badań eksperymentalnych i prac teoretycznych, według których mocznik wbudowuje się w strukturę wody i zachowuje jej tetraedryczną strukturę [167,170], jako cząsteczka typu „*water like*” [174,177] lub wpływa na strukturę wody w niewielkim stopniu [180,184]. Rezus i Bakker stwierdzili na podstawie badań spektroskopowych, że sieć wiązań wodorowych w roztworach mocznika jest niemal nie zmieniona w porównaniu do sytuacji w wodzie czystej [185]. Do podobnych wniosków doprowadziły badania z użyciem spektroskopii terahercowej [166] oraz symulacje metodami dynamiki molekularnej [171]. Interpretacja wyników w aspekcie pytania czy mocznik osłabia lub wzmacnia strukturę wody jest zależna od przyjętego przez autorów kryterium określania właściwości struktury wody, takich jak liczba wiązań wodorowych jakie tworzy cząsteczka wody z innymi cząsteczkami wody, kryterium geometryczne charakteryzujące wiązania wodorowe, różnice w dynamice wody wokół cząsteczki rozpuszczonej a wodzie czystej lub odległość między cząsteczkami wody. Z większości tych badań wyłania się wspólny wniosek, że mocznik ma niewielki wpływ na otaczającą go wodę.

Roztwory mocznika były badane w aspekcie jego zdolności do denaturacji białek, w wyniku czego zostały zaproponowane dwa mechanizmy jego wpływu na stabilność białek: bezpośredni i pośredni. Według pierwszego z nich, mocznik wiąże się bezpośrednio z łańcuchem głównym białek lub jego resztami aminokwasowymi silniej niż woda. Istnieją różne koncepcje oddziaływania mocznika z białkiem. Efekt entalpowy jest siłą napędową rozwijania białka w przypadku mechanizmu bezpośredniego. Wynika on z korzystnych energetycznie oddziaływań mocznika z powierzchnią białka, które występują w większej liczbie w przypadku formy rozwiniętej białka [4]. Według części autorów [3,116], interpretujących wpływ osmolitów destabilizujących na białka w ramach modelu wpływu bezpośredniego, mocznik konkuruje z wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi fragmentów łańcucha głównego białka, które stabilizują jego strukturę drugorzędową. Skupiając się na mechanizmie bezpośrednim, inni autorzy [186] wskazują na możliwość wiązania mocznika z fragmentami polarnymi powierzchni biomakrocząsteczek w pobliżu grup hydrofobowych. Zakłóca to oddziaływania między hydrofobowymi fragmentami białka,

co powoduje rozluźnienie struktury przeważająco hydrofobowego rdzenia białka i umożliwia jego denaturację [186]. Inne badania sugerują dwustopniowy proces denaturacji białka przez mocznik. W pierwszym etapie mocznik działa jak surfaktant i powoduje usunięcie wody z pierwszej sfery solwatacyjnej białka tworząc „suchą sferę” [6,187]. W tym procesie biorą udział oddziaływania dyspersyjne mocznika z powierzchnią białek. Mocznik wiąże się również na tym etapie z protonem aminowym łańcucha głównego białka wiązaniami wodorowymi, co prowadzi do zerwania wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych białka. W drugim etapie mocznik i woda solwatuja odsłonięte reszty aminokwasowe: hydrofobowe, polarne i posiadające ładunek oraz tworzą z nimi wiązania wodorowe [187].

Według Wei, Yang i Gao [15,188,189] denaturacja białek przez mocznik jest indukowana przez akumulację jego cząsteczek wokół łańcucha białka, w wyniku czego część wody jest usuwana z jego otoczenia. Pozostała część cząsteczek wody silnie oddziałuje z grupą karbonylową łańcucha głównego białek. Oddziaływania te powodują zerwanie wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych między grupami polarnymi w białku. Reszty aminokwasowe zostają związane wiązaniami wodorowymi z cząsteczkami mocznika oraz w mniejszym stopniu z cząsteczkami wody. Silne oddziaływanie zdenaturowanego białka ze składnikami roztworu uniemożliwia jego zwinięcie do formy natywnej.

Street i współautorzy [101] stwierdzili, na podstawie badań entalpii swobodnej przeniesienia łańcucha głównego białka z wody do roztworu osmolitu, że mocznik akumuluje się w pobliżu łańcucha głównego białka i oddziałuje z nim silniej niż woda. Według modelu przeniesienia Tanforda [114] oddziaływania łańcucha głównego białek mają decydujący wpływ na fałdowanie białek [99,116]. Z kolei badania denaturacji białka TRP-cage za pomocą symulacji metodą dynamiki molekularnej replik temperaturowych (REMD) [190] sugerują znaczny wpływ reszt aminokwasowych na rozwijanie białka. Stwierdzono, że interakcje mocznik-białko stanowią 60% udziału w zmianie współczynnika preferencji interakcji między formą zwiniętą a zdenaturowaną białka. Znaczny w tym udział reszt aminokwasowych został potwierdzony przez badania wolumetryczne i osmometryczne [191,192]. Badania hydratacji peptydu NATA w obecności mocznika z wykorzystaniem pomiarów anizotropowego zaniku fluorescencji i symulacji metodą dynamiki molekularnej [129] wykazały, że mocznik powoduje formowanie niezorganizowanych agregatów wokół



grupy indolowej peptydu, ma mały wpływ na wodę, natomiast silnie oddziałuje z łańcuchem głównym peptydu i z jego łańcuchem bocznym.

Mechanizm pośredni zakłada, że mocznik zaburza strukturę wody i w ten sposób osłabia efekt hydrofobowy. W konsekwencji powoduje zmniejszenie oddziaływań hydrofobowych i umożliwia wprowadzenie cząsteczek wody w pobliżu grup hydrofobowych. Powoduje to dehydratację, ekranowanego od wody w stanie zwiniętym, rdzenia hydrofobowego białka [36]. Część badaczy wskazuje, że denaturacja białka następuje na sposób mechanizmu pośredniego i bezpośredniego [10,15,189]. Dwie hipotezy wpływu osmolitów – pośredniego i bezpośredniego – nie wykluczają się wzajemnie i mogą oddawać pełen obraz wpływu osmolitów na stabilność białek.

3.8. Hydratacja betainy i jej wpływ na białka

Betaina jest osmolitem stabilizującym wykorzystanym w moich badaniach. Badania spektroskopowe i symulacje metodą dynamiki molekularnej *ab initio* wykazały istnienie dwóch izomerów konformacyjnych betainy w roztworze wodnym [193]. Izomer z kątem dwuściennym 0° w wiązaniu OCCN charakteryzuje się większą populacją niż ten z kątem 90° .

Istnieje niewiele doniesień literaturowych na temat hydratacji betainy. Za pomocą symulacji metodą dynamiki molekularnej [194] próbowano określić strukturę wody w sferach hydratacyjnych glicyny i jej analogów: glicyny, *N*-metyloglicyny, *N,N*-dimetyloglicyny oraz betainy. W badaniach hydratacji tych substancji oparto się na modelu, w którym woda posiada dwie struktury: tetraedryczną – lodopodobną i strukturę amorficzną – bardziej podobną do struktury wody w fazie gazowej. Na podstawie obliczeń stwierdzono, że średnia wartość współczynnika tetraedryczności, q , zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia substancji rozpuszczonej. Oznacza to zmniejszenie liczby cząsteczek wody lodopodobnej i zwiększenie liczby cząsteczek wody związanej z substancją rozpuszczoną. Na podstawie porównania rozkładu parametru q i funkcji rozkładu radialnego udowodniono istnienie od 1,5 do 2 sfer hydratacyjnych w pobliżu atomu azotu. Najwięcej wody o strukturze wody objętościowej, spośród zbadanych substancji, znajduje się w otoczeniu cząsteczki betainy. Stwierdzono również, że sfera hydratacyjna betainy rozciąga się wokół całej cząsteczki, przy czym czas przebywania cząsteczek wody w otoczeniu anionu

karboksylowego wynosi około 0,63 ps, co jest wyraźnie wyższą wartością w porównaniu do czasu przybywania w pobliżu atomu azotu, wynoszącym około 0,13 ps. Obliczona liczba wiązań wodorowych przypadająca na atom tlenu grupy karboksylowej wynosi 2,35.

Sironi i współautorzy [195,196] badali hydratację betainy za pomocą obliczeń kwantowomechanicznych QM/MM i symulacji metodą dynamiki molekularnej. Symulacje przeprowadzono dla układów zawierających 1, 4, 27, 64, 125 cząsteczek betainy otoczonych 453 cząsteczkami wody. Na podstawie funkcji rozkładu radialnego atomów tlenu cząsteczek wody zlokalizowanych w pobliżu anionu karboksylowego stwierdzono, że druga sfera hydratacyjna dla betainy nie istnieje. Ustalono również, że średnia liczba wiązań wodorowych pomiędzy betainą a wodą wynosi około 4 dla roztworów o najniższym stężeniu i zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia. Ponadto liczba cząsteczek wody w pierwszej sferze hydratacyjnej betainy wynosi 23,2 i zmniejsza się wraz ze wzrostem stężenia betainy. Jednocześnie zwiększa się prawdopodobieństwo, że wraz ze wzrostem stężenia betainy jedna cząsteczka wody jest współdzielona i należy jednocześnie do kilku sfer hydratacyjnych różnych cząsteczek betainy. Stwierdzono również, że cząsteczki betainy przy wyższych stężeniach oddziałują ze sobą atomami tlenu grup karboksylowych pośrednio, przez oddziaływanie z cząsteczkami wody, z którymi tworzą wiązania wodorowe.

Na podstawie badań dotyczących hydratacji glicyny i jej metylowych pochodnych za pomocą spektroskopii FTIR [18] ustalono, że liczba moli wody zaburzonej przez 1 mol substancji rozpuszczonej wynosi 4 dla betainy. Ponadto zaobserwowano rozszczepienie pasma OD wody HDO zaburzonej przez betainę na dwa pasma składowe położone przy 2542 cm^{-1} i 2445 cm^{-1} . Efekt ten tłumaczono załamaniem symetrii oddziaływania grupy karboksylowej z cząsteczkami wody. Stwierdzono również wzmocnienie struktury wody przez betainę.

Hower z zespołem [197] wykorzystali metodę wolumetryczną do badania hydratacji betainy. Na tej podstawie wyznaczono liczbę cząsteczek wody hydratujących betainę równą 3,17, co nieznacznie różni się od wartości uzyskanych innymi metodami [18,194–196]. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem spektroskopii dielektrycznej [198] sugerują, że betaina silnie wpływa na strukturę wody. Wyznaczona liczba hydratacyjna wynosiła 9 i jest wyższa w porównaniu do innych doniesień [18,195,196,199].



Di Gioacchino i współautorzy [200] stwierdzili na podstawie badań dyfrakcji neutronów, że tylko grupa karboksylowa betainy tworzy silne wiązania wodorowe z wodą. Sfera hydratacyjna betainy zawiera 25 cząsteczek wody. Według autorów sieć wiązań wodorowych wody w obecności betainy jest wzmocniona w porównaniu do wody czystej. Wzmocnienie struktury wody wokół betainy potwierdzono także na podstawie wyników badań prowadzonych z użyciem symulacji metodą dynamiki molekularnej [201].

Wpływ osmolitów stabilizujących na białka jest przedmiotem wieloletnich badań [76,101,153,202]. Niekiedy autorzy sugerują, że stabilizacja białek przez betainę jest związana z wykluczeniem jej ze sfery hydratacyjnej białka [203,204] i jego preferencyjnej hydratacji w roztworze wodnym. Bezpośrednie oddziaływania białka z betainą są mniej korzystne niż z wodą. Efektem tego zjawiska jest mniejsze stężenie osmolitu w sferze solwatacyjnej białka. Wyniki prowadzą do wniosku, że oddziaływania białka z betainą mają charakter pośredni, uczestniczy w nich woda hydratacyjna białka i betainy [203,204].

3.9. Hydratacja stosowanych w pracy cząsteczek modelowych

Hydratacja *N*-metyloacetamidu

N-metyloacetamid (NMA) jest najprostszą cząsteczką zawierającą wiązanie peptydowe oraz dwie grupy metylowe będące centrami hydrofobowymi i jest uważany za dobry model hydratacji łańcucha głównego białka [22,205,206].

Z wykorzystaniem symulacji metodą Monte Carlo i metod *ab initio* wykazano, że korzystniejsza energetycznie w fazie gazowej i w roztworach wodnych jest forma *trans*-NMA od *cis*-NMA [207,208]. Na podstawie badań NMR i spektroskopii Ramana oszacowano zawartość formy *trans*-NMA na poziomie 98,5% [100,107,153,209].

Na podstawie badań hydratacji NMA za pomocą symulacji metodą dynamiki molekularnej [210,211] stwierdzono, że tworzy on trzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Tlen grupy karbonylowej tworzy dwa wiązania wodorowe z dwiema cząsteczkami wody, natomiast proton grupy aminowej tworzy jedno wiązanie wodorowe [210,211]. Inne badania obliczeniowe nad deuterowanym NMA w D₂O wykazały, że wiązania wodorowe z grupą karbonylową NMA mają dłuższy czas życia niż wiązania pomiędzy cząsteczkami wody [212]. Stwierdzono też, że wiązanie

wodorowe grupy karbonylowej deuterowanego NMA z ciężką wodą jest silniejsze od wiązania wodorowego między deuterowaną grupą aminową a ciężką wodą.

Na podstawie symulacji metodą dynamiki molekularnej [213] stwierdzono, że wiązania wodorowe w sferze hydratacyjnej NMA są silniejsze niż w wodzie czystej. Do podobnych wniosków prowadziły wyniki badań przeprowadzonych w naszym Zespole z użyciem spektroskopii w podczerwieni [23,214] i obliczeń DFT [23]. Ustalono, że zwiększenie populacji silnych wiązań wodorowych jest skutkiem interakcji między cząsteczkami wody oddziałującymi z atomem tlenu grupy karbonylowej NMA i cząsteczkami wody zlokalizowanymi wokół grup hydrofobowych. Na skutek występowania hydratacji hydrofobowej i hydrofilowej wokół cząsteczki NMA tworzy się wzmocniona klatratopodobna struktura utworzona z cząsteczek wody.

Badania NMR i symulacje metodą dynamiki molekularnej [215] wskazały na istnienie słabych oddziaływań C-H...O między grupami metylowymi NMA a atomami tlenu wody. Na podstawie analizy funkcji rozkładu radialnego stwierdzono, że silniejsze oddziaływania występują między wodą i grupą metylową związaną z grupą karbonylową NMA niż z wodą i grupą metylową związaną z atomem azotu NMA.

Hydratacja dimetylosulfotlenku

Dimetylosulfotlenek (DMSO) jest cząsteczką modelową wykorzystaną w moich badaniach. W swojej budowie charakteryzuje się bliskością położenia grup polarnej i niepolarnych, co sprawia, że jest dobrym modelem do badania hydratacji powierzchni charakteryzujących się mieszaną hydratacją hydrofilowo-hydrofobową [24].

Badania spektroskopowe w podczerwieni wskazują na istnienie oddziaływań między atomami wodoru grup metylowych DMSO i atomami tlenu otaczających cząsteczek wody [216–218]. Można je sklasyfikować jako wiązania wodorowe typu *blue-shift* – obserwuje się przesunięcie częstości pasm $\nu(\text{C-H})$ DMSO w stronę wyższych liczb falowych w porównaniu do izolowanej cząsteczki DMSO. Oddziaływania tego typu zaobserwowano też na podstawie obliczeń *ab initio* [219]

Wyniki symulacji metodą dynamiki molekularnej [220] wykazały występowanie hydratacji hydrofobowej wokół grup metylowych DMSO w rozcieńczonych roztworach wodnych. W sferach hydratacyjnych tych grup



zaobserwowano silniejsze i charakteryzujące się dłuższym czasem życia wiązania wodorowe w porównaniu do wody czystej. Wyniki badań eksperymentalnych [221–224] nie dają uzgodnionej opinii na temat występowania hydratacji hydrofobowej w przypadku DMSO. Według niektórych autorów wyniki spektroskopii dielektrycznej rozcieńczonych roztworów DMSO wskazują na jej występowanie [221,222]. Jako dowód, przedstawiają oni zwiększenie czasu relaksacji wody wraz z dodawaniem DMSO do roztworów o dużej zawartości wody. Inni autorzy [223] efekt ten tłumaczą poprzez zaburzenie sieci wiązań wodorowych wywołanych zawadami przestrzennymi. Soper i Luzar [224] na podstawie badań dyfrakcji neutronów i symulacji metodą dynamiki molekularnej stwierdzili, że sieć wiązań wodorowych wody jest bardziej uporządkowana i wzmocniona w obecności DMSO. Efekty te tłumaczyli jednak jako rezultat silnych wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody a atomem tlenu DMSO. Wyniki uzyskane w naszym Zespole wskazują na tworzenie się wody o strukturze „lodopodobnej” w sferze hydratacyjnej DMSO wokół grup metylowych w bardzo rozcieńczonych roztworach [24]. Przy wysokich stężeniach, DMSO tworzy słabe wiązania wodorowe z wodą (istotnie słabsze niż występujące w wodzie czystej).

Większość wyników nowszych badań eksperymentalnych [225–227] oraz symulacji metodą dynamiki molekularnej [220,224,228,229] wskazuje na wzmocnianie struktury wody w rozcieńczonych roztworach DMSO. Wyniki badań spektroskopowych oraz obliczeń DFT przeprowadzonych w naszym Zespole wskazują na istnienie dwóch populacji cząsteczek wody w sferze hydratacyjnej DMSO: osłabionej i wzmocnionej względem wody. Większy udział populacji o silnych wiązaniach między cząsteczkami wody powodował, że w ogólnym efekcie sfera hydratacyjna DMSO była wzmocniona. Powstawanie wzmocnionej sieci wiązań wodorowych w sferze hydratacyjnej DMSO jest wspierane efektem kooperatywności wiązań wodorowych wody między cząsteczkami wody zlokalizowanych wokół grup metylowych oraz cząsteczkami wody oddziałującymi z atomem tlenu cząsteczki DMSO. Rezultaty uzyskane za pomocą spektroskopii w podczerwieni [227] i symulacji metodą dynamiki molekularnej [228] pozwoliły na stwierdzenie, że przy dużym stężeniu DMSO osłabia strukturę wody. Wpływ DMSO na strukturę wody koreluje z jego wpływem na stabilność białek, przy niskich stężeniach DMSO wzmocnia strukturę wody i przesuwa równowagę reakcji w kierunku zwiniętej formy białka [230,231], natomiast w zakresie wysokich stężeń DMSO osłabia strukturę wody i jest denaturatem [232].

Hydratacja glicyny

Glicyna jest najprostszym aminokwasem. W roztworach wodnych występuje w postaci jonu obojnaczego w wyniku korzystnego oddziaływania z cząsteczkami wody [78,233–236]. Obliczenia teoretyczne [237–240] wskazują na stabilizowanie jonu obojnaczego w wyniku pośrednictwa cząsteczek wody zlokalizowanych między grupą aminową i grupą karboksylową. Autorzy [237–240] innych badań teoretycznych wskazują na bezpośrednie wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu z grupy karboksylowej na grupę aminową.

Na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych [241–243] otrzymano różne liczby cząsteczek występujących w pierwszej warstwie hydratacyjnej glicyny. Według jednych z autorów sfera hydratacyjna glicyny zawiera 5 cząsteczek wody [241]. Inni autorzy wskazują na 6 cząsteczek [242]. Na podstawie symulacji *ab initio* metodą dynamiki [242] molekularnej stwierdzono, że sfera hydratacyjna glicyny składa się z 8 cząsteczek wody, z czego 4,7 znajduje się wokół grupy karboksylowej i 3 wokół grupy aminowej. Z kolei inni autorzy [243] z użyciem tej samej metody uzyskali liczbę hydratacyjną równą 9.

Hydratacja glicyny została zbadana z użyciem symulacji metodą dynamiki molekularnej [244,245]. Stwierdzono, że glicyna ma niewielki wpływ na wiązania wodorowe między cząsteczkami wody [244,245]. Na podstawie analizy funkcji rozkładu radialnego $O_{\text{woda}}-O_{\text{woda}}$ zauważono, że położenie jej pierwszego piksu nie zmienia się pod wpływem dodatku glicyny do wody czystej, co miałyby wskazywać na brak znaczącego wpływu glicyny na strukturę wody w roztworze. Trzeba jednak pamiętać, że opis ten dotyczy wszystkich cząsteczek wody w roztworze, a nie tylko tych w bezpośrednim otoczeniu glicyny.

Wyniki badań spektroskopowych FTIR [246] przeprowadzonych w naszym Zespole wskazywały na istnienie krótszych i silniejszych wiązań wodorowych w sferze hydratacyjnej glicyny w porównaniu do wody czystej. Ponadto stwierdzono, że glicyna cechuje się hydratacją typu hydrofilowego, charakteryzującą się bezpośrednimi wiązaniami wodorowymi cząsteczek wody z grupami polarnymi aminokwasu.



Hydratacja *N*-metyloglicyny

Z obliczeń DFT [247] układu *N*-metyloglicyny i wody wynikało, że niezbędnym jest sześć cząsteczek wody do przekształcenia formy podstawowej tej cząsteczki do jonu obojnaczego. W innej pracy teoretycznej [248] stwierdzono, że cztery cząsteczki wody w układzie są wystarczające do uzyskania trwałej stabilizacji jonu obojnaczego *N*-metyloglicyny w stosunku do jego formy neutralnej.

Na podstawie symulacji metodą dynamiki molekularnej [249] stwierdzono, że dodatek *N*-metyloglicyny do wody nie zaburza tetraedrycznej struktury wody. Z analizy funkcji rozkładu radialnego $O_{\text{woda}}-O_{\text{woda}}$, zauważono zwiększenie intensywności pierwszego pików tej funkcji oraz przesunięcie maksimum tego pików w stronę mniejszych odległości. Dodatkowo na podstawie analizy funkcji rozkładu odległości między cząsteczkami wody oraz kątów wiązań wodorowych między nimi stwierdzono, że woda w roztworze *N*-metyloglicyny jest wzmocniona w porównaniu do wody czystej. Wzmocnienie wiązań wodorowych wody w sferze hydratacyjnej *N*-metyloglicyny zostało zaobserwowane przez członków naszego Zespołu badawczego z wykorzystaniem spektroskopii FTIR [250].

3.10. Widma oscylacyjne wody. Poglądy na temat struktury wody ciekłej.

Spektroskopia w podczerwieni jest powszechnie stosowaną metodą do badania wody w fazie gazowej, ciekłej oraz krystalicznej, a także w amorficznym lodzie. Rozciągające pasmo drgań OH (OD) jest czułą sondą odległości między cząsteczkami wody, która z kolei jest miarą siły wiązań wodorowych [251]. Z tego powodu spektroskopia oscylacyjna dostarcza informacji strukturalno-energetycznych o sieci wiązań wodorowych wody w roztworach. Na drgania cząsteczki wody w niewielkim stopniu wpływają oddziaływania inne niż wiązania wodorowe.

Cząsteczka wody wykonuje trzy drgania normalne. Częstości tych drgań dla wody zwykłej (H_2O), ciężkiej (D_2O) i półciężkiej (HDO) w stanie gazowym umieściłem w tabeli 1 [252]. W przypadku ciekłej wody zwykłej (H_2O) obserwowane jest też pasmo kombinacyjne drgań zginających i libracyjnych przy około 2100 cm^{-1} .



Tabela. 1. Drgania normalne wody w stanie gazowym w cm^{-1} [252].

Drgania	ν	H_2O	D_2O	HDO
Rozciągające	$\nu_1 (\nu_s)$	3652	2666	2719
	$\nu_3 (\nu_a)$	3756	2789	-
Zginające	$\nu_2 (\delta)$	1595	1179	1402

W widmach ciekłej wody oraz lodu uzyskanych za pomocą spektroskopii w podczerwieni oraz ramanowskiej obserwowane jest przesunięcie maksimum pasm rozciągających OH w stronę niższych częstości w stosunku do wody w stanie gazowym. Pasma rozciągające oscylatorów OH lub OD w przypadku H_2O oraz D_2O w podczerwieni są bardzo szerokie i zawierają w sobie wiele udziałów. Znaczne poszerzenie pasma OH (OD) spowodowane jest niejednorodnością wiązań wodorowych, sprzężeniem zdelokalizowanych drgań symetrycznych i asymetrycznych oraz rezonansem Fermiego wynikającego z nakładania się drgań rozciągających OH z drganiami pierwszego nadtonu zginającego HOH [253]. Dlatego interpretacja widm wody H_2O lub D_2O jest trudna. Złożoność widm wody obrazują wyniki badań spektroskopowych wielu autorów [252,254,255]. Badania nad drganiami normalnymi H_2O z użyciem spektroskopii Ramana oraz w podczerwieni pozwoliły na znalezienie czterech składowych położonych przy około 3240 cm^{-1} (3247 cm^{-1}), 3435 cm^{-1} (3435 cm^{-1}), 3540 cm^{-1} (3535 cm^{-1}), 3620 cm^{-1} (3622 cm^{-1}) [252], wartości w nawiasach pochodzą ze spektroskopii Ramana. Według Maxa i Chapodos [254] natomiast, pasmo drgań rozciągających H_2O może składać się nawet z ośmiu podstawowych komponentów (Gaussowskich pasm składowych). Składają się na nie drgania symetryczne oraz asymetryczne, które są przesunięte w stronę niższych częstości w stosunku do tych w fazie gazowej. Dodatkowa obecność pasm drgań złożonych w towarzystwie pasm drgań podstawowych tłumaczy według tych autorów wysoką absorbcję, jednocześnie nie dostarcza znaczących informacji o strukturze [254]. Czarnik-Matusiewicz i współautorzy [255] na podstawie badań spektralnych wody w funkcji temperatury z użyciem dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej w podczerwieni zidentyfikowali trzy komponenty pasma OH w wodzie zwykłej. Dwa z nich, synchronicznie skorelowane, odpowiadające cząsteczkom wody związanym wiązaniami wodorowymi, zmieniały swoją intensywność wraz ze zmianą temperatury. Według autorów, pasmo o najniższej częstości można przypisać cząsteczkom wody związanym czterema wiązaniami wodorowymi. Pasma o wyższej częstości odpowiada



oscylatorom OH związanym wiązaniami wodorowymi wody z mniejszą liczbą wiązań wodorowych. Z kolei pasmo asynchroniczne, o najwyższej częstości, odpowiada oscylatorom OH, które nie tworzą wiązań wodorowych lub wolnym grupom OH. Z powyższego opisu jest widoczne, że pomimo wielu lat badań spektroskopowych wody ciekłej (H_2O , D_2O) przypisanie sensu fizycznego pasmom składowym w obszarach drgań OH i OD jest wciąż problematyczne.

Interpretację skomplikowanych widm H_2O lub D_2O można uprościć poprzez zastosowanie metody rozcieńczania izotopowego HDO w H_2O lub D_2O [256]. Drgania OD (maksimum piku przy około 2500 cm^{-1}) i OH (maksimum piku przy około 3400 cm^{-1}) w fazie ciekłej są rozprzęgnięte. W efekcie, energia oscylacji nie ulega podzieleniu na symetryczne i antysymetryczne drgania normalne [253].

Czystej HDO nie można otrzymać, ponieważ istnieje ona w roztworze w równowadze z H_2O i D_2O : $H_2O + D_2O \rightleftharpoons 2HDO$ [257]. Według danych literaturowych wartość stałej równowagi, K , tej reakcji wynosi $3,72 - 3,94$ [258–260] w 25°C . Oznacza to, że przy zastosowaniu 4% wagowego dodatku D_2O do H_2O w wyniku reakcji wymiany izotopowej D_2O ulega niemal całkowitemu przereagowaniu w HDO.

W przypadku braku substancji rozpuszczonych, kształt rozprzęgniętego pasma OD wody jest zbliżony do Gaussowskiego, jednak wykazuje on asymetrię [256]. Jest ona spowodowana zmianą absorpcyjności molekuł wraz z częstością w obrębie pasma OD oraz możliwą obecnością tonów złożonych w zakresie o niskich częstościach. Krótki czas życia wiązań wodorowych w cieczy powoduje poszerzenia pasma OD. Na częstotliwość drgań rozciągających w wodzie ciekłej silnie wpływają wiązania wodorowe z otaczającymi cząsteczkami wody [252]. Pasma drgań OD (OH) w wodzie ciekłej jest przesunięte w kierunku niższych częstości w stosunku do fazy gazowej o 225 cm^{-1} (250 cm^{-1}) z powodu obecności wiązań wodorowych. Z tego powodu pasmo drgań rozciągających jest bardzo czułym wskaźnikiem i jest używane do badania wiązań wodorowych w wodzie objętościowej, wodzie zawierającej sole i rozpuszczalne w wodzie nieelektrolity.

Senior i Verral [261], na podstawie widm HDO zmierzonych w funkcji temperatury stwierdzili, że pasmo drgań HDO w podczerwieni jest złożone z dwóch zależnych temperaturowo pasm składowych położonych przy 2525 i 2650 cm^{-1} . Wraz



ze wzrostem temperatury obserwowane było zwiększanie intensywności składowej położonej przy wyższych częstościach i zmniejszenie intensywności składowej położonej przy niższych częstościach. Świadczy to o zmniejszeniu udziału wiązań wodorowych i zwiększeniu udziału wolnych grup OH (OD) wraz ze wzrostem temperatury. Podobne wyniki uzyskał Walrafen [262] z użyciem spektroskopii Ramana. Na podstawie widm ciekłej wody półciężkiej Lindner, mierzonych w zakresie 20-400°C (wyniki zapisane w jego rozprawie doktorskiej są opisane w pozycji [252]), znalazł trzy pasma składowe w paśmie OD HDO: to przy około 2630 cm⁻¹ było niemal niezależne od temperatury, natomiast położenia dwóch pozostałych pasm przesunęły się w stronę wyższych częstości wraz ze wzrostem temperatury i występowały w zakresach 2510-2620 cm⁻¹ i 2300-2550 cm⁻¹. Obecność składowej niewrażliwej na zmianę temperatury wskazuje na istnienie niezwiązanych wiązaniami wodorowymi grup OD. Trzeba jednak pamiętać, że nie można traktować grup niezwiązanych tak jakby były w stanie gazowym. Są to grupy w polarnym środowisku rozpuszczalnika. Również Kristiansson i współautorzy [263] aproksymowali pasmo OD wody półciężkiej trzema Gaussowskimi pasmami składowymi (2329 cm⁻¹, 2506 cm⁻¹ i 2643 cm⁻¹). Max i Chapados [254] znaleźli na podstawie analizy drugiej pochodnej kształtu pasma HDO w podczerwieni trzy pasma składowe położone przy 2385 cm⁻¹, 2506 cm⁻¹ i 2625 cm⁻¹. Według nich pasmu położonemu przy 2506 cm⁻¹ odpowiada drganie rozciągające OD, natomiast pasmu przy 2385 cm⁻¹ i 2625 cm⁻¹ przypisali odpowiednio drgania $\nu(\text{OD}) - \nu_T$ oraz $\nu(\text{OD}) + \nu_T$, gdzie ν_T oznacza pasma odpowiadające ograniczonej translacji.

Istnieją dwa główne typy modeli dotyczące struktury wody – *Mixture Model* oraz *Continuum Model*. Według *Mixture Model* [264–266] woda składa się z co najmniej dwóch stabilnych składników. Pierwszy model zaproponowano na podstawie wyników badań widmowych ramanowskich [267] oraz w podczerwieni [261,268]. Głównym dowodem na poparcie tej tezy jest obserwowany punkt izobestyczny w widmach pasma wody w funkcji temperatury. Na podstawie analizy kształtu pasm ramanowskich stwierdzono, że przy wyższych częstościach w obrębie drgań rozciągających pasma wody absorbują oscylatory, które nie tworzą wiązania wodorowego przez atom H/D z cząsteczkami wody [251]. Obserwacje te wspierają pogląd o tym, że w ciekłej wodzie znajdują się związane wiązaniami wodorowymi cząsteczki wody oraz wolne grupy OH (OD). Dlatego często składowym spektralnym przypisywane są udziały: wody związanej wiązaniami wodorowymi oraz wody



niezwiązanej wiązaniami wodorowymi. Inni autorzy [268] przypisują wodzie komponenty różniące się liczbą interakcji poprzez wiązania wodorowe. Wyróżniają cząsteczki wody o wysokiej liczbie wiązań wodorowych – wodę tetraedryczną, wodę pośrednią (dimery i trimery) oraz wodę o małej liczbie wiązań z innymi cząsteczkami. Badania z wykorzystaniem ultraszybkiej spektroskopii [269,270] (IR i IR-Raman) doprowadziły do wykrycia dwóch komponentów wody różniących się czasem relaksacji [269]. Jednemu z nich jest przypisywana woda tworząca zero wiązań wodorowych. Stwierdzenie to zostało poparte wynikami symulacji metodą dynamiki molekularnej [271,272]. Wyniki innych badań z użyciem femtosekundowej spektroskopii *pump-probe* w podczerwieni również wskazują na istnienie dwóch komponentów różniących się czasem relaksacji orientacyjnej [273]. Krótszemu czasowi relaksacji przypisano słabo związane wiązaniami wodorowymi cząsteczki wody, natomiast dłuższemu czasowi relaksacji odpowiadają cząsteczki wody silnie związane. Doniesienia w nowszej literaturze [274] wskazują na istnienie w wodzie mieszaniny składającej się z wody o małej gęstości (*low density liquid*, LDL) i dużej gęstości (*high density liquid*, HDL). Wodzie o niskiej gęstości miałyby odpowiadać cząsteczki wody o liczbie koordynacyjnej wynoszącej w przybliżeniu cztery, odpowiadającej wodzie o strukturze tetraedrycznej. Liczba koordynacyjna cząsteczek wody HDL jest bliższa pięciu, dodatkowa cząsteczka wody pochodzi z drugiej sfery hydratacyjnej i „wpasowuje” się w tetraedryczną sieć wiązań wodorowych w pierwszej sferze hydratacyjnej wokół cząsteczki wody.

Większość badań spektroskopowych w bliskiej podczerwieni oraz ramanowskich dostarcza dowodów na słuszność modelu typu *Mixture Model* [275]. Wskazują one na istnienie dwóch [276,277] lub trzech komponentów [255,278] i dostarczają dowodów na istnienie wolnych grup OH. W badaniach w zakresie średniej podczerwieni te ostatnie pasma są bardzo słabe [275].

Continuum Model [279,280] nie rozróżnia granicznych struktur lecz traktuje strukturę wody jako ciągły rozkład geometrii i zniekształceń średniej struktury sieci wiązań wodorowych. Wyniki badań teoretycznych wskazują na taki *Continuum Model*, w którym woda składa się z szerokiego kontinuum struktur różniących się długością wiązań wodorowych, kątów i liczby koordynacyjnej oraz struktur chiralnych nie przypominających niczego co występuje w wodzie w stanie gazowym lub stałym.



Według Maxa i Chapodos [254,281], w zależności od udziału molowego w mieszaninie H_2O i HDO istnieje pięć różnych jednostek organizacyjnych wody: OH_4 , OH_3D , OH_2D_2 , OHD_3 i OD_4 , w których dwa protony związane są wiązaniami kowalencyjnymi, a pozostałe dwa wiązaniami wodorowymi. Przy małym udziale D_2O najbardziej prawdopodobnymi jednostkami są OH_4 i OH_3D . W ostatnim przypadku oznacza to występowanie cząsteczek H-O-H z dwoma wiązaniami kowalencyjnymi i wiązaniami wodorowymi $\text{O}\cdots\text{D}$ i $\text{O}\cdots\text{H}$ lub cząsteczek H-O-D połączonych dwoma wiązaniami $\text{O}\cdots\text{H}$. Sytuacje te przechodzą jedna w drugą na skutek „przeskakiwania” protonu. Autorzy nie znajdują dowodu na istnienie „wolnych” grup OH (OD) [281]. Żukowski [282] na podstawie badań spektroskopowych HDO w H_2O stwierdził, że kształt pasma drgań rozciągających jest związany ze statystycznym rozkładem oscylatorów względem energii wiązań wodorowych. Badania Eavesa i współautorów [283] z wykorzystaniem femtosekundowej dwuwymiarowej spektroskopii w podczerwieni wskazują na istnienie bardzo nietrwałych wolnych oscylatorów OH HDO rozcieńczonej w D_2O , których czas życia jest krótszy niż 200 fs. W tym rozumieniu wolne grupy OH są niestabilne i nie stanowią istotnych komponentów wody. Obliczenia teoretyczne widm w podczerwieni oraz Ramana, opierające się na koncepcji fluktuacji wiązań wodorowych, wykonane przez Efimowa i Naberuchina [284] wskazują na główną rolę sprzężeń wewnątrzcząsteczkowych grup OH oraz nadtonu drgań zginających na kształt pasma drgań H_2O . Według nich nie jest potrzebne proponowanie istnienia oddzielnych agregatów do opisanego kształtu pasma drgań wody.

Według Ben-Amotza [69] pasmo rozciągające H_2O może w dobrym przybliżeniu naśladować stan dwukompozycyjny wody. Możliwość opisanego pasma wody za pomocą dwóch składowych nisko- i wysokotemperaturowej, została potwierdzona w zakresie 280 – 360 K przy ciśnieniu atmosferycznym za pomocą spektroskopii ramanowskiej z wykorzystaniem analizy MCR [285]. Jednak nie było możliwe opisanie pasma rozciągającego wody, zmierzonego w wyższej temperaturze i przy większym ciśnieniu (ok. 600 K, 30 MPa) oraz w niższej temperaturze (250 K), za pomocą dwóch składowych.

Badania pasma drgań OH HDO rozcieńczonej w H_2O z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej połączonej z analizą MCR doprowadziły do wniosku, że w obrębie tego pasma była obecna składowa wynikająca z międzymolekularnych oddziaływań cząsteczek HDO z H_2O . Dlatego obserwowane pasmo OH nie wynikało



tylko z drgań OH HDO lecz zawierało udziały pochodzące z otaczających cząsteczek H₂O biorących udział w delokalizacji drgania OH HDO. Cząsteczki H₂O wpływają na drgania grup OH w cząsteczkach HDO, nawet poza pierwszą sferą hydratacyjną cząsteczek HDO [286].

Obecność substancji rozpuszczonych wpływa na pasma drgań oscylacyjnych wody w roztworze. Dlatego też spektroskopia w podczerwieni oraz ramanowska są wykorzystywane do badania hydratacji soli [287–292], substancji organicznych w roztworze [293–297] oraz substancji hydrofobowych [55,297,298]. W interpretacji wpływu substancji rozpuszczonych na otaczającą ją wodę pomocna jest eksperymentalna reguła Badgera-Bauera [299], według której zmiana energii wiązań wodorowych jest proporcjonalna do zmiany przesunięcia położenia pasm rozciągających wody. Silniejsze wiązania wodorowe odpowiadają położeniu pasma przy niższych liczbach falowych.

4. METODYKA BADAWCZA

4.1. Użyte substancje

Do badań eksperymentalnych wykorzystałem następujące odczynniki chemiczne:

jako substancje modelowe:

- *N*-metyloacetamid (NMA, Aldrich, > 99%)
- Dimetylosulfotlenek (DMSO, Alfa Aesar, 99 +%)
- Glicynę (GLY, Aldrich, ≥ 99%)
- *N*-metyloglicynę (NMG, Fluka, ≥ 99%)

jako biomakrocząsteczki:

- *trpzip-1* (SWTWEGNKWTWK, Lipopharm.pl)
- Lizozym białka jaja kurzego (*hewl*, Fluka)

jako osmolity:

- *N,N,N*-trimetyloglicynę (TMG, Alfa Aesar, 98%)
- Mocznik (Aldrich, 99,5 %)

4.2. Przygotowanie roztworów

Roztwory zawierające jedynie substancję modelową/biomakrocząsteczkę lub roztwory podstawowe osmolitu przygotowałem metodą wagową poprzez odważenie odpowiedniej masy wybranej substancji i dodanie odważonej ilości wody demineralizowanej ($\kappa \approx 5 \cdot 10^{-8} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$). Roztwory serii stężeniowej osmolitu sporządzałem poprzez rozcieńczanie roztworu podstawowego wodą demineralizowaną. Każdy z roztworów – substancji modelowej/biomakrocząsteczki oraz roztwory z serii stężeniowej osmolitu dzieliłem na dwie, w przybliżeniu, równomasy próbki. Do jednej z nich dodawałem D₂O (Aldrich, 99,9%) w ilości stanowiącej 4% całkowitej masy wody w roztworze, do drugiej dodawałem równoważną molowo ilość H₂O w stosunku do dodanej D₂O.

