

JAROSŁAW POZNAŃSKI

*Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
Zakład Fizykochemii Kompleksów Supramolekularnych
Instytut Chemii Fizycznej PAN
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa
e-mail: jarek@ibb.waw.pl*

POSZUKIWANIE MODELU WODY OPISUJĄCEGO HYDRATACJĘ BIOLOGICZNYCH MAKROMOLEKUŁ

WSTĘP

Wszystkie znane przejawy życia związane są z wodą, która stanowi ponad 70% masy żywej komórki. Pierwsza żyjąca, to znaczy zdolna do samopowielenia, cząsteczka powstała około 3,5 miliarda lat temu w praoceanie pokrywającym znaczną część Ziemi. Od tego czasu obecność życia nierozłącznie wiąże się ze środowiskiem wodnym. Wytworzona w toku ewolucji błona komórkowa pozwoliła na znaczne uniezależnienie się żyjącego organizmu od niestabilności środowiska zewnętrznego. Obecność w błonie podwójnej warstwy lipidowej, której przepuszczalność dla różnych związków chemicznych może być przez komórkę kontrolowana, pozwala na istnienie znaczących różnic w ich stężeniu po obu jej stronach. Umożliwia to efektywną stabilizację składu środowiska wewnętrznego, zoptymalizowanego do prowadzenia niezbędnych reakcji (bio)chemicznych. Co więcej, w cytosolu, to znaczy w wodnym środowisku zamkniętym wewnątrz komórki (*in vivo*), lokalne stężenie wielu substancji znacznie przekracza wartości możliwe do osiągnięcia *in vitro*. Znajdujące się w cytoplazmie białka i struktury błonowe, zwane także cząsteczkami tła, zmniejszają przestrzeń dostępną dla innych molekuł (FULTON 1987). W efekcie wiele parametrów termodynamicznych opisujących własności białka *in vivo* może być odmiennych od tych, które zarejestrowane zostały *in vitro* (ZIMMERMAN i MINTON 1993, ELLIS i MINTON 2003). Już na początku lat 70.

ubiegłego stulecia wykazano, iż aktywność chemiczna enzymów, podobnie jak ich rozpuszczalność, może w warunkach zatłoczenia molekularnego zmieniać się o kilka rzędów wielkości (LAURENT 1971, ATHA i INGHAM 1981). Obecność błony komórkowej była jednym z czynników pozwalających żywym organizmom na opanowanie środowiska lądowego, co stało się zaledwie kilkaset milionów lat temu, po ponad 3 miliardach lat ewolucji od powstania pierwszego żywego organizmu. W tym wypadku podwójna warstwa lipidowa stała się granicą między wodnym roztworem cytosolu zawartym we wnętrzu komórki a bezwodnym otoczeniem. Dodatkowo, niektóre organizmy są chronione ścianą komórkową, która znacznie zwiększa odporność komórki na bodźce zewnętrzne, zaś inne, wielokomórkowe, wykształciły skórę – wyspecjalizowaną tkankę zbudowaną z wielu warstw odpowiednio przystosowanych komórek, której rolą jest ochrona organizmu przed wpływem środowiska zewnętrznego. Zarówno siła jonowa, jak i pH płynów ustrojowych organizmu ludzkiego są bardzo zbliżone do wartości mierzonych dla wody morskiej, co jest najprawdopodobniej piętnem pierwotnego praoceanu, w którym narodziło się życie (PIKUŁA 2004).

Niemal wszystkie reakcje biochemiczne zachodzące w żywej komórce są związane z wodnym otoczeniem; zarówno substraty, jak i produkty są zwykle transportowane na

drodze dyfuzji. Analiza dostępnych struktur krystalograficznych białek wykazuje, że cząsteczki wody są często bezpośrednio zaangażowane w stabilizację ich struktury. Często pośredniczą w oddziaływaniach między makromolekułami, a nawet biorą bezpośredni udział w katalizie reakcji chemicznej (BRAIG i współaut. 2000), w której mogą pełnić rolę zarówno akceptora, jak i donora protonu. Rolę wody w specyficznej stabilizacji struktury białka najdobitniej wyraża proces liofilizacji, to jest usunięcia z układu zawartej w nim wody. Białka poddane wielokrotnie cyklowi liofilizacji tracą zwykle, przynajmniej częściowo, aktywność katalityczną. Często desolwatacja białka, spowodowana procesem liofilizacji,

powoduje tak znaczące zmiany w jego strukturze, że proces ten jest nieodwracalny, a białko staje się nierozpuszczalne.

Ze względu na szczególną rolę wody jako środowiska, w którym zachodzą procesy życiowe i towarzysząca im samoorganizacja makromolekularnych struktur komórkowych, niezbędne jest zarówno określenie parametrów termodynamicznych, jak i stworzenie modelu pozwalającego na ilościowy opis zjawiska hydratacji cząsteczek o różnej skali wielkości. Problem ten, zwłaszcza dla makromolekuł biologicznych, jest od wielu lat przedmiotem intensywnych badań wielu grup badawczych.

WODA – BUDOWA CHEMICZNA

Od czasów starożytnych woda, obok ognia, powietrza i ziemi, uważana była za jeden z czterech żywiołów traktowanych jako „byty elementarne”, wchodzące w skład wszystkich innych substancji. Wodór, jak dziś wiemy jeden ze składników cząsteczki wody, został najprawdopodobniej po raz pierwszy otrzymany przez szwajcarskiego alchemika, Theophrastusa Philippusa Aureolusa Bombastusa von Hohenheim (1493–1541) zwanego Paracelsusem, jako gaz powstający w wyniku działania wodnych roztworów silnych kwasów nieorganicznych na metale. Na przełomie lat 1784 i 1785 Henry Cavendish (1731–1810) pokazał, że woda, wbrew opinii Platona (427–347 p.n.e.) i Arystotelesa (384–322 p.n.e.), nie jest jednym z czterech żywiołów, ale produktem wybuchowej reakcji gazu, wyodrębnionego wcześniej przez Cavendisha, z powietrzem atmosferycznym. W wyniku se-

rii eksperymentów Joseph Priestley (1733–1804) w 1774 r. wyodrębnił z powietrza niezwykle reaktywny składnik, a Antoine Lavoisier (1743–1794) powtarzając eksperymenty przeprowadzone wcześniej przez Cavendisha i Priestleya wykazał, że bezpośrednim produktem reakcji gazów otrzymanych w obu eksperymentach jest woda. Konsekwentnie, wyodrębnione przez poprzedników gazy nazwał odpowiednio „wodorodem” (ang. hydrogen, pol. wodór) i „kwasorodem” (ang. oxygen, pol. tlen). Obie polskie nazwy zawdzięczamy Jędrzejowi Śniadeckiemu (1768–1838). Na początku XIX w. Amedeo Avogadro (1776–1856) za pomocą pomiaru objętości gazów powstających w procesie elektrolizy wykazał, że cząsteczka wody składa się z dwóch atomów wodoru i jednego atomu tlenu (a dokładniej, że takie są proporcje obu tych pierwiastków).

NIEZWYKŁE WŁASNOŚCI WODY

Woda jest substancją niezbędną człowiekowi i z tej właśnie przyczyny stała się wzorcem wielu wielkości fizycznych. I tak, na podstawie jej temperatur krzepnięcia i wrzenia została wprowadzona przez Andersa Celsiusa (1701–1744) uniwersalna skala temperatur, ciężar jej 1 cm³ w temperaturze 4°C stał się wzorcem masy (gram), a jednostka ciepła (kaloria) została powiązana z pojemnością cieplną 1g wody o temperaturze 15°C. Woda jako ciecz stanowi niezwykle rozpuszczalnik. Wiele jej fizykochemicznych

i termodynamicznych własności wyróżnia ją od wszystkich innych, tak zwanych niewodnych rozpuszczalników. Część z nich zebrana została w Tabeli 1. Większość z obserwowanych różnic wynika bezpośrednio z własności pojedynczej cząsteczki H₂O zbudowanej z dwóch atomów wodoru (izotop ¹H) związanych z atomem tlenu (¹⁶O). Atom tlenu w hybrydyzacji sp³ wykazuje symetrię tetragonalną (C_{2v}), w ogólnym zarysie zgodną z symetrią czworościanu foremniego. Dwa naroża czworościanu zajęte są przez atomy wodoru,

podczas gdy dwa pozostałe wyznaczają kierunek dwóch zamkniętopowłokowych orbitali cząsteczkowych. Równowagowa odległość między atomami tlenu i wodoru wynosi 0,98 Å. Średnia wartość kąta między wiązaniami OH (107°) odbiega od teoretycznej wartości kąta, pod jakim przecinają się wysokości czworościanu foremnego ($109,5^\circ$), co świadczy o lekkiej deformacji cząsteczki pod wpływem wewnętrznych oddziaływań elektrostatycznych. Atom tlenu wykazuje większe powinowactwo do elektronów walencyjnych niż atomy wodoru (cecha ta nazywa się elektroujemnością), co powoduje przesunięcie gęstości elektronów w jego kierunku. W konsekwencji atomy neutralnej cząsteczki wody są naładowane, na atomie tlenu jest nadmiar 0,22 elektronu (ładunek cząstkowy $-0,22e$), podczas gdy oba atomy wodoru wykazują deficyt gęstości elektronowej (0,11e). Dodatkowo następuje przeniesienie gęstości elektronowej w kierunku zamkniętopowłokowych orbitali, co jest powodem powstania znacznego statycznego momentu dipolowego (μ), którego wartość (1.85D) przewyższa wielkości obserwowane dla większości rozpuszczalników. Z powodu braku zdelokalizowanych elektronów molekułę wody charakteryzuje stosunkowo mała, w porównaniu z innymi rozpuszczalnikami, polaryzowalność cząsteczkowa (α). Z kolei, niezwykle duża wartość przenikalności dielektrycznej (ϵ) ciekłej wody jest związana z możliwością niemal swobodnej reorientacji cząsteczek o dużym momencie dipolowym (μ) pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego. Jeżeli szybka reorientacja cząsteczek zostanie uniemożliwiona, np. przez zmianę stanu skupienia, przenikalność dielektryczna znacząco się zmniejsza. Tak dla wody w temperaturze 298K wynosi ona około 78, wzrastając do 87 w 273 K (punkt krzepnięcia) i 108 dla cieczy przechłodzonej w 238K, ale dla lodu w temperaturze 263K wynosi tylko 3,5. Tak znaczna wartość stałej dielektrycznej ułatwia dysocjację związków jonowych czyniąc z wody znakomity rozpuszczalnik. Z kolei, symetria molekuły wody implikuje ogólną topologię sieci oddziaływań międzycząsteczkowych w stanie ciekłym. Każda cząsteczka rozpuszczalnika może być zaangażowana w maksymalnie cztery wiązania wodorowe, udostępniając dwa własne atomy wodoru innym molekułom oraz oddziałując z dwoma atomami wodoru otaczających cząsteczek. Idealny schemat sieci wiązań wodorowych jest praktycznie realizowany w kryształach lodu o syme-

trii heksagonalnej (tak zwany lód 1h), w którym każda cząsteczka tworzy cztery wiązania wodorowe z czterema najbliższymi sąsiadami

