



УДК 577.158.439

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ С АНАЛОГАМИ НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА: НИКОТИНОИЛГИДРАЗИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДОМ И НИКОТИНАМИДГИПОКСАНТИНДИНУКЛЕОТИДОМ *

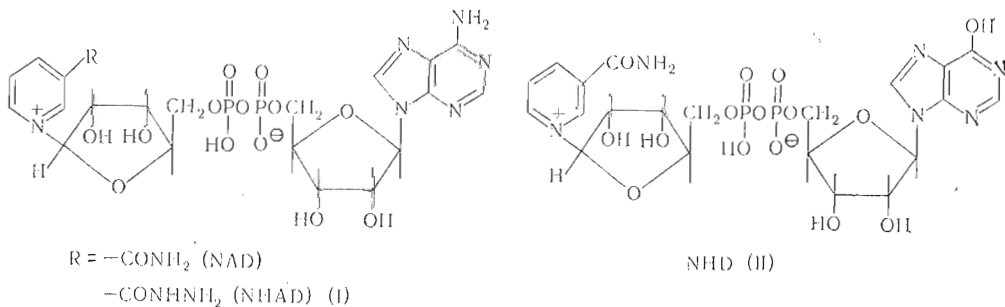
*Цетлин Л. Г., Калачева Н. И., Мальцев Н. И.,
Щорс Е. И., Яковлев В. А.*

Всероссийский научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Проведено сравнение коферментных свойств природного кофермента и его аналогов (NHAD и NHD) в реакциях, катализируемых ЛДГ мышц свиньи. Изучены спектральные свойства двойных и тройных комплексов, определены величины K_d двойных комплексов, образованных восстановленной формой динуклеотидов, а также кинетические параметры окислительно-восстановительных реакций. Приведена оценка прочности связывания субстратов в тройных комплексах.

Результаты исследования коферментной активности аналогов NAD, модифицированных в положении 3 пиридинового цикла, свидетельствуют о существенной роли заместителя в этом положении в катализе [1—3]. Детально и систематически этот вопрос, однако, не исследовался. Исходя из общих соображений можно рассматривать по крайней мере 3 функции заместителя пиридинового цикла: 1) изменение сродства кофермента к нуклеофильным агентам; 2) участие в связывании кофермента; 3) участие в связывании субстрата. Таким образом, изменение свойств этого заместителя может сказаться на положении равновесия окислительно-восстановительной реакции, на прочности как двойных, так и тройных комплексов.

Цель данной работы — изучение взаимодействия ЛДГ (*L*-лактат: NAD-оксиредуктаза, КФ 1.1.1.27) с двумя аналогами NHAD (I) и NHD (II).



* Принятые сокращения: NHAD — никотиноилгидразидадениндинуклеотид; NHADH — никотиноилгидразидадениндинуклеотид восстановленный; NHD — никотинамидгипоксантиндинуклеотид; NHDH — никотинамидгипоксантиндинуклеотид восстановленный; ADPR — аденозиндифосфатрибоза; ЛДГ — лактатдегидрогеназа (изофермент M₁).

В аналоге (I) карбоксамидная группа замещена на несколько более электроположительную гидразидную группу. Аналог (II), в котором в положении 6 пуринового цикла вместо аминогруппы находится гидроксильная группа, был использован в качестве кофермента с немодифицированной «рабочей» пиридиновой частью.

Для правильной оценки данных о взаимодействии пиридиновых динуклеотидов с дегидрогеназами необходимо знание степени их «свернутости», а также электрофильности пиридинового цикла. Величина гипохромного эффекта, определенная при расщеплении динуклеотидов до смеси мононуклеотидов при действии фосфолиэстеразы, составила для NHD, NAD и NHAD соответственно 1, 12 и 8%. Внутримолекулярное взаимодействие гетероциклов в NAD и NHAD и, следовательно, степень их «свернутости» сходна, и конформационный фактор будет давать примерно одинаковый вклад в прочность комплексов с ферментом. В молекуле NHD такое взаи-

