



УДК 577.158.429.02

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
С 3-АЦЕТИЛПИРИДИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДОМ*Воронцов Е. А., Гуревич В. М., Калачева Н. И.,
Мальцев Н. И., Яковлев В. А.**Всероссийский научно-исследовательский
витаминовый институт, Москва*

Проведено детальное исследование коферментных свойств NAD, NADH и ацетильного аналога NAD, 3-ацетилпиридинадениндинуклеотида (APAD, APADH), в реакциях, катализируемых изоферментом M₄ лактатдегидрогеназы мышц свиньи (ЛДГ). Обнаружено сходство спектральных изменений, происходящих при образовании двойных комплексов ЛДГ—NADH и ЛДГ—APADH, однако комплекс, образованный аналогом, более прочен. Определены константы диссоциации комплексов ЛДГ—APADH — оксамат и ЛДГ—APADH — лактат, а также константы Михаэлиса для APAD, лактата и пирувата. Показано, что связывание аналога пирувата, оксамата, в тройных комплексах с NADH и APADH происходит по-разному, причем константа диссоциации больше для комплекса с APADH. Связывание лактата в комплексах, образованных APAD и APADH, происходит более прочно, чем для NAD и NADH. Величины $k_{\text{кат}}$ в реакциях окисления лактата и восстановления пирувата (прямой и обратной реакциях) понижены. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения влияния заместителя в положении 3 пиридинового цикла на различных стадиях прямой и обратной реакций.

Одним из путей исследования механизма действия дегидрогеназ является модификация структуры кофермента и изучение молекулярных и каталитических свойств образующихся комплексов модифицированного кофермента с апоферментом.

Модифицирование молекулы NAD с целью получения сведений о механизме действия лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27) можно проводить путем изменения заместителя в положении 3 пиридинового цикла. Природу этой группы можно варьировать при сохранении коферментной активности. Замена карбоксамидной группы NAD на гидразидную значительно сказывается на прочности двойных и тройных комплексов ЛДГ [1]; замена на альдегидную группу избирательно уменьшает скорость реакции восстановления пирувата, что свидетельствует в пользу различной роли этого заместителя в прямой и обратной реакциях [2].

Целью данной работы явилось исследование коферментной активности аналога NAD, содержащего ацетильную группу, — 3-ацетилпиридинадениндинуклеотида (APAD). Свойства ацетильной группы существенно отличны от свойств карбоксамидной и альдегидной групп, что позволяло рассчитывать на получение новых сведений о роли заместителя пиридинового цикла на различных стадиях катализа.

Сокращения: ЛДГ — лактатдегидрогеназа, APAD, APADH — 3-ацетилпиридинадениндинуклеотид и его восстановленная форма.

Спектральные свойства динуклеотидов и их комплексов с ЛДГ

Соединение	Спектры поглощения		Спектры флуоресценции		Спектры КД	
	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\epsilon \cdot 10^{-3}$, $M^{-1}cm^{-1}$	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	относитель- ный квант. выход *	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\Delta\epsilon$, $M^{-1}cm^{-1}$
АРАДН	363	9,1	450	1	—	—
ЛДГ—АРАДН	354—355	8,8	442	14	356	4,7
ЛДГ—АРАДН—оксамат	358	8,5	442	0,3	360	3,7
ЛДГ—АРАДН—лактат	356—357	8,8	449	49	—	—
NADH	340	6,2	455	1,0	330—345	—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	—	—	430	4	—	—

* Расчет см. «Экспериментальную часть».

Образование двойных комплексов ЛДГ—кофермент является первой стадией ферментативного катализа, поэтому вначале было проведено изучение спектральных свойств и определена константа диссоциации ($K_{\text{дис}}$) комплекса ЛДГ—АРАДН.

Связывание АРАДН в активном центре ЛДГ сопровождается заметным коротковолновым сдвигом (рис. 1, табл. 1). Такой же сдвиг наблюдается и в спектрах флуоресценции, а квантовый выход при этом увеличивается в 14 раз. Эти спектральные изменения аналогичны тем, которые происходят при образовании комплекса ЛДГ—NADH (см. табл. 1 и рис. 1).