Podczas stopniowego podnoszenia temperatury, rosnąca amplituda drgań termicznych powoduje zerwanie niektórych wiązań wodorowych i, w konsekwencji, stopnienie lodu. Obecność silnych oddziaływań międzycząsteczkowych (około $21 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ na każde wiązanie wodorowe) tak znacznie podwyższa temperaturę topnienia, że jest ona dla wody jedną z najwyższych, jakie są obserwowane dla związków o porównywalnych masach (amoniak, metan, cyjanowodór, metanol, etanol, aceton, kwas octowy, kwas mrówkowy, heksan, cykloheksan, heksanol). Przy przejściu do stanu ciekłego większość z obecnych w lodzie wiązań wodorowych pozostaje zachowana, a ich średnia ilość w temperaturze 293K została oszacowana na 3,4 – co oznacza, że zerwanie jedynie jednego wiązania wodorowego na osiem wystarcza do przejścia wody ze stanu stałego do ciekłego. W konsekwencji ciepło topnienia lodu ($\Delta H_m \approx 6 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) jest zbliżone do wartości mierzonych dla innych substancji o podobnej masie. Ciepło parowania wody ($\Delta H_b \approx 40 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) jest niemal 7 razy wyższe, co jest prostą konsekwencją faktu, że zerwaniu muszą ulec wszystkie zachowane do tej pory wiązania wodorowe. W rzeczywistości, zgodnie z powyższym rozumowaniem, iloraz $\Delta H_b / \Delta H_m$ (6,7) z dobrym przybliżeniem odpowiada stosunkowi średniej liczby wiązań wodorowych zrywanych odpowiednio przy parowaniu i topnieniu – $3,4/0,6 = 5,7$.

Właściwości wody są także niezwykle, jeśli porównać ją z wodorkami innych pierwiastków grupy 6A. Analiza zależności temperatur topnienia i wrzenia wyznaczonych dla wodorków pierwiastków ułożonych kolejno w tej samej kolumnie układu okresowego, to jest H_2O , H_2S , H_2Se , H_2Te i H_2Po wykazuje, że wartości temperatury krzepnięcia i wrzenia dla wody, oszacowane na podstawie danych otrzymanych dla pozostałych związków, bardzo znacząco odbiegają od wielkości rzeczywiście mierzonych. Dla obu przejść obserwowane jest przesunięcie równowagi o odpowiednio 85 i 171 stopni. Co ciekawe, analogiczny, choć nieco mniejszy, efekt występuje także dla pierwiastków grup 5A (N, P, As, Sb, Bs) i 7A (F, Cl, Br, I, At). Dla wszystkich trzech serii związków temperatury przejść fazowych wyznaczone dla wodorku pierwszego pierwiastka w grupie, to jest odpowiednio NH_3 , H_2O i HF , znacząco odbie-

Tabela 1. Wybrane własności powszechnie stosowanych rozpuszczalników.

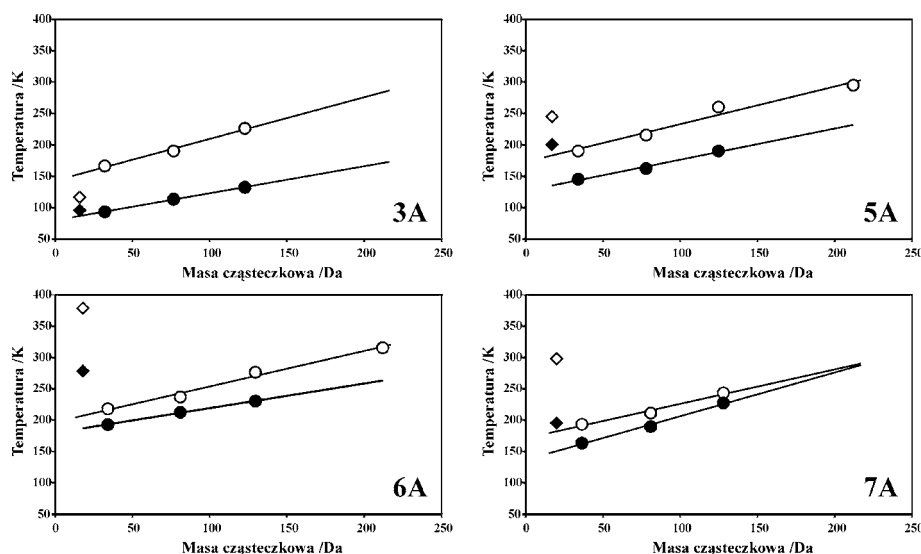
Rozpuszczalnik	Wzór strukturalny	M Da	V_2^0 cm ³ ·mol ⁻¹	ρ^{293} g·cm ⁻³	T_m K	ΔH_m kJ·mol ⁻¹	T_b K	ΔH_b kJ·mol ⁻¹	C_p^{298} J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹	ϵ	μ D	$\alpha \cdot 10^{40}$ J ⁻¹ ·C ² ·m ²	γ^{293} mN·m ⁻¹
Aceton		58.08	73.80	0.787	178.0		329.0		124.7	21.4	2.8		22.7
Amoniak	NH ₃	17.03	20.84		195.4	5.65	239.7	23.4	43.68	16.9	1.47	2.47	
Benzen		78.11	88.86	0.879	278.6	10.6	353.2	30.8	136.1	2.3	0.00	11.6	28.8
Chloroform		119.38	79.64	1.499	209.6		334.0		96	5.1	1.01	9.49	26.5
Cyjanowodór		27.03	39.67	0.699	259.7		299.0		70.63	~150	3.00		
DMSO		78.13	70.94	1.101	291.5		462.2	52.8		46.7	4.06		42.9
Etanol		46.07	58.39	0.789	158.7	4.60	351.4	43.5	111.46	24.3	1.69		22.8
Metanol	H ₃ C-OH	32.04	40.51	0.791	179.2	3.16	337.6	35.3	81.6	32.6	1.71	3.59	22.6
Woda		18.02	18.07	0.997	273.2	6.01	373.2	40.7	75.29	78.5	1.85	1.65	72.8
Heksan		86.18	130.6	0.660	177.8	13.08	342.1	28.9	46.6	1.9	0.00		18.4

gają w górę od wartości otrzymywanych dla pozostałych związków.

Zaobserwowane na Ryc. 1 zależności powinny wywołać co najmniej zaniepokojenie, tym bardziej, że opisany efekt nie występuje dla pierwiastków grupy 3A (C, Si, Ge, Sn, Pb). A przecież pierwiastki poszczególnych grup układu okresowego nie powinny aż tak bardzo różnić się od siebie. W obrębie grupy wykazują zbliżone własności elektronowe (elektroujemność) i porównywalne preferencje w tworzeniu związków chemicznych. Przecież na tej właśnie podstawie Dmitrij Iwanowicz Mendelejew (1834–1907) uszeregował je w układ okresowy. Źródłem obserwowanych rozbieżności jest wiązanie wodorowe, to jest specyficzne oddziaływanie między elektroujemnymi pierwiastkami, w którym pośredniczy atom wodoru związany z jednym z nich. Zdolność do tworzenia wiązania wodorowego praktycznie wykazują wyłącznie atomy azotu (N), tlenu (O) i fluorku (F) i właśnie dla ich wodorków sieć wiązań wodorowych wiąże sąsiadujące ze sobą cząsteczki na tyle silnie, że obserwowane jest tak znaczne podwyższenie temperatur przejść fazowych ciało stałe – ciecz i ciecz – gaz. Jednak efekt wiązania wodorowego jest najsilniejszy właśnie dla wody, co wynika z

faktu, że zarówno w przypadku NH₃ jak i HF każda cząsteczka może brać udział jedynie w dwóch wiązaniach wodorowych. W cząsteczce amoniaku występuje jedynie jedna para elektronowa stanowiąca akceptor wiązania wodorowego, podczas gdy w cząsteczce HF jest tylko jeden jego donator. W konsekwencji przesunięcie temperatur krzepnięcia i wrzenia (odpowiednio 65 K i 62 K dla amoniaku oraz 45 K i 116 K dla fluorowodoru) jest niemal dokładnie o połowę mniejsze, niż wartości obserwowane dla wody (85 K i 171 K), której każda cząsteczka może partycypować w aż czterech wiązaniach wodorowych. Dla pełności należy dodać, że także atom węgla jest w stanie utworzyć stosunkowo słabe wiązanie wodorowe, co zostało potwierdzone doświadczalnie między innymi za pomocą spektroskopii NMR

Niewielkie zmiany geometrii cząsteczki wody po zerwaniu wiązania wodorowego są przyczyną anomalnej, silnie niemonotonicznej zależności gęstości wody od temperatury. Osiąga ona maksimum w temperaturze 277K (4°C). Dane rentgenograficzne wykazują, że struktura lodu jest relatywnie dziurawa, a między cząsteczkami występują stosunkowo duże wolne przestrzenie. Powoduje to, że gęstość lodu jest znacząco mniejsza od gęstości



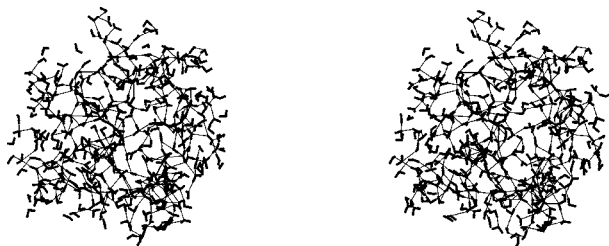
Ryc. 1. Temperatury topnienia (znaczniki zaczerńnione) i wrzenia (znaczniki puste) wyznaczone dla wodorków pierwiastków grup 3A, 5A, 6A i 7A układu okresowego jako funkcja masy cząsteczkowej. We wszystkich przypadkach woderek pierwszego z pierwiastków (romb), odpowiednio CH_4 , NH_3 , H_2O i HF , odbiega od linii trendu wyznaczonej dla pozostałych związków. Podwyższenie temperatur krzepnięcia i wrzenia obserwowane dla amoniaku, wody i fluorowodoru jest konsekwencją obecności międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, które występują jedynie w przypadku tych trzech związków.

wody i w rezultacie lód utrzymuje się na jej powierzchni. Właśnie obniżona gęstość lodu, w połączeniu z jego niskim przewodnictwem cieplnym oraz anomalną zależnością gęstości wody od temperatury, powodują powstawanie stabilnych gradientów temperatury. W konsekwencji głębsze zbiorniki wodne nie zamarzają całkowicie, a blisko ich dna jest utrzymywana temperatura odpowiadająca największej gęstości cieczy (4°C), co umożliwia „przeczekanie” przez żywe organizmy okresu mrozów w enklawie niezamarzającej wody.

