



УДК 577.158.429.02

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
С (ПИРИДИН-3-АЛЬДЕГИД)-АДЕНИНДИНУКЛЕОТИДОМ***Гуревич В. М., Мальцев Н. И., Яковлев В. А.,
Янина М. М.**Всесоюзный научно-исследовательский
витаминовый институт, Москва*

Изучены коферментные свойства (пиридин-3-альдегид)-адениндинуклеотида (РААД) в реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой (ЛДГ) мышц свиньи. Определены кинетические параметры прямой и обратной реакции в стационарных условиях и проведено сравнение спектральных свойств комплексов, образованных NADH и РААДН. Обсуждается роль заместителя в положении 3 пиридинового цикла кофермента ЛДГ в формировании реактивного конформера.

В последние годы достигнут определенный прогресс [1] в понимании кинетического механизма действия ЛДГ (КФ 1.1.1.27). Остается, однако, неясным, как происходит активация субстратов, и, следовательно, каков химический механизм окислительно-восстановительной реакции. Возможно, в реакции принимает участие заместитель в положении 3 пиридинового цикла. Такой вывод можно сделать при рассмотрении коферментных свойств аналогов NAD в реакциях, катализируемых различными дегидрогеназами [2, 3]. Замещение карбоксамидной группы в молекуле NAD на гидразидную, обладающую более электроположительными свойствами, приводит к изменению кинетических параметров реакции, а также к уменьшению прочности двойных и тройных комплексов [4].

Целью работы являлось исследование коферментной активности РААД, содержащего более электроотрицательную группу по сравнению с карбоксамидной группой NAD в реакциях, катализируемых ЛДГ мышц свиньи. Были изучены прочность и спектральные свойства двойных и тройных ингибиторных комплексов, а также проведено их сравнение с комплексами, образованными природным коферментом. Качественная оценка коферментных свойств РААД проведена ранее [5].

Сродство NAD и РААД к H⁻-иону, переносимому в катализируемой ЛДГ реакции окисления лактата, заметно различается. Константа равновесия K этой реакции с участием РААД равна $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$ М, а с участием NAD — $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-11}$ М. Эти значения сходны с приведенными величинами, полученными ранее [5], и свидетельствуют о большем сродстве H⁻-иона к РААД по сравнению с NAD.

Была изучена кинетика окислительно-восстановительных реакций с участием РААД и РААДН в стационарных условиях в сравнении с аналогичными характеристиками NAD и NADH (см. рис. 1 и табл. 1).

Кинетические параметры реакций РААД и NAD сходны, однако имеется существенное различие в кинетике реакций окисления РААДН и NADH. Величина K_m для РААДН в 10 раз меньше, чем для NADH, а

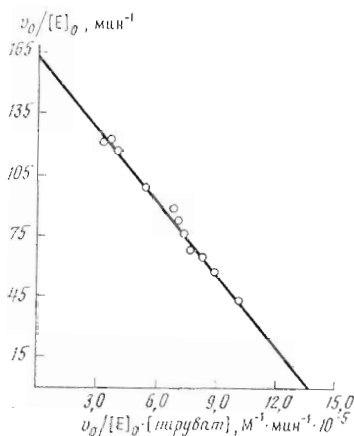


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость стационарной скорости реакции окисления РААДН от концентрации пирувата. Условия: 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0; 35°. Концентрация, М: ЛДГ — $7,2 \cdot 10^{-8}$ (активные центры), РААДН — $2,0 \cdot 10^{-5}$, пируват — $6,6 \cdot 10^{-5}$ — $4,6 \cdot 10^{-4}$

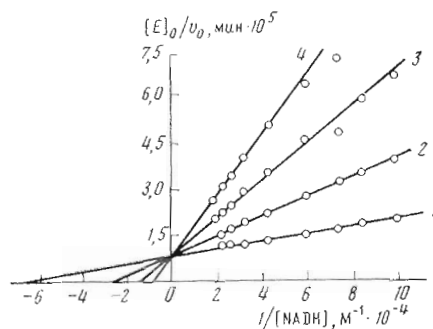


Рис. 2

Рис. 2. Влияние РААДН на зависимость стационарной скорости реакции окисления NADH: 1 — в отсутствие РААДН, 2 — РААДН $3,1 \cdot 10^{-6}$ М, 3 — $6,0 \cdot 10^{-6}$ М, 4 — $8,0 \cdot 10^{-6}$ М. Условия: 0,1 М фосфатный буфер, pH 7,0, 35°. Концентрация, М: ЛДГ — $2,4 \cdot 10^{-10}$ (активные центры), пируват — $2,0 \cdot 10^{-3}$, NADH — $1,0 \cdot 10^{-5}$ — $5,0 \cdot 10^{-5}$

