

studijas [Aquaporin0SLat.pdf](#): ChemScape MDL  RasMol ; MAGE  FireFoxv3.5.5.

Eksperimentāls pētījums htdocsLocal: <http://aris.gusc.lv/ChemFiles/Aquaporins/AquaPorin1-0.htm>

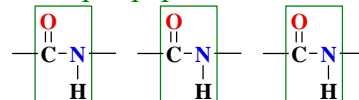
Rīgas Stradiņa universitātē Āra Kakša 2023 sagatavots eksperiments-pētījumu par olbaltumvielu **AQP0 acu-lēcas šūnai** [William E. C. Harries, David Akhavan, Larry J. W. Miercke, Shahram Khademi, Robert M. Stroud](#) Bioķīmijas katedra Kalifornijas universitāte 2004 Proc.Natl.Acad.Sci. **1YMG.pdb** monomērs

Vizualizācijas - **Display** iespējas (izvēlnē: **Bumbiņu un Nūjiņu=Ball & Stick** **Nūjiņu=Stick Van der Vālsa rādiusos =Spacefill**

Atoms	Simbols	Krāsa	Atoma kovalento vērtību skaits
Ogleklis	C	gaiši Pelēks vai Melns	4
Ūdeņradis	H	Balts	1
Skābeklis	O	Sarkans	2 (donoru akceptoru ligandi līdz 4)
Slāpeklis	N	gaiši Zils	3 + 1 (donoru akceptoru ligandi līdz 4)
Sērs	S	gaiši Dzeltens	2 & 6
Fosfors	P	intensīvi Dzeltens	5 & 3
Nātrija jons	Na ⁺	intensīvi Zils	+1 (donoru akceptoru līdz 6)
Kalcija jons	Ca ²⁺	tumši Pelēks	+2 (donoru akceptoru līdz 6)
Magnija jons	Mg ²⁺	Zaļš	+2 (donoru akceptoru līdz 6)
Dzelzs jons	Fe ²⁺	pelēki Dzeltens	+2 (donoru akceptoru līdz 6)
Dzelzs jons	Fe ³⁺	pelēki Dzeltens	+3 (donoru akceptoru līdz 6)

Corey, Pauling, Kultins CPK krāsu shēmu **1965** patents **ASV** Olbaltumvielas **mugurkauls ir Aminoskābju Cα** oglekļa atomu

polipeptīdu treks



sānu virknes: **hidrofobas pelēkas** **polāras/polāras rozā** un **gaiši zilas** **fizioloģiskā pH=7.36 vidē** **skābe-COO⁻ negatīvs lādiņš** **bāze-NH₃⁺ pozitīvs lādiņš**

1. N-termināla aminoskābe ir Ser..... un **C-termināla** aminoskābi Gly.....?

Cik aminoskābes veido Akvaporīna 0 **acu-lēcas šūnas** polipeptīda virkni ...? skat. 6.lpp

2. Kāda veida otrējās struktūras satur **1YMG.pdb** akvaporīns 0?... , nav.....

3. Kāds skaits alfa spirāles veido akvaporīna 0 polipeptīda

molekulas?..... **Alfa-spirāles**

4. Vai AQP0 satur **beta struktūras** , beta **plāksnītes** no **beta virknēm? nesatur**

5. Cik ūdens molekulu skābekļa atomu **O** atrodas kanālā akvaporīnā 0 **1YMG.pdb**?

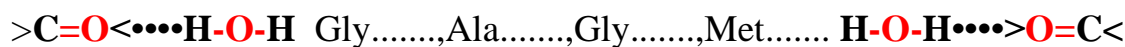
10. Trīs aminoskābes atbildīgas par maksimālu sašaurinājumu vestibilā un viena aminoskābe ir orientēta uz centru nodrošina maksimālo sašaurinājumu!

Asn....., Thr....., His.... .

