

KoEnzīms vitamīns B₃ NAD⁺Ox, NADH Red. A: uzdevums alkohola dehidrogenāze ADH pētījumams

ChemScape MDL ; RasMol ; MAGE ; FireFox v.3.5.5 aplikācija. risinājums

B. aktivē Rīgas Stradiņa universitātē Āra Kakša 2023 sagatavotu molekulāru pētījumu par

olbaltumvielu ADH: <http://aris.gusc.lv/ChemFiles/AlhoDeHydrogenase/NadDehydrogenase.htm>

1. Lietojot ADH **Backbone** Display iespēju, norādiet **N-termināla** domēna sākuma aminoskābi SER... un **C-termināla** domēna aminoskābi PHE.? Cik aminoskābes veido ADH IV pilno virkni.

(skat. 2.lpp. 1AGN.pdb) un polipeptīdā **1JU9.pdb** molekulas struktūrā?

2. Enzīma ADH klasifikācijas Nr., ja ir zināmas EC klases 1.,2.,3.,4.,5.,6.7.?

3. ADH daļiņa, kura pārnes divus reducējošos ekvivalentus (2e⁻) no spirta uz NAD⁺?(2e⁻+H⁺)

3. Daļiņa ADH, kura pārnes divus reducējošos ekvivalentus (2e⁻) uz NAD⁺? H⁺(2e⁻+H⁺) **hidrīda jons**.....

4. Summāro Red-Ox reakciju studijas (endoerģiska vai eksoerģiska) ADH ar reducēto formu etanolu un oksidēto NAD⁺ atbildēs **4.1 – 4.17 ! Absolūtā** potenciālu standarta E° vērtības ir (David Harris);

(KortlyShucha): standarta apstākļi **absolūtās** skalas temperatūrā K atbilstoši celsija skalai 25° C.

Alkohola dehidrogenāze Spirta oksidēšana par aldehīdu (aeroba).

4.1 Oks NAD⁺+H⁺(2e⁻)=NADH ; -E°¹=**0,4095 V** **absolūtais inversais** standarta potenciāls.

4.2 Red CH₃CH₂OH+H₂O=CH₃CHO+H₃O⁺+H⁺(2e⁻); **absolūtais** standarta potenciāls E°²=**-0.0550 V**

4.3 OksRed summa: NAD⁺ + CH₃CH₂OH+H₂O=>.....

4.4 ΔE°=E°²H₂O+E°¹=**-0.0550+0,4095=** V, pus reakciju summas standarta potenciāls ΔE°.

4.5 ΔG_{eq}Standarta=ΔE°•F•n=**0,3545*2*96485/1000=**..... kJ/mol standarta brīvās enerģijas izmaiņa.

1 > K_{eq}standarta = $\frac{[NADH] \cdot [CH_3CHO] \cdot [H_3O^+]}{[NAD^+] \cdot [CH_3CH_2OH] \cdot [H_2O]}$ = e $\frac{-\Delta G_{eqAerobi}}{R \cdot T}$ = EXP(-68400/8,314/298,15)=**1,038•10⁻¹²**=.....

4.6 Vai ir labvēlīgs vai nelabvēlīgs aerobais līdzsvars : lapas puse 8; ;

$$\Delta G_{Hess} = \Delta G^\circ_{H_3O} - \Delta G^\circ_{CH_3CHO} - \Delta G^\circ_{NADH} - (\Delta G^\circ_{CH_3CH_2OH} + \Delta G^\circ_{H_2O} + \Delta G^\circ_{NAD^+}) = \\ = 32,2824 + 1175,5732 - 151,549 - (75,2864 + 1059,11 - 237,191) = \dots\dots\dots \text{kJ/mol endoerģiska} \dots\dots\dots$$

Nelabvēlīga līdzsvara konstantes K_{eqAerobic}=10⁻¹² vērtība uzrāda stabilitāti līdzsvara maisījumā.

