

Ciklo Oksigenāze enzīms olbaltumviela A. COX pētījums ar ChemScape

MDL  RasMol  ;MAGE  FireFox v.3.5.5 aplikācija.

B. aktivē Rīgas Stradiņa universitātē Aris Kaksis 2023 pētnieciskās studijas bāzētas uz **Ērika Marca 1997. gada Masačusetas universitātē**: <http://aris.gusc.lv/ChemFiles/CycloOxygenase/cycox.html>

3. **N-termināla** aminoskābe ir His.... un **C-termināla** aminoskābe GLN.... .

Cik aminoskābes ir Ciklooksigenāzes 2 **COX-2** virknē (skat. 2. Lpp.) ?

Cik aminoskābes veido **3HS5.pdb** polipeptīda virknes 550+1=.....?

5. **N-termināla** aminoskābe ir His.... un **C-termināla** aminoskābe Val.... .

Cik aminoskābes veido **3TZI.pdb** polipeptīda virknes 549+1=.....?

4. **N-termināla** domēna sākuma aminoskābi Pro.... un **C-termināla** aminoskābe ASP.....

Cik aminoskābes veido **1DIY.pdb** polipeptīda virkni...552+1=.....?

6. **N-termināla** aminoskābe ir Val... **C-termināla** aminoskābe Pro. ..

Cik veido **1PTH.pdb**, **1EQG.pdb** polipeptīda virknes...583-33=550; 550+1=.....?

7. Cik otrējās struktūras satur ciklo oksigenāze COX?**Alfa-spirāles** un.....**plāksnītes**

8. Lietojot podziņu 2° Structure saskaita cik **pink sarkanā** krāsā iekrāsotu **alfa spirāļu** veido COX polipeptīda molekulu? **Alfa-spirāles**.

9. Cik **dzeltenā krāsā** iekrāsotu **beta struktūras**, **plāksnītes** un **virknes** veido COX molekulu?
beta plāksnītes ar 2 anti-paralēlām virknēm katrā.....1PTH-.....3TZI-.....3N8Z

10. Kāds ir kopējais otrējo struktūrvienību skaits ?**Alfa-spirāles**;

.....**beta plāksnītes ar divām anti-paralēlām virknēm katrā plāksnītē**.

11. Kura aminoskābe saista nesteroidālās pretiekaisuma zāles **NSAIDs** vai arahidonskābi kā substrātu - ligandu prostaglandīna H2 (PGH2) un G2 (PGG2) sintēzei? **Ser**.....

11a. Veikt COX-2 izoelektriskā punkta IEP=pH=pK_{a-vid} analīzi fizioloģiskajā pH=7,36 vidē .

Noteikt ūdens šķīduma pH ar COX-2 koncentrāciju C=10^{-6,8473} M (mol/Litrā)!

Ciklooksigenase 2 COX-2 prostaglandīna G/H sintāze

<http://aris.gusc.lv/ChemFiles/CycloOxygenase/3TZIpILatStudS.pdf>; <http://aris.gusc.lv/ChemFiles/CycloOxygenase/3TZIpL.xls>

Virkne no 604 AA aminoskābēm COX-2 molekulā mouse 3HS5.pdb, 3TZI.pdb :

MLFRAVLLCAALGLSQAANPCSNPCQNRGECMSTGFDQYKCDCTRTGFYGENCTTPEFLTRIKLLLKPTNTVHYILTH
FKGVNIVNNI PFLRSLIMKYVLT SRSYLI DSPPTYNVHYGYKSWEAFSNLSYYTRALPPVADDCPTPMGVKGNKELPDS
KEVLEKVLRLREFIPDPQGSNMMFAFFAQHFTHQFFKTDHKGPGFTRGLGHGVDLNHI YGETLDRQHKLRLFKDGLKY
QVIGGEVYPPTVKDTQVEMI YPPHI PENLQFAVGQEVFGLVPLMMYATIWLREHNRVCDILKQEHPEWGDEQLFQTSRL
ILIGETIKIVIEDYVQHL SGYHFKLKFDPELLFNQQFQYQNRIASEFNTLYHWHPLLPDTFNIEDQEYSFKQFLYNN SIL
LEHGLTQFVESFTRQIAGRVAGGRNVPIAVQAVAKASIDQSREMKYQSLNEYRKRFS LKPYTSFEELTGEKEMAAELKAL
YSDIDVMELYPALLVEKPRPDAIFGETMVELGAPFSLKGLMGNPICSPQYWKPSTFGGEVGFKIINTASIQSLICNNVKG
CPFTSFNVQDPQPTKTATINASASHSRLDDINPTVLIKRRSTEL

