



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.158.347.02

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНАЛОГОВ КОФЕРМЕНТОВ И СУБСТРАТОВ
В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

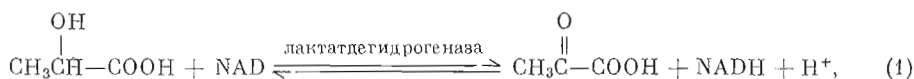
Мальцев Н. И.

Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва

Проведен анализ данных по взаимодействию лактатдегидрогеназы с аналогами кофермента и субстратов. Строение активного центра лактатдегидрогеназы в тройных комплексах, по-видимому, определяется свойствами молекулы субстрата и пиридиновой части кофермента. Амидная группа кофермента образует водородные связи с группами активного центра. Это взаимодействие, различное в лактатном и пируватном конформерах фермента, определяет строение субстратсвязывающего участка и скорость конформационной перестройки, лимитирующей скорость реакции, а также оказывает влияние на положение группы-тушителя флуоресценции кофермента. Протонирование тройных комплексов, образованных ингибитором и коферментом в восстановленной форме, не зависит от свойств заместителя в положении 3 пиридинового цикла и способности α -заместителя субстрата образовывать водородную связь. Каждая функциональная группа субстрата взаимодействует с активным центром лактатдегидрогеназы, организуя полипептидные фрагменты в систему, оптимальную для катализа.

В последние годы в области изучения механизма действия NAD-зависимых дегидрогеназ проведены обширные исследования. Получены новые данные о строении активных центров, о природе каталитических групп, расположении кофермента и субстрата на ферменте. Весьма подробно изучена лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27).

Росман с сотр. [1, 2] выполнили серию работ методом рентгеноструктурного анализа с высоким разрешением и описали строение двойного комплекса лактатдегидрогеназа·NAD и тройных комплексов: непродуктивного — лактатдегидрогеназа·NAD·пируват и ингибиторного — лактатдегидрогеназа·NAD·оксамат. Предполагается, что в тройном комплексе (рис. 1) кофермент связывается в «развернутой» конформации, в которой пиридиновый и пуриновый циклы удалены друг от друга. В реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой (1), водород переносится в виде гидрид-иона:



что подразумевает непосредственный контакт в активном центре субстрата и кофермента, поэтому авторы расположили молекулу субстрата в области атома $\text{C}_{(4)}$ пиридинового цикла кофермента. В каталитическом центре лактатдегидрогеназы находятся полярные группы, участвующие в связи

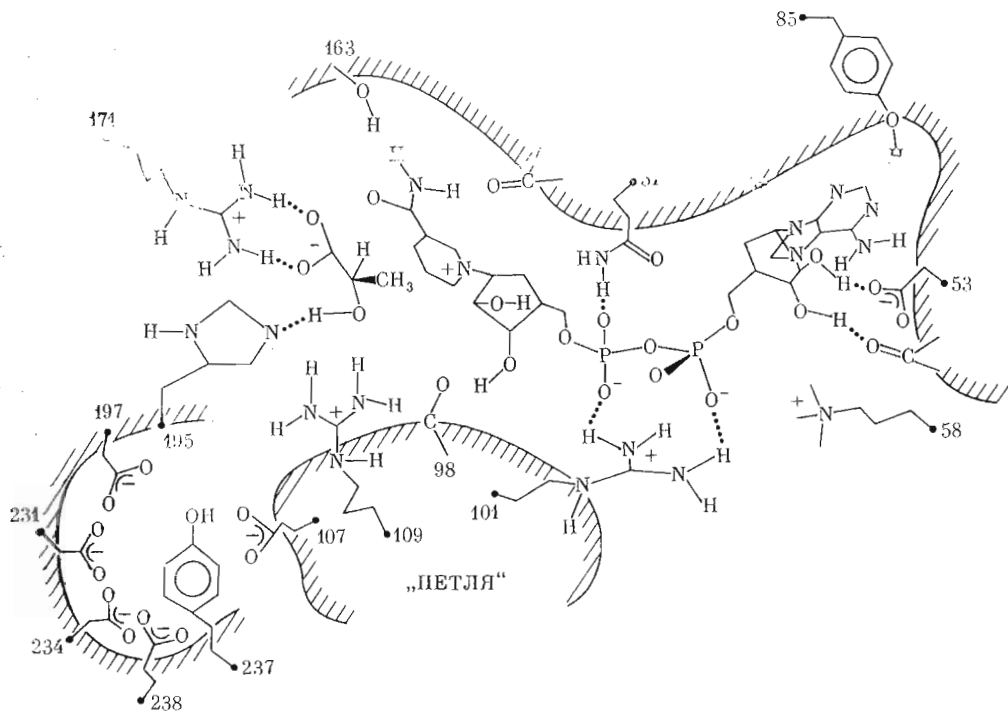
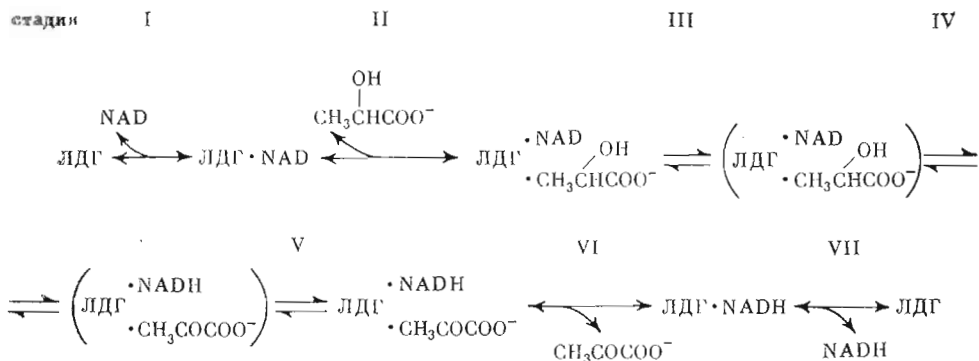


Рис. 1. Гиотетическое строение реакционноспособного комплекса лактатдегидрогеназы с NAD·лактатом [6]

ваний и катализе: остатки Arg¹⁰⁹, Arg¹⁷¹, Arg¹⁰¹, Glu¹⁰², Asn¹⁴⁰, а также существенный остаток His¹⁹⁵, способный играть роль донора-акцептора H⁺ в ходе реакции.

Изучение реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой, методом «остановленного потока» позволило определить положение лимитирующих стадий в реакциях окисления лактата и восстановления пирувата [3, 4]. Связывание кофермента и субстрата происходит быстро, в то время как диссоциация NADH в некоторых случаях — самая медленная стадия (схема). В реакциях восстановления пирувата лимитирующая стадия заключается в изомеризации тройного комплекса лактатдегидрогеназа ·NADH·пируват (стадия V), а в реакции окисления лактата лимитирующая стадия следует до или после диссоциации пирувата (стадия V или VI).



Кинетический механизм реакций, катализируемых ЛДГ [4]

Последовательное связывание в активном центре дегидрогеназы кофермента и субстрата сопровождается обширными конформационными изменениями белка [1, 2]. В результате образуется система, спонтанно претерпевающая конформационные перестройки, которые приводят к активации субстратов и переносу водорода.