Reasumując, przy przejściu lodu do stanu ciekłego większość z wiązań wodorowych zostaje zachowana, a średnia liczba wiązań przypadających w niskiej temperaturze na jedną cząsteczkę (3,4) wskazuje, że woda jest cieczą zorganizowaną w różnej wielkości klastery o strukturze zbliżonej do struktury lodu.

Obecność sieci specyficznych oddziaływań międzycząsteczkowych w ciekłej wodzie (Ryc. 2) sprawia, że wykazuje ona wysoki stopień uporządkowania, co jest przyczyną szeregu nieoczekiwanych właściwości. Jednak, w odróżnieniu od ciała stałego, sieć międzycząsteczkowych wiązań wodorowych ulega dynamicznej reorganizacji w czasie femtosekund (10^{-15} s), a utworzenie i zerwanie wiązania wodorowego jest jednym z najszybciej zachodzących procesów między-

cząsteczkowych (nie licząc elektronowych i spinowych przejść optycznych, czy zjawiska międzycząsteczkowego przeniesienia elektronu, w których to procesach masa przekazywanego obiektu jest kilka rzędów wielkości mniejsza). Jednym z bezpośrednich skutków obecności klastery cząsteczek wody jest silna preferencja do zajmowania przez ciecz zwartych obszarów, co znajduje wyraz w dużej wartości współczynnika napięcia powierzchniowego (γ). Jest to prostą konsekwencją faktu, że cząsteczka wody znajdująca się na granicy fazy ciekłej nie ma możliwości stworzenia optymalnej liczby wiązań wodorowych (4), co pociąga za sobą znaczny koszt energetyczny ($\sim S \cdot \gamma$, gdzie S – wielkość powierzchni). Wysoka wartość napięcia powierzchniowego powoduje samoistną organizację wody w kuliste krople, które charakteryzują się najmniejszą powierzchnią kontaktu ze środowiskiem. O właściwościach ciekłej wody decyduje więc subtelna równowaga między proporcjonalnymi do powierzchni siłami kohezji (spójności) i adhezji (efektem zwilżania powierzchni kontaktu) a innymi siłami działającymi na ciecz, które w większości wypadków zależą od objętości cieczy. Z tego właśnie powodu woda w skali mikro zachowuje się zupełnie inaczej, niż oczekujemy tego po klasycznej cieczy. Obserwujemy więc krople deszczu, a strumień fontanny



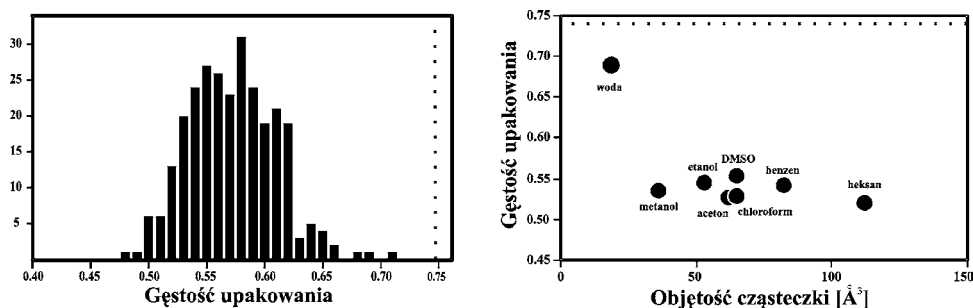
Ryc. 2. Stereoskopowy obraz klastera 300 cząsteczek wody znajdujących się w próżni. Struktura została otrzymana za pomocą 10ns dynamiki molekularnej prowadzonej w 350K. Jako układ startowy została użyta heksagonalna struktura lodu. Grube linie symbolizują cząsteczki wody, podczas gdy cienkie pokazują zachowane wiązania wodorowe. Niektóre z cząsteczek odparowały podczas symulacji, inne tworzą sieć międzycząsteczkowych wiązań wodorowych angażując się w 1 do 4 wiązań.

spontanicznie dzieli się na pojedyncze krople. Podobnie, niewielka ilość wody rozlana na natłuszczone podłoże, zamiast rozlać się po nim, także organizuje się w krople, które w sprzyjających warunkach mogą trwać nawet wbrew siłom grawitacji. Wodę można wylać z butelki tylko wtedy, gdy szyjka

jest dostatecznie szeroka, a już kilkukrotne zmniejszenie wymiarów naczynia spowoduje, że nie będzie można tego uczynić.

Jednym z istotnych parametrów opisujących rozpuszczalnik jest gęstość upakowania (η), zdefiniowana jako stosunek teoretycznej, wynikającej z geometrii i promieni atomowych (van der Waalsa), objętości cząsteczki do objętości przypadającej na jedną molekulę rozpuszczalnika w roztworze, co z kolei odpowiada ilorazowi gęstości właściwej cieczy i jej masy cząsteczkowej. Wielkość ta, zgodnie ze swoją nazwą, opisuje jak bardzo cząsteczki rozpuszczalnika wykorzystują dostępną im przestrzeń. Wyidealizowany przypadek upakowania kul daje graniczną wartość:

$\eta = \pi / (3\sqrt{2}) \approx 0.7405$ a rzeczywista gęstość upakowania dla większości rozpuszczalników leży w stosunkowo wąskim zakresie między 0,50 a 0,65. Dla wody wynosi ona 0,695, zaś wśród rozpuszczalników organicznych największą gęstość upakowania mają glicerol (0,703) oraz trójetanolamina (0,675). W ogólności wszystkie ciecze o znacznej gęstości upakowania są w większości wielowodorotlenowymi alkoholami lub ich pochodnymi (Ryc. 3).



Ryc. 3. Rozkład gęstości upakowania wyliczony dla 250 powszechnie stosowanych rozpuszczalników organicznych (po lewej) oraz wartości wyznaczone dla rozpuszczalników zebranych w tabeli 1, wyrażone jako funkcja objętości van der Waalsa. Glicerol, woda i trójetanolamina wyróżniają się wartościami gęstości upakowania zbliżonymi do teoretycznego maksimum wynoszącego 0,74.

ŚWIAT ODDZIAŁYWAŃ MIĘDZYCZĄSTECZKOWYCH

Wiązania chemiczne utrzymują razem atomy, z których zbudowana jest cząsteczka. Ich energia, zmieniająca się w granicach od 140 kJ·mol⁻¹ dla wiązania O-O do 840 kJ·mol⁻¹ dla potrójnego wiązania C≡C, zwykle znacznie przewyższa energię oddziaływań międzycząsteczkowych. Pozwala to na wprowadzenie formalnego podziału na oddziaływania wiążące, z utworzeniem wiązania chemicznego, i pozostałe, zwane

niewiążącymi. Ich energię można z powodzeniem oszacować na gruncie mechaniki kwantowej stosując tak zwane przybliżenie polaryzacyjne w rachunku zaburzeń (KOŁOŚ 1986, PIELA 2003). Przybliżenie to jest dość dobrze spełnione, gdy odległości między cząsteczkami są na tyle duże, że można zaniedbać nakładanie elektronowych funkcji falowych obu cząsteczek. Przyjmując, że energia oddziaływania molekuł jest znacznie

mniejsza niż energia wiązań chemicznych można, po przeprowadzeniu stosunkowo prostych obliczeń i uporządkowaniu otrzymanych zależności, otrzymać cztery główne typy oddziaływań międzycząsteczkowych: elektrostatyczne, walencyjne, indukcyjne i dyspersyjne. Poniżej przedstawiona jest ich krótka charakterystyka.

ODDZIAŁYWANIA ELEKTROSTATYCZNE

Od czasów Charlesa Augustina de Coulomb (1736–1806) wiadomo było, że ciała obdarzone ładunkiem elektrycznym oddziałują ze sobą z siłą odwrotnie proporcjonalną do kwadratu odległości między nimi. Kiedy w 1883 r. Svante August ARRHENIUS (1859–1927) przedstawił ideę spontanicznej dysocjacji elektrolitów znajdujących się w wodnym roztworze (ARRHENIUS 1884) stało się jasne, że oddziaływania elektrostatyczne dominują wśród sił wewnątrz- i międzycząsteczkowych działających w roztworze. Ogólnie ujmując, oddziaływania elektrostatyczne są dalekozasięgowe, a odpowiadający im potencjał zależy od wartości formalnych ładunków (q_i) zlokalizowanych