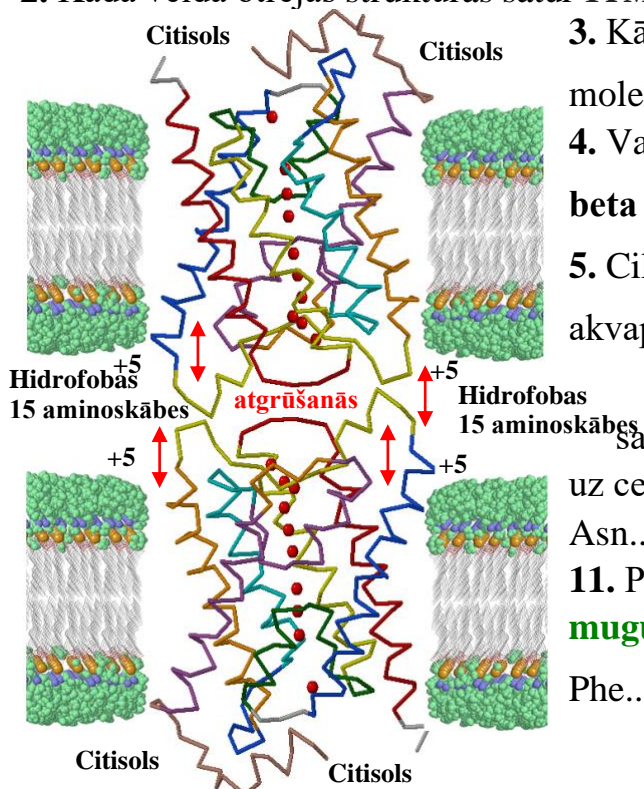
11. Piecas aminoskābes akvaporīna 0 **AQP0** polipeptīda **mugurkaula** virknē sašaurina kanāla diametru uz 1.99 Å?

Phe....., His....., Met....., Ala....., Arg.....

12. Četru aminoskābju mugurkaula karbonili **>C=O<...H-O-H** sekmē līnija veida **ūdens** molekulu līdzināšanos kanālā ar **ūdenraža akceptora mijiedarbības mehānismu saitē?**



13. Trīs aminoskābes veic līdzināšanos kanālā ar trīs **donora ūdenraža saitēm** & **četrām ūdens** molekulām ar **akceptoru saitēm?** **4 H₂O<...H-N=C<** Asn.....,Arg.....,His...



14. 4 aminoskābes kanālā sašaurina diametru uz 2.5 Å ar sānu virkni orientētu kanāla centrālās ass virzienā? Phe.....,Leu.....,Leu.....,Tyr2.....kanāla centrālās ass virzienā
15. Divu aminoskābju **NPA–NPA** raksturīgais sašaurināšanās motīvs tieši pēc Tyr23 ir orientācijas atslēga centrālai **ūdens** molekulai, tāpēc atbildīga par rotāciju 180°, tur klāt bloķē protonu vadītspēju kanālā? Asn.....,Asn.....
16. Četras aminoskābes citoplazmas pusē **NPA** raksturīgajā motīvā, sarindo **mugurkaula** trīs karbonila skābekļus $>C=O< \cdots H-O-H$ nostājoties gar vienu kanāla sienu vērsti tieši kanālā, izbeidzoties pie Tyr149? Gly.....,Ala.....,His.....,Val.....
17. Piecas aminoskābes veido citu sašaurinājumu, kas ir šaurākais reģions kanālā? Tas ieņem **poras** sfēras **SF rādiusu** ~ 1.1 Å ir salīdzināms ar vidējo **ūdens rādiusu** **H–O–H** garumā 1.4 Å un 0.55 Å dipola lenķa augstuma izmērs ar maksimālo diametru 1.5 Å atbilstošs **ūdens** specifiskajai lenķiskajai struktūrai? Tyr.....,Val...,Gly...,His...,Phe..
18. Kādu skaitu **ūdens** molekulas sarindo astoņi **mugurkaula** karbonili $>C=O< \cdots H-O-H$ un citi kanāla-līnijas dalībnieki stabilizējot ciešu vienas-rindas kolonu iezīmētām **ūdens** molekulām **AQP0** akvaporīna kanālā?..... **ūdens** molekulas ciešā vienas-rindas kolonā
19. Kuras aminoskābes sānu virkne no **mugurkaula** akvaporīnā 0 ir atbildīga par **ūdens** transporta ātruma inhibēšanas efektu ar **pH** vai **Ca²⁺** jonu? Nemeth-Cahalani un Halls mutācijas eksperimentā, kurā apmainīja His-40 uz alanīnu40, aspartātu40, vai lizīnu40, un tādējādi atklāja, ka mutējošās olšūnās neuzrādās **pH-atkarīga** kanāla **slēgšanās** ja **pH** ir lielāks par >..... Histidīna40 reakcija **AQP0** acu-lēcas šūnās ar dietilpirokarbonātu (DEPC) novērš **pH atkarību** un palielina **ūdens** vadīšanu (histidīna40-specifiskumu atjauno ar hidroksilamīnu), papildinot ar histidīna40 titrēšanas eksperimentu mainās ūdens vadītspēja. His-..... palielina vadītspēju.
20. Kādi pieci 5 starp molekulārie spēki zināmi olbaltumvielu bioķīmijā un fizioloģijā? ...
1.... 2.... 3... 4.-**S-S**-... 5....
21. Kādi trīs 3 starp molekulārie spēki saloka olbaltumvielu **AQP0**? Nosauciet trīs 3 klātesošos!
1..... 2.... 3...