Одна из важных задач в изучении механизма действия этого фермента состоит в получении данных, характеризующих строение тройных комплексов последовательно на каждой стадии реакции по мере приближения системы к переходному состоянию. При этом сведения о взаимодействии функциональных групп кофермента и субстрата с группами белка могут быть получены методом субстратно-ингибиторного анализа.

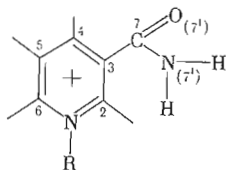
Проводившееся нами в течение ряда лет детальное исследование взаимодействия с лактатдегидрогеназой аналогов кофермента и субстратов позволило сделать выводы об особенностях строения активного центра в прямой и обратной реакциях, о роли функциональных групп субстратов на различных стадиях катализа.

Аналоги коферментов

Наибольший интерес представляло модифицирование пиридиновой части кофермента, поскольку она является донором-акцептором водорода.

Вопрос о взаимодействии амидной группы кофермента с группами белка оставался до настоящего времени неясным, поскольку в работах, выполненных методом рентгеноструктурного анализа, на него не дается четкого ответа. В двойном комплексе лактатдегидрогеназа·NAD, по мнению авторов, отсутствует какое-либо взаимодействие амидной группы кофермента и групп белка [5]. Не было такое взаимодействие обнаружено также в тройном комплексе лактатдегидрогеназа·NAD·пируват [5], а выдвинутые на этот счет предположения оказались противоречивы [1, 6]. Возможно, это объясняется трудностями в определении ориентации амидной группы относительно пиридинового цикла в комплексах дегидрогеназы даже при разрешении 2,0 Å [5].

Проведенный нами анализ атомной модели активного центра лактатдегидрогеназы, собранной по координатам α -атомов углерода, опубликованным для комплекса лактатдегидрогеназа·NAD·пируват [1], показал, что, вращая амидную группу по связи $C_{(3)} - C_{(7)}$, можно выбрать такие ее положения, которые объясняют роль этого заместителя в катализе. Если двугранный угол между плоскостями амидной группы и пириди-



нового цикла составляет менее 15° , а атом $O_{(7')}$ направлен в сторону $C_{(4)}$, легко проследить водородную связь с β -амидной группой остатка Asn^{166} , находящегося в N-концевой части фрагмента $\alpha 2F$ субъединицы [1]. При восстановлении пиридинового цикла расположение амидной группы при $C_{(3)}$ несколько изменяется и становится возможным образование также прочной водородной связи между атомами $N_{(7')}$ и карбонильной группой остатка Pro^{139} или Leu^{137} , расположенных в C-концевой части фрагмента βE [1] (рис. 2). Взаимодействующие группы располагаются с учетом вандер-ваальсовых радиусов таким образом, что углы между связями не превышают $15-20^\circ$, а межатомные расстояния составляют 2,5—3,0 Å. Таким образом, амидная группа кофермента способна образовать прочные водородные связи с группами активного центра, причем во взаимодействии участвуют, по-видимому, оба гетероатома заместителя.

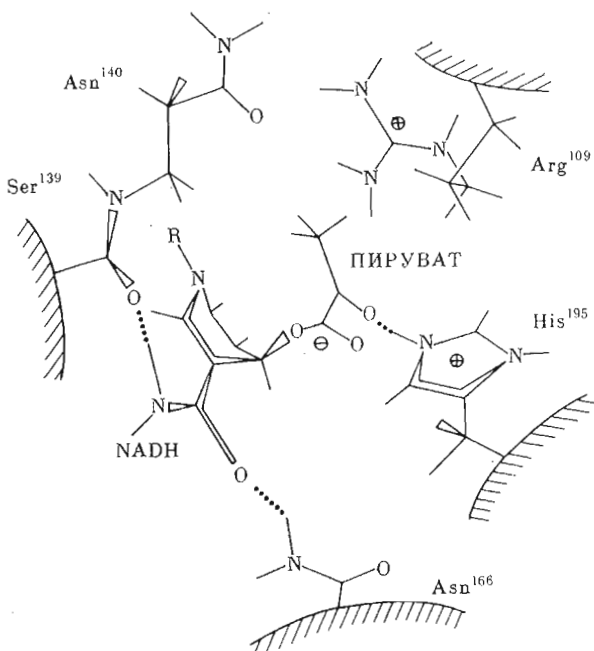


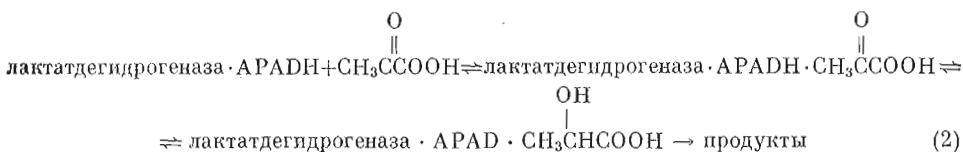
Рис. 2. Взаимодействие амидной группы NADH с группами белка в «пируватном» конформере ЛДГ

Использование аналогов NAD, содержащих различные заместители при $C_{(3)}$ (амидная группа),* дало возможность охарактеризовать его роль на различных стадиях реакции.

Нами были исследованы следующие аналоги NAD: (3-ацетилпиридин)-адениндинуклеотид (APAD), (пиридин-3-альдегид)-адениндинуклеотид (PAAD) и (никотиноилгидразид)-адениндинуклеотид (аналог I). Интерпретация результатов основывалась на сходстве и различии в свойствах амидной, ацетильной, формильной и гидразидной групп.

Поскольку авторы рентгеноструктурных исследований высказывали сомнение относительно существования связи между атомом $N_{(1)}$ пуринового цикла NAD и функциональными группами лактатдегидрогеназы [1], нами было проведено также изучение никотинамид-гипоксантиндинуклеотида (аналог II).

Обсуждая результаты изучения кинетики реакций превращения аналогов NAD в стационарных условиях (табл. 1), следует иметь в виду сложность механизма реакций и возможность изменения положения лимитирующей стадии в зависимости от строения аналога. Этот вопрос был изучен нами на примере реакций окисления APADH (2):



Опыты методом «остановленного потока» проводили, смешивая растворы комплекса лактатдегидрогеназа·APADH и пирувата и наблюдая изменение оптической плотности раствора при 358 нм. Выполнялись условия, когда фермент совершает один оборот, т. е. при [лактатдегидрогеназа] > [APADH] и в стационарных условиях. При выражении результатов в полулогарифмических координатах по методу Гугенхайма [7] (рис. 3) была получена прямая, что указывает на протекание реакции пер-

Кинетические параметры реакций превращения NAD и его аналогов в стационарных условиях