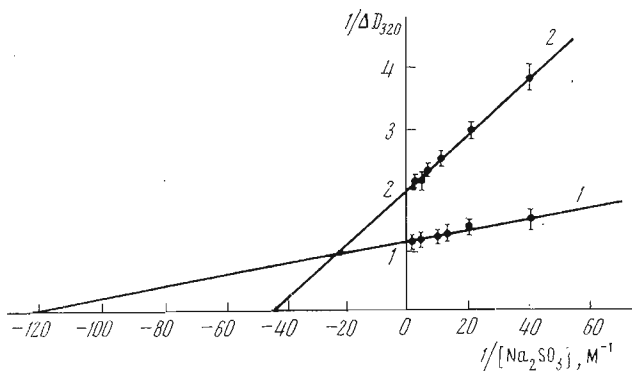


Рис. 1. Зависимость оптической плотности растворов динуклеотидов от концентрации Na_2SO_3 : 1 — NAD $1,5 \cdot 10^{-4}$ М, 2 — NHAD $3,9 \cdot 10^{-4}$ М. Условия проведения опытов: 0,1 н. *трис*-HCl буфер (pH 8,0), 21° , Na_2SO_3 — от $2,5 \cdot 10^{-2}$ до 0,5 М

модействие, по-видимому, весьма незначительно, что подтверждают данные, полученные методом ЯМР [4], и указывают на «развернутую» структуру динуклеотида. Можно ожидать, что комплексы ЛДГ с NHD будут более прочны, поскольку в активном центре ЛДГ кофермент связывается в «развернутой» конформации [5].

Замена карбоксамидной группы на гидразидную не препятствует образованию аддуктов с CN^- и SO_3^{2-} -ионами. В спектрах поглощения комплексов NHAD, так же как и в случае NAD, имеются полосы с максимумом соответственно при 325 и 320 нм. Величины K_d аддуктов NAD, NHAD, NHD, определенные из зависимости ΔD_{320} раствора динуклеотида от концентрации Na_2SO_3 (рис. 1), составили соответственно $2,1 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$, $0,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$ и $2,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-2}$ М. Сродство пиридиновых циклов в NAD и NHAD к нуклеофильному агенту, SO_3^{2-} -иону сходно, что согласуется с расчетом электронных структур замещенных пиридиновых катионов [6]. Можно допустить, что в реакциях ферментативного превращения NAD и NHAD положение равновесия на стадиях, зависящих от электрофильности атома углерода в положении 4 пиридинового цикла, также будет сходным.

При связывании восстановленных форм динуклеотидов с ЛДГ возникают разностные спектры поглощения, приведенные на рис. 2. Спектр ЛДГ — NADH имеет максимум при 317 нм и минимум при 364 нм. Спектры такого рода были объяснены коротковолновым смещением максимума в спектре поглощения дигидропиридинового цикла [7]. Спектр комплекса ЛДГ — NHADH обладает другой формой, и максимум находится при 344 нм. Комплексы ЛДГ — NADH и ЛДГ — NHADH имеют сходную форму, однако минимум в случае NHDH смещен на 24 нм в коротковолновую область. Очевидно, что изменение структуры кофермента в адениновой части принципиально не сказывается на состоянии дигидропиридинового хромофора в

двойном комплексе, в то время как изменение природы заместителя в положении 3 пиридинового цикла оказывает существенное влияние, по-видимому, в результате аномального взаимодействия с функциональными группами активного центра.

В спектрах КД двойных комплексов всех динуклеотидов имеется положительная дихроичная полоса в области длинноволнового максимума спектра поглощения. Это свидетельствует о сходстве микроокружения

дигидропиридинового цикла в двойных комплексах. В случае NADH максимум расположен при 343 нм, что соответствует данным В. М. Гуревича с соавт. [8], в случае NHADH максимум находится при 335 нм, а для NHDH — при 350 нм (рис. 3).