$K_{\text{дис}}$ комплексов были определены с помощью метода, предложенного Холбруком [3], по изменению интенсивности флуоресценции динуклеотида при образовании комплексов (табл. 2). Приведенные в таблице величины $K_{\text{дис}}$ свидетельствуют о большей прочности комплекса ЛДГ—АРАДН по сравнению с ЛДГ—NADH. Согласно спектральным данным, при образовании этих комплексов электронное состояние дигидропиридиновых циклов АРАДН и NADH меняется приблизительно одним и тем же образом; следовательно, их микроокружение примерно одинаково. Результаты исследования комплексов ЛДГ методом рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что карбоксамидная группа пиридинового цикла не взаимодействует с белком [4]. Различие в прочности связывания АРАДН и NADH, вероятно, можно объяснить дополнительным нековалентным взаимодействием между ацетильной группой и функциональной группой активного центра. В случае карбоксамидной и альдегидной групп такая связь, по-видимому, отсутствует, поскольку прочность комплексов, образованных АРАДН и NADH, весьма близка [2].

Существенное различие между свойствами NADH и АРАДН наблюдается также при образовании тройных комплексов с оксаматом, имитирующих комплексы ЛДГ—кофермент—субстрат. Комплекс ЛДГ—АРАДН—оксамат характеризуется более длинноволновым максимумом в спектре поглощения по сравнению с двойным комплексом ЛДГ—АРАДН, в то время как максимум в спектре поглощения комплекса ЛДГ—NADH при связывании оксамата остается неизменным (рис. 1, табл. 1).

В спектре КД двойного комплекса ЛДГ—АРАДН также наблюдается длинноволновое смещение примерно на 4 нм, а интенсивность дихроичной полосы несколько уменьшается (рис. 2). Наоборот, при образовании комплекса ЛДГ—NADH—оксамат наблюдается коротковолновый сдвиг на 17 нм и увеличение интенсивности полосы. Это свидетельствует о различном участии карбоксамидной и ацетильной групп в формировании асимметричного микроокружения дигидропиридинового хромофора при связывании аналога субстрата.

Константы диссоциации комплексов лактатдегидрогеназы, определенные методом флуориметрического титрования

Комплекс	Концентрация, М			К _{дисс} , М
	ЛДГ (активные центры)	Динуклеотид	Субстрат (аналог)	
ЛДГ-АРАДН	5,7·10 ⁻³	1,5·10 ⁻⁸ -3,6·10 ⁻⁶	—	(3,0±0,2)·10 ⁻⁷
ЛДГ-АРАДН-оксамат	3,2·10 ⁻⁶	2,2·10 ⁻⁶	2·10 ⁻⁵ -2·10 ⁻³	(1,2±0,2)·10 ⁻⁴
ЛДГ-АРАДН-лактат	2,6·10 ⁻⁵	8,0·10 ⁻⁷	8,0·10 ⁻⁴ -8,0·10 ⁻³	(1,6±0,2)·10 ⁻³
ЛДГ-NADH	3,7·10 ⁻⁶	3,5·10 ⁻⁶ -5,2·10 ⁻⁵	—	(1,7±0,2)·10 ⁻⁶
ЛДГ-NADH-оксамат	3,7·10 ⁻⁵	1,6·10 ⁻⁵	5,0·10 ⁻⁶ -2,0·10 ⁻⁴	(3,4±0,3)·10 ⁻⁵
ЛДГ-NADH-лактат	5,1·10 ⁻⁵	1,0·10 ⁻⁵	1,7·10 ⁻³ -2,4·10 ⁻²	(9,0±0,2)·10 ⁻³

Величины K_ш и k_{кат} в реакциях превращения NAD и АРАДПодчеркнуты компоненты смеси, K_ш которых определяли