$k_{\text{кат}}$ почти в 400 раз меньше. В то же время величины K_m для лактата и пирувата в реакциях окисления NADH и РААДН практически одинаковы.

Ввиду различия в величинах каталитических констант реакций окисления РААДН и NADH концентрация ЛДГ в опытах с аналогом была примерно в 100 раз выше, чем в опытах с NADH для получения сопоставимых величин начальной скорости. Это позволило использовать РААДН в качестве ингибитора и установить конкурентный тип торможения в реакции окисления NADH (рис. 2). Величина K_i составила $(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$ М, что совпадает с величиной $K_{\text{дисс}}$ комплекса ЛДГ · РААДН (см. далее табл. 3).

Спектральные свойства динуклеотидов существенно изменяются при образовании комплексов с ЛДГ (табл. 2). Разностные спектры комплексов ЛДГ · NADH и ЛДГ · РААДН обладают отрицательным максимумом в области поглощения дигидропиридинового хромофора (рис. 3, 1 и 3). Спектры такого рода Фишер и Кросс [6] объяснили коротковолновым сдвигом максимума в спектре поглощения кофермента. Этот сдвиг несколько усиливается при последующем связывании оксамата (рис. 3, 2 и 4).

Спектры КД комплексов ЛДГ · РААДН и ЛДГ · РААДН · оксамат сходны со спектрами КД аналогичных комплексов, образуемых NADH, [7] (рис. 4). Связывание дигидропиридинового компонента РААДН в активном центре ЛДГ приводит к появлению положительной полосы в области поглощения хромофора с максимумом при 364 нм (рис. 4, б, 2). В комплексе ЛДГ · РААДН · оксамат положение этой полосы смещается к 360 нм (рис. 4, б, 3). Аналогичный гипсохромный сдвиг наблюдается также при образовании комплекса ЛДГ · NADH · оксамат [7]. В спектральной области 250—300 нм сложный спектр ЛДГ (рис. 4, а, 1), образованный рядом перекрывающихся полос, заметно отличается от спектра КД комплекса ЛДГ · РААДН (рис. 4, а, 2). Наибольшее возрастание дихроичного поглощения наблюдается вблизи 267 и 287 нм. Интерпретация этого эффекта затруднена вследствие близости полос КД аденозинового компонента РААДН и остатков ароматических аминокислот ЛДГ.

Величины K_m и $K_{кат}$ в реакциях превращения NAD и PAAD
 Подчеркнуты компоненты смеси, K_m которых определяли

[ЛДГ], M (активные центры)	[Динуклеотид]; M	[Субстрат]; M	K_m , M	$k_{кат}$, мин ⁻¹
$1,3 \cdot 10^{-9}$	<u>PAAD</u> ; $1,2 \cdot 10^{-1} - 8,7 \cdot 10^{-1}$	<u>L-лактат</u> ; 0,25	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(8,0 \pm 0,7) \cdot 10^3$
$1,1 \cdot 10^{-9}$	PAAD;	<u>L-лактат</u> ;	$(2,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-2}$	
$5,1 \cdot 10^{-8}$	<u>1,6 \cdot 10^{-3}</u> <u>PAADH</u> ;	<u>1,0 \cdot 10^{-2} - 5,0 \cdot 10^{-2}</u> Пируват;	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^2$
$7,2 \cdot 10^{-8}$	<u>2,2 \cdot 10^{-6} - 1,1 \cdot 10^{-5}</u> PAADH;	<u>3,0 \cdot 10^{-3}</u> Пируват;	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-1}$	
$2,6 \cdot 10^{-9}$	<u>2,0 \cdot 10^{-5}</u> <u>NAD</u> ;	<u>6,6 \cdot 10^{-5} - 4,6 \cdot 10^{-1}</u> L-лактат;	$(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(8,5 \pm 0,5) \cdot 10^3$
$1,8 \cdot 10^{-9}$	<u>9,0 \cdot 10^{-5} - 2,9 \cdot 10^{-1}</u> NAD;	<u>0,5</u> L-лактат;	$(9,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	
$2,4 \cdot 10^{-10}$	<u>1,2 \cdot 10^{-3}</u> <u>NADH</u> ;	<u>6,6 \cdot 10^{-3} - 5,0 \cdot 10^{-2}</u> Пируват;	$(2,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(8,3 \pm 0,3) \cdot 10^1$
$3,5 \cdot 10^{-10}$	<u>1,1 \cdot 10^{-5} - 5,8 \cdot 10^{-5}</u> NADH;	<u>2,0 \cdot 10^{-3}</u> Пируват;	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-1}$	
	<u>2,0 \cdot 10^{-4}</u>	<u>1,0 \cdot 10^{-1} - 8,3 \cdot 10^{-1}</u>		