AA	pK _{acoo}	pK _{anH3+}	pK _{RR}	Nr	AA	pK _{acoo}	pK _{anH3+}	pK _{RR}	Nr	AA	pK _{acoo}	pK _{anH3+}	pK _{RR}	Nr	AA	pK _{acoo}	pK _{anH3+}	pK _{RR}	Nr	
M	9,21	1		1	E	4,25	156	48		R	12,48	297	94		Y	10,07	446	140		
R	12,48	4		2	D	3,65	159	49		C	8,18	299	95		E	4,25	451	141		
C	8,18	9		3	K	10,53	161	50		D	3,65	300	96		Y	10,07	452	142		
C	8,18	21		4	E	4,25	162	51		K	10,53	303	97		R	12,48	453	143		
C	8,18	22		5	E	4,25	165	52		E	4,25	305	98		K	10,53	454	144		
C	8,18	26		6	K	10,53	166	53		H	6	306	99		R	12,48	455	145		
R	12,48	29		7	R	12,48	170	54		E	4,25	308	100		K	10,53	459	146		
E	4,25	31		8	R	12,48	171	55		D	3,65	311	101		Y	10,07	461	147		
C	8,18	32		9	E	4,25	172	56		E	4,25	312	102		E	4,25	465	148		
D	3,65	38		10	D	3,65	176	57		R	12,48	319	103		E	4,25	466	149		
Y	10,07	40		11	H	6	190	58		E	4,25	325	104		E	4,25	470	150		
K	10,53	41		12	H	6	193	59		K	10,53	328	105		K	10,53	471	151		
C	8,18	42		13	K	10,53	197	60		E	4,25	332	106		E	4,25	472	152		
D	3,65	43		14	D	3,65	199	61		D	3,65	333	107		E	4,25	476	153		
C	8,18	44		15	H	6	200	62		Y	10,07	334	108		K	10,53	478	154		
R	12,48	46		16	K	10,53	201	63		H	6	337	109		Y	10,07	481	155		
Y	10,07	50		17	R	12,48	202	64		Y	10,07	341	110		D	3,65	483	156		
E	4,25	52		18	R	12,48	208	65		H	6	342	111		D	3,65	485	157		
C	8,18	54		19	H	6	212	66		K	10,53	344	112		E	4,25	488	158		
E	4,25	58		20	D	3,65	215	67		K	10,53	346	113		Y	10,07	490	159		
R	12,48	62		21	H	6	218	68		D	3,65	348	114		E	4,25	496	160		
K	10,53	64		22	Y	10,07	220	69		E	4,25	350	115		K	10,53	497	161		
K	10,53	68		23	E	4,25	222	70		Y	10,07	359	116		R	12,48	499	162		
H	6	75		24	D	3,65	225	71		R	12,48	362	117		D	3,65	501	163		
Y	10,07	76		25	R	12,48	226	72		E	4,25	366	118		E	4,25	506	164		
H	6	80		26	H	6	228	73		Y	10,07	371	119		E	4,25	510	165		
K	10,53	82		27	K	10,53	229	74		H	6	372	120		K	10,53	518	166		
R	12,48	95		28	R	12,48	231	75		H	6	374	121		C	8,18	526	167		
K	10,53	100		29	K	10,53	234	76		D	3,65	379	122		Y	10,07	530	168		
Y	10,07	101		30	D	3,65	235	77		E	4,25	384	123		K	10,53	532	169		
R	12,48	106		31	K	10,53	237	78		D	3,65	385	124		E	4,25	539	170		
Y	10,07	108		32	K	10,53	239	79		E	4,25	387	125		K	10,53	543	171		
D	3,65	111		33	Y	10,07	240	80		Y	10,07	388	126		C	8,18	555	172		
Y	10,07	116		34	E	4,25	246	81		K	10,53	391	127		K	10,53	559	173		
H	6	119		35	Y	10,07	248	82		Y	10,07	395	128		C	8,18	561	174		
Y	10,07	120		36	K	10,53	253	83		E	4,25	402	129		D	3,65	570	175		
Y	10,07	122		37	D	3,65	254	84		H	6	403	130		K	10,53	575	176		
K	10,53	123		38	E	4,25	258	85		E	4,25	410	131		H	6	585	177		
E	4,25	126		39	Y	10,07	261	86		R	12,48	414	132		R	12,48	587	178		
Y	10,07	133		40	H	6	264	87		R	12,48	419	133		D	3,65	589	179		
Y	10,07	134		41	E	4,25	267	88		R	12,48	424	134		D	3,65	590	180		
R	12,48	136		42	E	4,25	276	89		K	10,53	435	135		K	10,53	598	181		
D	3,65	143		43	Y	10,07	287	90		D	3,65	439	136		R	12,48	599	182		
D	3,65	144		44	R	12,48	293	91		R	12,48	442	137		R	12,48	600	183		
C	8,18	145		45	E	4,25	294	92		E	4,25	443	138		E	4,25	603	184		
K	10,53	152		46	H	6	295	93		K	10,53	445	139		L	2,36	604	185		
K	10,53	155		47																