Roztwory zawierające dwie substancje rozpuszczone: cząsteczkę modelową/biomakrocząsteczkę i osmolit przygotowywałem przez rozpuszczenie odważonej substancji modelowej/biomakrocząsteczki w odgazowanej wodzie demineralizowanej. Następnie roztwory były dzielone na dwie części. Do jednej z nich dodawałem osmolit do uzyskania jego maksymalnego stężenia w ramach serii.



W następnym kroku przygotowywałem serię roztworów o różnym stężeniu osmolitu przez mieszanie w odpowiednich proporcjach próbek zawierających roztwór substancji trójskładnikowych modelowej/biomakrocząsteczki-osmolitu-wody z roztworami dwuskładnikowych substancji modelowej/biomakrocząsteczki-wody. W celu otrzymania serii próbek wody półciężkiej każdy z roztworów dzieliłem na dwie części. Do jednej z nich dodawałem wodę ciężką (D_2O) w ilości stanowiącej 4% całkowitej masy wody w próbce. Do drugiej części, próbki odniesienia, dodawałem równoważną molowo ilość H_2O w stosunku do dodanej ilości D_2O . W ten sposób uzyskiwałem serię roztworów o różnych molalnościach osmolitu i stałej molalności substancji modelowej/biomakrocząsteczki, zawierających wodę półciężką oraz serię roztworów odnośników zawierających wodę zwykłą. Molalności substancji modelowych (NMA, DMSO, glicyny i NMG) w roztworach wynosiły około $1 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$, natomiast molalność *trpzip-1* wynosiła około $0,035 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ i lizozymu wynosiła około $0,008 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Wszystkie roztwory sporządziłem metodą wagową, z wykorzystaniem wagi Mettler Toledo, z dokładnością do $0,00001 \text{ g}$. Pomiar pH roztworów *trpzip-1* + betaina, *trpzip-1* + mocznik, lizozym + betaina, lizozym + mocznik o molalnościach odpowiadających tym, dla których wykonałem pomiary widmowe, zawarłem w Tabeli S1.

4.3. Pomiar widm FTIR

Widma FTIR badanych roztworów wodnych zmierzyłem za pomocą spektrometru Nicolet 8700 (Thermo Electron Co.) pracującym pod kontrolą oprogramowania OMNIC. Każde widmo było uśrednieniem 256 niezależnych skanów zarejestrowanych z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Komora spektrometru była przedmuchiwana suchym azotem w celu usunięcia udziału pary wodnej oraz ditlenku węgla w zmierzonych widmach. Do pomiarów używałem kuwety transmisyjnej wyposażonej w okienka wykonane z CaF_2 . Grubość kuwety, wyznaczona interferometrycznie, wynosiła $0,029 \text{ mm}$. Termostatowana woda opływająca kuwetę pomiarową zapewniała utrzymanie temperatury próbek w kuwecie na stałym poziomie $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Temperaturę próbek kontrolowałem za pomocą termopary umieszczonej w próbce.

4.4. Oprogramowanie komputerowe

Do rejestracji widm w podczerwieni zastosowałem program Omnic 7.2 firmy Nicolet. Analizę widm wykonałem przy użyciu programów GRAMS/32 4.01 (Galactic



Industries Corporation, Salem, USA) oraz RAZOR (Spectrum Square Associates, Inc., Ithaca, USA). Do odczytu parametrów pasm użyłem programu GRAMS/AI w wersji 9.3 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Przy obliczeniach funkcji rozkładu odległości międzycząsteczkowych tlen-tlen między cząsteczkami wody korzystałem ze skryptu Array BASIC autorstwa dr. hab. inż. Macieja Śmiechowskiego.

4.5. Metoda analizy danych widmowych

4.5.1. Izolacja widm wody zaburzonej

Zastosowanie techniki rozcieńczania izotopowego HDO w H₂O pozwoliło mi na uzyskanie widm wody pozbawionych wewnątrz- i międzycząsteczkowych sprzężeń oscylatorów. W ten sposób zostały usunięte niedogodności interpretacyjne związane z analizą złożonego konturu pasma OH wody zwykłej.

Woda w roztworach może być podzielona na dwa udziały: wodę zaburzoną, która spektralnie różni się od wody czystej oraz wodę objętościową. Przyjmuje się, że woda objętościowa wykazuje właściwości identyczne do wody czystej. W układzie zawierającym dwie substancje rozpuszczone można wyróżnić następujące udziały wody: wodę czystą i wodę zaburzoną przez obie substancje rozpuszczone, którą zbiorczo będę określał jako „eksperymentalną” wodę zaburzoną. W skład „eksperymentalnej” wody zaburzonej wchodzi: woda zaburzona przez substancję 1 (*s1*), woda zaburzona przez substancję 2 (*s2*) oraz woda zaburzana równocześnie przez obie substancje. Wodę zaburzoną jednocześnie przez dwie substancje będę nazywał „podwójnie” zaburzoną. Moim celem było wyizolowanie tego ostatniego udziału spektralnego wody. Serie widmowe w zakresie drgań OD wody półciężkiej analizowałem z wykorzystaniem metody widm różnicowych [300], przystosowanej do wyodrębniania udziału wody jednocześnie zaburzonej przez dwie substancje rozpuszczone w roztworze. Metoda otrzymywania widm wody zaburzonej w obecności tylko jednej substancji rozpuszczonej została opracowana i rozwinięta w naszym Zespole wcześniej [300]. Istota tej metody polega na odjęciu od widma wody w roztworze odpowiedniej porcji „wody czystej”.

Widmo wody zaburzonej przez jedną substancję rozpuszczoną otrzymałem z użyciem klasycznej metody widm różnicowych [292]. Całkowite stężenie molowe wody w roztworze, c [mol·dm⁻³] może być wyrażone jako $c = c_a + c_b$, gdzie c_a jest stężeniem molowym wody zaburzonej i c_b jest stężeniem wody objętościowej. Średni



molowy współczynnik absorpcji wody może być wyrażony jako $\varepsilon = (\varepsilon_a \cdot c_a + \varepsilon_b \cdot c_b) / c$ przy każdej liczbie falowej, $\varepsilon(\nu_i)$, gdzie ε jest zmierzonym widmem wody w roztworze (w skali molowego współczynnika absorpcji) przy molalności m [$\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$], ε_a jest widmem wody „zaburzonej”, ε_b – widmem wody objętościowej (*bulk water*), c_a stężeniem wody zaburzonej [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]. Po przekształceniu otrzymuje się równanie pozwalające na uzyskanie widma wody zaburzonej:

$$\varepsilon_a = \frac{c}{c_a} (\varepsilon - \varepsilon_b) + \varepsilon_b \quad (1)$$

Jako, że $c_a = Nm/V$ i $c_b = 1/MV$ równanie (1) może być wyrażone za pomocą zależności.

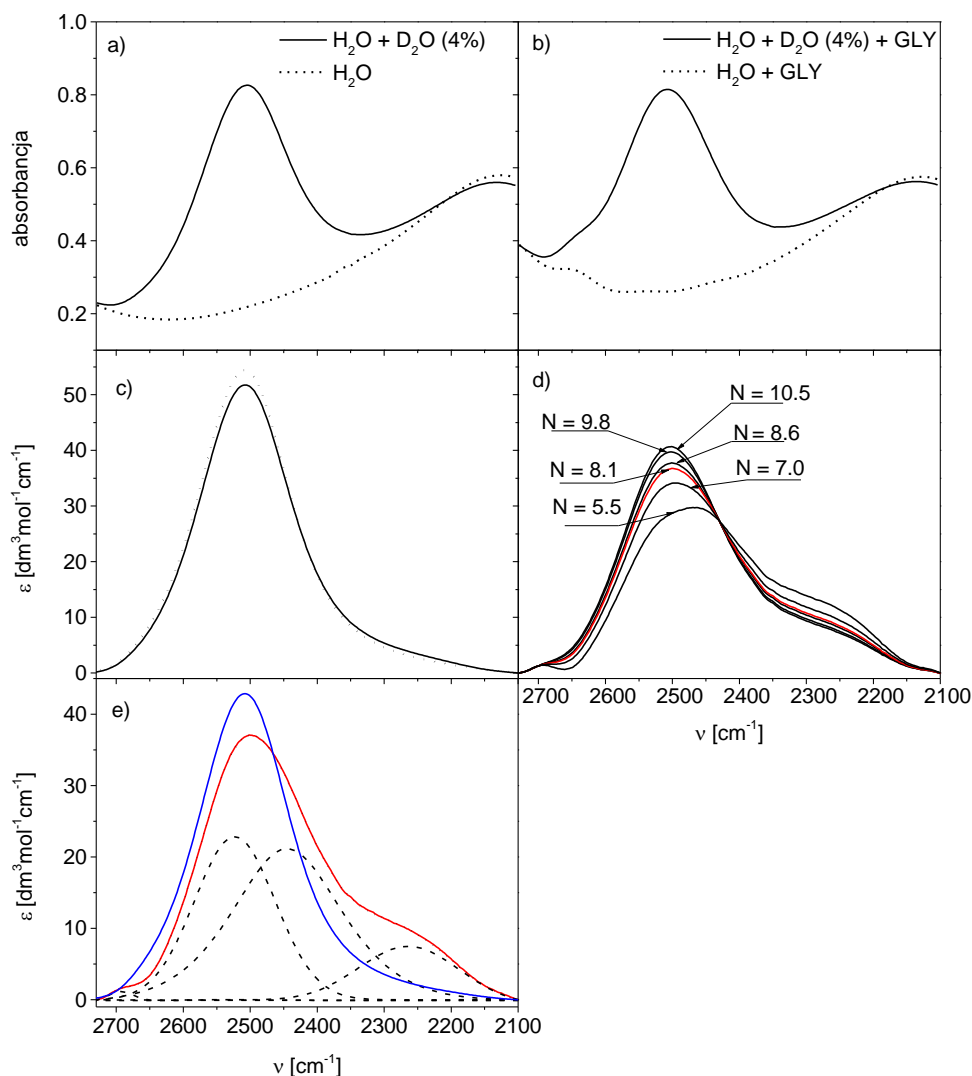
$$\varepsilon_a = \frac{1}{NMm} (\varepsilon - \varepsilon_b) + \varepsilon_b \quad (2)$$

gdzie ε jest zmierzonym widmem wody w roztworze (w skali molowego współczynnika absorpcji) przy molalności m [$\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$], M [$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$] jest średnią masą molową wody (masą molową wody zawierającej udziały masowe 96% wody zwykłej i 4% wody ciężkiej), V jest objętością roztworu zawierającego m moli substancji rozpuszczonej i jeden kilogram wody. Wyrażenie $(\varepsilon - \varepsilon_b) / m$ jest różnicą między widmem roztworu i wody czystej przeskalowanej względem molalności roztworu. N jest liczbą moli cząsteczek wody zaburzonej przez jeden mol substancji rozpuszczonej².

Procedurę wyznaczania widma wody zaburzonej zilustrowałem na Rys. 2, na podstawie roztworu glicyny (o molalności 0,9687 $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) w wodzie. Zmierzone widma H_2O i mieszaniny $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ pokazałem na Rys. 2a, podczas gdy widma $\text{H}_2\text{O} + \text{GLY}$ i odpowiadające im widma $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O} + \text{GLY}$ umieściłem na Rys. 2b. W celu otrzymania widm oscylacyjnych pasma ν_{OD} HDO w H_2O odjąłem od widm roztworów zawierających D_2O widma roztworów zawierających tylko H_2O , z uwzględnieniem stosunku stężeń H_2O w obu roztworach. Skalę absorpcji widma przeliczyłem na skalę molowego współczynnika absorpcji z uwzględnieniem stężenia molowego HDO w roztworze oraz grubości kuwety, wyznaczonej interferometrycznie. Otrzymałem

² Parametr N nie powinien być utożsamiany z liczbą hydratacyjną lub liczbą solwatacyjną otrzymywaną na podstawie symulacji metodą dynamiki molekularnej lub badań dyfrakcyjnych. Wartość N jest bliska liczbie hydratacyjnej tylko wtedy gdy widmo wody zaburzonej przez substancję rozpuszczoną różni się znacznie od widma wody czystej w jego położeniu lub kształcie konturu. W innym wypadku jego wartość jest mniejsza niż liczba hydratacyjna. Ma to miejsce szczególnie w przypadku wody zaburzonej w sferach hydratacyjnych cząsteczek hydrofobowych [298]. N jest liczbą moli cząsteczek wody różniących się spektralnie od wody czystej na skutek bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania z jednym molem substancji rozpuszczonej. Widmo wody zaburzonej zawiera w sobie informacje o stanie energetycznym i strukturalnym wody w formie „skondensowanej”. Skutkiem tego jest wysoka czułość stosowanej metody, pozwalająca na rozróżnienie różnych stanów cząsteczek wody w roztworze.

w ten sposób widmo czystej HDO (ϵ_b) oraz widmo HDO w roztworze zawierającym glicynę (ϵ) (Rys. 2c). Właściwe widmo wody zaburzonej (ϵ_a) znajdowałem w serii widm próbnych otrzymanych dla różnych wartości parametru N z użyciem równania (1), niektóre z nich pokazałem na Rys. 2d.



Rys. 2. Procedura wyznaczania pasma OD wody zaburzonej przez substancję rozpuszczoną (ϵ_a) na przykładzie GLY ($m_{\text{GLY}} = 0,9687 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$). a) zmierzone widmo H_2O i $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ (4% (wagowe) D_2O w H_2O), b) zmierzone widmo $\text{H}_2\text{O} + \text{GLY}$ i $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ (4%) + GLY, c) widmo czystej HDO (ϵ_b , linia kropkowana) i widmo HDO w roztworze zawierającym GLY (ϵ_b , linia ciągła) d) seria próbnych widm wody zaburzonej („prawdziwe” widmo wody zaburzonej zaznaczone jest na czerwono), e) pasmo OD wody zaburzonej przez substancję rozpuszczoną wraz z rozkładem na analityczne pasma składowe: linia przerywana oznacza pasma analityczne, linia kropkowana jest sumą pasm składowych, ciągła linia czerwona oznacza oryginalne widmo zaburzone; dla porównania, linią niebieską pokazano, pokazano kontur pasma wody czystej.

Widma próbne aproksymowałem za pomocą sumy analitycznych pasm składowych i linii bazowej. Używałem iloczynów funkcji Gaussa i Lorentza jako wyjściowych analitycznych konturów pasm do dalszej analizy. Parametry pasm analitycznych: kształt (stosunek funkcji Gaussa do funkcji Lorentza), intensywność, szerokość połówkowa

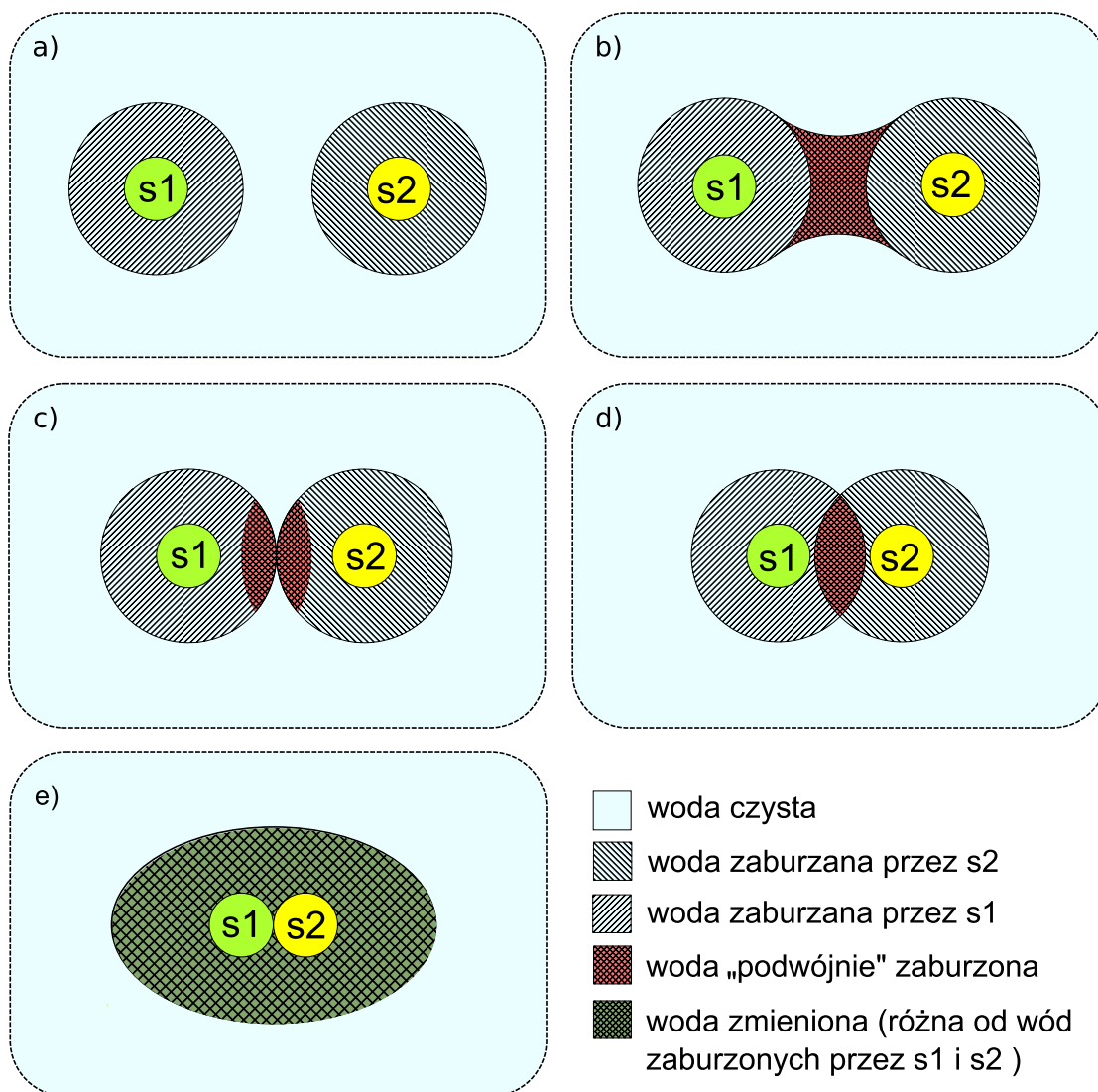
i położenie, mogły zmieniać się w trakcie analizy. Minimalna liczba pasm analitycznych, dająca odpowiedni stopień dopasowania, jest przyjmowana jako właściwa liczba pasm składowych. Następnie do rozkładu pasma próbnego, zawierającego analityczne pasma składowe, dodawałem zmierzone pasmo HDO wody czystej (pokazane na Rys. 2c). Taki układ składowych podlegał ponownemu dopasowaniu. W tym kroku, wszystkie parametry pasm analitycznych mogły się zmieniać, natomiast spośród parametrów pasma HDO wody czystej tylko wysokość tego pasma mogła ulegać zmianie. Przyjmowałem, że „prawdziwym” widmem wody zaburzonej jest pierwsze widmo w serii zawierające mniej niż 0,5% (pod względem powierzchni) udziału wody objętościowej. Pasma składowe traktowałem jako funkcje umożliwiające aproksymację kształtu pasma wody zaburzonej (Rys. 2e) lub próbnym pasm wody zaburzonej, bez przypisywania im sensu fizycznego.

4.5.2. Izolacja „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej

Widmo wody zaburzonej przez dwie substancje rozpuszczone w mieszaninie nazwałem „eksperymentalnym” widmem wody zaburzonej, ε_e . Wszystkie rodzaje wody zaburzonej przedstawiłem na (Rys. 3b-e). Uwzględniając, że całkowita molalność roztworu (m_e) jest równa sumie molalności s_1 i s_2 , tzn. $m_e = m_1 + m_2$, otrzymałem równanie (3) pozwalające na izolację „eksperymentalnego” widma wody zaburzonej, ε_e .

$$\varepsilon_e = \frac{1}{N_e M m_e} (\varepsilon - \varepsilon_b) + \varepsilon_b \quad (3)$$

gdzie: ε jest zmierzonym widmem wody w roztworze (w skali molowego współczynnika absorpcji) przy molalności m_e [$\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$], M [$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$] jest średnią masą molową wody, N_e jest liczbą cząsteczek wody zaburzonej, odpowiadającą liczbie moli wody zaburzonej przez sumę liczby moli substancji rozpuszczonych wynoszącą jeden ($n_1 + n_2 = 1 \text{ mol}$).



Rys. 3. Graniczne przypadki wzajemnych interakcji sfer hydracyjnych dwóch substancji rozpuszczonych w roztworze. a) sfery hydracyjne dwóch cząsteczek nie oddziałują ze sobą, b) obecność dwóch substancji wpływa na dodatkowe cząsteczki wody objętościowej, które mostkują te sfery hydracyjne c) roztwór w którym dwie sfery hydracyjne nie przenikają siebie, ale ich obecność wzajemnie wpływa na wodę w ich sferach hydracyjnych, d) nakładające się na siebie sfery hydracyjne dwóch substancji, e) dwie różne cząsteczki rozpuszczone oddziałują ze sobą i ich sfery hydracyjne ulegają modyfikacji w nową sferę. Izolacja udziału wody zaburzonej obecnością jednej substancji w roztworze.

4.5.3. Konstrukcja „syntetycznych” widm wody zaburzonej.

„Syntetyczne” widma wody zaburzonej (ϵ_s) są konstrukcją teoretyczną. Są one otrzymywane z wykorzystaniem widm wody zaburzonej przez każdą substancję rozpuszczoną z osobna, bez uwzględnienia ich interakcji. Zawierają one zatem udział widmowy wody zaburzonej z osobna przez $s1$ i $s2$, natomiast nie zawierają udziału wody zaburzonej przez obie substancje rozpuszczone, czyli wody „podwójnie” zaburzonej. Równanie (4) opisuje widmo takiej hipotetycznej wody zaburzonej.

$$\varepsilon_s = \frac{\varepsilon_{a_1} + N_2/N_1 \cdot \beta \cdot \varepsilon_{a_2}}{1 + N_2/N_1 \cdot \beta} \quad (4)$$

gdzie: β oznacza stosunek liczby moli s_2 do s_1 , ε_1 i ε_2 to odpowiednio widma wody zaburzonej w roztworze s_1 i s_2 , w których stężenia substancji rozpuszczonych odpowiadają stężeniom substancji rozpuszczonych w układach typu $s_1 + s_2 + \text{woda}$. N_1 i N_2 oznaczają odpowiednio liczbę moli wody zaburzonej przez s_1 i s_2 , w dwuskładnikowych roztworach typu $[s_1 + \text{woda}]$ i $[s_2 + \text{woda}]$. Widmu ε_s odpowiada parametr N_s , który jest liczbą cząsteczek wody zaburzonej, odpowiadającą liczbie moli wody zaburzonej przez sumę liczby moli substancji rozpuszczonych wynoszącą jeden ($n_1 + n_2 = 1$ mol). Wartość parametru N_s otrzymywałem na podstawie równania (5).

$$N_s = \frac{N_1 + \beta \cdot N_2}{\beta + 1} \quad (5)$$

4.5.4. Izolacja widm wody „podwójnie” zaburzonej

Widmo wody „podwójnie” zaburzonej otrzymuje się w wyniku odjęcia od „eksperymentalnego” widma wody zaburzonej odpowiadającego „syntetycznego” widma wody zaburzonej, zgodnie z równaniem (6):

$$\varepsilon_d = \frac{\varepsilon_e - k \cdot \varepsilon_s}{1 - k} \quad (6)$$

Parametr k charakteryzuje udział wody „podwójnie” zaburzonej w widmie „eksperymentalnej” wody zaburzonej. Jest zdefiniowany jako:

$$k = 1 - \frac{|N_d|}{N_s} \quad (7)$$

Sposób jego wyznaczania dla różnych wzajemnych interakcji cząsteczek substancji rozpuszczonych jest opisany w dalszej części rozdziału dotyczącego metodyki badawczej. Wyrażenie $\varepsilon_e - k \cdot \varepsilon_s$ w równaniu (6) opisuje udział spektralny wody „podwójnie” zaburzonej w widmie „eksperymentalnej” wody zaburzonej, zaś mianownik tego równania, $1 - k$, pozwala przeliczyć ten udział na jeden mol wody „podwójnie” zaburzonej.

W zależności od sytuacji, gdy liczba cząsteczek wody „podwójnie” zaburzonej jest większa od zera, mniejsza od zera lub równa zero, sposób wyodrębniania widm wody „podwójnie” zaburzonej się różni.

Na Rys. 3b przedstawiłem oddziaływanie sfer hydratacyjnych dwóch różnych substancji rozpuszczonych jako rezultat obecności nadmiarowych cząsteczek wody „podwójnie” zaburzonej (tzw. wody „mostkującej”). Cząsteczki wody tego rodzaju są



włączane w oddziaływania z wody objętościowej. Liczba cząsteczek „mostkującej” wody „podwójnie” zaburzonej może być wyrażona jako $N_d = N_e - N_s$. Widmo takiej wody otrzymywałem przez odjęcie „syntetycznego” widma wody zaburzonej od widma „eksperymentalnej” wody zaburzonej ze współczynnikiem k równym 1.

Przykład sytuacji, w której następuje nakładanie się sfer hydratacyjnych cząsteczek dwóch różnych substancji rozpuszczonych jest pokazany na Rys. 3d. W rezultacie, część cząsteczek wody jest uwalniana między sferami, podczas gdy inne są uwalniane do wody objętościowej. W tym przypadku wartość N_d jest ujemna. Oznacza to, że liczba zaburzonych cząsteczek wody w układzie „eksperymentalnym” jest mniejsza w porównaniu do odpowiadającego układu „syntetycznego”. Wtedy $|N_d|$ odzwierciedla liczbę moli cząsteczek wody współdzielonych między sferami hydratacyjnymi cząsteczek różnych substancji rozpuszczonych. Reszta cząsteczek wody to „syntetyczna” woda zaburzona. Ich udział spektralny musi być odjęty w celu wyizolowania widma wody „podwójnie” zaburzonej z użyciem równania (6).

Na Rys. 3c przedstawiłem przypadek oddziaływań dwóch różnych sfer hydratacyjnych, w którym nie występuje ich nakładanie. Cząsteczki wody w sferach hydratacyjnych substancji rozpuszczonych są wzajemnie zaburzane w wyniku ich bliskiej odległości. Jednak, ten rodzaj interakcji nie zmienia liczby cząsteczek wody zaburzonej. Rozróżnienie między tą a innymi sytuacjami jest możliwe na podstawie porównania „eksperymentalnych” (N_e) i „syntetycznych” (N_s) konturów widm wody zaburzonej. W tym przypadku „prawdziwe” widmo wody „podwójnie” zaburzonej znajdowałem w serii widm próbnych zbudowanych w oparciu o równanie (6) otrzymanych dla różnych wartości parametru k . W tych widmach sprawdzałem udział „syntetycznego” widma wody zaburzonej. W omawianej sytuacji, pierwsze widmo w serii zawierające mniej niż 0,5% udziału widmowego „syntetycznych” widm wody zaburzonej uznawałem za właściwe widmo wody „podwójnie” zaburzonej.

Możliwa jest również sytuacja, w której cząsteczki dwóch różnych substancji oddziałują bezpośrednio ze sobą (Rys. 3e). W efekcie tego rodzaju oddziaływania, sfery hydratacyjne tych substancji mogą przekształcić się w całkowicie nową sferę hydratacyjną, o innych właściwościach niż wyjściowe sfery. Powyższy opis dotyczy sytuacji, w której „eksperymentalne” widmo wody zaburzonej nie zawiera żadnego udziału spektralnego odpowiadającego „syntetycznym” widmom wody zaburzonej. W przypadku gdy cząsteczki dwóch różnych substancji oddziałują bezpośrednio ze sobą i udział spektralny „syntetycznej” wody zaburzonej jest znaczny, powinna zostać



zastosowana procedura przedstawiona dla przypadku, który zaprezentowałem na Rys. 3c.

Przedstawiona metoda analizy danych widmowych pozwoliła mi na znalezienie wpływu jednej substancji rozpuszczonej na sferę hydratacyjną drugiej substancji poprzez wyodrębnienie udziału widmowego wody znajdującej się pod wpływem obu substancji jednocześnie. Odróżnia to opracowaną tutaj metodę analizy danych widmowych od metod przedstawionych dotychczas w literaturze. W pracach innych autorów otrzymywane są zwykle informacje o pojedynczym wpływie substancji rozpuszczonych na wodę w roztworze, co może dawać nieprawdziwy obraz wpływu osmotów na sfery hydratacyjne biomakrocząsteczek. Dzieje się tak, dlatego że niewielki dodatek substancji rozpuszczonej może zmienić w znaczny sposób ogólny obraz hydratacji w roztworze, jednak niekoniecznie zmienia się wtedy hydratacja cząsteczki centralnej. Obie substancje w roztworze mogą zachowywać się całkowicie niezależnie w roztworze. Interakcje między dwiema substancjami i ich sferami hydratacyjnymi muszą więc być zbadane za każdym razem po to, żeby móc wyciągać wnioski o wzajemnych oddziaływaniach sfer hydratacyjnych dwóch substancji.

4.5.5. Ilustracja metody izolacji widm wody zaburzonej w układach zawierających dwie substancje rozpuszczone

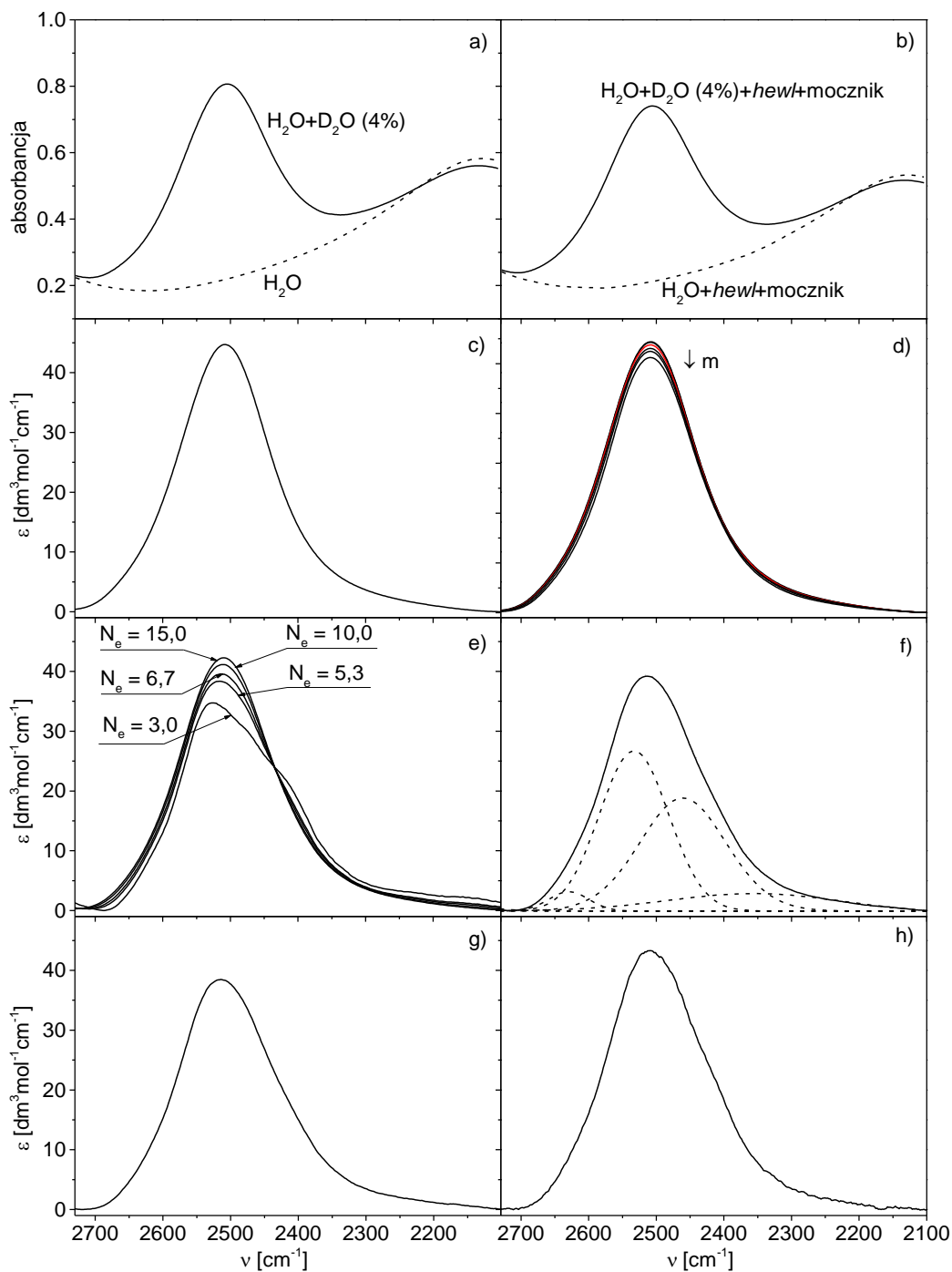
Procedurę otrzymywania widm wody „podwójnie” zaburzonej zilustrowałem na Rys. 4 na przykładzie układu lizozym + mocznik. W pierwszym kroku zmierzyłem widmo H_2O czystej i mieszaniny $H_2O + D_2O$, w której masa D_2O stanowi 4% całkowitej masy wody w próbce (Rys. 4a). Otrzymałem też widma roztworów zawierających substancje rozpuszczone o odpowiednich molalnościach (Rys. 4b) – widmo $H_2O +$ lizozym + mocznik oraz odpowiadające im widma $H_2O + D_2O +$ lizozym + mocznik. W celu otrzymania widm oscylacyjnych pasm ν_{OD} HDO w H_2O , od widm roztworów zawierających D_2O odjąłem widma roztworów zawierających tylko H_2O , z uwzględnieniem stosunku stężeń H_2O w obu roztworach. Skalę absorpcji widm przeliczyłem na skalę molowego współczynnika absorpcji z uwzględnieniem stężenia molowego HDO w roztworze oraz grubości kuwety wyznaczonej interferometrycznie. Wyizolowałem w ten sposób widmo HDO wody czystej (Rys. 4c) oraz serię HDO roztworów lizozym + mocznik o zmiennej molalności mocznika (w granicach 0 – 6,24 mol·kg⁻¹) i stałym stężeniu lizozymu ($m = 0,00779$ mol·kg⁻¹) (Rys. 4d). Wykorzystując prawą stronę równania (3) uzyskałem serię widm próbnych dla różnych



wartości parametru N_e dla wybranej wartości molalności osmolytu (Rys. 4e). Próbne widma różnicowe rozkładałem, z wykorzystaniem oprogramowania komputerowego, na jak najmniejszą liczbę analitycznych pasm składowych, których suma dawała kontur adekwatnie zbliżony do badanego próbnego widma różnicowego. Jako pasma składowe wykorzystywałem funkcje będące iloczynem krzywych Gaussa i Lorentza. Do otrzymanego rozkładu widma dodawałem eksperymentalne pasmo wody czystej o dobieralnej w procesie aproksymacji wysokości i sprawdzałem jego udział widmie. Pozwoliło mi to na znalezienie widma wody zaburzonej o maksymalnej wartości parametru N_e , które było pozbawione udziału wody czystej, Rys. 4f, (w praktyce uznawałem za właściwe to widmo, w którym udział powierzchni pasma wody czystej nie przekraczał 0,5%). W ten sposób otrzymywałem dla danego układu serie „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej.

W następnym etapie analizy wyodrębniałem widmo wody „podwójnie” zaburzonej z „eksperymentalnego” widma wody zaburzonej. W tej operacji wykorzystałem „syntetyczne” widmo wody zaburzonej, ε_s (Rys. 4g), skonstruowane za pomocą równania (4). Widmo to usuwałem z konturu „eksperymentalnej” wody zaburzonej z użyciem równania (6). W ten sposób otrzymywałem widmo wody „podwójnie” zaburzonej (Rys. 4h).

Parametry pasm otrzymane dla „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej, wody zaburzonej przez osmolyty wraz z parametrami pasma wody czystej, „syntetycznych” widm wody zaburzonej oraz widm wody „podwójnie” zaburzonej zestawilem w materiałach uzupełniających w Tabelach S2-5.



Rys. 4. Procedura wyznaczania pasma OD wody „podwójnie” zaburzonej przez obecność substancji rozpuszczonych w roztworze, na przykładzie układu lizozym + mocznik. a) zmierzone widmo H_2O oraz widmo roztworu $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ (dodatek D_2O w roztworze wynosi 4% wagowe w stosunku do H_2O), b) zmierzone widmo $\text{H}_2\text{O} + \text{lizozym} + \text{mocznik}$ oraz widmo roztworu $\text{H}_2\text{O} + \text{D}_2\text{O}$ (4%) + lizozym + mocznik, c) widmo HDO wody czystej, d) seria stężeniowa widm HDO w układzie lizozym + mocznik (czerwona linia oznacza widmo odpowiadające $m_{\text{lizozym}} \approx 0,00779 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $m_{\text{mocznik}} \approx 1,01 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), e) próbne ważone widma różnicowe wody „eksperymentalnej” ($m_{\text{lizozym}} \approx 0,00779 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $m_{\text{mocznik}} \approx 1,01 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), f) pasmo OD wody zaburzonej przez substancję rozpuszczoną w układzie lizozym + mocznik ($N_e = 6,7$) wraz z rozkładem na analityczne pasma składowe: linia ciągła oznacza oryginalne widmo zaburzone; linia kropkowana – sumę pasm składowych (częściowo przysłonięta przez oryginalne widmo), linie przerywane – pasma składowe, g) „syntetyczne” widmo wody zaburzonej skonstruowane na podstawie widmo wody zaburzonej przez lizozym ($m_{\text{lizozym}} \approx 0,00779 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) oraz widma wody zaburzonej przez mocznik ($m_{\text{mocznik}} \approx 1,01 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$), h) widmo wody „podwójnie” zaburzonej.

4.6. Analiza liczby cząsteczek wody „podwójnie” zaburzonej

Celem analizy liczby cząsteczek wody „podwójnie” zaburzonej, liczby N_e i N_s odpowiadającej „eksperymentalnym” i „syntetycznym” widmom wody zaburzonej przekształciłem w funkcję N_p zgodnie z równaniami (8) i (9).

$$N_{p(e)} = N_e \cdot (\beta + 1) \quad (8)$$

$$N_{p(s)} = N_s \cdot (\beta + 1) \quad (9)$$

Powyższe funkcje pozwalają na zobrazowanie wpływu oddziaływań dwóch różnych substancji rozpuszczonych na liczbę cząsteczek zaburzonych w zestawie złożonym z jednego mola cząsteczek modelowych/biomakrocząsteczek i β (stosunek liczby moli osmolitu do liczby moli cząsteczek modelowych/biomakrocząsteczek) moli osmolitu. Ich użycie pozwala na śledzenie nakładania się sfer hydratacyjnych substancji rozpuszczonych lub pojawienie się dodatkowych cząsteczek wody zaburzonej w układzie (wody „mostkującej”) w stosunku do „syntetycznych” widm wody zaburzonej w funkcji stężenia. Na podstawie badań z wykorzystaniem metody widm różnicowych ustalono, że błąd metody wynosi około 5% w zakresie wyznaczenia wartości liczby cząsteczek zaburzonych. Wartość ta została oszacowana na podstawie analiz przeprowadzonych dla różnych układów. Wykorzystane zostały przy tym różne warunki początkowe rozkładu pasm, różniące się liczbami pasm analitycznych oraz ich parametrami początkowymi (położeniem, kształtem i wysokością). Wartość ta przekłada się na błąd wartości parametru N wynoszący 0,5 dla $N < 10$. Słupki błędów widoczne na rysunkach zawierających wartości N_p są efektem dodawania błędów wyznaczania liczby moli wody zaburzonej przez zestaw składający się z jednego mola cząsteczek modelowych/biomakromolekuł i β moli osmolitu.

4.7. Interpretacja danych widmowych

Kontur widmowy wody niesie w sobie informacje o stanie energetycznym i strukturalnym wody.

Informację o stanie energetycznym wiązań wodorowych uzyskałem na podstawie eksperymentalnej reguły Badgera-Bauera [299], zgodnie z którą energia wiązań wodorowych wody zmienia się proporcjonalnie z przesunięciem położenia pasm OD (OH). Przesunięcie położenia pasm OD lub OH w kierunku wyższych/niższych liczb falowych wskazuje na osłabienie/zwiększenie energii wiązań wodorowych wody. Wartość położenia środka ciężkości pasma OD, ν^s , jest miarą średniej energii wiązań



wodorowych, podczas gdy wartość położenia maksimum pasma, ν^o , jest miarą energii najbardziej prawdopodobnej.