ЛДГ (активные центры)	Концентрация, М		K _ш , М	k _{кат} , мин ⁻¹
	Динуклеотид	Субстрат		
8,9·10 ⁻¹⁰	АРАДН 6,6·10 ⁻⁵	Пируват 1,0·10 ⁻³ -5,0·10 ⁻³	(1,6±0,2)·10 ⁻³	(3,5±0,2)·10 ³
3,6·10 ⁻¹⁰	NADH 1,5·10 ⁻⁴	» 8,0·10 ⁻⁵ -8,0·10 ⁻⁴	(4,3±0,2)·10 ⁻⁴	(8,7±0,2)·10 ⁴
3,6·10 ⁻¹⁰	NADH 9,0·10 ⁻⁶ -4,5·10 ⁻⁵	» 2,0·10 ⁻³	(2,0±0,2)·10 ⁻⁵	(8,7±0,2)·10 ⁴
1,8·10 ⁻⁹	NAD 9,0·10 ⁻⁵ -5,5·10 ⁻⁴	Лактат 8,0·10 ⁻²	(4,0±0,2)·10 ⁻⁴	(8,7±0,2)·10 ³
1,8·10 ⁻⁹	NAD 4,2·10 ⁻³	» 6,6·10 ⁻³ -5,0·10 ⁻²	(9,5±0,2)·10 ⁻³	(8,7±0,2)·10 ³
1,8·10 ⁻⁹	АРАД 4,7·10 ⁻⁴	» 3,0·10 ⁻³ -5,0·10 ⁻⁴	(8,0±0,2)·10 ⁻⁴	(8,5±0,2)·10 ²
1,8·10 ⁻⁹	АРАД 4,0·10 ⁻⁵ -6,0·10 ⁻⁴	» 3,0·10 ⁻³	(8,4±0,2)·10 ⁻⁵	(8,5±0,2)·10 ²

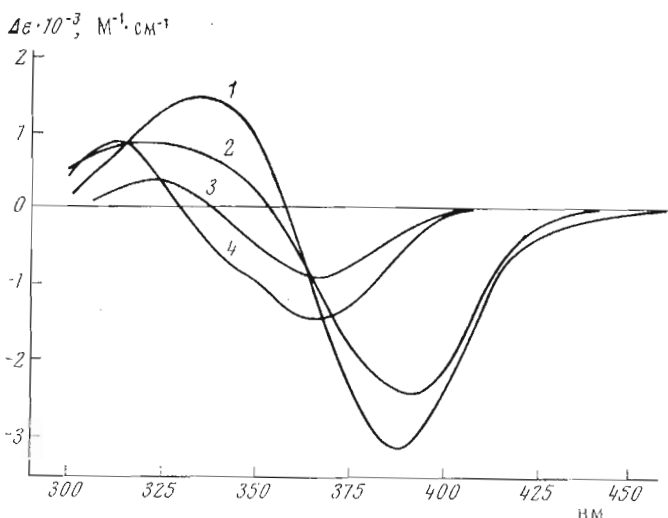


Рис. 1. Разностные спектры поглощения комплексов лактатдегидрогеназы с динуклеотидами: 1 — ЛДГ—АРАДН: [ЛДГ] $6,5 \cdot 10^{-5}$ (здесь и далее концентрация активных центров), [АРАДН] $5,1 \cdot 10^{-5}$ М; 2 — ЛДГ—АРАДН—оксамат: [ЛДГ] $6,5 \cdot 10^{-5}$, [АРАДН] $5,1 \cdot 10^{-5}$, [оксамат] $5 \cdot 10^{-3}$ М; 3 — ЛДГ—НАДН: [ЛДГ] $5 \cdot 10^{-4}$, [НАДН] $5,2 \cdot 10^{-5}$ М; 4 — ЛДГ—НАДН—оксамат: [ЛДГ] $5,0 \cdot 10^{-4}$, [НАДН] $5,0 \cdot 10^{-4}$, [оксамат] $2,0 \cdot 10^{-3}$ М. Условия: 0,1М фосфатный буфер (рН 7,0), 20°. Спектры скорректированы в соответствии с величинами $K_{\text{дис}}$ (см. табл. 2)