185 no 604 aminoskābēm aktīvās vērtības pKa Summa tabulā 1456,06..... vidējā vērtība pKa=7,8727.....

Aprēķinu uzdevumi COX-2 molekulai

Protolītisko konstanti pKa izoelektrisko punktu IEP=pKa aprēķina saskaitot sānu virkņu ΣpKaRsānu grupa, un pKaNterminālsNH3 un pKaCterminālsCOO- konstanšu summu izdalot ar skābes grupu skaitu molekulā NpKa:

$$IEP = pK_a = (\Sigma pK_{aRsānu\ grupa} + pK_{aNtermināls} + pK_{aCtermināls}) / NpK_a$$

1. Summārais protolītisko līdzsvaru skaits ir NpKa=183.....+2.....=.....

604 aminoskābes no tām 183+2 aminoskābes ar protolītiskām pKa sānu grupām,

N-termināla metionīns M pKaNtermināls=9,21 un C-termināla leicīns L pKaCtermināls=2,36

Summa ir saskaitāma kā ΣpKaRsānu grupa + pKaNtermināls + pKaCtermināls =

2. Summāri vidējā skābju grupu konstante pKvid= pKa = IEP **IZO ELEKTRISKAIS PUNKTS**

$$IEP = 1456,06 / 185 = \dots\dots\dots$$

Aminoskābju un olbaltumvielu izoelektriskā punkta pH vērtībā pH=IEP jonu lādiņu summa ir nulle „0”

0 — skābā vidē plus (+) — nulles lādiņš „0” IEP=pH — bāziskākā vidē mīnuss (-) — 14 pH skala

-COOH & -NH3+ pozitīvs lādiņš -COO- & -NH2+ lādiņš ir negatīvs -COO- & -NH2

Pasvītro un noteic pareizo: pozitīvs(+) vai nulle vai negatīvs(-)!

3. COX-2 molekulas lādiņš ir (+), nulle „0” vai (-) fizioloģiskā pH=7,36 vidē asins plazmā

..... lādiņš pasvītro

-COOH & -NH3+ ir pozitīvs (+) lādiņš pH=7,36 < IEP=7.87 lādiņš ir negatīvs(-) -COO- & -NH2.

4. Noteikt albumīna molekulas lādiņa zīmi **elektroforēzē pie pH 8,8** (+), nulle „0” vai (-)

..... ir lādiņš pasvītrot

-COOH & -NH3+ ir pozitīvs (+) lādiņš IEP=7.87 < pH=8,8 lādiņš ir negatīvs(-) -COO- & -NH2.

5. Aprēķina C=10^{-6,8473} moli / Litrā COX-2 šķīduma pH

Ostvalda atšķaidīšanas likumā logaritmam no C=10^{-6,8473} M:

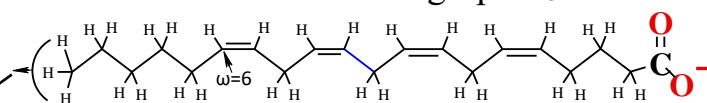
$$pH = \frac{pK_a - \log C}{2} = \frac{7.3197768 - \log 10^{-6,8473}}{2} = \frac{7.8727 + 6,8473}{2} = 14,72 / 2 = \dots\dots$$

7,36 Atraktora COX-2 koncentrācija ir C=.....M .