Таблица 2

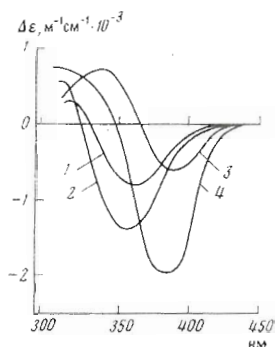
Спектральные свойства динуклеотидов и комплексов с ЛДГ

Соединение	Спектры поглощения		Спектры флуоресценции		Спектры КД	
	$\lambda_{макс}$, нм	ϵ , M ⁻¹ см ⁻¹ · 10 ³	$\lambda_{макс}$, нм	относительный квантовый выход	$\lambda_{макс}$, нм	ϵ , M ⁻¹ см ⁻¹
PAADH	358	9,3	460	1	340—350	-0,71
ЛДГ·PAADH	355	9,9	440	34	364	+5,1
ЛДГ·PAADH·оксамат	353	9,2	435	78	360	+3,1
ЛДГ·PAADH·лактат	355	9,9	440	105	—	—
NADH	340	6,2	455	1	330—350	-0,36
ЛДГ·NADH	334	6,1	440	2,1 *	348	+2,7**
ЛДГ·NADH·оксамат	334	5,8	440	0,15 *	331	+3,5**
ЛДГ·NADH·лактат	334	6,1	430	4	—	—

* и ** Идентичные величины приведены соответственно в работах [8] и [7].

Максимумы в спектрах флуоресценции PAADH и NADH при связывании с ЛДГ смещаются в коротковолновую область примерно на 20 нм. При этом квантовый выход PAADH увеличивается в 34 раза. Образование тройных комплексов с оксаматом и лактатом сопровождается дальнейшим увеличением квантового выхода (табл. 2). В аналогичных опытах с NADH квантовый выход динуклеотида увеличивался при образовании тройного комплекса с лактатом, но уменьшался в 15 раз при связывании оксамата. Таким образом, изменение спектральных свойств NADH и PAADH при образовании двойных и тройных комплексов в основном сходно, что указывает на сходство микроокружения дигидропиридинового хромофора в активном центре ЛДГ. Изменение квантового выхода флуоресценции NADH и PAADH в противоположном направлении при связывании оксамата может свидетельствовать об определенной роли замес-

Рис. 3. Разностные спектры поглощения комплексов ЛДГ с динуклеотидами: 1 — ЛДГ·NADH, концентрация, М: ЛДГ — $6,5 \cdot 10^{-5}$ (активные центры), NADH — $5,2 \cdot 10^{-5}$; 2 — ЛДГ·NADH·оксамат, концентрация, М: ЛДГ — $6,5 \cdot 10^{-5}$ (активные центры), NADH — $5,2 \cdot 10^{-5}$, оксамат — $5,0 \cdot 10^{-3}$; 3 — ЛДГ·РААДН, концентрация, М: ЛДГ — $3,1 \cdot 10^{-4}$, РААДН — $7,1 \cdot 10^{-5}$; 4 — ЛДГ·РААДН·оксамат, концентрация, М: ЛДГ — $3,1 \cdot 10^{-4}$ (активные центры), РААДН — $4,9 \cdot 10^{-5}$, оксамат — $2,0 \cdot 10^{-3}$. Условия: 0,02 М пирофосфатный буфер, рН 6,0, 20°. Спектры скорректированы в соответствии с величинами $K_{\text{дисс}}$ (табл. 3)



тителя в положении 3 пиридинового цикла кофермента в образовании тройных комплексов.