Endotermiska un endoerģiska etanola H₃CCH₂OH oksidēšanās H₃CCHO

4.7 Hesa brīvās enerģijas izmaiņa pozitīva ΔG_{Hess_oxidation}=.....kJ/mol, bet

4.8 minimizējas ΔG_{min}=ΔG_{eq}=..... kJ/mol sasniedzot aerobo maisījumu līdzsvarā:

4.9 Aeroba oksidēšana ar [NAD⁺]/[NADH]=10⁶ homeostāzē pH=7,36 ir labvēlīga .

ΔG_{AerobiOx}=**68,4**+8,3144*298,15*ln(1/10⁶*1/1*10^(-7,36)/55,3457)/1000=-.....kJ/mol ;

Inversā simetrija reakcijā: aeroba oksidēšana ir **inversi** simetriska anaerobai reducēšanai

$$10^{-12} = \frac{[NADH] \cdot [CH_3CHO] \cdot [H_3O^+]}{[NAD^+] \cdot [CH_3CH_2OH] \cdot [H_2O]} = K_{eqAerobi} < 1 < K_{eqAnaerobi} = \frac{[NAD^+] \cdot [CH_3CH_2OH] \cdot [H_2O]}{[NADH] \cdot [CH_3CHO] \cdot [H_3O^+]} = 10^{12}.$$

Viens skaitlis |ΔG_{Hess_oxidation}|=|.....| kJ/mol = |ΔG_{Hesa}|=|.....| kJ/mol ar pretēju zīmi.

Inversa eksotermiska un eksoerģiska etanāla H₃CCHO **reducēšana** H₃CCH₂OH

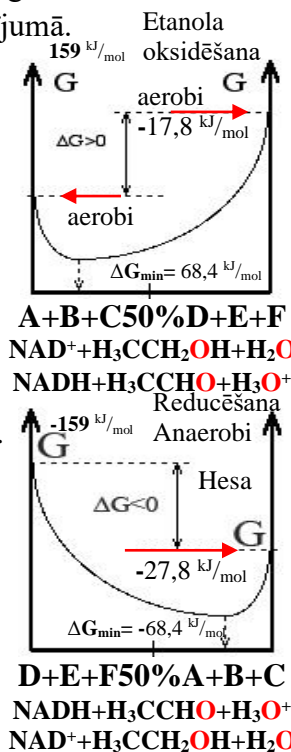
4.10 hipoksijā anaeroba etanāla reducēšana ir **inversi** negatīva: ΔG_{Hesa}=-.....kJ/mol, bet

4.11 minimizējas par ΔG_{eq}=ΔE°•F•n=-0,3545 V•2 mol•96485 C/mol=-.... kJ/mol.

4.12 Etanāla reducēšana par **etanolu** ar anaerobo attiecību [NAD⁺]/[NADH]=1/10 un pH=7,36 ir labvēlīgi negatīva, eksoerģiska brīvās enerģijas izmaiņa:

$$\Delta G_{anaerobi} = -68,4 + 8,3144 \cdot 298,15 \cdot \ln\left(\frac{1}{10} \cdot \frac{1}{10} \cdot \frac{55,3}{10^{-7,36}}\right) = -\dots\dots \text{kJ/mol} ;$$

$$\Delta G_{AnaerobiRed} = -68,4 + 8,3144 \cdot 298,15 \cdot \ln(1/10 \cdot 1/10 \cdot 55,3457/10^{(-7,36)})/1000 = -\dots\dots \text{kJ/mol} ;$$



A+B+C50%D+E+F
NAD⁺+H₃CCH₂OH+H₂O

NADH+H₃CCHO+H₃O⁺
Reducēšana

D+E+F50%A+B+C
NADH+H₃CCHO+H₃O⁺
NAD⁺+H₃CCH₂OH+H₂O

5.0 Veikt ADHIV izoelektriskā punkta IEP=pH=pK_{a-vid} analīzi fizioloģiskajā pH=7,36 vidē .

Noteikt ūdens šķīduma pH ar ADHIV koncentrāciju 10^{-7,05339} M (mol/Litrā)

Alkohola dehidrogenāze ADH E.1.1.1.1. oksidoreduktāze

Virrne no 386 AA aminoskābēm ADHIV molekulā human 1AGN.pdb:

MFAEIQIQDKDRMGTAGKVIKCKAAVLWEQKQPFSEIEIEVAPPKTKEVRIKILATGICRTDDHVIKGTMVSKFPVIVGH
EATGIVESIGEGVTTVKPGDKVIPLFLPQCRECNACRNPdGNLCIRSDITGRGVLDGTTTRFTCKGKPVHHFMNTSTFTE
YTVVDESSVAKIDDAAPPEKVKCLIGCGFSTGYGAAVKTGKVKPGSTCVVFGGLGGVGLSVIMGCKSAGASRIIGIDLNKDK
FEKAMAVGATECISPkdSTKPISEVLSEMTGNVGYTFEVIHLETMIDALASCHMNYGTSVVVGVPPSAKMLTYDPMLL
FTGRTWKGCVFGLKSRDDVPLVTEFLAKKFDLDQLITHVLPFKKISEGFELLNSGQSIRTVLTF

AA	pK _{acoo}	pK _{anH3+}	pK _{RR}	Nr	AA	pK _{acoo}	pK _{anH3+}	pK _{RR}	Nr
M	9,21			1	D	3,65			59
E	4,25			2	E	4,25			60
D	3,65			3	K	10,53			61
K	10,53			4	C	8,18			62
D	3,65			5	C	8,18			63
R	12,48			6	Y	10,07			64
K	10,53			7	K	10,53			65
K	10,53			8	K	10,53			66
C	8,18			9	K	10,53			67
K	10,53			10	C	8,18			68
E	4,25			11	C	8,18			69
K	10,53			12	K	10,53			70
E	4,25			13	R	12,48			71
E	4,25			14	D	3,65			72
E	4,25			15	K	10,53			73
K	10,53			16	D	3,65			74
K	10,53			17	K	10,53			75
E	4,25			18	E	4,25			76
R	12,48			19	K	10,53			77
K	10,53			20	E	4,25			78
C	8,18			21	C	8,18			79
R	12,48			22	K	10,53			80
D	3,65			23	D	3,65			81
D	3,65			24	K	10,53			82
H	6			25	E	4,25			83
K	10,53			26	E	4,25			84
K	10,53			27	Y	10,07			85
H	6			28	E	4,25			86
E	4,25			29	H	6			87
E	4,25			30	E	4,25			88
E	4,25			31	D	3,65			89
K	10,53			32	C	8,18			90
D	3,65			33	H	6			91
K	10,53			34	Y	10,07			92
C	8,18			35	K	10,53			93
R	12,48			36	Y	10,07			94
E	4,25			37	D	3,65			95
C	8,18			38	R	12,48			96
C	8,18			39	K	10,53			97
R	12,48			40	C	8,18			98
D	3,65			41	K	10,53			99
C	8,18			42	R	12,48			100
R	12,48			43	D	3,65			101
D	3,65			44	D	3,65			102
R	12,48			45	K	10,53			103
D	3,65			46	E	4,25			104
R	12,48			47	K	10,53			105
C	8,18			48	K	10,53			106
K	10,53			49	D	3,65			107
K	10,53			50	D	3,65			108
H	6			51	H	6			109
H	6			52	K	10,53			110
E	4,25			53	K	10,53			111
Y	10,07			54	E	4,25			112
D	3,65			55	E	4,25			113
E	4,25			56	R	12,48			114
K	10,53			57	F	1,83			115
D	3,65			58					

Nr 115 no 386 aminoskābēm aktīvās vērtības pKa

Summa = 881,66.....

= ΣpKa_{Rsānu grupa}+pKa_{Ntermināls}+pKa_{Ctermināls} =

pK_{vid}=(ΣpKa_{Rsānu grupa}+pKa_{Ntermināls}+pKa_{Ctermināls})/NpKa

IEP= pK_{vid} =881,66 / 115 =7.6666.....

