

MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE MIKROBIÁLNÍCH NAD(P) A Zn-DEPENDENTNÍCH ALKOHOLDEHYDROGENAS

ANNA KOTRBOVA-KOZAK, JIŘÍ SAJDOK
a PAVEL KOTRBA

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
pavel.kotrba@vscht.cz

Došlo 18.12.06, přijato 2.2.07.

Klíčová slova: alkoholdehydrogenasa, primární struktura,
katalytický mechanismus, katalytický Zn^{2+} , strukturní
 Zn^{2+} , vazba kofaktoru

Obsah

1. Úvod
2. Struktura a katalytický mechanismus alkoholdehydrogenasy (ADH) z koňských jater (HLADH) – model pro ADH skupiny I
 - 2.1. Binární komplex ADH z koňských jater (HLADH) s NAD(H)
 - 2.2. Katalytický mechanismus ADH
3. Mikrobiální ADH skupiny I
 - 3.1. Vzájemná identita aminokyselinových sekvencí a konzervované aminokyselinové zbytky
 - 3.2. Konzervované aminokyselinové zbytky a nábojová (protonová) štafeta
 - 3.3. Vazba katalytického Zn^{2+}
 - 3.4. Vazba strukturního Zn^{2+}
 - 3.5. Konzervované aminokyselinové zbytky a specifická vazba kofaktoru
 - 3.6. Vztah struktury ADH a substrátové specifity
4. Závěr

1. Úvod

Vzájemná přeměna primárních a sekundární alkoholů s normálním nebo větveným alifatickým řetězcem, cyklických sekundárních alkoholů, hemiacetalů a aromatických alkoholů na odpovídající aldehydy a ketony je jednou ze základních reakcí v prokaryotních a eukaryotních organismech. Oxidoreduktasy katalyzující tyto reakce mohou být z hlediska požadavku na kofaktor rozděleny do tří kategorií. Nejlépe charakterizovaná je první kategorie, nikotinamidnukleotid (NAD⁺)- nebo nikotinamidnukleotid fosfát (NADP⁺)-dependentní alkoholdehydrogenasy (ADH). ADH živočišného, rostlinného a mikrobiálního původu z této kategorie byly dále rozděleny na základě

strukturních a funkčních charakteristik do tří skupin¹: skupina I zahrnuje Zn^{2+} -dependentní ADH s polypeptidovým řetězcem dlouhým přibližně 350 aminokyselinových zbytků. Analýza dostupných genomových sekvencí poukázala na jejich obecnou přítomnost v mikroorganismech z nejrůznějších taxonomických skupin^{2,3}. Skupinu II tvoří ADH s polypeptidovým řetězcem dlouhým přibližně 250 aminokyselinových zbytků^{2–5}. Typickým zástupcem jsou ADH z *Drosophila* spp. (cit.⁶). Tyto ADH jsou obecně považovány za nezávislé na přítomnosti iontu kovu, avšak Niefind a spol.⁷ ukázali, že ADH z *Lactobacillus brevis* (LbRAdh) je aktivní pouze v případě, že obsahuje strukturní ion Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . Skupina III zahrnuje ADH aktivované bivalentními kationty kovů s polypeptidovým řetězcem dlouhým asi 385 aminokyselinových zbytků, nebo 900 u multifunkčních enzymů^{3,8}. Typickým zástupcem je ADH kódovaná genem *adhB* ze *Zymomonas mobilis*⁹. ADH řazené do druhé kategorie využívají jako kofaktory pyrrolochinolin chinon (PQQ), hem spolu s PQQ nebo kofaktor F₄₂₀ (cit.^{3,8,10}). Třetí kategorií jsou alkoholoxidasy, které jsou schopny katalyzovat pouze nevratnou oxidaci alkoholů podle rovnice $R-CH_2OH + O_2 \rightarrow RCHO + H_2O_2$. Tyto ADH využívají při katalýze flavinadenindinukleotid^{8,11,12}.

Podle Thomsona a spol.¹³ byla v počátku evoluce alkoholdehydrogenas (ADH) na Zemi ovlivněna dvěma hlavními faktory: *i*) (mikro)organismy schopnými v prostředí bohatém na sacharidy produkovat a tolerovat ethanol a vytvářet tak prostředí toxické pro ostatní organismy, *ii*) schopností těchto organismů využívat zdroj uhlíku a energie uložený ve formě ethanolu, což jim v konkurenčním prostředí přinášelo další fyziologickou výhodu. Tento evoluční tlak pak zřejmě nutil i další organismy vyvinout si vlastní ADH. Učebnicovým příkladem jsou octomilky *Drosophila* spp., které jsou již v larválním stádiu schopny díky ADH tolerovat vysoké koncentrace ethanolu v dietě¹⁴ a dospělci jsou ethanol schopni v případě nouze i využívat jako zdroj uhlíku a energie¹⁵.

ADH jsou u řady mikroorganismů často esenciální součástí katabolismu. Reduktasová aktivita umožňuje u anaerobních bakterií získat oxidovaný kofaktor pro další pokračování oxidoredukčních pochodů v energetickém metabolismu^{9,16,17}. Tento směr reakce je průmyslově významný nejen v potravinářství, ale i pro produkci rozpouštědel¹⁶, pro produkci průmyslového ethanolu jako náhrady fosilních paliv^{18–20} nebo jsou ADH využívány pro stereospecifickou biosyntézu chirálních alkoholů^{21–23}. Oxidace alkoholů na odpovídající aldehydy a ketony a vznik redukováného kofaktoru mohou být součástí vstupu alkoholů jako zdroje uhlíku a energie do centrálního metabolismu. Tato role ADH je u mikroorganismů běžná a vede např. k produkci kyseliny octové bakteriemi *Acetobacter* spp., je zásadní pro růst methylotrofních mikroorganismů^{24,25} nebo

oxidaci přirozených sloučenin a xenobiotik bakteriemi rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter* nebo *Rhodococcus*^{26–29}.

2. Struktura a katalytický mechanismus alkoholdehydrogenasy (ADH) z koňských jater (HLADH) – model pro ADH skupiny I

Skupina NAD(P), Zn-dependentních ADH zahrnuje enzymy vyskytující se ve formě homodimerů (především rostlinné a živočišné ADH) a homotetramerů (většina mikrobiálních ADH). Typickými zástupci jsou homodimerní ADH z koňských jater (HLADH) a homotetramer ScADHI ze *Saccharomyces cerevisiae*⁸. Ačkoliv pro ScADHI a její mutantní formy existuje velké množství biochemických dat, terciární a kvarterní struktura tohoto enzymu doposud nebyla krystalograficky uspokojivě vyřešena¹⁷. Oproti tomu pro HLADH jsou dostupné nejen enzymologické studie, ale velmi dobře experimentálně charakterizována je terciární a kvarterní struktura apoenzymu, holoenzymu a jejich různých mutantních forem. HLADH je tak v současnosti používána jako vzor pro ostatní ADH této skupiny. Proto je vhodné nejprve uvést zásadní poznatky získané pro tento enzym, které mají obecný význam pro pochopení průběhu vzniku komplexu enzym-kofaktor-substrát a mechanismu enzymové reakce.

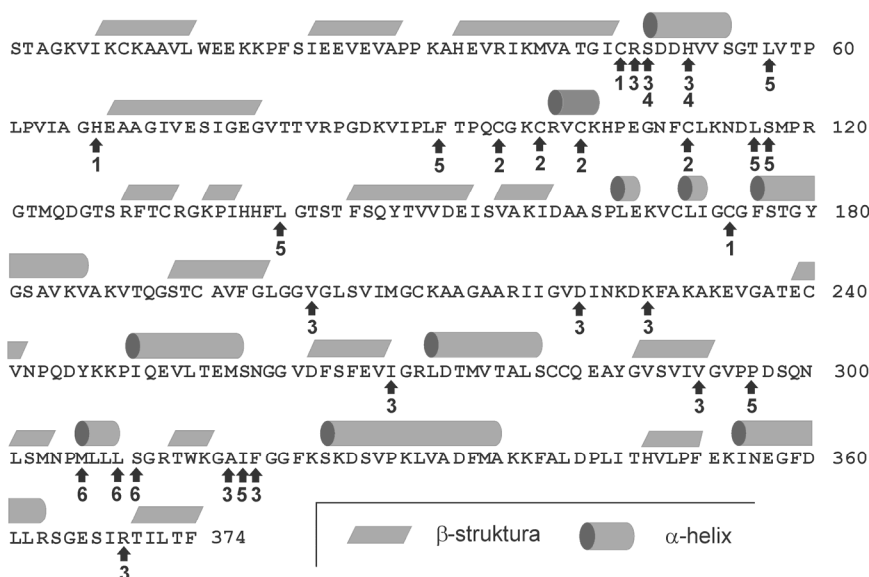
2.1. Binární komplex ADH z koňských jater (HLADH) s NAD(H)

HLADH je homodimer složený v nativní formě z podjednotek o 374 aminokyselinových zbytcích a mole-

kulové hmotnosti 40 kDa. Na obr. 1 je znázorněna aminokyselinová sekvence a sekundární struktury isoenzymu E, který byl používán v nativní nebo mutované formě ve většině biochemických a krystalografických studií. Každá podjednotka HLADH se sestává z katalytické a NAD⁺-vazebné domény, které jsou od sebe odděleny dlouhou štěrbinou. Ukazuje se, že tato konformace je společná všem terciárním strukturám NAD(P), Zn-ADH bez ohledu na kvarterní strukturu, tj. počet podjednotek v nativním enzymu. Stejně tak všechny NAD(P), Zn-ADH obsahují v každé podjednotce jeden katalyticky aktivní ion Zn²⁺. Podjednotky většiny ADH skupiny I včetně HLADH obsahují navíc jeden Zn²⁺ vázaný v zinkovém prstu, který stabilizuje strukturu enzymu.