Величины $K_{\text{дисс}}$ комплексов ЛДГ, определенные методом флуориметрического титрования, приведены в табл. 3. Как видно, прочность комплексов, образованных NADH и РААДН, практически одинакова. Величина $K_{\text{дисс}}$ комплекса ЛДГ·РААДН·оксамат не отличается от величины, полученной ранее для комплекса ЛДГ·NADH·оксамат — $3,4 \cdot 10^{-5}$ М [8]. Таким образом, замена карбоксамидной группы восстановленного кофермента на альдегидную не сказывается на прочности двойных и тройных комплексов.

В комплексе ЛДГ с NAD по данным, полученным методом рентгеноструктурного анализа, не образуется связи между заместителем в положении 3 пиридинового цикла и функциональными группами активного центра [9]. Однако карты электронной плотности двойного комплекса цитоплазматической малатдегидрогеназы ясно показывают наличие взаимодействия карбоксамидной группы NAD с активным центром [10]. Отсутствие такого взаимодействия в комплексах с ЛДГ не исключает возможности участия карбоксамидной группы на других стадиях реакции.

Различное изменение флуоресценции динуклеотида при образовании тройных комплексов с оксаматом, а также анализ кинетических данных позволяет высказать предположение о различии в строении активного центра ЛДГ в прямой и обратной реакциях. Заместитель в положении 3 пиридинового цикла принимает участие в катализе, по-видимому, на стадии образования тройных комплексов.

Молекула субстрата — лактата или пирувата, связываясь в активном центре, завершает формирование реактивного конформера — соответственно лактатного или пируватного (рис. 5). При одинаковом наборе точек

Таблица 3

Константы диссоциации двойных и тройных комплексов 0,02 М пирофосфатный буфер, рН 6,0, 6°

[ЛДГ], М (активные центры)	[Динуклеотид], М	[Субстрат], М	$K_{\text{дисс}}$	Метод*
$2,0 \cdot 10^{-6}$	РААДН; $3,5 \cdot 10^{-7}$ — $1,3 \cdot 10^{-5}$	—	$(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	Н
$1,3 \cdot 10^{-6}$	РААДН; $6,0 \cdot 10^{-7}$ — $6,5 \cdot 10^{-6}$	—	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	Б
$3,7 \cdot 10^{-6}$	NADH; $3,5 \cdot 10^{-6}$ — $5,2 \cdot 10^{-5}$	—	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	Н
$5,4 \cdot 10^{-6}$	РААДН; $9,2 \cdot 10^{-5}$	Оксамат; $1,0 \cdot 10^{-5}$ — $6,5 \cdot 10^{-5}$	$(3,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	Н
$5,6 \cdot 10^{-6}$	РААДН; $1,1 \cdot 10^{-4}$	L-лактат; $1,5 \cdot 10^{-3}$ — $1,5 \cdot 10^{-2}$	$(1,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	Н

* Титрование проводили, наблюдая флуоресценцию динуклеотида (Н) или белка (Б).