Informację o strukturalnym stanie wiązań wodorowych otrzymałem w wyniku transformacji konturów pasm HDO na funkcję rozkładu odległości tlen-tlen między cząsteczkami wody. Rozkład ten uwzględnia też oddziaływania atomu tlenu cząsteczki HDO z atomem azotu grupy aminowej oraz z karbonylowym lub karboksylowym atomem tlenu. W tej procedurze wykorzystałem empiryczną funkcję (10) wyznaczoną przez Berglunda i współautorów [301], z użyciem spektroskopii w podczerwieni, na podstawie badań położenia pasm izotopowo rozcieńczonej HDO w stałych hydratách oraz z użyciem dyfrakcji neutronowej. Posłużyła do wyznaczenia odpowiadających odległości tlen-tlen między cząsteczkami wody, R_{OO} . Wiarygodność zależności ν_{OD} i R_{OO} została potwierdzona badaniami teoretycznymi na podstawie pasm OD (HDO) uzyskanych za pomocą spektroskopii czasowo-rozdzielczej w podczerwieni [302].

$$\begin{aligned} \nu_{OD} [\text{cm}^{-1}] &\rightarrow R_{OO} (\text{\AA}) \\ \nu_{OD} &= 2727 - 8,97 \cdot 10^6 \cdot e^{-3,73 \cdot R_{OO}} \end{aligned} \quad (10)$$

gdzie: 2727 cm^{-1} - eksperymentalna wartość położenia pasma OD HDO w fazie gazowej. Biorąc pod uwagę, że $\ln(8,97 \cdot 10^6) = 16,01$, po przekształceniu funkcja

(10) może być przedstawiona w postaci (11), którą używałem.

$$\nu_{OD} = 2727 - e^{16,01 - 3,73 \cdot R_{OO}} \quad (11)$$

Powyzsza korelacja pozwala na znalezienie funkcji rozkładu odległości tlen-tlen, $P(R_{OO})$, pomiędzy cząsteczkami wody tworzącymi wiązania wodorowe [298] na podstawie równań [303]:

$$P(R_{OO}) = C \varepsilon_{OD}(\nu_{OD}) \frac{d\nu_{OD}}{dR_{OO}} \quad (12)$$

$$\int_0^{\infty} P(R_{OO}) dR_{OO} = 1 \quad (13)$$

gdzie: C – stała, która normalizuje pole pod rozkładem prawdopodobieństwo odległości tlen-tlen do 1, ε_{OD} – absorbanca przy liczbie falowej ν_{OD} .

Położenie środka ciężkości funkcji, R_{OO}^g , jest miarą średniej odległości między cząsteczkami wody, podczas gdy położenie maksimum tej funkcji, R_{OO}^o , jest miarą odległości najbardziej prawdopodobnej między cząsteczkami wody.

Moimi kryteriami do oszacowania wzmacniającego lub osłabiającego wpływu osmолitu na wiązania wodorowe wody zaburzonej przez cząsteczkę



modelową/biomakrocząsteczkę lub wody czystej są: średnia energia wiązań wodorowych wody oraz średnia odległość tlen-tlen między cząsteczkami wody.

5. WYNIKI BADAŃ

5.1. Wpływ osmolitu stabilizującego i destabilizującego na sfery hydratacyjne cząsteczek modelujących stan natywny białka [135]

W tym rozdziale przedstawiłem wyniki badań nad wpływem osmolitu stabilizującego – betainy lub osmolitu destabilizującego – mocznika na sfery hydratacyjne cząsteczek modelowych względem białka w stanie natywnym: *N*-metyloacetamidu (NMA) lub dimetylsulfotlenku (DMSO).

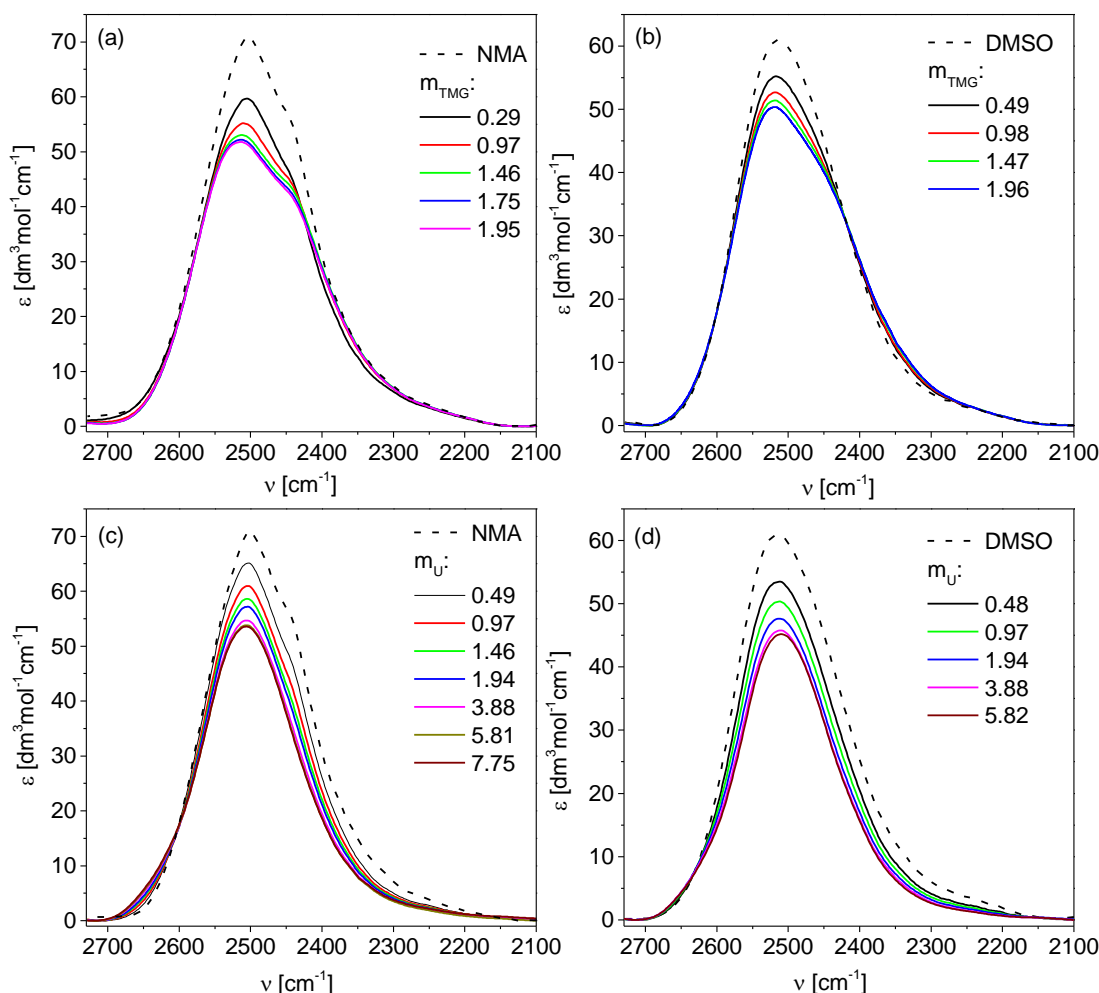
5.1.1. Analiza danych widmowych

Cząsteczki NMA oraz DMSO cechują się bliskim położeniem grup hydrofobowej i hydrofilowej w swojej budowie. W rezultacie są dobrym modelem do badania hydratacji białek charakteryzujących się mieszanym typem hydratacji hydrofilowo-hydrofobowej. W badaniach grupy badawczej, której byłem członkiem pokazaliśmy, że blisko zlokalizowane grupy hydrofilowa i hydrofobowa cząsteczki wspomagają tworzenie rozległej klatratopodobnej struktury sieci wiązań wodorowych wokół tej cząsteczki [23,24]. Wyniki te znalazły potwierdzenie w symulacjach metodą dynamiki molekularnej [304,305]. Ponadto kształt konturu widma wody zaburzonej przez lizozym w znacznej mierze jest podobny do konturu widma NMA [22]. Obserwowane wzmocnienie wiązań wodorowych wody zarówno w przypadku NMA jak i DMSO jest możliwe, ponieważ oddziaływania wody z grupami polarnymi są silniejsze niż wiązania wodorowe między cząsteczkami wody w wodzie czystej. Istnienie wzmocnionej sieci wiązań wodorowych jest wspomagane przez kooperatywność wiązań wodorowych cząsteczek wody oddziałujących z grupami polarnymi i cząsteczek wody zlokalizowanych przy powierzchni hydrofobowej modeli. Skutkuje ona zakotwiczeniem na grupach hydrofilowych wzmocnionej sieci wiązań wodorowych wody i jej dynamicznej stabilizacji przy powierzchni grup niepolarnych [22,24].

Analizę widm w układach NMA + betaina, NMA + mocznik, DMSO + betaina, DMSO + mocznik, wykonałem zgodnie z metodą przedstawioną w rozdziale 4.5. Doprowadziła ona do izolacji „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej, które przedstawiłem dla każdego z układów na Rys. 5. Jednocześnie otrzymałem



„eksperymentalne” liczby cząsteczek wody zaburzonej, N_e , w funkcji stężenia osmolitu. Dla każdego z układów skonstruowałem „syntetyczne” widma wody zaburzonej (Rys. S1 w materiałach uzupełniających) i obliczyłem „syntetyczne” liczby cząsteczek wody zaburzonej, N_s . Parametry N_e i odpowiadające im parametry N_s transformowałem na funkcje $N_{p(e)}$ i $N_{p(s)}$ (Rys. 6) zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.6.

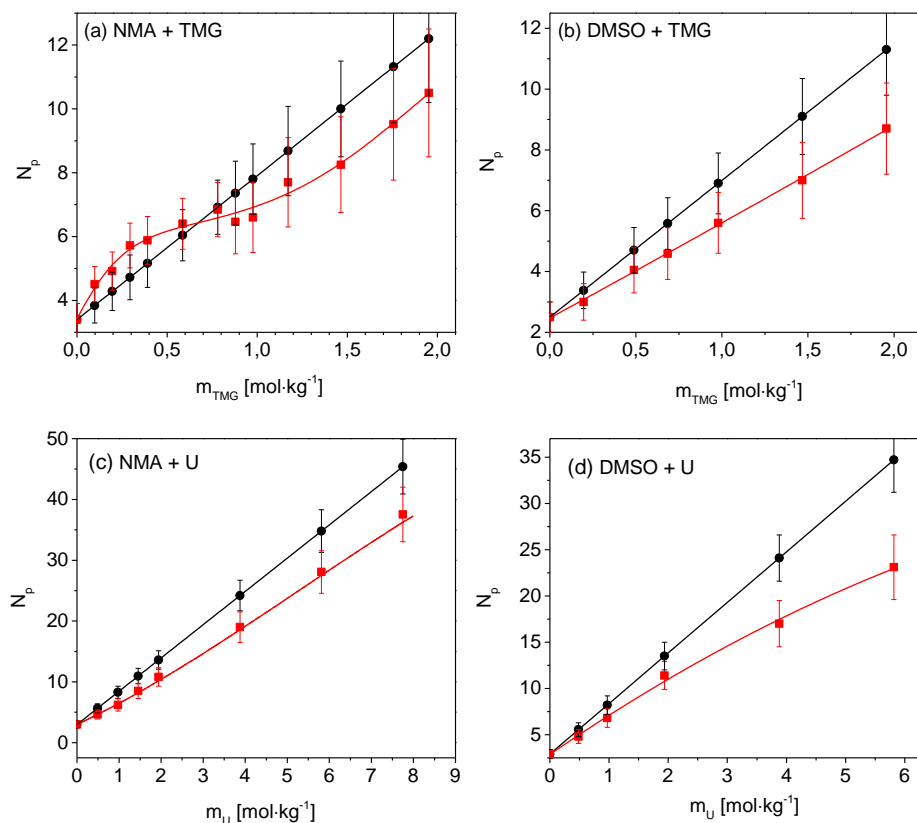


Rys. 5. „Eksperymentalne” widma wody zaburzonej w układach (a) NMA + betaina (b) DMSO + betaina, (c) NMA + mocznik oraz (d) DMSO + mocznik. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik. Przerwaną linią zaznaczono widma wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe.

W układzie NMA + betaina (Rys. 6a) miały miejsce dwa efekty, w zależności od molalności osmolitu w roztworze. Przy stężeniu betainy mniejszym niż $0,6 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$, „eksperymentalne” liczby cząsteczek wody zaburzonej były większe w porównaniu do „syntetycznych” liczb wody zaburzonej. Oznaczało to występowanie dodatkowych cząsteczek wody, tzw. „mostkujących”, pochodzących z wody objętościowej (rozdział 4.5). Ich stan energetyczny był bardzo podobny do wody czystej. Natomiast przy wyższych stężeniach betainy, następowała redukcja liczby cząsteczek wody



w „eksperymentalnych” widmach wody zaburzonej w stosunku do „syntetycznych” widm wody zaburzonej, na skutek nakładania się sfer hydratacyjnych cząsteczek NMA i betainy. Prowadziło to do uwolnienia części cząsteczek wody do wody objętościowej. W pozostałych układach (Rys. 6b-d: DMSO + betaina, NMA + mocznik oraz DMSO + mocznik) obserwowane było zmniejszenie „eksperymentalnych” liczb cząsteczek wody zaburzonej w porównaniu do „syntetycznych” liczb cząsteczek wody zaburzonej w całym zakresie stężeń użytych osmolitów.

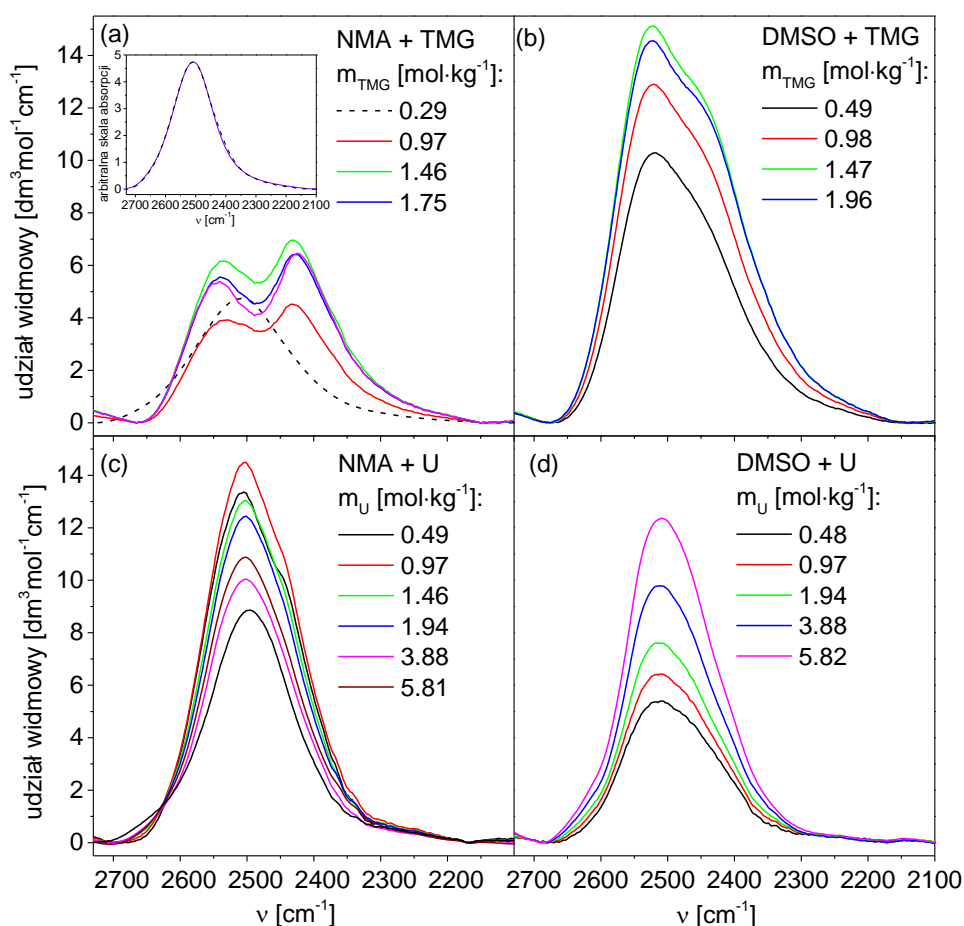


Rys. 6. Liczby cząsteczek wody zaburzonej (równania (8) i (9)) w funkcji molalności osmolitu przypadające na pakiet złożony z jednej cząsteczki modelowej oraz β cząsteczek osmolitu w układach: (a) NMA + betaina, (b) DMSO + betaina, (c) NMA + mocznik oraz (d) DMSO + mocznik. Czarna linia odpowiada zależnościom otrzymanym dla „syntetycznych” widm wody zaburzonej, natomiast czerwona linia odpowiada zależnościom odpowiadającym „eksperymentalnym” widmom wody zaburzonej. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik.

Dalsze informacje o hydratacji cząsteczek modelowych pochodziły z analizy widm wody „podwójnie” zaburzonej otrzymanych zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.5.4. Pozwalały one na scharakteryzowanie stanu energetycznego i strukturalnego wody będącej pod równoczesnym wpływem dwóch substancji rozpuszczonych. Widma wody „podwójnie” zaburzonej dla wszystkich układów zaprezentowałem na Rys. 7. Analizując kontury widm wody „podwójnie” zaburzonej w układzie NMA + betaina można zauważyć, że pasmo przedstawione na Rys. 7a,



odpowiadające wodzie „mostkującej” w układzie NMA + betaina ($m_{\text{betaina}} = 0,29 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) przypomina kształtem widmo wody czystej (wstawka na Rys. 7a). Natomiast widma wody „podwójnie” zaburzonej otrzymane dla wyższych stężeń osmolitu mają dwa maksima: pierwsze położone przy 2420 cm^{-1} odpowiada silnym wiązanom wodorowym wody, natomiast drugie położone przy 2560 cm^{-1} odpowiada słabym wiązanom wodorowym między cząsteczkami wody.



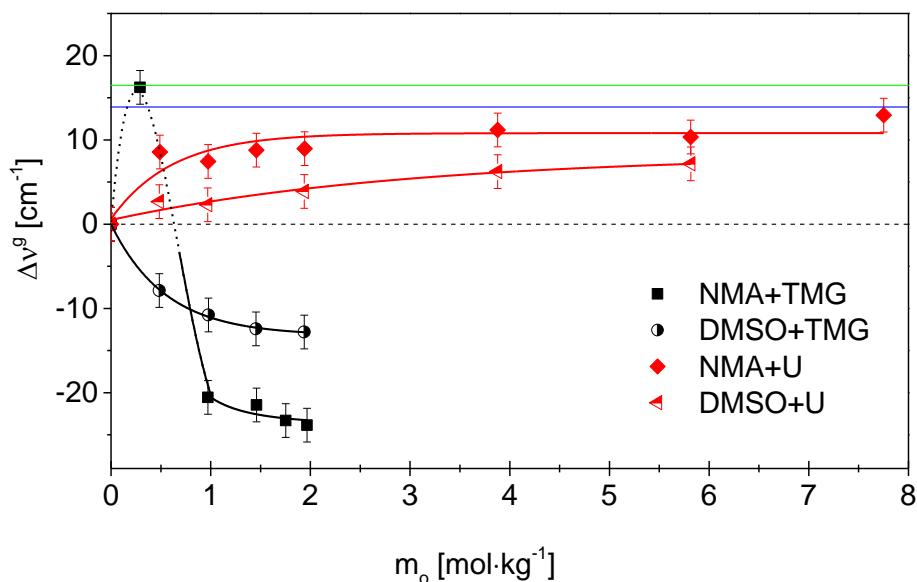
Rys. 7. Udziały widmowe wody „podwójnie” zaburzonej w układach (a) NMA + betaina (we wstawce znajdują się nałożone widmo wody czystej (fioletowy kolor) i widmo wody „mostkującej” (linia przerywana, $m_{\text{TMG}}=0,29$), (b) DMSO + betaina, (c) NMA + mocznik oraz (d) DMSO + mocznik. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik. Przerywana linia oznacza widmo „mostkującej” wody „podwójnie” zaburzonej.

W celu porównania wpływu obu osmolitów na energię wiązań wodorowych w sferach hydratacyjnych cząsteczek modelowych, na Rys. 8 przedstawiłem różnice między wartościami położenia środków ciężkości pasm wody „podwójnie” zaburzonej i wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe, $\Delta\nu^s$, w funkcji molalności osmolitu. Ujemne wartości $\Delta\nu^s$ oznaczają, że średnia energia wiązań wodorowych między cząsteczkami wody w wodzie „podwójnie” zaburzonej jest większa od średniej energii wiązań wodorowych wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe, natomiast dodatnie

wartości Δv^g wskazują na osłabienie wiązań wodorowych wody „podwójnie” zaburzonej w stosunku do wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe.

Na podstawie zależności pokazanych na Rys. 8 można zauważyć, że obecność betainy powoduje wzmocnienie sfery hydratacyjnej DMSO w całym zakresie molalności (ujemne wartości Δv^g). Betaina wywierała inny wpływ na otoczkę hydratacyjną NMA w zależności od jej molalności w roztworze. Woda „mostkująca” między NMA i betainą przy molalności betainy wynoszącej $0,29 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ była osłabiona (dodatnie wartości Δv^g) w stosunku do wody hydratacyjnej NMA, natomiast przy wyższych molalnościach betaina wzmacniała wodę hydratacyjną NMA. Z kolei mocznik powodował, w całym zakresie jego molalności, osłabienie wody w sferach hydratacyjnych obu modeli (dodatnie wartości Δv^g).

W układzie NMA + betaina, woda „mostkująca” oraz woda „podwójnie” zaburzona dla każdej molalności osmolitu jest wzmocniona w stosunku do wody czystej. W pozostałych układach (zawierających betainę lub mocznik) też jest obserwowane wzmocnienie wody w sferach hydratacyjnych modeli przy każdym ze stężeń osmolitu.

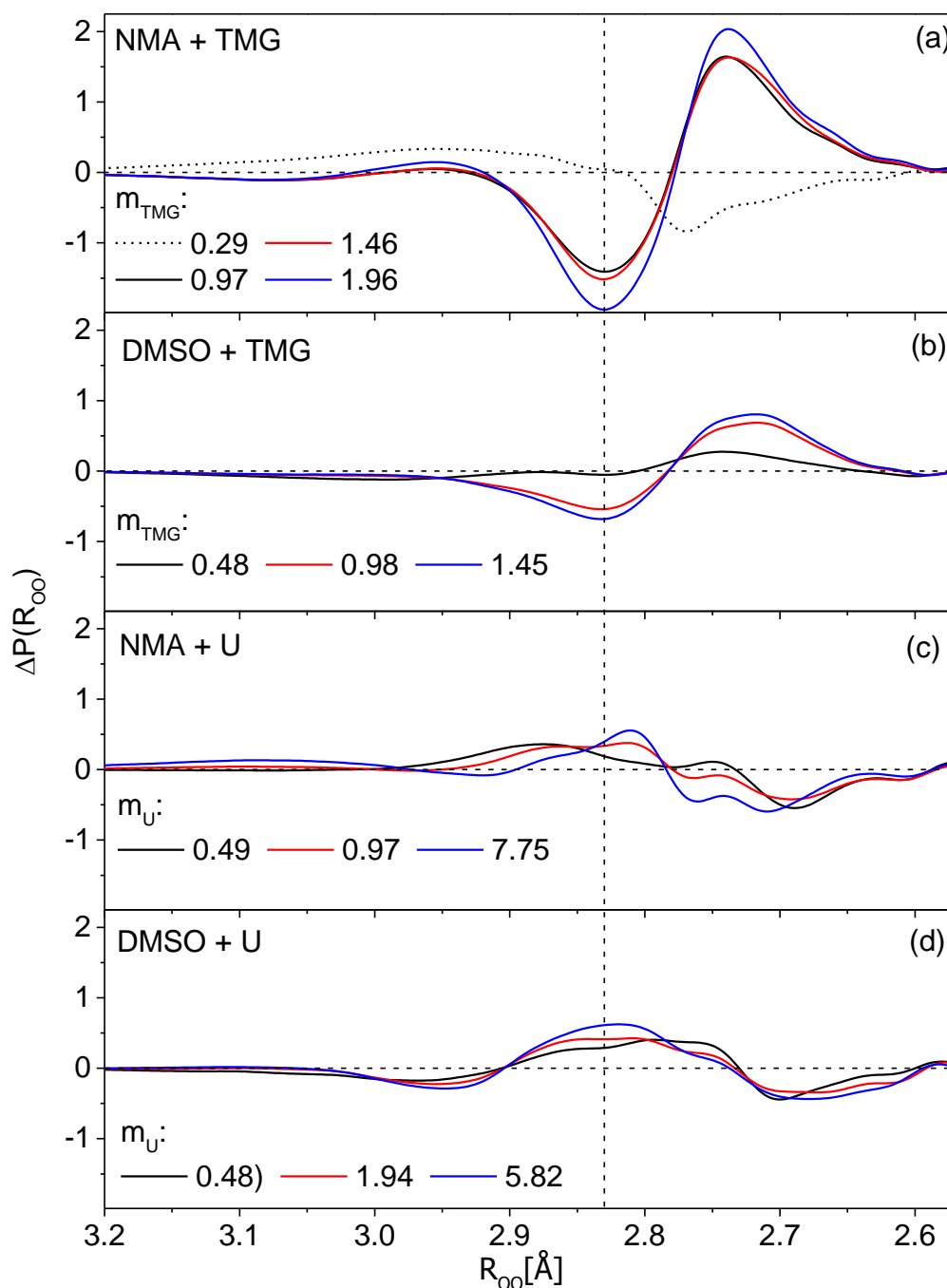


Rys. 8. Różnice między wartościami położenia środków ciężkości pasm (jako miara średniej energii wiązań wodorowych między cząsteczkami wody) wody „podwójnie” zaburzonej (Δv^p) i wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe (Δv^m), $\Delta v^g = v^p - v^m$, w funkcji molalności osmolitu (m_o). Linia przerywana oznacza zakres występowania wody nadmiarowej, linia ciągła – obszar występowania wody „podwójnie” zaburzonej. Czerwoną linią zaznaczono układy zawierające mocznik (U), czarną linią – układy zawierające betainę (TMG). Zielona linia oznacza różnice między wartościami położenia środków ciężkości pasma wody czystej i wody zaburzonej przez NMA, natomiast niebieska linia oznacza różnicę wartości położenia środków ciężkości pasma wody czystej i wody zaburzonej przez DMSO.

Stan strukturalny wody hydratacyjnej cząsteczek modelowych może być scharakteryzowany funkcjami rozkładu międzycząsteczkowych odległości $O\cdots O$, $P(R_{OO})$. W tym celu kontury pasma widma wody „podwójnie” zaburzonej transformowałem na funkcje $P(R_{OO})_{podwójna}^{m+o}$, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.7. Następnie, analogiczne funkcje rozkładu odległości uzyskane dla wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe, $P(R_{OO})_{model}^m$, odjąłem od funkcji rozkładu odległości uzyskanych dla wody „podwójnie” zaburzonej. W ten sposób otrzymałem różnice funkcji rozkładu odległości $O\cdots O$ między cząsteczkami wody, $\Delta P(R_{OO})$ (Rys. 9). Operacja ta pozwoliła mi na określenie wpływu osmolitów na długość wiązań wodorowych w sferach hydratacyjnych NMA i DMSO. Na podstawie Rys. 9a można zauważyć, że betaina zwiększała populację cząsteczek wody silnie związanych wiązaniami wodorowymi (2,74 Å) przy molalnościach osmolitu 0,97; 1,46; 1,96 mol·kg⁻¹ oraz zmniejszała populację cząsteczek wody odpowiadających najbardziej prawdopodobnej odległości $O\cdots O$ w wodzie czystej względem sfery hydratacyjnej NMA. Przebieg $\Delta P(R_{OO})$ dla wody „mostkującej”, zaznaczonej na Rys. 9a linią przerywaną, wskazuje na jej osłabienie w stosunku do wody hydratacyjnej NMA. W tym przypadku widoczne jest zmniejszenie populacji oddziaływań silnych (około 2,75 Å) i zwiększenie prawdopodobieństwa występowania oddziaływań słabych, dłuższych niż 2,85 Å. Wpływ betainy na sferę hydratacyjną DMSO był podobny do wywieranego przez nią przy wyższych molalnościach na sfery hydratacyjne NMA. Obecność betainy przyczyniała się do zwiększenia populacji silnych wiązań wodorowych między cząsteczkami wody. Wpływ mocznika był znacznie różny od wpływu betainy na sfery hydratacyjne cząsteczek modelowych, ale podobny względem obu modeli. W obecności mocznika zmniejszała się populacja silnych wiązań wodorowych wody (o odległościach między cząsteczkami wody wynoszących 2,67 – 2,70 Å) w sferach hydratacyjnych NMA i DMSO. Równocześnie zwiększała się populacja średnich i słabych wiązań wodorowych (o odległościach równych i nieznacznie dłuższych niż najbardziej prawdopodobna odległość dla wody czystej). W rezultacie mocznik powodował zastąpienie silnych wiązań wodorowych w sferach hydratacyjnych cząsteczek modelowych wiązaniami zbliżonymi do tych występujących w wodzie czystej. Efekt taki może być nazwany „rozpuszczaniem” sfer hydratacyjnych cząsteczek modelowych. Można zauważyć, że wpływ mocznika był znacząco różny od



wpływu betainy na sferę hydratacyjną cząsteczek modelowych, ale podobny względem obu cząsteczek modelowych.



Rys. 9. Różnice między funkcjami rozkładu odległości O...O między cząsteczkami wody $\Delta P(R_{OO})$, $\Delta P(R_{OO}) = P(R_{OO})_{podwójna}^{m+o} - P(R_{OO})_{model}^m$, gdzie $m+o$ oznacza wodny roztwór cząsteczki modelowej (m) i osmolitu (o), w funkcji molalności osmolitu [$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$] w układach: (a) NMA + betaina, (b) DMSO + betaina, (c) NMA + mocznik i (d) DMSO + mocznik. Pionową linią przerywaną zaznaczono najbardziej prawdopodobną odległość O...O między cząsteczkami wody w wodzie czystej.

5.1.2. *Analiza wyników teoretycznych*

Wyniki przedstawione w niniejszym rozdziale zostały uzyskane przez dr Anetę Panuszko, dr. hab. inż. Piotra Bruździaka, dr. hab. inż. Macieja Śmiechowskiego oraz Pawła Maszotę. Zostały one opublikowane we wspólnej pracy [135] z moim udziałem. Są one bardzo istotne w interpretacji danych widmowych, dlatego też zamieściłem je w tym rozdziale. Szczegóły obliczeń DFT i AIMD zostały opisane w publikacji [135].

Obliczenia DFT

Wyniki wykazały, że cząsteczka mocznika (Rys. S2 i Rys. S3) wpasowywała się w sferę hydratacyjną NMA antyrównolegle względem momentu dipolowego cząsteczki modelowej i jednocześnie wypierała cząsteczki wody zlokalizowane w pobliżu płaskiej cząsteczki NMA. Wyjaśnia to, stwierdzone na podstawie obliczeń za pomocą metodą AIMD, zmniejszenie liczby oddziaływań między cząsteczkami wody w otoczeniu cząsteczki NMA. W to miejsce powstały oddziaływania między NMA i mocznikiem, które są widoczne pod postacią dużej oliwkowej łąty (Rys. S2) na wizualizacji uzyskanej metodą zredukowanego gradientu gęstość (RDG).

W układzie DMSO + mocznik występowały nieklasyczne, bezpośrednie, oddziaływania DMSO i mocznika. Realizowane one były przez wolne pary dwóch atomów azotu w cząsteczce mocznika, które były akceptorami dla protonów metylowych DMSO. Efektem były słabe, ale dobrze zdefiniowane oddziaływania typu wiązań wodorowych $\text{CH}\cdots\text{N}$ (Rys. S4). Porównanie odległości $\text{O}\cdots\text{O}$ obliczonych kompleksów z mocznikiem oraz bez niego (Rys. S5) pozwala na stwierdzenie, że obecność mocznika zmniejsza liczbę oddziaływań o małej długości, podczas gdy liczba średnich długości wzrasta. Wyniki te są w swojej istocie podobne do tych otrzymanych na podstawie spektroskopii.

Symulacje AIMD

Główną zaobserwowaną różnicą między betainą i mocznikiem było zwiększone prawdopodobieństwo występowania bezpośrednich oddziaływań tego ostatniego z NMA, które jest widoczne na podstawie analizy funkcji rozkładu radialnego (RDF, Rys. S6) między środkami ciężkości cząsteczek NMA i osmolitów. Istniały natomiast przesłanki aby stwierdzić, że betaina może oddziaływać z NMA pośrednio, poprzez wzmocnienie jego sfery hydratacyjnej. Do takich wniosków



doprowadziła pełnoatomowa (*all-atom*) analiza RDF, która łączyła w sobie wszystkie możliwe oddziaływania. Atomy cząsteczki mocznika lokalizowały się bliżej NMA niż atomy cząsteczki betainy. Spośród wszystkich możliwych odległości par atomowych między cząsteczkami NMA i osmolitu, najmniejszymi odległościami były między atomami węgla grupy metylowej połączonej z grupą aminową NMA i atomu tlenu mocznika, $(\text{NMA})\text{C}\cdots\text{O}(\text{mocznik})$, oraz atomem wodoru tej samej grupy z atomem tlenu mocznika, $(\text{NMA})\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}(\text{mocznik})$.

Przeprowadzono analizę funkcji przestrzennego rozkładu (*spatial distribution functions*, SDFs) atomów tlenu cząsteczek wody wokół cząsteczki NMA dla układów NMA + betaina i NMA + mocznik (Rys. S7). Stwierdzono zwiększenie prawdopodobieństwa występowania cząsteczek wody w pobliżu atomów węgla grupy metylowej połączonej z grupą karbonylową NMA i atomem tlenu NMA. W układzie NMA + mocznik widoczne było natomiast załamanie kooperatywności oddziaływań cząsteczek wody, które oddziałują z grupą hydrofilową oraz tych zlokalizowanych w pobliżu grupy metylowej, w budowaniu wzmocnionej sfery hydratacyjnej.

Przy pomocy różnic SDF zbadano też zmianę gęstości wiązań wodorowych wokół NMA pod wpływem obecności osmolitów. Oba osmolity zwiększały gęstość wiązań wodorowych wokół atomu węgla grupy metylowej połączonej z grupą karbonylową cząsteczki NMA. Natomiast betaina i mocznik wywierały różny wpływ na gęstość wiązań wodorowych wody wokół hydrofobowej grupy metylowej połączonej z grupą aminową cząsteczki NMA. Mocznik powodował zmniejszenie gęstości wiązań wodorowych przy tej grupie. Otrzymane rezultaty wskazują na rozpad hydrofobowej sfery hydratacyjnej wokół atomu węgla tej grupy, który wynika z utraty kooperatywności w tworzeniu wzmocnionej sfery hydratacyjnej wokół grupy metylowej przez fragment hydrofilowy NMA.

5.1.3. Podsumowanie wpływu osmolitów na cząsteczki modelowe

Zastosowałem opracowaną w ramach tej pracy procedurę pozwalającą na określenie wpływu przedstawiciela osmolitów stabilizujących – betainy i osmolitów destabilizujących – mocznika na sferę hydratacyjną cząsteczek modelowych względem powierzchni białek zwiniętych – NMA i DMSO. Obie te cząsteczki charakteryzują się bezpośrednim położeniem grupy hydrofilowej i hydrofobowej w swojej budowie, tak jak ma to miejsce w przypadku białek w ich natywnej formie. Badania przeprowadzone



w Zespole [23,24], w którym brałem udział, wskazywały na promowanie tworzenia sieci wiązań wodorowych wody *lodopodobnych* wokół cząsteczki substancji rozpuszczonej przy takim usytuowaniu tych grup. Z badań innych autorów [56,305] wynikały podobne wnioski w stosunku do peptydów i białek. Wyniki badań widmowych wskazywały na zwiększanie przez betainę energii wiązań wodorowych i skrócenie ich długości w sferze hydratacyjnej cząsteczek modelowych. Wpływ mocznika jest natomiast przeciwny w stosunku do tych obserwacji. Otrzymane rezultaty dla NMA i DMSO wydają się bezpośrednio korespondować z wpływem obu osmolitów na sfery hydratacyjne białek i w ten sposób na przesuwanie delikatnej równowagi między stanem zwiniętym i rozwiniętym tych biomakrocząsteczek. W wypadku betainy to przesunięcie odbywa się w stronę stanu zwiniętego, natomiast mocznik przesuwa równowagę w stronę w stanu rozwiniętego.

Wzmacniający wpływ betainy może być w uproszczeniu tłumaczony przez kooperatywny efekt wiązań wodorowych wody w sferach hydratacyjnych modeli i osmolitu, między którymi dochodzi do kontaktu, cechującymi się w obu przypadkach obecnością silnych wiązań wodorowych. Wartym zauważenia jest fakt unikania kontaktu sfer hydratacyjnych NMA i betainy przy niskich stężeniach tego osmolitu. Takie unikanie kontaktu pomiędzy peptydami/białkiem oraz osmolitami stabilizującymi było postulowane przez Timasheffa [7,86,102] i współpracowników oraz innych badaczy [4,12,100,101,103,104]. Zjawisko to jest podstawą hipotezy o entropowej stabilizacji białek przez osmolity [45,75,104,306,307]. Widoczne jest jednak na podstawie naszych badań, że ten efekt jest istotny jedynie przy niskich stężeniach osmolitów i może nie mieć uniwersalnego znaczenia. Hipoteza o sterowanej efektem entalpowym stabilizacji białek przez tę grupę osmolitów wygląda na bardziej uniwersalną. Przy wyższych stężeniach, sfery hydratacyjne NMA i betainy nakładają się na siebie, skutkując synergistycznym wzmocnieniem wiązań wodorowych wody w sferze hydratacyjnej NMA. W przypadku DMSO i betainy nie obserwowano unikania kontaktu między tymi cząsteczkami, a wzmacnianie wody w sferze hydratacyjnej DMSO jest obserwowane od najniższych stężeń. W przeciwieństwie do betainy, mocznik ma stosunkową dużą tendencję bezpośrednich oddziaływań z powierzchnią modeli. Obliczenia teoretyczne wskazują na bezpośrednie oddziaływania mocznika siłami van der Waalsa z płaską powierzchnią NMA. Cząsteczka mocznika ustawia się równoległe do powierzchni NMA, antyrównoległe względem momentu dipolowego



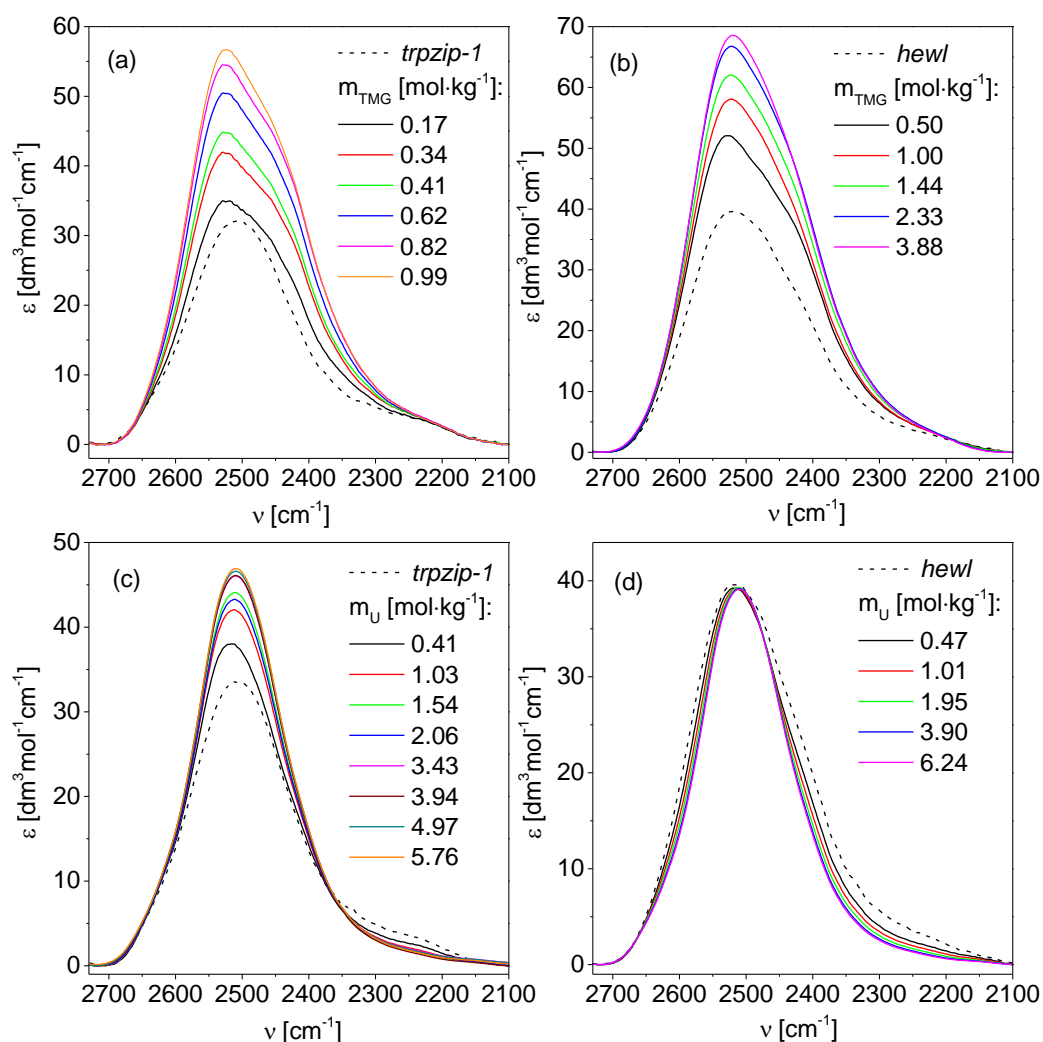
tego modelu. Najbliższy kontakt między tymi cząsteczkami jest realizowany przez atom tlenu mocznika i atomy wodoru grupy metylowej NMA [135]. W przypadku układu DMSO + mocznik, mocznik tworzy słabe wiązania wodorowe typu (mocznik)N \cdots H-C(DMSO), które ponownie wykazuje powinowactwo z grupą niepolarną. Powinowactwo cząsteczki mocznika do powierzchni modelu skutkuje usuwaniem cząsteczek wody ze sfery hydratacyjnej cząsteczki modelowej. Zdolność mocznika do oddziaływania z powierzchnią białek była wielokrotnie przedstawiana w literaturze [3,99,192,308,309], w kontekście tłumaczenia jego wpływu na zachowanie się zwiniętych form białek. Nasze badania spektroskopowe prowadzą jednak przede wszystkim do wniosku, że mocznik osłabia sferę hydratacyjną badanych modeli i ponownie wskazuje na entalpowo stymulowany wpływ osmolitów na stabilność białek. Potrzebne jest dodatkowe wyjaśnienie dotyczące ostatniego wniosku, ponieważ mocznik wykazuje nieco silniejsze oddziaływania z cząsteczkami wody niż cząsteczki wodą między sobą [180,181], aczkolwiek są one istotnie słabsze od oddziaływań betaina-woda. Z tego powodu efekt kooperatywności wiązań wodorowych powinien także mieć miejsce, tak jak w przypadku betainy. Wy tłumaczenie tego zjawiska staje się oczywiste na podstawie wizualizacji symulacji AIMD (Rys. S7) i obliczeń DFT (Rys. S4). Wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami wody, oddziałującymi z hydrofilowymi grupami cząsteczek modelowych i cząsteczkami wody oddziałującymi między sobą przy powierzchni grup hydrofobowych tych cząsteczek modelowych współdziałają w tworzeniu wzmocnionej *lodopodobnej* sieci wiązań wodorowych w sferze hydratacyjnej tej cząsteczki. To współdziałanie jest zaburzone przez obecność mocznika w roztworze i przyczynia się do ogólnego osłabienia sieci wiązań wodorowych między cząsteczkami wody otaczającymi tę cząsteczkę. Wspomniane zaburzenie kooperatywności wiązań wodorowych może być skutkiem bezpośredniego oddziaływania mocznika, głównie z fragmentami niepolarnymi modelu, powodującego uwolnienie cząsteczek wody ze sfery hydratacyjnej tych obszarów.