Замена карбоксамидной группы молекулы кофермента на ацетильную группу вызывает уменьшение $K_{\text{дис}}$ лактата для комплекса ЛДГ—АРАДН—лактат по сравнению с комплексом ЛДГ—НАДН—лактат. $K_{\text{дис}}$ оксамата для комплекса ЛДГ—АРАДН—оксамат в 3,5 раза выше $K_{\text{дис}}$ комплекса ЛДГ—НАДН—оксамат (табл. 2), свойства которого, по-видимому, подобны свойствам комплекса ЛДГ—НАДН—пируват [3].

Исходя из различия в прочности двойных комплексов лактатдегидрогеназы с НАДН и АРАДН, а также различия между этими динуклеотидами при образовании тройных комплексов с аналогом субстрата, оксаматом, можно было ожидать также изменения кинетических параметров окислительно-восстановительных реакций. В табл. 3 приведены найденные значения K_m и $k_{\text{кат}}$ (величину K_m по отношению к АРАДН не удалось надежно измерить из-за сильной нелинейности начального участка кинетической кривой, что объясняется малой глубиной реакции, особенно в области небольших концентраций). Кинетические параметры реакций превращения NAD и NADH совпадают с полученными ранее [2]. Как видно из таблицы, кажущиеся величины K_m существенно различны для реакций восстановления NAD и АРАД. Особенно сильно изменяются величины K_m по отношению к лактату и пирувату: в реакциях с аналогом K_m по лактату ниже, а по пирувату выше, чем в реакциях с природным коферментом, что согласуется с величинами $K_{\text{дис}}$ лактата и оксамата для тройных комплексов (см. табл. 2 и 3). Величины $k_{\text{кат}}$ в прямой и обратной реакциях, катализируемых ЛДГ, с аналогом значительно ниже, чем с природным коферментом (табл. 3).

Гутфройнд с сотр. [5] показали, что скорость реакции восстановления пирувата лимитируется изомеризацией тройного комплекса ЛДГ—НАДН—пируват. При условии принципиальной неизменности кинетического механизма действия ЛДГ в случае АРАДН эта стадия замедляется в 20 раз. Известно, что скорость реакции окисления лактата определяется либо стадией изомеризации тройного комплекса, либо стадией диссоциации комплекса ЛДГ—НАДН [5, 6]. Лимитирующая стадия в случае АРАД замедлена в 10 раз.