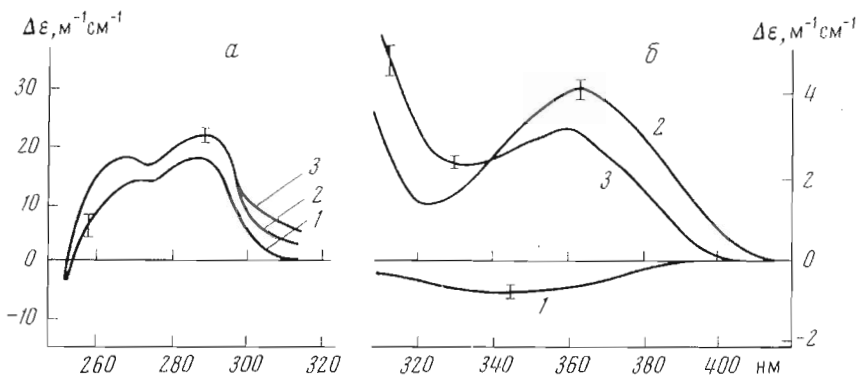


Рис. 4. Спектры КД комплексов ЛДГ с РААДН (0,02 М пирофосфатный буфер, pH 6,0, 25°) в области 250—300 нм (а) и 320—410 нм (б). 1 — ЛДГ, $1,6 \cdot 10^{-4}$ М (активные центры); 2 — ЛДГ·РААДН, концентрация, М: ЛДГ — $3,1 \cdot 10^{-4}$ (активные центры), РААДН — $7,1 \cdot 10^{-5}$; 3 — ЛДГ·РААДН·оксамат, концентрация, М: ЛДГ — $3,1 \cdot 10^{-4}$ (активные центры), РААДН — $4,9 \cdot 10^{-5}$, оксамат — $2,0 \cdot 10^{-3}$. б: 1 — РААДН, $7,1 \cdot 10^{-5}$ М; 2 — ЛДГ·РААДН, концентрация, М: ЛДГ — $3,1 \cdot 10^{-4}$ (активные центры), РААДН — $7,1 \cdot 10^{-5}$; 3 — ЛДГ·РААДН·оксамат, концентрация, М: ЛДГ — $3,1 \cdot 10^{-4}$ (активные центры), РААДН — $7,1 \cdot 10^{-5}$, оксамат — $2,0 \cdot 10^{-3}$

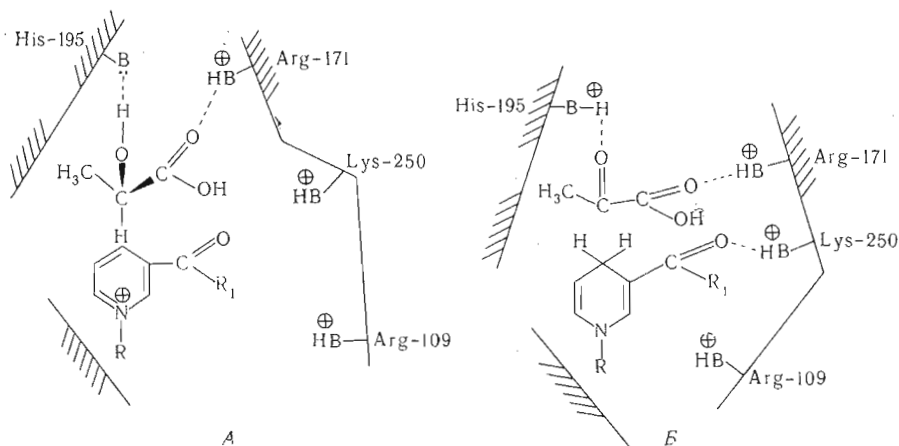


Рис. 5. Формирование лактатного (А) и пируватного (Б) конформеров ЛДГ в прямой и обратной реакциях. $R_1 = -H(РААДН), -NH_2(НАД)$; R = аденозиндифосфатрибоза

связывания субстрата в активном центре, соответствующих метильной, карбоксильной группам и атому кислорода у α -углеродного атома, между этими конформерами существуют различия, определяемые тетраэдрическим (в случае лактата) и плоским (в случае пирувата) расположением σ -связей у α -углеродного атома субстрата. В тройном комплексе, соответствующем пируватному конформеру и образующемуся при связывании как пирувата, так и оксамата, происходит перемещение участка полипептидной цепи в направлении к дигидропиридиновому циклу и в результате приближения положительно заряженной функциональной группы происходит тушение флуоресценции динуклеотида.

В роли такой группы может, например, выступать остаток аргинина 109 [9]. Это положение цепи фиксируется образованием связи между заместителем в положении 3 пиридинового цикла и аминогруппой остатка лизина 250. После переноса H^+ -иона пиридиновый цикл приобретает положительный заряд. В результате электростатического отталкивания происходит перемещение полипептидной цепи в направлении от пиридинового цикла и превращение пируватного конформера в лактатный. При этом ослабляется связь карбонильной группы заместителя в положении 3 пи-

