

KoEnzīms vitamīns B<sub>3</sub> NAD<sup>+</sup>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<sup>-</sup>) no spirta uz NAD<sup>+</sup>? .....(2e<sup>-</sup>+H<sup>+</sup>)

3. Daļiņa ADH, kura pārnes divus reducējošos ekvivalentus (2e<sup>-</sup>) uz NAD<sup>+</sup>? H<sup>+</sup>(2e<sup>-</sup>+H<sup>+</sup>) **hidrīda jons**.....

4. Summāro Red-Ox reakciju studijas (endoerģiska vai eksoerģiska) ADH ar reducēto formu etanolu un oksidēto NAD<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>(2e<sup>-</sup>)=NADH ; -E°<sup>1</sup>=**0,4095 V** **absolūtais inversais** standarta potenciāls.

**4.2 Red** CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH+H<sub>2</sub>O=CH<sub>3</sub>HC=O+H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>(2e<sup>-</sup>); **absolūtais** standarta potenciāls E°<sup>2</sup>=**-0.0550 V**

**4.3** Pus reakciju summa: NAD<sup>+</sup> + CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH+H<sub>2</sub>O=>NADH + CH<sub>3</sub>HC=O + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>.....

**4.4** ΔE°=E°<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O+E°<sup>1</sup>=**-0.0550+0,4095=** ..... V, pus reakciju summas standarta potenciāls ΔE°.

**4.5** ΔG<sub>eq</sub>Standarta=ΔE°•F•n=**0,3545\*2\*96485/1000=**..... kJ/mol standarta brīvās enerģijas izmaiņa.

1 > K<sub>eq</sub>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<sup>-12</sup>**=.....

**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<sub>eqAerobic</sub>=10<sup>-12</sup> vērtība uzrāda stabilitāti līdzsvara maisījumā.

Endotermiska un endoerģiska etanola H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>OH oksidēšanās H<sub>3</sub>CCH=O

**4.7** Hesa brīvās enerģijas izmaiņa pozitīva ΔG<sub>Hess\_oxidation</sub>=.....kJ/mol, bet

**4.8** minimizējas ΔG<sub>min</sub>=ΔG<sub>eq</sub>=..... kJ/mol sasniedzot aerobo maisījumu līdzsvarā:

**4.9** Aeroba oksidēšana ar [NAD<sup>+</sup>]/[NADH]=10<sup>6</sup> homeostāzē pH=7,36 ir labvēlīga .

ΔG<sub>AerobiOx</sub>=**68,4**+8,3144\*298,15\*ln(1/10<sup>6</sup>\*1/1\*10<sup>(-7,36)</sup>/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<sub>Hess\_oxidation</sub>|=|.....| kJ/mol = |ΔG<sub>Hesa</sub>|=|.....| kJ/mol ar pretēju zīmi.

**Inversa** eksotermiska un eksoerģiska etanāla H<sub>3</sub>CCH=O reducēšana H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>OH

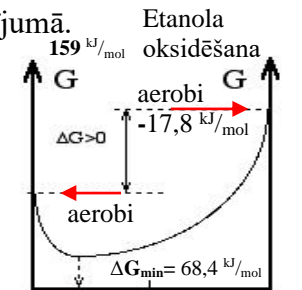
**4.10** hipoksijā anaeroba etanāla reducēšana ir **inversi** negatīva: ΔG<sub>Hesa</sub>=-.....kJ/mol, bet

**4.11** minimizējas par ΔG<sub>eq</sub>=ΔE°•F•n=-0,3545 V•2 mol•96485 C/mol=-.... kJ/mol.

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

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

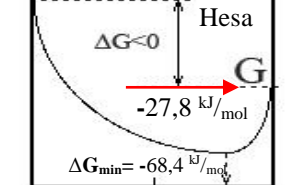
$$\Delta G_{AnaerobiRed} = -68,4 + 8,3144 \cdot 298,15 \cdot \ln(1/10 \cdot 1/10 \cdot 55,3457/10^{(-7,36)})/1000 = -\dots\dots \text{kJ/mol} ;$$



A+B+C50%D+E+F  
NAD<sup>+</sup>+H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>OH+H<sub>2</sub>O

NADH+H<sub>3</sub>CCHO+H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>

Reducēšana  
Anaerobi



D+E+F50%A+B+C

NADH+H<sub>3</sub>CCHO+H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>

NAD<sup>+</sup>+H<sub>3</sub>CCH<sub>2</sub>OH+H<sub>2</sub>O

## 5.0 Veikt ADHIV izoelektriskā punkta IEP=pH=pK<sub>a-vid</sub> analīzi fizioloģiskajā pH=7,36 vidē .

Noteikt ūdens šķīduma pH ar ADHIV koncentrāciju 10<sup>-7,05339</sup> M (mol/Litrā)