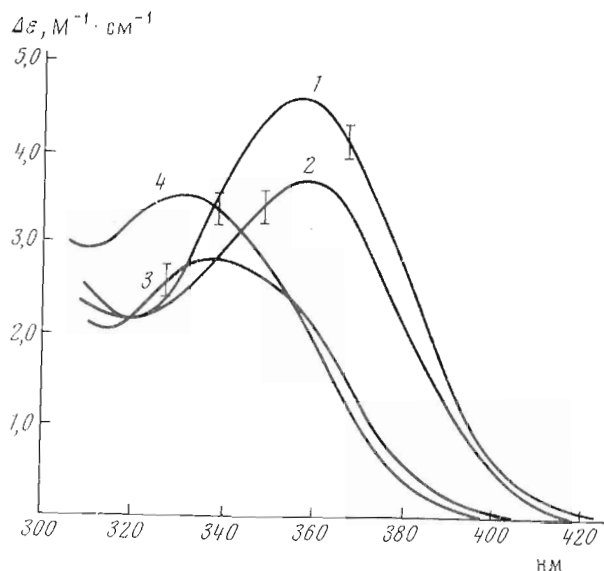


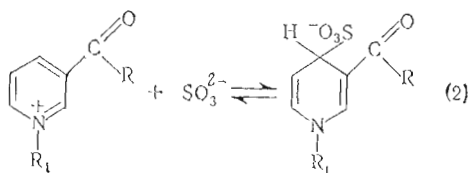
Рис. 2. Спектры кругового дихроизма комплексов лактатдегидрогеназы с нуклеотидами: 1 — ЛДГ—АРАДН: [ЛДГ] $3,0 \cdot 10^{-4}$, [АРАДН] $3,0 \cdot 10^{-4}$ М; 2 — ЛДГ—АРАДН—оксамат: [ЛДГ] $3,0 \cdot 10^{-4}$, [АРАДН] $3,0 \cdot 10^{-4}$, [оксамат] $5,0 \cdot 10^{-3}$ М; 3 — ЛДГ—НАДН: [ЛДГ] $5,0 \cdot 10^{-4}$, [НАДН] $2,0 \cdot 10^{-4}$ М; 4 — ЛДГ—НАДН—оксамат: [ЛДГ] $5,0 \cdot 10^{-4}$, [НАДН] $2,0 \cdot 10^{-4}$, [оксамат] $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. Условия: $0,02$ М пирофосфатный буфер (рН 6,0), 21°

Константа равновесия (K) окислительно-восстановительной реакции (1) равна $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-10}$ М, что согласуется с величиной, полученной ранее Капланом с сотр. [7]:



Величина K в реакции превращения NAD составила $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$ М. Сравнение величин K для АРАД и NAD указывает на смещение равновесия реакции в сторону восстановленной формы динуклеотида в случае АРАД, т. е. на большее сродство пиридинового цикла к переносимому водороду при наличии в положении 3 ацетильной группы.

Этот вывод нашел подтверждение в опытах по определению прочности комплексов АРАД и NAD с нуклеофильным агентом, SO_3^{2-} -ионом (реакция 2):



Величина $K_{\text{дис}}$ комплекса $\text{APAD} \cdot \text{SO}_3^-$ равна $(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ М, что значительно меньше величины $K_{\text{дис}}$ комплекса $\text{NAD} \cdot \text{SO}_3^-$, равной $(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$ М.

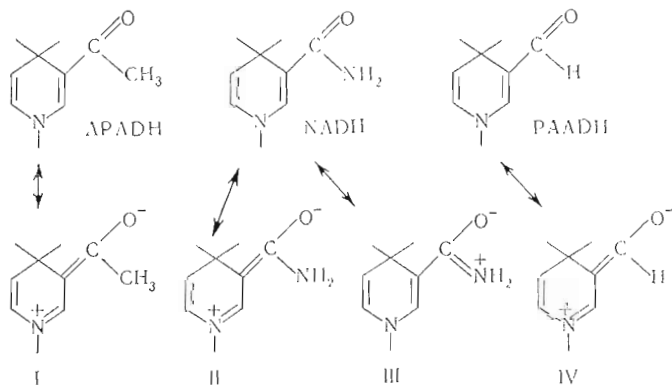
Обсуждая полученные данные, целесообразно сопоставить их с опубликованными ранее результатами исследования альдегидного аналога

(РААДН) [2]. При этом нужно учитывать различия и сходство карбоксамидной, ацетильной и альдегидной групп. Методом ИК-спектроскопии по влиянию полярности среды на полосу, соответствующую частоте колебаний $\text{C}=\text{O}$ -группы, было обнаружено для NADH наличие резонансной структуры III [8]. В карбоксамидной группе смещение электронной плотности к атому кислорода происходит за счет неподеленной пары электронов амидного атома азота и незначительно влияет на электронную систему пиридинового цикла. Подобная резонансная структура отсутствует в APAD и PAAD. Из резонансных структур I, II и IV, соответствующих возбужденному состоянию дигидропиридинового цикла, более вероятны I и IV, что объясняет длинноволновое смещение максимумов в спектрах поглощения и флуоресценции APADH и PAADH по сравнению с NADH.

В NAD и APAD заместители в положении 3 различаются по своей электронной структуре, по близки по размерам, а в APAD и PAAD электронная структура заместителей сходна, в то время как размеры существенно различны. Это обстоятельство позволяет выделить стерический и электронный эффекты при сравнении коферментных свойств NADH, APADH и PAADH.