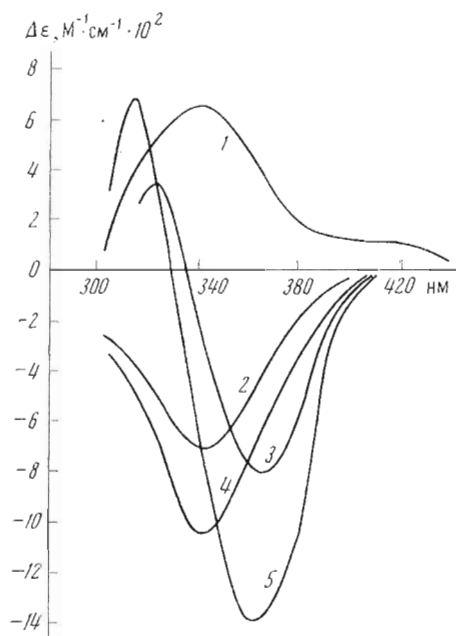


Рис. 2

Рис. 2. Разностные спектры поглощения комплексов ЛДГ с нуклеотидами: 1 — комплекс ЛДГ — NHADH (ЛДГ — $1,8 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NHADH — $1,5 \cdot 10^{-4}$ М); 2 — комплекс ЛДГ — NHDH (ЛДГ — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NHDH — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М); 3 — комплекс ЛДГ — NADH (ЛДГ — $6,4 \cdot 10^{-5}$ М активных центров, NADH — $1,5 \cdot 10^{-4}$ М); 4 — комплекс NHDH — ЛДГ — оксамат (ЛДГ — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NHDH — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, оксамат — $2,5 \cdot 10^{-1}$ М); 5 — комплекс NADH — ЛДГ — оксамат (ЛДГ — $6,4 \cdot 10^{-5}$ М активных центров, NADH — $1,5 \cdot 10^{-4}$ М, оксамат — $5 \cdot 10^{-3}$ М). Условия проведения опытов: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0), 20°. Спектры скорректированы в соответствии с K_D (см. табл. 1)

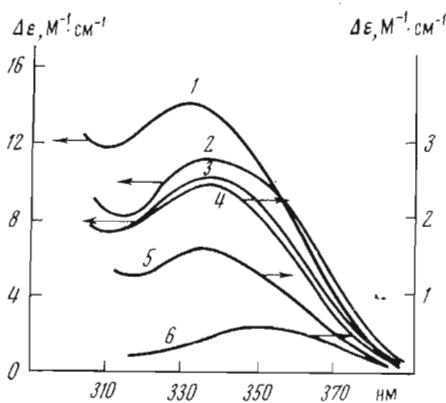


Рис. 3

Рис. 3. Спектры КД комплексов ЛДГ с нуклеотидами: 1 — комплекс NADH — ЛДГ — оксамат (ЛДГ — $4,9 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NADH — $4,3 \cdot 10^{-4}$, оксамат — $1,4 \cdot 10^{-3}$ М); 2 — комплекс ЛДГ — NADH (ЛДГ — $4,9 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NADH — $4,3 \cdot 10^{-4}$ М); 3 — комплекс ЛДГ — NHADH (ЛДГ — $2,1 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NHADH — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М); 4 — комплекс NHADH — ЛДГ — оксамат (ЛДГ — $2,1 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, оксамат — $4,3 \cdot 10^{-2}$ М, NHADH — $2,5 \cdot 10^{-4}$ М); 5 — комплекс NHDH — ЛДГ — оксамат (ЛДГ — $5,2 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NHDH — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М, оксамат — $3,3 \cdot 10^{-4}$ М); 6 — комплекс ЛДГ — NHDH (ЛДГ — $5,2 \cdot 10^{-4}$ М активных центров, NHDH — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М). Условия проведения опытов: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0), 21°. Спектры скорректированы в соответствии с K_D (см. табл. 1)

Связывание восстановленных форм динуклеотидов приводит к тушению флуоресценции белка. Это позволило применить метод флуориметрического титрования для определения K_D комплексов. На рис. 4 приведены в качестве примера данные, полученные при титровании ЛДГ раствором NADH.

По данным Хольбрука, при титровании ЛДГ — NADH при степени насыщения $> 0,5$ величина относительной флуоресценции зависит нелинейно от степени насыщения, что затрудняет определение K_D [9]. Мы проводили опыты по титрованию при $L_0 > E_0 < K_D$ (L_0 — концентрация динуклео-

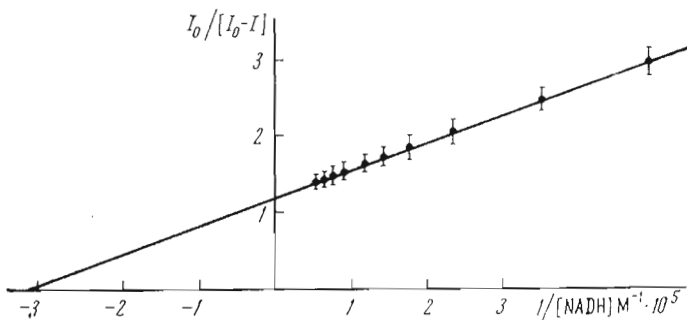


Рис. 4. Зависимость флуоресценции ЛДГ от концентрации NADH. Условия проведения опыта: 0,1 н. фосфатный буфер (рН 7,0), 21°. ЛДГ — $1,2 \cdot 10^{-7}$ М активных центров; NADH от $1,4 \cdot 10^{-6}$ до $1,5 \cdot 10^{-5}$ М

