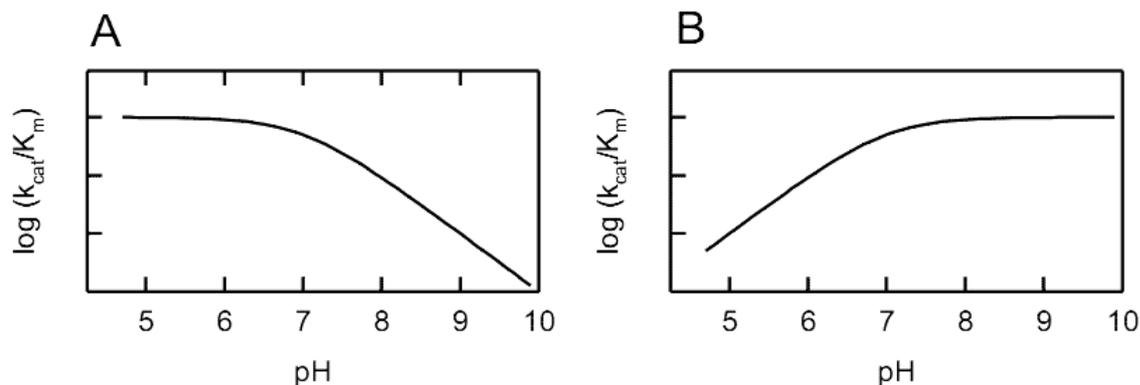
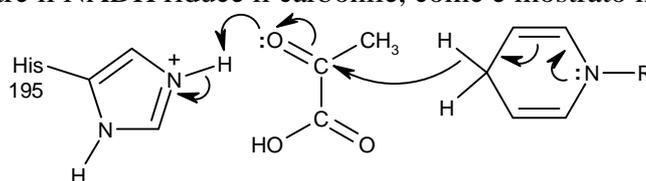


Problema 20 Mechanism of Catalysis by Lactate Dehydrogenase

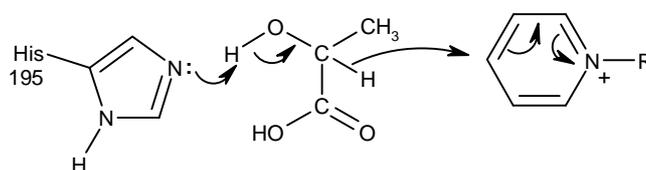
a) Quale dei due diagrammi si riferisce alla reazione diretta e quale a quella inversa della LDH?



Il diagramma A si riferisce alla reazione diretta, cioè alla **riduzione dell'acido piruvico** ad acido lattico, infatti l'istidina **sotto pH 7** è protonata in catena laterale e può donare un H^+ all'ossigeno dell'acido piruvico mentre il NADH riduce il carbonile, come è mostrato in figura.

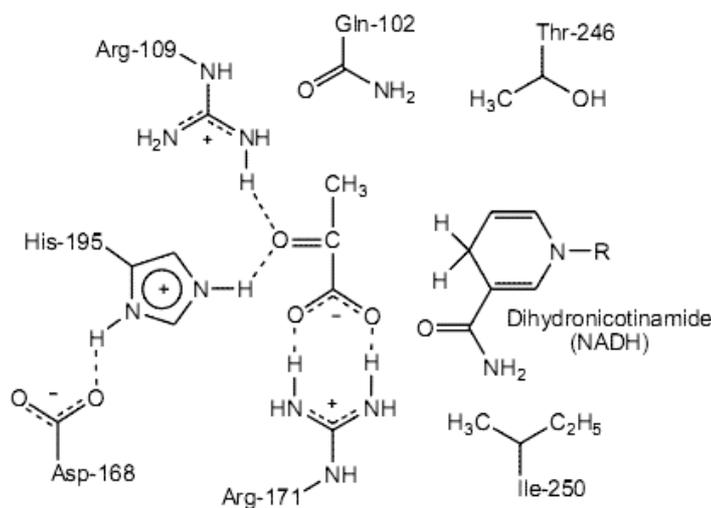


Il diagramma B si riferisce alla reazione inversa, infatti **sopra pH 7** l'istidina è deprotonata e può catturare l' H^+ dall'OH dell'acido lattico per favorire la formazione del carbonile e il trasferimento di H^- al NAD^+ , come nella figura seguente.



b) Cosa rappresentano i deboli legami indicati con tratteggio nello schema 1 tra His-195 e Arg-109 con l'ossigeno del carbonile dell'acido piruvico?