Konformační změny doprovázející vznik binárního komplexu

Při vzniku komplexu HLADH-NAD dochází patrně nejprve k vazbě adenosinové části kofaktoru, která je následována navázáním jeho nikotinamidové části³⁰. NAD (H) je poté lokalizován podél štěrbinu mezi oběma doménami³¹. Tato vazba indukuje konformační změnu zahrnující přiblížení obou domén a reorganizaci smyčky mezi aminokyselinovými zbytky 293 až 298. To umožní přiblížení zbytků 46 až 60 katalytické domény do aktivního centra, přičemž některé atomy se přitom posunou až o 9 Å. Zároveň dochází k mírnému posunu NAD(H)-vazebné domény (o 1,5 Å) tak, aby se optimalizovala poloha aminokyselinových zbytků interagujících s koenzymem. Důsledkem těchto konformačních změn je zpevnění vazebných interakcí HLADH s koenzymem, zúžení štěrbinu mezi oběma doménami a vytvoření, pro katalýzu nezbytného, nevodného prostředí v aktivním místě. Postranní řetězce

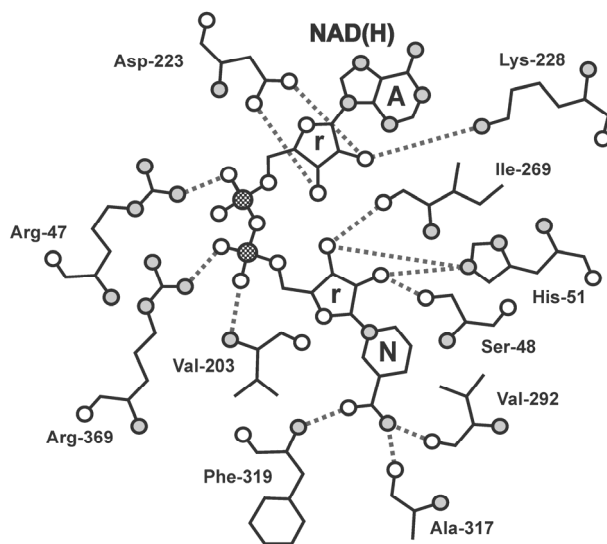


Obr. 1. Aminokyselinová sekvence alkoholdehydrogenasy z koňských jater (HLADH); vyznačeny jsou sekundární struktury a šipkami aminokyselinové zbytky účastníci se vazby katalytického (1) a strukturálního Zn²⁺ (2), vazby kofaktoru (3) transportu H⁺ (4) a výstavby hydrofobního válce aktivního místa (5 zbytky z jedné a 6 zbytky z druhé podjednotky dimeru)

těchto aminokyselin navíc vytváří jakýsi hydrofobní válec, do kterého je zasunut postranní řetězec substrátu. Válec je tvořen soustředěním postranních řetězců Leu-57, 116, 141, Ser-48, 117, Phe-93, Pro-296 a Ile-318 jedné podjednotky homodimeru a Met-306, Leu-309 a Ser-310 z druhé podjednotky (obr. 1). Dalšími reaktivními komponentami v asi 20 Å hluboké štěrbině aktivního místa jsou vedle NAD(H) a iontu Zn^{2+} tetraedrálně koordinované zbytky Cys-46, His-67 a Cys-174 a molekulou vody také postranní řetězce His-51 a Ser-48 účastníci se přenosu protonu (kap. 2.2.). HLADH je schopna oxidovat vedle ethanolu i vyšší, větvené i aromatické alkoholy, což je dáno dostačující velikostí štěrbinu aktivního místa. Není však schopna na rozdíl od S isoenzymu využívat jako substrátů steroidy. Důvodem rozdílné substrátové specifity jsou především mutace v oblasti smyčky mezi Phe-110 až Arg-120, jež je součástí hydrofobní štěrbinu. Delece hydrofilní Asp-115 a substituce objemného postranního řetězce Phe-110 za Leu (číslování zbytků je pro isoformu E) vede kromě patrné změny v hydrofobicitě aktivního místa a sterických nároků aminokyselinových zbytků (Phe110Leu) především k lokální reorganizaci této smyčky. Ta indukuje další konformační změny a zvětšení objemu štěrbinu aktivního místa z 250 Å³ pro isoenzym E na 500 Å³ u isoenzymu S (cit. ³²).

Aminokyselinové zbytky vážící NAD(H)

Jak je znázorněno na obr. 2, je vazba koenzymu zprostředkována vodíkovými můstky a iontovými interakcemi s O a N atomy postranních řetězců aminokyselin nebo peptidových vazeb Arg-47, Ser-48, His-51, Val-203, Asp-223, Lys-228, Val-292, Ile-269, Ala-317 a Phe-319 (cit. ³¹). Pro efektivní přenos hydridového ekvivalentu mezi alko-



Obr. 2. Vazba kofaktoru v alkoholdehydrogenase z koňských jater (HLADH); interakce aminokyselinových zbytků s NAD(H) je znázorněna přerušovanou čarou. Atomy O jsou vyznačeny bílými, N šedými a P bíločernými kroužky. A: adenin, N: nikotinamid, r: ribosa

holem a kofaktorem je významná van der Waalsovská interakce Val-203 a nikotinamidu. Krystalografické studie³³ ukázaly, že záměna Val203 za menší Ala má za následek další zúžení štěrbinu, avšak současně prodloužení vzdálenosti mezi reagujícími atomy C1 substrátu a C4 nikotinamidu kofaktoru o 0,8 Å. To vede ke zvýšení aktivační energie pro přenos vodíkového ekvivalentu³⁴ a tím k 50násobnému snížení katalytické účinnosti mutovaného enzymu Val203Ala oproti nemutovanému. Další zásah v okolí vazebného místa NAD(H), záměna Phe93Trp, sice vedl k přiblížení reagujících atomů o 0,4 Å, avšak interakce Trp s karboxamidovou skupinou nikotinamidu naopak nedovolovala plně uzavření štěrbinu aktivního místa a dvojnásobný mutant Val203Ala/Phe93Trp vykazoval v porovnání s nemutovaným enzymem 75násobné snížení katalytické účinnosti³⁵.

Závislost tvorby komplexu HLADH-NAD⁺ a HLADH-NADH na hodnotě pH byla popsána již v prvotních studiích tohoto enzymu³⁶. V obou případech klesá rychlostní konstanta asociace enzymu s kofaktorem při pH > 9. Z pohledu rovnovážných disociačních konstant komplexu se „afinita“ NAD⁺ k apoenzymu zvyšuje o více než jeden řád růstem pH v rozmezí hodnot 6 až 10: Rovnovážná disociační konstanta $K_{E,NAD}$ je při pH 7 rovna 0,15 mM a při pH 9 pak $K_{E,NAD}$ klesá na hodnotu 4 μM (cit. ³⁷). Oproti tomu afinita NADH na pH nezávisí ($K_{E,NADH} = 0,3 μM$) v rozmezí hodnot 6 až 8, avšak klesá o jeden řád při zvýšení pH na 10 ($K_{E,NADH} = 4 μM$). Bylo učiněno několik pokusů rozlišit, zda za závislost vazby obou forem kofaktorů na pH a uvažovanou kritickou roli ionizovatelné skupiny o pK_a 9,2 (cit. ³⁸) je zodpovědná (de)protonace zbytků His-51 nebo Lys-228 či disociace molekuly vody vázané v aktivním centru na Zn^{2+} (přehled uvádí Pettersson³⁹), avšak pro žádný z nich nebylo dosaženo plné shody s experimentálními daty a situace je patrně složitější.

LeBrun a Plapp⁴⁰ ukázali, že Lys-228 je ionizovatelnou skupinou kontrolující pK_a 9,2 a předpokládají, že interakce jeho $\epsilon-NH_3^+$ s pyrofosfátem NAD(H) může usnadňovat vznik binárního komplexu, ve kterém je však nakonec Lys-228 propojen vodíkovým můstkem s hydroxylem ribosy adenosinu (obr. 2). Při představě mnohonásobných kolizí apoenzymu a kofaktoru daných Brownovým pohybem (difuzní model) Adolph a spol.³⁰ předpokládají, že pro prvotní vazbu adenosinové části společně oběma kofaktorům, která je závislá na pH, je důležitý celkový náboj enzymu a poté obzvláště aktuální náboj aminokyselinových zbytků (patrně včetně Lys-223) vážících pyrofosfátovou část molekuly kofaktoru (obr. 2). V souladu s touto představou je i skutečnost, že rychlostní konstanta pro vazbu oxidované i redukované formy kofaktoru je vyšší pro isoenzym S, což je patrně dáno náhradou Glu-366 z isoenzymu E za Lys, jehož zbytek je pak orientován směrem k pyrofosfátu kofaktoru³².