5.2. Wpływ osmolitu stabilizującego i destabilizującego na sferę hydratacyjną biomakrocząsteczek [310]

W tym rozdziale przedstawiłem wyniki badań nad wpływem osmolitu stabilizującego – betainy lub osmolitu destabilizującego – mocznika na sfery hydratacyjne: biomakrocząsteczek peptydu *trpzip-1* lub lizozymu z białka jaja kurzego.

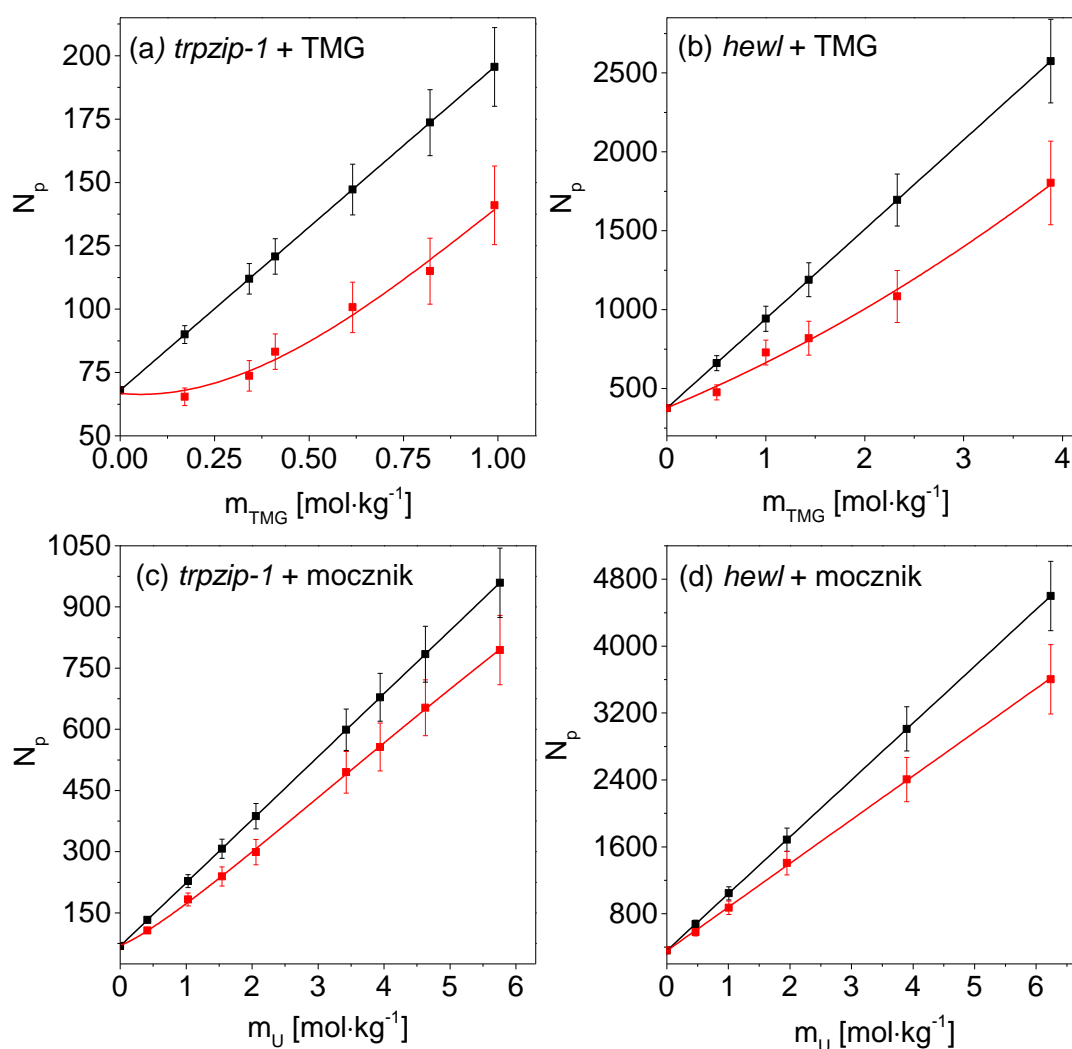
5.2.1. Analiza danych widmowych

Analiza widm w układach *trpzip-1* + betaina, lizozym + betaina, *trpzip-1* + mocznik oraz lizozym + mocznik doprowadziła do izolacji „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej (Rys. 10) i „syntetycznych” widm wody zaburzonej (Rys. S8).

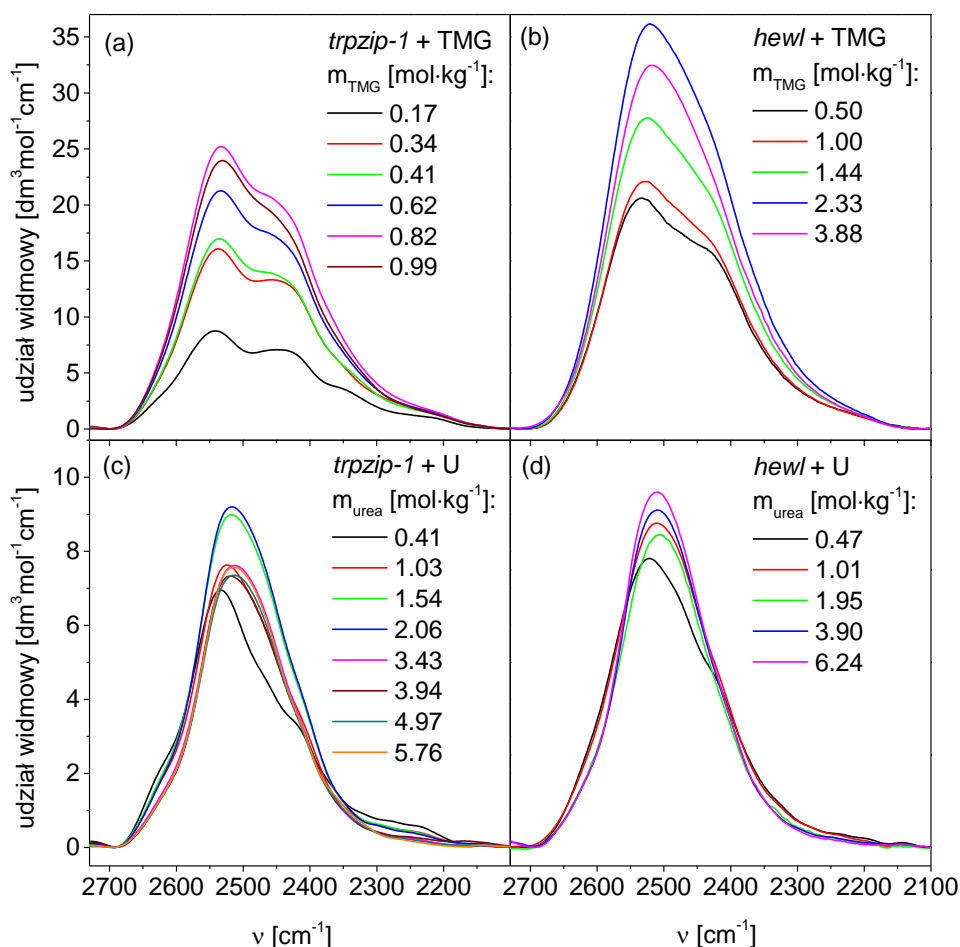


Rys. 10. „Eksperymentalne” widma wody zaburzonej w układach (a) *trpzip-1* + betaina, (b) lizozym + betaina, (c) *trpzip-1* + mocznik oraz (d) lizozym + mocznik. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik. Przerywaną linią zaznaczono widma wody zaburzonej przez biomakrocząsteczki.

Jednocześnie otrzymałem „eksperymentalne” liczby cząsteczek wody zaburzonej, N_e i „syntetyczne” liczby cząsteczek wody zaburzonej, N_s , w funkcji molalności osmolitu. Przekształcone wartości N_e i N_s (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.6 przedstawiłem na Rys. 11. Z porównania tych wartości wynika, że wartości N_p otrzymane dla „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej są mniejsze w porównaniu do wartości N_p uzyskanych dla „syntetycznych” widm wody zaburzonej w każdym z rozpatrywanych układów. Oznacza to, że niektóre cząsteczki wody są współdzielone między sferami hydratacyjnymi obu substancji rozpuszczonych na skutek nakładania się ich sfer. Odpowiednie udziały widmowe wody „podwójnie” zaburzonej w badanych układach pokazałem na Rys. 12.



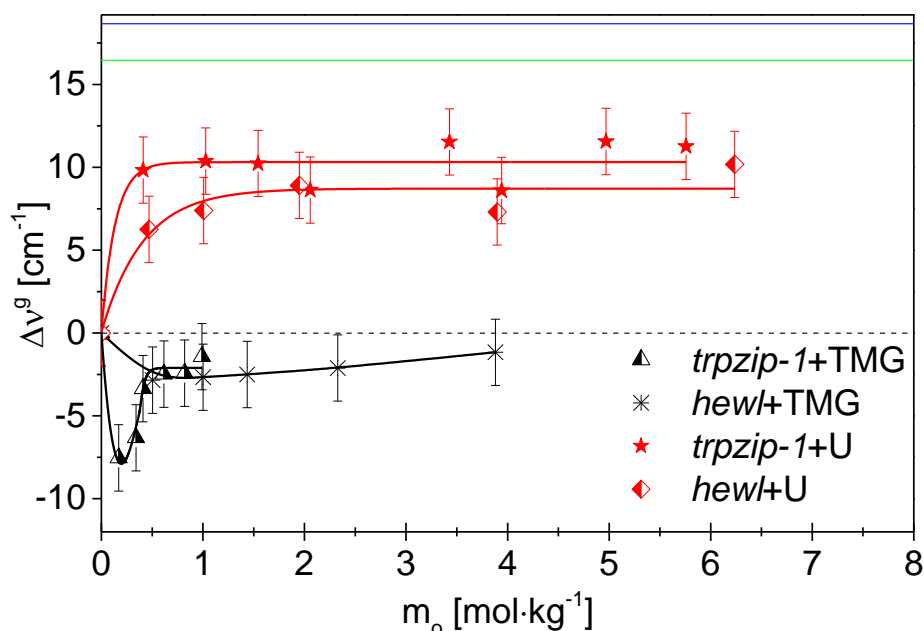
Rys. 11. Liczby cząsteczek wody przypadająca na pakiet złożony z jednej cząsteczki modelowej oraz β cząsteczek osmolitu w układach (równania (8) i (9)): (a) *trpzip-1* + betaina, (b) lizozym + betaina, (c) *trpzip-1* + mocznik oraz (d) lizozym + mocznik. Czarna linia odpowiada zależnościom otrzymanym dla „syntetycznych” widm wody zaburzonej, natomiast czerwona linia odpowiada zależnościom uzyskanym dla „eksperymentalnych” widmo wody zaburzonej. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik.



Rys. 12. Udziały widmowe wody „podwójnie” zaburzonej w układach (a) *trpzip-1* + betaina (b) lizozym + betaina, (c) *trpzip-1* + mocznik oraz (d) lizozym + mocznik. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik.

Wpływ osmolitów na sfery hydratacyjne biomakrocząsteczek określiłem w aspekcie energii wiązań wodorowych cząsteczek wody. Na Rys. 13 przedstawiłem obliczone różnice w położeniach środków ciężkości pasm wody „podwójnie” zaburzonej i wody zaburzonej wyłącznie przez biomakromolekuły ($\Delta\nu^s$) w funkcji molalności osmolitu. Uzyskane zależności wskazują na odmienny wpływ osmolitu stabilizującego oraz destabilizującego na otoczki hydratacyjne biomakrocząsteczek. Obecność betainy w roztworze biomakrocząsteczki powoduje wzmocnienie energii wiązań wodorowych w sferach hydratacyjnych biomakromolekuł (ujemne wartości $\Delta\nu^s$) w całym zakresie molalności osmolitu. Zwiększenie energii wiązań wodorowych jest silniej zaznaczone przy niższych molalnościach betainy w przypadku obu biomakromolekuł. Możliwym wytłumaczeniem tego zjawiska jest zachowanie się cząsteczki betainy jako liganda. Przy niskich molalnościach betainy akumuluje się przy specyficznych centrach oddziaływań na powierzchni peptydu lub białka, dlatego też silnie wpływa na cząsteczki wody uwspólnione z biomakrocząsteczkami. Przy pewnych

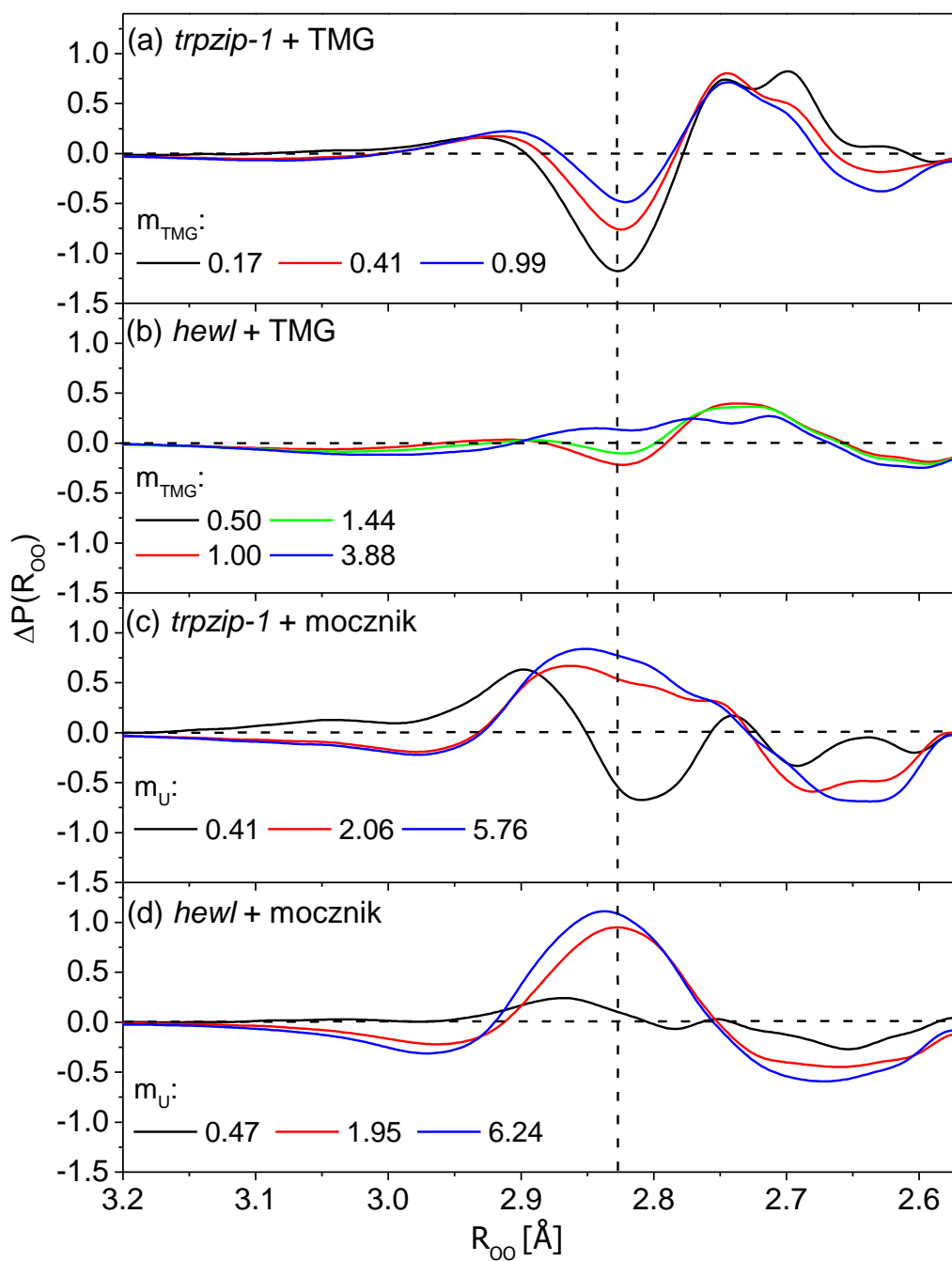
molalnościach te interakcje stają się wysyczone. Reszta mniej specyficznie zlokalizowanych cząsteczek betainy wzmacnia mniej efektywnie wiązania wodorowe wody. W obecności destabilizującego osmolitu – mocznika (dodatnie wartości Δv^g) wiązania wodorowe w sferach hydratacyjnych obu biomakromolekuł są natomiast osłabione. Ponadto w stosunku do wody czystej, woda „podwójnie” zaburzona w całym zakresie molalności osmolitu jest wzmocniona w każdym ze zbadanych układów.



Rys. 13. Różnice wartości położenia środków ciężkości pasm (jako miara średniej energii wiązań wodorowych między cząsteczkami wody) między wodą „podwójnie” zaburzoną i wodą zaburzoną przez biomakrocząsteczki ($\Delta v^g = v^p - v^m$) w funkcji molalności osmolitu (m_o). Czerwoną linią zaznaczono układy zawierające mocznik (U), czarną linią układy zawierające betainę (TMG). Zieloną linią oznaczono różnice wartości położenia środków ciężkości pasma wody czystej i wody zaburzonej przez *trpzip-1*, natomiast niebieska linia oznacza różnice wartości położenia środków ciężkości pasma wody czystej i wody zaburzonej przez lizozym.

Na Rys. 14 pokazałem funkcje $\Delta P(R_{OO})$, otrzymane przez odjęcie od funkcji rozkładu odległości O...O dla wody „podwójnie” zaburzonej, $P(R_{OO})_{podwójna}$, funkcji rozkładu odległości O...O dla wody zaburzonej przez biomakrocząsteczki, $P(R_{OO})_{biomakrocząsteczka}$. Zobrazowałem w ten sposób wpływ osmolitów na sfery hydratacyjne *trpzip-1* i lizozymu w aspekcie odległości międzycząsteczkowych. Na Rys. 14a i Rys. 14b można zaobserwować, że obecność betainy zwiększa populację silnych wiązań wodorowych w sferach hydratacyjnych *trpzip-1* i lizozymu (dodatnie wartości $\Delta P(R_{OO})$), o odległościach O...O z przedziału 2,70-2,75 Å (2,74 Å – odległości O...O w lodzie [311]). Największe wzmocnienie wiązań wodorowych w przypadku *trpzip-1* występuje przy najniższych molalnościach osmolitu. Ten efekt widoczny jest

na podstawie pojawienia się populacji bardzo silnych wiązań wodorowych (maksimum przy 2,70 Å). Przy wyższych molalnościach betainy, odległości przesuwają się w stronę mniej silnych interakcji (ale nadal silnych), jako wynik wcześniej sugerowanego wysycenia miejsc specyficznej akumulacji osmolitu wokół powierzchni peptydu. Towarzyszy temu redukcja populacji cząsteczek wody charakteryzujących się odległościami międzycząsteczkowymi wynoszącymi około 2,83 Å (ujemne wartości $\Delta P(R_{OO})$), która odpowiada najbardziej prawdopodobnej odległości O...O w wodzie czystej. Wyjątkiem jest różnica $\Delta P(R_{OO})$ otrzymana w układzie z lizozymem przy najwyższej molalności betainy. W tym przypadku widoczny jest niewielki wzrost tej populacji. Ciekawą obserwacją jest to, że różnice $\Delta P(R_{OO})$ w przypadku układu lizozym + betaina są mniejsze niż w przypadku układu *trpzip-1* + betaina. Wskazuje to na mniejszy wpływ betainy na sferę hydratacyjną lizozymu w porównaniu do jego wpływu na sferę hydratacyjną *trpzip-1*. Wpływ mocznika na sfery hydratacyjne *trpzip-1* i lizozymu jest przeciwny względem wpływu osmolitu stabilizującego. Przy najniższych molalnościach mocznika obserwowany jest wzrost populacji słabych i długich wiązań wodorowych (2,87-2,90 Å) i zmniejszenie prawdopodobieństwa występowania silnych i krótkich wiązań wodorowych w przypadku obu biomakrocząsteczek. Przy wyższych molalnościach mocznika pojawia się znaczna populacja wiązań wodorowych wody o długościach równych i dłuższych niż najbardziej prawdopodobna odległość w czystej wodzie (2,83 Å). Ponadto, w przeciwieństwie do betainy, wpływ mocznika na sfery hydratacyjne obu biomakrocząsteczek jest podobny.



Rys. 14. Różnice między funkcjami rozkładu odległości O...O między cząsteczkami wody $\Delta P(R_{oo})$, $\Delta P(R_{oo}) = P(R_{oo})_{\text{podwójna}}^{m+o} - P(R_{oo})_{\text{biomakroczaścizka}}^m$, gdzie $m+o$ oznacza wodny roztwór biomakroczaścizki (m) i osmolitu (o), w funkcji molalności osmolitu [$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$] w układach: (a) *trpzip-1* + betaina, (b) lizozym + betaina, (c) *trpzip-1* + mocznik i (d) lizozym + mocznik. Pionową linią przerywaną zaznaczono najbardziej prawdopodobną odległość O...O między cząsteczkami wody w wodzie czystej.

5.2.2. Podsumowanie wpływu osmotów stabilizujących i destabilizujących na biomakrocząsteczki.

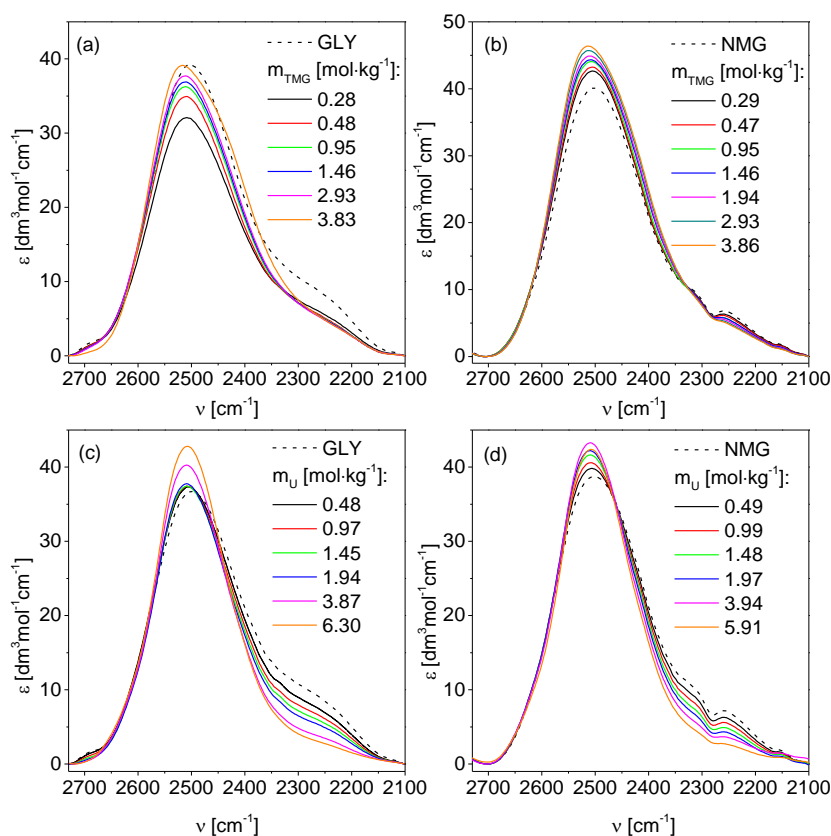
Przeprowadzona przez mnie analiza widmowa wykazała, że betaina wzmacnia sfery hydratacyjne zwiniętych form biomakrocząsteczek w ich zwiniętych formach, podczas gdy mocznik je osłabia. Przy rozważaniu roli betainy jako osmotu, warto zauważyć, że wiązania wodorowe w sferach hydratacyjnych betainy [18,200] i białek [22,143,312] są silniejsze niż te w czystej wodzie. Oddziaływanie między tymi sferami hydratacyjnymi powoduje dodatkowe wzmocnienie wiązań wodorowych z powodu kooperatywnej natury wiązań wodorowych wody. Najsilniejsze wzmocnienie sieci wiązań wodorowych wydaje się mieć miejsce w obszarach bliskiego położenia grup polarnych i niepolarnych, w których promowane jest powstawanie fragmentów stabilnej klatratopodobnej sieci wiązań wodorowych wody. Z drugiej strony pomimo, że mocznik wzmacnia w pewnym stopniu energię wiązań wodorowych w roztworach wodnych [133,180,313], w znacznym stopniu osłabia wodę w sferach hydratacyjnych biomakrocząsteczek. Ta obserwacja potwierdza wniosek sformułowany już na podstawie wyników badań nad hydratacją NMA i DMSO, że mocznik zaburza kooperatywność wiązań wodorowych wody hydratacyjnej w otoczeniu grup hydrofilowych i hydrofobowych znajdujących się na powierzchni biomakrocząsteczek. Bliskość grup tego typu jest bardziej prawdopodobna w przypadku zwiniętych białek w porównaniu do rozwiniętych form. Dlatego też obecność wcześniej wspomnianej kooperatywności jest bardziej typowa dla zwiniętej formy. Przy tłumaczeniu efektu wywołanego przez mocznik, należy wziąć pod uwagę zdolność mocznika do bezpośredniego oddziaływania z powierzchnią białek, szczególnie w obszarach, obecności grup hydrofobowych [314–317]. Oddziaływanie takie skutkuje częściowym uwolnieniem cząsteczek wody hydratacyjnej [318]. W efekcie następuje zakłócenie ciągłości sieci wiązań wodorowych cząsteczek wody hydratującej polarne i niepolarne fragmenty znajdujące się w bliskiej odległości

5.3. Wpływ osmolitu stabilizującego i destabilizującego na sfery hydratacyjne modeli fragmentów rozwiniętych białek.

W tym rozdziale przedstawiłem wyniki badań nad wpływem osmolitu stabilizującego – betainy lub osmolitu destabilizującego – mocznika na sfery hydratacyjne cząsteczek modelowych względem stanu rozwiniętego białka: glicyny (GLY) lub *N*-metyloglicyny (NMG).

5.3.1. Analiza danych widmowych

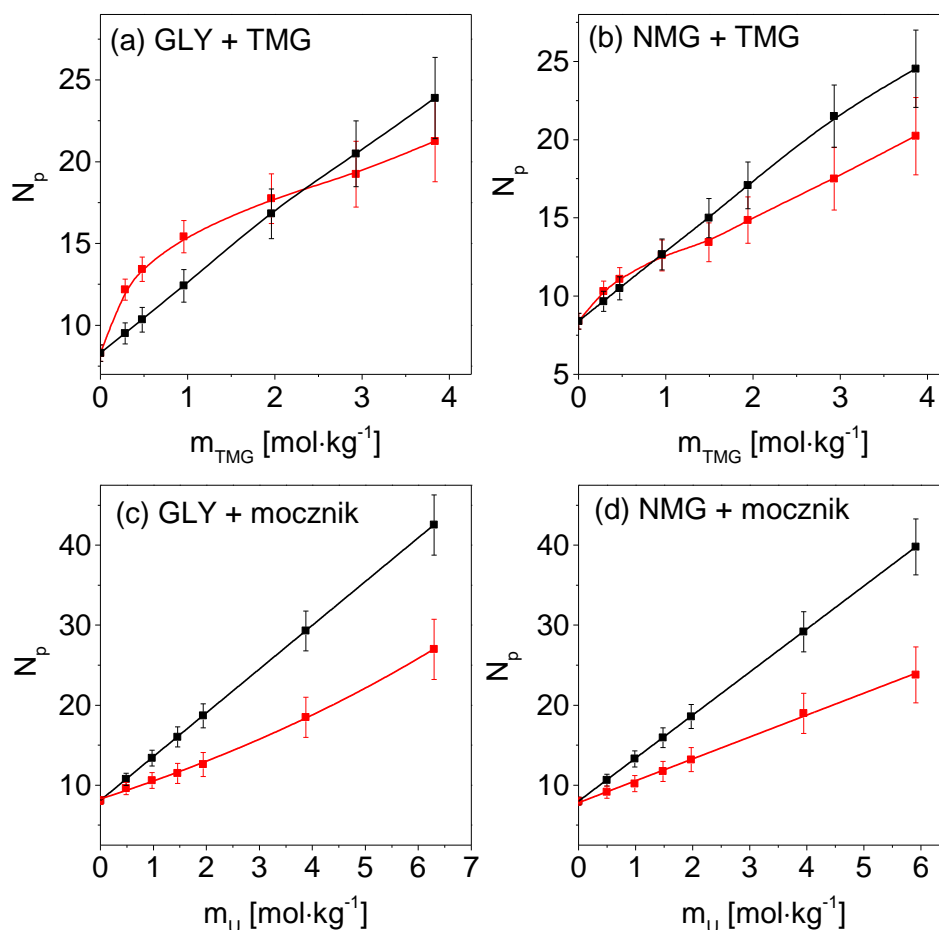
Na Rys. 15 i Rys. S9 zamieściłem „eksperymentalne” i „syntetyczne” widma wody zaburzonej w układach GLY + betaina, NMG + betaina, GLY + mocznik i NMG + mocznik. Na Rys. 16 pokazałem liczbę cząsteczek wody zaburzonej (N_p) otrzymanych dla tych widm w funkcji molalności osmotów.



Rys. 15. „Eksperymentalne” widma wody zaburzonej w układach (a) GLY + betaina (b) NMG+ betaina, (c) GLY + mocznik oraz (d) NMG + mocznik. GLY, TMG i U oznaczają odpowiednio glicynę, betainę i mocznik. Przerywaną linią zaznaczono widma wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe.

Na podstawie Rys. 16a i b widoczne jest, że w układach GLY + betaina oraz NMG + betaina, przy molalnościach niższych niż $2,4 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $1 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, odpowiednio, wartości parametru N_p odpowiadające „eksperymentalnym” widmom wody zaburzonej

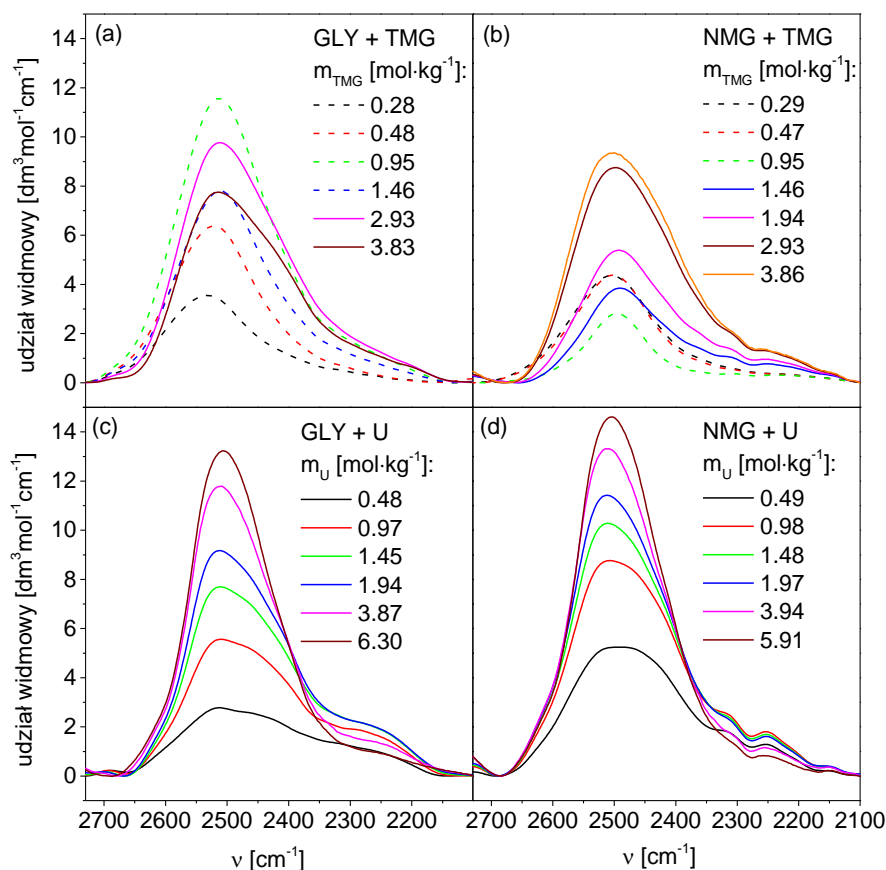
są wyższe niż te odpowiadające „syntetycznym” widmom wody zaburzonej. Oznacza to, że dodatkowe cząsteczki wody zostały zaburzone w tych układach – pojawiła się tzw. woda „mostkująca” (Rys. 3b). Przy wyższych molalnościach betainy, wartości N_p dla „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej są mniejsze niż dla „syntetycznych” widm wody zaburzonej, co wskazuje na istnienie „współdzielonej” wody zaburzonej, będącej skutkiem nakładania się sfer hydratacyjnej (Rys. 3d).



Rys. 16. Liczby cząsteczek wody przypadająca na pakiet złożony z jednej cząsteczki modelowej oraz β cząsteczek osmolytu w układach (równania (8) i (9)): (a) GLY + betaina, (b) NMG + betaina, (c) GLY + mocznik oraz (d) NMG + mocznik. Czarna linia odpowiada zależnościom otrzymanym dla „syntetycznych” widm wody zaburzonej, natomiast czerwona linia odpowiada zależnościom odpowiadającym „eksperymentalnym” widmom wody zaburzonej. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik

W przypadku układów zawierających mocznik (Rys. 16c i d) liczba cząsteczek wody zaburzonej (N_p) otrzymana dla „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej jest niższa w porównaniu do „syntetycznych” widm wody zaburzonej w całym zakresie badanych molalności. Powyższa obserwacja świadczy o nakładaniu się sfer hydratacyjnych mocznika i cząsteczek modelowych w całym zakresie molalności osmolytu.

W przypadku układów GLY + betaina i NMG + betaina nie byłem w stanie wyznaczyć udziału widmowego wody „podwójnie” zaburzonej używając odpowiedniego współczynnika odejmowania „syntetycznych” widm wody zaburzonej od „eksperymentalnych” widm wody zaburzonej (parametr k , równanie (7), rozdział 4.5.4, str. 59). Otrzymywane w ten sposób pasma wody „podwójnie” zaburzonej są w niektórych regionach ujemne. Wskazuje to na częściową transformację sfer hydratacyjnych cząsteczek substancji rozpuszczanych w nowe sfery hydratacyjne (Rys. 3e, rozdział 4.5), z powodu utworzenia kompleksu molekularnego między różnymi substancjami rozpuszczonymi. Z tego powodu użyłem klasycznej metody analizy danych, bazującej na sprawdzaniu udziału widmowego „syntetycznej” wody zaburzonej w serii próbnych widm wody „podwójnie” zaburzonej, analogicznie jak w metodzie znajdowania widma wody zaburzonej w roztworze zawierającym tylko jedną substancję rozpuszczoną w roztworze. Wyizolowane udziały widmowe wody „podwójnie” zaburzonej w badanych układach przedstawiłem na Rys. 17.



Rys. 17. Udziały widmowe wody „podwójnie” zaburzonej w układach (a) GLY + betaina, (b) NMG + betaina, (c) GLY + mocznik oraz (d) NMG + mocznik. Przerywana linia oznacza nadmiarową wodę „mostkującą”. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik.



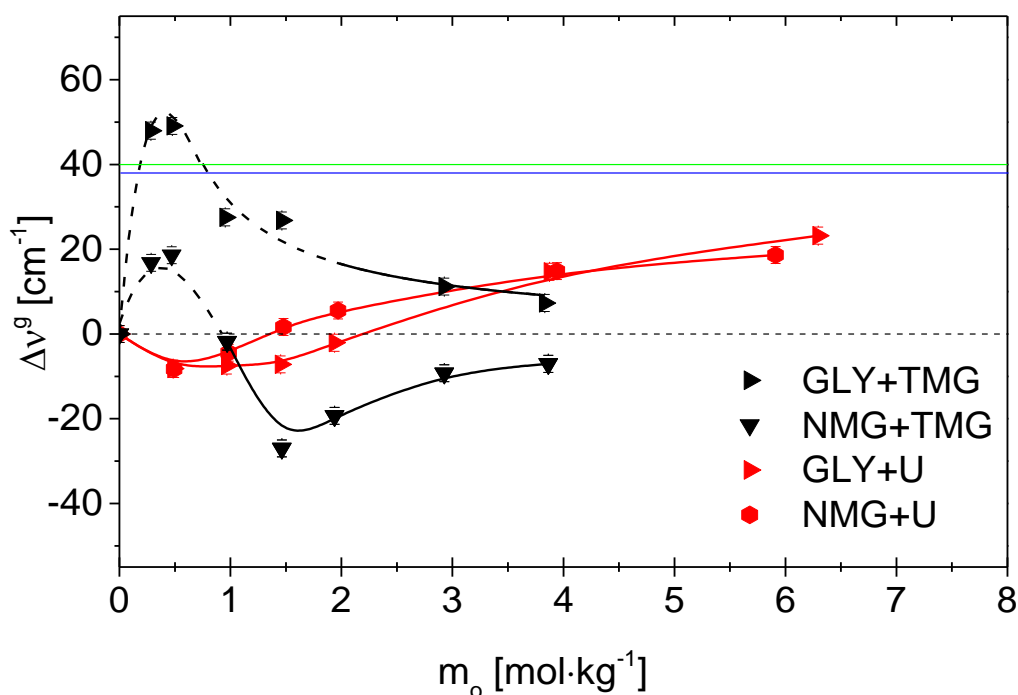
Wpływ betainy i mocznika, w aspekcie energetycznym, na sfery hydratacyjne cząsteczek modelowych³ względem rozwiniętych fragmentów białek zaprezentowałem z użyciem wartości Δv^s na Rys. 18. Analiza Δv^s w funkcji molalności osmolitu wskazuje, że wiązania wodorowe w sferze hydratacyjnej glicyny są osłabione w obecności betainy (dodatnie wartości Δv^s) w porównaniu do wody zaburzonej jedynie przez glicynę. Zjawisko to występuje w całym zakresie molalności betainy, zarówno w przypadku wody „mostkującej” sfery hydratacyjne obu cząsteczek (Rys. 3b) jak i wody „współdzielonej” (Rys. 3d). Ponadto, „mostkująca” woda zaburzona w układzie GLY + betaina, przy dwóch najniższych molalnościach betainy, jest osłabiona w stosunku do wody czystej. W układach NMG + betaina, przy molalnościach poniżej $1 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, energia wiązań wodorowych wody „podwójnie” zaburzonej jest niższa w porównaniu do wody zaburzonej jedynie przez NMG (dodatnie wartości Δv^s), podczas gdy przy wyższych molalnościach betainy jest wyższa (ujemne wartości Δv^s). Analizując wpływ betainy na obie cząsteczki modelowe można, zauważyć, że efekt wzmocnienia sfery hydratacyjnej NMG przez betainę i osłabienia sfery hydratacyjnej glicyny zmniejsza się wraz ze wzrostem molalności betainy. Przy pozostałych molalnościach, zarówno „mostkująca” woda zaburzona, jak i „współdzielona” woda zaburzona jest wzmocniona względem sfery hydratacyjnej modelu.