Кофактор, субстрат	K_m , M	$k_{кат}$, мин ⁻¹	Литература
NAD	$(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(8,0 \pm 2,0) \cdot 10^3$	[11]
Лактат	$(9,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$		
NADH	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(8,0 \pm 3,0) \cdot 10^4$	[11]
Пируват	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$		
РААД	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(8,6 \pm 3,0) \cdot 10^3$	[20]
Лактат	$(2,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-2}$		
РААДН	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^2$	[20]
Пируват	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$		
АРАД	$(8,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(8,5 \pm 2,0) \cdot 10^2$	[11]
Лактат	$(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$		
АРАДН	—	$(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$	[11]
Пируват	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$		
Аналог I	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^2$	[21]
Лактат	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$		
Аналог I (восстановл.)	$(3,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(9,0 \pm 0,5) \cdot 10^2$	[21]
Пируват	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$		
Аналог II	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(9,0 \pm 3,9) \cdot 10^3$	[21]
Лактат	$(1,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-1}$		
Аналог II (восстановл.)	$(9,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}$	$(9,0 \pm 3,0) \cdot 10^3$	[21]
Пируват	$(3,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$		

вого порядка. Величина константы скорости, аппроксимированная к бесконечно большим концентрациям пирувата, равна $37 \pm 4 \text{ с}^{-1}$, а величина $k_{кат}$, определенная для реакции (2) в стационарных условиях, составила $48 \pm 2 \text{ с}^{-1}$ (рис. 4). Хорошее совпадение констант скорости указывает на лимитирование процесса в условиях одного оборота и стационарных условиях одной и той же стадией.

При выполнении опытов в условиях одного оборота можно исключить из рассмотрения стадии связывания кофермента и диссоциации продуктов реакции. Наиболее медленная стадия может представлять собой перенос водорода, связывание пирувата либо изомеризацию тройного комплекса лактатдегидрогеназы · АРАДН · пируват. В том случае, если перенос водорода — самая медленная стадия, должен наблюдаться кинетический изотопный эффект при использовании АРАДН, содержащего в положении 4 А дейтерий (АРАДД), так, как это наблюдается в реакциях, катализируемых алкогольдегидрогеназой [8]. Скорость реакции окисления АРАДН и АРАДД практически совпадает, т. е. изотопный эффект отсутствует и перенос водорода не является лимитирующей стадией.

Очевидно, что, если бы связывание пирувата было лимитирующей стадией, наблюдалась бы линейная зависимость скорости реакции от концентрации пирувата. Как видно из рис. 4, эта зависимость представляет собой гиперболическую кривую; следовательно, связывание пирувата не является лимитирующей стадией. Реакция (2) лимитируется, таким образом, стадией изомеризации тройного комплекса так же, как это происходит в реакции окисления NADH. Один и тот же кинетический механизм реакций лактатдегидрогеназы выполняется, очевидно, при использовании NADH и его аналогов.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, величины K_m и $k_{кат}$ в реакциях превращения NAD и РААД в основном сходны. Существенное различие наблюдается в реакции восстановления пирувата — в величинах $k_{кат}$ и K_m по отношению к NADH — РААДН. Из сопоставления величин

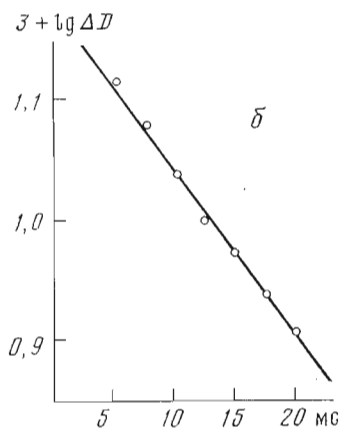
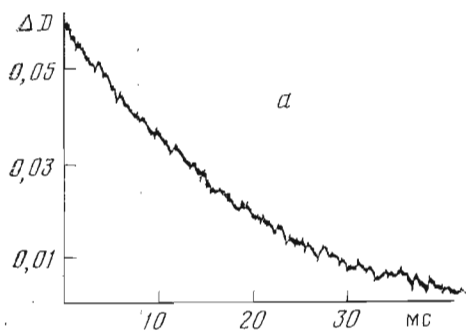


Рис. 3

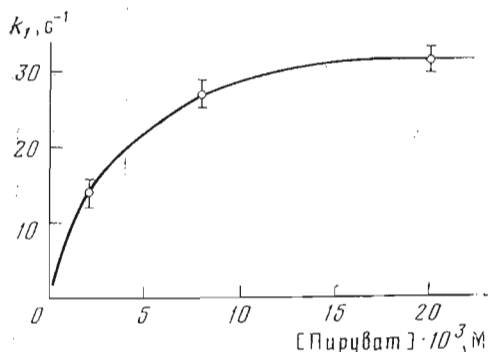


Рис. 3. Кинетика реакций окисления АРАДН в условиях одного оборота лактатдегидрогеназы. *a* — запись хода реакции на осциллографе, *б* — определение k_1 скорости реакции по методу Гугенхайма [7]

Рис. 4. Зависимость константы скорости первого порядка k_1 реакции АРАДН + пируват → от концентрации пирувата

Рис. 4

$K_{\text{дисс}}$ комплексов лактатдегидрогеназа · NADH и лактатдегидрогеназа · РААДН (табл. 2) следует, что NADH и РААДН связываются одинаково эффективно. Таким образом, единственное различие в субстратных свойствах между NADH и РААДН заключается в уменьшении максимальной скорости реакции восстановления пирувата в 400 раз.

Формильная группа РААДН способна образовывать водородную связь только с остатком Asn¹⁶⁶ в отличие от амидной группы NADH. Это различие сказывается исключительно на стадии изомеризации тройного комплекса. Связь с остатком Asn¹⁶⁶ карбонильной группы заместителя постоянна в комплексах, образованных NADH и РААДН, а ее образование является достаточным условием для прочного связывания кофермента и нормального формирования субстратсвязывающего участка.

При сравнении кинетических параметров реакций превращения NAD и АРАД видно, что изменяются многие константы реакций: уменьшается

Таблица 2

Величины констант диссоциации ($K_{\text{дисс}}$) комплексов лактатдегидрогеназы с восстановленным коферментом [11, 20, 21]

Кофермент	$K_{\text{дисс}}$, М	Кофермент	$K_{\text{дисс}}$, М
NADH	$(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	Аналог I (восстановл.)	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$
РААДН	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	Аналог II (восстановл.)	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$
АРАДН	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$		

прочность не только двойных, но и тройных комплексов, замедляются реакции окисления лактата и восстановления пирувата. Ацетильная группа APADH может испытывать влияние боковых цепей остатков Pго¹³⁹ и Leu¹³⁷, в результате чего увеличивается прочность комплекса с ферментом (см. табл. 2). Связь карбоильной группы заместителя с остатком Asn¹⁶⁶ сохраняется, однако силы гидрофобного взаимодействия с неполярным локусом вызывают смещение дигидропиридинового цикла кофермента и изменение структуры активного центра. Аналогичный вывод можно сделать при рассмотрении взаимодействия гидразидной группы аналога I с группами активного центра. В этом случае также изменяется прочность не только двойных, но и тройных комплексов.