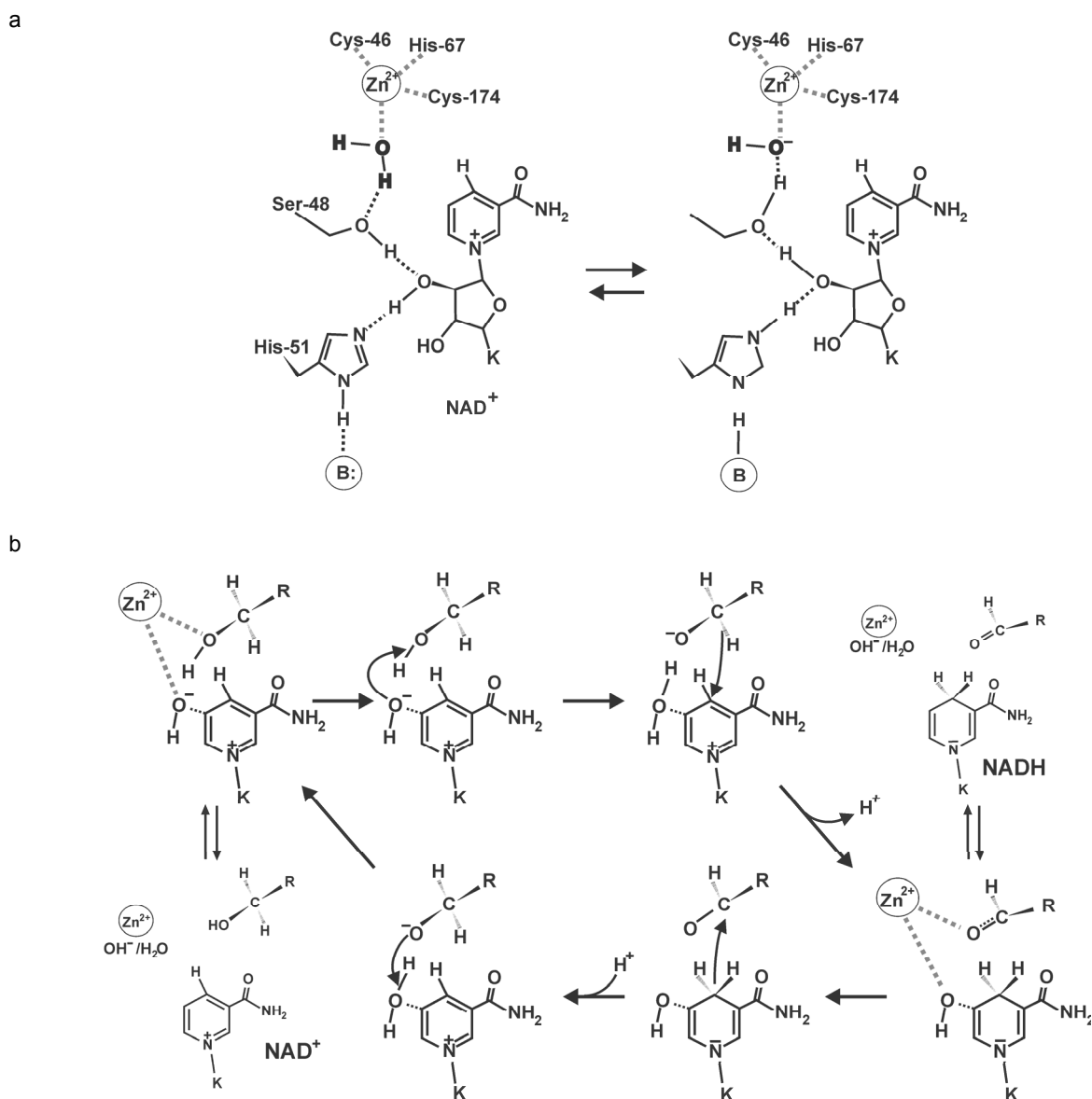
Rychlost vazby redukováného nikotinamidu NADH je již na pH nezávislá. Oproti tomu vazba kladně nabitě nikotinamidové části NAD⁺ je díky elektrostatické repulzi pomalá při nižších hodnotách pH a rychlejší při vyšším

pH, což je vysvětlováno její interakcí s hydroxylem vody vázaným na Zn^{2+} (kap. 2.2), který tímto neutralizuje kladný náboj nikotinamidu a tak při pH 10 snižuje $K_{E,NAD}$ na hodnotu shodnou s $K_{E,NADH}$.

2.2. Katalytický mechanismus

Prvním krokem při oxidaci alkoholu je vazba NAD^+ a následující konformační změna enzymu vede k posunu pK_a molekuly vody vázané na Zn^{2+} z hodnoty 9,6 na hodnotu 7,6 (při současném navázání alkoholu klesá pK_a vody až na hodnotu 4,5). Důsledkem snížení hodnoty pK_a vody

dochází k disociaci protonu, který však nemůže být vzhledem k hydrofobnímu prostředí uvolněn přímo do štěrbin aktivního místa a je prostřednictvím systému vodíkových vazeb mezi H_2O , hydroxylem zbytku Ser-48, 2' hydroxylem ribosy NAD^+ a imidazolem His-51 odveden na povrch enzymu (tzv. protonová štafeta; obr. 3a). Následně dochází k vazbě alkoholu na Zn^{2+} , který zajistí jeho stabilizaci, orientaci pro oxidační reakci a elektrofilní povaha iontu kovu usnadní přenos hydridového ekvivalentu (obr. 3b). Alkohol je vázán ve formě alkoholátu, uvolněný proton přijímá hydroxylová skupina a vzniká penta-koordinovaný komplex Zn^{2+} . Po přenosu hydridového



Obr. 3. Schematické znázornění části katalytického mechanismu alkoholdehydrogenasy z koňských jater (HLADH); a) Protonová štafeta. b) Reakční mechanismus přenosu vodíkového ekvivalentu (podle cit.⁴²)

ekvivalentu na C4 nikotinamidové části kofaktoru dochází k oddisociování vzniklého aldehydu nebo ketonu a poté k uvolnění NADH (cit.³⁹). Vzhledem k tomu, že volná aktivní energie pro uvolnění NADH (17 kcal mol^{-1}) je o 5 kcal mol^{-1} vyšší než pro vznik komplexu HLADH-NAD⁺ (cit.⁴¹), je tento poslední krok považován za řídicí děj reakce. V opačném směru reakce patrně nezáleží na pořadí vazby NADH a aldehydu (ketonu) v aktivním místě, ale při uvolňování produktů je disociace NAD⁺ posledním krokem. ADH vykazují při přenosu hydridového ekvivalentu na NAD⁺ stereospecifitu a lze je tak rozdělit do dvou tříd: ADH třídy A přenášející hydridový ekvivalent do *pro-R* polohy nikotinamidové části kofaktoru a ADH třídy B přenášející hydridový ekvivalent do *pro-S* polohy. Rozdíl je dán opačnou konformací nikotinamidu vázaného na apoenzym, která je způsobena jeho 180° rotací okolo glykosidové vazby s ribosou. HLADH patří do třídy A.

Krystalografická studie komplexu HLADH-NADH s rozlišením na atomární úrovni (1 Å) potvrdila platnost tohoto modelu a poskytla významnou informaci o roli molekuly vody v aktivním centru při aktivaci redukovaného nikotinamidu pro přenos hydridového ekvivalentu⁴². Ukazuje se, že hydroxylový anion je prostřednictvím zbytku Ser-48 přesunut směrem k C6 nikotinamidu a vznik NADH-OH⁻ aduktu vede k distorzi heterocyklu a redistribuci elektrického náboje na nikotinamidu nebo jeho redukované formě. Tímto způsobem může být usnadněn přenos hydridového ekvivalentu. Navíc je pravděpodobné, že tento adukt vzniká již v binárním komplexu HLADH-NAD(H) a k disociaci molekuly vody patrně není třeba snížení pK_a na 4,5 uváděné jako důsledek vazby alkoholu v aktivním centru.

3. Mikrobiální ADH skupiny I

3.1. Vzájemná identita aminokyselinových sekvencí a konzervované aminokyselinové zbytky

V současné době je dostupná celá řada primárních struktur mikrobiálních NAD(P), Zn-ADH a pro některé byla vyřešena i krystalová struktura. To umožňuje porovnání jednotlivých ADH s ohledem na předpokládaný reakční mechanismus, požadavek na kofaktor a případně i substrátovou specifitu a kvarterní strukturu. S rostoucím množstvím sekvenčních projektů lze navíc předpovědět aminokyselinovou sekvenci dalších potenciálních ADH této skupiny^{2,3}. V následujícím textu však budou diskutovány pouze vybrané mikrobiální ADH, které byly charakterizovány i biochemicky. V tabulce I jsou uvedena označení používaná pro jednotlivé ADH, jejich požadavek na kofaktor a identifikátory (přístupová čísla) v databázi Swiss-Prot, kde lze nalézt kompletní primární strukturu a další odkazy na zdroje informací o charakteristických vlastnostech dané ADH.

Rozsah identity aminokyselinových sekvencí mikrobiálních ADH (tabulka II) je obecně vyšší než při srovnání

s HLADH, která dosahuje nejvyšší identity s EcAdhC (45 %) a GsAdhT (30 %). S výjimkou EnADHII, ScADHVI a ScADHVII lze vysokou identitu převyšující 50 % pozorovat mezi ADH kvasinek a plísní a zejména pak mezi isoenzymy. Mezi bakteriálními ADH je identita menší a vysoký stupeň vzájemné identity vykazují ZmAdhA a EcAdhP (79% identita), PaAdhA a SmAdhA (66% identita) a CbAdh a TbAdh (75% identita). Posledně jmenované však, podobně jako ReAdh, RerAdh, EcAdhC, PpCamD a PpXylB vykazují poměrně nízkou identitu s ostatními mikrobiálními ADH. Aminokyselinové sekvence archaebakteriálních ApAdh a SsAdh jsou identické z 39 % a vykazují poměrně výraznou identitu pohybující se mezi 25 až 35 % i s řadou ostatních mikrobiálních ADH.

Sun a Plapp⁴³ při porovnání sekvencí živočišných ADH skupiny I našli pouze 9 konzervovaných aminokyselinových zbytků, přičemž žádný z nich se neúčastní katalýzy, ale všechny hrají strukturální roli a jsou vysoce konzervovány i v mikrobiálních ADH. Jedná se o Gly-66, 71, 77, 192, 201, 204, 236, 320 a Val-81 v sekvenci HLADH (pokud nebude uvedeno jinak, odpovídá v dalším textu číslování pozic aminokyselinových zbytků všech ADH zbytkům HLADH, jak je uvedeno v porovnání primárních struktur na obr. 4).

V mikrobiálních ADH lze navíc identifikovat další 4 přísně konzervované zbytky odpovídajících Cys-46, Asp-49, His-67 a Glu-68 (obr. 4). Tyto zbytky plní jak katalytickou, tak strukturální úlohu a jejich konzervovanost ukazuje na větší evoluční příbuznost mezi mikrobiálními ADH. Pravděpodobně nejkonzervovanějším sekvenčním motivem je sekvence Gly-His-Glu-X₂-Gly-X₅-Gly-X₂-Val mezi pozicemi 66 až 80, která obsahuje jeden z ligandů katalytického Zn²⁺ odpovídající His-67 HLADH (X značí jakoukoliv aminokyselinu). Výjimku tvoří ApAdh se substitucí Gly77Ala a EnADHII, ScADHVI a VII se substitucemi Val80Ala, Val80Ser a Val80Cys v uvedeném pořadí. Ve většině porovnaných mikrobiálních ADH je vysoce konzervována i sekvence Cys-His-(Thr nebo Ser)-Asp-X-His zbytků 46 až 51. Tuto konsezní sekvenci však díky záměně v pozici 47 neobsahují CbAdh a TbAdh s Thr-47 a ReAdh, PpCamD, ScADHVI, ScADHVII a EcTHD s Gly-47. Katalyticky významný His-51 je nahrazen Phe u EcAdhC, RerAdh, Gly u EnAdhII a Val u PpXylB.