### Alkohola dehidrogenāze ADH E.1.1.1.1. oksidoreduktāze

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

MFAEIQIQDKDRMGTAGKVIKCKAAVLWEQKQPFSEIEIEVAPPKTKEVRIKILATGICRTDDHVIKGTMVSKFPVIVGH  
EATGIVESIGEGVTTVKPGDKVIPLFLPQCRCNACRNPDGNLCSIRSDITGRGVLDGTTTRFTCKGKPVHHFMNTSTFTE  
YTVVDESSVAKIDDAAPPEKVKCLIGCGFSTGYGAAVKTKGVKPGSTCVVFGGLGGVGLSVIMGCKSAGASRIIGIDLNKDK  
FEKAMAVGATECISPKDSTKPISEVLSEMTGNVGYTFEVIHLETMIDALASCHMNYGTSVVVGVPPSAKMLTYDPMLL  
FTGRTWKGCVFGLKSRDDVPLVTEFLAKKFDLDQLITHVLPFKKISEGFELLNSGQSIRTVLTF

AA	pK <sub>acoo</sub>	pK <sub>anH3+</sub>	pK <sub>RR</sub>	Nr	AA	pK <sub>acoo</sub>	pK <sub>anH3+</sub>	pK <sub>RR</sub>	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<sub>Rsānu grupa</sub>+pKa<sub>Ntermināls</sub>+pKa<sub>Ctermināls</sub> =

pK<sub>vid</sub>=(ΣpKa<sub>Rsānu grupa</sub>+pKa<sub>Ntermināls</sub>+pKa<sub>Ctermināls</sub>)/NpKa

IEP= pK<sub>vid</sub> =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  $\Sigma pK_{aRsānu\ grupā}$ , un  $pK_{aNterminālsNH_3}$  un  $pK_{aCterminālsCOO}$ -konstanšu summu izdalot ar skābes grupu skaitu molekulā  $NpK_a$ :

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

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  $\Sigma pK_{aRsānu\ grupā} + pK_{aNtermināls} + pK_{aCtermināls} = \dots$

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:

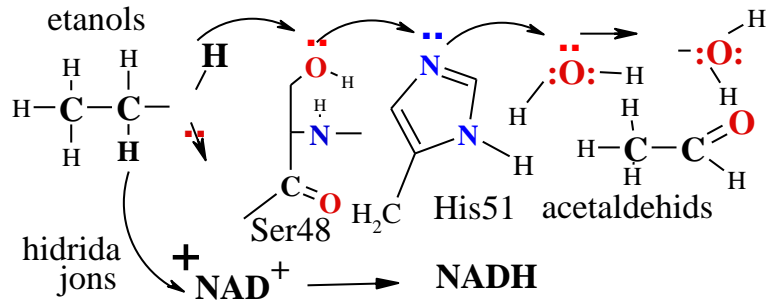
$$pH = \frac{pK_{a\ vid} - \log C}{2} = \frac{7,6666087 - \log 10^{-7,0533913}}{2} = \frac{7,6666087 + 7,0533913}{2} = 14,72 / 2 = \dots$$

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 pārlēcienos 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  $H_3O^+$ .

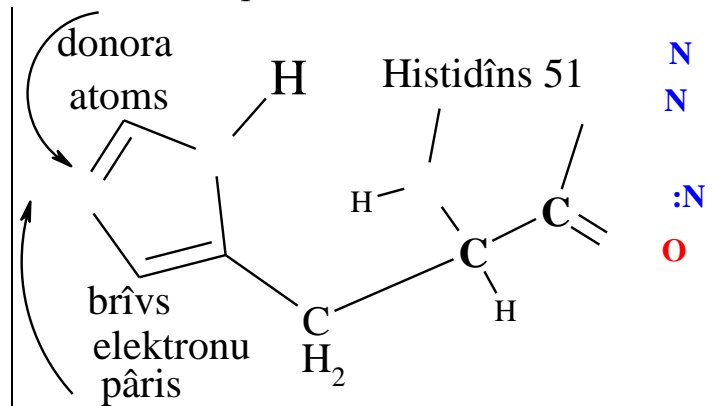
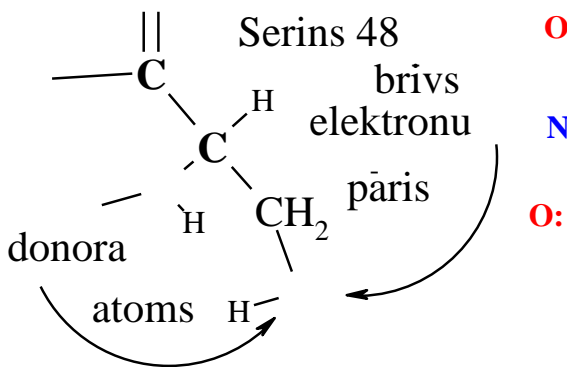
ADH spirta oksidēšanas laikā ūdens vidē,