При образовании тройных комплексов происходит удаление части воды из области активного центра лактатдегидрогеназы, а остающаяся вода обладает, вероятно, особыми свойствами вследствие гидрофобного окружения. В активных центрах алкогольдегидрогеназы и малатдегидрогеназы молекулы воды, координированные с ионом металла, играют роль реактивных групп [9, 10]. В активном центре лактатдегидрогеназы молекулы воды могут образовывать мостик водородных связей между субстратом и остатком His¹⁹⁵. Заместитель в положении 3 пиридинового цикла расположен в непосредственной близости к каталитическому центру, поэтому изменение его полярности влияет на количество воды и ее структуру. Так, метильная группа заместителя в молекуле ацетильного аналога может способствовать образованию неполярной области и выталкиванию воды.

В комплексах, образованных ацетильным аналогом, изменяется прочность связывания лактата и пирувата, причем лактат связывается более прочно в комплексах лактатдегидрогеназа·APAD·лактат и лактатдегидрогеназа·APADH·лактат, а пируват и оксамат — менее прочно в комплексах лактатдегидрогеназа·APADH·пируват и лактатдегидрогеназа·APADH·оксамат [11]. Эти факты соответствуют выводу о том, что заместитель при C₍₃₎ различным образом участвует в организации субстрат-связывающего участка «лактатного» и «пируватного» конформеров.

Следует отметить, что в комплексах с PAADH средство субстратов не изменяется, т. е. связь заместителя при C₍₃₎ с остатком Asn¹⁶⁶ играет решающую роль в строении субстратсвязывающего участка.

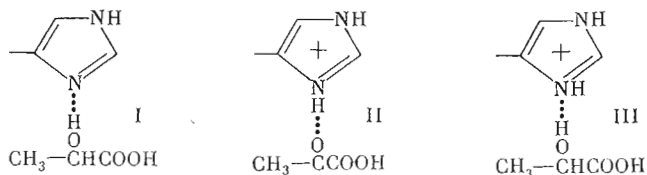
Кинетические параметры реакций превращения аналога II и NAD существенно различны. Изменяются свойства двойных и тройных комплексов, скорость реакции на лимитирующих стадиях. Это, вероятно, объясняется взаимодействием атома N₍₁₎ пуринового цикла с функциональной группой активного центра. Ослабление связывания лактата в комплексе, образованном аналогом II, свидетельствует о том, что такое взаимодействие оказывает влияние и на строение субстратсвязывающего участка, несмотря на то что этот участок и пуриновый цикл удалены друг от друга на расстояние более 14 Å [1].

Восстановленный аналог II и NADH содержат один и тот же хромофор — остаток дигидроникотинамида. Сравнение спектров кругового дихроизма (см. табл. 3) показывает, что микроокружение в каталитическом центре зависит от свойств «адениновой» части кофермента.

Некоторые свойства комплексов лактатдегидрогеназы, существенные для понимания механизма реакций, до сих пор не нашли структурного обоснования. Одним из таких свойств является увеличение флуоресценции NADH на стадии образования тройного комплекса. Отсутствие какой-либо специфичности по отношению к аналогу лактата (оксалату, ряду карбоновых кислот [12]) позволяет рассматривать увеличение интенсивности флуоресценции как результат общей во всех случаях конформационной перестройки. Такая перестройка лактатдегидрогеназы наблюдается при изучении кристаллических комплексов, она приводит к сжатию молекулы фермента и понижению полярности среды каталитического центра.

[1]. Предполагалось, что уменьшение интенсивности флуоресценции при связывании аналогов пирувата [12] происходит в результате поляризации дигидропиридинового цикла кофермента под влиянием группы-тушителя.

Другая важная особенность комплексов лактатдегидрогеназы заключается в изменении их ионного состояния при связывании субстрата. Из данных рН-зависимости величин K_m по отношению к лактату и пирувату [13] следует, что при связывании субстрата изменяется рК существующего гистидина, причем стабилизируется та ионная форма имидазольного цикла, которая образует водородную связь с субстратом (I или II)



Прочность комплекса лактатдегидрогеназа·NADH·лактат уменьшается с повышением рН так же, как и комплекса лактатдегидрогеназа·NADH·пируват. Поскольку водородная связь типа III маловероятна, вывод о стабилизации формы имидазольного цикла гистидина субстратом кажется необоснованным, а механизм изменения ионного состояния His¹⁹⁵, как одной из стадий реакции, остается неясным.

Определяет ли амидная группа кофермента расположение группы-тушителя в активном центре, а также участвует ли в изменении ионного состояния остатка гистидина, представлялось возможным изучить, используя аналоги NAD.

При взаимодействии оксамата с комплексами лактатдегидрогеназа·NADH и лактатдегидрогеназа·APADH происходит тушение флуоресценции кофермента (табл. 3). Очевидно, что группа-тушитель занимает одинаковое положение относительно дигидропиридинового цикла в результате взаимодействия заместителя с полипептидным фрагментом, содержащим остатки Asp¹⁶⁶ и Pro¹³⁹.

Таблица 3

Спектральные характеристики динуклеотидов и их комплексов с лактатдегидрогеназой [11, 20, 21]

Соединение	Спектры поглощения		Спектры флуоресценции	
	λ , нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$, M ⁻¹ ·см ⁻¹	λ , нм	квантовый выход, q
APADH	363	9,1	450	0,013
APADH·ЛДГ	354	8,8	442	0,18
ЛДГ·APADH·оксамат	358	8,5	442	0,0039
ЛДГ·APADH·лактат	356	8,8	444	0,635
РАADH	358	9,3	460	0,00022
ЛДГ·РАADH	355	9,9	440	0,0075
ЛДГ·РАADH·оксамат	353	9,2	435	0,017
ЛДГ·РАADH·лактат	355	9,9	440	0,023
NADH	340	6,2	455	0,02
ЛДГ·NADH	334	6,1	440	0,042
ЛДГ·NADH·оксамат	334	5,8	440	0,003
ЛДГ·NADH·лактат	334	6,1	430	0,08
Аналог I (восстановл.)	337	6,2	—	—
ЛДГ·(аналог I)	337	7,2	—	—
ЛДГ·(аналог I)·оксамат	337	7,2	—	—
Аналог II (восстановл.)	338	6,0	—	—
ЛДГ·(аналог II)	334	5,3	—	—
ЛДГ·(аналог II)·оксамат	334	5,0	—	—

Примечание. Величины ϵ_m приведены с точностью до 10%, величины λ — с точностью до 1 нм.

Изменение ионного состояния комплексов лактатдегидрогеназы при связывании второго субстрата

Комплекс	Субстрат	pH исходного раствора	Выделение (+) или поглощение (-) протона	[H ⁺]/[ЛДГ]
ЛДГ·NADH	Оксамат	6,5	—	0,4±0,1
ЛДГ·NADH	»	8,1	—	1,0±0,2
ЛДГ·PAADH	»	8,1	—	0,8±0,1
ЛДГ·NAD	Тиолактат	6,0	+	0,7±0,1
ЛДГ·NADH	»	6,0	—	0,15±0,03

Интенсивность флуоресценции PAADH при связывании оксамата с комплексом лактатдегидрогеназа·PAADH не уменьшается, а увеличивается, по-видимому, вследствие изменения положения группы-тушителя по сравнению с комплексом лактатдегидрогеназа·NADH·оксамат. Следует предположить, что связь заместителя при C₍₃₎ с остатком Pro¹³⁹ определяет положение этой группы. Остаток His¹³⁵ не может играть роль группы-тушителя, так как его ориентация и заряд одинаковы в комплексах, образованных NADH и PAADH. Этот вывод следует из факта восстановления пирувата в реакциях с обоими нуклеотидами.