Wpływ mocznika na sfery hydratacyjne obu modeli jest podobny: wiązania wodorowe w ich sferach hydratacyjnych są wzmocnione (ujemne wartości Δv^s) przy molalnościach osmolitu poniżej $2,3 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $1,5 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ odpowiednio dla układów GLY + mocznik i NMG + mocznik. Powyżej tych molalności zauważalne jest osłabienie wiązań wodorowych wody wokół modeli fragmentów rozwiniętych białek, przejawiające się dodatnimi wartościami Δv^s .

Efekt wywierany przez mocznik względem cząsteczek modelujących właściwości białek w formie rozwiniętej peptydów i białek jest zdecydowanie różny od tego obserwowanego w przypadku sfer hydratacyjnych biomakrocząsteczek w zwiniętych formach (Rys. 13) oraz sferach hydratacyjnych prostych modeli białek, NMA i DMSO (Rys. 8), w których energia wiązań wodorowych wody jest osłabiona

³ Analogiczne różnice wartości położenia środków ciężkości pasm między „eksperymentalną” wodą zaburzoną i wodą zaburzoną przez cząsteczki modelowe względem fragmentów rozwiniętych białek zamieściłem w materiałach uzupełniających na Rys. S10. Jego dyskusję przedstawiłem w rozdziale 6.

nawet przy najniższych molalnościach mocznika. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest początkowe oddziaływanie mocznika przez jego grupę karbonylową z tymi cząsteczkami wody, które tworzą wiązania wodorowe z grupami aminowymi glicyny (trzy możliwe takie interakcje) lub grupą aminową NMG (dwa możliwe wiązania wodorowe). Dalszy wpływ mocznika jest realizowany przez wiązania wodorowe grup aminowych tej cząsteczki, skutkujące zmniejszeniem ich energii. Wiadomo [177,313,319], że wiązania wodorowe między grupami $-NH_2$ mocznika i cząsteczek wody są słabe, a przynajmniej znacznie słabsze niż interakcje typu woda-woda. Tylko oddziaływanie mocznika przez grupę karbonylową jest silniejsze niż oddziaływania woda-woda [177,313,319]. Bezpośrednie oddziaływania mocznika z cząsteczkami modelowymi, skutkujące usunięciem cząsteczek wody z ich silnych centrów oddziaływań, są także możliwym powodem osłabienia wiązań wodorowych wody przy wyższych molalnościach mocznika.

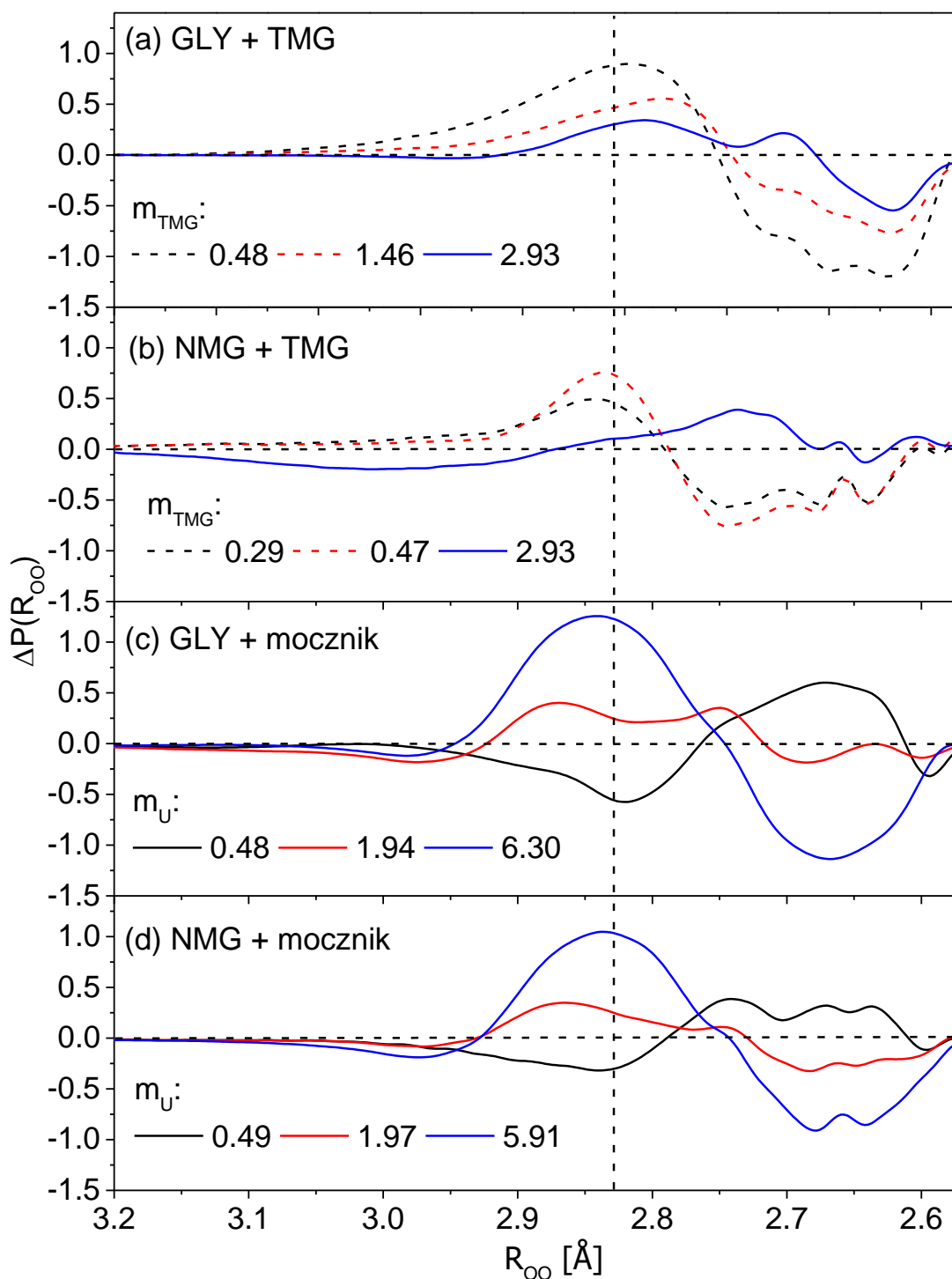


Rys. 18. Różnice wartości położenia środków ciężkości pasm (jako miara średniej energii wiązań wodorowych między cząsteczkami wody) między wodą „podwójnie” zaburzoną i wodą zaburzoną przez cząsteczki modelowe względem fragmentów rozwiniętych białek ($\Delta\nu^g = \nu^p - \nu^m$) w funkcji molalności osmolitu (m_o). Linia przerywana oznacza zakres występowania nadmiarowej wody „mostkującej” zaburzonej, linia ciągła obszar występowania „współdzielonej” wody zaburzonej. Czerwoną linią zaznaczono układy zawierające mocznik (U), czarną linią układy zawierające betainę (TMG). Zielona linia oznacza różnice wartości położenia środków ciężkości pasma wody czystej i wody zaburzonej przez GLY, natomiast niebieska linia oznacza różnice wartości położenia środków ciężkości pasma wody czystej i wody zaburzonej przez NMG

Więcej informacji o stanie strukturalnym wiązań wodorowych wody pod jednoczesnym wpływem cząsteczki modelowej i osmolitu (tj. wody „podwójnie” zaburzonej) otrzymałem na podstawie różnic funkcji rozkładu odległości O...O między wodą „podwójnie” zaburzoną i wodą zaburzoną tylko przez cząsteczkę modelową fragmentu stanu rozwiniętego białek, $\Delta P(R_{OO})$. Odpowiednie zależności w funkcji molalności osmolitu przedstawiłem na Rys. 19.

W układzie GLY + betaina (Rys. 19a) i NMG + betaina (Rys. 19b), przy najniższych stężeniach betainy, wzrasta populacja umiarkowanych i słabych wiązań wodorowych (2,80 Å – 2,95 Å) i jednocześnie zmniejsza się populacja silnych wiązań wodorowych (2,75 Å) w stosunku do wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe (GLY lub NMG). Przy tych molalnościach występuje „mostkująca” woda „podwójnie” zaburzona. Przy najwyższych molalnościach betainy (2,93 mol·kg⁻¹), obserwowany jest mniejszy wzrost populacji oddziaływań o odległościach O...O wynoszących 2,83 Å (w układzie NMG + betaina udział tych wiązań jest nieistotny) oraz zwiększenie populacji silnych wiązań wodorowych. Otrzymane funkcje $\Delta P(R_{OO})$ dla tych wysokich molalności odpowiadają sytuacji, w której sfery hydratacyjne dwóch cząsteczek substancji rozpuszczonych nakładają się na siebie.

Wpływ mocznika na sfery hydratacyjne glicyny i NMG jest podobny (Rys. 19c i Rys. 19d). Przy najniższych molalnościach mocznika (około 0,5 mol·kg⁻¹) zmniejsza się populacja wiązań wodorowych między cząsteczkami wody o odległościach O...O wynoszących około 2,83 Å. Jednocześnie wzrasta populacja silnych wiązań wodorowych (2,75 Å) w porównaniu do wody zaburzonej przez cząsteczki modelowe względem fragmentów białek, GLY lub NMG. Wraz ze wzrostem molalności mocznika zwiększa się udział umiarkowanych i słabych wiązań wodorowych wody, podczas gdy wkład silnych wiązań zmniejsza się. Przy najwyższych molalnościach mocznika, 6,30 mol·kg⁻¹ i 5,91 mol·kg⁻¹ odpowiednio dla układów z GLY i NMG, występuje znacząca populacja umiarkowanych i słabych wiązań wodorowych.



Rys. 19. Różnice między funkcjami rozkładu odległości O...O między cząsteczkami wody, $\Delta P(R_{OO})$, $\Delta P(R_{OO}) = P(R_{OO})_{podwójna}^{m+o} - P(R_{OO})_{mod\ el}^m$, gdzie $m+o$ oznacza wodny roztwór cząsteczki modelowej względem fragmentów rozwiniętych białek (m) i osmolitu (o), w funkcji molalności osmolitu [$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$] w układach: (a) GLY + betaina, (b) NMG + betaina, (c) GLY + mocznik i (d) NMG + mocznik. Pionową linią przerywaną zaznaczono najbardziej prawdopodobną odległość O...O między cząsteczkami wody w wodzie czystej. Linia przerywana oznacza zakres występowania nadmiarowej wody „podwójnie” zaburzonej, linia ciągła obszar występowania „współdzielonej” wody zaburzonej.

5.3.2. Konfrontacja wpływu osmolitów na sfery hydratacyjne białek w formie zwiniętej i rozwiniętej.

W moich badaniach użyłem krótkiego peptydu – *trpzip-1* i białka – lizozymu do zbadania hydratacji rzeczywistych biomakrocząsteczek w ich zwiniętej postaci w wodnych roztworach osmolitu. W temperaturze pokojowej cząsteczki te nie są dostępne w rozwiniętych formach. Dlatego też, musiałem użyć modeli (NMG i GLY) rozwiniętych fragmentów białek. Wpływ zbadanych osmolitów na sfery hydratacyjne modeli fragmentów rozwiniętych białek różni się od ich wpływu na sfery hydratacyjne natywnych biomakrocząsteczek lub cząsteczek modelujących powierzchnie biomakrocząsteczek w stanie natywnym (NMA lub DMSO). Wyniki badań widmowych wykazały, że betaina była wykluczana ze sfer hydratacyjnych modeli (NMG i GLY) przy niskich molalnościach. Efekt ten uwidocznił się jako włączanie dodatkowych cząsteczek wody pochodzących z wody objętościowej do bliskiego sąsiedztwa między sferami hydratacyjnymi osmolitu i modelu. Te cząsteczki wody mostkowały ich sfery hydratacyjne. Takie zachowanie betainy wspiera hipotezę o entropowym mechanizmie stabilizacji białek [104,307], według której w przypadku rozwiniętych form białek, objętość wykluczona dla osmolitów powinna być większa w porównaniu do przypadku zwiniętych białek [54]. W związku z tym entropia układu zawierającego rozwinięte białko jest mniejsza w porównaniu do formy zwiniętej. Sytuacja ta prowadzi to do przesunięcia równowagi reakcji zwijania białek w kierunku formy zwiniętej. W przypadku badanych przeze mnie układów, uzyskany wynik raczej wskazuje na większą tendencję rozwiniętej formy białka do wykluczania osmolitów stabilizujących. Taki efekt nie był obserwowany w stosunku do zbadanych natywnych biomakrocząsteczek, ale był obecny w przypadku modelu zwiniętych form białek – NMA, przy najniższych molalnościach betainy. Nadmiarowe cząsteczki wody „mostkującej” sfery hydratacyjne GLY lub NMG i betainy charakteryzują się słabszymi wiązaniami wodorowymi w porównaniu do tych w sferach hydratacyjnych cząsteczek modelowych. W efekcie, betaina zmniejsza energię wiązań wodorowych w otocze hydratacyjnej GLY w całym zakresie badanych molalności (pomimo, że powyżej molalności ok. $2 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ interakcje zmieniają swój charakter, a w przypadku NMG do molalności ok. $1 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$). Przy wyższych molalnościach, w przypadku NMG, widoczne jest wzmocnienie wiązań wodorowych. Wyniki dla wyższych molalności mogą wskazywać na powstawanie specyficznych kompleksów molekularnych



złożonych z cząsteczek wody i substancji rozpuszczonych, których skład zależy od składu roztworu.

Przy niskich molalnościach mocznik wzmacnia sfery hydratacyjne GLY i NMG (Rys. 18). Przy wyższych molalnościach, wiązania wodorowe wody hydratacyjnej są osłabione, prawdopodobnie w następstwie bezpośrednich oddziaływań osmolytu i cząsteczki modelowej. Efekt ten jest wyraźnie inny od wpływu mocznika na sfery hydratacyjne cząsteczek modelujących białka w stanie natywnym (NMA lub DMSO) oraz na sfery hydratacyjne biomakrocząsteczek (*trpzip-1* lub lizozymu), w których wiązania wodorowe między cząsteczkami wody są osłabiane od najniższych stężeń mocznika.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Wielu autorów [106,133,171,178–180,201,320,321] zdecydowało się na badanie wpływu osmolytów na strukturę i właściwości wody w roztworze upatrując w zmienionej charakterystyce wody wytłumaczenia wpływu osmolytów na stabilność białek. Powszechnym oczekiwaniem było to, że substancje kosmotropowe (wzmacniające strukturę wody) powinny stabilizować białka, podczas gdy substancje chaotropowe (osłabiające strukturę wody) powinny wykazywać działanie destabilizujące [88,176]. Jednakże wyniki badań nad wpływem osmolytów na wodę są często sprzeczne [166,176–180,184,201,320,322,323], także dlatego ponieważ używane są różne metody badań i różne parametry do scharakteryzowania stanu wody [39]. Niektórzy autorzy wskazywali, że niemożliwe jest połączenie wpływu wzmacniającego lub osłabiającego osmolytów z ich właściwościami stabilizującymi lub destabilizującymi [133,201,324]. Wadą przedstawionego w literaturze podejścia było milczące założenie, że zbadany wpływ osmolytu na wodę w roztworze bezpośrednio przenosi się na taki sam wpływ na sferę hydratacyjną białka. Na podstawie przykładowego zestawienia na Rys. 18 i Rys. S10 (materiały uzupełniające) układu cząsteczek modelowych, GLY i NMG, w obecności betainy i mocznika można pokazać błędność takiej interpretacji. Rysunki te obrazują różnice energii wiązań wodorowych „podwójnie” zaburzonej wody (Rys. 18), czyli zmienionej wody w sferze hydratacyjnej cząsteczki centralnej, oraz „eksperymentalnej” wody zaburzonej (Rys. S10), czyli ogólnej (uśrednionej) wody zaburzonej w roztworze, przez obie substancje rozpuszczone w odniesieniu do energii wiązań wodorowych wody hydratacyjnej

cząsteczki modelowej w funkcji molalności osmolitu. Porównanie przebiegu krzywych na obu rysunkach ewidentnie pokazuje błędność rozumowania prezentowanego dotąd w literaturze. Przeprowadzone przeze mnie badania doprowadziły do izolacji efektu wpływu osmolitu na sferę hydratacyjną cząsteczki centralnej. W tym aspekcie przedstawione przeze mnie wyniki badań są nowatorskie. Dodatkowo, zawarta w nich jest analiza wpływu osmolitów na wodę w układach zawierających realne białko – z tego typu wynikami nie spotkałem się dotychczas w literaturze.

W niniejszej pracy przedstawiłem wyniki badań dotyczących wpływu osmolitów stabilizujących i destabilizujących na sfery hydratacyjne peptydów i białek. W badaniach zastosowałem metodę widm FTIR oraz technikę rozcieńczenia izotopowego HDO w H₂O. Do analizy widm zastosowałem specjalnie opracowaną metodę, która pozwołała mi na wyodrębnienie udziału widmowego cząsteczek wody będących pod jednoczesnym wpływem dwóch różnych substancji rozpuszczonych (wody zaburzanej jednocześnie przez obecność w roztworze peptydu/białka i osmolitu) w roztworze w funkcji składu roztworu. Na tej podstawie mogłem określić zmianę stanu energetyczno-strukturalnego wody hydratacyjnej białka/cząsteczki modelowej spowodowaną obecnością osmolitu w roztworze. Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy są pod tym względem unikalne. Na podstawie położenia i kształtów otrzymanych konturów pasm OD HDO ustaliłem stan energetyczny wiązań wodorowych wody. Strukturę wody hydratacyjnej scharakteryzowałem poprzez funkcję rozkładu odległości tlen-tlen między cząsteczkami wody, uzyskaną przez transformację konturu pasma OD z wykorzystaniem empirycznej zależności korelacyjnej.

W pierwszym etapie badań wyznaczyłem wpływ osmolitu stabilizującego – betainy i destabilizującego – mocznika na sfery hydratacyjne modeli powierzchni natywnych białek, NMA i DMSO. Wyniki moich badań dostarczyły dowodów na wzmocnienie sieci wiązań wodorowych w sferach hydratacyjnych NMA lub DMSO pod wpływem betainy. Mocznik natomiast osłabia wiązania wodorowe wody w sferach hydratacyjnych tych cząsteczek modelowych. Ostatni efekt jest skutkiem zaburzenia ciągłości wzmocnionej sieci wiązań wodorowych wody solwatacyjnej, powstałej w wyniku bezpośredniej bliskości grup hydrofilowych i hydrofobowych cząsteczek modelowych. Uzyskane przeze mnie wyniki korespondowały z wynikami obliczeń teoretycznych (DFT, RDG oraz symulacji AIMD) uzyskanych przez innych członków naszego Zespołu badawczego. Wyniki badań nad cząsteczkami modelowymi względem



powierzchni natywnych białek sugerowały sterowany entalpowo mechanizm wpływu osmolitów na równowagę między formą zwiniętą a rozwiniętą białek w roztworach wodnych. Równowaga ta jest uwarunkowana przez stan energetyczny sfery hydratacyjnej biomakrocząsteczki, będącej pod wpływem osmolitu.

W dalszej części pracy określiłem rodzaj wpływu osmolitu stabilizującego i destabilizującego na wodę w sferach hydratacyjnych biomakrocząsteczek o znaczeniu biologicznym: peptydu – *trpzip-1* i białka – lizozymu z białka jaja kurzego. Obserwowałem w ich przypadku podobne zachowanie w stosunku do wcześniej przeze mnie zbadanych układów cząsteczek modelowych względem powierzchni natywnych białek i osmolitów. Można zatem uważać, że modele te są dobrymi modelami powierzchni białek w formie zwiniętej. Dowiodłem, że oba osmolity wywierają efekt entalpowy na sfery hydratacyjne biomakrocząsteczek. Betaina wzmacnia wiązania wodorowe wody w sferach hydratacyjnych peptydów i białek już od najniższych molalności. Mocznik zaś je osłabia od najniższych molalności, w następstwie niszczenia sieci wzmocnionych wiązań wodorowych wody między fragmentami polarnymi i niepolarnymi białek. Wymienione efekty mogą być bezpośrednio powiązane z właściwościami stabilizującymi/destabilizującymi osmolitów w stosunku do białek.

W ostatnim etapie pracy określiłem wpływ osmolitów na sfery hydratacyjne NMG i GLY. Cząsteczki te posłużyły mi jako minimalne modele rozwiniętych fragmentów peptydów i białek. Wyniki badań wpływu osmolitów na sfery hydratacyjne tych modeli muszą być traktowane z ostrożnością, z powodu istotnych ograniczeń tych modeli. Cząsteczki te charakteryzują się brakiem grupy hydrofobowej (GLY) lub większym oddaleniem grupy hydrofobowej od grupy polarnej (NMG), co stanowiło kryterium wyboru. Okazuje się, że osmolit stabilizujący unikał bezpośredniego kontaktu z ich powierzchnią. Zjawisko to wydaje się wspierać entropowy mechanizm stabilizacji białek przez osmolity. Sfera hydratacyjna tych modeli była natomiast wzmacniania w obecności destabilizującego osmolitu.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, efekt entalpowy wywierany przez osmolity na sfery hydratacyjne białek w formie zwiniętej i rozwiniętej jest najważniejszym czynnikiem określającym jego stabilność w roztworze. Efekt



entropowy wspomaga działanie osmolitów stabilizujących, z powodu destabilizacji rozwiniętej formy białka.

7. DOROBEK NAUKOWY

Artykuły opublikowane w ramach prezentowanej pracy doktorskiej:

1. M. Stasiulewicz, A. Panuszko, M. Śmiechowski, P. Bruździak, P. Maszota, and J. Stangret, *Effect of urea and glycine betaine on the hydration sphere of model molecules for the surface features of proteins*, J. Mol. Liq., vol. 324, p. 115090, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.molliq.2020.115090,

IF = 6,165, kwartył Q2, liczba punktów MEiN = 100.

2. M. Stasiulewicz, A. Panuszko, P. Bruździak, and J. Stangret, *Mechanism of Osmolyte Stabilization–Destabilization of Proteins: Experimental Evidence*, J. Phys. Chem. B, 2022, 126, 16, 2990–2999, doi: 10.1021/acs.jpcc.2c00281,

IF = 2.991, kwartył Q3, liczba punktów MEiN = 140.

Pozostałe artykuły:

- 1 A. Panuszko, M. G. Nowak, P. Bruździak, M. Stasiulewicz, and J. Stangret, *Amides as models to study the hydration of proteins and peptides — spectroscopic and theoretical approach on hydration in various temperatures*, J. Mol. Liq., vol. 278, pp. 706–715, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.01.086,

IF = 6,165, kwartył Q2, liczba punktów MEiN = 100.

- 2 A. Panuszko, P. Bruździak, M. Śmiechowski, M. Stasiulewicz, J. Stefaniak, and J. Stangret, *DMSO hydration redefined: Unraveling the hydrophobic hydration of solutes with a mixed hydrophilic–hydrophobic characteristic*, J. Mol. Liq., vol. 294, p. 111661, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111661,

IF = 6,165, kwartył Q2, liczba punktów MEiN = 100.

Doniesienia konferencyjne:

1. M. Stasiulewicz A. Panuszko, J. Stangret, *Spectroscopic investigation of water structure around betaine*, **XIVth International Conference on Molecular Spectroscopy** From Molecules to Functional Materials, 2017, Białka Tatrzańska, Polska
2. M. Stasiulewicz A. Panuszko, J. Stangret, *Investigation of the Influence of N,N,N-trimethylglycine and Urea on the Hydration Sphere of N-methylacetamide by Means of FTIR Spectroscopy*, **XVth International Conference on Molecular Spectroscopy** From Molecules to Molecular Materials, Molecular Biological Systems and Nanostructures, 2019, Wojanów, Polska
3. M. Stasiulewicz, S. Filipkowski, A. Panuszko, *Hydration of Three-piece K Peptide Fragments Studied by Means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, **ICMS 2021: 15. International Conference on Molecular Spectroscopy**, 2021, Helsinki, Finlandia

Udział w projektach badawczych

1. Projekt badawczy NCN typu OPUS: Stabilność białek w wodnych roztworach osmolitów w oparciu o komplementarne podejście eksperymentalne i teoretyczne (projekt 2013/11/B/NZ1/02258). Kierownik – prof. dr hab. inż. Janusz Stangret (Katedra Chemii Fizycznej, Politechnika Gdańska). Część badań została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach powyższego projektu.
2. Projekt badawczy NCN typu SONATA: Wpływ właściwości wody hydratacyjnej na proces powstawania włókien amyloidowych (projekt 2017/26/D/NZ1/00497I) Kierownik – dr hab. inż. Piotr Bruździak (Katedra Chemii Fizycznej, Politechnika Gdańska). Część badań została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach powyższego projektu.

8. LITERATURA

- (1) Ball, P. Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (1), 74–108.
- (2) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. Preferential Interactions of Proteins with Solvent Components in Aqueous Amino Acid Solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *224* (1), 169–177.
- (3) Bolen, D. W.; Rose, G. D. Structure and Energetics of the Hydrogen-Bonded Backbone in Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77* (1), 339–362.
- (4) Canchi, D. R.; García, A. E. Cosolvent Effects on Protein Stability. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64* (1), 273–293.
- (5) Smiatek, J. Osmolyte Effects: Impact on the Aqueous Solution around Charged and Neutral Spheres. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (3), 771–782.
- (6) Niether, D.; Di Lecce, S.; Bresme, F.; Wiegand, S. Unravelling the Hydrophobicity of Urea in Water Using Thermodiffusion: Implications for Protein Denaturation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (2), 1012–1020.
- (7) Gekko, K.; Timasheff, S. N. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry* **1981**, *20* (16), 4667–4676.
- (8) Myers, J. K.; Nick Pace, C.; Martin Scholtz, J. Denaturant m Values and Heat Capacity Changes: Relation to Changes in Accessible Surface Areas of Protein Unfolding. *Protein Sci.* **1995**, *4* (10), 2138–2148.
- (9) Zou, Q.; Bennion, B. J.; Daggett, V.; Murphy, K. P. The Molecular Mechanism of Stabilization of Proteins by TMAO and Its Ability to Counteract the Effects of Urea. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (7), 1192–1202.
- (10) Bennion, B. J.; Daggett, V. The Molecular Basis for the Chemical Denaturation of Proteins by Urea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (9), 5142–5147.
- (11) Guo, F.; Friedman, J. M. Osmolyte-Induced Perturbations of Hydrogen Bonding between Hydration Layer Waters: Correlation with Protein Conformational Changes. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (52), 16632–16642.
- (12) Shukla, N.; Pomarico, E.; Chen, L.; Chergui, M.; Othon, C. M. Retardation of Bulk Water Dynamics by Disaccharide Osmolytes. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (35), 9477–9483.
- (13) Pattanayak, S. K.; Chettiyankandy, P.; Chowdhuri, S. Effects of Co-Solutes on the Hydrogen Bonding Structure and Dynamics in Aqueous N-Methylacetamide Solution: A Molecular Dynamics Simulations Study. *Mol. Phys.* **2014**, *112* (22), 2906–2919.
- (14) Lee, H.; Choi, J. H.; Verma, P. K.; Cho, M. Spectral Graph Analyses of Water Hydrogen-Bonding Network and Osmolyte Aggregate Structures in Osmolyte-Water Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (45), 14402–14412.
- (15) Wei, H.; Fan, Y.; Gao, Y. Q. Effects of Urea, Tetramethyl Urea, and Trimethylamine n-Oxide on Aqueous Solution Structure and Solvation of Protein Backbones: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (1), 557–568.
- (16) Shiraga, K.; Ogawa, Y.; Tanaka, K.; Arikawa, T.; Yoshikawa, N.; Nakamura, M.; Ajito, K.; Tajima, T. Coexistence of Kosmotropic and Chaotropic Impacts of Urea on Water As Revealed by Terahertz Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (3), 1268–1277.
- (17) Panuszko, A.; Bruździak, P.; Kaczkowska, E.; Stangret, J. General Mechanism of Osmolytes' Influence on Protein Stability Irrespective of the Type of Osmolyte Cosolvent. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (43), 11159–11169.

- (18) Panuszko, A.; Śmiechowski, M.; Stangret, J. Fourier Transform Infrared Spectroscopic and Theoretical Study of Water Interactions with Glycine and Its N -Methylated Derivatives. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134* (11), 115104.
- (19) Bruździak, P.; Panuszko, A.; Stangret, J. Influence of Osmolytes on Protein and Water Structure: A Step To Understanding the Mechanism of Protein Stabilization. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (39), 11502–11508.
- (20) Bruździak, P.; Panuszko, A.; Kaczkowska, E.; Piotrowski, B.; Dagher, A.; Demkowicz, S.; Stangret, J. Taurine as a Water Structure Breaker and Protein Stabilizer. *Amino Acids* **2018**, *50* (1), 125–140.
- (21) Panuszko, A.; Bruździak, P.; Kaczkowska, E.; Stangret, J. General Mechanism of Osmolytes' Influence on Protein Stability Irrespective of the Type of Osmolyte Cosolvent. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (43), 11159–11169.
- (22) Panuszko, A.; Wojciechowski, M.; Bruździak, P.; Rakowska, P. W.; Stangret, J. Characteristics of Hydration Water around Hen Egg Lysozyme as the Protein Model in Aqueous Solution. FTIR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (45), 15765–15773.
- (23) Panuszko, A.; Nowak, M. G.; Bruździak, P.; Stasiulewicz, M.; Stangret, J. Amides as Models to Study the Hydration of Proteins and Peptides — Spectroscopic and Theoretical Approach on Hydration in Various Temperatures. *J. Mol. Liq.* **2019**, *278*, 706–715.
- (24) Panuszko, A.; Bruździak, P.; Śmiechowski, M.; Stasiulewicz, M.; Stefaniak, J.; Stangret, J. DMSO Hydration Redefined: Unraveling the Hydrophobic Hydration of Solutes with a Mixed Hydrophilic–Hydrophobic Characteristic. *J. Mol. Liq.* **2019**, *294*, 111661.
- (25) Bruździak, P.; Panuszko, A.; Piotrowski, B.; Stangret, J. Structural Changes of a Simple Peptide—Trpzip-1—in Aqueous Solutions and the Corresponding Hydration Phenomena under the Influence of Temperature. *J. Mol. Liq.* **2019**, *277*, 532–540.
- (26) Biswas, A.; Mallik, B. S. Distinctive Behavior and Two-Dimensional Vibrational Dynamics of Water Molecules inside Glycine Solvation Shell. *RSC Adv.* **2020**, *10* (11), 6658–6670.
- (27) Tompa, P.; Bánki, P.; Bokor, M.; Kamasa, P.; Kovács, D.; Lasanda, G.; Tompa, K. Protein-Water and Protein-Buffer Interactions in the Aqueous Solution of an Intrinsically Unstructured Plant Dehydrin: NMR Intensity and DSC Aspects. *Biophys. J.* **2006**, *91* (6), 2243–2249.
- (28) Rodwell W., V.; Bender A., D.; Botham M., K.; Kennelly J., P.; Weil, P. A. *Ilustrowana Biochemia Harpera.*; Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Weil, P. A., Eds.; PZWL Wydawnictwo Lekarskie: Warszawa, 2018.
- (29) Sudha, R.; Jarrold, M. F. Left-Handed and Ambidextrous Helices in the Gas Phase. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (23), 11777–11780.
- (30) Marechal Yves. *The Hydrogen Bond and the Water Molecule*; Elsevier: Amsterdam, 2007.
- (31) Lesser, G. J.; Rose, G. D. Hydrophobicity of Amino Acid Subgroups in Proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **1990**, *8* (1), 6–13.
- (32) Anfinsen, C. B. Principles That Govern Protein Folding. *Science* (80-.). **1973**, *181* (4096), 223–230.
- (33) Tanford, C. The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter. *Science* (80-.). **1978**, *200* (4345), 1012–1018.
- (34) Charton, M.; Charton, B. I. The Structural Dependence of Amino Acid Hydrophobicity Parameters. *J. Theor. Biol.* **1982**, *99* (4), 629–644.

- (35) Baldwin, R. L. Temperature Dependence of the Hydrophobic Interaction in Protein Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83* (21), 8069–8072.
- (36) Dill, K. A. Dominant Forces in Protein Folding. *Biochemistry* **1990**, *29* (31), 7133–7155.
- (37) Kauzmann, W. Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. *Adv. Protein Chem.* **1959**, *14* (C), 1–63.
- (38) Baldwin, R. L. Dynamic Hydration Shell Restores Kauzmann's 1959 Explanation of How the Hydrophobic Factor Drives Protein Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (36), 13052–13056.
- (39) Duboué-Dijon, E.; Laage, D. Characterization of the Local Structure in Liquid Water by Various Order Parameters. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (26), 8406–8418.
- (40) Chandler, D. Interfaces and the Driving Force of Hydrophobic Assembly. *Nature* **2005**, *437* (7059), 640–647.
- (41) Ball, P. Water Is an Activematrix of Life for Cell and Molecular Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (51), 13327–13335.
- (42) Rupley, J. A.; Careri, G. Protein Hydration and Function. In *Advances in Protein Chemistry*; Academic Press, 1991; Vol. 41, pp 37–172.
- (43) Makhatadze, G. I.; Privalov, P. L. Contribution of Hydration to Protein Folding Thermodynamics. I. The Enthalpy of Hydration. *J. Mol. Biol.* **1993**, *232* (2), 639–659.
- (44) Heremans, K. High Pressure Effects on Proteins and Other Biomolecules. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1982**, *11* (1), 1–21.
- (45) Timasheff, S. N. The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect These Processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, *22* (1), 67–97.
- (46) Rani, A.; Venkatesu, P. Changing Relations between Proteins and Osmolytes: A Choice of Nature. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (31), 20315–20333.
- (47) Kamerzell, T. J.; Middaugh, C. R. The Complex Inter-Relationships between Protein Flexibility and Stability. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (9), 3494–3517.
- (48) Pal, S. K.; Peon, J.; Bagchi, B.; Zewail, A. H. Biological Water: Femtosecond Dynamics of Macromolecular Hydration. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (48), 12376–12395.
- (49) Garczarek, F.; Gerwert, K. Functional Waters in Intraprotein Proton Transfer Monitored by FTIR Difference Spectroscopy. *Nature* **2006**, *439* (7072), 109–112.
- (50) Makarov, V. A.; Andrews, B. K.; Smith, P. E.; Pettitt, B. M. Residence Times of Water Molecules in the Hydration Sites of Myoglobin. *Biophys. J.* **2000**, *79* (6), 2966–2974.
- (51) Brotzakis, Z. F.; Groot, C. C. M.; Brandeburgo, W. H.; Bakker, H. J.; Bolhuis, P. G. Dynamics of Hydration Water around Native and Misfolded α -Lactalbumin. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (21), 4756–4766.
- (52) Despa, F.; Fernández, A.; Stephen Berry, R. Dielectric Modulation of Biological Water. **2004**.
- (53) Drost-Hansen, W. Water: The Structure and Properties of Water. D. Eisenberg and W. Kauzmann. Oxford University Press, New York, 1969. Xiv + 300 Pp., Illus. Cloth, \$10; Paper, \$4.50. *Science* (80-.). **1969**, *166* (3907), 861–861.
- (54) Sapir, L.; Harries, D. Is the Depletion Force Entropic? Molecular Crowding beyond Steric Interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2015**, *20* (1), 3–10.



- (55) Grdadolnik, J.; Merzel, F.; Avbelj, F. Origin of Hydrophobicity and Enhanced Water Hydrogen Bond Strength near Purely Hydrophobic Solutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (2), 322–327.
- (56) 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* (12), 3056–3067.
- (57) Frank, H. S.; Evans, M. W. Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13* (11), 507–532.
- (58) Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1993**, *32* (11), 1545–1579.
- (59) Laage, D.; Stirnemann, G.; Hynes, J. T. Why Water Reorientation Slows without Iceberg Formation around Hydrophobic Solutes. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (8), 2428–2435.
- (60) Bowron, D. T.; Filipponi, A.; Roberts, M. A.; Finney, J. L. Hydrophobic Hydration and the Formation of a Clathrate Hydrate. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81* (19), 4164–4167.
- (61) Koh, C. A.; Wisbey, R. P.; Wu, X.; Westacott, R. E.; Soper, A. K. Water Ordering around Methane during Hydrate Formation. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113* (15), 6390–6397.
- (62) Buchanan, P.; Aldiwan, N.; Soper, A. K.; Creek, J. L.; Koh, C. A. Decreased Structure on Dissolving Methane in Water. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *415* (1–3), 89–93.
- (63) Wu, X.; Lu, W.; Streacker, L. M.; Ashbaugh, H. S.; Ben-Amotz, D. Temperature-Dependent Hydrophobic Crossover Length Scale and Water Tetrahedral Order. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (5), 1012–1017.
- (64) Scatena, L. F.; Brown, M. G.; Richmond, G. L. Water at Hydrophobic Surfaces: Weak Hydrogen Bonding and Strong Orientation Effects. *Science (80-.)*. **2001**, *292* (5518), 908–912.
- (65) Strazdaite, S.; Versluis, J.; Backus, E. H. G.; Bakker, H. J. Enhanced Ordering of Water at Hydrophobic Surfaces. *J. Chem. Phys.* **2014**, *140* (5), 054711.
- (66) Baldwin, R. L.; Rose, G. D. How the Hydrophobic Factor Drives Protein Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (44), 12462–12466.
- (67) Nozaki, Y.; Tanford, C. The Solubility of Amino Acids and Two Glycine Peptides in Aqueous Ethanol and Dioxane Solutions. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (7), 2211–2217.
- (68) Jorgensen, W. L.; Ravimohan, C. Monte Carlo Simulation of Differences in Free Energies of Hydration. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83* (6), 3050–3054.
- (69) Ben-Amotz, D. Hydration-Shell Vibrational Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (27), 10569–10580.
- (70) Zukowski, S. R.; Mitev, P. D.; Hermansson, K.; Ben-Amotz, D. CO₂ Hydration Shell Structure and Transformation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8* (13), 2971–2975.
- (71) Wu, X.; Lu, W.; Streacker, L. M.; Ashbaugh, H. S.; Ben-Amotz, D. Methane Hydration-Shell Structure and Fragility. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (46), 15133–15137.
- (72) Davis, J. G.; Zukowski, S. R.; Rankin, B. M.; Ben-Amotz, D. Influence of a Neighboring Charged Group on Hydrophobic Hydration Shell Structure. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (29), 9417–9422.
- (73) Yancey, P. H.; Clark, M. E.; Hand, S. C.; Bowlus, R. D.; Somero, G. N. Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science (80-.)*. **1982**, *217* (4566), 1214–1222.