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

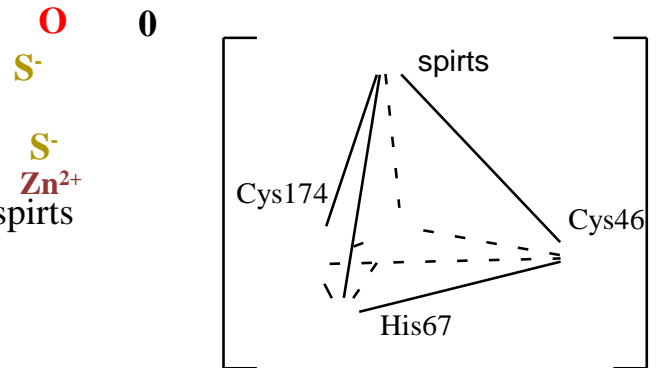
6. Ievietot **Ser-48, His-51** struktūrās **O, N** atomus un elektronu pārus donoru atomus **O:, :N?**



7. Ievietot **O, Zn<sup>2+</sup>, S, N** atomus un kompleksā  $[Zn^{2+}(S-Cys)_2(O-spirts)(NHis)]^0$  nulles lādiņu 0

tetragonālā ģeometrijā, trigonālā piramīdā!

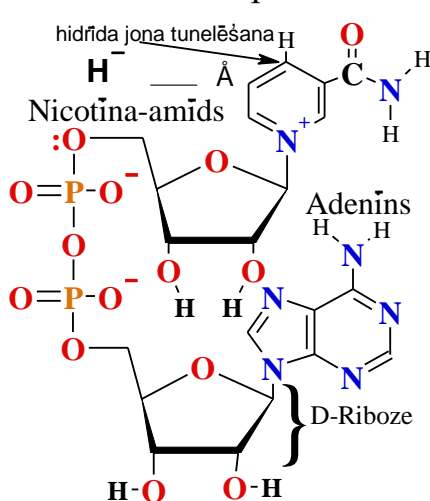
1HLD.pdb  $Zn^{2+}$  koordinē Cys46-Cys174-His67-**O** spirts



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

9. Oksidētā  $NAD^+$  hidrīda tunelēšana **nikotīna adenīna dinukleotīdā:**

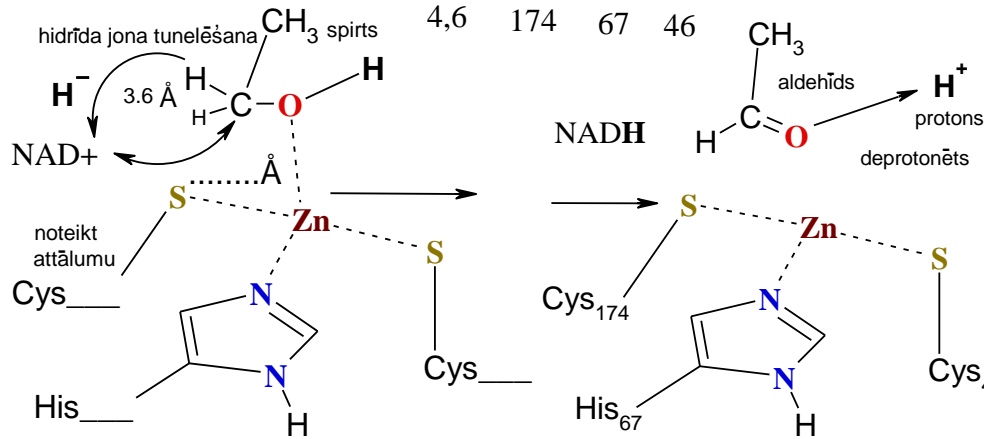
Nicotīna amīds oksidēts, adenīns, divas ribozes, divus fosfāti ar anhidrīda saiti starp fosfātiem



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



jonam  $H^-$  u  $NAD^+$  nikotīna amīda pozitīvi lādētā cikla oglekļa atomu  $-CH-$ .  
Nomērīt attālumu ..... Å no spirta  $-CH_2-$  oglekļa atoma līdz  $NAD^+$  aromātiskā gredzena  $-CH-$  1HLD.pdb molekulā.  
Ar peles labās pogas izvēlnes „Distance” izvēlnē

„Select Mouse Click Action” nomērīt attālumu no spirta oglekļa atomam  $-CH_2-$  ..... Å līdz  $NAD^+$  nikotīna cikliskā oglekļa atomam  $-CH-$ !

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

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 retinola .....nomācot 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  $H_3C-OH+NAD^+$  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	<b>Table 1:</b> Nomenclature for Human Alcohol Dehydrogenase <b>Abstract Background</b> 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 IHSO		ADH1A	.	ADH1	ADH1A	
Class I IDEH		ADH1B	.	ADH2	ADH1B	
Class I IHT0		ADH1C	.	ADH3	ADH1C	
Class II		ADH2	.	ADH4	ADH4	
Class III <sup>1MP0</sup>		ADH3	.	ADH5	ADH5	
Class IV <sup>1AGN</sup>		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;653:97-106.4DXHa

*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](#), [5VN1](#),,, 6