Из рассмотрения атомной модели следует, что группой-тушителем может быть остаток Arg¹⁰⁹, расположенный в подвижной «аргининовой» петле и сближенный с каталитическим центром.

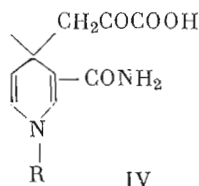
Так как заместитель при C₍₃₎ оказывает влияние на свойства комплексов этого фермента, следует иметь в виду возможность его участия в изменении ионного состояния гистидина активного центра. Аналоги APADH и PAADH подобно NADH окисляются в реакции с пируватом, поэтому во всех случаях остаток гистидина должен быть протонирован. О вынужденном протонировании комплексов лактатдегидрогеназа·NADH и лактатдегидрогеназа·PAADH свидетельствуют данные, полученные нами при смешивании растворов этих комплексов и раствора оксамата. Из среды происходило поглощение H⁺, о чем судили по увеличению pH раствора. Количество поглощенного H⁺ определяли обратным титрованием (табл. 4).

Как видно из соотношения [H⁺]/[ЛДГ], образование тройных комплексов лактатдегидрогеназа·NADH·оксамат и лактатдегидрогеназа·PAADH·оксамат сопровождается протонированием одного аминокислотного остатка на субъединицу.

Таким образом, взаимодействие заместителя при C₍₃₎ с остатком Pro¹³⁹ не играет существенной роли в изменении ионного состояния гистидина и его ориентации относительно реагирующих молекул.

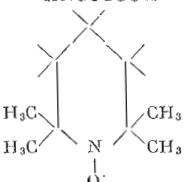
Аналоги пирувата

В непродуктивном тройном комплексе лактатдегидрогеназа·NAD·пируват, изученном Россманом с сотр. [1], молекула субстрата ориентирована в направлении C₍₄₎ пиридинового цикла своей метильной группой и, по-видимому, образует аддукт типа IV.



Такое расположение не соответствует структуре реактивного комплекса лактатдегидрогеназа·NADH·пируват, в котором с пиридиновым циклом

Взаимодействие аналогов пирувата с лактатдегидрогеназой

Пируват или его аналог	K_m , М	$k_{кат}$, мин ⁻¹	K_i , М
CH ₃ COSOON	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(8,3 \pm 0,3) \cdot 10^4$	—
CH ₃ C(=NOH)COOH	—	0	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$
C ₆ H ₅ COSOON	$(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$1,0 \pm 0,2$	—
CH ₃ COSOONCH ₃	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^4$	—
CH ₃ COSOCN ₂	$(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^3$	—
CH ₃ COCH ₃	$> 1,0 \cdot 10^{-1}$	0	—
H ₂ N-COSOON	—	0	$(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$
H ₂ NCOSOOC ₂ H ₅	—	0	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
ПНСОСООН	—	—	—
	—	0	$(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-2}$

сближен α -атом углерода. Возможно, кристаллический непродуктивный комплекс соответствует структурно одной из ранних стадий реакции, и для описания субстратсвязывающего участка реактивного комплекса необходимы дальнейшие поиски.

Нами изучены аналоги пирувата, модифицированные в различных положениях. Модифицируя карбоксильную часть молекулы пирувата, можно получить аналоги, способные восстанавливаться в ферментативной реакции: эфир пирувата и диацетил (табл. 5). По сравнению с пируватом его метиловый эфир имеет несколько более высокую величину K_m и почти неизменную V . Очевидно, аналог связывается в субстратсвязывающем участке так же, как пируват. Этерифицированная карбоксильная группа субстрата, по-видимому, взаимодействует с катионными группами по типу ион-диполь.

По сравнению с эфиром пирувата молекула диацетила менее полярна, в результате чего связывание несколько ослаблено. Тем не менее диацетил ориентирован в активном центре фермента аналогично пирувату, поскольку происходит перенос водорода с дигидропиридинового цикла кофермента. Дальнейшее изменение способа связывания, при переходе от эфира пирувата к диацетилену, приводит к изменению расположения полипептидных фрагментов и снижению скорости конформационной перестройки тройного комплекса в 20 раз.

Карбоксильная группа пирувата обеспечивает высокую прочность связывания, взаимодействуя с полярными группами активного центра, а ацетильная группа диацетила менее эффективно взаимодействует с такими группами.

Ослабление связывания наблюдалось также Майстером при введении в β -положение молекулы пирувата неполярных заместителей [14]. Это возможно в том случае, если вода занимает обширные области активного центра, структура которых существенно важна на стадиях связывания и последующих конформационных перестроек.

Ацетон, пропионат, кетоксим пирувата слабо ингибируют лактатдегидрогеназу. Очевидно, что только наличие в структуре субстрата обеих групп, карбоксильной и карбонильной, делает возможным продуктивное связывание.

При взаимодействии кетоксима пирувата с комплексом лактатдегидрогеназы-NADH наблюдается тушение флуоресценции кофермента, что указывает на нормальное расположение группы-тушителя активного центра относительно дигидропиридинового цикла.

Аналоги лактата

В соответствии с обратимостью реакций, катализируемых лактатдегидрогеназой, связывание лактата происходит в тех же локусах активного центра фермента, что и пирувата. Однако строение субстратсвязывающего участка в комплексе лактатдегидрогеназа·NAD·лактат и лактатдегидрогеназа·NADH·пируват имеет, вероятно, некоторое различие.

Введение в β-положение молекулы лактата фенильного остатка значительно увеличивает сродство к комплексу лактатдегидрогеназа·NAD, причем окисление становится невозможным (табл. 6). Данные, приведенные в работе [15], указывают на ослабление связывания при введении в β-положение молекулы пирувата фенильного остатка. Таким образом, при одинаковой модификации прочность связывания лактата увеличивается, а пирувата уменьшается. Это свидетельствует о различном строении субстратсвязывающего участка в «лактатном» и «пируватном» конформерах.

В комплексе лактатдегидрогеназа·NAD·(Ph-лактат) фенильный остаток может взаимодействовать с неполярными группами, например Tyr²⁴⁵, Val²⁴¹ и Val²⁴⁷, в результате чего увеличивается расстояние между атомом C_(α) аналога субстрата и пиридиновым циклом кофермента (рис. 5). В комплексе лактатдегидрогеназа·NADH·(Ph-пируват) неполярная область занимает иное положение и смещения субстрата не происходит. Связывание ослаблено, поскольку микроокружение имеет полярный характер. Подобными свойствами обладают также фенилгликолевая (миндальная) и фенилглиоксалева кислоты. Фенилгликолевая кислота связывается более прочно по сравнению с гликолевой кислотой, но не способна окисляться, в то время как фенилглиоксалева кислота восстанавливается в ферментативной реакции, но связывается слабо (табл. 6).