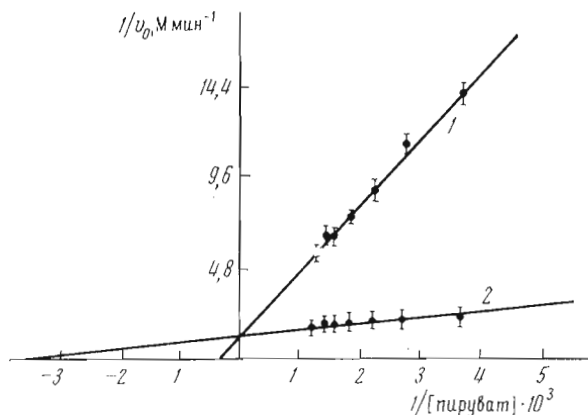
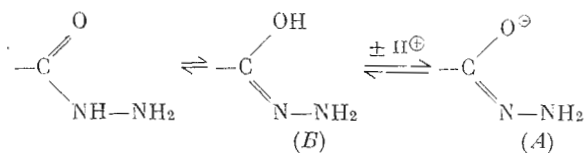


Рис. 5. Влияние оксамата на зависимость начальной скорости реакции окисления NHDH от концентрации пирувата: 1 — в присутствии оксамата $5,0 \cdot 10^{-4}$ М; 2 — в отсутствие оксамата ЛДГ — $2,8 \cdot 10^{-10}$ М активных центров; NHDH — $1,6 \cdot 10^{-3}$ М

тида, E_0 — концентрация фермента) и в каждом случае зависимость изменения относительной интенсивности флуоресценции $(I_0 - I) / I_0$ от L_0 (I — интенсивность флуоресценции при определенной L_0 , I_0 — интенсивность флуоресценции при $L_0 = 0$) в двойных обратных координатах была линейной, что позволяло определить величину K_d .

Найденные значения K_d приведены в табл. 1. Из этих данных видно, что NHDH и NADH образуют менее прочный комплекс с ЛДГ, чем NADH.

Таким образом, введение менее нуклеофильной гидроксильной группы в NHDH вместо аминогруппы в NADH уменьшает ΔF связывания примерно на 1 ккал/моль. Можно рассмотреть по крайней мере две причины ослабления связывания кофермента при замене карбоксамидной группы на гидразидную. Во-первых, существование гидразидной группы в ионной форме (А) и неблагоприятное взаимодействие с функциональными группами активного центра фермента:



В условиях опытов при рН 7,3 вкладом ионной формы А можно пренебречь, так как величина pK_a гидразидной группы равна 9,5 [10]. В связы-

Величины K_d комплексов ЛДГ—кофермент при 20°

Кофермент	М	ЛДГ (активные центры), М	K_d , М
NADH	$1,4 \cdot 10^{-6}$ — $2,1 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$3,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-6}$
NHADH	$9,6 \cdot 10^{-7}$ — $1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$
NHDH	$8,0 \cdot 10^{-7}$ — $9,7 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$1,7 \pm 2,2 \cdot 10^{-5}$

Таблица 2

Величины K_i оксамата в реакциях восстановления пирувата

Опыты проводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2) при 35°

Кофермент	М	Пируват, М	Оксамат, М	ЛДГ, М	K_i , М
NADH	$9,0 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$ — $9,1 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$2,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$
NHADH	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$9,1 \cdot 10^{-4}$ — $9,1 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$7,7 \pm 0,3 \cdot 10^{-4}$
NHDH	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$9,1 \cdot 10^{-5}$ — $9,1 \cdot 10^{-1}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$1,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$

вании принимает, по-видимому, участие неионизованная форма. Во-вторых, можно допустить образование водородной связи с карбонильной группой заместителя в положении 3 пиридинового цикла. В этом случае более слабое связывание NHADH следует объяснить пониженной нуклеофильностью атома кислорода гидразидной группы в форме псевдокислоты (B).