Kromě aminokyselinových zbytků diskutovaných v následujících kapitolách jsou v porovnávaných mikrobiálních ADH vysoce konzervovány také Asp-87, Gly-199 a Ala-211.

3.2. Konzervované aminokyselinové zbytky a nábojová (protonová) štafeta

Záměna Ser-48 za Thr-48 nepředstavuje z hlediska funkce protonové štafety významný zásah do výše popsaného mechanismu katalýzy. Rozdílná velikost obou zbytků však může mít při dané velikosti štěrbině aktivního místa význam s ohledem na substrátovou specifitu enzymu. Cre-

Tabulka I
Vybrané mikrobiální NAD(P), Zn-dependentní alkoholdehydrogenasy

Označení	Organismus	Kofaktor	Swiss-Prot ^a
AfADHI	<i>Aspergillus flavus</i>	NAD(H)	P47147
ApAdh	<i>Aeropyrum pernix</i>	NAD(H)	Q9Y9P9
CaADHI	<i>Candida albicans</i>	NAD(H)	P43067
CbAdh	<i>Clostridium beijerinckii</i>	NADP(H)	P25984
EcAdhC	<i>Escherichia coli</i>	NAD(H)	P25437
EcAdhP	<i>E. coli</i>	NAD(H)	P39451
EcTHD	<i>E. coli</i>	NAD(H)	P07913
EnADHI	<i>Emericella nidulans</i>	NAD(H)	P08843
EnADHII	<i>E. nidulans</i>	NAD(H)	P54202
EnADHIII	<i>E. nidulans</i>	NAD(H)	P07754
GsAdhHT	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	NAD(H)	P42328
KIADHI	<i>Kluyveromyces lactis</i>	NAD(H)	P20369
KIADHII	<i>K. lactis</i>	NAD(H)	P49383
KIADHIII	<i>K. lactis</i>	NAD(H), NADP(H)	P49384
KIADHIV	<i>K. lactis</i>	NAD(H), NADP(H)	P49385
KmADHI	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	NAD(H)	Q07288
KmADHII	<i>K. marxianus</i>	NAD(H)	Q9P4C2
PaAdhA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NAD(H)	Q9HTD9
PpCamD	<i>Pseudomonas putida</i>	NAD(H)	P09347
PpXylB	<i>P. putida</i>	NAD(H)	P39849
PsADHI	<i>Pichia striptidis</i>	NAD(H)	O00097
PsADHII	<i>P. striptidis</i>	NAD(H)	O13309
ReAdh	<i>Ralstonia eutropha</i>	NAD(H)	P14940
RerAdh	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	NAD(H)	Q6YBW1
ScADHI	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NAD(H)	P00330
ScADHII	<i>S. cerevisiae</i>	NAD(H)	P00331
ScADHIII	<i>S. cerevisiae</i>	NAD(H)	P07246
ScADHVI	<i>S. cerevisiae</i>	NADP(H)	Q04894
ScADHVII	<i>S. cerevisiae</i>	NADP(H)	P25377
SmAdhA	<i>Shinorhizobium melioli</i>	NAD(H)	O31186
SpADHI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NAD(H)	P00332
SsADH	<i>Sulfobolus solfataricus</i>	NAD(H)	P39462
TbAdh	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	NADP(H)	P14941
ZmAdhA	<i>Zymomonas mobilis</i>	NAD(H)	P20368

^a Přístupové číslo v databázi Swiss-Prot (www.expasy.ch/sprot/)

aser a spol.⁴⁴ připravili mutantní ScADHI, v níž záměna Thr-48 za Ser-48 umožnila enzymu oxidovat i objemnější alkoholy. Ačkoliv byly vyřešeny krystalové struktury dvou enzymů s Thr-48, GsAdhHT (cit.⁴⁵) a PaAdhA (cit.⁴⁶), autoři se analýze aspektu substrátové specifity nevěnovali. Nicméně tyto studie potvrdily, že poloha postranního řetězce Thr odpovídá jeho účasti na přenosu protonu.

Z hlediska vazby kofaktoru (obr. 2) a především mechanismu funkce protonové štafety (obr. 3a) jsou zásadnější záměny v pozici His-51 za Phe v EcAdhC, RerAdh, Gly v EnADHII a EcTHD a za Val v PpXylB. Záměnu His-51 za Val, Ser, Tyr a Lys lze nalézt i u některých homologických živočišných a rostlinných ADH (cit.^{43,47}), přičemž katalytická účinnost pro oxidaci ethanolu je u variant

Tabulka II

Vzájemná identita (v %) mezi primárními strukturami mikrobiálních NAD(P), Zn-dependentních alkoholdehydrogenas^a

	HLADH	EcAdhC	CbAdh	TbAdh	ReAdh	RerAdh	EnADHII	PaAdhA	SmAdhA	GsAdhHT	EcAdhP	ZmAdhA	SpADHI	PsADHI	PsADHII	CaADHI	ScADHI	ScADHII	KmADHII	KLADHI	KLADHII	KmADHI	KLADHIV	ScADHIII	KLADHIII	AfADHI	EnADHIII	EnADHI	ScADHVI	ScADHVII	PpCamD	PpXylB	ApAdh	SsADH	EcTHD		
HLADH	*	45	19	26	21	19	12	24	22	30	23	24	19	23	20	21	23	22	21	23	24	25	23	22	22	17	20	22	15	16	21	31	20	24	26		
EcAdhC		*	20	23	24	20	17	29	25	28	25	25	23	26	25	26	25	25	23	25	24	24	25	24	22	26	24	24	11	13	24	30	19	25	26		
CbAdh			*	75	35	15	11	16	18	17	16	16	14	14	15	15	14	13	13	12	14	13	14	14	17	16	15	16	11	16	14	17	20	18	19		
TbAdh				*	35	16	11	19	18	20	20	16	17	16	16	14	16	12	14	11	15	11	15	13	14	14	13	15	17	15	19	17	19	18	19		
ReAdh					*	21	17	24	24	19	20	22	17	19	16	17	16	19	13	15	13	14	16	17	14	16	17	18	17	16	25	18	22	20	24		
RerAdh						*	25	30	31	29	28	27	24	24	27	24	23	25	23	24	25	26	23	22	22	24	22	23	18	16	21	18	33	21	23		
EnADHII							*	34	40	38	33	33	43	41	41	42	40	40	42	41	40	39	41	40	40	38	39	38	26	25	16	16	25	26	24		
PaAdhA								*	66	61	43	42	44	42	43	43	42	43	42	42	42	43	42	40	41	42	45	44	26	28	25	30	35	30	29		
SmAdhA									*	56	42	40	43	42	41	42	39	40	41	41	41	40	39	39	40	42	43	45	26	27	19	25	33	33	25		
GsAdhHT										*	52	53	44	42	41	44	41	42	40	41	41	42	41	41	41	41	40	43	42	32	29	23	28	36	33	27	
EcAdhP											*	79	36	34	34	36	35	37	34	35	35	35	34	34	35	35	36	33	25	25	22	23	27	31	24		
ZmAdhA												*	35	36	37	36	35	36	35	35	35	36	36	35	35	35	35	31	24	25	23	21	27	32	21		
SpADHI													*	51	52	52	52	52	51	49	49	50	48	48	49	53	54	49	23	24	16	20	27	26	19		
PsADHI														*	80	78	71	71	74	72	72	71	72	72	75	62	58	59	24	22	22	20	25	31	18		
PsADHII															*	76	74	75	76	74	76	74	76	74	77	61	59	58	21	21	18	19	29	30	17		
CaADHI																*	73	73	75	74	71	70	74	74	74	60	59	58	23	23	20	20	25	29	18		
ScADHI																	*	93	85	85	81	79	79	79	80	56	55	54	23	21	17	19	27	29	19		
ScADHII																		*	84	83	80	79	78	78	80	57	56	55	24	20	17	19	26	29	18		
KmADHII																			*	86	83	81	79	78	80	57	56	56	22	22	17	18	24	30	17		
KLADHI																				*	89	85	78	81	83	57	56	56	22	22	17	18	28	30	17		
KLADHII																					*	86	77	78	82	55	55	54	22	21	16	18	29	29	16		
KmADHI																						*	77	77	79	57	56	56	23	22	17	20	28	29	17		
KLADHIV																							*	82	82	57	59	57	23	21	15	20	28	30	17		
ScADHIII																								*	82	56	56	54	23	20	16	20	24	29	18		
KLADHIII																									*	59	56	55	22	20	17	20	30	29	17		
AfADHI																									*	83	81	23	23	17	19	26	29	21			
EnADHIII																										*	78	25	23	18	17	23	26	21			
EnADHI																										*	26	24	18	21	26	29	20				
ScADHVI																										*	63	15	15	21	20	20					
ScADHVII																											*	19	14	23	19	22					
PpCamD																											*	23	17	23	22						
PpXylB																												*	26	22	24						
ApAdh																												*	39	19							
SsADH																												*	20								
EcTHD																													*								