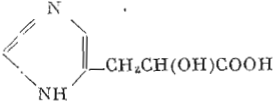
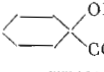
Различие в строении активного центра комплексов лактатдегидрогеназа·NAD·лактат и лактатдегидрогеназа·NADH·пируват, т. е. в «лактатном» и «пируватном» конформерах, объясняется, по-видимому, влиянием пиридинового цикла кофермента. В окисленной форме положительно заряженный пиридиновый цикл вызывает перемещение неполярных остатков в направлении от каталитического центра. При восстановлении пиридинового цикла неполярные остатки сохраняются в непосредственной близости к субстратсвязывающему участку.

Наличие неполярной области в активном центре лактатдегидрогеназы может указывать на генетическую связь с NAD-зависимой редуктазой ароматических кетокислот [16].

Тот факт, что фенилгликолевая кислота не окисляется, хотя и связывается, можно было бы объяснить наличием в каталитическом центре жестких пространственных требований к заместителю при C_(α).

Таблица 6

Величины констант ингибирования (K_i) аналогов лактата в реакциях, катализируемых лактатдегидрогеназой [17]

Аналог лактата	K _i , M	Аналог лактата	K _i , M
HCH(OH)COOH	>1·10 ⁻¹	(CH ₃) ₂ CHCH(OH)COOH	(2,1±0,2)·10 ⁻²
C ₆ H ₅ CH ₂ CH(OH)COOH	(5,0±0,2)·10 ⁻⁴	CH ₃ CH(CH ₃)COOH	(2,0±0,2)·10 ⁻²
C ₆ H ₁₁ CH ₂ CH(OH)COOH	(6,8±0,2)·10 ⁻⁴	(CH ₃) ₂ C(OH)COOH	(1,7±0,2)·10 ⁻²
C ₆ H ₅ CH ₂ CH(OH)COOCH ₃	(2,0±0,2)·10 ⁻³	CH ₃ CH(NH ₂)COOH	>1·10 ⁻¹
	(2,2±0,3)·10 ⁻³ *	CH ₃ CH(SH)COOH	(2,0±0,2)·10 ⁻³
	(1,0±0,2)·10 ⁻² **		(2,0±0,5)·10 ⁻²
CH ₃ (CH ₂) ₆ CH ₂ CH(OH)COOH	(2,2±0,2)·10 ⁻²	C ₆ H ₅ CH(OH)COOH	(2,0±0,2)·10 ⁻²

* pH 8,0. ** pH 6,0.

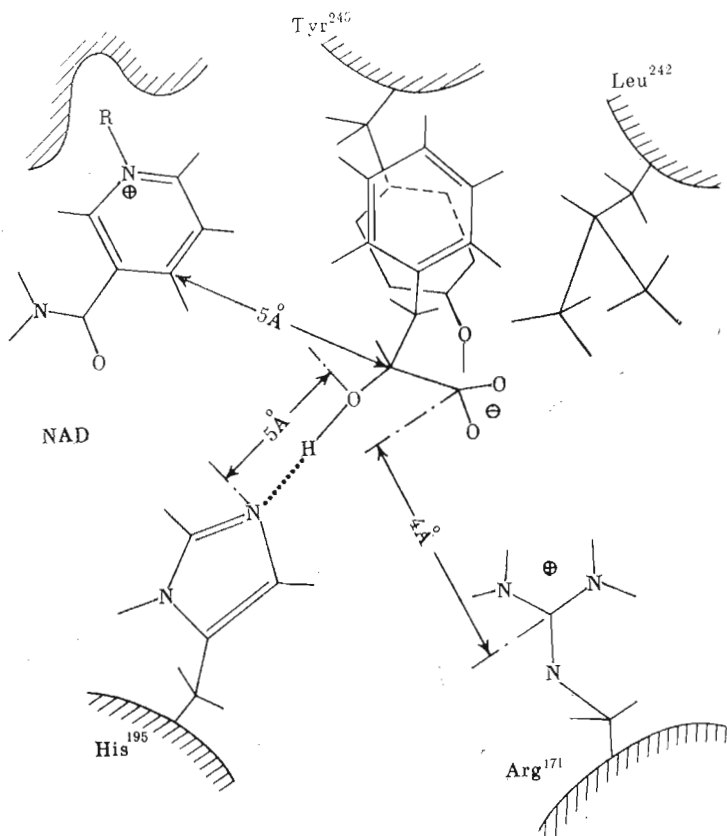


Рис. 5. Схема расположения Ph-лактата в активном центре лактат-дегидрогеназы

Как следует из рассмотрения атомной модели активного центра, боковые цепи ближайших аминокислотных остатков, Glu^{102} , Tyr^{246} , Leu^{167} , Val^{287} удалены от атома $\text{C}_{(\alpha)}$ на расстояние 4—5 Å и не могут препятствовать связыванию фенильного остатка фенилгликолевой кислоты. Другая возможная причина заключается в смещении молекулы этого аналога относительно пиридинового цикла кофермента в направлении неполярной области.

Вопрос об участии в связывании лактата его карбоксильной группы был изучен на примере Ph-лактата. Как видно из констант связывания (табл. 6), этерификация Ph-лактата понижает прочность связывания и, следовательно, ион-ионные взаимодействия карбоксильной группы с катионным локусом субстратсвязывающего участка играют важную роль в связывании.

Изучая аналоги лактата, модифицированные в α -положении, мы стремились выяснить, участвует ли оксигруппа субстрата в связывании. Сравнение величин K_i , определенных для изомазляной, оксиизомазляной, тиомолочной кислот, с величиной K_m по отношению к лактату, не позволяет сделать определенного вывода, однако кривые рН-зависимостей, приведенные на рис. 6 [17], находят объяснение. В случае изомазляной и оксиизомазляной кислот зависимость от рН практически отсутствует, что свидетельствует о связывании этих аналогов без участия группы, имеющей рК ионизации в области рН 6—8.

Интересно, что оксигруппа в молекуле оксиизомазляной кислоты не участвует в связывании, вероятно, в результате смещения молекулы

в участке связывания за счет взаимодействия двух метильных групп аналога с неполярным окружением.

Величины K_i тиомолочной кислоты уменьшаются с повышением pH, т. е. сродство аналога к комплексу лактатдегидрогеназа · NAD увеличивается пропорционально содержанию депротонированной формы функциональной группы с pK 7,0. Роль такой группы может играть существенный остаток His¹⁹⁶ [1]. Таким образом, не только в реакции восстановления пирувата, как показано в работе [4], но и в реакции окисления лактата остаток His¹⁹⁶, по-видимому, участвует в реакции в качестве донора-акцептора протона.

Полученные данные согласуются с результатами опытов по определению количества протонов, выделившихся или поглощенных при связывании аналогов субстрата (табл. 4). Образование комплекса лактатдегидрогеназа · NAD · тиолактат, как и следовало ожидать, сопровождается выделением протонов, поскольку по механизму реакции необходимо образование непротонированной формы гистидина. При связывании тиолактата с комплексом лактатдегидрогеназа · NADH происходило поглощение протонов, хотя образование прочной водородной связи между меркаптогруппой тиомолочной кислоты и протонированным имидазольным циклом гистидина маловероятно.