5.1-5.5 pieci aprēķinu uzdevumi cilvēka ADH IV molekulai 1AGN.pdb

Protolītisko konstanti pK_a izoelektrisko punktu $IEP=pK_a$ aprēķina saskaitot sānu virkņu $\Sigma pK_{aRsānu}$ grupu, un $pK_{aNtermināls}NH_3$ un $pK_{aCtermināls}COO$ -konstanšu summu izdalot ar skābes grupu skaitu molekulā NpK_a :

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

1 Summārais protolītiska līdzsvaru skaits ir $NpK_a = 113 + 2 + \dots = \dots$

386 aminoskābes no tām 113+2 aminoskābes ar protolītiskām pK_a sānu grupām,

N-termināla metionīns M $pK_{aNtermināls} = 9,21$ un C-termināla fenilalanīns F $pK_{aCtermināls} = 1,83$

Summa ir saskaitāma kā $\Sigma pK_{aRsānu\ grupu} + pK_{aNtermināls} + pK_{aCtermināls} = \dots$

2 Summāri vidējā skābju grupu konstante $pK_{vid} = pK_a = IEP$ **IZO ELEKTRISKAIS PUNKTS**

$$IEP = pK_{vid} = 881,66 / 115 = \dots$$

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
 $-COOH$ & $-NH_3^+$ pozitīvs lādiņš $-COO^-$ & $-NH_2$ lādiņš ir negatīvs $-COO^-$ & $-NH_2$
Pasvītro un noteic pareizo: pozitīvs(+) vai negatīvs(-) vai nulle!

3 ADH IV molekulas bez NAD^+ lādiņš ir (+), nulle „0” vai (-) fizioloģiskā $pH = 7,36$ vidē asins plazmā

Pasvītro eksistējošu:

$-COOH$ & $-NH_3^+$ ir pozitīvs (+) lādiņš $pH = 7,36 < IEP = 7,67$ lādiņš ir negatīvs(-) $-COO^-$ & $-NH_2$.

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

Pasvītro eksistējošu:

$-COOH$ & $-NH_3^+$ ir pozitīvs (+) lādiņš $IEP = 7,67 < pH = 8,8$ lādiņš ir negatīvs(-) $-COO^-$ & $-NH_2$.

5 Aprēķināt $C = 10^{-7,05339}$ moli / Litrā ADH IV šķīduma pH

Ostvalda atšķaidīšanas likumā logaritmam no $C = 10^{-7,05339}$ M:

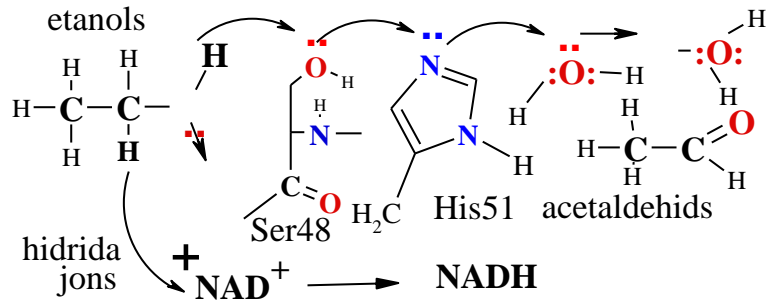
$$pH = \frac{pK_{a\ vid} - \log C}{2} = \frac{7,6666087 - \log 10^{-7,0533913}}{2} = \frac{7,6666087 + 7,0533913}{2} = 14,72 / 2 = \dots$$

7,36 Atraktora ADH IV koncentrācija ir $C = \dots$ M .

5. Ievietot katalītiskā Zn^{2+} jonu, etanola skābekļa atomu **O** koordinētu ar donora akceptora saiti un četrus pārļēcienos disociējošu protonus H^+ no spirta grupas $-CH_2-O-H$ uz Ser48 uz His51 un rezultējošo piesaistīto ūdens molekulai H_2O protonu H^+ , veidojot hidronija jonu H_3O^+ .