22. Ievietot aminoskābju nummus 28-Å-garam, **cilindriskam AQP0 kanālam**, kuram seklie vestibili atrodas abos kanāla galos! Kanāla tilpuma virsma attēlota fonā ar svarīgākajiem kanālu-veidojošiem aminoskābju atlikumu nosaukumiem! Centrālais reģions attēlots ar diametru no <2.5 Å, reģioni abās pusēs parādīti ar diametru lielāku par >2.5 Å un kanāla garuma distance līdz <10 Å no centrālā reģiona centra 0! Sākot no ekstra celulārās puses, vestibils attēlots piltuvē diametrā ap 10 Å un satur 10 ūdens molekulas **H₂O** 405, 415, 455, 411, 426, 407, 436, 439, 451, 435, 465**skābekļa** atomus **H₂O** starp aminoskābju atlikumiem. Ūdens molekulas orientētas uz kanāla centru līnijā. Centrs ir atbildīgs par maksimālu sašaurinājumu no vestibila līdz kanāla šaurākajam diametram 1.99 Å ! Izkārtoti 7 lādiņus **-NH₃⁺** + un **-COO⁻** abās pusēs kanālam!

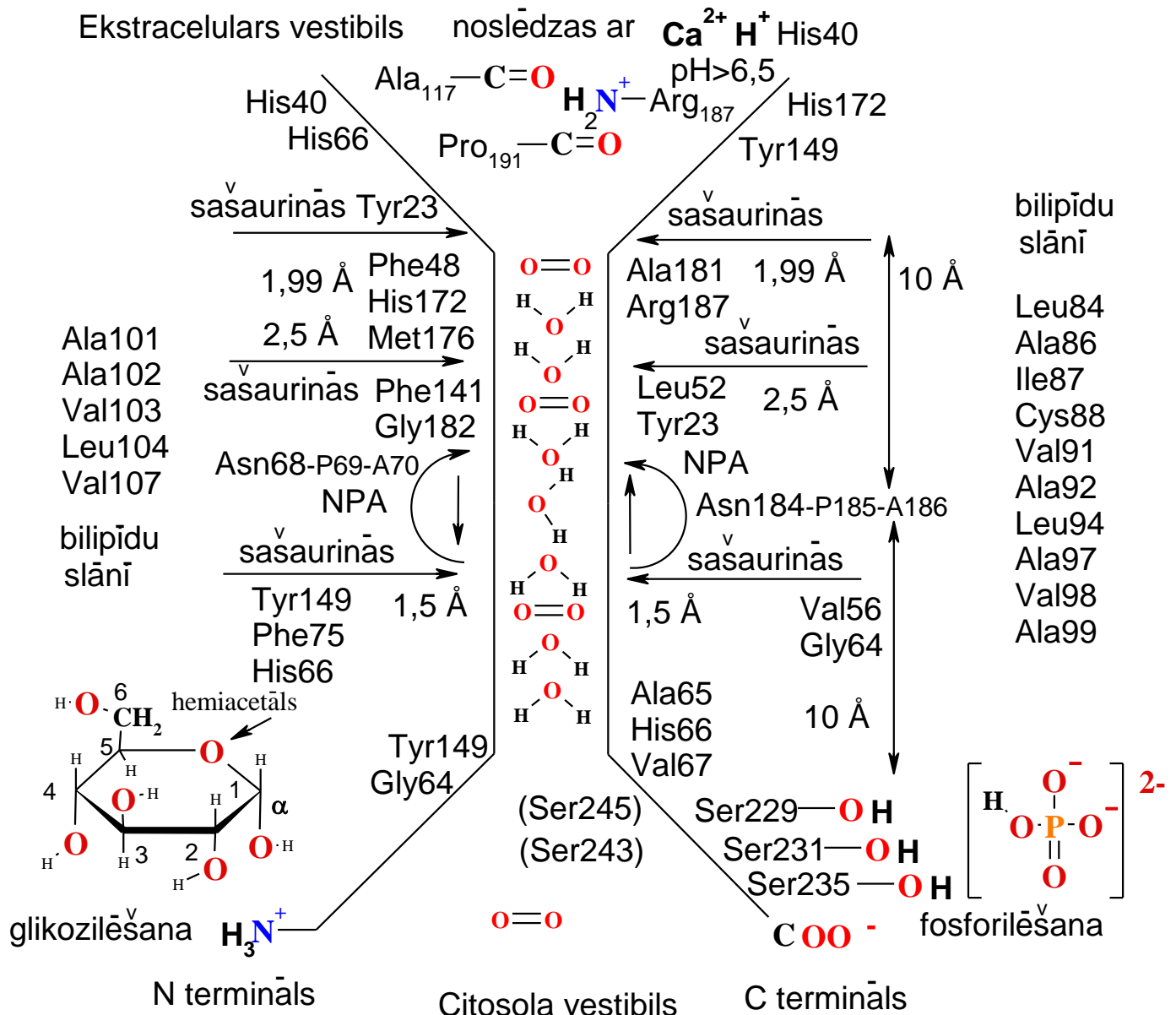
hidrofobs savienojums (junction)

Gly124, Pro123, Leu121, Phe198, Leu194

Leu39, Pro38, Gly37, Ala35, Gly114 Val112, Ala111, Pro110, Pro109; Val125

pozitīvu lādiņu tīklojums atgrūžas

His40 Arg33 Arg113 His122 Arg196



Lejuplādēt: <http://aris.gusc.lv/06Daugavpils/Research/tgf/AQP0skemLatS.tgf>

<http://aris.gusc.lv/06Daugavpils/Research/jpg/AQP0Lat.jpg>

23. Nosauciet šūnu un organellu lokalizēšanās vietas, kurās transporta enzīmi **AQP0** atrasti!

.....šūnas kā starpšūnu.....vai kā.....

starp**audu šūnām**..

24. Divi tirozīni un trīs histidīni ekstracelulārajā pusē atrodas leļup pa z asi kanālā?

Ierakstiet tirozīna atlikuma pozīciju uz olbaltumvielas virknes **mugurkaula treka** un ...pozīcijas trim histidīniem, kuri atrodas tieši kanāla vestibālā!

Tyr....., Tyr....., His....., His....., His....