ридинового цикла с белком. В альдегидном аналоге эта связь, возможно, слабее, чем в NADH, вследствие различия в поляризуемости карбоксамидной и альдегидной групп [11]. Поэтому при связывании как лактата, так и пирувата образуется лактатный конформер, характеризующийся увеличенной флуоресценцией динуклеотида, так как расстояние между пиридиновым циклом и положительно заряженной группой активного центра увеличено. Таким образом, заместитель в положении 3 пиридинового цикла может участвовать в конформационном переходе в области активного центра, определяющем эффективность катализа.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты NAD, NADH и пирувата натрия фирмы «Reanal» (Венгрия). Из кристаллического препарата ЛДГ (фирма «Reanal» (выделяли изофермент M_4 хроматографией на СМ-целлюлозе [12]). В качестве препарата β -NAD-трансгликозидазы использовали микросомальную фракцию селезенки свиньи с уд. акт. 6 мккат/мл*.

При определении концентрации веществ использовали следующие коэффициенты: ЛДГ — $E_{280}^{0,1\%}$ 1,29 [13]; PAAD — ϵ $18,3 \cdot 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$, 260 нм; NAD — ϵ $17,8 \cdot 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$, 259 нм; NADH — ϵ $6,22 \cdot 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$, 340 нм; PAADH — ϵ $9,3 \cdot 10^3$ $M^{-1}cm^{-1}$, 358 нм [13]. Для синтеза PAAD использовали ферментативный метод [14]. NAD (1,5 мМ) и пиридин-3-альдегид (13,3 мМ) инкубировали в 300 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,0) при концентрации NAD-трансгликозидазы 0,1 мккат/мл в течение 60 мин, после чего белок осаждали 5%-ной трихлоруксусной кислотой, а из надосадочной жидкости ацетоном при 0° выделяли смесь нуклеотидов. Хроматографию этой смеси проводили на колонке с DEAE-сефадексом А-25 (100 × 1 см), уравновешенной 0,005 М фосфатным буфером (рН 6,0). Нуклеотиды элюировали в условиях возрастающего градиента концентрации NaCl от нуля до $3 \cdot 10^{-2}$ М. Фракцию, содержащую PAAD, подвергали повторной хроматографии в этих же условиях. Препарат обессоливали с помощью сефадекса G-10. Выход PAAD 15 ÷ 20%.

Восстановленную форму динуклеотидов получали ранее описанным методом [15]. УФ-спектры регистрировали в двухлучевом спектрофотометре «Рye-Unitum» SP-800 (Англия). Кинетические опыты проводили также в этом приборе или в анализаторе скорости реакций LKB-4200 А (фирма «LKB», Швеция) с использованием шкалы 0—0,05 на 20 см с самописцем LKB — 6500 при 35°. Спектры КД снимали в приборе «JASCO» ORD/UV-5 (Япония). Разностные спектры снимали методом сдвоенных кювет [16]. Спектры флуоресценции измеряли в спектрофлуориметре «Hitachi» MPF-2A с самописцем QPD₃₃ (Япония). Флуоресценцию остатков триптофана белка возбуждали светом с длиной волны 290 нм, наблюдая эмиссию при 340 нм. Флуоресценцию динуклеотида возбуждали светом с длиной волны 360 нм, наблюдая эмиссию при 450 нм.

Определение величины $K_{дисс}$ комплексов с ЛДГ проводили флуориметрическим титрованием, наблюдая флуоресценцию белка или динуклеотида. Величины $K_{дисс}$ рассчитывали из графиков в координатах двойных обратных величин (в тех случаях, когда $[L]_0 \gg [E]_0 < K_{дисс}$, где $[E]_0$ — общая концентрация фермента, $[L]_0$ — общая концентрация лиганда) [17] или из графиков в координатах $1/(1 - \alpha)$, $\alpha/[L]_0$, где α — степень насыщения активных центров фермента [7].

Определение константы равновесия (K) окислительно-восстановительной реакции. Раствор, содержащий $4,2 \cdot 10^{-4}$ М NAD или $3,5 \cdot 10^{-4}$ М PAAD, $1,5 \cdot 10^{-8}$ М активных центров ЛДГ и $2,0 \cdot 10^{-2}$ М L-лактат в 0,05 М фосфат-

* Катал (кат) — единица ферментативной активности, рекомендуемая ИИРАС (Enzyme Nomenclature, 1972, р. 26). Катал выражает количество активности, которая превращает 1 моль субстрата за 1 с.