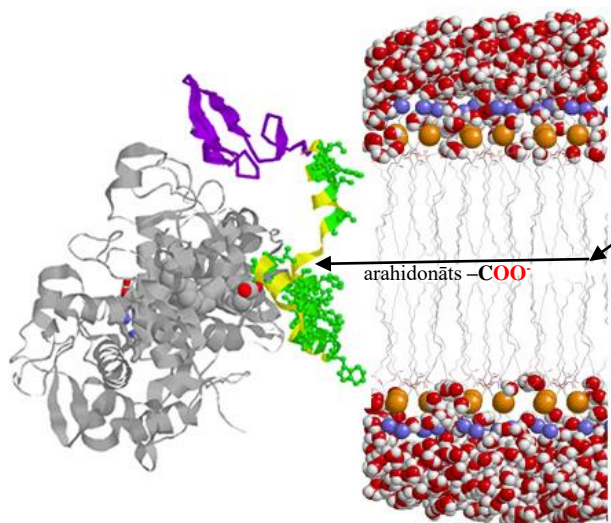
6. COX-2 molekulai piemīt ievērojama pozitīvi lādēto **+H3N-** fiksācija pie negatīvi **-PO4-**

lādētām fosfātu grupām -....><-.....

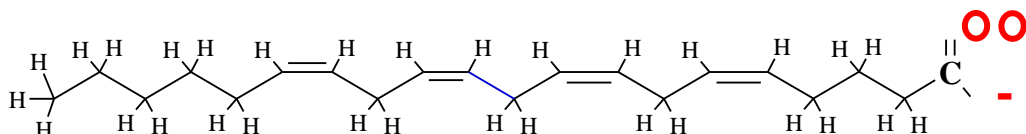
abpusēji plīsumam membrānā, lai arahidonskābe varētu ieslidēt ar ω=6 metil grupu H3C- COX



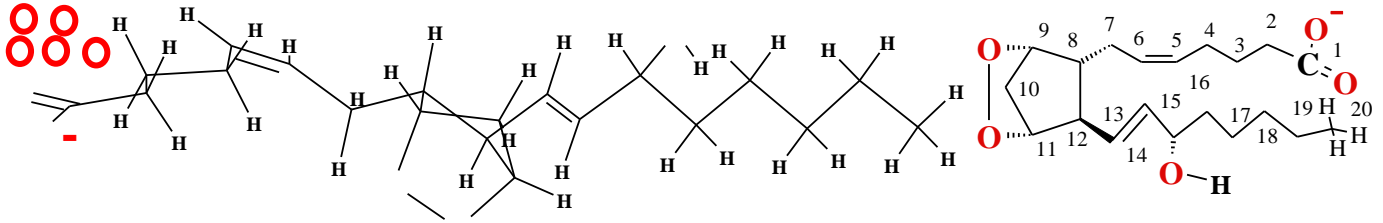
tunelī prostaglandīnu sintēzei. Membrānas plīsums atsedz membrānas nepolārās ogļūdeņražu virknes pie kurām piespiežas COX nepolārās (zaļā) aminoskābes. Pozitīvi lādētās grupas N-NH3+(+) orientē molekulu perpendikulāri membrānai atraktīvi piespiežoties ogļūdeņražu virknēm ar hidrofobām saitēm.



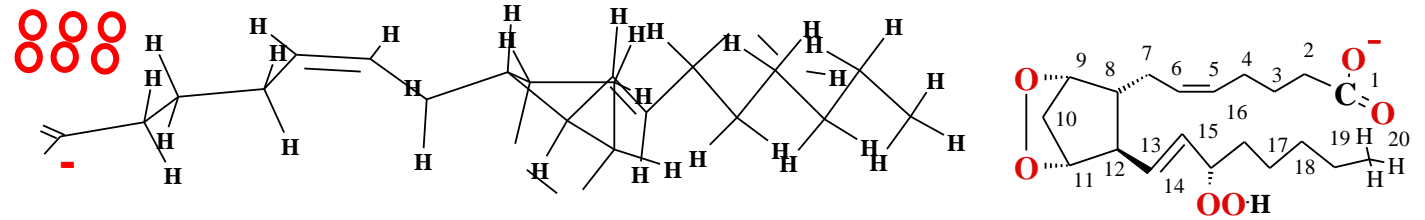
12. Iezīmēt **O** atomus un saskaitīt **C..... atomus** struktūrā pH=7.36!