^a Porovnání bylo provedeno s použitím programu Clustal W v. 1.83 (matrice blosum 30; Gap open penalty = 5; Gap extension penalty = 0,2) na serveru ebi.ac.uk

polymorfni lidské π ADH obsahující His-51, Ser-51 a nebo Tyr-51 takřka shodná⁴⁸. Je zajímavé, že v žádné z porovnávaných ADH není His-51 zaměněn za Gln. Cílelná mutagenese tohoto zbytku za isosterický Gln totiž naznačila, že i když došlo k 11násobnému snížení katalytické účinnosti mutanta His51Gln, karboxyamidová skupina může v protonové štafetě imidazolium nahradit⁴⁹. Oproti tomu Ser-51 stejně jako Lys-51 jsou teoreticky schopny nepřímé vazby s ribosou kofaktoru prostřednictvím molekuly vody, avšak v nevodném prostředí aktivního místa je tento způsob vazby nepravděpodobný, stejně jako participace obou zbytků na přenosu protonu⁵⁰. Tyr-51 je, podobně jako His-51, potenciálně schopen přímo tvořit vodíkové vazby s 2' kyslíkem ribosy, ale Davis a spol.⁴⁸ ukázali, že jeho postranní řetězec se neúčastní na přenosu vodíkového iontu. Je zřejmé, že Val, Phe a Gly nejsou schopny s ohledem na nepolární nebo chybějící postranní řetězec bezprostředně interagovat s pyrofosfátem NAD(P)H ani

vytvářet vodíkové vazby pro přenos protonu z molekuly vody. Inoue a spol.⁴⁷ ukázali, že přenosu vodíkového iontu u PpXylB s Val-51 se s největší pravděpodobností účastní imidazolová skupina His-47. Záměna His-47 za isosterický Gln totiž vedla k 125násobnému snížení katalytické účinnosti při oxidaci benzaldehydu a 400násobnému snížení účinnosti v opačném směru reakce. Další záměna, Val51His, vedoucí k dvojnásobnému mutantu His47Gln/Val51His, měla v porovnání s His47Gln mutantem za následek 12násobné zvýšení katalytické účinnosti při oxidaci a 26násobné zvýšení při redukci substrátů, což ukázalo na pouze částečné obnovení funkce protonové štafety. V navrženém reakčním mechanismu vycházejícím z experimentálních dat a počítačového modelu PpXylB, His-47 neinteraguje s pyrofosfátem kofaktoru, jak by odpovídalo analogickému Arg-47 u HLADH (obr. 2), ale je propojen vodíkovým můstkem s kyslíkem 2' hydroxyly ribosy (podobně jako His-51 u HLADH a nahrazuje jej i v tomto ohledu). Lze

spekulovat o tom, že obdobný mechanismus by mohl být řešením i pro protonovou štafetu EnADHIII, EcAdhC a RerAdh a pro odpovídající rostlinné a živočišné ADH.

3.3. Vazba katalytického Zn^{2+}

Dva z ligandů katalytického iontu Zn^{2+} , Cys-46 a His-67, jsou konzervovány ve všech porovnávaných mikrobiálních ADH (obr. 4). V pozici třetího ligandu, Cys-174, je Asp u CbAdh, TbAdh, ReAdh, Pro u ApAdh, ScADHVI, ScADHVII, Ala u PpCamD a Asn u EcTHD. Krystalové struktury určené pro CbAdh, TbAdh a ApAdh umožnily identifikovat jako třetí ligand Zn^{2+} v CbAdh a TbAdh kyslíkový atom karboxylu Asp-174 (cit.⁵¹) a v ApADH Asp-177 (cit.⁵²).

Vysoce konzervovaný Glu-68 byl v případě EcAdhP, SsAdh, CbAdh a TbAdh identifikován jako možný čtvrtý ligand Zn^{2+} , který tak vytěšňuje z vazby molekulu vody (cit.^{51,53,54}). Pro většinu NAD(P), Zn-dependenčních ADH, jejichž struktury byly vyřešeny, nejsou vysoce konzervované zbytky Glu-68 a Asp-49 považovány za přímé ligandy Zn^{2+} , ale za součást jeho druhé koordinační sféry. V případě HLADH vytváří Asp-49 vodíkový můstek s imidazolem His-67 (obr. 3a), jeden kyslík karboxylu

Glu-68 interaguje s guanidiniem Arg-369 (obr. 2) a druhý je pak lokalizován v blízkosti iontu Zn^{2+} . Postranní řetězce Asp-49 a Glu-68 zřejmě stabilizují kov v aktivním místě a prostřednictvím polarizačního efektu zvyšují elektrofilitu Zn^{2+} , čímž usnadňují přenos vodíkového ekvivalentu. Vysoce konzervovaná Glu-68 je nezbytná např. pro katalýzu u ScADHI a její záměna za Gln vedla ke ztrátě aktivity enzymu⁵⁵. Ačkoli počítačová simulace naznačila, že Glu-68 může dočasně Zn^{2+} koordinovat a usnadňovat tak výměnu substrátů a vody v průběhu katalýzy⁵⁶, výše zmíněná krystalografická studie HLADH s rozlišením na atomární úrovni⁴² se tomuto aspektu nevěnovala a z prezentované struktury nelze Glu-68 takovou roli připsat.

Možnost participace Glu-68 na přímé koordinaci Zn^{2+} v CbAdh a TbAdh zdůvoňovali Korkhin a spol.⁵¹ skutečností, že na rozdíl od silné interakce Glu-68 s Arg-369, která může být potenciálně ekvivalentní dvěma vodíkovým můstkům, je Arg-369 v CbAdh a TbAdh nahrazen Lys. S jeho ϵ -NH₂ skupinou vytváří vodíkový můstek pouze jeden z kyslíků karboxylu Glu-68 a druhý pak koordinuje Zn^{2+} . Nicméně stejná tetraedrální koordinace byla identifikována i v případě apoforem SsAdh a EcAdhP s Arg-369 (cit.^{53,54,57}). Po vazbě kofaktoru však v binárních komplexech došlo jak u SsAdh, tak TbAdh vlivem konfor-

část 1.

		* * * *		**	
HLADH	42	ATGICRSDDHVVVSG	-----	TLVTPLPVIA	GHEAAGIVVESIGEGVT--TVRPGDKV- 89
EcAdhC	36	HTGVCHTDAFTLISGDD	-----	PEGVFPVVLGHEGAGVVVEVGEVVT	--SVKPGDHVI 85
CbAdh	33	AVSPCTSDIHTV	-----	FEGALGDRKNMILGHEAVGVEVVEVGEVVK	--DFKPGDRVI 82
TbAdh	33	AVAPCTSDIHTV	-----	FEGAIGERHNMILGHEAVGVEVVEVGEVVK	--DFKPGDRVI 82
ReAdh	33	TTTICGTDVH-I	-----	LKGEYPAKGLTVGHEPVGIIIEKLGSAVT	--GYRFGQRVI 81
RerADH	34	AAGVCHSDDFIMS	-----	LPEQYTYGLPLTLGHEGACKVAAVGEGVEGLDIGNVNVVY	86
EnADHII	44	HSGVCHSDDFGIMTNTW	----	KILFPPTQPGVGGHEGVGVKVKLGAGAEASGLKIGDRVG	99
PaAdhA	40	ASGVCHTDLHAAEGDW	-----	PVKPPLPFIIPGHEGVGVVAAVGSGVVT	--RVKGGDRVG 90
SmAdhA	36	ATGVCHTDLHAAKGDW	-----	PVRPNPFFIPGHEGVGVVAKLGAEVIT	--RLKGGDRVG 86
GsAdhHT	34	ACGVCHTDLHAAHGDW	-----	PVKPKLPLIPGHEGVGVIVEVGGVVT	--HLKVGDRVG 84
EcAdhP	33	CCGVCHTDLHVKNDF	-----	GDKTGVILGHEGIGVVAEVGGVVT	--SLKGGDRAS 81
ZmAdhA	33	YCGVCHTDLHVKNDF	-----	GDETGRITGHEGIGIVKQVGGVVT	--SLKVGDRAS 81
SpADHI	42	YTGvCHTDLHALQGDW	-----	PLPAKMPLIGGHEGAGVVVKVAGVTR	--LKTGDRVG 92
PsADHI	40	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGVVVGIGSNVT	--GWEIGDYAG 90
PsADHII	40	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGVVVALGENVT	--GWEIGDYAG 90
CaADHI	42	YSGVCHTDLHARKGDW	-----	PLATKLPVGGHEGAGVVVMGGENVK	--GWKIGDFAG 92
ScADHI	40	YSGVCHTDLHAWHGDW	-----	PLPVKLPVGGHEGAGVVVMGGENVK	--GWKIGDYAG 90
ScADHII	40	YSGVCHTDLHAWHGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVVMGGENVK	--GWKIGDYAG 90
KLADHI	42	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVVMGGENVK	--GWKIGDFAG 92
KLADHII	40	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVVMGGENVK	--GWNIGDFAG 90
KLADHIV	43	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPVKLPVGGHEGAGIVVAKGENVK	--NFEIGDYAG 93
KmADHI	40	YSGVCHTDLHAWQGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGIVVAMGENVT	--GWEIGDYAG 90
KmADHII	39	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLDTKLPVGGHEGAGVVVMGDNVK	--GWKIGDLAG 89
ScADHIII	43	YSGVCHTDLHAWHGDW	-----	PLPVKLPVGGHEGAGVVVKLGSNVK	--GWKIGDLAG 93
KLADHIII	42	YSGVCHTDLHAWKGDW	-----	PLPTKLPVGGHEGAGVVVMGGENVK	--GWNIGDFAG 92
EnADHI	40	YSGVCHTDLHAMMHW	-----	PIPVKMPLVGGHEGAGIVVAKGELV	--HEFEIGDQAG 90
EnADHIII	40	YSGVCHTDLHAMKGDW	-----	PLPSKMPLIGGHEGAGVVVAKGELVKDEDKIGDRAG	92
AfADHI	40	YSGVCHTDLHALKGDW	-----	PLPVKMPLVGGHEGAGVVVARGDLVT	--EFEIGDHAG 90
PpCamD	36	LGGVCGSDVHIVSGE	-----	AGAMPFPIILGHEGIGRIEKLGTGVTTDYAGVPVQOG	87
ApAdh	50	GAGVCHTDLHLVQGMW	----	HELLQKLPYTLGHENVGYIEEVAEGVE	--GLEKGDVPI 10:
SsAdh	36	--GVCHSDVHMRQGRFNLRIVEDLGVKLPVTLGHEIACKIEEVGDEVV	----	--GYSKGDVLA 91	
ScADHVI	42	ACGVCGSDIHCAAHGW	-----	GNMKMPLVGGHEIIVGVKVKLGPKN	--SGLKVGDRVG 92
ScADHVII	42	ACGICGSDFIHIAVGNW	-----	GPVPEVQILGHEIIGRVVVKVGSKCH	--TGKIGDRVG 92
EcTHD	34	KTAICGTDVHIYNWDE	-----	WSQKTIIPVPMVGGHEVYVGEVVGIGQEVK	--GFKIGDRVS 86
PpXylB	36	ATGLCHTDLVCRD	-----	QHYPVPLPMVFGHEGAGVVVERVGSAAV	--KVQPGDHV- 83

Obr. 4. Porovnání vybraných úseků aminokyselinových sekvencí mikrobiálních NAD(P), Zn-dependenčních alkoholdehydrogenas; diskutované aminokyselinové zbytky jsou označeny hvězdičkou. Označení jednotlivých ADH je stejné jako v tabulce I a čísla indikují pozici prvního nebo posledního zbytku v uváděné části jejich sekvencí. Aminokyselinové zbytky konzervované alespoň ve 30 ADH jsou v rámečcích. Pomlčky upravují polohy homologních úseků, část 1.