$$V = \frac{q_1 \cdot q_2}{4\pi \cdot r_{12} \cdot \epsilon \cdot \epsilon_0}$$

na grupach oddziaływujących zgodnie z prawem Coulomba: gdzie r_{12} jest odległością między tymi grupami, ϵ_0 jest przenikalnością elektryczną próżni, zaś ϵ jest stałą dielektryczną ośrodka, w którym umieszczone są ładunki. W ten sposób energia potrzebna dla rozdzielenia dwóch różnoimiennych ładunków w procesie dysocjacji cząsteczki bezpośrednio zależy od właściwości otaczającego ośrodka, a wysoka wartość stałej dielektrycznej czyni wodę jednym z najlepszych rozpuszczalników. Warto dodać, że w roztworze wodnym optymalna odległość dla oddziaływania zjonizowanych grup wynosi około 2,8 Å. Taka para różnoimiennych ładunków nosi nazwę mostka solnego. Efektywne oddziaływanie elektrostatyczne między dwiema cząsteczkami odpowiada sumie oddziaływań zachodzących między wszystkimi możliwymi parami ładunków. Również cząsteczki nieobdarzone formalnym ładunkiem elektrycznym mogą ze sobą oddziaływać, co jest konsekwencją jego niejednorodnego rozłożenia. Zwykle energię potencjalną oddziaływania między dwiema cząsteczkami rozkłada się na sumę odpowiadającą własnościom niezaburzonego rozkładu ładunku wewnątrz cząsteczek. Przybliżenie to nosi nazwę rozwinięcia multipolowego i najczęściej jest przedstawiane jako:

$$V_{mult} \sim \frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{q_i \mu_{j,z} - q_j \mu_{i,z}}{r_{ij}^2} + \frac{q_i Q_{j,zz} + q_j Q_{i,zz}}{r_{ij}^3} + \frac{\mu_{i,x} \mu_{j,y} + \mu_{i,y} \mu_{j,x} - 2\mu_{i,z} \mu_{j,z}}{r_{ij}^3} + \dots$$

gdzie r_{ij} jest odległością między cząsteczkami, q_i , μ_i , i Q_i opisują kolejne momenty ładunku cząsteczki, odpowiednio ładunek (skalar), moment dipolowy (wektor) oraz moment kwadrupolowy (tensor). Pierwszy z czynników przedstawionego wzoru opisuje energię bezpośredniego oddziaływania ładunków punktowych, kolejne odpowiadają oddziaływaniu ładunku punktowego z dipolem i kwadrupolem elektrycznym drugiej cząsteczki oraz oddziaływaniu dwóch momentów dipolowych ze sobą. Zwykle dla poprawnego oszacowania energii oddziaływania oddalonych cząsteczek wystarczy zidentyfikować pierwszy nieznikający czynnik. Kolejne, wykazując coraz silniejszą zależność od odległości, zanikają na coraz krótszych odległościach międzycząsteczkowych. Przeciętna energia oddziaływania nienaładowanych cząsteczek zmienia się w stosunkowo niewielkim zakresie 2–5 kJ·mol⁻¹, co odpowiada energii ruchów termicznych. Należy jednak zaznaczyć, że stosowność rozwinięcia multipolowego jest ograniczona do układów, w których odległość między cząsteczkami jest znacznie większa niż ich własne wymiary. Tak dla układu przedstawionego na Ryc. 4 po lewej stronie nie można zastosować rozwinięcia multipolowego, które jednak może już być zastosowane dla konfiguracji przedstawionej po stronie prawej.



Ryc. 4. Przybliżenie multipolowe oddziaływań elektrostatycznych nie może być stosowane dla cząsteczek, których rozmiary są porównywalne z ich wzajemną odległością (po lewej). Gdy te same cząsteczki są od siebie znacznie bardziej oddalone (po prawej) przybliżenie to może być z powodzeniem stosowane.

ODDZIAŁYWANIA WALENCYJNE

Idea niewiążących, odpychających oddziaływań międzycząsteczkowych została oryginalnie zaproponowana przez Johanna Diderika van der Waalsa (1837–1923) pod koniec XIX w. Analizując zachowanie rzeczy-

wistych gazów wykazał on istnienie w otoczeniu każdej rzeczywistej cząsteczki pewnej wyłączzonej objętości, w której nie mogą znajdować się inne molekuly (van der WAALS 1873). Tego typu oddziaływania dominują w przypadku bliskiego kontaktu cząsteczek. W świetle mechaniki kwantowej ich istnienie wynika z deformacji zewnętrznych orbitali molekularnych pod wpływem sił kierujących obie cząsteczki w to samo miejsce przestrzeni. Jest to tak zwana deformacja Pauliego, która jest bezpośrednią konsekwencją zakazu Pauliego związanego z niemożnością występowania w jednym miejscu dwóch fermionów (są nimi elektrony) w tym samym stanie kwantowym. Duży dodatni wkład do energii układu pochodzący od oddziaływań walencyjnych sprawia, że wewnątrz cząsteczki, zdefiniowane jako obszar ograniczony przez cząsteczkowy orbital walencyjny jest praktycznie niedostępne dla innych cząsteczek. W ten sposób w mikroświecie związków chemicznych można zdefiniować pojęcia kształtu, a w konsekwencji objętości cząsteczki, która z dobrym przybliżeniem odpowiada pojęciu objętości wyłączzonej wprowadzonej w XIX w. przez van der Waalsa.

ODDZIAŁYWANIA INDUKCYJNE

Występują one, gdy rozkład ładunku w cząsteczce zostanie zaburzony przez pole elektryczne pochodzące od pobliskich molekuł. W klasycznym ujęciu elektrostatycznym oddziaływanie indukcyjne z obojętną cząsteczką o sferycznie-symetrycznym rozkładzie ładunku jest związane z wyindukowaniem w niej momentu dipolowego przez pole elektryczne wytworzone przez ładunek czy moment dipolowy pobliskiej cząsteczki. Energia związana z takim oddziaływaniem bardzo szybko zanika z odległością, zmieniając się zgodnie z zależnością:

$$E_{ind} \sim -\alpha_1 \left(\frac{q_2^2}{2r_{12}^4} + \frac{\mu_{2,z}^2}{r_{12}^6} + \dots \right) - \alpha_2 \left(\frac{q_1^2}{2r_{12}^4} + \frac{\mu_{1,z}^2}{r_{12}^6} + \dots \right)$$

gdzie α_i jest miarą polaryzowalności cząsteczki pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego. Oddziaływania indukcyjne stabilizują system powodując obniżenie jego energii, a w konsekwencji wzajemne przyciąganie cząsteczek.

ODDZIAŁYWANIA DYSPERSYJNE

Ich obecność jest związana z korelacją ruchów elektronów w oddziaływujących wzajemnie cząsteczkach. Jej wkład do energii

oddziaływania cząsteczek można oszacować jako

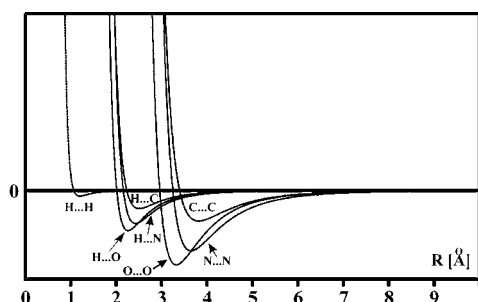
$$E_{disp} \sim -\frac{3}{2r_{12}^6} \cdot \alpha_1 \cdot \alpha_2 \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2}$$

gdzie I_j w przybliżeniu odpowiada potencjałowi jonizacji cząsteczki. Nawet w przypadku, gdy obie neutralne cząsteczki wykazują sferycznie symetryczny rozkład ładunku, ich oddziaływanie może powodować wzajemne przyciąganie, które zanika jednak niezwykle szybko z odległością ($\sim r^{-6}$). W ujęciu klasycznej elektrostatyki przyciąganie dyspersyjne może być interpretowane jako efekt oddziaływania momentu dipolowego jednej cząsteczki, powstałego w wyniku statystycznej fluktuacji jej rozkładu ładunku, z wyidukowanym przez niego momentem dipolowym drugiej cząsteczki.

Pole siłowe (ang. forcefield) stanowi matematyczny opis wszystkich możliwych oddziaływań, zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowych. Standardowo oddziaływanie międzycząsteczkowe opisuje się jako sumę oddziaływań zachodzących między wszystkimi możliwymi parami atomów. Pierwszym czynnikiem w opisie jest energia wewnętrzna cząsteczki bezpośrednio związana z deformacją wiązań chemicznych. Wkład oddziaływań elektrostatycznych najczęściej ogranicza się do oddziaływania zgodnie z prawem Coulomba cząstkowych punktowych ładunków elektrycznych centrowanych na atomach cząsteczki i jedynie w nielicznych przypadkach uwzględnia się kolejne człony rozwinięcia multipolowego (SOKALSKI i POIRIER 1983, GREMBECKA i współaut. 2001). Oddziaływania indukcyjne, poza nielicznymi wyjątkami (DONCHEV i współaut. 2005), są pomijane, czego przykładem są klasyczne pola siłowe CVFF (LIFSON i współaut. 1979), ECEPP/2 (NÉMETHY i współaut. 1983), CHARMM (BROOKS i współaut. 1983), AMBER (WEINER i współaut. 1986), OPLS (JORGENSEN i TIRADO-RIVES 1988), TRIPOS (CLARK i współaut. 1989), ECEPP/3 (NÉMETHY i współaut. 1992), zaś wypadkowy efekt oddziaływań walencyjnych i dyspersyjnych najczęściej opisuje się potencjałem Lennarda-Jonesa, często w skrócie oznaczanym jako LJ6-12:

$$V_{LJ} = V_o \left[\left(\frac{r_o}{r_{12}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_o}{r_{12}} \right)^6 \right]$$

gdzie r_o i V_o są równowagową odległością między dwoma oddziaływującymi atomami i maksymalną energią stabilizacji takiego układu. Warto zwrócić uwagę na wykładni-



Ryc. 5. Porównanie potencjałów niewiązanych Lennarda-Jonesa wyznaczonych dla par atomów H...H, H...O, H...N, H...C, O...O, N...N i C...C. Obliczenia przeprowadzono na podstawie pola siłowego AMBER (wg WEINERA i współaut. 1986).

ki występujące we powyższym wzorze. Szósta potęga ściśle odpowiada zależności oddziaływań dyspersyjnych od odległości, zaś wielkość potęgi w członie odpowiadającym odpychaniu walencyjnemu została przyjęta

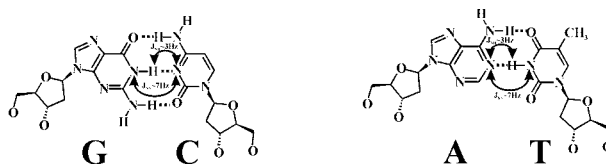
arbitralnie tak, aby maksymalnie przyspieszyć obliczenia. Energia oddziaływania, wyznaczona dla układu dwóch atomów, zależy zarówno od ich rodzaju, jak i od odległości jaka je dzieli. Na Ryc. 5 przedstawione są zależności wyliczone na podstawie pola siłowego AMBER (WEINER i współaut. 1986).