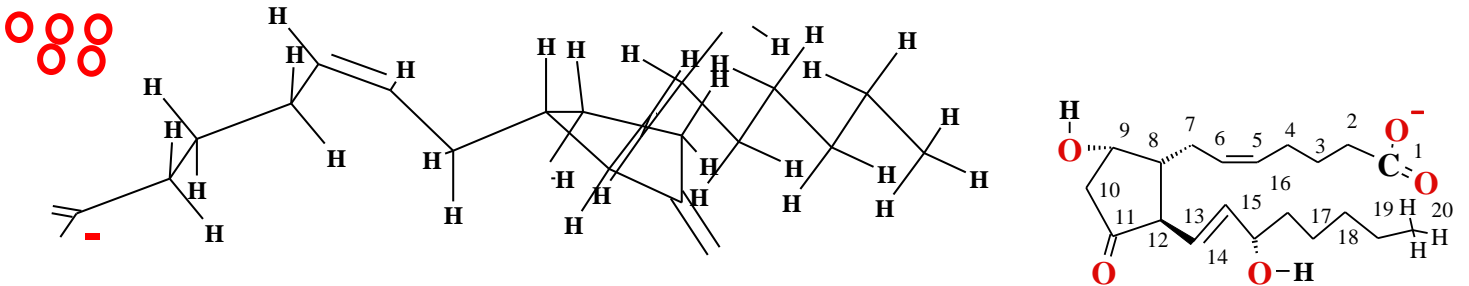
13. Iezīmēt **O** atomus! Saskaitīt **C**.... **atomus** prostaglandīna H2 (PGH₂) struktūrā pH=7,36 !



14. Iezīmēt **O** atomus! Saskaitīt **C**.... **atomus** prostaglandīna G2 (PGG₂) struktūrā pH=7,36!



15. Iezīmēt **O** atomus! Saskaitīt **C**.... **atomus** prostaglandīna D2 (PGD₂) struktūrā pH=7,36!



16. Kurš aktīvais centrs satur hēma struktūru?

..... aktīvais centrs

17. Kurš ir centrālais jons koordinatīvajā sfērā un kāda ir oksidēšanās pakāpe hēma koordinējošam centrālajam jonam? dzelzs(II).....

18. Attēlot **singleta** struktūru skābeklim, kuram parastos apstākļos ir trīs kovalentās saites **•:O≡O:•**

triplets, lai gan viens elektronu pāris ir irdinošs radikālis, tāpēc **tripletā** attēlo **divkāršo** saiti **:O=O:**, bet **peroksidāzes** dzelzs(II) **Fe²⁺** hēmā ar donoru akceptoru saiti adsorbēta skābekļa **singleta** molekula kā peroksīdā **H:-•:O-•:O-•:H** satur vienu kovalentu saiti.!..... tā pēc peroxidē lipīdu.

19. Kuri pieci atomi savieno **dzelzi Fe²⁺**?

.....
koordinācijas skaitlis ? **N**=.....

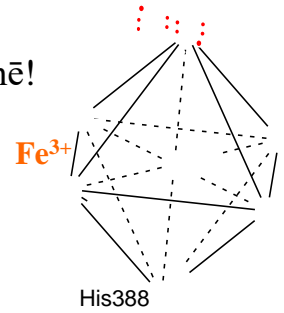
20. Cik brīvo delokalizēto elektronu **e⁻** un pāru atrodas hēma struktūrā, ieskaitot oglekļu divkāršo saiti >C=C< un nedalītos elektronu pārus atomos **:N**

hēmā? **n=15*2=.....e⁻ elektroni**

20a. Dziļi tunelī tālajā galā atrodas Tyr-385-**O-H**, svarīga katalītiska aminoskābe, kas sadarbībā ar hēma-atkarīgo peroksidāzes aktivitāti ir nepieciešama ciklooksigenāzes radikāļu reakcijas aktivitātē. Radikāļu reakcijas aktivēšanai izveidojas Tirozīna: ,.....

21. Kādu aminoskābju numuri ir **1DIY.pdb** virknē, kura līdzīga **epidermālam augšanas faktoram**? ..
Kādu šūnu receptoriem dod signālu **epidermālais augšanas faktors** COX molekulā?

22. Attēlot heksagonālu simetriju Dzelzs(III) koordinācijas ģeometrijai!



23. Kādu aminoskābju numuri ir membrānas-saistošā motīva moduļa virknē!

.....