Спектральные изменения при образовании двойных комплексов лактатдегидрогеназы с NADH, APADH и PAADH весьма сходны, что указывает на общие микроокружения дигидропиридинового цикла в этих комплексах.

Более высокая стабильность комплекса ЛДГ—APADH по сравнению с комплексом ЛДГ—NADH (табл. 2) может быть объяснена отсутствием для APADH биполярной структуры типа III, в форме которой NADH связывается с ферментом значительно слабее:



Комплекс ЛДГ—РААДН менее стабилен [2] по сравнению с комплексом ЛДГ—APADH. Это свидетельствует о существовании требования минимальных размеров 3-заместителя на стадии образования двойных комплексов. Вместе с тем для всех трех динуклеотидов пространственная ориентация дигидропиридинового цикла кофермента, по-видимому, одинакова.

При образовании тройных комплексов с субстратами и их аналогами расположение дигидропиридинового цикла кофермента относительно функциональных групп активного центра ЛДГ принципиально важно для эффективности каталитической реакции. Длинноволновое смещение максимума в спектре КД при образовании комплекса ЛДГ—APADH — оксамат указывает на существенно иное взаимодействие дигидропиридинового цикла кофермента с белком по сравнению с комплексами, образованными NADH и PAADH, в случае которых наблюдается коротковолновое смеще-

ние. Вероятно, такое взаимодействие приводит к ухудшению связывания оксамата в комплексе с АРАДН, в то время как прочность комплексов ЛДГ—NADH—оксамат и ЛДГ—РААДН—оксамат практически одинакова [2].

Для ответа на вопрос о влиянии изменения в структуре заместителя в положении 3 на кинетические параметры отдельных стадий реакции мы проводим в настоящее время работу методами скоростной кинетики [5, 6]. В том случае, если положение лимитирующей стадии в кинетическом механизме реакций превращения АРАДН и РААДН остается неизменным по сравнению с NADH, эффективность реакций на этой стадии может быть оценена уже сейчас из данных стационарной кинетики. Величина $k_{\text{кат}}$, являющаяся константой скорости реакции изомеризации тройного комплекса, существенно уменьшается как для АРАДН, так и для РААДН по сравнению с NADH [2]. Замедление конформационной перестройки белка, сопровождающее превращение тройного комплекса, может быть нарушено вследствие неблагоприятного взаиморасположения субстрата, кофермента и функциональных групп активного центра. Ответствен за это заместитель в положении 3 пиридинового цикла.

При использовании в качестве кофермента АРАД вместо NAD уменьшается величина K_m по отношению к лактату, в то время как в обратной реакции замена NADH на АРАДН вызывает увеличение K_m по отношению к пирувату. Это согласуется с более высокой величиной $K_{\text{дис}}$ комплекса ЛДГ—АРАДН—оксамат по сравнению с комплексом ЛДГ—NADH—оксамат. Противоположное изменение сродства лактата и пирувата к двойному комплексу при варьировании природы заместителя в положении 3 пиридинового цикла может свидетельствовать о различном участии этого заместителя в организации активного центра ЛДГ в прямой и обратной реакциях.

Экспериментальная часть

В работе использовали препараты NAD, NADH, пирувата натрия фирмы «Reanal» (Венгрия). Из кристаллического препарата лактатдегидрогеназы фирмы «Reanal» выделяли изофермент M_4 хроматографией на СМ-целлюлозе в соответствии с методом Ечаи [9]. В качестве препарата β -NAD-трансгликозидазы использовали микросомальную фракцию селезенки свиньи с уд. акт. 2,6 мккат*/мл.