Należy jednak zaznaczyć, że od dłuższego czasu podejmuje się próby symulacji układów cząsteczek stosując metodę mieszanej klasyczno-kwantowej dynamiki, w której fragmenty układu istotne dla badanego problemu są opisywane metodami mechaniki kwantowej, podczas gdy reszta stanowiąca otoczenie podlega opisowi mechaniki klasycznej (QM/MM – quantum mechanics/molecular mechanics). Prekursorami takiego podejścia, które umożliwiła badanie reakcji chemicznych zachodzących w układach biologicznych, są J. A. McCammon i B. Lesyng (GROCHOWSKI i współaut. 1996).

WIĄZANIE WODOROWE

Koncepcja wiązania wodorowego została pierwotnie zaproponowana już w 1920 r. przez Maurice L. Hugginsa (1897–1981) (HUGGINS 1922), a po ponad 10 latach Linus PAULING (1901–1994) ocenił je jako jeden z najistotniejszych czynników w procesie stabilizacji struktury białka (MIRSKY i PAULING 1936, HUGGINS 1943, PAULING 1960). Atom wodoru przyłączony do elektroujemnego atomu D (donor), którym praktycznie może być jedynie atom azotu lub tlenu, przybiera cząstkowy dodatni ładunek rzędu 0,4 ładunku elementarnego. Wiązanie wodorowe zostanie utworzone, jeśli taki atom znajdzie się w sąsiedztwie wolnej pary elektronowej innego elektroujemnego atomu A – akceptora wiązania wodorowego (O, N, F). Efektywne wiązanie wodorowe powstanie, gdy konfiguracja przestrzenna D-H...A jest niemal liniowa, a optymalna odległość między donorem D a akceptorem A wiązania wodorowego zmienia się w stosunkowo wąskich granicach 2,6–3,2 Å. Przeciętny wkład takiego oddziaływania wynosi 10–20 kJ·mol⁻¹, wykazując silną zależność od orientacji przestrzennej oddziaływujących atomów. Znalezione także wiele przypadków nietypowych postaci wiązań wodorowych, największą grupę stanowią wiązania typu D-H...π, w których zdelokalizowane elektrony pierścienia aromatycznego stanowią akceptor wiązania wodorowego i wią-

zania typu C-H...O, gdzie donorem wiązania wodorowego jest grupa CH. W chwili obecnej doświadczalne techniki NMR pozwalają zidentyfikować z dobrą dokładnością istniejącą sieć wiązań wodorowych, gdyż wiązanie wodorowe bierze udział w skalarnym sprzężeniu spinów jądrowych w ten sam sposób jak klasyczne wiązanie chemiczne. Jednym z najczęściej prezentowanych przykładów są sprzężenia występujące w kanonicznym układzie parujących zasad: guanina-cytozyna i adenina-tymina (Ryc. 6). Podobnie można jednak wykazać istnienie wiązania wodorowego w układach białkowych (zarówno w α-helisie jak i β-kartce), czy nawet wiązań typu C-H...O.



Ryc. 6. Kanoniczne pary Watsona-Cricka GC i AT są stabilizowane przez odpowiednio trzy i dwa wiązania wodorowe. Ich obecność została potwierdzona za pomocą spektroskopii NMR poprzez rejestrację międzycząsteczkowych skalarnych sprzężeń spinowych, w których wiązania wodorowe pośredniczą w sposób analogiczny do klasycznych wiązań chemicznych.

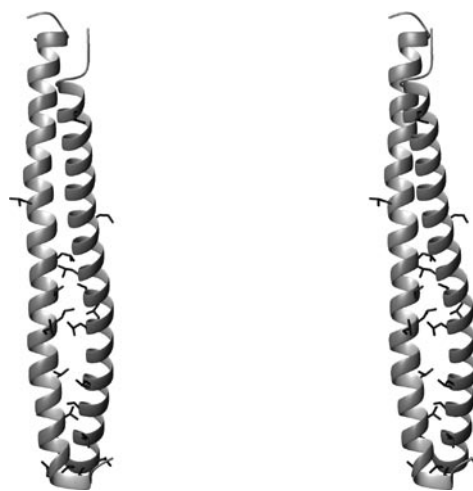
ROZWÓJ MODELI CIEKŁEJ WODY

Pierwszy jakościowy opis wodnego rozpuszczalnika został zaproponowany już w 1933 r. (BERNAL i FOWLER 1933; HUGGINS 1936). Woda jest w nim przedstawiona jako zbiór chaotycznie zorientowanych w przestrzeni cząsteczek tworzących jednak względnie regularną sieć, w której węzłach znajdują się atomy tlenu, a związane z nimi kowalencyjnie atomy wodoru rozmieszczone są tak, aby mogły tworzyć wiązanie wodorowe z atomem tlenu zajmującym jeden z sąsiednich węzłów sieci. Systematyczne analizy wyznaczanych doświadczalnie zależności entropia-entalpia dla procesów przeniesienia niepolarnych związków z fazy gazowej do rozpuszczalnika wykazały, że w odróżnieniu od wszystkich innych rozpuszczalników, roztwory wodne charakteryzuje znaczny nadmiar udziału entropowego (BARCLAY i BUTLER 1938). Na podstawie danych termodynamicznych wyznaczonych dla procesów rozcieńczania wodnych roztworów silnych elektrolitów, w 1945 r. Henry S. Frank i Marjorie Woodard Evans sformułowali hipotezę „góry lodowej” (ang. iceberg hypothesis), która była pierwszym mikroskopowym modelem oddziaływań między wodą a rozpuszczoną cząsteczką (FRANK i EVANS 1945). Zaproponowany model zakładał, że w środowisku wodnym, wokół niepolarnych fragmentów cząsteczek, wymuszane są zmiany strukturalne powodujące zrekompensowanie braku wiązań wodorowych z cząsteczką rozpuszczoną. Woda w jej otoczeniu staje się jakby zamrożona, wykazując własności bardziej zbliżone do lodu, niż do swobodnej cieczy.

Poszukując czynników stabilizujących strukturę białka Walter Kauzmann zaproponował nowy typ oddziaływań, na podstawie analizy danych termodynamicznych charakteryzujących proces przeniesienia aminokwasów ze środowiska niepolarnego do wody (KAUZMANN 1959). Wskazał na rolę niepolarnych łańcuchów bocznych, które zgromadzone we wnętrzu białka są zabezpieczone przed dostępem wodnego rozpuszczalnika. W swoich rozważaniach przyjął on, że własności wnętrza białka są zbliżone do własności prostych roztworów niepolarnych węglowodorów. Analizując wielkości zmian energii swobodnej, towarzyszącej przeniesieniu łańcuchów bocznych poszczególnych aminokwasów ze środowiska wodnego do niewodnego, oszacował wkład oddziaływań niepolarnych aminokwasów w stabilizację struktury

białka. Okazał się on wielokrotnie większy niż udział niewiążących oddziaływań van der Waalsa. Przez analogię do wiązania wodorowego wprowadził on pojęcie wiązania hydrofobowego, znane dzisiaj pod ogólniejszą nazwą oddziaływań hydrofobowych (Ryc. 7). Idee zaproponowane przez Kauzmana są w generalnym zarysie akceptowane do dnia dzisiejszego, a wyniki badań wkładu oddziaływań hydrofobowych do stabilizacji białek ukazują się nadal w wiodących czasopismach naukowych (ZHOU i ZHOU 2002, 2004; BEN-NAIM 2003).

Na początku lat 60. ubiegłego wieku G. Nemethy i H. A. Scheraga przedstawili wyniki teoretycznych prac wyjaśniających metodami mechaniki statystycznej własności rozcieńczonego wodnego roztworu niepolarnych cząsteczek (NÉMETHY i SCHERAGA 1962a, b). W swoich rozważaniach autorzy przyjęli, że stan pojedynczej cząsteczki wody w roztworze jest jednoznacznie określony przez liczbę wiązań wodorowych, w które jest ona zaangażowana. Każda cząsteczka może się znajdować w jednym z pięciu stanów odpowiadających zaangażowaniu w odpowiednio 0, 1, aż do 4 wiązań wodorowych. Organizacja przestrzenna wodnego rozpusz-



Ryc. 7. Struktura przestrzenna układu dwóch helis, których wzajemna orientacja jest stabilizowana przez oddziaływania hydrofobowe. Niepolarne łańcuchy boczne aminokwasów alifatycznych waliny, leucyny i izoleucyny są zlokalizowane w obszarze kontaktu helis, co zabezpiecza je przed swobodnym dostępem cząsteczek rozpuszczalnika. Zaprezentowany motyw strukturalny, powszechnie występujący wśród białek oddziałujących z DNA, nosi nazwę suwaka leucynowego

czalnika jest więc konsekwencją dynamicznej równowagi między różnymi formami organizacji klastrów cząsteczek wody. Za pomocą takiego modelu Nemethy i Scheraga byli już w stanie podjąć próbę wyjaśnienia szeregu anomalnych własności wody, w tym zależności gęstości od temperatury. Ilościowa analiza danych termodynamicznych dotyczących rozpuszczania węglowodorów w wodnym roztworze doprowadziła autorów do zaproponowania ilościowego mikroskopowego opisu oddziaływań hydrofobowych (NEMETHY i SCHERAGA 1962c). Wyniki uzyskane przy jego użyciu okazały się w znacznym stopniu zgodne z wcześniejszymi ilościowymi analizami przedstawionymi przez poprzedników (FRANK i EVANS 1945, KAUFMANN 1959).