24. Kādu hidrofobu aminoskābju numuri ir membrānas-saistošā motīva moduļa virknē?,.....,.....,.....,

.....,.....,.....,.....,

.....,..... ..

25. Kādus divus aktīvos centrus satur globulārā COX enzīma struktūra?

satur abus centrus unaktīvos centrus

26. Kuru 37 aminoskābju numuri saturošas hidrofobās sānu virknes veido tuneļa sienas 1DIY.pdb norādītajās **COX** alfa spirālēs: **H5**:107-123, **H14**:325-353, **H17**:378-384, **H28**: 520-535?

H5:Phe.....,Ile1.....,Leu.....,Met.....,

Leu.....,Val.....,Leu.....,Val.....,Leu....

H14:Leu.....,Phe.....,Ala.....,Leu.....,

Ile.....,Leu.....,Ile.....Gly.....,Ile.....,

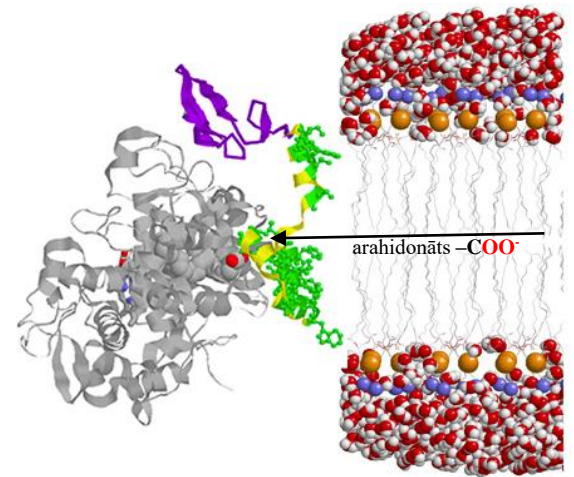
Ile.....,Val.....,Ile.....,Val.....,Leu.....

H17: Ala.....,Met.....,Phe.....,Leu.....

H28: Met.....,Ile.....,Met.....,Gly.....,

Ala.....,Pro.....Phe.....,Leu.....,

Gly.....,Leu.....,Leu.....



COX membrānas plīsuma vietā

28. Kura aminoskābe tunelī ir kovalenti modificēta -O- acilēta ar Varfarīnu, Aspirīnu un Bromaspirīnu, **1PTH.pdb** tādējādi neatgriezeniski deaktivējot abus COX-1 un COX-2 **1DIY.pdb**?.....

Ser.....

29. Kura aminoskābe tunelī saista nesteroidālās pretiekaisuma zāles **NSAIDs**

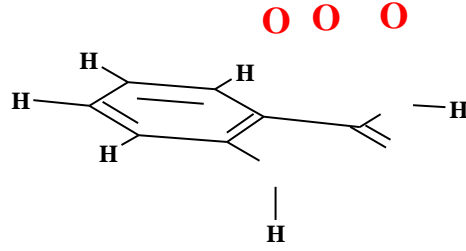
Ibuprofēnu, **Flourbiprofenu** un **IndoMethacinu** veidojot sāls tiltiņu starp zāļu karboksilāta grupu

-C=O-O⁻....⁺H₂N- un aminoskābes atlikuma amoniju **1PTH.pdb** , **1DIY.pdb**? **Arg**-.....

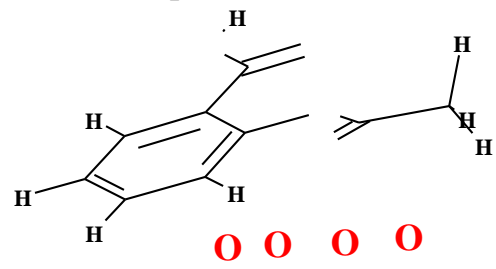
30. Kā sauc transporta olbaltumvielu asinīs aspirīna, bromaspirīna un varfarīna un citu ūdenī nešķīstošu molekulu tādu kā taukskābes ar karboksilāta -C=O-O⁻ grupām?