Scheme 1

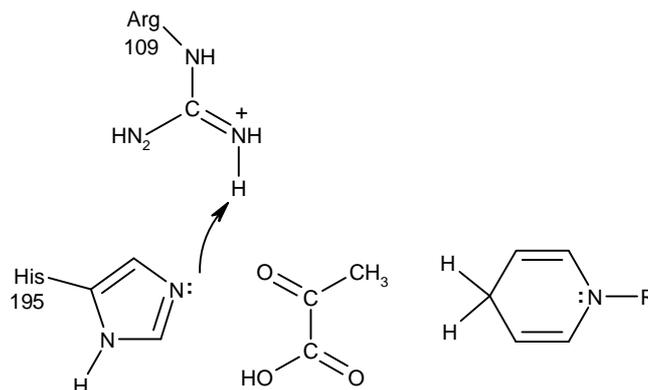


Quei due legami tratteggiati rappresentano legami a idrogeno, infatti sono realizzati tra idrogeni legati ad atomi molto elettronegativi (N) e un altro atomo molto elettronegativo (O). Sono legami di natura elettrostatica che avvengono lungo l'asse dell'orbitale che regge la coppia di elettroni di non legame dell'ossigeno.

c) Che tipo di legami intermolecolari vi sono tra la catena laterale dell'isoleucina 250 e il NADH? La catena laterale apolare di Ile-250 si trova subito sotto il piano dell'anello chinonico del NADH con il quale realizza legami di Van der Waals.

d) Qual è il ruolo di Arg-109 nella catalisi considerando che la sua sostituzione con Gln fa diminuire di 1400 volte la velocità di reazione, ma diminuisce solo di 15 volte l'affinità per il substrato, mentre resta inalterata la reazione con SO_3^{2-} ?

Nella reazione con solfito non c'è scambio di H^+ con l'ambiente, mentre dopo la riduzione dell'acido piruvico, l'istidina ha perso un H^+ . Dopo ogni riduzione, arriva nuovo acido piruvico, arriva nuovo NADH, ma serve un nuovo H^+ sull'istidina come si vede nella figura seguente.



Probabilmente Arg-109 ha il compito di rifornire di H^+ His-195 e poi, grazie alla sua grande forza basica, si può subito ricaricare di H^+ dall'esterno.

e) Decidere quale delle seguenti ipotesi sul ruolo nella catalisi di Asp-168 è corretta

(1): determinante per tenere His in posizione corretta

(2): elettron-donatore per aumentare la basicità di His

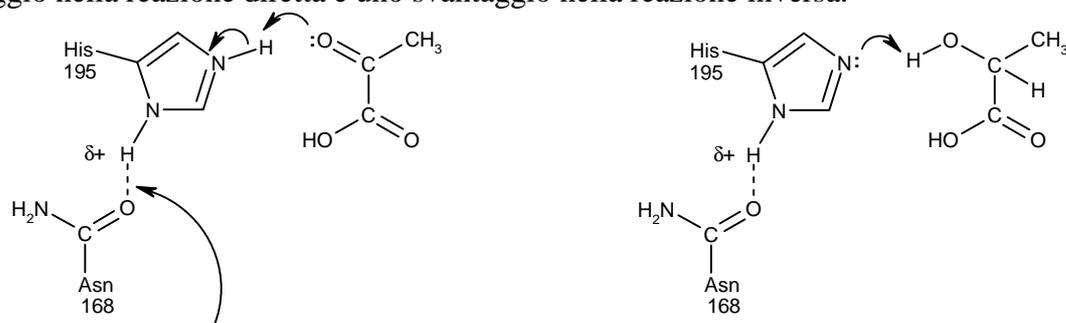
sulla base dei seguenti dati che riguardano tre enzimi. Quello Wild-type con Asp-168 al suo posto, Mutante-1 con Asp sostituito da Asn-168, Mutante-2 con Asp sostituito da Ala-168

Constant	Wild-type (Asp-168)	Mutant 1 (Asn-168)	Ratio: Wild-type / Mutant 1	Mutant 2 (Ala-168)	Ratio: Wild-type / Mutant 2
Forward reaction:					
K_m (pyruvate), mM	0.06	10	0.006	3.3	0.018
k_{cat} , s^{-1}	250	20	12.5	5.5	45
k_{cat}/K_m , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$4.2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^3$	2080	$1.7 \cdot 10^3$	2500
Reverse reaction:					
K_m (lactate), mM	40	120	0.33	80	0.5
k_{cat} , s^{-1}	9	0.12	75	0.09	100
k_{cat}/K_m , $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	$2.2 \cdot 10^2$	1	225	1.13	200

Esaminiamo la prima ipotesi, che il ruolo di Asp-168 sia quello di tenere nella corretta posizione His-195. Questa ipotesi sembra infondata perchè il Mutante-1, che contiene Asn-168, e quindi è ancora in grado di fare legami idrogeno con His, ha una affinità per il substrato ancora minore di

quella del Mutante-2 sia nella reazione diretta ($K_m = 10$ contro 3,3) sia nella reazione inversa ($K_m = 120$ contro 80). Questo fa supporre che esista un altro fattore importante per l'affinità per il substrato (vedi discussione finale: non solo la posizione di His-195, ma soprattutto la sua forma acido base).