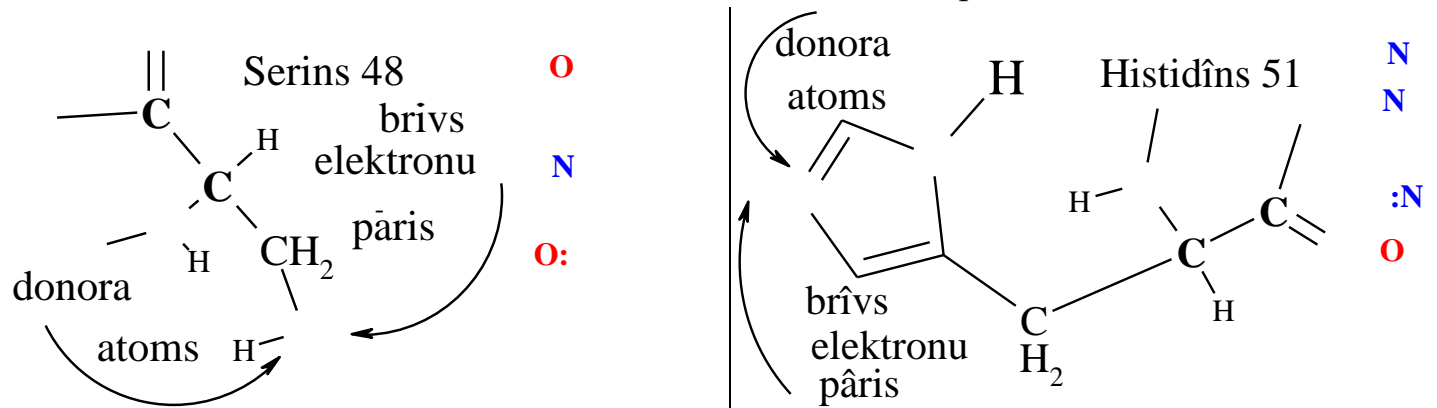
ADH spirta oksidēšanas laikā ūdens vidē,

Ievietot hidrīda jonu H^- tunelēšanas ceļā no spirta grupas oglekļa atoma- CH_2- uz NAD^+ cikliskā oglekļa atomu $-HC^+$ - producējot NADH.



lai H_2O ūdens molekulu pārvērstu hidroksonija jonā H_3O^+ un spirtu par aldehīdu

6. Ievietot Ser-48, His-51 struktūrās **O**, **N** atomus un elektronu pārus donoru atomus **O:**, **:N?**



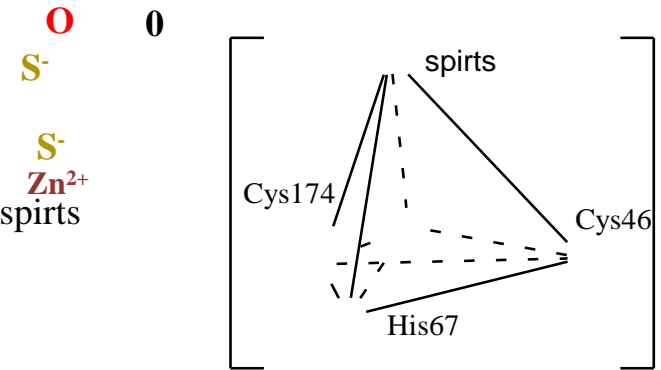
7. Ievietot **O**, Zn^{2+} , **S**, **N** atomus un kompleksā



nulles lādiņu 0

tetragonālā ģeometrijā, trigonālā piramīdā!

1HLD.pdb Zn^{2+} koordinē Cys46-Cys174-His67-**O** spirts



Hidrīda jona tunelēšana
3,6

8. Kurš vitamīns-kofaktors oksidē spirtus ADH dimēra ceturtnajā struktūrā?.....

9. Oksidētā NAD^+

hidrīda tunelēšana

nikotīna adenīna

dinukleotīdā:

Nicotīna amīds

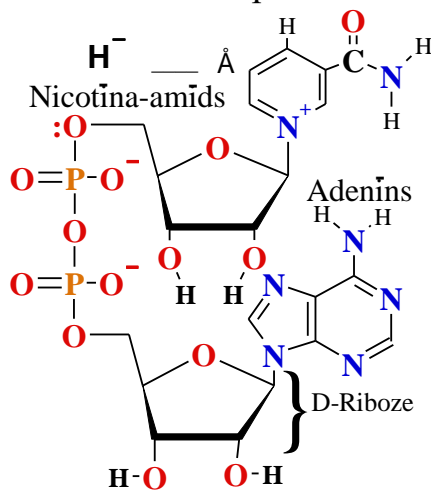
oksidēts, adenīns,

divas ribozes,

divus fosfāti ar

anhidrīda saiti

starp fosfātiem



10. NADH hidrīda

nikotīna adenīna

dinukleotīda

reducētā forma:

Nicotīna amīds,

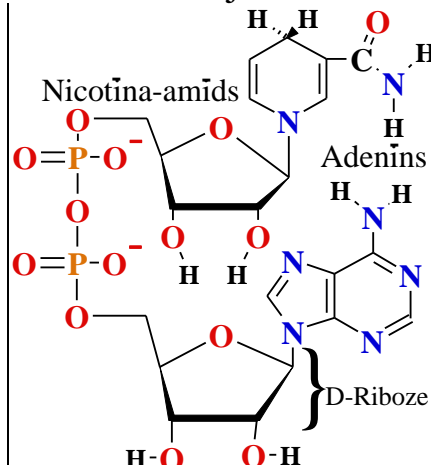
Adenīns,

divas ribozes,

divi fosfāti ar

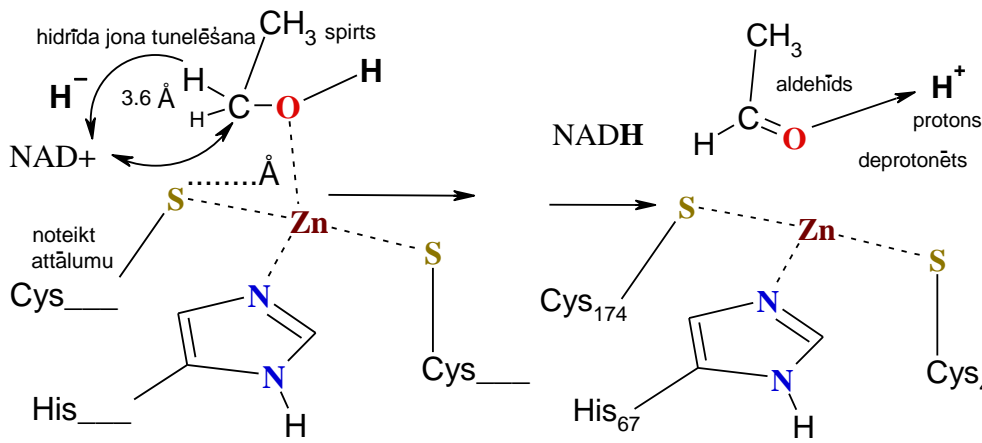
anhidrīda saiti

starp fosfātiem



ADH 1HLD.pdb Zn^{2+} koordinē Cys46-Cys174-His67-**O** : Tunelēšanas distance 3,6 Å hidrīda

4,6 174 67 46 4



jonam H^- u NAD^+ nikotīna amīda pozitīvi lādētā cikla oglekļa atomu $-\text{CH}-$.
 Nomērīt attālumu Å no spirta $-\text{CH}_2-$ oglekļa atoma līdz NAD^+ aromātiskā gredzena $-\text{CH}-$ IHL D.pdb molekulā.
 Ar peles labās pogas izvēlnes „Distance” izvēlnē

„Select Mouse Click Action” nomērīt attālumu no spirta oglekļa atomam $-\text{CH}_2-$ Å līdz NAD^+ nikotīna cikliskā oglekļa atomam $-\text{CH}-$!

11. Ievieto aminoskābju numurus cinka koordinācijas sfērā un nomērīto attālumu angstrēmos.

12. Otrejās (sekundārtās) struktūras **ADH** ir..... spirāles un..... plāksnītes.

13. Cik **alfa-spirāles** veido **ADH** polipeptīda molekulu?**alfa-spirāles**.....

14. Cik **beta virknes - plāksnītē** veido **ADH** molekulu ?**beta virkņu-plāksnīte**

..... **beta virkņu-plāksnīte** un viena atsevišķa

15. Cik ceturtējo 4° struktūru komponentu 3° subvienību satur **ADH** molekula **1JU9zn.pdb** un **1HLDznNAD.pdb**? identiskas **ADH** molekulas, katra saista koenzīmu ...