Rozwój technik magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. nuclear magnetic resonance, NMR) umożliwił analizę oddziaływań między pojedynczymi cząsteczkami. W szczególności zastosowanie teorii relaksacji jądrowej pozwoliło dowieść ograniczenia ruchliwości cząsteczek wody w otoczeniu niepolarnych grup substancji rozpuszczonej (HERTZ i ZEIDLER 1964). Dalsze systematyczne badania wykazały, że w miarę wzrostu liczby grup metylenowych czy metylenowych, dołączonych do szkieletu węglowodoru, usztywnieniu ulega struktura solwatującej je wody. Jej organizacja zbliżona jest do struktury lodu, jednak mniejsze uporządkowanie umożliwia szybką reorientację poszczególnych cząsteczek H_2O (DEJONG i współaut. 1997; FILIPPONI i współaut. 1997; BOWRON i współaut. 1998a, b, 2001). Z kolei analiza wartości przesunięć chemicznych przeprowadzona dla protonów wody wykazała, że wiązania wodorowe w obszarze sfery solwatacyjnej rozpuszczonej, niepolarnej cząsteczki wyraźnie różnią się od tych, które obserwuje się dla czystego rozpuszczalnika (DEJONG i współaut. 1997). Dane te potwierdziły hipotezę Franka i EVANS o wzroście uporządkowaniu wody w sąsiedztwie rozpuszczonej substancji (FRANK i EVANS 1945).

Z początkiem lat 90. nastąpił szybki wzrost mocy obliczeniowych komputerów, co umożliwiło prowadzenie stosunkowo długich symulacji śledzących zachowanie cząsteczek w warunkach roztworu wodnego. W szeregu tego typu obliczeń wykazano, że struktura wody w otoczeniu niepolarnych cząsteczek znacząco różni się od struktury niezaburzonego rozpuszczalnika. Co więcej, zmiany obserwowane były jedynie w stosunkowo niewielkim obszarze, który z grubsza

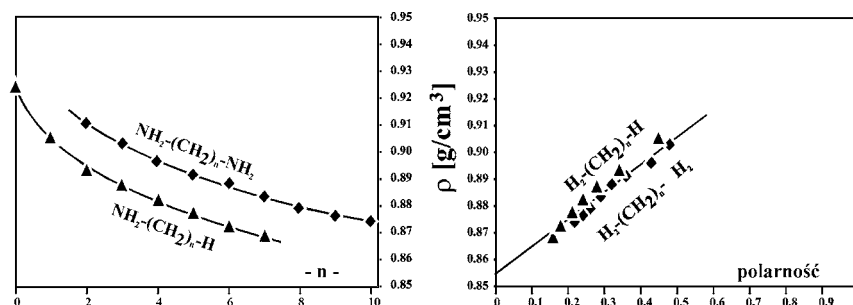
odpowiadał kształtem i wielkością sferze solwatacyjnej badanej cząsteczki (ASHBAUGH i PAULAITIS 1996; 2001; ASHBAUGH i współaut. 1999a, b, 2002).

Gęstość wody w sferze solwatacyjnej cząsteczki można oszacować za pomocą serii pomiarów gęstości właściwej różnych roztworów danego związku. Stosując bilans masy można określić średnią objętość przypadającą w roztworze na jedną cząsteczkę. Wielkość ta nosi nazwę cząstkowej molowej objętości (V_2^0). Jeżeli znana jest struktura badanej cząsteczki, to poprzez proste obliczenia geometryczne można oszacować objętość jaką powinna ona fizycznie zajmować w roztworze (V_{mol}), a także oszacować objętość jej sfery solwatacyjnej ($V_{1,solv}$). Gęstość wody w sferze solwatacyjnej (ρ) można wtedy oszacować jako:

$$\rho = \rho_0 \cdot \left(1 - \frac{V_2^0 - V_{mol}}{V_{1,solv}} \right)$$

Analiza przeprowadzona między innymi dla serii liniowych amin wykazała (ZIELENKIEWICZ i POZNAŃSKI 1998), że oszacowana wartość gęstości wody w sferze solwatacyjnej zależy od wielkości cząsteczki i jest tym mniejsza im więcej grup metylenowych zawiera cząsteczka. Co więcej, dla dwuamin oszacowana wartość gęstości jest zawsze większa niż dla pojedynczej aminy o zbliżonej wielkości. Pozwala to sądzić, że obserwowany efekt zależy w znacznym stopniu od polarności cząsteczki, co, jak przedstawiono na prawym panelu Ryc. 8, rzeczywiście ma miejsce. Jednak otrzymane wartości należy traktować z pewną rezerwą. To, że gęstość oszacowana dla sfery solwatacyjnej wokół dużej całkowicie niepolarnej cząsteczki ($\sim 0,855 \text{ g/cm}^3$) jest niższa od gęstości lodu ($0,92 \text{ g/cm}^3$) wynika najprawdopodobniej z zastosowanych uproszczeń, natomiast obserwowane trendy zmian nie budzą wątpliwości. Wyniki te w sposób oczywisty potwierdzają słuszność hipotezy „góry lodowej” sformułowanej ponad pięćdziesiąt lat temu (FRANK i EVANS 1945).

Od połowy lat 70. próbowano powiązać parametry termodynamiczne, opisujące oddziaływanie substancji ze środowiskiem wodnym, z ich budową chemiczną. Szeroko stosowana jest zaproponowana przez S. Cabaniego metoda tak zwanych udziałów grupowych (CABANI i współaut. 1981). U jej podstaw leży założenie o braku wzajemnego oddziaływania grup funkcyjnych przyłączonych do szkieletu wyjściowej cząsteczki, co



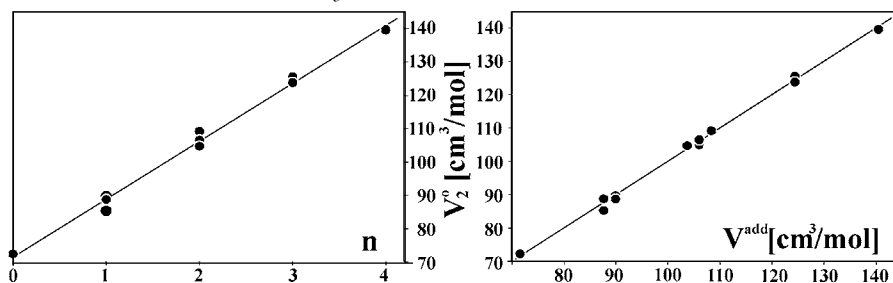
Ryc. 8. Oszacowane zmiany średniej gęstości wody w sferze solwatacyjnej liniowych amin w zależności od liczby grup metylenowych wchodzących w ich skład (po lewej) oraz polarności cząsteczki (po prawej). Otrzymane tendencje sugerują, że struktura wody w sferze solwatacyjnej w większym stopniu zależy od liczby specyficznych kontaktów, niż od samej wielkości cząsteczki (wg ZIELENKIEWICZA i POZNAŃSKIEGO 1998).

sprawia, że wypadkowa zmiana dowolnego parametru termodynamicznego jest sumą wkładów pochodzących od poszczególnych podstawników.

Dla metylowanych pochodnych uracylu analiza cząstkowych molowych objętości wykazuje, że średni wkład pochodzący od grupy metylowej zmienia się z zależności od miejsca jej przyłączenia (ZIELENKIEWICZ i współaut. 1998). Z dobrym przybliżeniem można przyjąć, że efektywna objętość grupy metylowej przyłączonej do jednego z atomów azotu (N1, N3) wynosi $18,38 \pm 0,43 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ i odpowiednio $16,06 \pm 0,52$, gdy jest ona przyłączona do atomu węgla (C5, C6) (Ryc. 9). Oszacowana na podstawie regresji objętość uracylu ($71,55 \pm 0,70 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$) jest zgodna z wartością doświadczalną, a zmiana efektywnej objętości grupy metylowej spowodowana jej przeniesieniem z jednego z atomów węgla (C5, C6) na atom azotu (N1 lub N3) może zostać oszacowana na $2,3 \pm 0,7 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ i z poziomem istotności poniżej 0,001 jest różna od zera. W sposób oczywisty tak znaczna różnica nie może się wiązać ze zmianami długości wiązania X-CH_3 , a jest

raczej efektem reorganizacji sfery solwatacyjnej cząsteczki spowodowanej obecnością grupy metylowej, która w większym stopniu wpływa na otaczający rozpuszczalnik, gdy jest przyłączona do atomu polarnego (to jest mogącego brać udział w wiązaniach wodorowych), niż do niepolarnego atomu węgla.

W międzyczasie rozwijane były różne metody doświadczalne pozwalające na ilościowy opis oddziaływań hydrofobowych. Dla aminokwasów zdefiniowano kilkadziesiąt różnych skal hydrofobowości (CARUGO 2003) opartych na pomiarach fizykochemicznych (BULL i BREESE 1974, WOLFENDEN i współaut. 1981, ABRAHAM i LEO 1987, AKAMATSU i współaut. 1994). Powszechnie stosowane są także metody statystyczne, określające jak często dany aminokwas występuje na powierzchni białka (GUY 1985, ROSE i współaut. 1985). Jednym z parametrów najczęściej używanych w opisie polarności cząsteczek jest współczynnik podziału w układzie oktanol-woda (FUJITA i współaut. 1964). Na jego podstawie została stworzona baza danych dla zastosowań biologicznych i biomedycznych (LEO i współaut. 1971), która umożliwia ko-



Ryc. 9. Cząstkowa molowa objętość (V_2^0) wyznaczona doświadczalnie dla uracylu i jego jedenastu metylowych pochodnych przedstawiona jako funkcja ilości grup metylowych przyłączonych do pierścienia diketopirydynowego (po lewej) oraz jako efekt opisanego schematu addytywności (po prawej). Druga procedura wykazuje znacznie lepszą zgodność z danymi doświadczalnymi (wg ZIELENKIEWICZA i współaut. 1998).

relację budowy cząsteczki z jej własnościami (HANSCH i FUJITA 1964, REKKER 1977). Prace C. Hanscha o inhibitorach roślinnych regulatorów wzrostu (HANSCH i współaut. 1962, 1963) należy uznać za pierwsze zastosowanie metody korelacji struktury związku niskocząsteczkowego z jego aktywnością biologiczną (ang. *QSAR – quantitative structure activity relationship*).