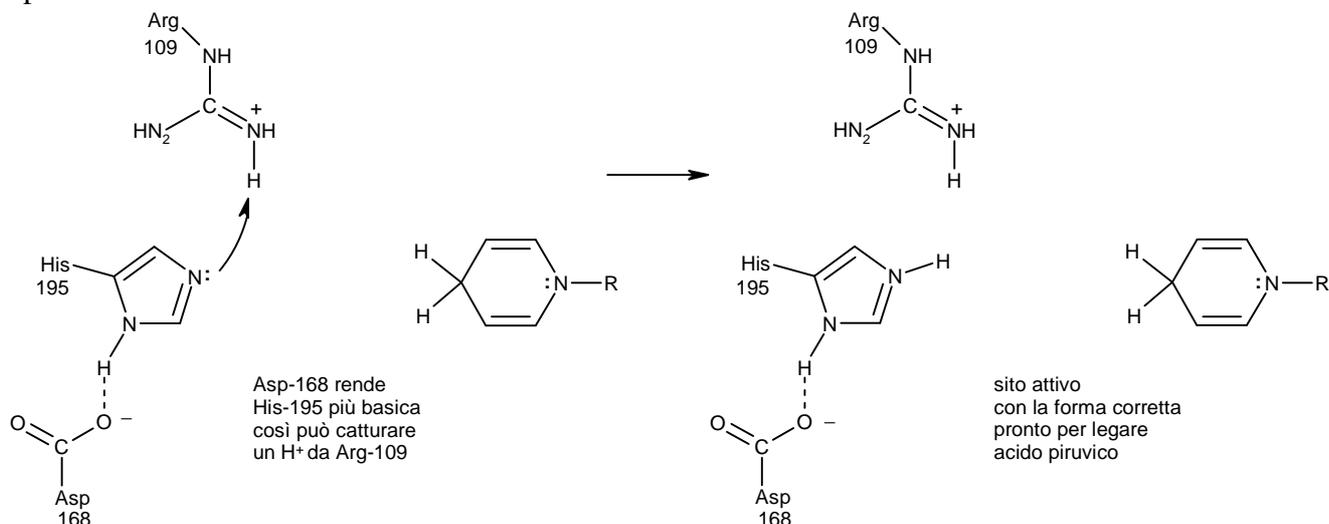
Esaminiamo la seconda ipotesi, che il ruolo di Asp-168 sia quello di aumentare la basicità di His-195 grazie all'effetto elettron-donatore del carbossilato. In questo caso la sostituzione con Asn-168 dovrebbe peggiorare le cose perchè il carbonile di Asn è elettron-attrattore e la basicità di His dovrebbe diminuire. Dal punto di vista della velocità di reazione, ci si potrebbe aspettare un vantaggio nella reazione diretta e uno svantaggio nella reazione inversa.



l'effetto elettron attrattore dell'ossigeno del carbonile dovrebbe favorire la reazione diretta

mentre dovrebbe ostacolare la reazione inversa

In realtà i dati della tabella indicano che la reazione diretta è la più svantaggiata (2080 volte più lenta contro 225 di quella inversa). Questo suggerisce che la spiegazione non va cercata nella semplice reazione di trasferimento di H^+ da His-195 al substrato e viceversa, ma piuttosto nel ripristino della forma acido-base corretta del sito attivo alla fine della reazione.



Asp-168 rende His-195 più basica così può catturare un H^+ da Arg-109

sito attivo con la forma corretta pronto per legare acido piruvico

La presenza di Asp-168 rende più basica His-195 che così alla fine della reazione si può protonare catturando un H^+ da Arg-109. Questo permette di rendere più veloce la reazione visto che il sito attivo si è rigenerato in modo efficiente, e d'altra parte permette di legare con più efficienza la nuova molecola di acido piruvico e questo abbassa K_m . Nel Mutante-1 Asn-168 rende meno basica His-195 questo rallenta la reazione perchè il sito attivo tarda a ripristinare il giusto assetto acido base e inoltre His-195 non protonata peggiora l'affinità dell'enzima per l'acido piruvico, visto che viene a mancare un legame idrogeno verso l'ossigeno del carbonile.

La spiegazione corretta è quindi la n°2.

Soluzione proposta da
prof. Mauro Tonellato
ITI Marconi - Padova