Изменение структуры кофермента может сказаться на связывании не только кофермента, но и второго субстрата. Для выяснения вопроса о том, как изменяются свойства тройных комплексов при переходе от природного кофермента к аналогам, были исследованы тройные ингибиторные комплексы с оксаматом и восстановленной формой кофермента, а также тройные непродуктивные комплексы с пируватом и окисленной формой кофермента. При добавлении оксамата форма разностных спектров ЛДГ — NADH и ЛДГ — NHDH не изменяется, однако интенсивность спектральных изменений возрастает (см. рис. 2, соответственно кривые 3, 5 и 2, 4). В спектрах КД комплексов с NADH и NHDH при добавлении оксамата наблюдается коротковолновый сдвиг максимума положительной полосы и увеличение ее интенсивности (см. рис. 3, кривые 1, 2 и 5, 6), а спектр КД комплекса ЛДГ — NHADH, так же как и его разностный спектр, не изменяется (см. рис. 2 и 3).

Прочность тройных комплексов с оксаматом оценивали, определив величины констант ингибирования K_i в реакции восстановления пирувата. Оксамат является аналогом пирувата и проявляет конкурентный по отношению к субстрату характер ингибирования. Величины K_i находили из зависимости начальной скорости реакции восстановления пирувата от концентрации последнего при фиксированной концентрации оксамата (рис. 5). Как видно из данных табл. 2, величины K_i в реакциях с участием NADH и NHDH весьма близки, в то время как ингибирование реакции с участием NHADH выражено слабее. Это позволяет сделать вывод о важной роли заместителя в положении 3 пиридинового цикла в связывании субстратоподобного ингибитора, оксамата.

ЛДГ легко образует непродуктивный тройной комплекс с пируватом, в котором молекула субстрата присоединяется в положение 4 пиридинового цикла кофермента [5]. Формы спектров комплексов NAD — ЛДГ — пиру-

ват и NHD — ЛДГ — пируват совпадают: два максимума в длинноволновой области при 323 и 390 нм. В спектре комплекса NHAD — ЛДГ — пируват имеется только один слабый максимум при 330 нм. Коэффициент молярной экстинкции ϵ тройных комплексов определяли в условиях насыщения ЛДГ коферментом и пируватом. Для NAD и NHD величины ϵ в расчете на субъединицу практически совпадают и составляют $7,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [11]. Для NHAD определить величину ϵ тройного комплекса не удалось, так как при насыщающих концентрациях этого аналога ($> 10^{-3} \text{ M}$) оптическая плотность раствора в присутствии пирувата $5,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ при 330 нм превышает величину, надежно регистрируемую прибором.

Величины K_m и $V_{\text{макс}}$ в прямой и обратной реакциях определяли из концентрационных зависимостей v_0 в координатах Лайнуивера — Берка [12] в условиях насыщения по второму субстрату. При анализе найденных значений (табл. 3) видно, что кажущееся сродство NHD и NHAD , так же как их восстановленных форм, несколько понижено по сравнению с природным коферментом. Величины K_m по отношению к субстратам повышены в случае гидразидного аналога для пирувата в 50 раз, но практически не изменяются в реакциях превращения NHD . Величины $k_{\text{кат}}$ понижены в 10 и 100 раз для NHAD и NHADH , однако, как и следовало ожидать, не изменяются для гипоксантинового аналога. Суммируя данные стационарной кинетики, хотелось бы отметить ослабление прочности связывания субстрата в комплексах, образованных гидразидным аналогом.

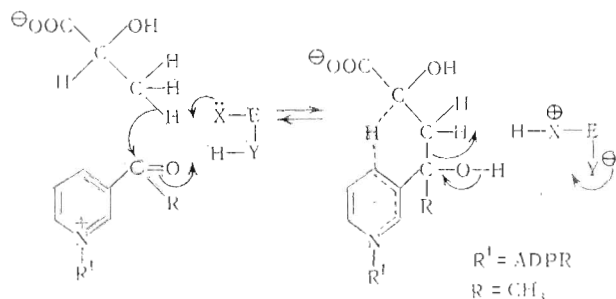
В работах Россмана и соавт. [5] не было отмечено какого-либо взаимодействия карбоксамидной группы NAD с функциональными группами активного центра ЛДГ. Полученные нами данные свидетельствуют о существовании такого взаимодействия, сказывающегося на стадиях образования двойного и тройного комплексов, а также на стадиях, лимитирующих скорость процесса.

Следует рассматривать по крайней мере две возможности участия заместителя в положении 3 пиримидинового цикла кофермента в катализе.