- (74) Yancey, P. H. Water Stress, Osmolytes and Proteins. *Am. Zool.* **2001**, *41* (4), 699–709.
- (75) Yancey, P. H. Organic Osmolytes as Compatible, Metabolic and Counteracting Cytoprotectants in High Osmolarity and Other Stresses. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208* (15), 2819–2830.
- (76) Santoro, M. M.; Liu, Y.; Khan, S. M. A.; Hou, L. X.; Bolen, D. W. Increased Thermal Stability of Proteins in the Presence of Naturally Occurring Osmolytes. *Biochemistry* **1992**, *31* (23), 5278–5283.
- (77) Pollard, A.; Wyn Jones, R. G. Enzyme Activities in Concentrated Solutions of Glycinebetaine and Other Solutes. *Planta* **1979**, *144* (3), 291–298.
- (78) Lin, T. Y.; Timasheff, S. N. Why Do Some Organisms Use a Urea-Methylamine Mixture as Osmolyte? Thermodynamic Compensation of Urea and Trimethylamine N-Oxide Interactions with Protein. *Biochemistry* **1994**, *33* (42), 12695–12701.
- (79) Privalov, P. L. Cold Denaturation of Protein. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *25* (4), 281–306.
- (80) Chambers, S.; Kunin, C. M. The Osmoprotective Properties of Urine for Bacteria : The Protective Effect of Betaine and Human Urine against Low PH and High Concentrations of Electrolytes , Sugars , and Urea Author (s): Stephen Chambers and Calvin M . Kunin Published by : Oxford Uni. *J. Infect. Dis.* **1985**, *152* (6), 1308–1316.
- (81) Pollard, A.; Wyn Jones, R. G. Enzyme Activities in Concentrated Solutions of Glycinebetaine and Other Solutes. *Planta* **1979**, *144* (3), 291–298.
- (82) Cleland, D.; Krader, P.; McCree, C.; Tang, J.; Emerson, D. Glycine Betaine as a Cryoprotectant for Prokaryotes. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *58* (1), 31–38.
- (83) Gordon, J. A.; Jencks, W. P. The Relationship of Structure to the Effectiveness of Denaturing Agents for Proteins. *Biochemistry* **1963**, *2* (1), 47–57.
- (84) Kumar, A.; Venkatesu, P. Overview of the Stability of α -Chymotrypsin in Different Solvent Media. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (7), 4283–4307.
- (85) Bagnasco, S. M.; Uchida, S.; Balaban, R. S.; Kador, P. F.; Burg, M. B. Induction of Aldose Reductase and Sorbitol in Renal Inner Medullary Cells by Elevated Extracellular NaCl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (6), 1718–1720.
- (86) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. Stabilization of Protein Structure by Sugars. *Biochemistry* **1982**, *21* (25), 6536–6544.
- (87) Schneck, E.; Horinek, D.; Netz, R. R. Insight into the Molecular Mechanisms of Protein Stabilizing Osmolytes from Global Force-Field Variations. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (28), 8310–8321.
- (88) Collins, K. D. Ions from the Hofmeister Series and Osmolytes: Effects on Proteins in Solution and in the Crystallization Process. *Methods* **2004**, *34* (3), 300–311.
- (89) Asakura, S.; Oosawa, F. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of Macromolecules. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22* (7), 1255–1256.
- (90) Asakura, S.; Oosawa, F. Interaction between Particles Suspended in Solutions of Macromolecules. *J. Polym. Sci.* **1958**, *33* (126), 183–192.
- (91) Minton, A. P. A Molecular Model for the Dependence of the Osmotic Pressure of Bovine Serum Albumin upon Concentration and PH. *Biophys. Chem.* **1995**, *57* (1), 65–70.
- (92) Bechinger, C.; Rudhardt, D.; Leiderer, P.; Roth, R.; Dietrich, S. Understanding Depletion Forces beyond Entropy. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83* (19), 3960–3963.



- (93) Davis-Searles, P. R.; Saunders, A. J.; Erie, D. A.; Winzor, D. J.; Pielak, G. J. Interpreting the Effects of Small Uncharged Solutes on Protein-Folding Equilibria. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 271–306.
- (94) Hall, D.; Minton, A. P. Macromolecular Crowding: Qualitative and Semiquantitative Successes, Quantitative Challenges. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2003**, *1649* (2), 127–139.
- (95) Zhou, H. X.; Rivas, G.; Minton, A. P. Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375–397.
- (96) Knowles, D. B.; LaCroix, A. S.; Deines, N. F.; Shkel, I.; Record, M. T. Separation of Preferential Interaction and Excluded Volume Effects on DNA Duplex and Hairpin Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (31), 12699–12704.
- (97) Kim, Y. C.; Mittal, J. Crowding Induced Entropy-Enthalpy Compensation in Protein Association Equilibria. *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *110* (20), 208102.
- (98) Minton, A. P. Quantitative Assessment of the Relative Contributions of Steric Repulsion and Chemical Interactions to Macromolecular Crowding. *Biopolymers* **2013**, *99* (4), 239–244.
- (99) Auton, M.; Holthausen, L. M. F.; Bolen, D. W. Anatomy of Energetic Changes Accompanying Urea-Induced Protein Denaturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (39), 15317–15322.
- (100) Bolen, D. W.; Baskakov, I. V. The Osmophobic Effect: Natural Selection of a Thermodynamic Force in Protein Folding. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310* (5), 955–963.
- (101) Street, T. O.; Bolen, D. W.; Rose, G. D. A Molecular Mechanism for Osmolyte-Induced Protein Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (38), 13997–14002.
- (102) Timasheff, S. N. Protein Hydration, Thermodynamic Binding, and Preferential Hydration. *Biochemistry* **2002**, *41* (46), 13473–13482.
- (103) Kumar, N.; Kishore, N. Mechanistic Insights into Osmolyte Action in Protein Stabilization under Harsh Conditions: N-Methylacetamide in Glycine Betaine-Urea Mixture. *Chem. Phys.* **2014**, *443*, 133–141.
- (104) Cho, S. S.; Reddy, G.; Straub, J. E.; Thirumalai, D. Entropic Stabilization of Proteins by TMAO. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (45), 13401–13407.
- (105) Schroer, M. A.; Michalowsky, J.; Fischer, B.; Smiatek, J.; Grübel, G. Stabilizing Effect of TMAO on Globular PNIPAM States: Preferential Attraction Induces Preferential Hydration. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (46), 31459–31470.
- (106) Liao, Y. T.; Manson, A. C.; DeLyser, M. R.; Noid, W. G.; Cremer, P. S. Trimethylamine N-Oxide Stabilizes Proteins via a Distinct Mechanism Compared with Betaine and Glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (10), 2479–2484.
- (107) Felitsky, D. J.; Cannon, J. G.; Capp, M. W.; Hong, J.; Van Wynsberghe, A. W.; Anderson, C. F.; Record, M. T. The Exclusion of Glycine Betaine from Anionic Biopolymer Surface: Why Glycine Betaine Is an Effective Osmoprotectant but Also a Compatible Solute. *Biochemistry* **2004**, *43* (46), 14732–14743.
- (108) Hu, C. Y.; Lynch, G. C.; Kokubo, H.; Montgomery Pettitt, B. Trimethylamine N-Oxide Influence on the Backbone of Proteins: An Oligoglycine Model. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2010**, *78* (3), 695–704.
- (109) Jamal, S.; Kumari, A.; Singh, A.; Goyal, S.; Grover, A. Conformational Ensembles of α -Synuclein Derived Peptide with Different Osmolytes from Temperature Replica Exchange Sampling. *Front. Neurosci.* **2017**, *11* (DEC), 684.



- (110) Bischofberger, I.; Calzolari, D. C. E.; De Los Rios, P.; Jelezarov, I.; Trappe, V. Hydrophobic Hydration of Poly-N-Isopropyl Acrylamide: A Matter of the Mean Energetic State of Water. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4667–4676.
- (111) Stanley, C.; Rau, D. C. Assessing the Interaction of Urea and Protein-Stabilizing Osmolytes with the Nonpolar Surface of Hydroxypropylcellulose†. *Biochemistry* **2008**, *47* (25), 6711–6718.
- (112) Hovagimyan, K. G.; Gerig, J. T. Interactions of Trimethylamine N-Oxide and Water with Cyclo-Alanylglycine. **2005**.
- (113) Bruździak, P.; Adamczak, B.; Kaczkowska, E.; Czub, J.; Stangret, J. Are Stabilizing Osmolytes Preferentially Excluded from the Protein Surface? FTIR and MD Studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (35), 23155–23164.
- (114) Tanford, C. Isothermal Unfolding of Globular Proteins in Aqueous Urea Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (10), 2050–2059.
- (115) Auton, M.; Bolen, D. W. Additive Transfer Free Energies of the Peptide Backbone Unit That Are Independent of the Model Compound and the Choice of Concentration Scale. *Biochemistry* **2004**, *43* (5), 1329–1342.
- (116) Auton, M.; Bolen, D. W. Prediction the Energetics of Osmolyte-Induced Protein Folding/Unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (42), 15065–15068.
- (117) Kumar, N.; Kishore, N. Effect of Glycine Betaine on the Hydrophobic Interactions in the Presence of Denaturant: A Molecular Dynamics Study. *J. Mol. Liq.* **2016**, *215*, 104–109.
- (118) Sarma, R.; Paul, S. Hydrophobic Interactions in Presence of Osmolytes Urea and Trimethylamine-N-Oxide. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135* (17), 174501.
- (119) Sarma, R.; Paul, S. Crucial Importance of Water Structure Modification on Trimethylamine N - Oxide Counteracting Effect at High Pressure. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (2), 677–689.
- (120) Paul, S.; Paul, S. Trehalose Induced Modifications in the Solvation Pattern of N-Methylacetamide. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (4), 1052–1063.
- (121) Paul, S.; Paul, S. Influence of Temperature on the Solvation of N-Methylacetamide in Aqueous Trehalose Solution: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Mol. Liq.* **2015**, *211*, 986–999.
- (122) Sarma, R.; Paul, S. Exploring the Molecular Mechanism of Trimethylamine-N-Oxide's Ability to Counteract the Protein Denaturing Effects of Urea. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (18), 5691–5704.
- (123) Paul, S.; Paul, S. Exploring the Counteracting Mechanism of Trehalose on Urea Conferred Protein Denaturation: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (30), 9820–9834.
- (124) Paul, S.; Paul, S. Influence of Temperature on the Solvation of N-Methylacetamide in Aqueous Trehalose Solution: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Mol. Liq.* **2015**, *211*, 986–999.
- (125) Chand, A.; Chowdhuri, S. A Comparative Study of Hydrogen Bonding Structure and Dynamics in Aqueous Urea Solution of Amides with Varying Hydrophobicity: Effect of Addition of Trimethylamine N-Oxide (TMAO). *J. Mol. Liq.* **2017**, *242*, 70–81.
- (126) Johnson, M. E.; Malardier-Jugroot, C.; Head-Gordon, T. Effects of Co-Solvents on Peptide Hydration Water Structure and Dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (2), 393–405.
- (127) Malardier-Jugroot, C.; Bowron, D. T.; Soper, A. K.; Johnson, M. E.; Head-Gordon, T. Structure and Water Dynamics of Aqueous Peptide Solutions in the Presence of Co-Solvents. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (2), 382–392.



- (128) Panuszko, A.; Pieloszczyk, M.; Kuffel, A.; Jacek, K.; Biernacki, K. A.; Demkowicz, S.; Stangret, J.; Bruździak, P. Hydration of Simple Model Peptides in Aqueous Osmolyte Solutions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (17), 9350.
- (129) Jas, G. S.; Rentchler, E. C.; Słowicka, A. M.; Hermansen, J. R.; Johnson, C. K.; Middaugh, C. R.; Kuczera, K. Reorientation Motion and Preferential Interactions of a Peptide in Denaturants and Osmolyte. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120* (12), 3089–3099.
- (130) Kuczera, K.; Jas, G. S.; Ekiel-Jeżewska, M. L.; Melikhov, Y. Reorientation Motions of N - Acetyl-Tryptophan-Amide (NATA Dipeptide) in Aqueous Solution and with Co-Solvents: Molecular Dynamics vs Hydrodynamic Model. *Phys. Fluids* **2020**, *32* (12).
- (131) Kang, N. S.; Yu, J. Y.; Jhon, M. S. Effect of Cosolvent on a Tripeptide Solution Using Molecular Dynamics Simulations. *J. Mol. Struct.* **1995**, *355* (2), 201–209.
- (132) Sarma, R.; Paul, S. Interactions of S-Peptide Analogue in Aqueous Urea and Trimethylamine- N - Oxide Solutions: A Molecular Dynamics Simulation Study. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139* (3), 034504.
- (133) Oprzeska-Zingrebe, E. A.; Smiatek, J. Aqueous Mixtures of Urea and Trimethylamine-N-Oxide: Evidence for Kosmotropic or Chaotropic Behavior? *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (20), 4415–4424.
- (134) Panuszko, A.; Stangret, J.; Nowosielski, B.; Bruździak, P. Interactions between Hydration Spheres of Two Different Solutes in Solution: The Least Squares Fitting with Constraints as a Tool to Determine Water Properties in Ternary Systems. *J. Mol. Liq.* **2020**, *310*, 113181.
- (135) Stasiulewicz, M.; Panuszko, A.; Śmiechowski, M.; Bruździak, P.; Maszota, P.; Stangret, J. Effect of Urea and Glycine Betaine on the Hydration Sphere of Model Molecules for the Surface Features of Proteins. *J. Mol. Liq.* **2021**, *324*, 115090.
- (136) Panuszko, A.; Pieloszczyk, M.; Kuffel, A.; Jacek, K.; Biernacki, K. A.; Demkowicz, S.; Stangret, J.; Bruździak, P. Hydration of Simple Model Peptides in Aqueous Osmolyte Solutions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (17), 9350.
- (137) Cochran, A. G.; Tong, R. T.; Starovasnik, M. A.; Park, E. J.; McDowell, R. S.; Theaker, J. E.; Skelton, N. J. A Minimal Peptide Scaffold for β -Turn Display: Optimizing a Strand Position in Disulfide-Cyclized β -Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (4), 625–632.
- (138) Cochran, A. G.; Skelton, N. J.; Starovasnik, M. A. Tryptophan Zippers: Stable, Monomeric β -Hairpins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (10), 5578–5583.
- (139) Vinh, N. Q.; Allen, S. J.; Plaxco, K. W. Dielectric Spectroscopy of Proteins as a Quantitative Experimental Test of Computational Models of Their Low-Frequency Harmonic Motions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (23), 8942–8947.
- (140) Xu, J.; Plaxco, K. W.; Allen, S. J. Collective Dynamics of Lysozyme in Water: Terahertz Absorption Spectroscopy and Comparison with Theory. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110* (47), 24255–24259.
- (141) Bellavia, G.; Paccou, L.; Achir, S.; Guinet, Y.; Siepmann, J.; Hédoux, A. Analysis of Bulk and Hydration Water During Thermal Lysozyme Denaturation Using Raman Scattering. *Food Biophys.* **2013**, *8* (3), 170–176.
- (142) 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. U. S. A.* **1998**, *95* (5), 2267–2272.
- (143) Merzel, F.; Smith, J. C. Is the First Hydration Shell of Lysozyme of Higher Density than Bulk Water? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (8), 5378–5383.



- (144) Del Galdo, S.; Marracino, P.; D'Abramo, M.; Amadei, A. In Silico Characterization of Protein Partial Molecular Volumes and Hydration Shells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (46), 31270–31277.
- (145) Del Galdo, S.; Amadei, A. The Unfolding Effects on the Protein Hydration Shell and Partial Molar Volume: A Computational Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (40), 28175–28182.
- (146) Ortore, M. G.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Paciaroni, A.; Barbosa, L. R. S.; Amenitsch, H.; Steinhart, M.; Ollivier, J.; Russo, D. Combining Structure and Dynamics: Non-Denaturing High-Pressure Effect on Lysozyme in Solution. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6* (SUPPL. 5).
- (147) Mallamace, D.; Fazio, E.; Mallamace, F.; Corsaro, C. The Role of Hydrogen Bonding in the Folding/Unfolding Process of Hydrated Lysozyme: A Review of Recent NMR and FTIR Results. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (12), 3825.
- (148) Green, J. L.; Fan, J.; Angell, C. A. The Protein-Glass Analogy: Some Insights from Homopeptide Comparisons. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (51), 13780–13790.
- (149) Hédoux, A.; Ionov, R.; Willart, J. F.; Lerbret, A.; Affouard, F.; Guinet, Y.; Descamps, M.; Prévost, D.; Paccou, L.; Danéde, F. Evidence of a Two-Stage Thermal Denaturation Process in Lysozyme: A Raman Scattering and Differential Scanning Calorimetry Investigation. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (1), 014703.
- (150) Dinner, A. R.; Šalib, A.; Smitha, L. J.; Dobson, C. M.; Karplus, M. Understanding Protein Folding via Free-Energy Surfaces from Theory and Experiment. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Current Trends July 1, 2000, pp 331–339.
- (151) Stirling, P. C.; Lundin, V. F.; Leroux, M. R. Getting a Grip on Non-Native Proteins. *EMBO Rep.* **2003**, *4* (6), 565–570.
- (152) Meersman, F.; Atilgan, C.; Miles, A. J.; Bader, R.; Shang, W.; Matagné, A.; Wallace, B. A.; Koch, M. H. J. Consistent Picture of the Reversible Thermal Unfolding of Hen Egg-White Lysozyme from Experiment and Molecular Dynamics. *Biophys. J.* **2010**, *99* (7), 2255–2263.
- (153) Arakawa, T.; Timasheff, S. N. The Stabilization of Proteins by Osmolytes. *Biophys. J.* **1985**, *47* (3), 411–414.
- (154) Anjum, F.; Rishi, V.; Ahmad, F. Compatibility of Osmolytes with Gibbs Energy of Stabilization of Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1476* (1), 75–84.
- (155) Al-Ayoubi, S. R.; Schummel, P. H.; Golub, M.; Peters, J.; Winter, R. Influence of Cosolvents, Self-Crowding, Temperature and Pressure on the Sub-Nanosecond Dynamics and Folding Stability of Lysozyme. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (22), 14230–14237.
- (156) Platts, L.; Falconer, R. J. Controlling Protein Stability: Mechanisms Revealed Using Formulations of Arginine, Glycine and Guanidinium HCl with Three Globular Proteins. *Int. J. Pharm.* **2015**, *486* (1–2), 131–135.
- (157) Gopal, S.; Ahluwalia, J. C. Effect of Osmoregulatory Solutes on the Stability of Proteins. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, *89* (15), 2769–2774.
- (158) Hédoux, A.; Krenzlin, S.; Paccou, L.; Guinet, Y.; Flament, M. P.; Siepmann, J. Influence of Urea and Guanidine Hydrochloride on Lysozyme Stability and Thermal Denaturation; A Correlation between Activity, Protein Dynamics and Conformational Changes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (40), 13189–13196.
- (159) Dong, X. Y.; Liu, J. H.; Liu, F. F.; Sun, Y. Self-Interaction of Native and Denatured Lysozyme in the Presence of Osmolytes, L-Arginine and Guanidine Hydrochloride. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *43* (3), 321–326.

- (160) Kinne-Saffran, E.; Kinne, R. K. H. Vitalism and Synthesis of Urea. *Am. J. Nephrol.* **1999**, *19* (2), 290–294.
- (161) Hammes, G. G.; Schimmel, P. R. An Investigation of Water-Urea and Water-Urea-Polyethylene Glycol Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (2), 442–446.
- (162) Beauregard, D. V.; Barrett, R. E. Ultrasonics and Water Structure in Urea Solutions. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49* (12), 5241–5244.
- (163) Adams, R.; Balyuzi, H. H. M.; Burge, R. E. X-Ray Diffraction Studies of Aqueous Solutions of Urea. *J. Appl. Crystallogr.* **1977**, *10* (4), 256–261.
- (164) Soper, A. K. Neutron Scattering Studies of Solvent Structure in Systems of Chemical and Biological Importance. *Faraday Discuss.* **1996**, *103* (0), 41–58.
- (165) Grant, E. H.; Keefe, S. E.; Shack, R. Dielectric Dispersion of Urea and Thiourea. *Adv. Mol. Relax. Process.* **1972**, *4* (3–4), 217–228.
- (166) Funkner, S.; Havenith, M.; Schwaab, G. Urea, a Structure Breaker? Answers from THz Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (45), 13374–13380.
- (167) Grdadolnik, J.; Maréchal, Y. Urea and Urea-Water Solutions - An Infrared Study. *J. Mol. Struct.* **2002**, *615* (1–3), 177–189.
- (168) Hoccart, X.; Turrell, G. Dynamics of Urea-Water Complexes. *J. Mol. Struct.* **1995**, *349*, 141–144.
- (169) Idrissi, A.; Bartolini, P.; Ricci, M.; Righini, R. Temperature Dependence of the Reorientational Dynamics and Low-Frequency Response of Aqueous Urea Solutions Investigated by Femtosecond Optical Kerr-Effect Spectroscopy and Molecular-Dynamics Simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5* (20), 4666–4671.
- (170) Shimizu, A.; Fumino, K.; Yukiyasu, K.; Taniguchi, Y. NMR Studies on Dynamic Behavior of Water Molecule in Aqueous Denaturant Solutions at 25 °C: Effects of Guanidine Hydrochloride, Urea and Alkylated Ureas. *J. Mol. Liq.* **2000**, *85* (3), 269–278.
- (171) Kokubo, H.; Pettitt, B. M. Preferential Solvation in Urea Solutions at Different Concentrations: Properties from Simulation Studies. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (19), 5233–5242.
- (172) Hernández-Cobos, J.; Ortega-Blake, I.; Bonilla-Marín, M.; Moreno-Bello, M. A Refined Monte Carlo Study of Aqueous Urea Solutions. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99* (11), 9122–9134.
- (173) Bertran, C. A.; Cirino, J. J. V.; Freitas, L. C. G. Theoretical Studies of Concentrated Aqueous Urea Solutions Using Computational Monte Carlo Simulation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13* (2), 238–244.
- (174) Astrand, P. O.; Wallqvist, A.; Karlstrom, G.; Linse, P. Properties of Urea-Water Solvation Calculated from a New Ab Initio Polarizable Intermolecular Potential. *J. Chem. Phys.* **1991**, *95* (11), 8419–8429.
- (175) Ramondo, F.; Bencivenni, L.; Caminiti, R.; Pieretti, A.; Gontrani, L. Dimerisation of Urea in Water Solution: A Quantum Mechanical Investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (18), 2206–2215.
- (176) Frank, H. S.; Franks, F. Structural Approach to the Solvent Power of Water for Hydrocarbons; Urea as a Structure Breaker. *J. Chem. Phys.* **1968**, *48* (10), 4746–4757.
- (177) Kallies, B. Coupling of Solvent and Solute Dynamics - Molecular Dynamics Simulations of Aqueous Urea Solutions with Different Intramolecular Potentials. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4* (1), 86–95.



- (178) Idrissi, A.; Gerard, M.; Damay, P.; Kiselev, M.; Puhovsky, Y.; Cinar, E.; Lagant, P.; Vergoten, G. The Effect of Urea on the Structure of Water: A Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (13), 4731–4738.
- (179) Samanta, N.; Das Mahanta, D.; Kumar Mitra, R. Does Urea Alter the Collective Hydrogen-Bond Dynamics in Water? A Dielectric Relaxation Study in the Terahertz-Frequency Region. *Chem. - An Asian J.* **2014**, *9* (12), 3457–3463.
- (180) Stumpe, M. C.; Grubmüller, H. Aqueous Urea Solutions: Structure, Energetics, and Urea Aggregation. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (22), 6220–6228.
- (181) Motin, M. A.; Biswas, T. K.; Huque, E. M. Volumetric and Viscometric Studies on an Aqueous Urea Solution. *Phys. Chem. Liq.* **2002**, *40* (5), 593–605.
- (182) Kresheck, G. C.; Scheraga, H. A. The Temperature Dependence of the Enthalpy of Formation of the Amide Hydrogen Bond; the Urea Model. *J. Phys. Chem.* **1965**, *69* (5), 1704–1706.
- (183) Stokes, R. H. Thermodynamics of Aqueous Urea Solutions. *Aust. J. Chem.* **1967**, *20* (10), 2087–2100.
- (184) Carr, J. K.; Buchanan, L. E.; Schmidt, J. R.; Zanni, M. T.; Skinner, J. L. Structure and Dynamics of Urea/Water Mixtures Investigated by Vibrational Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (42), 13291–13300.
- (185) Rezus, Y. L. A.; Bakker, H. J. Effect of Urea on the Structural Dynamics of Water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (49), 18417–18420.
- (186) Klimov, D. K.; Straub, J. E.; Thirumalai, D. Aqueous Urea Solution Destabilizes A β 16–22 Oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (41), 14760–14765.
- (187) Hua, L.; Zhou, R.; Thirumalai, C. D.; Berne, B. J. Urea Denaturation by Stronger Dispersion Interactions with Proteins than Water Implies a 2-Stage Unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (44), 16928–16933.
- (188) Wei, H.; Shao, Q.; Gao, Y. Q. The Effects of Side Chain Hydrophobicity on the Denaturation of Simple β -Hairpins. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (32), 9292–9299.
- (189) Wei, H.; Yang, L.; Gao, Y. Q. Mutation of Charged Residues to Neutral Ones Accelerates Urea Denaturation of HP-35. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (36), 11820–11826.
- (190) Canchi, D. R.; Garcíá, A. E. Backbone and Side-Chain Contributions in Protein Denaturation by Urea. *Biophys. J.* **2011**, *100* (6), 1526–1533.
- (191) Guinn, E. J.; Pegram, L. M.; Capp, M. W.; Pollock, M. N.; Record, M. T. Quantifying Why Urea Is a Protein Denaturant, Whereas Glycine Betaine Is a Protein Stabilizer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (41), 16932–16937.
- (192) Lee, S.; Shek, Y. L.; Chalikian, T. V. Urea Interactions with Protein Groups: A Volumetric Study. *Biopolymers* **2010**, *93* (10), 866–879.
- (193) Li, T.; Cui, Y.; Mathaga, J.; Kumar, R.; Kuroda, D. G. Hydration and Vibrational Dynamics of Betaine (N,N,N-Trimethylglycine). *J. Chem. Phys.* **2015**, *142* (21), 212438.
- (194) White, A.; Jiang, S. Local and Bulk Hydration of Zwitterionic Glycine and Its Analogues through Molecular Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (4), 660–667.
- (195) Sironi, M.; Fornilia, A.; Fornili, S. L. Water Interaction with Glycine Betaine: A Hybrid QM/MM Molecular Dynamics Simulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3* (6), 1081–1085.
- (196) Civera, M.; Fornili, A.; Sironi, M.; Fornili, S. L. *Molecular Dynamics Simulation of Aqueous Solutions of Glycine Betaine*; 2003; Vol. 367.

- (197) Chang, H. C.; Lee, K. M.; Jiang, J. C.; Lin, M. S.; Chen, J. S.; Lin, I. J. B.; Lin, S. H. Charge-Enhanced C-H-O Interactions of a Self-Assembled Triple Helical Spine Probed by High-Pressure. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117* (4), 1723–1728.
- (198) Hayashi, Y.; Katsumoto, Y.; Omori, S.; Kishii, N.; Yasuda, A. Liquid Structure of the Urea - Water System Studied by Dielectric Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (5), 1076–1080.
- (199) Hower, J. C.; Bernards, M. T.; Chen, S.; Tsao, H. K.; Sheng, Y. J.; Jiang, S. Hydration of “Nonfouling” Functional Groups. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (1), 197–201.
- (200) Di Gioacchino, M.; Bruni, F.; Ricci, M. A. Aqueous Solution of Betaine: Hydration and Aggregation. *J. Mol. Liq.* **2020**, *318*, 114253.
- (201) Zeman, J.; Holm, C.; Smiatek, J. The Effect of Small Organic Cosolutes on Water Structure and Dynamics. *J. Chem. Eng. Data* **2020**, *65* (3), 1197–1210.
- (202) Jamal, S.; Poddar, N. K.; Singh, L. R.; Dar, T. A.; Rishi, V.; Ahmad, F. Relationship between Functional Activity and Protein Stability in the Presence of All Classes of Stabilizing Osmolytes. *FEBS J.* **2009**, *276* (20), 6024–6032.
- (203) Fedotova, M. V.; Kruchinin, S. E. Hydration and Ion-Binding of Glycine Betaine: How They May Be Involved into Protection of Proteins under Abiotic Stresses. *J. Mol. Liq.* **2017**, *244*, 489–498.
- (204) Liu, Y.; Bolen, D. W. The Peptide Backbone Plays a Dominant Role in Protein Stabilization by Naturally Occurring Osmolytes. *Biochemistry* **1995**, *34* (39), 12884–12891.
- (205) Lecomte, F.; Lucas, B.; Grégoire, G.; Schermann, J. P.; Desfrancois, C. Structures of Amide-Water Neutral Complexes from Dipole-Bound Anion Formation. *Eur. Phys. J. D* **2002**, *20* (3), 449–457.
- (206) Selvarengan, P.; Kolandaivel, P. G. Molecular Modeling of Dipeptide and Its Analogous Systems with Water. *J. Mol. Model.* **2004**, *10* (3), 198–203.
- (207) Jorgensen, W. L.; Gao, J. Cis-Trans Energy Difference for the Peptide Bond in the Gas Phase and in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (13), 4212–4216.
- (208) Radzicka, A.; Pedersen, L.; Wolfenden, R. Influences of Solvent Water on Protein Folding: Free Energies of Solvation of Cis and Trans Peptides Are Nearly Identical. *Biochemistry* **1988**, *27* (12), 4538–4541.
- (209) Song, S.; Asher, S. A.; Krimm, S.; Shaw, K. D. Ultraviolet Resonance Raman Studies of Trans and Cis Peptides: Photochemical Consequences of the Twisted Π^* Excited State. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (4), 1155–1163.
- (210) Jorgensen, W. L.; Swenson, C. J. Optimized Intermolecular Potential Functions for Amides and Peptides. Hydration of Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (6), 1489–1496.
- (211) Torii, H.; Tatsumi, T.; Tasumit, M. Effects of Hydration on the Structure, Vibrational Wavenumbers, Vibrational Force Field and Resonance Raman Intensities of N-Methylacetamide. *J. Raman Spectrosc.* **1998**, *29* (6), 537–546.
- (212) Yadav, V. K.; Chandra, A. First-Principles Simulation Study of Vibrational Spectral Diffusion and Hydrogen Bond Fluctuations in Aqueous Solution of N -Methylacetamide. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (30), 9858–9867.
- (213) Salamatova, E.; Cunha, A. V.; Bloem, R.; Roeters, S. J.; Woutersen, S.; Jansen, T. L. C.; Pshenichnikov, M. S. Hydrophobic Collapse in N -Methylacetamide-Water Mixtures. *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122* (9), 2468–2478.



- (214) Panuszko, A.; Gojło, E.; Zielkiewicz, J.; Śmiechowski, M.; Krakowiak, J.; Stangret, J. Hydration of Simple Amides. FTIR Spectra of HDO and Theoretical Studies. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (8), 2483–2493.
- (215) Zhang, R.; Li, H.; Lei, Y.; Han, S. Different Weak C-H...O Contacts in N-Methylacetamide-Water System: Molecular Dynamics Simulations and NMR Experimental Study. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (33), 12596–12601.
- (216) Wallace, V. M.; Dhumal, N. R.; Zehentbauer, F. M.; Kim, H. J.; Kiefer, J. Revisiting the Aqueous Solutions of Dimethyl Sulfoxide by Spectroscopy in the Mid- and Near-Infrared: Experiments and Car-Parrinello Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (46), 14780–14789.
- (217) Mrázková, E.; Hobza, P. Hydration of Sulfo and Methyl Groups in Dimethyl Sulfoxide Is Accompanied by the Formation of Red-Shifted Hydrogen Bonds and Improper Blue-Shifted Hydrogen Bonds: An Ab Initio Quantum Chemical Study. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (7), 1032–1039.
- (218) Mizuno, K.; Imafuji, S.; Ochi, T.; Ohta, T.; Maeda, S. Hydration of the CH Groups in Dimethyl Sulfoxide Probed by NMR and IR. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (47), 11001–11005.
- (219) Li, Q.; An, X.; Gong, B.; Cheng, J. Spectroscopic and Theoretical Evidence for the Cooperativity between Red-Shift Hydrogen Bond and Blue-Shift Hydrogen Bond in DMSO Aqueous Solutions. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2008**, *69* (1), 211–215.
- (220) Mancera, R. L.; Chalaris, M.; Refson, K.; Samios, J. Molecular Dynamics Simulation of Dilute Aqueous DMSO Solutions. A Temperature-Dependence Study of the Hydrophobic and Hydrophilic Behaviour around DMSO. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6* (1), 94–102.
- (221) Puranik, S. M.; Kumbharkhane, A. C.; Mehrotra, S. C. Dielectric Study of Dimethyl Sulfoxide-Water Mixtures Using the Time-Domain Technique. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88* (3), 433–435.
- (222) Kaatze, U.; Pottel, R.; Schäfer, M. Dielectric Spectrum of Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures as a Function of Composition. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (14), 5623–5627.
- (223) Lu, Z.; Manias, E.; Lanagan, M.; Macdonald, D. Dielectric Relaxation in Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures. In *ECS Transactions*; 2010; Vol. 28, pp 11–21.
- (224) Soper, A. K.; Luzar, A. Orientation of Water Molecules around Small Polar and Nonpolar Groups in Solution: A Neutron Diffraction and Computer Simulation Study. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (4), 1357–1367.
- (225) Baker, E. S.; Jonas, J. Transport and Relaxation Properties of Dimethyl Sulfoxide-Water Mixtures at High Pressure. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89* (9), 1730–1735.
- (226) Koga, Y.; Kasahara, Y.; Yoshino, K.; Nishikawa, K. Mixing Schemes for Aqueous Dimethyl Sulfoxide: Support by X-Ray Diffraction Data. *J. Solution Chem.* **2001**, *30* (10), 885–893.
- (227) Klemenkova, Z. S.; Kononova, E. G. Elucidation of the Water-DMSO Mixing Process Based on an IR Study. *J. Solution Chem.* **2015**, *44* (2), 280–292.
- (228) Vaisman, I. I.; Berkowitz, M. L. Local Structural Order and Molecular Associations in Water-DMSO Mixtures. Molecular Dynamics Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (20), 7889–7896.
- (229) Mancera, R. L.; Chalaris, M.; Samios, J. The Concentration Effect on the “hydrophobic” and “Hydrophilic” Behaviour around DMSO in Dilute Aqueous DMSO Solutions. A Computer Simulation Study. *J. Mol. Liq.* **2004**, *110* (1–3), 147–153.
- (230) Jacob, S. W.; Herschler, R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* **1986**, *23* (1), 14–27.

- (231) Kim, S. H.; Yan, Y. Bin; Zhou, H. M. Role of Osmolytes as Chemical Chaperones during the Refolding of Aminoacylase. *Biochem. Cell Biol.* **2006**, *84* (1), 30–38.
- (232) Arakawa, T.; Kita, Y.; Timasheff, S. N. Protein Precipitation and Denaturation by Dimethyl Sulfoxide. *Biophys. Chem.* **2007**, *131* (1–3), 62–70.
- (233) Parsons, M. T.; Koga, Y. Hydration Number of Glycine in Aqueous Solution: An Experimental Estimate. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (23).
- (234) Ding, Y.; Krogh-Jespersen, K. The Glycine Zwitterion Does Not Exist in the Gas Phase: Results from a Detailed Ab Initio Electronic Structure Study. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *199* (3–4), 261–266.
- (235) Iijima, K.; Tanaka, K.; Onuma, S. Main Conformer of Gaseous Glycine: Molecular Structure and Rotational Barrier from Electron Diffraction Data and Rotational Constants. *J. Mol. Struct.* **1991**, *246* (3–4), 257–266.
- (236) Suenram, R. D.; Lovas, F. J. Millimeter Wave Spectrum of Glycine. A New Conformer. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (24), 7180–7184.
- (237) Rzepa, H. S.; Yi, M. Y. An AM1 and PM3 Molecular Orbital and Self-Consistent Reaction-Field Study of the Aqueous Solvation of Glycine, Alanine and Proline in Their Neutral and Zwitterionic Forms. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1991**, No. 4, 531–537.
- (238) Tuñón, I.; Silla, E.; Millot, C.; Martins-Costa, M. T. C.; Ruiz-López, M. F. Intramolecular Proton Transfer of Glycine in Aqueous Solution Using Quantum Mechanics - Molecular Mechanics Simulations. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (45), 8673–8678.
- (239) Tortonda, F. R.; Pascual-Ahuir, J. L.; Silla, E.; Tuñón, I. Why Is Glycine a Zwitterion in Aqueous Solution? A Theoretical Study of Solvent Stabilising Factors. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260* (1–2), 21–26.
- (240) Nagaoka, M.; Okuyama-Yoshida, N.; Yamabe, T. Origin of the Transition State on the Free Energy Surface: Intramolecular Proton Transfer Reaction of Glycine in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (42), 8202–8208.
- (241) Kokpol, S. U.; Doungdee, P. B.; Hannongbua, S. V.; Rode, B. M.; Limtrakul, J. P. Ab Initio Study of the Hydration of the Glycine Zwitterion. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1988**, *84* (11), 1789–1792.
- (242) Leung, K.; Rempe, S. B. Ab Initio Molecular Dynamics Study of Glycine Intramolecular Proton Transfer in Water. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (18).
- (243) Pérez de Tudela, R.; Marx, D. Water-Induced Zwitterionization of Glycine: Stabilization Mechanism and Spectral Signatures. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (24), 5137–5142.
- (244) Campo, M. G. Molecular Dynamics Simulation of Glycine Zwitterion in Aqueous Solution. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (11), 1–9.
- (245) Di Gioacchino, M.; Ricci, M. A.; Imberti, S.; Holzmann, N.; Bruni, F. Hydration and Aggregation of a Simple Amino Acid: The Case of Glycine. *J. Mol. Liq.* **2020**, *301*, 112407.
- (246) Panuszko, A.; Adamczak, B.; Czub, J.; Gojło, E.; Stangret, J. Hydration of Amino Acids: FTIR Spectra and Molecular Dynamics Studies. *Amino Acids* **2015**, *47* (11), 2265–2278.
- (247) Sharma, P.; Singh, D. K.; Gupta, V.; Asthana, B. P.; Mishra, P. C.; Singh, R. K. Study of Hydration of Sarcosine, Formation of Its Zwitterion and Their Different Oligomers in Aqueous Media: A Raman Spectroscopic and Theoretical Study. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *116*, 74–83.

- (248) Srinivasadesikan, V.; Lu, C. H.; Ramachandran, B.; Lee, S. L. Effects of Microsolvation on the Electronic Properties of Sarcosine: A Computational Study. *ChemistrySelect* **2017**, 2 (28), 8950–8958.
- (249) Kumar, N.; Kishore, N. Structure and Effect of Sarcosine on Water and Urea by Using Molecular Dynamics Simulations: Implications in Protein Stabilization. *Biophys. Chem.* **2013**, 171, 9–15.
- (250) Bruździak, P.; Panuszko, A.; Stangret, J. Influence of Osmolytes on Protein and Water Structure: A Step to Understanding the Mechanism of Protein Stabilization. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117 (39), 11502–11508.
- (251) Bakker, H. J.; Skinner, J. L. Vibrational Spectroscopy as a Probe of Structure and Dynamics in Liquid Water. *Chem. Rev.* **2010**, 110 (3), 1498–1517.
- (252) Luck, W. A. P. Infrared Fundamental Region. In *Structure of Water and Aqueous Solutions*; Luck, W. A. P., Ed.; Verlag Chemie GmbH and Physik Verlag GmbH: Weinheim, 1974; pp 221–245.
- (253) Perakis, F.; Marco, L. De; Shalit, A.; Tang, F.; Kann, Z. R.; Kühne, T. D.; Torre, R.; Bonn, M.; Nagata, Y. Vibrational Spectroscopy and Dynamics of Water. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (13), 7590–7607.
- (254) Max, J. J.; Chapados, C. Isotope Effects in Liquid Water by Infrared Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **2002**, 116 (11), 4626–4642.
- (255) Czarnik-Matusewicz, B.; Pilorz, S.; Hawranek, J. P. Temperature-Dependent Water Structural Transitions Examined by near-IR and Mid-IR Spectra Analyzed by Multivariate Curve Resolution and Two-Dimensional Correlation Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 544 (1-2 SPEC. ISS.), 15–25.
- (256) Falk, M.; Ford, T. A. Infrared Spectrum and Structure of Liquid Water. *Can. J. Chem.* **1966**, 44 (14), 1699–1707.
- (257) Kakiuchi, M. Distribution of Isotopic Water Molecules, H₂O, HDO, and D₂O, in Vapor and Liquid Phases in Pure Water and Aqueous Solution Systems. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, 64 (9), 1485–1492.
- (258) Friedman, L.; Shines, V. J. Experimental Determination of the Disproportionation of Hydrogen Isotopes in Water. *J. Chem. Phys.* **1966**, 44 (12), 4639–4640.
- (259) Hulston, J. R. Revised Zero-Point Energy Calculation for H₂O+D₂O⇌2HDO Isotopic Equilibrium. *J. Chem. Phys.* **1969**, 50 (3), 1483–1484.
- (260) Jancso, G.; Van Hook, W. A. Condensed Phase Isotope Effects. *Chem. Rev.* **1974**, 74 (6), 689–750.
- (261) Senior, W. A.; Verrall, R. E. Spectroscopic Evidence for the Mixture Model in HOD Solutions. *J. Phys. Chem.* **1969**, 73 (12), 4242–4249.
- (262) Walrafen, G. E. Raman and Infrared Spectral Investigations of Water Structure. In *The Physics and Physical Chemistry of Water*; Franks, F., Ed.; Springer New York: Boston, MA, 1972; pp 151–214.
- (263) Kristiansson, O.; Eriksson, A.; Lindgren, J.; Maeda, M.; Ohtaki, H. Hydration of Ions in Aqueous Solutions Studied by Infrared Spectroscopy. I. Method. *Acta Chem. Scand.* **1984**, 38a, 609–612.
- (264) Benson, S. W.; Siebert, E. D. A Simple Two-Structure Model for Liquid Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (11), 4269–4276.
- (265) Speedy, R. J. Self-Replicating Structures in Water. *J. Phys. Chem.* **1984**, 88 (15), 3364–3373.