25. Kuras trīs C-termināla **2B6P**.pdb aminoskābes Post translācijas modificēšanā, ir iesaistītas

domājams **AQP0** aktivitātes regulēšanā, jo C-termināla virkne piedalās kā **fosforilēšanas**

regulācijas vietas ? Nosauciet vārdu C-termināla 24 aminoskābju saturošai mobilai spirālei,

olbaltumvielas sekundārās struktūras domēnam kopā ar 239–263 rindas trīs fosforilēšanai

pakļaujamajām aminoskābēm ! **H**....., Ser.....(Ser245), Ser.....(Ser243, Ser240), Ser.....

26. **Acu lēcas** šķiedru audos 15 nepolāru aminoskābju atlikumi sānu virknēs ar hidrofobiem spēkiem saista divus akvaporīnus (AQP0) veidojot starp membrānu 16 Å spraugas cieš saistes šūnās. Katrā kontakta punktā enerģija ir -10 kJ/mol , ja 15 punkti tad summā ir -150 kJ/mol .

Leu....., Pro....., Gly....., Ala....., Gly....., Val....., Ala....., Pro.....,

Pro.....; Val....., Gly....., Pro....., Leu.....; Phe....., Leu.....,

27. Četras aminoskābes, kā konservētas nemainīgi atrodamas visos **akvaporīnos**, mainot

konformāciju lokalizētas centrālā “selektivitātes filtrā **SF**” kanālā veic **kanāla slēgšanu**?

ar divām ūdeņraža saitēm no **NH1 Arg....>NH...O=C<Pro.....**

un no **NH1 Asn....>NH...O=C<Ala.....**

28. Piecas aminoskābes uz virsmas veido pozitīvu +5 lādiņu tīklojumu **atgrūšanai** AQP0

acu-lēcas šūnas ekstra cellulārā pusē? His....., Arg....., Arg....., His...., Arg.....

29. Arg-187, Asn68 3. konformācija atrodas centrālā kanāla “selektivitātes filtrā **SF**” veicot

kanāla slēgšanu ar divām ūdeņraža saitēm Arg-187>**NH...O=C<** un Asn68>**NH...O=C<** :

>**NH...O=C<Pro....., O=C<Phe....., O=C<Asn....., O=C<Arg....., O=C<Ser.....;**

>**NH to O=C<Asn....., O=C<Ala....., O=C<Asn.... and**

Kuras divas aminoskābes ir saglabātas visos akvaporīnos Val....., Tyr..... ?

30. AQP0 izoelektriskā punkta $IEP=pH=pK_{a-vid}$ kā vidējās pK_{a-vid} vērtības noteikšana. .
 Noteikt ūdens šķīduma pH ar **AQP0** koncentrāciju $C=0.00000063=10^{-6.2}M$ (mol/Litrā)!

21 L-α-aminoskābes olbaltumvielu-polipeptīdu protolīzes pK_a vērtība **izoelektriskais punkts IEP**

Fizioloģiskajā $pH=7,36 \pm 0,01$ vidē karbonskābes grupas eksistē negatīvi lādēta **-COO⁻** un amino grupas **R-NH₃⁺** pozitīvi lādētas, kā piemērā ar glutamīnskābes pK_a vērtībām salīdzinājumā ar fizioloģisko pH vērtību ir mazāka karbonskābes grupām: $pK_{aR-COOH}=4,25 < 7,36$, $pK_{a-COOH}=2,19 < 7,36$ vai protonētai amino grupai lielāka $7,36 < 9,67 = pK_{a-NH_3^+}$.

Tabulā dotas konstantes pK_a četru veidu paralēliem protolītiskiem līdzsvāriem katrā aminoskābes molekulā:
 skābe \leftrightarrow bāze $+H^+$; Paralēlo protolītisko līdzsvāru skaita NpK_a vidējā konstantes
 1. **R-COOH** \leftrightarrow **R-COO⁻** $+H^+$; izoelektriskā punkta $IEP= pK_a$ vērtība ir aprēķināma kā
 2. **R-NH₃⁺** \leftrightarrow **R-NH₂** $+H^+$; $IEP= pK_a=(\sum pK_{aR\ grupas} + pK_{a-NH_3^+} + pK_{a-COOH})/NpK_a$
 3. **Tirozīna-fenols-OH** \leftrightarrow **Tirozīna-fenols-O⁻** $+H^+$, *Ostvalda atšķaidīšanas likumā* aprēķina pH šķīduma
 4. Cisteīns-SH \leftrightarrow Cisteīns-S⁻ $+H^+$ koncentrācijas C logaritmā: $pH = \frac{pK_a - \log C}{2} = \dots$