část 2.

HLADH	91	PLFTPCGGKCRVCKHPEGNFLKND	170	CLIGCGFSITGYG	HLADH
EcAdhC	86	PLYTAEQGECEFCRSGKTNLCVAVR	165	CLLGCQVTTGIG	EcAdhC
CbAdh	84	-----PCTTPDWRSLVQAGFQQHS	146	VMITDMMTSGFH	CbAdh
TbAdh	84	-----PAITPDWRTSEVQRGYHQHS	146	VMIPDMMTGTFH	TbAdh
ReAdh	83	-----GAICPNFNYSYAAQDGVASQD	159	LMCPDIMSITGFK	ReAdh
RerADH	88	PWCGCNWHCSQGLNYSRAQELG	-----	-----	RerADH
EnADHII	101	KWISSACGQPPQODGADGLCFNOK	159	APLLCAGVTVYA	EnADHII
PaAdhA	92	PWLYTACGCCHECLTGWETLCESEQ	150	APILCAGVTVYK	PaAdhA
SmAdhA	88	PWLHTACGCCTPRTGWETLCSQQ	146	APVLCAGVTVYK	SmAdhA
GsAdhHT	86	PWLYSACGHCDYCLSGQETLCEHOK	144	APIFCAGVTVYK	GsAdhHT
EcAdhP	83	AWFYEGCGHCEYCNNGNETLCSRVK	141	SSITCAGVTVYK	EcAdhP
ZmAdhA	83	AWFFKGGHCEYCVSGNETLCSRVE	141	SSITCAGVTVYK	ZmAdhA
SpADHI	94	KWNSSCGNCEYCMKAETTCPHIQ	152	APIMCAGITCYR	SpADHI
PsADHI	92	KWLNGSCLNCEFCQHSDEPNCAKAD	150	APILCAGITVYK	PsADHI
PsADHII	92	KWLINGSCLQCEYCVTAHESNCPDAD	150	APILCAGITVYK	PsADHII
CaADHI	94	KWLNGSCMSCEFCQQAEPNCGEAD	152	APILCAGVTVYK	CaADHI
ScADHI	92	KWLNGSCMACEYCELGNESNCPHAD	150	APILCAGITVYK	ScADHI
ScADHII	92	KWLNGSCMACEYCELGNESNCPHAD	150	APILCAGITVYK	ScADHII
KLADHI	94	KWLNGSCMSCEYCELSNESNCPHAD	152	APVLCAGVTVYK	KLADHI
KLADHII	92	KWLNGSCMSCEYCELSNESNCPHAD	150	APILCAGVTVYK	KLADHII
KLADHIV	95	KWLNGSCMSCELCQGYESNCLQAD	153	APILCAGVTVYK	KLADHIV
KmADHI	92	KWLNGSCMSCECELSNESNCPKAD	150	APILCAGVTVYK	KmADHI
KmADHII	91	KWLNGSCMNCECELSNESNCPDAD	149	APILCAGVTVYK	KmADHII
ScADHIII	95	KWLNGSCMTCEFCESHGESNCPDAD	153	APILCAGVTVYK	ScADHIII
KLADHIII	94	KWLNGSCMSCEYCELSNESNCPDAD	152	APILCAGVTVYK	KLADHIII
EnADHI	92	KWLNGSCGCEFCRQSDDPICARAQ	150	APVLCAGITVYK	EnADHI
EnADHIII	94	KWLNGSCLSCQMCADEPLCPHAS	152	APILCAGITVYK	EnADHIII
AfADHI	92	KWLNGSCLACEFCRQADEPLCPNAS	150	APVLCAGITVYK	AfADHI
PpCamD	92	WAPIALCHRHCSCTVLDLTFWDNST	144	LPDHAQPEALAA	PpCamD
ApAdh	104	-HPAVTDGTCLARAGEDMHCENLE	161	VEMAPLADAGIT	ApAdh
SsAdh	93	-NFWQEGENCYCRIGEEHLCDSPR	150	APLTCSGITTYR	SsAdh
ScADHVI	96	QVFSCLCECDRCKNDNEPYCTKFFV--	156	HLAAPLLCGGLT	ScADHVI
ScADHVII	96	QALACFCERCCKSDNEQYCTNDH--	157	PLAAPLLCGGIT	ScADHVII
EcTHD	89	GHITCGHCRNRGRGTRHLORNTIGV	148	DPFGNAVHTALS	EcTHD
PpXylB	86	TFYTCGSCDAFLSGDPTSCANSEFGP	165	GPLGCGIQTGAG	PpXylB

část 3.

HLADH	QGSTCAVFGI	GGVGLSVIMGCKAAGAARIIGVD	230	NEGFDLL-RSGE-SIRTI	374
EcAdhC	PQDSVAVFGL	GAIGLAVVQGARQAKAGRIIAID	225	NDAFDLM--HEGKSI	369
CbAdh	MGSSVVVIGI	GAVGLMGTAGAKLRGAGRIIGV	205	EEALLMKDKPKDLIKAVIL	351
TbAdh	LGATVAVLGI	CPVGLMAVAGAKLRGAGRIIAV	205	EKAFMLMKDKPKDLIKAVIL	351
ReAdh	IAGHTVAVFAQ	GPIGLCATAGARLGCATTIIAID	218	VAAVDLAFANQRDGVLKAIKIP	361
RerADH	-GGSYAVVIGT	GGGLGHVAIQLLRHLSAATVIALD	209	AEAYRRLAA-GTLSGRAVVP	345
EnADHII	PQOWIVISGAG	GGGLGHLAVQIYAKMGLRVIGV	219	TEIFKEM-EEGKLGQGRVVDL	366
PaAdhA	PQQWVAISGI	GGGLGHVAVQYARAM-GLHVAAID	208	NQILDQM-RAGQIEGRIVLEM	342
SmAdhA	PGEWVIVSGI	GGGLGHVAVQYAKAM-GMHVAAAD	204	NAIFERM-EEGKIDGRIVLVL	338
GsAdhHT	PGEWVAIYGI	GGGLGHVAVQYAKAM-GLNVVAVD	202	NEVFDRM-LKGINGRIVVLT	336
EcAdhP	PQOWIAIYGL	GGGLGNLALQYAKNVFNKVAID	200	NTIFTEM-EEGKIRGRVVDL	334
ZmAdhA	PQOWIAIYGL	GGGLGNLALQYAKNVFNKVAID	200	NQIFDEM-EHGKFTGRVVDL	334
SpADHI	PDEWICIPGAG	GGGLGHLAVQYAKAM-AMRVVAID	211	PDVYRLM-HENKIAGRIVLVL	348
PsADHI	PENWVICISGAG	GGGLGSLAIQYAKAM-GFRVVAID	209	PKVYELM-EAGKIVGRVVDL	346
PsADHII	AGQWVAISGAG	GGGLGSLAIQYAKAM-GYRVVVD	209	ASVYELM-EQKILGRVVDL	346
CaADHI	AGQWVAISGAG	GGGLGSLAVQYARAM-GLRVVAID	211	PEVFKLM-EEGKILGRVVDL	348
ScADHI	AGHWVAISGAG	GGGLGSLAVQYAKAM-GYRVLD	209	PEIYEKM-EKGQIVGRVVDL	346
ScADHII	AGHWVAISGAG	GGGLGSLAVQYAKAM-GYRVLD	209	PEIYEKM-EKGQIAGRIVVDL	346
KLADHI	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAVQYAKAM-GYRVLD	211	PSIYEKM-EKGAIAGRIVVDL	348
KLADHII	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAIQYAKAM-GYRVLD	209	ADVVDKM-VKGEIVGRVVDL	346
KLADHIII	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAVQYAKAM-GLRVLD	212	PEAYELM-EQKILGRVVDL	349
KmADHI	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAIQYAKAM-GYRVLD	209	ASVYDKM-VKQIVGRVVDL	346
KmADHII	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAVQYAKAM-GFRVLD	208	PEIYEKM-EQKIVLGRVVDL	345
ScADHIII	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAVQYATAM-GYRVLD	212	PKVYDLM-EKGKILGRVVDL	349
KLADHIII	AGDWVAISGAG	GGGLGSLAVQYAKAM-GYRVLD	211	PKVYELM-EQKILGRVVDL	348
EnADHI	PQQTVAIVGAG	GGGLGSLAQYAKAM-GIRVVAVD	209	PKIYELM-EQGRIAGRIVLEM	347
EnADHIII	PQQTVAIVGAG	GGGLGSLAQYAKAM-GIRVVAID	211	PQTFELM-GQKRIAGRIVLEI	350
AfADHI	PQQTVAIVGAG	GGGLGSLALQYAKAM-GIRVVAID	209	PKIFELM-EQKRIAGRIVLEI	347
PpCamD	RCGFVGLDDT	VVVGAGFVGLAVLVAAASGAKDII	209	EASKALELVKAGALIKPVIDS	359
ApAdh	PQAYVAIVGV	GGGLHIAVQLKVMTPATVIALD	225	NDVLERL-EKGEVLGRAVLIP	359
SsAdh	TGKTLVVVAG	GGGLGTMVAQIAKAVSGATII	211	ANEAINLLENFKAIGRQVLIP	348
ScADHVI	PQKRVGIVGL	GGIGSMGTLISKAM-GAETTVIS	217	VHEAFERMEKGDVYRFTLVG	353
ScADHVII	PQKRVGIVGI	GGIGHMGILLAKAM-GAEVYAF	218	VSHAFTRMESGDVYRFTLVG	354
EcTHD	VGEDVLVSGA	GPIGIMAAVAKHVGNRVVITD	202	QKGFDM-RSQ-SGKVLISW	340
PpXylB	AGSAIAIFGA	GAVGLSVMRAVAVGCTTIIAVD	225	NRAAEDS-EKGV-TLKPVLRI	365