Tās ir ūdenī nešķīstošas bioorganiskas vielas ar kopīgu nosaukumu lipīdi, kurus ūdenī transportē **lipoproteīnī**. Šis olbaltums atrodas asins plazmā 0,6 mM koncentrācijā

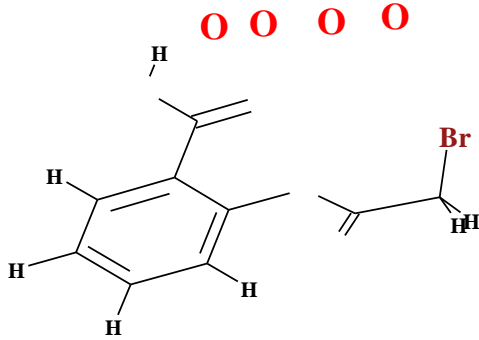
31. Iezīmēt **O** atomus! salicilskābē,



Aspirīna struktūrās



32. Iezīmēt **O** atomus! Bromaspirīna

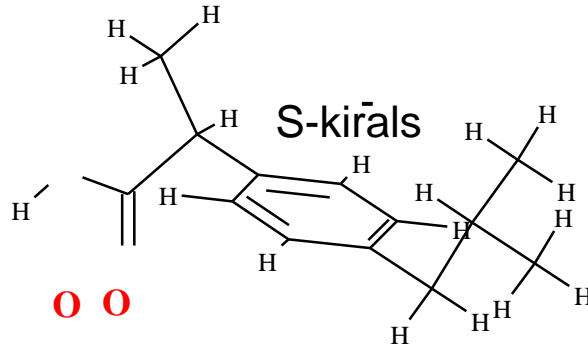


Bromaspirīns

1PTH.pdb

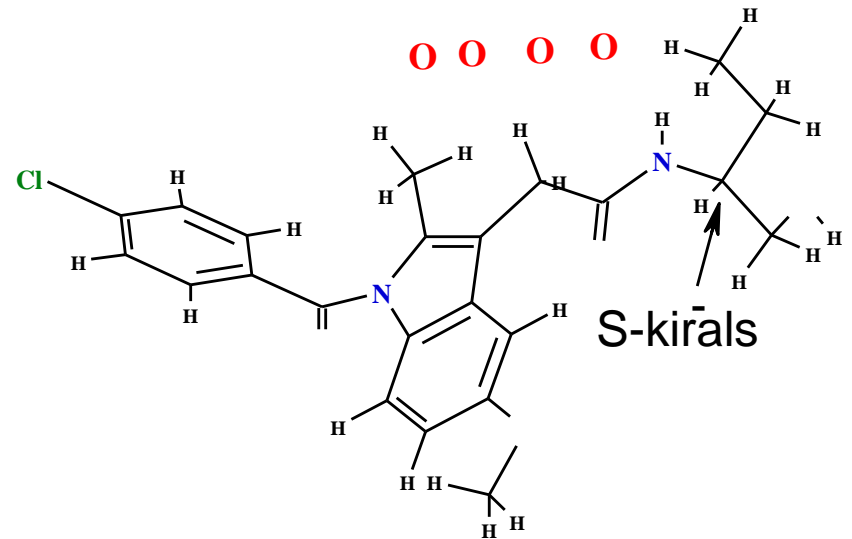
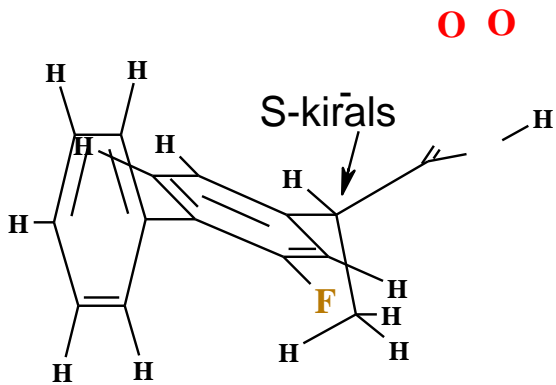
S-Ibuprofēnu