Во-первых, заместитель необходим для осуществления локальных конформационных переходов на различных стадиях каталитической реакции. Переход такого рода обнаруживается методом рентгеноструктурного анализа — при связывании пирувата или оксамата с комплексом ЛДГ — NAD симметрия молекул белка изменяется с 2 на 222 [13].

Во-вторых, заместитель образует связь с молекулой субстрата. Ди-Сабато [14] были приведены доказательства взаимодействия в тройном непродуктивном комплексе метильной группы пирувата с ацетильной группой аналога NAD . В том случае, если в тройном непродуктивном и реакционноспособном комплексах способ связывания молекулы субстрата сходен, метильная группа субстрата направлена в сторону карбонильной группы заместителя в положении 3, что обеспечивает ориентацию, необходимую для катализа.

Взаимодействие субстратов в промежуточном комплексе облегчается существованием шестичленного цикла, в котором обратимо происходит «внутримолекулярный» перенос гидрид-иона. Образование связи $\text{C}-\text{S}$, протекающее, по предположению Ди-Сабато, по механизму реакции аль-



дольной конденсации, должно происходить с участием функциональной группы фермента путем акцептирования Н-атома метильной группы субстрата и образования Н-связи с О-атомом карбонильной группы фермента.

Очевидно, в случае NHAD наличие двух атомов азота в гидразидной группе уменьшает нуклеофильность атома углерода, и результатом является уменьшение прочности связи с молекулой субстрата.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты NAD, NADH, пирувата натрия, ЛДГ мышц свиньи фирмы «Reanal» (Венгрия). Из кристаллического препарата ЛДГ выделяли изофермент M_4 путем хроматографии на СМ-целлюлозе по методу Ечаи [15]. Концентрацию активных центров в молекуле тетрамера ЛДГ определяли в соответствии с методом Хольбрука [16]. В качестве препарата β -NAD-трансгликозидазы (NADаза) использовали микросомальную фракцию селезенки свиньи с удельной активностью 6,6 мкат.

При определении концентрации веществ использовали следующие коэффициенты: ЛДГ 1,29 $E_{230}^{0,1\%}$ [15]; NADH ϵ — $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, 340 нм; NAD ϵ — $17,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, 259 нм; NHDH ϵ — $6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, 338 нм. NHD получали путем дезаминирования NAD [17].

Для синтеза NHAD использовали ферментативный метод Каплана [18]; NDA $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ и гидразид никотиновой кислоты $1,0 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ инкубировали при pH 7,2 в присутствии NADазы, после чего белки осаждали 50%-ной трихлоруксусной кислотой, из надосадочной жидкости ацетоном при 0° осаждали смесь нуклеотидов, которую разделяли на DEAE-целлюлозе в условиях возрастающего градиента 0,005—0,01 M триэтиламинокарбонатного буфера (pH 7,8).

Фракции, содержавшие NHAD, обессоливали на сефадексе G-10. Выход NHAD — 5—10%. Препараты NHD и NHAD были гомогенны при БХ в системе этанол — 0,1 M уксусная кислота (9 : 1) и при электрофорезе на бумаге в 0,005 M фосфатном буфере (pH 7,2) при градиенте напряжения 20 В/см. Восстановленные формы динуклеотидов получали действием дитионита натрия [19] и затем хроматографировали на DEAE-целлюлозе в условиях элюции 0,1 M фосфатным буфером.

Количество восстановленного динуклеотида определяли реакцией с феррицианидом калия [20]. Величина ϵ для NHADH составляла $6,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при 337 нм и $1,75 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ при 260 нм.

УФ-спектры регистрировали на двухлучевом приборе «Pye-Unicam» SP-800 (Англия). Для более точного измерения малых величин оптической плотности (D) применяли шкалу 0—0,1 ОЕ (20 см) с использованием выносного самописца SP-22. Кинетические опыты проводили либо на приборе SP-800, либо на анализаторе скорости реакций LKB-4200 А (Швеция) на шкале 0—0,05 ОЕ (20 см) с самописцем LKB-6500 при 35°. Спектры КД снимали на приборе «Jasco» ORD/UV-5 (Япония). Разностные спектры снимали методом сдвоенных кювет [21]. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре «Hitachi» (Япония) с самописцем QPD₃₃.