Aminoskābju un olbaltumvielu izoelektriskā punkta vērtībā $pH=IEP$ jona lādiņa summa ir nulle
 0 — skābā vidē plus (+) — nulles lādiņš, „0” IEP — bāziskākā vidē mīnuss (-) — 14 pH skala
-COOH & **-NH₃⁺** pozitīvs lādiņš **-COO⁻** & **-NH₂** lādiņš ir negatīvs **-COO⁻** & **-NH₂**

Amino Acid	pK_{aCOOH}	$pK_{aNH_3^+}$	$pK_{aRgrupa}$	
Izoleicīns	I	2,36	9,68	
Valīns	V	2,32	9,62	
Leicīns	L	2,36	9,60	
Fenilalanīns	F	1,83	9,13	
Cisteīns	C	1,96	10,28	8,18
Metionīns	M	2,28	9,21	
Alanīns	A	2,34	9,69	
Prolīns	P	1,99	10,96	
Glicīns	G	2,34	9,60	
Treonīns	T	2,11	9,62	
Serīns	S	2,21	9,15	
Triptofāns	W	2,38	9,39	
Tirozīns	Y	2,20	9,11	10,07
Histidīns	H	1,82	9,17	6,00
Aspartāts	D	1,88	9,60	3,65
Glutamāts	E	2,19	9,67	4,25
Aspargīns	N	2,02	8,80	
Glutamīns	Q	2,17	9,13	
Lizīns	K	2,18	8,95	10,53
Arginīns	R	2,17	9,04	12,48

Tabula 5.3: Reginald H. Garrett, Charles M. Grishman, **Biochemistry**, University of Virginia 1995;

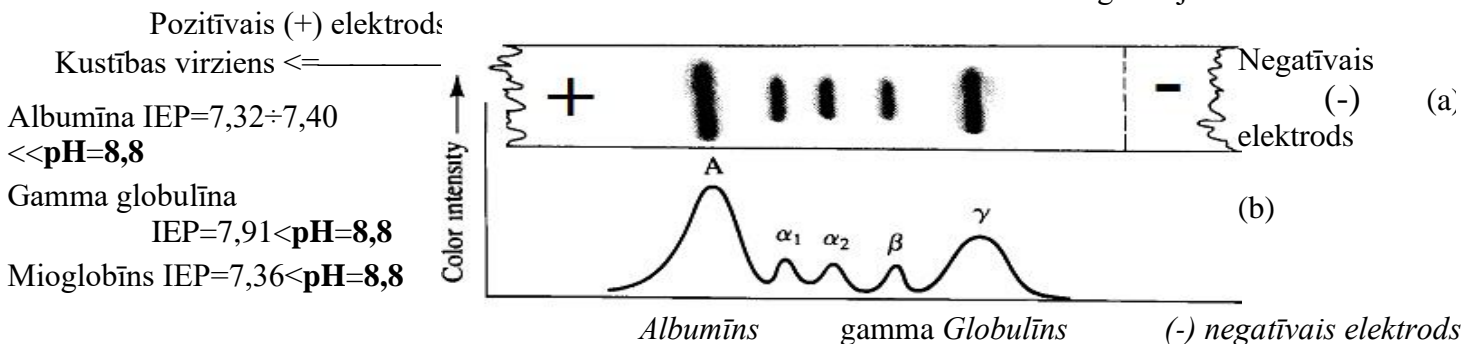
Albumīns E7G.pdb 7,32=IEP 7 taukskābes mazs (-) lādiņš un bez 7 taukskābēm 7,40=IEP mazs (+) pozitīvs fizioloģiskā $pH=7,36$, bet *Gamma globulīna* IgG1.pdb molekulai ir pozitīvs (+) lādiņš, jo fizioloģiskais $pH=7,36 <$ ir mazāks par 7,91=IEP.