Obr. 4. Porovnání vybraných úseků aminokyselinových sekvencí mikrobiálních NAD(P), Zn-dependentních alkoholdehydrogenas; diskutované aminokyselinové zbytky jsou označeny hvězdičkou. Označení jednotlivých ADH je stejné jako v tabulce 1 a čísla indikují pozici prvního nebo posledního zbytku v uváděné části jejich sekvencí. Aminokyselinové zbytky konzervované alespoň ve 30 ADH jsou v rámečcích. Pomlčky upravují polohy homologických úseků, část 2. a 3.

mační změny k úplnému zrušení bezprostřední koordinace Zn^{2+} zbytkem Glu-68. V případě CbAdh a EcAdhP byl Zn^{2+} koordinován Glu-68 pouze u jedné podjednotky tetramerů holoenzymu. Role tohoto aminokyselinového zbytku při katalýze tak zůstává nevyjasněna a vzhledem k tomu, že záměna Glu-68 za Ala v TbAdh neměla na katalytickou účinnost enzymu výrazný vliv⁵⁸, tento zbytek nemusí být nutně esenciálním prvkem katalytického mechanismu.

3.4. Vazba strukturního Zn^{2+}

Dalším významným sekvenčním motivem ADH je Cys-X₂-Cys-X₂-Cys-X₇-Cys, který odpovídá vazebnému motivu zinkového prstu, kde sulfhydrylové skupiny Cys vytvářejí tetraedrální koordinační sféru strukturního iontu Zn^{2+} . Zinkový prst je významný pro stabilitu řady ADH (cit.^{59,60}). Tento motiv je u většiny porovnávaných ADH lokalizován mezi zbytky odpovídajícími pozici 97 až 111 nebo 95 až 109 (obr. 4). Pro řadu dalších ADH je vazba strukturního Zn^{2+} předpokládána na základě přítomnosti nebo absence motivu zinkového prstu (chybí u RerAdh, CbAdh, TbAdh). Krystalografické studie CbADH a TbAdh, které vykazují celkovou konformaci obdobnou ostatním homologním ADH, ukázaly, že tyto dva enzymy skutečně neobsahují strukturní ion Zn^{2+} a odpovídající smyčka je u CbAdh stabilizována prostřednictvím iontových vazeb mezi Asp-89 a Lys-111 (číslování odpovídá CbAdh) a vodíkovým můstkem mezi Glu-94 a Asn-104 (cit.⁵¹).

V motivu zinkového prstu je v sekvenci ApAdh nahrazen první Cys-97 zbytkem Asp a v sekvenci SsAdh zbytkem Glu. Krystalografická studie těchto dvou enzymů z termofilních bakterií prokázaly přítomnost strukturního Zn^{2+} a účast kyslíku karboxylu Asp-97 a Glu-97 na jeho koordinaci^{52,53}. S ohledem na termostabilitu ApAdh a SsAdh byly navrženy dvě hypotézy vysvětlující opodstatněnost karboxylu v koordinační sféře strukturního Zn^{2+} . Jednou z možností navrženou pro ApAdh je, že slabší vazba mezi kyslíkem a Zn^{2+} může vést ke zrušení koordinační vazby, čímž dojde k posunu čtvrtého Cys zinkového prstu směrem k třetímu a vzniku disulfidové vazby, která může přispívat k fixaci struktury enzymu při vyšších teplotách⁵². Podrobněji byl studován tento aspekt v případě SsAdh a bylo prokázáno, že přítomnost strukturního Zn^{2+} je u tohoto enzymu nezbytná pro termostabilitu a odolnost vůči denaturačním činidlům⁶¹. Záměna Glu-97 za Cys a vytvoření „ideálního“ zinkového prstu sice neměla vliv na aktivitu enzymu při nízkých teplotách, ale negativně ovlivnila jeho termostabilitu⁶². Z krystalové struktury tohoto enzymu pak vyplývá, že jeden z kyslíků karboxylu Glu-97 koordinuje Zn^{2+} a druhý je prostřednictvím vodíkových můstků vázán k dusíkovým atomům peptidové vazby mezi zbytky Gly-99 a Asn-101 a prostřednictvím molekuly vody k přiléhající podjednotce, což patrně společně přispívá k fixaci struktury, kterou by zbytek Cys v této poloze nemohl zajistit⁵³.

3.5. Konzervované aminokyselinové zbytky a specifická vazba kofaktoru

Asp-223 je konzervována ve všech mikrobiálních NAD(H)-dependentních ADH skupiny I (obr. 4). Dostupné krystalové struktury odpovídajících bakteriálních ADH povzrují, že, podobně jako v případě HLADH (obr. 2), vytvářejí kyslíkové atomy karboxylu Asp-223 vodíkové můstky s 2' a 3' hydroxyly ribosy adenosinové části NAD(H). Stejně vodíkové můstky byly identifikovány i v počítačovém modelu ScADHI, II a III (cit.¹⁷) a s ohledem na vysoký stupeň identity (tabulka II) a homologie (obr. 4) lze jejich tvorbu předpokládat i u jiných ADH kvasinek a plísní. Fosforylace 2' hydroxyly ribosy v NADP(H) brání z důvodu elektrostatické repulze karboxylu Asp-223 a 2' fosfátu vazbě tohoto kofaktoru. Mikrobiální NADP(H)-dependentní ADH proto Asp-223 postrádají a navíc v blízkosti pozice 223 obsahují zbytek bazického Arg. V souladu s výše uvedenou rolí Asp-223, její záměna za Gly umožnila tvorbu komplexu NADP(H) s ScADHI (cit.⁶³). Naopak záměna Gly v poloze 223 za Asp umožnila vazbu NAD(H) v TbAdh (cit.⁵¹). Tyto změny však vedly ke snížení katalytické účinnosti binárních komplexů ScADHI-NADP(H) a TbAdh-NAD(H) na 1 % původní aktivity nemutovaných forem s přirozeným kofaktorem.

Závěr, že aminokyselinový zbytek 223 determinuje specifitu dané ADH vůči kofaktoru kontraindikuje skutečnost, že K1ADHII a IV obsahující Asp-223 jsou schopny využívat i NADP(H) jako kofaktor (tabulka I). S ohledem na širokou substrátovou specifitu těchto ADH Bozzi a spol.⁶⁴ předpokládají, že schopnost využívat NADP(H) je dána vysokou flexibilitou aminokyselinových zbytků v okolí štěrbiny aktivního místa, která umožní deponovat zbytek Asp-223 mimo vazebné místo kofaktoru.

Vazby NAD(H) se v HLADH účastní Arg-47 a 369 (obr. 2), přičemž bazická aminokyselina Arg nebo Lys jsou v pozici 369 striktně konzervovány ve všech porovnávaných sekvencích (obr. 4). Většina mikrobiálních ADH také konzervuje v pozici 47 bazický His, pro který byla podle očekávání u ApAdh (cit.⁵²), PaAdhA (cit.⁴⁶), BsAdhHT (cit.⁴⁵), EcAdhP (cit.⁵⁴) a SsAdh (cit.⁵⁷) experimentálně prokázána role analogická Arg-47. Oproti tomu ScADHVI a VII, ReAdh a PpCamD mají v této pozici Gly a CbAdh a TbAdh obsahují Thr-47. Jak je patrné z tabulky I, záměny nesouvisí se specifitou ke kofaktoru. Z těchto ADH byly vyřešeny pouze struktury CbAdh a TbAdh a Korkhin a spol.⁵¹ roli Thr-47 při vazbě NADP(H) nepřipisují.

Lys-228, jemuž je na obr. 2 přisuzována tvorba vodíkové můstky s hydroxylem ribosy, je v mikrobiálních ADH poměrně konzervován a chybí pouze v sekvenci ZmAdhA, TbAdh, CbAdh, EnADHIII, EcAdhP a SsAdh a v ReAdh a EcTHD je v této pozici Arg. Krystalografická studie⁵⁷ ukázala, že funkci Lys-228 přebírá u SsAdh blízký

zbytek Arg (Arg-205 v sekvenci SsAdh). Z dalších aminokyselin účastnicích se přímé interakce ADH s NAD(H) byly již popsány His-51 a Ser-48 a případná diskuse významu dalších aminokyselin v blízkém okolí přesahuje rámeček tohoto přehledu.

3.6. Vztah struktury ADH a substrátové specifity

Obecně je přijímána teze, že substrátová specifita enzymu je determinována především velikostí (objemem) štěrbinu aktivního místa a přítomností nabitých nebo polarizovatelných skupin. Jak bylo uvedeno pro E a S isoenzymy HLADH, velikost štěrbinu aktivního místa je dána nejen délkou postranních řetězců hydrofobních aminokyselin, ale také indukovanými změnami struktury v souvislosti s aminokyselinovými záměnami. Důležité jsou patrně objemy aminokyselinových zbytků bezprostředně uvnitř aktivního místa, zbytků na stěnách štěrbinu aktivního místa a zbytků lokalizovaných při „vstupu“ do této štěrbinu⁸. Předpoklad, že důvodem schopnosti HLADH (isoenzym E) katalyzovat v porovnání s ScADHI oxidaci objemnějších alkoholů vzhledem k menším postranním řetězcům na stěnách štěrbinu experimentálně potvrdili Creaser a spol.⁴⁴. Mutant ScADHI, v němž byl Trp-93 substituován za menší a hydrofobnější Phe a Thr-48 za menší Ser, vykazoval vyšší katalytickou aktivitu s 3 až 8 uhlíkatými alifatickými alkoholy než nemutovaná forma ScADHI.