Определение величин констант диссоциации (K_d) аддуктов динуклеотидов с SO_3^{2-} -ионом проводили двумя методами, изучая зависимость оптической плотности раствора при 320 нм от концентрации Na_2SO_3 . Концентрация динуклеотида составляла $\sim 10^{-4} \text{ M}$, концентрация Na_2SO_3 изменялась от $2,5 \cdot 10^{-2}$ до 0,5 M.

В соответствии с методом Пфлайдерера и соавт. [22] величина K_d равна концентрации Na_2SO_3 при отношении [динуклеотид]/[аддукт SO_3^{2-}], равном 1. При $[\text{NAD}] < K_d$ зависимость D пропорциональна концентрации аддукта от концентрации Na_2SO_3 и выражается уравнением

$$\Delta D = \Delta D_{\infty} \frac{[\text{Na}_2\text{SO}_3]/K_d}{1 + [\text{Na}_2\text{SO}_3]}$$

Кинетические константы реакций окисления — восстановления NAD, NADH и NHD, катализируемых ЛДГ

Кофермент	M	Субстрат	M	ЛДГ (активных центров), M	K_m , M	$k_{кат}$, мин ⁻¹
NAD *	$8,0 \cdot 10^{-5}$ — $5,6 \cdot 10^{-4}$	<i>DL</i> -лактат	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$2,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	$0,7 \pm 0,2 \cdot 10^4$
NADH *	$5,0 \cdot 10^{-3}$	<i>DL</i> -лактат *	$6,0 \cdot 10^{-2}$ — $1,0 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$3,1 \pm 0,2 \cdot 10^{-2}$	
	$6,0 \cdot 10^{-6}$ — $4,0 \cdot 10^{-5}$	Пируват	$4,0 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	$8,3 \pm 0,3 \cdot 10^4$
	$1,1 \cdot 10^{-4}$	Пируват *	$9,0 \cdot 10^{-5}$ — $9,0 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$2,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	
NHAD	$4,9 \cdot 10^{-4}$ — $9,2 \cdot 10^{-4}$	<i>DL</i> -лактат	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$5,0 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \pm 0,4 \cdot 10^2$
	$8,0 \cdot 10^{-4}$	<i>DL</i> -лактат *	$3,0 \cdot 10^{-2}$ — $3,0 \cdot 10^{-1}$	$2,5 \cdot 10^{-9}$	$2,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-1}$	
NHADH *	$2,0 \cdot 10^{-6}$ — $2,6 \cdot 10^{-4}$	Глюкуват	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$3,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	$0,9 \pm 0,3 \cdot 10^3$
	$1,3 \cdot 10^{-4}$	Пируват *	$9,1 \cdot 10^{-4}$ — $9,1 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-9}$	$1,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-2}$	
NHD *	$2,0 \cdot 10^{-4}$ — $3,2 \cdot 10^{-3}$	<i>DL</i> -лактат	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	$0,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$
	$4,0 \cdot 10^{-3}$	<i>DL</i> -лактат *	$2,5 \cdot 10^{-2}$ — $2,5 \cdot 10^{-1}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$1,0 \pm 0,2 \cdot 10^{-1}$	
NHHDH *	$5,0 \cdot 10^{-5}$ — $2,5 \cdot 10^{-4}$	Пируват	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$9,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	$0,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$
	$2,7 \cdot 10^{-4}$	Глюкуват *	$9,1 \cdot 10^{-5}$ — $9,1 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-9}$	$3,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	

* Компонент смеси, по отношению к которому определяли K_m .

где ΔD_{∞} — предельное значение ΔD при $[\text{Na}_2\text{SO}_3] \gg K_d$, которое можно представить в виде:

$$1/\Delta D = 1/\Delta D_{\infty} + (K_d/\Delta D) \cdot (1/[\text{Na}_2\text{SO}_3]).$$

График в координатах $1/\Delta D$ от $1/[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ представляет собой прямую, отсекающую на оси абсцисс величину $-1/K_d$.

Определение величин K_d двойных комплексов ЛДГ — динуклеотид проводили по тушению флуоресценции белка при добавлении кофермента в восстановленной форме, исследуя зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации динуклеотида [23].