ном буфере (рН 7,0), инкубировали при 28° в течение времени, в 10 раз большего времени полупревращения для достижения равновесия. Концентрацию образовавшегося NADH и PAADH определяли по изменению оптической плотности раствора. Величину K рассчитывали, пользуясь выражением:

$$K = \frac{[\text{PAADH}] \cdot [\text{пируват}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{PAAD}] \cdot [\text{лактат}]}$$

Определение скорости окислительно-восстановительной реакции в стационарных условиях проводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) при 35°. К 2 мл раствора, содержащего динуклеотид и карбоновую кислоту, добавляли 0,025 или 0,05 мл раствора ЛДГ. После перемешивания (3, 5с) регистрировали изменение оптической плотности раствора. Величину скорости реакции определяли как тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кинетической кривой.

Концентрационные зависимости стационарной скорости реакции определяли по каждому из субстратов, соблюдая условие насыщения по второму субстрату.

ЛИТЕРАТУРА

1. Whitaker J. R., Yates D. W., Bennett N. G., Holbrook J. J., Gutfreund H. (1974) *Biochem. J.*, 139, 677—684.
2. Colowick S. P., Eys J., Park J. H. (1966) *Comprehensive Biochemistry*, 14, 1—28.
3. Biemann J. F., Yung M. J. (1971) *Eur. J. Biochem.*, 19, 130—133.
4. Петляк Л. Г., Калачева Н. И., Мальцев Н. И., Щорс Е. И., Яковлев В. А. (1975) *Биоорганическая химия*, 1, 1197—1206.
5. Kaplan N. O., Ciotti M. M. (1956) *J. Biol. Chem.*, 221, 833—839.
6. Fisher H. F., Cross D. G. (1969) *Biochemistry*, 8, 4424—4426.
7. Гуревич В. М., Курганов Б. И., Сугрובה Н. П., Яковлев В. А. (1972) *Биохимия*, 37, 1023—1025.
8. Holbrook J. J., Stinson R. A. (1973) *Biochem. J.*, 131, 739—748.
9. Adams M. J., Buehner M., Chandrasekhar K., Ford G. C., Hocker M. L., Lillias A., Rossman M. G., Smiley Y. E., Allison W. S., Everse Y., Kaplan N. O., Taylor S. S. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 1968—1972.
10. Webb L. E., Hill E. J., Banaszak L. J. (1973) *Biochemistry*, 12, 5101—5109.
11. Patrick D. M., Wilson J. E., Leroy G. E. (1974) *Biochemistry*, 13, 2813—2816.
12. Jecsei G. (1961) *Acta physiol. Acad. sci. hung.*, 20, 339—342.
13. Siegal J. M., Montgomery G. A., Bock R. M. (1959) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 82, 288—290.
14. Zatman L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., Ciotti M. M. (1954) *J. Biol. Chem.*, 209, 453—466.
15. Pastore E., Friedkin M. (1961) *J. Biol. Chem.*, 236, 2314—2316.
16. Swaney J. B. (1971) *Anal. Biochem.*, 43, 388—393.
17. Luisi D. L., Olomucki A., Karboric D. (1973) *Biochemistry*, 12, 4100—4105.

Поступила в редакцию
18.II.1975

INTERACTION OF LACTATE DEHYDROGENASE WITH PYRIDINE-3-ALDEHYDE ADENINE DINUCLEOTIDE

GUREVICH V. M., MAL'TSEV N. I., YAKOVLEV V. A.,
YANINA M. M.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

Pyridine-3-aldehyde adenine dinucleotide (PAAD) and NAD show similar kinetic parameters in the LDN catalyzed reaction. The ratio $\gamma_{\max}^{\text{NADN}} : \gamma_{\max}^{\text{PAADH}}$ is 400. The spectral properties of binary and ternary complexes formed by NADH and PAADH are suggestive of the differences in microenvironment of dihydropyridine ring. Lactate, pyruvate and oxamate manifest similar affinity in ternary NADH and PAADH complexes. The formation of $\text{LDH}_{\text{oxamate}}^{\text{PAADH}}$ and $\text{LDH}_{\text{lactate}}^{\text{PAADH}}$ in both cases enhances the dinucleotide fluorescence, in contrast to analogous NADH-complexes. It is suggested that 3-substituent of pyridine moiety participates in the formation of «lactate» and «pyruvate» reactive conformers.