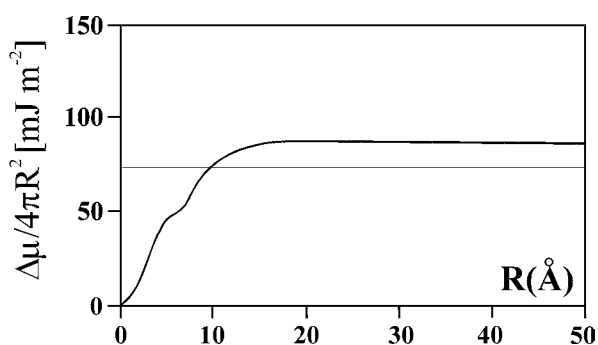
W 1974 r. C. Chothia wprowadził ideę atomowych parametrów solwatacyjnych (ang. *atomic solvation parameters, ASP*), wykazując na przykładzie szeregu białek, że energia ich oddziaływania z wodą jest proporcjonalna do powierzchni rozpuszczonej cząsteczki, a współczynnik proporcjonalności zmienia się w granicach $\sim 6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ (CHOTHIA 1974). Systematyczne badania wykazały, że w solwatacji związków hydrofobowych dominuje wkład entropowy (PRIVALOV i GILL 1988), a zmiana energii swobodnej związanej z hydratacją jest rzeczywiście proporcjonalna do powierzchni cząsteczki (REYNOLDS i współaut. 1974, GILL i WADSÖ 1976, CHOTHIA 1976). Szczegółowa analiza pozwoliła na określenie wielkości wkładów pochodzących od poszczególnych typów atomów, co z kolei pozwoliło na stworzenie szeregu półempirycznych potencjałów pozwalających na obliczenie energii solwatacji dla wielu klas cząsteczek (EISENBERG i MCLACHLAN 1986, DILL 1990, BEN-NAIM i MAZO 1993).

Jedną z pierwszych prób analitycznego opisu kosztu energetycznego umieszczenia cząsteczki rozpuszczonej w ciekłej wodzie została przedstawiona w 1968 r. przez O. Sinanoglu. Autor rozważał proces utworzenia w ciekłym rozpuszczalniku wnęki o kształcie odpowiadającym cząsteczce rozpuszczonej. Obliczenia opierały się na wyznaczeniu pracy niezbędnej do wytworzenia wnęki w środowisku, którego właściwości były opisane przez makroskopowe parametry napięcia powierzchniowego, współczynnika rozszerzalności cieplnej i gęstości upakowania cząsteczek rozpuszczalnika (SINANOGU 1968).

W 1976 r. R. A. Pierotti zaprezentował alternatywną teorię opierającą się na statystycznej analizie właściwości rozpuszczalnika modelowanego jako zbiór sztywnych kul (PIEROTTI 1976). Teoria skalowania cząsteczek (ang. *scaled particle theory, SPT*) łączyła mikroskopowe parametry rozpuszczalnika z jego makroskopowymi własnościami, takimi jak zależności temperaturowe gęstości czy napięcia powierzchniowego. Teoria SPT była z powodzeniem stosowana w wielu ana-

lizach hydrofobowej hydratacji, jednak jej zastosowanie było ograniczone do stosunkowo niedużych cząsteczek. Co więcej, wbrew intuicji, przewidywała ona niezerowy koszt energetyczny utworzenia wnęki o nieskończenie małej wielkości.

Przez długi czas brakowało więc jednej spójnej teorii łączącej mikroskopowe właściwości cząsteczek H_2O z makroskopowymi cechami wodnego rozpuszczalnika. Dopiero analiza przeprowadzona w 1999 r. przez K. Luma, D. Chandlera i J. D. Weeksa pokazała, że przenoszenie parametryzacji otrzymanej dla małych cząsteczek na znacznie od nich większe układy białkowe jest nieuprawnione (LUM i współaut. 1999). Zaproponowany model, zwany od nazwisk autorów (Lum, CHANDLER, Weeks) modelem LCW, pokazuje, że dla małych cząsteczek o promieniu nie większym niż $10 \text{ \AA}$, oddziaływanie z wodą jest proporcjonalne do ich objętości, podczas gdy dla dużych, zgodnie z wcześniejszymi analizami, do powierzchni (Ryc. 10). Model LCW jest na tyle uniwersalny, że na jego podstawie można odtworzyć mierzone doświadczalnie temperaturowe zależności entropii rozwijania białek (HUANG i CHANDLER 2000), a o jego istotności najlepiej świadczy prawie 350 cytowań w przeciągu niecałych siedmiu lat. Wykazując, że wielkość oddziaływań hydrofobowych zależy od skali układu model LCW dowodzi niemożności zastosowania parametryzacji otrzymanej na przykład dla pojedynczych aminokwasów do opisu oddziaływania całego białka z wodą. Jednym z najważniejszych wyników otrzymanych za pomocą modelu LCW jest obraz zmian potencjału chemicznego wody w sferze solwatacyjnej kuli o ustalonym promieniu.



Ryc. 10. Zmiany potencjału chemicznego pojedynczej cząsteczki wody znajdującej się w otoczeniu sferycznie symetrycznej nieoddziałującej cząsteczki o promieniu R . Pozioma linia odpowiada makroskopowej wartości napięcia powierzchniowego (wg LUMA i współaut. 1999).

PODSUMOWANIE

Niemal wszystkie reakcje biochemiczne zachodzą *in vivo* w środowisku wodnym. Między innymi z tego właśnie powodu poszukuje się modelu pozwalającego w efektywny sposób opisać zachowanie makromolekuł w roztworze wodnym. Wszystkie doświadczalne dane fizykochemiczne wskazują na dominujący wkład czynnika entropowego w procesie hydratacji. Wydaje się to być prostą konsekwencją zaburzenia przez substancję rozpuszczoną idealnej sieci międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, charakterystycznych dla czystego rozpuszczalnika. Tworzone od początku XX w. mikroskopowe modele wody pozwalały na coraz dokładniejszy opis efektów termodynamicznych związanych z rozpuszczaniem różnych substancji.

Do niedawna brakowało jednak jednolitej teorii opisującej zachowanie wody, zarówno w skali oddziaływań między małymi cząsteczkami (nanometry), jak i w skali makromolekuł o wymiarach kilkaset razy większych. Dopiero w 1999 r. model LCW, zaproponowany przez Luma, Chandlera i Weeksa, umożliwił poprawny opis solwatacji cząsteczek przez wodę. Pozwala on analizować procesy hydratacji w szerokim zakresie wielkości badanych obiektów, od pojedynczych jonów i związków niskocząsteczkowych (10^{-10} – 10^{-9} m), poprzez białka i kompleksy białkowe (10^{-9} – 10^{-7} m), organelle i całe komórki (10^{-6} – 10^{-4} m), aż po zjawiska zwilżania powierzchni w skali odpowiadającej wielkości urządzeń technicznych (10^{-6} – 10^{-2} m).

IN QUEST OF A WATER MODEL DESCRIBING HYDRATION OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

Summary

The first model of liquid water at atomic resolution was proposed as early as in 1933. Since that time a vast amount of data concerning both microscopic and macroscopic parameters describing hydration phenomena has been collected. Majority of experimental and theoretical studies pointed out that the main driving force of the so called "hydrophobic interactions" is an entropic effect connected with the solute-induced reorganization of solvation shells. Water molecules surrounding apolar solutes were shown to organize in ice-like structures, the properties of which, in particular molecular packing,

proton relaxation rates, distribution and strength of intermolecular H-bonds, differ significantly from those determined for the bulk water. Dozens of models were proposed to describe properties of aqueous solutions at different length-scales, but up to 1999 there was no uniform theory of water for the scales varying from nanometers up to millimeters/centimeters. Recently developed LCW model, by K. Lum, D. Chandler and J. D. Weeks, is the first one, which could be applied to a wide range of phenomena including atom hydration, macromolecule solvation, surface wetting, etc.

LITERATURA

- ABRAHAM D. J., LEO A. J., 1987. *Extension of the fragment method to calculate amino acid zwitterion and side chain partition coefficients*. Proteins 2, 130–152.
- AKAMATSU M., KATAYAMA T., KISHIMOTO D., KUROKAWA Y., SHIBATA H., UENO T., FUJITA T., 1994. *Quantitative analyses of the structure-hydrophobicity relationship for N-acetyl di- and tripeptide amides*. J. Pharm. Sci. 83, 1026–1033.
- ARRHENIUS S. A., 1884. *Recherches sur la conductibilité galvanique des électrolytes*. Praca doktorska, Stockholm.
- ASHBAUGH H. S., GARDE S., HUMMER G., KALER E. W., PAULAITIS M. E., 1999. *Conformational equilibria of alkanes in aqueous solution: Relationship to water structure near hydrophobic solutes*. Biophys. J. 77, 645–654.
- ASHBAUGH H. S., KALER E. W., PAULAITIS M. E., 1999. *A "universal" surface area correlation for molecular hydrophobic phenomena*. J. Am. Chem. Soc. 121, 9243–9244.
- ASHBAUGH H. S., PAULAITIS M. E., 1996. *Entropy of hydrophobic hydration: Extension to hydrophobic chains*. J. Phys. Chem. 100, 1900–1913.
- ASHBAUGH H. S., PAULAITIS M. E., 2001. *Effect of solute size and solute-water attractive interactions on hydration water structure around hydrophobic solutes*. J. Am. Chem. Soc. 123, 10721–10728.
- ASHBAUGH H. S., TRUSKETT T. M., DEBENEDETTI P. G., 2002. *A simple molecular thermodynamic theory of hydrophobic hydration*. J. Chem. Phys. 116, 2907–2921.
- ATHA D. H., INGHAM K. C., 1981. *Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols*. J. Biol. Chem. 256, 12108–12117.
- BARCLAY I. M., BUTLER J. A. V., 1938. *The entropy of solutions*. Trans. Faraday Soc. 34, 1445–1454.
- BEN-NAIM A., 2003. *Hydrophobic hydrophilic phenomena in biochemical processes*. Biophys. Chem. 105, 183–193.
- BEN-NAIM A., MAZO R. M., 1993. *Size dependence of the solvation free energies of large solutes*. J. Phys. Chem. 97, 10829–10834.