Опыты по флуориметрическому титрованию проводили при 21° , добавляя порции раствора по 0,005 мл восстановленной формы кофермента ($\sim 10^{-6}$ М) в кювету, содержащую 3 мл раствора ЛДГ ($3,0 \cdot 10^{-8}$ М). Изменение объема в кювете к концу титрования не превышало 2%. Флуоресценцию белка возбуждали светом с длиной волны 290 нм, наблюдая эмиссию при 340 нм. Ширина щели пучка возбуждения 10 нм, эмиссии — 20 нм. Результаты опытов выражали в координатах $I_0/(I_0 - I)$ от $1/[\text{динуклеотид}]$. Прямая отсекает на оси абсцисс величину $-1/K_d$.

Окислительно-восстановительные реакции, катализируемые ЛДГ, проводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0). Начальные участки кинетических кривых реакций восстановления пирувата, как правило, были линейны. Реакцию окисления лактата проводили в присутствии 0,05 М семикарбазида. Величины v_0 находили как тангенс угла наклона линейного участка или угла, образуемого касательной к начальному участку, отличающегося от линейного. Величины V относили к единице концентрации активных центров фермента, принимая молекулярный вес ЛДГ равным 140 000.

Авторы благодарят Б. И. Курганова за помощь при расчете констант диссоциации, В. М. Гуревича и Н. П. Сугрובה за плодотворное обсуждение работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Colowick S. P., I Van Eys, Park I. (1966) *Comprehensive Biochem.*, **14**, 1—98.
2. Biellmann J. K., Jung M. I. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **19**, 130—133.
3. Biellmann J. K., Jung M. I. (1970) *FEBS Lett.*, **4**, 199—201.
4. Sarma R. H., Kaplan N. O. (1970) *Biochemistry*, **7**, 557—567.
5. Adams M. I., Buehner G., Chandrasekhar K., Ford G., Hackert M., Liljas A., Rossmann M., Smiley I., Allison W., Everse I., Kaplan N., Taylor S. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 1968—1972.
6. Пюльман Б., Пюльман А. (1965) *Квантовая биохимия*, стр. 425, «Мир», М.
7. Fisher M., Adija D. L., Cross D. (1969) *Biochemistry*, **8**, 4424—4430.
8. Гуревич В. М., Курганов Б. И., Сугрובה Н. П., Яковлев В. А. (1972) *Биохимия*, **37**, 1023—1025.
9. Stinson R. A., Holbrook J. J. (1973) *Biochemistry*, **131**, 719—728.
10. Anderson B. M., Ciotty C., Kaplan N. O. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1219—1226.
11. Сугрובה Н. П., Курганов Б. И. (1972). *Молекулярн. биология*, **6**, 274—290.
12. Lineweaver H., Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 658—660.
13. Rossmann M., Adams M., Buehner G., Ford M., Hackert M., Lentz P., McPherson., Smiley I. (1971) *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 179—191.
14. Di Sabato G. (1971) *Biochemistry*, **10**, 395—401.
15. Ecsai G. (1961) *Acta physiolog. Acad. scient. hung.*, **20**, 339—342.
16. Holbrook J. J. (1966) *Biochemistry Z.*, **344**, 141—144.
17. Kaplan N. O., Colowick C. (1952) *J. Biol. Chem.*, **194**, 579—592.
18. Anderson B. M., Kaplan N. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1226—1231.
19. Scott T., Spenser R., Leonard N., Weber. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 687—695.
20. Schellenberg K. A., Hellerman L. (1958) *J. Biol. Chem.*, **231**, 547—556.
21. Swaney J. (1971) *Anal. Biochem.*, **43**, 388—393.
22. Pfeleiderer G., Sann E., Stok A. (1960) *Chem. Ber.*, **93**, 3083—3099.
23. Luisi P. L., Oiotnucki A., Baici A., Karlovic D. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4100—4106.

Поступила в редакцию
9.XII.1974

LACTATE DEHYDROGENASE INTERACTION WITH NAD ANALOGS:
NICOTINOYLHYDRAZIDE ADENINE- AND NICOTINAMIDE
HYPOXANTHINE DINUCLEOTIDES

TSETLIN L. G., KALACHEVA N. I., MAL'TSEV N. I.,
SHCHORS E. I., YAKOVLEV V. A.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

The coenzyme activity of NAD, nicotinoylhydrazide adenine- and nicotinamide hypoxanthine dinucleotides in LDH-catalyzed reaction was examined. The formation of binary and ternary complexes was followed by spectral methods. For binary complexes of reduced dinucleotides K_{diss} values were measured and the kinetic parameters of redox reactions were found. The efficiency of substrate binding in ternary complexes was evaluated.