Для синтеза АРАД использовали ферментативный метод, предложенный Капланом [11]. NAD (2,0 ммоль) и 3-ацетилпиридин (100 ммоль) инкубировали в течение 330 мин в 78 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 7,6) при конечной концентрации β -NAD-трансгликозидазы 33,4 мккат/мл, после чего белки осаждали 5%-ной трихлоруксусной кислотой. Из надосадочной жидкости ацетоном при 0° осаждали смесь нуклеотидов. Разделение этой смеси проводили на колонке с ДЕАЕ-сефадексом А-25 (100 × 1,5 см), уравновешенным 0,005 М фосфатным буфером, рН 6,0. Нуклеотиды элюировали в условиях градиента концентрации NaCl от 0 до $3 \cdot 10^{-2}$ М. Фракцию, содержащую АРАД, подвергали повторной хроматографии в этих же условиях. Препарат обессоливали на сефадексе G-10. Выход АРАД составлял 20—25%. Восстановленную форму динуклеотидов получали согласно методу [12].

При определении концентрации веществ использовали следующие коэффициенты: ЛДГ — $1,29 E_{280}^{0,1\%}$ [9]; АРАД — $\epsilon_{260} 16,4 \cdot 10^3$; NAD — $\epsilon_{259} 17,8 \cdot 10^3$; NADH — $\epsilon_{340} 6,22 \cdot 10^3$; АРАДН — $\epsilon_{363} 9,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [10].

УФ-спектры регистрировали на двухлучевом спектрофотометре «Pye Unicam» SP-800. Кинетические опыты проводили либо на приборе SP-800,

* Катал (кат) — единица ферментативной активности (Recommendation IUPAC — IUB (1972)), соответствующая превращению 1 моль субстрата за 1с.

либо на «Reaction Rate Analyzer» ЛКВ-4200А фирмы ЛКВ (Швеция) с использованием шкалы 0—0,05 на 20 см с самописцем ЛКВ-6500 при 35°. Спектры кругового дихроизма регистрировали на приборе «JASCO» ORD/UV-5. Разностные спектры снимали методом двойных кювет [13]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi» MPF-2А с самописцем OPD-33 (Япония). Флуоресценцию APADH возбуждали светом с длиной волны 360 нм, NADH — 340 нм.

Корректировку спектров и определение относительных квантовых выходов проводили по методу, предложенному Паркером [14]. Используя вольфрамовую лампу CU-200-8-у, находили поправочные коэффициенты в диапазоне 380—600 нм, на которые делили величины интенсивности флуоресценции с интервалом 5 нм. После построения скорректированного спектра определяли площадь над ним. Относительный квантовый выход рассчитывали по формуле

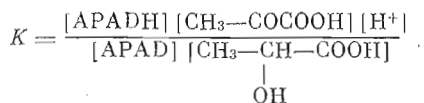
$$\Phi_2 = \frac{S_2 \Phi_1 D_1}{S_1 D_2}$$

где S_1 — площадь под скорректированным спектром NADH или APADH; Φ_1 — квантовые выходы NADH или APADH, условно принятые равными 1; S_2 — площадь под скорректированным спектром флуоресценции двойных или тройных комплексов, квантовые выходы которых определяются; D_1 — оптическая плотность раствора динуклеотида, D_2 — оптическая плотность комплексов. Величины D_1 и D_2 не должны превышать 0,2 оптических единиц.

Для определения $K_{\text{дис}}$ комплексов с лактатдегидрогеназой проводили флуориметрическое титрование, наблюдая флуоресценцию динуклеотида. Величины $K_{\text{дис}}$ рассчитывали либо из графиков в координатах двойных обратных величин (в тех случаях, когда $[L]_0 \gg [E]_0 > K_{\text{дис}}$, где $[E]_0$ — общая концентрация фермента, $[L]_0$ — общая концентрация лиганда) [15], либо из графиков в координатах $1/(1 - \alpha)$, $[L]_0/\alpha$, где α — степень насыщения активных центров фермента [3]. Для проведения титрования использовали калиброванный капилляр. Поправка на изменение объема не вводилась, поскольку разбавление к концу титрования не превышало 2%.

Для определения $K_{\text{дис}}$ аддуктов динуклеотидов с SO_3^{2-} -ионом снимали зависимость оптической плотности раствора в области 325—343 нм от концентрации Na_2SO_3 . Величину $K_{\text{дис}}$ рассчитывали из графиков в координатах двойных обратных величин [16].