Зависимость величин $K_{дисс}$ комплекса лактатдегидрогеназа · NADH · лактат, приведенная в работе Хольбука и др. [1], также свидетельствует о протонировании остатка His при связывании лактата.

Таким образом, в комплексах, образованных NAD и NADH, изменение ионного состояния существенного остатка His не определяется свойствами субстрата, а зависит от окислительно-восстановительного состояния пиридинового цикла кофермента. Восстановление пиридинового цикла включает механизм протонирования остатка His.

Заключение

Имеющиеся экспериментальные данные, а также анализ атомной модели активного центра позволяет рассмотреть возможную природу группы-тушителя флуоресценции кофермента, механизм изменения ионного состояния существенного гистидина и конформационную перестройку тройного комплекса лактатдегидрогеназы.

Расположение группы-тушителя относительно дигидропиридинового цикла зависит от свойств субстрата и от взаимодействия заместителя при C₍₃₎ с фрагментом βЕ. При связывании лактата и ряда карбоновых кислот с комплексом лактатдегидрогеназа · NADH увеличивается интенсивность флуоресценции NADH [12], по-видимому, в результате конформационных изменений (сближения полипептидных цепей, вытеснения воды), для осуществления которых в структуре соединения необходимо наличие COOH-группы и алкильного радикала. Ион-ионные взаимодействия играют при этом решающую роль. Оксалат, в структуре которого не содержится алкильного радикала, также вызывает увеличение интенсивности флуоресценции кофермента.

В этих комплексах и в комплексе лактатдегидрогеназа · NADH · пируват группа-тушитель находится в разных положениях. В «пируватном» конформере группа-тушитель сближена с дигидропиридиновым циклом—

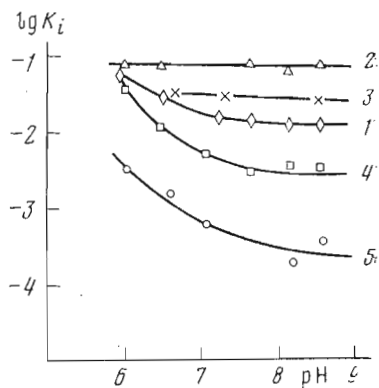


Рис. 6. Зависимость K_m лактата (1) и K_i для α -оксизобутирата (2), изобутирата, (3), α -тиолактата (4) и Ph-лактата (5) от pH [17]

очевидно, в результате взаимодействия группы >C=O пирувата с функциональными группами активного центра.

Рассматривая данные, полученные при изучении коферментных свойств РААДН, можно прийти к выводу, что скорость изомеризации тройного комплекса зависит от положения группы-тушителя. По-видимому, взаимодействие CONH_2 -группы NADH с фрагментом βE необходимо для «правильной» ориентации группы-тушителя в активном центре и одновременно максимальной скорости конформационной перестройки.

Роль группы-тушителя, поляризующей дигидропиридиновый цикл, может играть одна из функциональных групп активного центра, несущая положительный или отрицательный заряд. Какая именно группа, катионная или анионная, установить трудно, однако имеются соображения, что группа-тушитель заряжена положительно. Величины констант равновесия K_p' и K_p'' , соответствующие реакции с использованием каталитических количеств лактатдегидрогеназы [18] и равновесию между тройными комплексами, которое устанавливается в исходный момент реакции [4]

$$K_p' = \frac{[\text{NADH}] \cdot [\text{пируват}]_i}{[\text{NAD}] \cdot [\text{лактат}]} \cong 1 \cdot 10^{-5}$$

$$K_p'' = \frac{[\text{лактатдегидрогеназа} \cdot \text{NADH} \cdot \text{пируват}]}{[\text{лактатдегидрогеназа} \cdot \text{NAD} \cdot \text{лактат}]} \cong 0,5$$

свидетельствуют о значительном изменении реакционной способности коферментов и субстратов при связывании в активном центре этого фермента. В результате поляризации субстратов оказываются близкими величины окислительно-восстановительных потенциалов пар лактат — пируват и NADH — NAD. Для пары NADH — NAD это равносильно тому, что NAD с трудом принимает H^- -ион, а NADH с трудом его отдает. Одна из возможных причин заключается в поляризации дигидропиридинового цикла под влиянием катионной группы активного центра — тушителя флуоресценции. Роль такой группы не может играть остаток His^{195} , который должен занимать одно и то же положение в активном центре, выполняя функцию донора-акцептора H^+ .

Наиболее вероятной группой-тушителем может оказаться остаток Arg^{109} , находящийся в «аргининовой петле» на небольшом расстоянии от пиридинового цикла и легко изменяющий свое положение при образовании комплексов [1].

При окислении дигидропиридинового цикла и переходе активного центра к структуре «лактатного» конформера участок «аргининовой петли» в районе остатка Arg^{109} перемещается в направлении от центра катализа.

То же самое происходит, когда заместитель при $\text{C}_{(3)}$ кофермента утрачивает связь с фрагментом βE , т. е. в комплексах, образованных РААДН.

Рассматривая возможный механизм изменения ионного состояния функциональной группы лактатдегидрогеназы при связывании субстрата, необходимо отметить факторы, вызывающие эти изменения. Все дальнейшие рассуждения справедливы в том случае, если такой группой является остаток His^{195} . Изменение ионного состояния этого остатка происходит до или после связывания субстрата [4].

Изменение ионного состояния остатка His^{195} может происходить под влиянием пиридинового цикла, которое проявляется в тройном комплексе. Так, в комплексах, образованных NADH, при связывании субстрата и независимо от свойств последнего происходит протонирование His^{195} . Для этого нет надобности в образовании H -связи с α -атомом кислорода субстрата. Хотя лактат не может образовать связь с протонированным имидазольным циклом, комплекс лактатдегидрогеназа · NADH · лактат наиболее прочен, если остаток His^{195} протонирован [1]. Связывание и лактата и пирувата ослабляется при депротонировании остатка His^{195} . В комп-

лексе, образованном NADH, пируват может образовать Н-связь, и это одна из причин его более прочного связывания.

Известная рН-зависимость $K_{дисс}$ комплекса лактатдегидрогеназы ·NADH·лактат не может отражать образование водородной связи между субстратом и имидазольным циклом His¹⁹⁵. Эта рН-зависимость требует другого объяснения: например, протонирование остатка His¹⁹⁵ увеличивает прочность связей, образуемых СН₃- и СОО⁻-группами субстрата.

Протонирование остатка His¹⁹⁵ при восстановлении никотинамидного цикла и формировании «пируватного» конформера следует объяснить уменьшением полярности среды активного центра, влиянием ионных функциональных групп (остатков Arg¹⁰⁹, Glu¹⁴⁰ и др.) и амидной группы с фрагментом βЕ и α2F. В «лактатном» конформере остаток His¹⁹⁵ непротонирован в результате влияния положительного заряда никотинамидного цикла.