- (266) Smith, J. D.; Cappa, C. D.; Wilson, K. R.; Messer, B. M.; Cohen, R. C.; Saykally, R. J. Energetics of Hydrogen Bond Network Rearrangements in Liquid Water. *Science (80-.)*. **2004**, *306* (5697), 851–853.
- (267) Walrafen, G. E. Raman and Infrared Spectral Investigations of Water Structure. In *The Physics and Physical Chemistry of Water*; Franks, F., Ed.; Springer New York: Boston, MA, 1972; Vol. 166, pp 151–214.
- (268) Brubach, J. B.; Mermet, A.; Filabozzi, A.; Gerschel, A.; Roy, P. Signatures of the Hydrogen Bonding in the Infrared Bands of Water. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (18), 184509.
- (269) Wang, Z.; Pakoulev, A.; Pang, Y.; Dlott, D. D. Vibrational Substructure in the OH Stretching Band of Water. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *378* (3–4), 281–288.
- (270) Steinel, T.; Asbury, J. B.; Zheng, J.; Fayer, M. D. Watching Hydrogen Bonds Break: A Transient Absorption Study of Water. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (50), 10957–10964.
- (271) Lawrence, C. P.; Skinner, J. L. Vibrational Spectroscopy of HOD in Liquid D₂O. III. Spectral Diffusion, and Hydrogen-Bonding and Rotational Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118* (1), 264–272.
- (272) Corcelli, S. A.; Skinner, J. L. Infrared and Raman Line Shapes of Dilute HOD in Liquid H₂O and D₂O from 10 to 90°C. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (28), 6154–6165.
- (273) Woutersen, S.; Emmerichs, U.; Bakker, H. J. Femtosecond Mid-IR Pump-Probe Spectroscopy of Liquid Water: Evidence for a Two-Component Structure. *Science (80-.)*. **1997**, *278* (5338), 658–660.
- (274) Sciortino, F. Which Way to Low-Density Liquid Water? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (31), 8141–8143.
- (275) Czarnecki, M. A.; Morisawa, Y.; Futami, Y.; Ozaki, Y. Advances in Molecular Structure and Interaction Studies Using Near-Infrared Spectroscopy. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (18), 9707–9744.
- (276) Segtnan, V. H.; Šašić, Š.; Isaksson, T.; Ozaki, Y. Studies on the Structure of Water Using Two-Dimensional Near-Infrared Correlation Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (13), 3153–3161.
- (277) Šašić, S.; Segtnan, V. H.; Ozaki, Y. Self-Modeling Curve Resolution Study of Temperature-Dependent Near-Infrared Spectra of Water and the Investigation of Water Structure. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (5), 760–766.
- (278) Luck, W. A. P. The Importance of Cooperativity for the Properties of Liquid Water. *J. Mol. Struct.* **1998**, *448* (2–3), 131–142.
- (279) Stillinger, F. H. Water Revisited. *Science (80-.)*. **1980**, *209* (4455), 451–457.
- (280) Rice, S. A.; Sceats, M. G. A Random Network Model for Water. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85* (9), 1108–1119.
- (281) Max, J. J.; Chapados, C. Determination of Spectroscopic Band Shapes by Second Derivatives, Part II: Infrared Spectra of Liquid Light and Heavy Water. *Acta radiol.* **2015**, *56* (12), 1281–1292.
- (282) Zhukovskii, A. P. Justification of the Continuous Model of the Structure of Water by Infrared Spectroscopy. *J. Struct. Chem.* **1981**, *22* (3), 356–362.
- (283) Eaves, J. D.; Loparo, J. J.; Fecko, C. J.; Roberts, S. T.; Tokmakoff, A.; Geissler, P. L. Hydrogen Bonds in Liquid Water Are Broken Only Fleetingly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (37), 13019–13022.



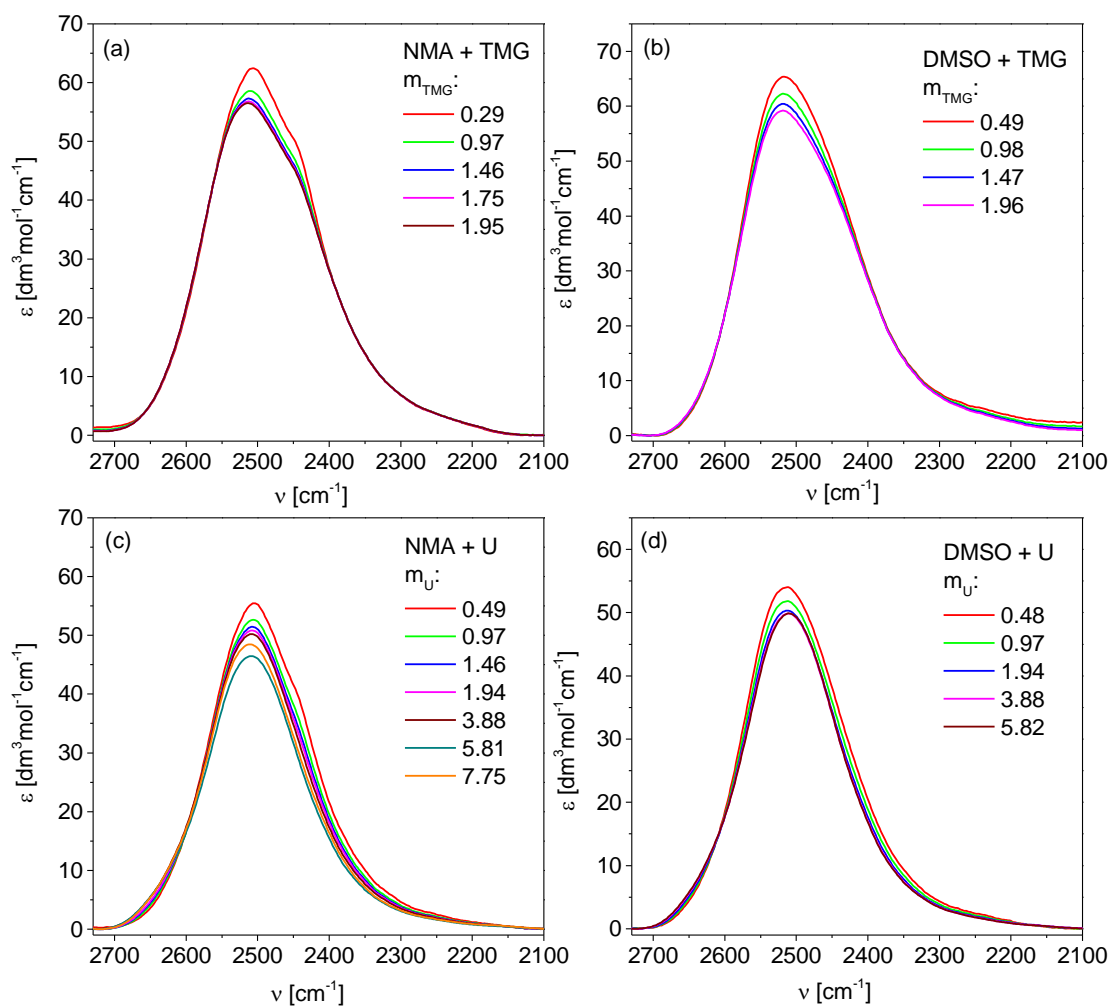
- (284) Efimov, Y. Y.; Naberukhin, Y. I. The Fluctuation Hypothesis of Hydrogen Bonding VI. Calculation of the Band Shapes in Infra-Red and Raman Spectra for Normal and Heavy Water in the Region of Stretching Vibrations. *Mol. Phys.* **1978**, *36* (4), 973–992.
- (285) Pattenaude, S. R.; Streacker, L. M.; Ben-Amotz, D. Temperature and Polarization Dependent Raman Spectra of Liquid H₂O and D₂O. *J. Raman Spectrosc.* **2018**, *49* (11), 1860–1866.
- (286) Kananenka, A. A.; Hestand, N. J.; Skinner, J. L. OH-Stretch Raman Multivariate Curve Resolution Spectroscopy of HOD/H₂O Mixtures. *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123* (24), 5139–5146.
- (287) Stangret, J.; Gampe, T. Ionic Hydration Behavior Derived from Infrared Spectra in HDO. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (21), 5393–5402.
- (288) Nikolov, Z. S.; Miller, J. D. Water Structure in Aqueous Solutions of Alkali Halide Salts: FTIR Spectroscopy of the OD Stretching Band. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287* (2), 572–580.
- (289) Smith, J. D.; Saykally, R. J.; Geissler, P. L. The Effects of Dissolved Halide Anions on Hydrogen Bonding in Liquid Water. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13847–13856.
- (290) Giammanco, C. H.; Wong, D. B.; Fayer, M. D. Water Dynamics in Divalent and Monovalent Concentrated Salt Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (46), 13781–13792.
- (291) Marcus, Y. Effect of Ions on the Structure of Water: Structure Making and Breaking. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (3), 1346–1370.
- (292) Stangret, J. Solute-Affected Vibrational Spectra of Water in Ca(ClO₄)₂ Aqueous Solutions. *Spectrosc. Lett.* **1988**, *21* (5), 369–381.
- (293) Bredt, A. J.; Ben-Amotz, D. Influence of Crowding on Hydrophobic Hydration-Shell Structure. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (20), 11724–11730.
- (294) Wong, D. B.; Sokolowsky, K. P.; El-Barghouthi, M. I.; Fenn, E. E.; Giammanco, C. H.; Sturlaugson, A. L.; Fayer, M. D. Water Dynamics in Water/DMSO Binary Mixtures. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (18), 5479–5490.
- (295) Sharp, K. A.; Madan, B.; Manas, E.; Vanderkooi, J. M. Water Structure Changes Induced by Hydrophobic and Polar Solutes Revealed by Simulations and Infrared Spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114* (4), 1791–1796.
- (296) Stangret, J. Donor Properties of Water in Organic Solvents Derived from Infrared Spectra of HDO. *J. Mol. Struct.* **2002**, *643* (1–3), 29–35.
- (297) Stangret, J.; Gampe, T. Hydration of Tetrahydrofuran Derived from FTIR Spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2005**, *734* (1–3), 183–190.
- (298) Stangret, J.; Gampe, T. Hydration Sphere of Tetrabutylammonium Cation. FTIR Studies of HDO Spectra. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (18), 3778–3783.
- (299) Badger, R. M.; Bauer, S. H. Spectroscopic Studies of the Hydrogen Bond. II. The Shift of the O-H Vibrational Frequency in the Formation of the Hydrogen Bond. *J. Chem. Phys.* **1937**, *5* (11), 839–851.
- (300) Śmiechowski, M.; Stangret, J. Vibrational Spectroscopy of Semiheavy Water (HDO) as a Probe of Solute Hydration. *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82* (10), 1869–1887.
- (301) Berglund, B.; Lindgren, J.; Tegenfeldt, J. O-H and O-D Stretching Vibrations in Isotopically Dilute HDO Molecules in Some Solid Hydrates. *J. Mol. Struct.* **1978**, *43* (2), 169–177.
- (302) Bratos, S.; Leicknam, J. C.; Pommeret, S. Relation between the OH Stretching Frequency and the OO Distance in Time-Resolved Infrared Spectroscopy of Hydrogen Bonding. *Chem. Phys.* **2009**, *359* (1–3), 53–57.

- (303) Wall, T. T.; Hornig, D. F. Roman Intensities of H₂O and Structure in Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43* (6), 2079–2087.
- (304) Chakraborty, A.; Sarkar, M.; Basak, S. Stabilizing Effect of Low Concentrations of Urea on Reverse Micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287* (1), 312–317.
- (305) 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* (39), 25365–25376.
- (306) Parsegian, V. A.; Rand, R. P.; Rau, D. C. Osmotic Stress, Crowding, Preferential Hydration, and Binding: A Comparison of Perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (8), 3987–3992.
- (307) Linhananta, A.; Hadizadeh, S.; Plotkin, S. S. An Effective Solvent Theory Connecting the Underlying Mechanisms of Osmolytes and Denaturants for Protein Stability. *Biophys. J.* **2011**, *100* (2), 459–468.
- (308) Canchi, D. R.; Paschek, D.; Garcia, A. E. Equilibrium Study of Protein Denaturation by Urea. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (7), 2338–2344.
- (309) Ding, B.; Yang, L.; Mukherjee, D.; Chen, J.; Gao, Y.; Gai, F. Microscopic Insight into the Protein Denaturation Action of Urea and Its Methyl Derivatives. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (11), 2933–2940.
- (310) Stasiulewicz, M.; Panuszko, A.; Bruździak, P.; Stangret, J. Mechanism of Osmolyte Stabilization–Destabilization of Proteins: Experimental Evidence. *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 2990–2999.
- (311) Kuo, J. L.; Klein, M. L.; Kuhs, W. F. The Effect of Proton Disorder on the Structure of Ice-Ih: A Theoretical Study. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123* (13), 515.
- (312) Shiraga, K.; Ogawa, Y.; Kondo, N. Hydrogen Bond Network of Water around Protein Investigated with Terahertz and Infrared Spectroscopy. *Biophys. J.* **2016**, *111* (12), 2629–2641.
- (313) Panuszko, A.; Bruździak, P.; Zielkiewicz, J.; Wyrzykowski, D.; Stangret, J. Effects of Urea and Trimethylamine-N-Oxide on the Properties of Water and the Secondary Structure of Hen Egg White Lysozyme. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (44), 14797–14809.
- (314) Adamczak, B.; Wieczór, M.; Kogut, M.; Stangret, J.; Czub, J. Molecular Basis of the Osmolyte Effect on Protein Stability: A Lesson from the Mechanical Unfolding of Lysozyme. *Biochem. J.* **2016**, *473* (20), 3705–3724.
- (315) Zangi, R.; Zhou, R.; Berne, B. J. Urea's Action on Hydrophobic Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (4), 1535–1541.
- (316) Adamczak, B.; Kogut, M.; Czub, J. Effect of Osmolytes on the Thermal Stability of Proteins: Replica Exchange Simulations of Trp-Cage in Urea and Betaine Solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20* (16), 11174–11182.
- (317) Su, Z.; Dias, C. L. Individual and Combined Effects of Urea and Trimethylamine N-Oxide (TMAO) on Protein Structures. *J. Mol. Liq.* **2019**, *293*, 111443.
- (318) Rossky, P. J. Protein Denaturation by Urea: Slash and Bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (44), 16825–16826.
- (319) Agieienko, V.; Buchner, R. Urea Hydration from Dielectric Relaxation Spectroscopy: Old Findings Confirmed, New Insights Gained. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (4), 2597–2607.
- (320) Sahle, C. J.; Schroer, M. A.; Niskanen, J.; Elbers, M.; Jeffries, C. M.; Sternemann, C. Hydration in Aqueous Osmolyte Solutions: The Case of TMAO and Urea. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (20), 11614–11624.

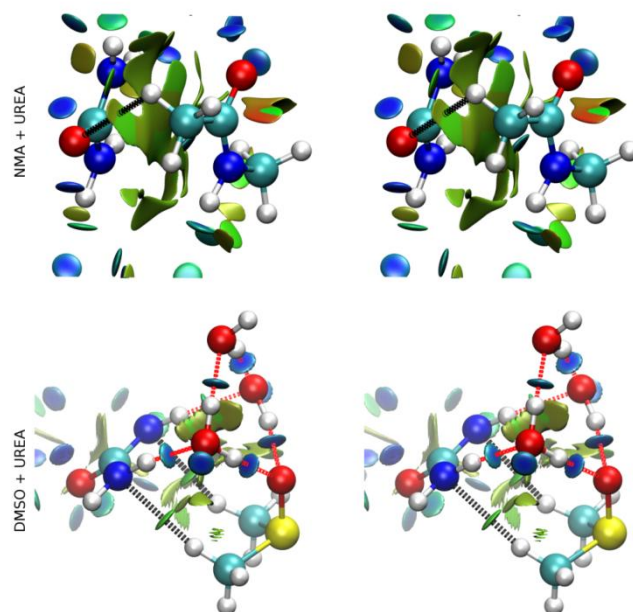


- (321) Hahn, M. B.; Uhlig, F.; Solomun, T.; Smiatek, J.; Sturm, H. Combined Influence of Ectoine and Salt: Spectroscopic and Numerical Evidence for Compensating Effects on Aqueous Solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (41), 28398–28402.
- (322) Rezus, Y. L. A.; Bakker, H. J. Destabilization of the Hydrogen-Bond Structure of Water by the Osmolyte Trimethylamine N-Oxide. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (13), 4038–4044.
- (323) Bandyopadhyay, D.; Mohan, S.; Ghosh, S. K.; Choudhury, N. Molecular Dynamics Simulation of Aqueous Urea Solution: Is Urea a Structure Breaker? *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (40), 11757–11768.
- (324) Batchelor, J. D.; Olteanu, A.; Tripathy, A.; Pielak, G. J. Impact of Protein Denaturants and Stabilizers on Water Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (7), 1958–1961.

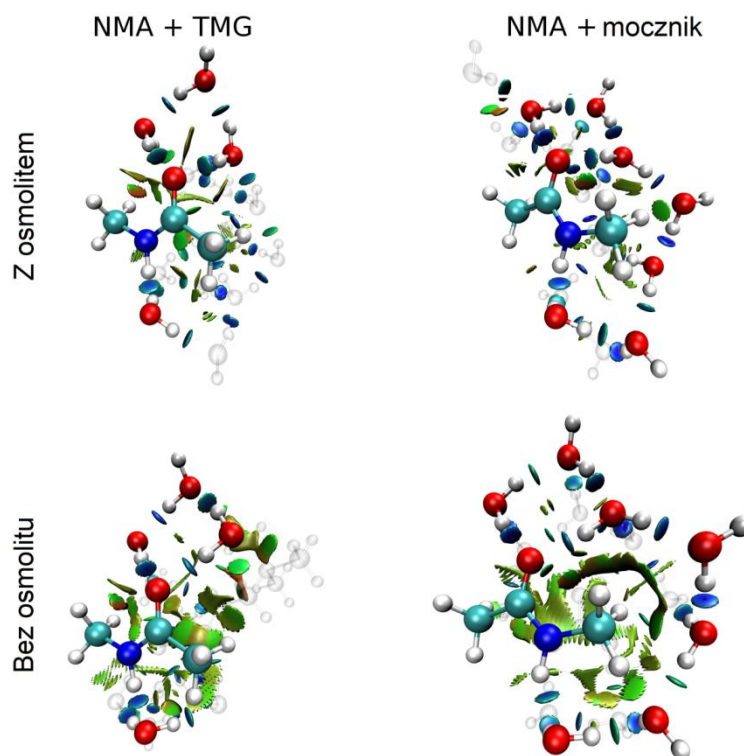
9. MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE



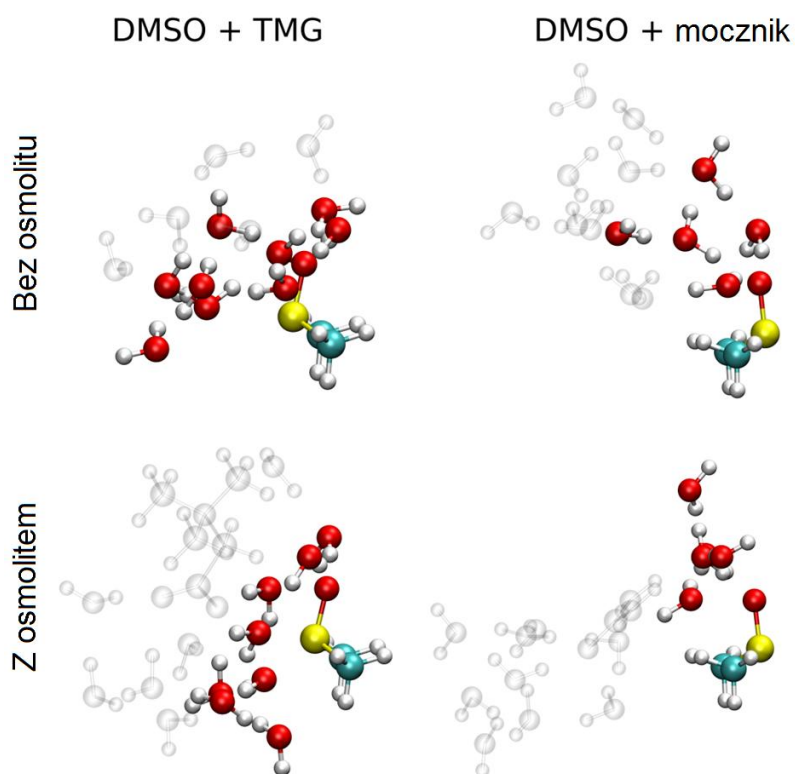
Rys. S1. „Syntetyczne” widma wody zaburzonej w układach (a) NMA + betaina (b) DMSO + betaina, (c) NMA + mocznik oraz (d) DMSO + mocznik. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik.



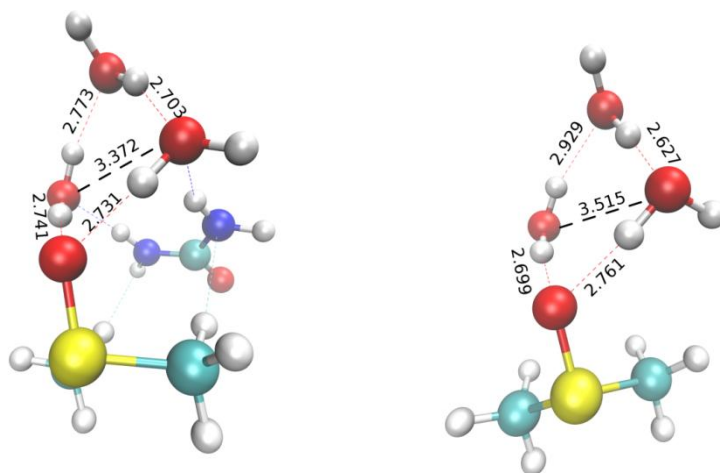
Rys. S2. Stereogramowy obraz zoptymalizowanych metodą DFT układów NMA + mocznik (górny wiersz) i DMSO + mocznik (dolny wiersz) z wyróżnionymi cząsteczkami wody. Niebieskie i zielone dyski oznaczają wiązania wodorowe; zielone i oliwkowe powierzchnie oznaczają inne rodzaje słabych interakcji. Klasyczne wiązania wodorowe zaznaczono czerwonymi liniami przerywanymi, a inne oddziaływania czarnymi przerywanymi liniami. Rysunek pochodzi z pracy [135].



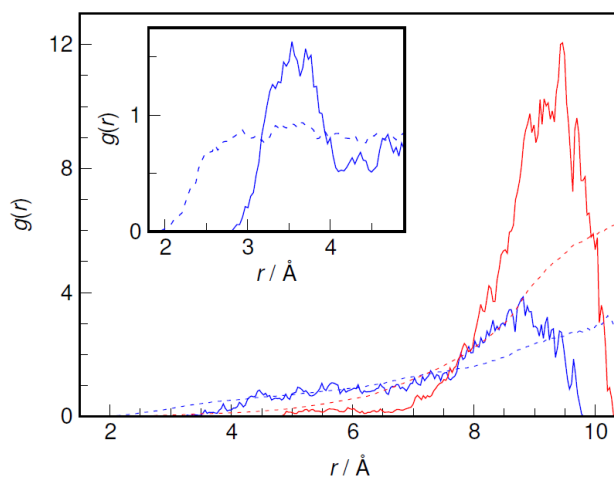
Rys. S3. Zwizualizowane za pomocą metody RDG słabe niekwalencyjne oddziaływania dla zoptymalizowanych metodą DFT kompleksów NMA-osmolit-woda. Niebieskie lub zielone dyski oznaczają wiązania wodorowe, zielone i oliwkowe powierzchnie odpowiadają słabym interakcjom innego rodzaju. Rysunek pochodzi z pracy [135].



Rys. S4. Zoptymalizowane za pomocą metody DFT kompleksy DMSO + osmolit + woda. Część cząsteczek wody i cząsteczka osmolitu zostały przedstawione jako transparentne w celu lepszego wizualizowania rozmieszczenia cząsteczek wody wokół centralnej cząsteczki modelowej. Rysunek pochodzi z pracy [135].



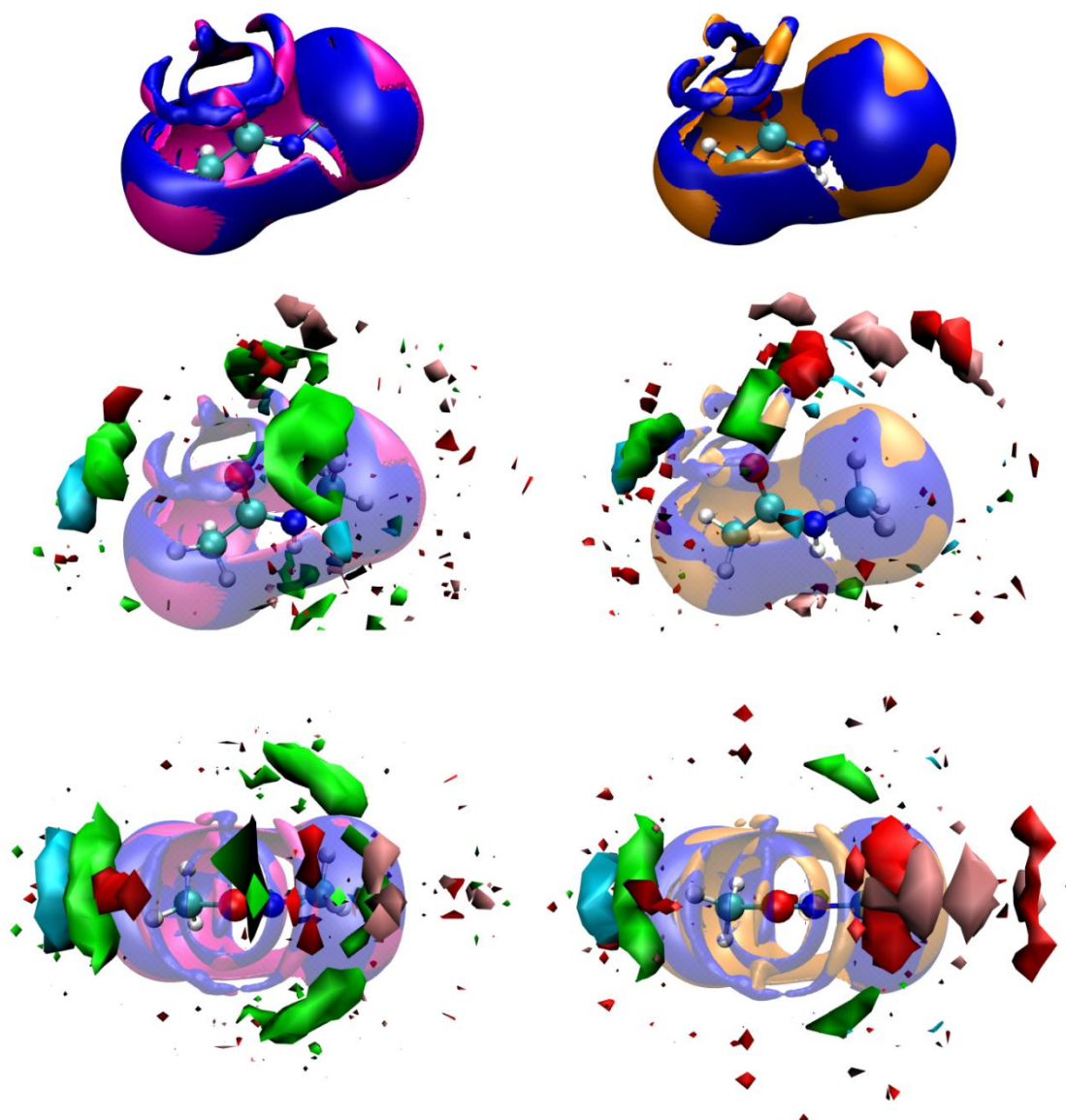
Rys. S5. Fragmenty kompleksów DMSO z wodą w obecności mocznika (po lewej stronie) oraz bez mocznika (po prawej stronie) z zaznaczonymi odległościami O...O. Rysunek pochodzi z pracy [135].



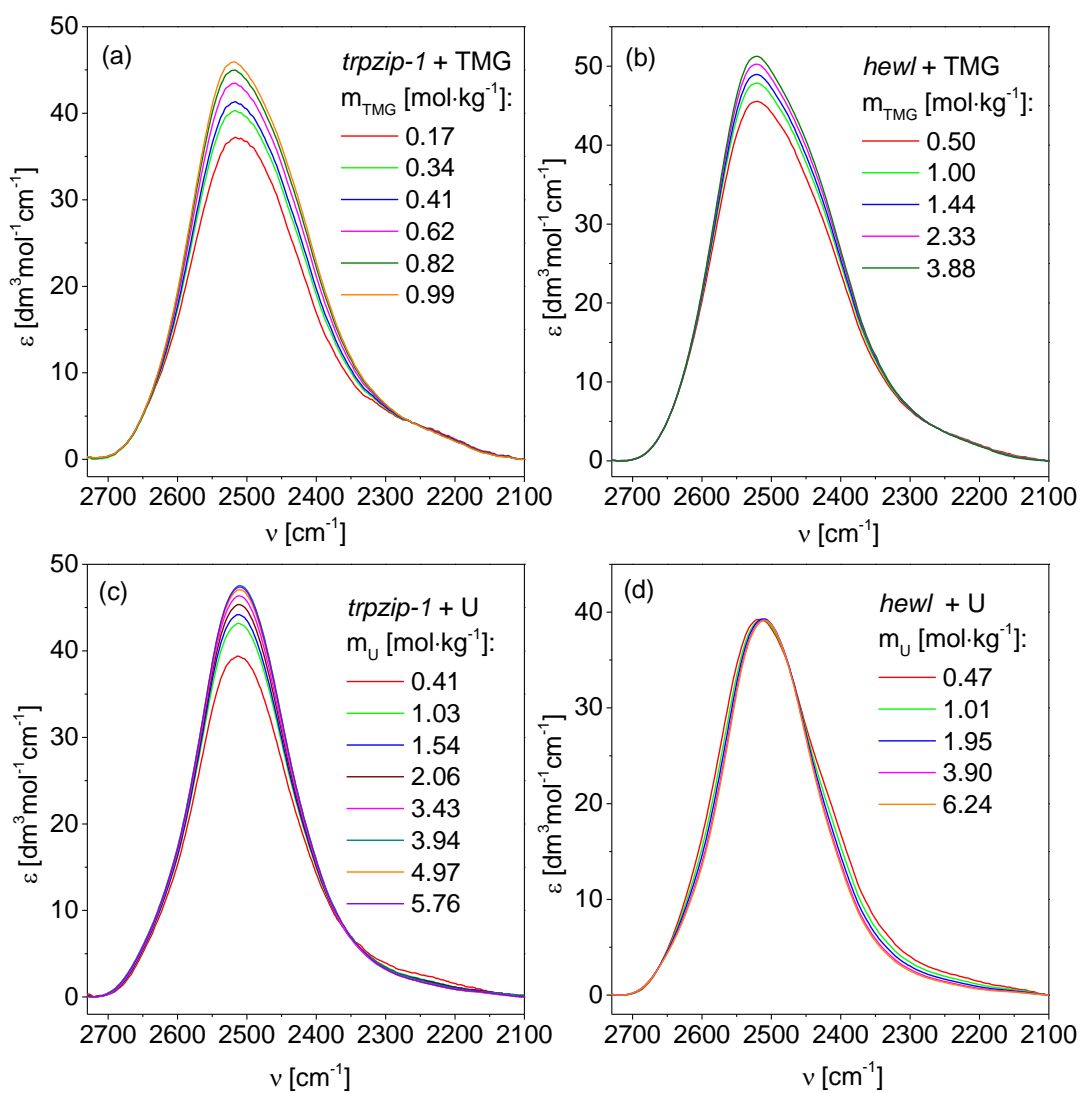
Rys. S6. Funkcje rozkładu radialnego między centrum masy NMA i centrum masy mocznika (niebieska ciągła linia) i betaina (czerwona ciągła linia) oraz pełno atomowe RDF między atomami NMA i atomami mocznika lub betainy (odpowiednio, niebieskie lub czerwone linie przerywane). W okienku RDF między atomem węgla grupy metylowej połączonej z grupą aminową NMA i O mocznika (ciągła linia) oraz między atomem wodoru grupy metylowej połączonej z grupą aminową i O mocznika (linia przerywana).
Rysunek pochodzi z pracy [135].

NMA + TMG

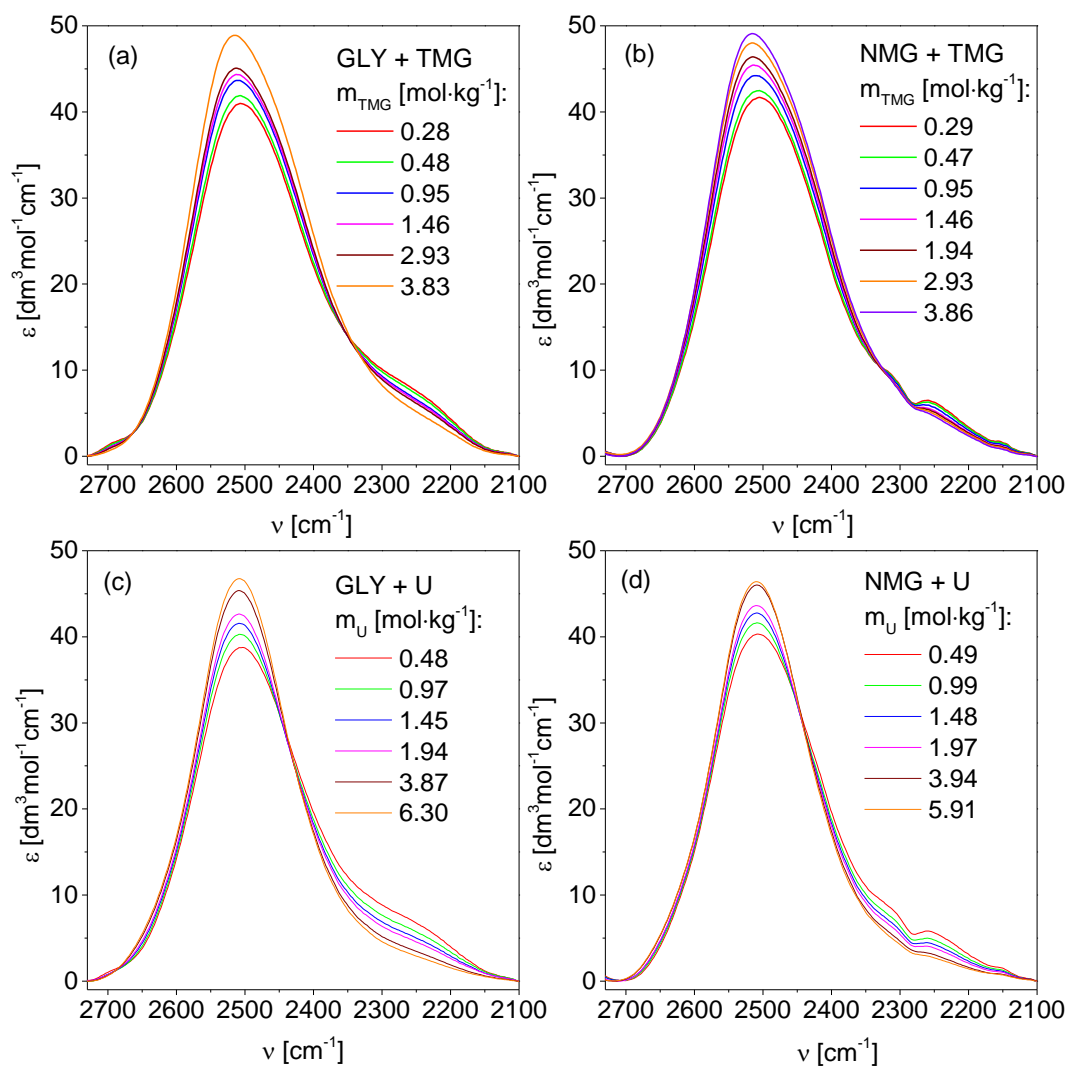
NMA + mocznik



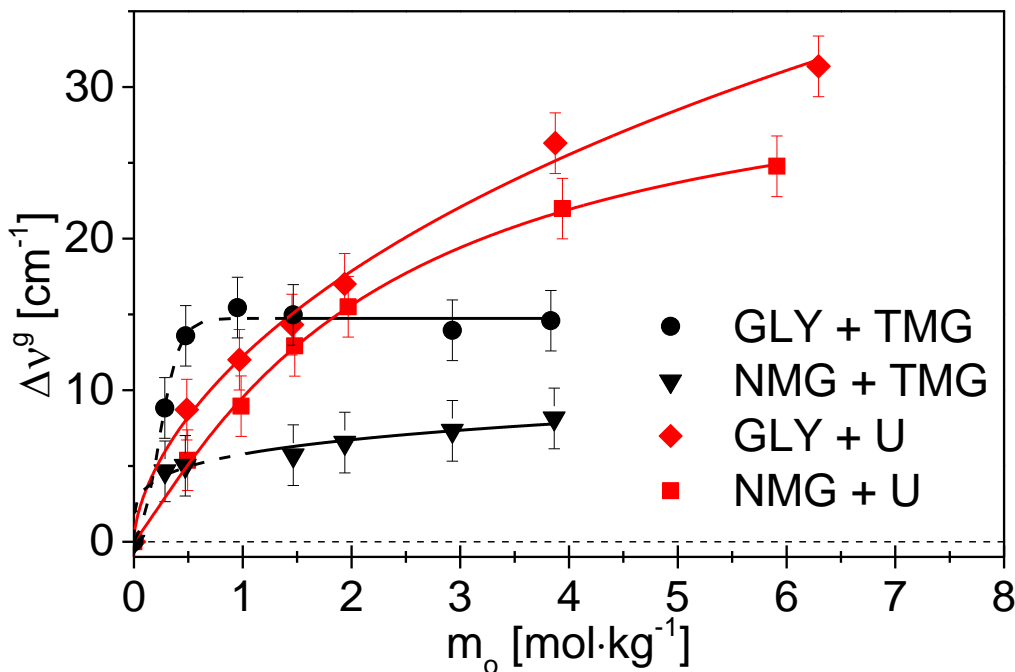
Rys. S7. Górny rząd: Wyniki obliczeń aRDG otrzymane na podstawie trajektorii AIMD dla układów NMA + osmolit + woda. Niebieskie powierzchnie zostały obliczone dla układów NMA + woda, natomiast powierzchnie różowe i pomarańczowe otrzymano, odpowiednio, dla układów NMA + betaina + woda lub NMA + mocznik + woda. Cząsteczka NMA jest umieszczona w centrum. W środkowym rzędzie przedstawiono te same struktury (transparentne) z bryłami odpowiadającymi dodatnim (zielone) i ujemnym (czerwone) różnicom funkcji rozkładu przestrzennego atomów tlenu cząsteczek wody między układami NMA + osmolit + woda i NMA + woda. Kolorem jasno niebieskim i różowym zaznaczono, odpowiednio, dodatnie i ujemne różnice obliczonych gęstości występowania wiązań wodorowych między układami NMA + osmolit + woda i NMA + woda. W najniższym wierszu umieszczono widok tego samego układu z „góry”. Rysunek pochodzi z pracy [135].