struktūrās



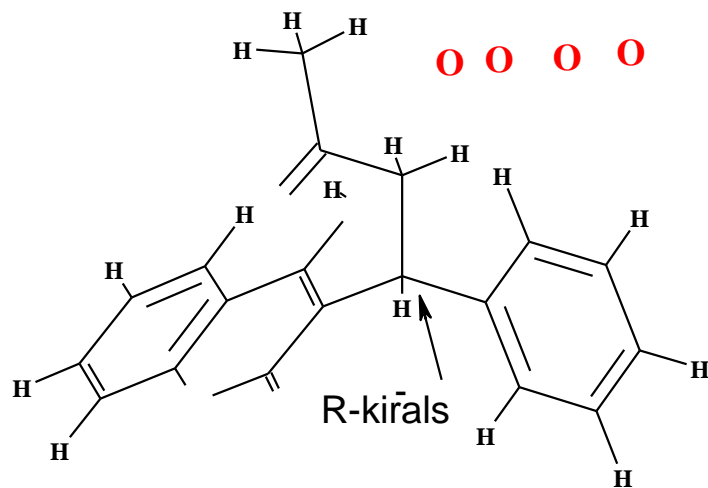
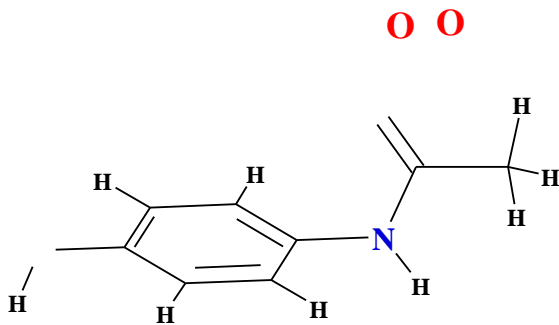
33. Iezīmēt **O** atomus! S-Fluoribuprofēna,

S-IndoMetacīna struktūrās!



33. Iezīmēt **O** atomus! R-Tailenola,

R Varfarīna struktūrās



R Varfarīns ACD 1DIY.pdb

Uz šūnām (leikocītiem, makrofāgiem) pārnestie signāli ir **Prostaglandīnu** kontrolēts process:

- 1) Muskuļu šūnu sašaurināšanās ap asinsvadiem.
- 2) Trombocītu agregācija asins recēšanas laikā, un
- 3) Dzemdies sašaurināšanās dzemdību laikā. **Prostaglandīni** arī
- 4) Piegādāt un signālēt leikocītiem, makrofāgiem un
- 5) tāpēc pastiprina sāpes izraisot iekaisumu (sāpīgu jūtīgu piepampumu).

Gandrīz visas zīdītāju šūnas, izņemot eritrocītus, ražo vienu vai vairākus eikosanoīdus.

Prostaglandīni veidojas ciklo oksigenāzes tunelī no arahidonāta (prekursora molekulas).

20-oglekļa $\omega=6$ taukskābe (Grieķ. eikosil, "divdesmit") ar četrām dubult saitēm **C20:4**:

prostaglandīni (PGs), prostaciklīni (PGIs), tromboksāni (TXs), leukotriēni (LTs).

Piemēram: Prostaglandīni: PGA₂, PGE₁, PGE₂, PGE₃, PGF_{2a}, PGG₂, PGH₂

un Prostaciklīni PGI₂; Tromboksāni TXA₂ un TXB₂; Leikotriēni LTE₄.

Ne Steroidāli Pretiekaisuma Līdzekļi (NPL)

ir ar vismaz četriem dažādiem darbības mehānismiem.

There are thought to be at least four different mechanisms of action for NSAIDs.

1. [Warfarin](#), [Aspirin \(and also bromoaspirin\)](#) is the only one which covalently modifies - Acylate a Ser530 [L-serine](#) residue as **O-(bromoacetyl)-L-serine** in the tunnel, thus irreversibly inactivating both COX-1 and COX-2.

2. [Ibuprofēns](#) darbojas, atgriezeniski konkurējot par ibuprofēna saistīšanās **Arg-120** vietu tunelī. [Ibuprofen](#) acts instead by competing in a reversible fashion for the ibuprofene and **Arg-120** binding site in the tunnel.

3. [Fluorbiprofēns](#) and [indometacīns](#) izraisa lēnu, no laika atkarīgu COX-1 un COX-2 inhibēšanu, acīmredzot, veidojot sāls tiltiņu starp zāļu karboksilātu un **Arg-120** (šeit parādīts **purpursarkanā** krāsā, mirgo), kas atrodas tunelī.

4. Zāles SC-558 iedarbojas īpaši inhibējot COX-2. Tas ir vājš konkurējošs COX-1 inhibitors, bet inhibē COX-2 lēnā, no laika atkarīgā procesā. Konkrēti COX-2 inhibitori, visticamāk, būs nākotnes zāles, jo tie spēs selektīvi bloķēt COX-2 izraisīto iekaisumu, neradot kuņģa bojājumus un nieru toksicitāti, ko izraisa COX-1 **inhibēšana**.