Mioglobīns IEP=7,36 ir neitrāla nulles „0” lādiņa molekula, jo IEP=7,36 ir vienāds ar fizioloģisko $pH_{asins}=7,36$ 1MBO.pdb

Protolītisko konstanti-izoelektrisko punktu pK_a aprēķina saskaitot sānu virkņu $\sum pK_{aRsānu\ grupa}$, $pK_{aNterminālsNH_3}$ un $pK_{aCterminālsCOO}$ -konstanšu summu izdalot ar skābes grupu skaitu molekulā NpK_a :
 $IEP=pK_a=(\sum pK_{aRsānu\ grupa} + pK_{aNtermināls} + pK_{aCtermināls})/NpK_a$

Zīmējums Seruma **olbaltumvielu** sadalīšana ar **elektroforēzi**. (a) Paraugs tiek uzlikts kā tieva līnija sākumā. Pēc **elektroforēzes** pie **pH 8,8**, papīrs tiek žāvēts un iekrāsots. (b) Krāsu intensitātes līknes plankumiem uz papīra. *γ-Globulīns* kustas lēnāk par *Albumīnu*.

Olbaltumvielas kustas šinī virzienā \leftarrow —Parauga līnija sākumā



Seleno cisteīns 21. L-α-aminoskābe?

Seleno cisteīns ir L-α-aminoskābe kura atrodas enzīmu olbaltumvielās, ieskaitot noteiktas **peroksidāzes** un **reduktāzes** kuras piedalās katalītiskās elektronu pārnese reakcijās. Seleno cisteīna nosaukums jau norāda ka selēna **Se** atoms aizvieto sēra **S** atomu strukturālajā analogā cisteīnā. Konstantes pK_3 vērtība seleno cisteīnā 5,2 ir par 3 vienībām mazāka nekā cisteīnā 8,18. Kopš seleno cisteīns ir iekļauts polipeptīdos translēšanas procesos ribosomās, tas tiek klasificēts kā "21 aminoskābe." Tāpat kā 20 ģenētiski iekodētām aminoskābēm, seleno cisteīns ir iekodēts ar vienkāršu trīs burtu kodonu **UGA** (skat 16 nodarbību Nukleo proteīni tRNS 62 kodoni).

Acu lēcu akvaporīns-0 (AQP0) specifiska ūdens pora un savienojums starp šķiedru šūnām acu lēcā

<http://aris.gusc.lv/ChemFiles/Aquaporins/1YMGpILat.doc>; <http://aris.gusc.lv/ChemFiles/Aquaporins/1YMGpI.xls>

Sequence of 263 AA Amino Acids in AQP0 molecule 1YMGpI.pdb: 80*3+23=263

10 20 30 40 50 60 70 80
 MWELRSASFWRRAICAEFFASLFYVFFGLGASLRWAPGPLHVLQVALAFGLALATLVQAVGHISGAHVNPVAVTFAFLVGSQ
 MSLRLAICYMVAQLLGAVAGAAYLYSVTPPAVRGNLALNTLHPGVSVGQATIVEIFLTLQFVLCIFATYDERRNGRLGSV
 ALAVGFSLTLGHLFGMYTGGMNPARSFAPAILTRNFTNHVWVWVGPVIGAGLGSLLYDFLLFPRLKSVSERLSILKGS
 RPSESNQPEVTGEPVELKTQAL