Rys. S8. „Syntetyczne” widma wody zaburzonej w układach (a) *trpzip-1* + betaina, (b) lizozym + betaina, (c) *trpzip-1* + mocznik oraz (d) lizozym + mocznik. TMG i U oznaczają odpowiednio betainę i mocznik.



Rys. S9. „Syntetyczne” widma wody zaburzonej w układach (a) GLY + betaina (b) NMG+ betaina, (c) GLY + mocznik oraz (d) NMG + mocznik. GLY, TMG i U oznaczają odpowiednio glicynę, betainę i mocznik.



Rys. S10. Różnice wartości położenia środków ciężkości pasm (jako miara średniej energii wiązań wodorowych między cząsteczkami wody) między „eksperymentalną” wodą zaburzoną i wodą zaburzoną przez cząsteczki modelowe względem fragmentów rozwiniętych białek ($\Delta v^g = v^e - v^m$) w funkcji molalności osmolytu (m_o). Linia przerywana oznacza zakres występowania „nadmiarowej” wody zaburzonej, linia ciągła obszar występowania „współdzielonej” wody zaburzonej. Czerwoną linią zaznaczono układy zawierające mocznik (U), czarną linią układy zawierające betainę (TMG).

Tabela S1. Zmiany pH roztworów w funkcji molalności osmolytu [$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$] dla układu biomakrocząsteczki i osmolytu. Wartości pH dla czystych roztworów lizozymu ($m = 0,0348 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) i *trpzip-1* ($m = 0,00794 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) wynosiło odpowiednio 4,93 i 1,92.

<i>trpzip-1</i> + TMG		lizozym + TMG		<i>trpzip-1</i> + U		lizozym + U	
m_{TMG}	pH	m_{TMG}	pH	m_{U}	pH	m_{U}	pH
0.996	3.42	1.02	5.13	2.23	2.48	2.11	5.02
		1.94	5.30	4.40	2.65	4.14	5.05
		3.96	5.62	6.29	2.88	6.55	5.13

Tabela S2. Parametry pasm „eksperymentalnej” wody zaburzonej w badanych układach oraz wody zaburzonej przez cząsteczki centralne.

NMA + betaina							
m	N_e	v^o	v^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
NMA	$3,4 \pm 0,5$	2505 ± 2	2479 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	167 ± 4	12011
0,2904	$4,3 \pm 0,5$	2507 ± 2	2482 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	173 ± 4	11177
0,9728	$3,5 \pm 0,5$	2511 ± 2	2478 ± 2	$2,785 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	188 ± 4	11014
1,4602	$3,3 \pm 0,5$	2513 ± 2	2478 ± 2	$2,777 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	195 ± 4	10960
1,7527	$3,4 \pm 0,5$	2515 ± 2	2477 ± 2	$2,777 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	195 ± 4	10816
1,9653	$3,5 \pm 0,5$	2517 ± 2	2477 ± 2	$2,777 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	198 ± 4	10760
NMA + mocznik							
m	N_e	v^o	v^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
NMA	$3,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2475 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	163 ± 4	11368
0,4891	$3,1 \pm 0,5$	2505 ± 2	2484 ± 2	$2,828 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	162 ± 4	10350
0,9732	$3,2 \pm 0,5$	2505 ± 2	2486 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,833 \pm 0,003$	159 ± 4	9590
1,4573	$3,4 \pm 0,5$	2506 ± 2	2488 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,833 \pm 0,003$	161 ± 4	9313

<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
1,9414	3,5 ± 0,5	2505 ± 2	2489 ± 2	2,821 ± 0,003	2,833 ± 0,003	159 ± 4	9041
3,8778	3,8 ± 0,5	2507 ± 2	2492 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	155 ± 4	8634
5,8143	4,0 ± 0,5	2507 ± 2	2492 ± 2	2,823 ± 0,003	2,836 ± 0,003	157 ± 4	8500
7,7507	4,2 ± 0,5	2507 ± 2	2493 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	156 ± 4	8458
DMSO + betaina							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
DMSO	2,5 ± 0,5	2517 ± 2	2484 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	167 ± 4	12850
0,4848	2,7 ± 0,5	2519 ± 2	2481 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	181 ± 4	12325
0,9784	2,8 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	184 ± 4	12056
1,4544	2,8 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,826 ± 0,003	190 ± 4	11991
1,9391	2,9 ± 0,5	2521 ± 2	2478 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	191 ± 4	11854
DMSO + mocznik							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
DMSO	2,5 ± 0,5	2517 ± 2	2484 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	167 ± 4	12850
0,4848	2,7 ± 0,5	2519 ± 2	2481 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	181 ± 4	12325
0,9784	2,8 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	184 ± 4	12056
1,4544	2,8 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,826 ± 0,003	190 ± 4	11991
1,9391	2,9 ± 0,5	2521 ± 2	2478 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	191 ± 4	11854
<i>trpzip-1</i> + betaina							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
<i>trpzip-1</i>	68,0 ± 2	2509 ± 2	2476 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	183 ± 4	6872
0,1710	10,9 ± 0,5	2530 ± 2	2475 ± 2	2,793 ± 0,003	2,826 ± 0,003	196 ± 4	7793
0,3418	6,7 ± 0,5	2530 ± 2	2475 ± 2	2,793 ± 0,003	2,826 ± 0,003	202 ± 4	9324
0,4101	6,4 ± 0,5	2530 ± 2	2476 ± 2	2,793 ± 0,003	2,823 ± 0,003	201 ± 4	9849
0,6151	5,3 ± 0,5	2530 ± 2	2477 ± 2	2,793 ± 0,003	2,826 ± 0,003	202 ± 4	10989
0,8201	4,6 ± 0,5	2530 ± 2	2477 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	203 ± 4	11830
0,9909	4,7 ± 0,5	2524 ± 2	2479 ± 2	2,793 ± 0,003	2,828 ± 0,003	197 ± 4	12156
<i>trpzip-1</i> + mocznik							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
<i>trpzip-1</i>	69,0 ± 0,5	2513 ± 2	2481 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	177 ± 4	6882
0,4116	8,2 ± 0,5	2513 ± 2	2488 ± 2	2,836 ± 0,003	2,838 ± 0,003	166 ± 4	7219
1,0285	5,9 ± 0,5	2513 ± 2	2491 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	160 ± 4	7683
1,5426	5,2 ± 0,5	2513 ± 2	2491 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	157 ± 4	7780
2,0566	4,9 ± 0,5	2513 ± 2	2492 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	157 ± 4	7876
3,4275	4,9 ± 0,5	2511 ± 2	2493 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	157 ± 4	8087
3,9416	4,8 ± 0,5	2511 ± 2	2494 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	157 ± 4	8130
4,9698	4,8 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	157 ± 4	8206
5,7580	4,7 ± 0,5	2511 ± 2	2494 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	157 ± 4	8237
lizozyim + betaina							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
lizozyim	375,0 ± 20	2520 ± 2	2477 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	203 ± 4	8755
0,5041	7,2 ± 0,5	2528 ± 2	2476 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	210 ± 4	11516
1,0009	5,3 ± 0,5	2524 ± 2	2478 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	206 ± 4	12618
1,4356	4,4 ± 0,5	2522 ± 2	2477 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	203 ± 4	13373
2,3283	3,6 ± 0,5	2522 ± 2	2477 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	205 ± 4	14333
3,8809	3,6 ± 0,5	2520 ± 2	2478 ± 2	2,810 ± 0,003	2,826 ± 0,003	198 ± 4	14483
lizozyim + mocznik							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
lizozyim	360,0 ± 20	2519 ± 2	2480 ± 2	2,810 ± 0,003	2,831 ± 0,003	199 ± 4	10426
0,4688	9,5 ± 0,5	2521 ± 2	2486 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	181 ± 4	9538
1,0065	6,7 ± 0,5	2515 ± 2	2489 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	171 ± 4	9123
1,9495	5,6 ± 0,5	2513 ± 2	2491 ± 2	2,821 ± 0,003	2,838 ± 0,003	162 ± 4	8842
3,8978	4,8 ± 0,5	2509 ± 2	2492 ± 2	2,821 ± 0,003	2,838 ± 0,003	159 ± 4	8591
6,2358	4,5 ± 0,5	2509 ± 2	2492 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	155 ± 4	8465
GLY + betaina							
<i>m</i>	N_e	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
GLY	8,3 ± 0,5	2505 ± 2	2456 ± 2	2,808 ± 0,003	2,810 ± 0,003	192 ± 4	9096



<i>m</i>	N_e	ν^o	ν^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,2831	9,5 ± 0,5	2509 ± 2	2465 ± 2	2,815 ± 0,003	2,810 ± 0,003	194 ± 4	7258
0,4758	9,1 ± 0,5	2509 ± 2	2470 ± 2	2,821 ± 0,003	2,821 ± 0,003	189 ± 4	7648
0,9528	7,9 ± 0,5	2511 ± 2	2472 ± 2	2,821 ± 0,003	2,821 ± 0,003	190 ± 4	8019
1,4640	6,7 ± 0,5	2511 ± 2	2471 ± 2	2,821 ± 0,003	2,810 ± 0,003	192 ± 4	8218
2,9268	4,9 ± 0,5	2515 ± 2	2470 ± 2	2,821 ± 0,003	2,810 ± 0,003	197 ± 4	8624
3,8320	4,4 ± 0,5	2517 ± 2	2471 ± 2	2,821 ± 0,003	2,810 ± 0,003	198 ± 4	8828
GLY + mocznik							
<i>m</i>	N_e	ν^o	ν^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
GLY	8,1 ± 0,5	2501 ± 2	2451 ± 2	2,800 ± 0,003	2,803 ± 0,003	200 ± 4	8810
0,4849	6,4 ± 0,5	2507 ± 2	2460 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	188 ± 4	8402
0,9691	5,3 ± 0,5	2509 ± 2	2463 ± 2	2,810 ± 0,003	2,815 ± 0,003	181 ± 4	8073
1,4533	4,6 ± 0,5	2509 ± 2	2465 ± 2	2,821 ± 0,003	2,818 ± 0,003	179 ± 4	7848
1,9375	4,2 ± 0,5	2509 ± 2	2468 ± 2	2,821 ± 0,003	2,821 ± 0,003	173 ± 4	7691
3,8742	3,7 ± 0,5	2509 ± 2	2477 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	162 ± 4	7598
6,2951	3,6 ± 0,5	2508 ± 2	2482 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	159 ± 4	7772
NMG + betaina							
<i>m</i>	N_e	ν^o	ν^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
NMG	8,4 ± 0,5	2505 ± 2	2462 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	190 ± 4	8895
0,2851	8,0 ± 0,5	2505 ± 2	2466 ± 2	2,818 ± 0,003	2,810 ± 0,003	187 ± 4	9295
0,4715	7,5 ± 0,5	2505 ± 2	2467 ± 2	2,818 ± 0,003	2,810 ± 0,003	188 ± 4	9375
1,4640	6,4 ± 0,5	2509 ± 2	2476 ± 2	2,818 ± 0,003	2,810 ± 0,003	194 ± 4	9583
1,9379	5,0 ± 0,5	2509 ± 2	2468 ± 2	2,818 ± 0,003	2,810 ± 0,003	194 ± 4	9693
2,9268	4,4 ± 0,5	2513 ± 2	2469 ± 2	2,818 ± 0,003	2,810 ± 0,003	195 ± 4	9818
3,8641	4,1 ± 0,5	2513 ± 2	2470 ± 2	2,818 ± 0,003	2,800 ± 0,003	195 ± 4	9956
NMG + mocznik							
<i>m</i>	N_e	ν^o	ν^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
NMG	8,0 ± 0,5	2501 ± 2	2459 ± 2	2,800 ± 0,003	2,810 ± 0,003	194 ± 4	8812
0,4928	6,1 ± 0,5	2505 ± 2	2465 ± 2	2,810 ± 0,003	2,815 ± 0,003	189 ± 4	8686
0,9854	5,1 ± 0,5	2509 ± 2	2468 ± 2	2,810 ± 0,003	2,821 ± 0,003	182 ± 4	8545
1,4779	4,7 ± 0,5	2509 ± 2	2472 ± 2	2,821 ± 0,003	2,823 ± 0,003	179 ± 4	8463
1,9705	4,4 ± 0,5	2509 ± 2	2475 ± 2	2,821 ± 0,003	2,826 ± 0,003	173 ± 4	8371
3,9407	3,8 ± 0,5	2509 ± 2	2481 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	165 ± 4	8024
5,9108	3,4 ± 0,5	2507 ± 2	2484 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	161 ± 4	7596

m - molalność osmolitu [$mol \cdot kg^{-1}$], N_e - „eksperymentalna” liczba cząsteczek wody zaburzonej, ν^o - położenie maksimum pasma [cm^{-1}], ν^s - położenie środka ciężkości pasma [cm^{-1}], R_{oo}^o - odległość najbardziej prawdopodobna O...O [Å], R_{oo}^s - średnia odległość O...O [Å], *fwhh* - szerokość połówkowa pasma [cm^{-1}], *I* - natężenie integralne pasma [$dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

Tabela S3. Parametry pasm wody zaburzonej przez osmolity w badanych układach wraz z parametrami wody czystej.

NMA + betaina							
<i>m</i>	<i>N</i>	ν^o	ν^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,2904	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11128
0,9728	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11126
1,4602	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	197 ± 4	11133
1,7527	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	10946
1,9653	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11132
NMA + mocznik							
<i>m</i>	<i>N</i>	ν^o	ν^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4891	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	8090
0,9732	5,3 ± 0,5	2514 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	8264
1,4573	5,3 ± 0,5	2513 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	8317
1,9414	5,3 ± 0,5	2513 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8359
3,8778	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,826 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8536
5,8143	5,3 ± 0,5	2509 ± 2	2495 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8603

<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
7,7507	5,3 ± 0,5	2509 ± 2	2495 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	156 ± 4	8670
DMSO + betaina							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4848	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11145
0,9784	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11129
1,4544	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11128
1,9391	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11128
DMSO + mocznik							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4848	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	8229
0,9696	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8298
1,9391	5,3 ± 0,5	2513 ± 2	2495 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8360
3,8782	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,826 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8568
5,8172	5,3 ± 0,5	2509 ± 2	2495 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8603
<i>trpzip-1</i> + betaina							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,1710	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11115
0,3418	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11113
0,4101	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11129
0,6151	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11124
0,8201	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11107
0,9909	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11122
<i>trpzip-1</i> + mocznik							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4116	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	8047
1,0285	5,3 ± 0,5	2513 ± 2	2495 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	156 ± 4	8384
1,5426	5,3 ± 0,5	2513 ± 2	2495 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8296
2,0566	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8378
3,4275	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,826 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8489
3,9416	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,826 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8642
4,9698	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,826 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8549
5,7580	5,3 ± 0,5	2509 ± 2	2495 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8564
lizozyim + betaina							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,5041	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11152
1,0009	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11143
1,4356	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11139
2,3283	4,2 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11123
3,8809	4,1 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11119
lizozyim + mocznik							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4688	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	7846
1,0065	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	8190
1,9495	5,3 ± 0,5	2513 ± 2	2495 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	154 ± 4	8357
3,8978	5,3 ± 0,5	2511 ± 2	2495 ± 2	2,826 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8628
6,2358	5,3 ± 0,5	2509 ± 2	2495 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8691
GLY + betaina							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,2831	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11131
0,4758	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11144
0,9528	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11140
1,4640	4,4 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,800 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11146
2,9268	4,2 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	11195
3,8320	4,1 ± 0,5	2519 ± 2	2480 ± 2	2,810 ± 0,003	2,826 ± 0,003	193 ± 4	11262
GLY + mocznik							
<i>m</i>	<i>N</i>	v^o	v^s	R_{oo}^o	R_{oo}^s	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4849	5,3 ± 0,5	2515 ± 2	2494 ± 2	2,836 ± 0,003	2,841 ± 0,003	153 ± 4	7830



m	N	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,9691	$5,3 \pm 0,5$	2515 ± 2	2494 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	153 ± 4	8107
1,4533	$5,3 \pm 0,5$	2514 ± 2	2494 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	154 ± 4	8294
1,9375	$5,3 \pm 0,5$	2513 ± 2	2495 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	154 ± 4	8378
3,8742	$5,3 \pm 0,5$	2511 ± 2	2495 ± 2	$2,826 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	155 ± 4	8616
6,2951	$5,3 \pm 0,5$	2509 ± 2	2495 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	155 ± 4	8719
NMG + betaina							
m	N	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,2851	$4,4 \pm 0,5$	2521 ± 2	2480 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	196 ± 4	11135
0,4715	$4,4 \pm 0,5$	2521 ± 2	2480 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	196 ± 4	11144
1,4640	$4,4 \pm 0,5$	2521 ± 2	2480 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	196 ± 4	11134
1,9379	$4,4 \pm 0,5$	2521 ± 2	2480 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	196 ± 4	11129
2,9268	$4,2 \pm 0,5$	2521 ± 2	2480 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	196 ± 4	11188
3,8641	$4,1 \pm 0,5$	2519 ± 2	2480 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	193 ± 4	11292
NMG + mocznik							
m	N	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,4928	$5,3 \pm 0,5$	2515 ± 2	2494 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	153 ± 4	7967
0,9854	$5,3 \pm 0,5$	2514 ± 2	2494 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	153 ± 4	8125
1,4779	$5,3 \pm 0,5$	2513 ± 2	2494 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	154 ± 4	8279
1,9705	$5,3 \pm 0,5$	2513 ± 2	2495 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	154 ± 4	8346
3,9407	$5,3 \pm 0,5$	2511 ± 2	2495 ± 2	$2,826 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	155 ± 4	8603
5,9108	$5,3 \pm 0,5$	2509 ± 2	2495 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	155 ± 4	8571
HDO							
HDO	-	2509 ± 2	2497 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	162 ± 4	10142

m - molalność osmolu $[mol \cdot kg^{-1}]$, N - liczba cząsteczek wody zaburzonej, ν^o - położenie maksimum pasma $[cm^{-1}]$, ν^g - położenie środka ciężkości pasma $[cm^{-1}]$, R_{oo}^o - odległość najbardziej prawdopodobna O...O $[Å]$, R_{oo}^g - średnia odległość O...O $[Å]$, $fwhh$ - szerokość połówkowa pasma $[cm^{-1}]$, I - natężenie integralne pasma $[dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}]$

Tabela S4. Parametry pasm „syntetycznej” wody zaburzonej w badanych układach.

NMA + betaina							
m	N_s	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,2904	$3,6 \pm 0,5$	2507 ± 2	2480 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	174 ± 4	11783
0,9728	$3,9 \pm 0,5$	2511 ± 2	2480 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	184 ± 4	11466
1,4602	$4,0 \pm 0,5$	2513 ± 2	2480 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	184 ± 4	11389
1,7527	$4,0 \pm 0,5$	2513 ± 2	2480 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	188 ± 4	11372
1,9653	$4,1 \pm 0,5$	2513 ± 2	2480 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	188 ± 4	11342
NMA + mocznik							
m	N_s	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,4891	$3,8 \pm 0,5$	2505 ± 2	2483 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	161 ± 4	9874
0,9732	$4,2 \pm 0,5$	2507 ± 2	2486 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,833 \pm 0,003$	160 ± 4	9409
1,4573	$4,4 \pm 0,5$	2507 ± 2	2488 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,833 \pm 0,003$	161 ± 4	9161
1,9414	$4,5 \pm 0,5$	2507 ± 2	2489 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,836 \pm 0,003$	159 ± 4	9053
3,8778	$4,8 \pm 0,5$	2509 ± 2	2492 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,838 \pm 0,003$	159 ± 4	8909
5,8143	$5,0 \pm 0,5$	2509 ± 2	2494 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,838 \pm 0,003$	156 ± 4	8190
7,7507	$5,0 \pm 0,5$	2511 ± 2	2493 ± 2	$2,826 \pm 0,003$	$2,838 \pm 0,003$	157 ± 4	8543
DMSO + betaina							
m	N_s	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,4848	$3,1 \pm 0,5$	2519 ± 2	2482 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,831 \pm 0,003$	179 ± 4	12009
0,9784	$3,5 \pm 0,5$	2519 ± 2	2481 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	184 ± 4	11706
1,4544	$3,6 \pm 0,5$	2521 ± 2	2481 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	185 ± 4	11563
1,9391	$3,8 \pm 0,5$	2521 ± 2	2481 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	190 ± 4	11486
DMSO + mocznik							
m	N_s	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,4848	$3,7 \pm 0,5$	2513 ± 2	2488 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,836 \pm 0,003$	165 ± 4	9850
0,9696	$4,1 \pm 0,5$	2513 ± 2	2490 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,839 \pm 0,003$	163 ± 4	9377
1,9391	$4,5 \pm 0,5$	2513 ± 2	2491 ± 2	$2,823 \pm 0,003$	$2,839 \pm 0,003$	161 ± 4	9032

<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
3,8782	4,8 ± 0,5	2511 ± 2	2491 ± 2	2,823 ± 0,003	2,839 ± 0,003	156 ± 4	8902
5,8172	5,0 ± 0,5	2511 ± 2	2493 ± 2	2,823 ± 0,003	2,839 ± 0,003	156 ± 4	8887
<i>trpzip-1 + betaina</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,1710	15,0 ± 0,5	2517 ± 2	2477 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	188 ± 4	7904
0,3418	10,2 ± 0,5	2517 ± 2	2479 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	191 ± 4	8519
0,4101	9,3 ± 0,5	2517 ± 2	2478 ± 2	2,821 ± 0,003	2,828 ± 0,003	192 ± 4	8686
0,6151	7,7 ± 0,5	2517 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	190 ± 4	9115
0,8201	6,9 ± 0,5	2517 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	191 ± 4	9426
0,9909	6,5 ± 0,5	2519 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	191 ± 4	9602
<i>trpzip-1 + mocznik</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4116	10,2 ± 0,5	2513 ± 2	2487 ± 2	2,823 ± 0,003	2,836 ± 0,003	163 ± 4	7420
1,0285	7,4 ± 0,5	2513 ± 2	2491 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	159 ± 4	7876
1,5426	6,7 ± 0,5	2512 ± 2	2492 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	158 ± 4	7933
2,0566	6,3 ± 0,5	2511 ± 2	2493 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	158 ± 4	8153
3,4275	5,9 ± 0,5	2511 ± 2	2493 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	158 ± 4	8266
3,9416	5,8 ± 0,5	2511 ± 2	2494 ± 2	2,823 ± 0,003	2,838 ± 0,003	158 ± 4	8414
4,9698	5,8 ± 0,5	2511 ± 2	2494 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8372
5,7580	5,7 ± 0,5	2511 ± 2	2494 ± 2	2,823 ± 0,003	2,841 ± 0,003	155 ± 4	8414
<i>lizozym + betaina</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,5041	10,0 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	201 ± 4	9759
1,0009	7,3 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	198 ± 4	10186
1,4356	6,4 ± 0,5	2521 ± 2	2479 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	199 ± 4	10367
2,3283	5,6 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	199 ± 4	10586
3,8809	5,1 ± 0,5	2521 ± 2	2480 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	196 ± 4	10765
<i>lizozym + mocznik</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4688	11,1 ± 0,5	2516 ± 2	2486 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	180 ± 4	9330
1,0065	8,0 ± 0,5	2515 ± 2	2488 ± 2	2,821 ± 0,003	2,839 ± 0,003	169 ± 4	8951
1,9495	6,7 ± 0,5	2513 ± 2	2492 ± 2	2,823 ± 0,003	2,839 ± 0,003	164 ± 4	8826
3,8978	6,0 ± 0,5	2511 ± 2	2493 ± 2	2,823 ± 0,003	2,839 ± 0,003	159 ± 4	8827
6,2358	5,7 ± 0,5	2510 ± 2	2493 ± 2	2,823 ± 0,003	2,839 ± 0,003	159 ± 4	8828
<i>GLY + betaina</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,2831	7,4 ± 0,5	2507 ± 2	2460 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	194 ± 4	9396
0,4758	7,0 ± 0,5	2507 ± 2	2462 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	197 ± 4	9541
0,9528	6,4 ± 0,5	2512 ± 2	2465 ± 2	2,810 ± 0,003	2,816 ± 0,003	195 ± 4	9813
1,4640	6,0 ± 0,5	2513 ± 2	2468 ± 2	2,810 ± 0,003	2,818 ± 0,003	197 ± 4	10016
2,9268	5,4 ± 0,5	2515 ± 2	2471 ± 2	2,810 ± 0,003	2,821 ± 0,003	196 ± 4	10375
3,8320	5,0 ± 0,5	2515 ± 2	2472 ± 2	2,810 ± 0,003	2,821 ± 0,003	196 ± 4	10552
<i>GLY + mocznik</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,4849	7,6 ± 0,5	2503 ± 2	2460 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	186 ± 4	8597
0,9691	6,7 ± 0,5	2509 ± 2	2467 ± 2	2,821 ± 0,003	2,821 ± 0,003	179 ± 4	8514
1,4533	6,4 ± 0,5	2509 ± 2	2472 ± 2	2,821 ± 0,003	2,823 ± 0,003	174 ± 4	8512
1,9375	6,2 ± 0,5	2509 ± 2	2475 ± 2	2,821 ± 0,003	2,826 ± 0,003	171 ± 4	8556
3,8742	5,9 ± 0,5	2509 ± 2	2483 ± 2	2,821 ± 0,003	2,833 ± 0,003	162 ± 4	8616
6,2951	5,7 ± 0,5	2509 ± 2	2484 ± 2	2,821 ± 0,003	2,833 ± 0,003	160 ± 4	8678
<i>NMG + betaina</i>							
<i>m</i>	<i>N_s</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,2851	7,5 ± 0,5	2505 ± 2	2464 ± 2	2,810 ± 0,003	2,816 ± 0,003	193 ± 4	9166
0,4715	7,1 ± 0,5	2505 ± 2	2466 ± 2	2,810 ± 0,003	2,818 ± 0,003	193 ± 4	9215
1,4640	6,4 ± 0,5	2515 ± 2	2470 ± 2	2,810 ± 0,003	2,821 ± 0,003	195 ± 4	9849
1,9379	5,7 ± 0,5	2515 ± 2	2472 ± 2	2,810 ± 0,003	2,821 ± 0,003	195 ± 4	10026
2,9268	5,4 ± 0,5	2515 ± 2	2474 ± 2	2,810 ± 0,003	2,823 ± 0,003	194 ± 4	10205



m	N_s	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
3,8641	$5,0 \pm 0,5$	2515 ± 2	2474 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	195 ± 4	10407
NMG + mocznik							
m	N_s	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
0,4928	$7,1 \pm 0,5$	2507 ± 2	2467 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,821 \pm 0,003$	185 ± 4	8611
0,9854	$6,7 \pm 0,5$	2509 ± 2	2472 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	180 ± 4	8569
1,4779	$6,4 \pm 0,5$	2509 ± 2	2476 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	173 ± 4	8530
1,9705	$6,2 \pm 0,5$	2509 ± 2	2479 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	170 ± 4	8526
3,9407	$5,8 \pm 0,5$	2509 ± 2	2485 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,833 \pm 0,003$	166 ± 4	8642
5,9108	$5,7 \pm 0,5$	2509 ± 2	2487 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,836 \pm 0,003$	164 ± 4	8567

m - molalność osmolitu [$mol \cdot kg^{-1}$], N_s - „syntetyczna” liczba cząsteczek wody zaburzonej, ν^o - położenie maksimum pasma [cm^{-1}], ν^g - położenie środka ciężkości pasma [cm^{-1}], R_{oo}^o - odległość najbardziej prawdopodobna O...O [Å], R_{oo}^g - średnia odległość O...O [Å], $fwhh$ - szerokość połówkowa pasma [cm^{-1}], I - natężenie integralne pasma [$dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

Tabela S5. Parametry pasm wody „podwójnie” zaburzonej w badanych układach oraz wody zaburzonej przez cząsteczki centralne.

NMA + betaina							
m	N_d	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
NMA	$3,4 \pm 0,5$	2505 ± 2	2479 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	167 ± 4	12011
0,2904	$0,7 \pm 0,5$	2507 ± 2	2496 ± 2	$2,828 \pm 0,003$	$2,841 \pm 0,003$	165 ± 4	881
0,9728	$-0,5 \pm 0,5$	2432 ± 2	2459 ± 2	$2,762 \pm 0,003$	$2,798 \pm 0,003$	227 ± 4	1007
1,4602	$-0,7 \pm 0,5$	2432 ± 2	2458 ± 2	$2,762 \pm 0,003$	$2,792 \pm 0,003$	230 ± 4	1586
1,7527	$-0,6 \pm 0,5$	2426 ± 2	2457 ± 2	$2,757 \pm 0,003$	$2,793 \pm 0,003$	233 ± 4	1442
1,9653	$-0,6 \pm 0,5$	2423 ± 2	2456 ± 2	$2,757 \pm 0,003$	$2,790 \pm 0,003$	232 ± 4	1415
NMA + mocznik							
m	N_d	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
NMA	$3,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2475 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	163 ± 4	11368
0,4891	$-0,7 \pm 0,5$	2505 ± 2	2483 ± 2	$2,836 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	163 ± 4	2264
0,9732	$-1,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2482 ± 2	$2,826 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	161 ± 4	2465
1,4573	$-1,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2484 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	156 ± 4	2211
1,9414	$-1,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2484 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	156 ± 4	2113
3,8778	$-1,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2486 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	153 ± 4	1687
5,8143	$-0,9 \pm 0,5$	2503 ± 2	2485 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	157 ± 4	1872
7,7507	$-0,9 \pm 0,5$	2495 ± 2	2488 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	145 ± 4	1469
DMSO + betaina							
m	N_d	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
DMSO	$2,5 \pm 0,5$	2517 ± 2	2484 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,831 \pm 0,003$	167 ± 4	12850
0,4848	$-0,4 \pm 0,5$	2521 ± 2	2476 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	183 ± 4	1992
0,9784	$-0,7 \pm 0,5$	2521 ± 2	2473 ± 2	$2,793 \pm 0,003$	$2,821 \pm 0,003$	193 ± 4	2604
1,4544	$-0,8 \pm 0,5$	2522 ± 2	2471 ± 2	$2,785 \pm 0,003$	$2,818 \pm 0,003$	201 ± 4	3148
1,9391	$-0,9 \pm 0,5$	2522 ± 2	2471 ± 2	$2,777 \pm 0,003$	$2,818 \pm 0,003$	202 ± 4	3064
DMSO + mocznik							
m	N_d	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
DMSO	$2,5 \pm 0,5$	2517 ± 2	2484 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,831 \pm 0,003$	167 ± 4	12850
0,4848	$-0,5 \pm 0,5$	2509 ± 2	2485 ± 2	$2,818 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	166 ± 4	943
0,9696	$-0,7 \pm 0,5$	2510 ± 2	2484 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,831 \pm 0,003$	165 ± 4	1120
1,9391	$-0,7 \pm 0,5$	2517 ± 2	2486 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,831 \pm 0,003$	160 ± 4	1306
3,8782	$-1,4 \pm 0,5$	2513 ± 2	2488 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,833 \pm 0,003$	156 ± 4	1643
5,8172	$-1,7 \pm 0,5$	2509 ± 2	2489 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,831 \pm 0,003$	152 ± 4	2030
trpzip-1 + betaina							
m	N_d	ν^o	ν^g	R_{oo}^o	R_{oo}^g	$fwhh$	I
trpzip-1	$68,0 \pm 2$	2509 ± 2	2476 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,828 \pm 0,003$	183 ± 4	6872
0,1710	$-4,1 \pm 0,5$	2536 ± 2	2469 ± 2	$2,767 \pm 0,003$	$2,818 \pm 0,003$	221 ± 4	2086
0,3418	$-3,5 \pm 0,5$	2536 ± 2	2471 ± 2	$2,767 \pm 0,003$	$2,818 \pm 0,003$	217 ± 4	3724
0,4101	$-2,9 \pm 0,5$	2532 ± 2	2474 ± 2	$2,767 \pm 0,003$	$2,821 \pm 0,003$	215 ± 4	3870

<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
0,6151	-2,4 ± 0,5	2532 ± 2	2474 ± 2	2,772 ± 0,003	2,823 ± 0,003	210 ± 4	4711
0,8201	-2,3 ± 0,5	2532 ± 2	2474 ± 2	2,785 ± 0,003	2,828 ± 0,003	212 ± 4	5589
0,9909	-1,8 ± 0,5	2530 ± 2	2475 ± 2	2,777 ± 0,003	2,826 ± 0,003	204 ± 4	5184
<i>trpzip-1</i> + mocznik							
<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
<i>trpzip-1</i>	69,0 ± 0,5	2513 ± 2	2481 ± 2	2,821 ± 0,003	2,831 ± 0,003	177 ± 4	6882
0,4116	-2,0 ± 0,5	2540 ± 2	2490 ± 2	2,846 ± 0,003	2,869 ± 0,003	166 ± 4	1297
1,0285	-1,5 ± 0,5	2524 ± 2	2490 ± 2	2,838 ± 0,003	2,838 ± 0,003	163 ± 4	1368
1,5426	-1,5 ± 0,5	2517 ± 2	2490 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	158 ± 4	1582
2,0566	-1,4 ± 0,5	2517 ± 2	2488 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	156 ± 4	1603
3,4275	-1,0 ± 0,5	2511 ± 2	2491 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	152 ± 4	1295
3,9416	-1,0 ± 0,5	2520 ± 2	2488 ± 2	2,836 ± 0,003	2,836 ± 0,003	153 ± 4	1222
4,9698	-1,0 ± 0,5	2517 ± 2	2491 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	152 ± 4	1243
5,7580	-1,0 ± 0,5	2516 ± 2	2491 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	152 ± 4	1278
lizozym + betaina							
<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
lizozym	375,0 ± 20	2520 ± 2	2477 ± 2	2,810 ± 0,003	2,828 ± 0,003	203 ± 4	8755
0,5041	-2,2 ± 0,5	2528 ± 2	2476 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	225 ± 4	4537
1,0009	-2,1 ± 0,5	2524 ± 2	2478 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	210 ± 4	5188
1,4356	-2,1 ± 0,5	2522 ± 2	2477 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	208 ± 4	6234
2,3283	-1,9 ± 0,5	2522 ± 2	2477 ± 2	2,800 ± 0,003	2,826 ± 0,003	206 ± 4	7568
3,8809	-1,6 ± 0,5	2520 ± 2	2478 ± 2	2,810 ± 0,003	2,826 ± 0,003	201 ± 4	6948
lizozym + mocznik							
<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
lizozym	360,0 ± 20	2519 ± 2	2480 ± 2	2,810 ± 0,003	2,831 ± 0,003	199 ± 4	10426
0,4688	-1,6 ± 0,5	2522 ± 2	2486 ± 2	2,828 ± 0,003	2,836 ± 0,003	189 ± 4	1542
1,0065	-1,3 ± 0,5	2509 ± 2	2487 ± 2	2,826 ± 0,003	2,833 ± 0,003	173 ± 4	1646
1,9495	-1,1 ± 0,5	2505 ± 2	2489 ± 2	2,821 ± 0,003	2,833 ± 0,003	158 ± 4	1512
3,8978	-1,2 ± 0,5	2509 ± 2	2487 ± 2	2,821 ± 0,003	2,833 ± 0,003	155 ± 4	1556
6,2358	-1,2 ± 0,5	2509 ± 2	2490 ± 2	2,821 ± 0,003	2,836 ± 0,003	149 ± 4	1597
GLY + betaina							
<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
GLY	8,3 ± 0,5	2505 ± 2	2456 ± 2	2,808 ± 0,003	2,810 ± 0,003	192 ± 4	9096
0,2831	2,2 ± 0,5	2530 ± 2	2504 ± 2	2,838 ± 0,003	2,859 ± 0,003	170 ± 4	708
0,4758	2,2 ± 0,5	2521 ± 2	2505 ± 2	2,836 ± 0,003	2,854 ± 0,003	167 ± 4	1202
0,9528	2,7 ± 0,5	2511 ± 2	2483 ± 2	2,821 ± 0,003	2,833 ± 0,003	180 ± 4	2359
1,4640	2,0 ± 0,5	2509 ± 2	2483 ± 2	2,828 ± 0,003	2,833 ± 0,003	174 ± 4	1572
2,9268	-1,9 ± 0,5	2509 ± 2	2467 ± 2	2,821 ± 0,003	2,818 ± 0,003	193 ± 4	2110
3,8320	-1,6 ± 0,5	2517 ± 2	2463 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	202 ± 4	1702
GLY + mocznik							
<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
GLY	8,1 ± 0,5	2501 ± 2	2451 ± 2	2,800 ± 0,003	2,803 ± 0,003	200 ± 4	8810
0,4849	-0,8 ± 0,5	2511 ± 2	2445 ± 2	2,777 ± 0,003	2,795 ± 0,003	224 ± 4	736
0,9691	-1,4 ± 0,5	2509 ± 2	2444 ± 2	2,780 ± 0,003	2,795 ± 0,003	206 ± 4	1353
1,4533	-1,8 ± 0,5	2509 ± 2	2444 ± 2	2,793 ± 0,003	2,795 ± 0,003	196 ± 4	1782
1,9375	-2,0 ± 0,5	2509 ± 2	2449 ± 2	2,800 ± 0,003	2,803 ± 0,003	186 ± 4	1987
3,8742	-2,2 ± 0,5	2509 ± 2	2466 ± 2	2,821 ± 0,003	2,818 ± 0,003	164 ± 4	2217
6,2951	-2,1 ± 0,5	2507 ± 2	2474 ± 2	2,821 ± 0,003	2,823 ± 0,003	154 ± 4	2324
NMG + betaina							
<i>m</i>	<i>N_d</i>	<i>v^o</i>	<i>v^g</i>	<i>R_{oo}^o</i>	<i>R_{oo}^g</i>	<i>fwhh</i>	<i>I</i>
NMG	8,4 ± 0,5	2505 ± 2	2462 ± 2	2,810 ± 0,003	2,813 ± 0,003	190 ± 4	8895
0,2851	0,5 ± 0,5	2501 ± 2	2478 ± 2	2,823 ± 0,003	2,828 ± 0,003	161 ± 4	832
0,4715	0,4 ± 0,5	2501 ± 2	2480 ± 2	2,823 ± 0,003	2,831 ± 0,003	151 ± 4	801
1,4640	0,0 ± 0,5	2490 ± 2	2427 ± 2	2,810 ± 0,003	2,790 ± 0,003	157 ± 4	768
1,9379	-0,7 ± 0,5	2492 ± 2	2440 ± 2	2,810 ± 0,003	2,796 ± 0,003	170 ± 4	1095
2,9268	-1,0 ± 0,5	2499 ± 2	2448 ± 2	2,800 ± 0,003	2,803 ± 0,003	190 ± 4	1883
3,8641	-0,9 ± 0,5	2499 ± 2	2446 ± 2	2,787 ± 0,003	2,796 ± 0,003	197 ± 4	2060

NMG + mocznik							
m	N_d	ν^o	ν^s	R_{OO}^o	R_{OO}^s	$fwhh$	I
NMG	$8,0 \pm 0,5$	2501 ± 2	2459 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,810 \pm 0,003$	194 ± 4	8812
0,4928	$-1,0 \pm 0,5$	2490 ± 2	2451 ± 2	$2,785 \pm 0,003$	$2,800 \pm 0,003$	213 ± 4	1293
0,9854	$-1,6 \pm 0,5$	2505 ± 2	2455 ± 2	$2,793 \pm 0,003$	$2,805 \pm 0,003$	200 ± 4	2018
1,4779	$-1,7 \pm 0,5$	2512 ± 2	2461 ± 2	$2,800 \pm 0,003$	$2,813 \pm 0,003$	188 ± 4	2222
1,9705	$-1,8 \pm 0,5$	2513 ± 2	2465 ± 2	$2,810 \pm 0,003$	$2,815 \pm 0,003$	181 ± 4	2356
3,9407	$-2,0 \pm 0,5$	2509 ± 2	2474 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,823 \pm 0,003$	167 ± 4	2490
5,9108	$-2,3 \pm 0,5$	2505 ± 2	2478 ± 2	$2,821 \pm 0,003$	$2,826 \pm 0,003$	154 ± 4	2481

m - molalność osmolitu [$mol \cdot kg^{-1}$], N_d - liczba cząsteczek wody „podwójnie” zaburzonej, ν^o - położenie maksimum pasma [cm^{-1}], ν^s - położenie środka ciężkości pasma [cm^{-1}], R_{OO}^o - odległość najbardziej prawdopodobna O...O [Å], R_{OO}^s - średnia odległość O...O [Å], $fwhh$ - szerokość połówkowa pasma [cm^{-1}], I - natężenie integralne pasma [$dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