katrā saistošs domēns **substrātam spirta grupai**

16. Kādas fizioloģiskas funkcijas cilvēka organismā ir **ADH** attiecībā uz etanolu? atraut divus

ūdeņraža atomus un tādējādi oksidēt etanolu, veidojot

18. Kādas toksiskas fizioloģiskas funkcijas cilvēka organismā ir etanola molekulām? Kāpēc CSDD nosaka etanola bīstamo koncentrāciju daudzumu 0.5 promiles akvaporīnu-kanāliem ?...

a)...palēnina transportu cauri membrānu akvaporīnu - kanāliem.....+.....

b) ilgu laiku lietošana organismā rada un

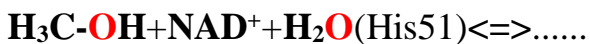
c) etanols konkurē ar retinolanomācot A vitamīna veidošanos organismā.

19. Kāda toksiska fizioloģiska funkcija cilvēka organismā ir **ADH** uz metanolu?.....

saindē cilvēku ar oksidēšanas produktu

atrauj divus ūdeņraža atomus un oksidē metanolu par

20. Pabeigt oksidēšanas reakciju metanolam $\text{H}_3\text{C}-\text{OH}+\text{NAD}^+$ ūdenī.



metanols B3 vitamīns formaldehīds B3 vitamīns reducēts

21. Kā konkurē etanols ar metanolu? Kāds pretlīdzeklis lietojams metanola saindētā cilvēka organismā? liela etanola koncentrācija konkurē ar

metanola oksidēšanās konkurencē ļauj akvaporīniem

22. Nosauciet sešu kristalizēto veidu **ADH** subvienību apzīmējumus ar grieķu alfabētu!

1. alfa, 2. beta, 3. gamma, 4. pī, 5. hī, 6. sigma

23. Kāda veida cilvēka alkohola dehidrogenāzi nav izdevies kristalizēt?

Atzīmējiet kādi cilvēka alkohola dehidrogenāzes septiņi veidi - olbaltumvielas identificētas organismā pēc datu bankas Uni-Prot KB datiem:

1._HUMAN, subvienības apzīmējums
2._HUMAN, subvienības apzīmējums
3._HUMAN, subvienības apzīmējums
4._HUMAN, subvienības apzīmējums
5._HUMAN, subvienības apzīmējums
6._HUMAN, subvienības apzīmējums
7._HUMAN, nav

<http://aris.gusc.lv/ChemFiles/AlhoDeHydrogenase/4DXH5VJ5hOhBioChem1718/5VJ5hOhBioChem17.pdf>

The Class	System	Protein gene	Uni-Prot KB	Gene new	Gene old	Table 1: Nomenclature for Human Alcohol Dehydrogenase Abstract Background All known attempts to isolate and characterize mammalian class V alcohol dehydrogenase (class V ADH, ADH7_HUMAN), a member of the large ADH protein family, at the protein level
Class I 1HSO		ADH1A	.	ADH1	ADH1A	
Class I 1DEH		ADH1B	.	ADH2	ADH1B	
Class I 1HT0		ADH1C	.	ADH3	ADH1C	
Class II		ADH2	.	ADH4	ADH4	
Class III ^{1MP0}		ADH3	.	ADH5	ADH5	
Class IV ^{1AGN}		ADH4	.	ADH7	ADH7	
Class V		ADH5	.	ADH6	ADH6	

have failed. This indicates that the class V ADH according Uni-Prot KB ADH6_HUMAN protein is not stable in a non-cellular environment, which is in contrast to all other human ADH enzymes. In this report we present evidence, supported with results from computational analyses performed in combination with earlier in vitro studies, why this ADH behaves in an atypical way.

[Arch Biochem Biophys.](#) 2018 Sep 1;653:97-106.4**DXHa**

Biochemistry, 2017, 56 (28), pp 3632-

3646.5ENV,8ADH,1QLH,4DWV,1N92,1N8K,1P1R,4DXH,1N92,1N8K,1LDE,1LDY,1MGO,5VKR,1HEU,2JHF,1HET,2JHG,1H2B,1MAO,1PL6,1PL6,1YKF,1YE3,4XD2,5VJ5,5VJG,5VKR,5VL0,5VNI,, 6