Механизм конформационной перестройки тройного комплекса лактатдегидрогеназы можно представить следующим образом. При связывании молекула пирувата, по-видимому, располагается между имидазольным циклом остатка His¹⁹⁵ и дигидропиридиновым циклом. На карбоксильную группу влияет не только остаток Arg¹⁷¹, но и находящийся в непосредственной близости остаток Lys²⁵⁰. Первоначально локусом связывания карбоксильной группы в большей степени является остаток Arg¹⁷¹.

Метильная группа пирувата взаимодействует с неполярной областью и дигидропиридиновым циклом. Равнодействующая сил связывания карбоксильной и метильной групп вызывает перемещение пирувата в направлении кофермента. Одновременно полипептидный фрагмент, содержащий остатки 193—198, изменяет свое положение так, что гистидин-195 перемещается вместе с пируватом.

В «лактатном» и «пируватном» конформерах амидная группа кофермента, карбоксильная группа и α-атом кислорода субстрата на всех стадиях реакции образуют связи с активным центром и, вероятно, именно они включают механизм перестройки. В «пируватном» конформере остаток Arg¹⁰⁹ сближен с центром катализа, а его удаление затрудняет стадию изомеризации. Поскольку βG и участок, соединяющий βG и βH (остатки 193—198), подвижны и могут легко изменять свое положение в зависимости от структуры субстрата [19], перемещение этих участков в ходе перестройки весьма вероятно.

В других возможных вариантах конформационной перестройки следует, по-видимому, учитывать возможность перемещения и никотинамидного цикла за счет некоторого «выпрямления» молекулы динуклеотида.

Экспериментальная часть

В работах [11, 17, 20, 21] использовали изофермент M₄ лактатдегидрогеназы, выделенный из кристаллического препарата фермента мышц свиньи (Reanal, Венгрия) хроматографией на СМ-целлюлозе [22].

Кинетические опыты в стационарных условиях проводили так, как описано в работе [11], при рН 7,0 и 35°.

Реакцию восстановления пирувата в условиях одного оборота лактатдегидрогеназы проводили с использованием спектрофотометра (Duglum, США) для изучения быстрой кинетики методом остановленного потока. «Мертвое» время прибора было равно 3 мс. За ходом реакции следили по изменению оптической плотности при 358 нм, которое регистрировали на осциллографе. Реакцию проводили в 0,1 М глициновом буфере, рН 9,0, при концентрациях (М): АРАДН 9,3·10⁻⁶, фермент 5,5·10⁻⁵ активных центров, пируват 2,0·10⁻².

Количество выделившихся или поглощенных Н⁺ при образовании тройных комплексов регистрировали спектрофотометрически при 580 нм с использованием индикатора хлорфенолового красного или потенциомет-

рически с помощью стеклянного электрода G-2222 С на рН-метре РНМ-26 (Radiometer, Дания). Фиксировали изменение рН, происходящее при смешивании растворов, после чего проводили обратное титрование 0,001 н. NaOH или 0,001 н. HCl. Исходные растворы двойного комплекса лактат-дегидрогеназа · кофермент и субстрата содержали одинаковое количество индикатора ($6,0 \cdot 10^{-4}$ М) и не различались по величине рН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Holbrook J. J., Liljas A., Steindel S. J., Rozzmann M. G. (1975) in *The Enzymes*, vol. 11; Part A, pp. 191—292, Acad. Press, N. Y.
2. Chandrasekhar K., McPherson A. J., Adams M. J., Rossmann M. G. (1973) *J. Mol. Biol.*, **76**, 503—513.
3. Stinson R. A., Gutfreund H. (1971) *Biochem. J.*, **121**, 235—240.
4. Whitaker J. R., Yates D. W., Bennett N. G., Holbrook J. J., Gutfreund H. (1974) *Biochem. J.*, **139**, 677—697.
5. Adams M. J., Buehner M., Chandrasekhar K., Ford G. C., Hackert M., Liljas A., Rossmann M. G., Smiley J. E., Allison W. S., Everse J., Kaplan N. O., Taylor S. S. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1968—1972.
6. Eventoff W., Rossmann M. G., Taylor S. S., Torff H., Meyer H., Keil W., Kiltz H. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2677—2681.
7. Guggenheim E. A. (1926) *Phyl. Mag.*, **2**, 538—552.
8. Brooks R. L., Shore J. D. (1971) *Biochemistry*, **10**, 3855—3868.
9. Branden C.-J., Jornvall H., Eklund H., Furugren B. (1975) in *The Enzymes*, vol. 11, pp. 112—190, Acad. Press, N. Y.
10. Schimerlik M. J., Cleland W. W. (1977) *Biochemistry*, **16**, 576—583.
11. Воронцов Е. А., Гуревич В. М., Калачева Н. И., Мальцев Н. И., Яковлев В. А. (1976) *Биоорган. химия*, **2**, 986—994.
12. Winer A. D., Schwert G. W. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1155—1161.
13. Schwert G. W., Miller B. R., Peanasky R. J. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3245—3257.
14. Meister A. (1950) *J. Biol. Chem.*, **184**, 117—126.
15. Holbrook J. J., Gutfreund H. (1973) *FEBS Lett.*, **31**, 157—169.
16. Weber W. W., Zannoni V. G. (1968) *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA*, **151**, 627—637.
17. Мальцев Н. И., Цетлин Л. Г., Яковлев В. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 529—536.
18. Kaplan N. O., Ciotti M. M., Stolzenbach F. E. (1956) *J. Biol. Chem.*, **221**, 833—844.
19. White J. L., Hackert M. L., Buehner M., Adams M. J., Ford G., Lentz J. P., Smiley J. E., Steindel S. J., Rossmann M. G. (1976) *J. Mol. Biol.*, **102**, 759—779.
20. Гуревич В. М., Мальцев Н. И., Яковлев В. А., Янина М. М. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1498—1504.
21. Цетлин Л. Г., Калачева Н. И., Мальцев Н. И., Щорс Е. И., Яковлев В. А. (1975) *Биоорган. химия*, **1**, 1197—1205.
22. Jecsei G. (1961) *Acta physiol. Acad. sci. hung.*, **20**, 339—342.

Поступила в редакцию
28.XII.1977

После доработки
30.V.1978

UTILIZATION OF COENZYME AND SUBSTRATE ANALOGS IN STUDYING THE LACTATE DEHYDROGENASE MECHANISM OF ACTION

MAL'TSEV N. I.

All-Union Vitamin Research Institute, Moscow

Within the «pyruvate» conformer of lactate dehydrogenase, the interaction of the coenzyme CONH₂ group with functional groups of the active site is a determining factor for the structure of the substrate binding site, for the position of a group quenching the coenzyme fluorescence, as well as for the rate of a conformational rearrangement which precedes the hydrogen transfer. Ionization of the essential histidine at the stage of ternary complex formation depends on the properties of the nicotinamide ring, rather than on those of the substrate or on the nature of the 3-substituent in the coenzyme. Although the H-bond formation between the substrate oxygen atom and histidine is not obligatory, histidine ionization affects the substrate interaction with the other loci of the active site. A substrate molecule plays an important role in the rearrangement which leads to the proximity of reacting molecules. The structure of the lactate dehydrogenase active site in «lactate» and «pyruvate» conformers has characteristic features associated with the properties of the substrates and of the nicotinamide moiety.