4. Závěr

S rostoucím počtem biochemických a především krystalografických studií alkohol dehydrogenas získáváme stále detailnější náhled na vztah jejich struktury a funkce. V této práci jsme se zaměřili na mikrobiální NAD(P), Zn-dependentní ADH a pokusili jsme se shrnout poznatky o funkčním významu konzervace specifických aminokyselinových zbytků v jejich primárních strukturách. Toto srovnání také umožňuje do určité míry predikovat reakční mechanismus, požadavek na kofaktor a případně i substrátovou specifitu homologních ADH, pro něž jsou dostupné pouze údaje o primární struktuře.

Tato práce vznikala za finanční podpory MŠMT ČR (granty č. 1M6837805002 a MSM6046137305).

LITERATURA

- Jörnval H., Persson B., Jeffery J.: *Eur. J. Biochem.* 167, 195 (1987).
- Jörnval H., Hoog J. O., Persson B.: *FEBS Lett.* 445, 261 (1999).
- Radianingtyas H., Wright P. C.: *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 593 (2003).
- Kallberg Y., Oppermann U., Jörnval H., Persson B.: *Eur. J. Biochem.* 269, 4409 (2002).
- Persson B., Kallberg Y., Oppermann U., Jörnval H.: *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 271 (2003).
- McKinley-McKee J. S., Winberg J. O., Pettersson G.: *Biochem. Int.* 25, 885 (1991).
- Niefind K., Müller J., Riebel B., Hummel W., Schomburg D.: *J. Mol. Biol.* 327, 317 (2003).
- Reid M. F., Fewson C. A.: *Crit. Rev. Microbiol.* 20, 13 (1994).
- Kalnenieks U., Galinina N., Toma M. M., Marjutina U.: *FEBS Lett.* 522, 6 (2002).
- Gorish H.: *Biochem. Biophys. Acta* 1647, 98 (2003).
- Ander P., Marzullo L.: *J. Biotechnol.* 53, 115 (1997).
- Szamecz B., Urban G., Rubiera R., Kucsera J., Dorgai L.: *Yeast* 22, 669 (2005).
- Thomson J. M., Gaucher E. A., Burgan M. F., De Kee D. W., Li T., Aris J. P., Benner S. A.: *Nat. Genet.* 37, 630 (2005).
- Geer B. W., Dybas L. K., Shanner L. J.: *J. Exp. Zool.* 250, 22 (1989).
- Pecsenye K., Lefkovitch L. P., Giles B. E., Saura A.: *Hereditas* 121, 225 (1994).
- Chen J. S.: *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 263 (1995).
- Leskovac V., Trivic S., Pericin D.: *FEMS Yeast Res.* 2, 481 (2002).
- Roehr M. (ed.): *The Biotechnology of Ethanol Classical and Future Applications.* Wiley-VCH, Weinheim 2001.
- Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 258 (2003).
- Gray K. A., Zhao L., Emptage M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 141 (2006).
- Hummel W.: *Trends Biotechnol.* 17, 487 (1999).
- Weckbecker A., Hummel W.: *Biotechnol. Lett.* 26, 1739 (2004).
- Ernst M., Kaup B., Müller M., Bringer-Meyer S., Sahm H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 629 (2005).
- Goodwin P. M., Anthony C.: *Adv. Microb. Physiol.* 40, 1 (1998).
- Brautaset T., Jakobsen O. M., Flickinger M. C., Valla S., Ellingsen T. E.: *J. Bacteriol.* 186, 1229 (2004).
- Ramos J. L., Marques S., Timmis K. N.: *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 341 (1997).
- Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C. W., Whyte L. G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3085 (2003).
- Larkin M. J., Kulakov L. A., Allen C. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 282 (2005).
- Peng X., Taki H., Komukai S., Sekine M., Kanoh K., Kasai H., Choi S. K., Omata S., Tanikawa S., Harayama S., Misawa N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 824 (2006).
- Adolph H. W., Kiefer M., Cedergren-Zeppezauer E.: *Biochemistry* 36, 8743 (1997).
- Eklund H.: *Biochem. Soc. Trans.* 17, 293 (1988).
- Adolph H. W., Zwart P., Meijers R., Hubatsch I., Kiefer M., Lamzin V., Cedergren-Zeppezauer E.:

- Biochemistry 39, 12885 (2000).
33. Bahnson B. J., Colby T. D., Chin J. K., Goldstein B. M., Klinman J. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 12797 (1997).
 34. Billeter S. R., Webb S. P., Agarwal P. K., Iordanov T., Hammes-Schiffer S.: J. Am. Chem. Soc. 123, 11262 (2001).
 35. Colby T. D., Bahnson B. J., Chin J. K., Klinman J. P., Goldstein B. M.: Biochemistry 37, 9295 (1998).
 36. Brändén C.-I., Jörnvall H., Eklund H., Furungren B., v knize: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) sv. 11, str. 103. Academic Press, New York 1975.
 37. Leskovac V., Trivic S., Anderson B. M.: Eur. J. Biochem. 264, 840 (1999).
 38. Andersson P., Kvassman J., Lindström A., Oldén B., Pettersson G.: Eur. J. Biochem. 133, 425 (1981).
 39. Pettersson G.: CRC Crit. Rev. Biochem. 21, 349 (1987).
 40. LeBrun L. A., Plapp B. V.: Biochemistry 38, 12387 (1999).
 41. Pocker Y., Page J. D.: J. Biol. Chem. 265, 22101 (1990).
 42. Meijers R., Morris R. J., Adolph H. W., Merli A., Lamzin V. S., Cedergren-Zeppezauer E. S.: J. Biol. Chem. 276, 9316 (2001).
 43. Sun H. W., Plapp B. V.: J. Mol. Evol. 34, 522 (1992).
 44. Creaser E. H., Murali C., Britt K. A.: Protein Eng. 3, 523 (1990).
 45. Ceccarelli C., Liang Z. X., Strickler M., Prehna G., Goldstein B. M., Klinman J. P., Bahnson B. J.: Biochemistry 43, 5266 (2004).
 46. Levin I., Meiri G., Peretz M., Burstein Y., Frolow F.: Protein Sci. 13, 1547 (2004).
 47. Inoue J., Tomioka N., Itai A., Harayama S.: Biochemistry 37, 3305 (1998).
 48. Davis G. J., Carr L. G., Hurley T. D., Li T. K., Bosron W. F.: Arch. Biochem. Biophys. 311, 307 (1994).
 49. LeBrun L. A., Park D. H., Ramaswamy S., Plapp B. V.: Biochemistry 43, 3014 (2004).
 50. Eklund H., Müller-Wille P., Horjales E., Futer O., Holmquist B., Valee B. L., Höög J.-O., Kaiser R., Jörnvall H.: Eur. J. Biochem. 193, 303 (1990).
 51. Korkhin Y., Kalb A. J., Peretz M., Bogin O., Burstein Y., Frolow, F.: J. Mol. Biol. 278, 967 (1998).
 52. Guy J. E., Isupov M. N., Littlechild J. A.: J. Mol. Biol. 331, 1041 (2003).
 53. Esposito L., Sica F., Raia C. A., Giordano A., Rossi M., Mazzarella L., Zagari A.: J. Mol. Biol. 318, 463 (2002).
 54. Karlsson A., El-Ahmad M., Johansson K., Shafqat J., Jörnvall H., Eklund H., Ramaswamy S.: Chem. Biol. Interact. 143, 239 (2003).
 55. Ganzhorn A. J., Plapp B. V. J.: Biol. Chem. 263, 5446 (1988).
 56. Ryde U.: Protein Sci. 4, 1124 (1995).
 57. Esposito L., Bruno I., Sica F., Raia C. A., Giordano A., Rossi M., Mazzarella L., Zagari A.: Biochemistry 42, 1439 (2003).
 58. Kleifeld O., Shi S. P., Zarivach R., Eisenstein M., Sagi I.: Protein Sci. 12, 468 (2003).
 59. Magonet E., Hayen P., Delforge D., Delaive E., Remacle J.: Biochem. J. 287, 361 (1992).
 60. Jelokova J., Karlsson C., Estonius M., Jörnvall H., Hoog J.O.: Eur. J. Biochem. 225, 1015 (1994).
 61. Raia C. A., Dauria S., Rossi M.: Biocatalysis 11, 143 (1994).
 62. Ammendola S., Raucci G., Incani O., Mele A., Tramontano A., Wallace A.: Protein Eng. 8, 31 (1995).
 63. Fan F., Lorenzen J. A., Plapp B. V.: Biochemistry 30, 6397 (1991).
 64. Bozzi A., Saliola M., Falcone C., Bossa F., Martini F.: Biochim. Biophys. Acta 1339, 133 (1997).
- A. Kotrbova-Kozak, J. Sajdok, and P. Kotrba**
(*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Molecular Characterization of Microbial NAD(P) and Zn-Dependent Alcohol Dehydrogenases**
- Alcohol dehydrogenases (ADHs; EC 1.1.1.1), a subset of oxidoreductases requiring NAD(P) as a cofactor, are present virtually in all life forms. Among them, Group I ADHs are Zn-dependent enzymes of ca. 350 amino acid residues. Owing to biochemical characterization and crystallographic studies on Group I ADHs allowing for information on structure-function relationship, much knowledge is available on the role of specific amino acid residues. Over the last decade a significant amount of work has been done also on molecular characterization of bacterial and yeast Group I ADHs, making it possible to estimate, among others, structure-function relationships in the ADHs for which only primary structure is available. In this paper we review the role of conserved amino acid residues of well characterized microbial NAD(P) and Zn-dependent ADHs in catalysis, sequestration of catalytic and structural zinc, cofactor binding and substrate specificity.