AA	pKa _{COO}	pKa _{NH3+}	pK _{RR}	NchainAA	Nr
M		9,21		1	1
E	4,25			3	2
R	12,48			5	3
R	12,48			11	4
C	8,18			14	5
E	4,25			16	6
Y	10,07			23	7
R	12,48			33	8
H	6			40	9
H	6			61	10
H	6			66	11
R	12,48			85	12
C	8,18			88	13
Y	10,07			89	14
Y	10,07			105	15
R	12,48			113	16
H	6			122	17
E	4,25			134	18
C	8,18			144	19
Y	10,07			149	20
D	3,65			150	21
E	4,25			151	22
R	12,48			152	23
R	12,48			153	24
R	12,48			156	25
H	6			172	26
Y	10,07			177	27
Y	10,07			178	28
R	12,48			187	29
R	12,48			196	30
H	6			201	31
Y	10,07			204	32
Y	10,07			219	33
D	3,65			220	34
R	12,48			226	35
K	10,53			228	36
E	4,25			232	37
R	12,48			233	38
K	10,53			238	39
R	12,48			241	40
E	4,25			244	41
E	4,25			250	42
E	4,25			254	43
E	4,25			257	44
K	10,53			259	45
L	2,63			263	46

Ir uzskaitīti 3 cisteīna Cys atlikumi ar pK_{RR} = 8.18;

Saskaītītas 46 pKa vērtības no tabulām

Uzdevums akvaporīna 0 molekulas AQP0 aprēķinam

Protolītisko konstanti pK_a izoelektrisko punktu IEP=pK_a aprēķina saskaitot sānu virkņu ΣpK_aRsānu grupa, un pK_aNterminālsNH₃ un pK_aCterminālsCOO- konstanšu summu

izdalot ar skābes grupu skaitu molekulā NpKa:

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

30.1 Sumārais protolītisko līdzsvaru skaits ir NpKa=44+2=.....

263 aminoskābes no tām ar 44+2 protolītiskām pK_a sānu grupām

N-termināla metionīns M pK_aNtermināls=9,21 un

C-termināla leicīns L pK_aCtermināls=2,36

Summa ir saskaitāma kā

$$\Sigma pK_{aRside\ group}+pK_{aNterminal}+pK_{aCterminala}=.....$$

30.2 Vidējā konstante pK_{vid}=pK_a=IEP **IZO ELEKTRISKAIS PUNKTS**

$$NpKa=44.....+2.....=.....$$

$$IEP=389,69 / 46 =.....$$

Isoelektriskā punkta pH=IEP vērtībā aminoskābes un olbaltumvielas kopējais lādiņš ir nulle „0” IEP=pH

0 — plus (+) — nulles lādiņš „0” mīnus lādiņš (-) — 14 pH skala

Pasvītro eksistējošu: pozitīvo (+) vai nulles lādiņu vai negatīvo (-)!

-COOH & -NH₃⁺ pozitīvs **-COO⁻ & -NH₂** negatīvs lādiņš **-COO⁻ & -NH₂**

30.3 AQP0 molekulas lādiņa zīmi (+). nulli „0” vai (-) fizioloģiskā pH=7.36

Pasvītro eksistējošu:

-COOH, -NH₃⁺ pozitīvs (+) pH = 7.36 < IEP = **8,52** negatīvs (-) **-COO⁻, -NH₂**.

30.4 AQP0 molekulas lādiņa zīmi (+). nulli „0” vai (-) **elektroforēzē pH 8.8**

Pasvītro eksistējošu:

-COOH, -NH₃⁺ pozitīvs (+) IEP = **8,52** < pH = **8,8** negatīvs (-) **-COO⁻, -NH₂**.

30.5 Aprēķina C=0.00000063=10^{-6.2} M AQP0 šķīduma pH *Ostvalda atšķaidīšanas likumā* logaritmam no C:

$$pH = \frac{pK_a - \log C}{2} = \frac{8,5228261 - \log 0.00000063}{2} = \frac{8,5228261 + 6,2}{2} = 14,723 / 2 =$$

Atraktora 7,36 AQP0 koncentrācija ir C=.....M .

Tālāk seko akvaporīna viens **AQP1** no eritrocītu šūnu membrānām pētījums!