Константу равновесия (K) окислительно-восстановительной реакции (1) определяли при 28° в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,0, при концентрации активных центров лактатдегидрогеназы $1,4 \cdot 10^{-7}$ и рассчитывали, пользуясь выражением



Концентрация APAD составляла $6,3 \cdot 10^{-5}$, лактата Li — $2,0 \cdot 10^{-2}$ М. Концентрацию образовавшегося APADH определяли по изменению оптической плотности раствора при 363 нм.

Определение скорости окислительно-восстановительной реакции проводили в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0, при 35°, реакцию окисления лактата — в присутствии 0,05 М семикарбазида. Величину скорости реакции рассчитывали как тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кинетической кривой или угла, образуемого касательной к начальному участку, отличающегося от линейного. Величины V относили к единице концентрации активных центров фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цетлип Л. Г., Калачева Н. И., Мальцев Н. И., Щорс Е. И., Яковлев В. А. (1975) Биоорган. химия, **1**, 1197—1205.
2. Гуревич В. М., Мальцев Н. И., Яковлев В. А., Янина М. М. (1975) Биоорган. химия, **1**, 1498—1504.
3. Holbrook J. J. (1973) Biochem. Soc. Trans., **1**, 615—620.
4. Hachert M. L., Ford G. C., Rossmann M. G. (1973) J. Mol. Biol., **78**, 665—673.
5. Whittaker J. R., Yates D. W., Bennett N. G., Holbrook J. J., Gutfrend H. (1974) Biochem. J., **139**, 677—697.
6. Südi J. (1974) Biochem. J., **139**, 251—259.
7. Kaplan N. O., Ciotti M. M., Stolzenbach F. E. (1956) J. Biol. Chem., **221**, 833—844.
8. Patrick D. M., Wilson J. E., Leroi G. E. (1974) Biochemistry, **13**, 2813—2816.
9. Jecsei G. (1961) Acta physiol. Acad. sci. hung., **20**, 339—342.
10. Siegel J. M., Montgomery G. A., Bock R. M. (1969) Arch. Biochem. and Biophys., **82**, 288—299.
11. Kaplan N. O., Ciotti M. M. (1956) J. Biol. Chem., **221**, 823—832.
12. Pastore E., Friedkin M. (1961) J. Biol. Chem., **236**, 2314—2316.
13. Swanney J. V. (1971) Anal. Biochem., **43**, 388—393.
14. Паркер С. (1972) Фотолюминесценция растворов, с. 247—253, «Мир», М.
15. Luisi P. L., Olomucki A., Karboric D. (1973) Biochemistry, **12**, 4100—4105.
16. Pfeleiderer G., Stock A. (1960) Chem. Ber., **93**, 3083—3099.

Поступила в редакцию
12.XII.1975

LACTATE DEHYDROGENASE INTERACTION WITH 3-ACETYL-PYRIDINE-ADENINE DINUCLEOTIDE

VORONTSOV E. A., GUREVICH V. M., KALACHEVA N. I.,
MALTSEV N. I., YAKOVLEV V. A.

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

The coenzyme properties of NAD, NADH and their 3-acetyl analogs (APAD, APADH) in the reaction catalyzed by pig muscle lactate dehydrogenase (LDH) isoenzyme (M₄) have been studied. The spectral changes of NADH and APADH which are caused by the nucleotide binding are similar, whereas the dissociation constant of LDH—APADH complex is about five times as low as for LDH—NADH complex. The dissociation constants of LDH—APADH—oxamate and LDH—APADH—lactate complexes and K_m values for APAD, lactate and pyruvate were also determined. The oxamate binding with the binary complexes LDH—NADH and LDH—APADH is accompanied by the opposite spectra shifts. The LDH catalytic constants for acetyl analog in direct and reverse reactions are reduced as compared with those for NAD. A possible role of the substituent in position 3 of the pyridine ring in catalysis is discussed.