- BERNAL J. D., FOWLER R. H., 1933. *A theory of water and ionic solutions, with particular reference to hydrogen and hydroxyl ions*. J. Chem. Phys. 1, 515-548.
- BOWRON D. T., FILIPPONI A., LOBBAN C., FINNEY J. L., 1998. *Temperature-induced disordering of the hydrophobic hydration shell of Kr and Xe*. Chem Phys Lett 293, 33-37.
- BOWRON D. T., FILIPPONI A., ROBERTS M. A., FINNEY J. L., 1998. *Hydrophobic hydration and the formation of a clathrate hydrate*. Phys. Rev. Lett. 81, 4164-4167.
- BOWRON D. T., WEIGEL R., FILIPPONI A., ROBERTS M. A., FINNEY J. L., 2001. *X-ray absorption spectroscopy investigations of the hydrophobic hydration of krypton at high pressure*. Mol. Phys. 99, 761-765.
- BRAIG K., MENZ R. I., MONTGOMERY M. G., LESLIE A. G., WALKER J. E., 2000. *Structure of bovine mitochondrial F1-ATPase inhibited by Mg_2^+ ADP and aluminium fluoride*. Structure Fold Des. 8, 567-573.
- BROOKS B. R., BRUCCOLERI R. E., OLAFSON B. D., STATES D. J., SWAMINATHAN S., KARPLUS M., 1983. *CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*. J. Comp. Chem. 4, 187-217.
- BULL H. B., BREESE K., 1974. *Surface tension of amino acid solutions: A hydrophobicity scale of the amino acid residues*. Arch. Biochem. Biophys. 161, 665-670.
- CABANI S., GIANNI P., MOLLIKA V., LEPORI L., 1981. *Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous-solution*. J. Solution Chem. 10, 563-598.
- CARUGO O., 2003. *Prediction of polypeptide fragments exposed to the solvent*. In Silico Biology 3, 0035.
- CHOTHIA C., 1974. *Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins*. Nature 248, 338-339.
- CHOTHIA C., 1976. *The nature of the accessible and buried surfaces in proteins*. J. Mol. Biol. 105, 1-12.
- CLARK M., CRAMER III R. D., OPDENBOSCH N. V., 1989. *Validation of the General Purpose Tripos 5. 2 Force Field*. J. Comput. Chem. 10, 982-1012.
- DEJONG P. H. K., WILSON J. E., NEILSON G. W., BUCKINGHAM A. D., 1997. *Hydrophobic hydration of methane*. Mol. Phys. 91, 99-103.
- DILL K. A., 1990. *Dominant forces in protein folding*. Biochemistry 29, 7133-7155.
- DONCHEV A. G., OZRIN V. D., SUBBOTIN M. V., TARASOV O. V., AND TARASOV V. I., 2005. *A quantum mechanical polarizable force field for biomolecular interactions*. PNAS 102 7829-7834.
- EISENBERG D., MCLACHLAN A. D., 1986. *Solvation energy in protein folding and binding*. Nature 319, 199-203.
- ELLIS R. J., MINTON A. P., 2003. *Join the crowd*. Nature 425, 27-28.
- FILIPPONI A., BOWRON D. T., LOBBAN C., FINNEY J. L., 1997. *Structural determination of the hydrophobic hydration shell of Kr*. Phys. Rev. Lett. 79, 1293-1296.
- FRANK H. S., EVANS M. W., 1945. *Free volume and entropy in condensed systems. III Entropy in binary liquid mixtures; partial molar entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes*. J. Chem. Phys. 13, 507-532.
- FUJITA T., IWASA J., HANSCH C., 1964. *A new substituent constant, π , derived from partition coefficients*. J. Am. Chem. Soc. 86, 5175-5180.
- FULTON A., 1987. *How crowded is cytoplasm?* Cell 30, 345-347.
- GILL S. J., WADSÖ I., 1976. *An equation of state describing hydrophobic interactions*. Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 2955-2958.
- GREMBECKA J., KĘDZIERSKI P., SOKALSKI W. A., LESZCZYŃSKI J., 2001. *Electrostatic Models of Inhibitory Activity*. Int. J. Quantum Chem. 83, 180-192.
- GUY H. R., 1985. *Amino acid side-chain partition energies and distribution of residues in soluble proteins*. Biophys. J. 47, 61-70.
- HANSCH C., FUJITA T., 1964. *ρ - σ - π analysis - A method for the correlation of biological-activity and chemical-structure*. J. Am. Chem. Soc. 86, 1616-1626.
- HANSCH C., MALONEY P. P., FUJITA T., MUIR R. M., 1962. *Correlation of biological activity with Hammett substituent constants and partition coefficients*. Nature 194, 178-180.
- HANSCH C., MUIR R. M., FUJITA T., MALONEY P. P., GEIGER F., STREICH M., 1963. *The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and partition coefficients*. J. Am. Chem. Soc. 83, 2817-2824.
- HERTZ H. G., ZEIDLER M. D., 1964. *Kernmagnetische Relaxationszeitmessungen zur Frage der Hydratation unpolarer Gruppen in wässriger Lösung*. Ber. Bunsen. Phys. Chem. 68, 821-837.
- HUANG D. M., CHANDLER D., 2000. *Temperature and length scale dependence of hydrophobic effects and their possible implications for protein folding*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8324-8327.
- HUGGINS M. L., 1922. *Atomic structure*. Science 55, 459-460.
- HUGGINS M. L., 1936. *Hydrogen bridges in ice and liquid water*. J. Phys. Chem. 40, 723-731.
- HUGGINS M. L., 1943. *The structure of fibrous proteins*. Chem. Rev. 32, 195-218.
- JORGENSEN W. L., TIRADO-RIVES J., 1988. *The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimization for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin*. J. Am. Chem. Soc. 110, 1657-1666.
- KAUZMANN W., 1959. *Some factors in the interpretation of protein denaturation*. Advan. Prot. Chem. 14, 1-63.
- KOŁOS W., 1986. *Chemia kwantowa*. PWN, Warszawa.
- LAURENT T. C., 1971. *Enzyme reactions in Polymer Media*. Eur. J. Biochem. 21, 498-506.
- LEO A., HANSCH C., ELKINS D., 1971. *Partition coefficients and their uses*. Chem. Rev. 71, 525-616.
- GROCHOWSKI P., BAŁA P., LESYNG B., MCCAMMON J. A., 1996. *Density Functional Based Parametrization of a Valence Bond Method and its Applications in Quantum-Classical Molecular Dynamics Simulations of Enzymatic Reactions*. Int. J. Quantum Chem. 60, 1143-1164.
- LIFSON S., HAGLER A. T., DAUBER P., 1979. *Consistent force field studies of intermolecular forces in hydrogen-bonded crystals. I. Carboxylic acids, amides, and the C:O...H hydrogen bonds*. J. Am. Chem. Soc. 101, 5111-5121.
- LUM K., CHANDLER D., WEEKS J. D., 1999. *Hydrophobicity at Small and Large Length Scales*. J. Phys. Chem. B 103, 4570-4577.
- MIRSKY A. E., PAULING L., 1936. *On the structure of native, denatured and coagulated proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. 22, 439-447.
- NÉMETHY G., GIBSON K. D., PALMER K. A., YOON C. N., PATERLINI G., ZAGARI A., RUMSEY S., SCHERAGA H. A., 1992. *Energy parameters in polypeptides. 10. Improved geometrical parameters and non-bonded interactions for use in the ECEPP/3 algorithm, with application to proline-containing peptides*. J. Phys. Chem. 96, 6472-6484.

- NÉMETHY G., POTTLE M. S., SCHERAGA H. A., 1983. *Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids.* J. Phys. Chem. 87, 1883–1887.
- NÉMETHY G., SCHERAGA H. A., 1962a. *Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water.* J. Chem. Phys. 36, 3382–3400.
- NÉMETHY G., SCHERAGA H. A., 1962b. *Structure of water and hydrophobic bonding in proteins. II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons.* J. Chem. Phys. 36, 3401–3417.
- NÉMETHY G., SCHERAGA H. A., 1962c. *The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III. The thermodynamic properties of hydrophobic bonds in proteins.* J. Phys. Chem. 66, 1773–1789.
- PAULING L., 1960. *Nature of the Chemical Bond.* Cornell Univ. Press, Ithaca.
- PIELA L., 2003. *Idee chemii kwantowej.* PWN, Warszawa.
- PIEROTTI R. A., 1976. *A scaled particle theory of aqueous and nonaqueous solutions.* Chem. Rev. 76, 717–726.
- PIKUŁA S., 2004. *Woda morska i dziury w błonach – nagroda Nobla z chemia za rok 2003.* Kosmos 53, 243–249.
- PRIVALOV P. L., GILL S. J., 1988. *Stability of protein structure and hydrophobic interaction.* Adv. Protein Chem. 39 191–234.
- REKKER R. F., 1977. *The hydrophobic fragmental constant: its derivation and application with a means of characterizing membrane systems.* Elsevier, Amsterdam.
- REYNOLDS J. A., GILBERT D. B., TANFORD C., 1974. *Empirical Correlation Between Hydrophobic Free Energy and Aqueous Cavity Surface Area.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2925–2927.
- ROSE G. D., GESELOWITZ A. R., LESSER G. J., LEE R. H., ZEHFUS M. H., 1985. *Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins.* Science 229, 834–838.
- SINANOGU O., 1968. *Solvent effects in molecular association* [W:] *Biology*, Pullman B. (red.), Academic Press, New York.
- SOKALSKI W. A., POIRIER R., 1983. *Cumulative Atomic Multipole Representation of the Molecular Charge Distribution and Its Basis Set Dependence.* Chem. Phys. Lett. 98, 86–92.
- VAN DER WAALS J. D., 1873. *Over de Continuïteit van den Gas en Vloeistoftoestand.* Praca doktorska, Uniwersytet w Leiden.
- WEINER S. J., KOLLMAN P. A., NGUYEN D. T., CASE D. A., 1986. *An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids.* J. Comp. Chem. 7, 230–252.
- WOLFENDEN R., ANDERSSON L., CULLIS P. M., SOUTHGATE C. C., 1981. *Affinities of amino acid side chains for solvent water.* Biochemistry 20, 849–855.
- ZHOU H., ZHOU Y., 2002. *Stability scale and atomic solvation parameters extracted from 1023 mutation experiments.* Proteins 49, 483–492.
- ZHOU H., ZHOU Y., 2004. *Quantifying the effect of burial of amino acid residues on protein stability.* Proteins 54, 315–322.
- ZIELENKIEWICZ W., POZNAŃSKI J., 1998. *Partial molar volumes of hydrophobic compounds – Insight into the solvation shell?* J. Solution Chem. 27, 245–254.
- ZIELENKIEWICZ W., POZNAŃSKI J., ZIELENKIEWICZ A., 1998. *Partial molar volumes of alkylated uracils – Insight into the solvation shell? Part II.* J. Solution Chem. 27, 543–551.
- ZIMMERMAN S. B., MINTON A. P., 1993. *Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences.* Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22, 27–65.