



УДК 577.158.439

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
С АНАЛОГАМИ ЛАКТАТА*Мальцев Н. И., Цетлин Л. Г., Яковлев В. А.**Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт,
Москва*

Изучено взаимодействие изофермента M_4 лактатдегидрогеназы (ЛДГ) мышц свиньи с аналогами лактата. При связывании в активном центре ЛДГ молекулы лактата карбоксильная и метильная группы, а также оксигруппа взаимодействуют с соответствующими локусами активного центра. Аналоги, содержащие циклические неполярные остатки, дают прочные комплексы, но не превращаются. Изучение атомной модели ЛДГ позволило сделать вывод о взаимодействии метильной группы лактата с неполярным локусом в области остатков Tyr-246, Val-241. Только в тройных комплексах, образованных ЛДГ·NAD, лактатом или его аналогами, происходит вынужденное депротонирование функциональной группы активного центра, по-видимому гистидина. В комплексах, образованных NADH, независимо от структуры субстрата наблюдается протонирование.

Представления о способе связывания лактата и его активации в активном центре лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27, лактат: NAD-оксидоредуктаза) (ЛДГ) до настоящего времени были гипотетическими. Проведенные Росманом с сотрудниками рентгеноструктурные исследования тройного непродуктивного комплекса ЛДГ·NAD·пироват [1] позволяют лишь приблизительно оценить возможное расположение субстрата в реактивном тройном комплексе. Принципиальной трудностью является ориентация молекулы пировата в направлении пиридинового цикла метильной группой, а не α -углеродным атомом.

Можно было полагать, что каждая из частей молекулы лактата — метильная, карбоксильная и оксигруппа — взаимодействуют в активном центре ЛДГ с определенными локусами. Целью данной работы явилась характеристика сил связывания и выяснение их роли в образовании комплексов. Было проведено изучение тройных комплексов, образованных изоферментом M_4 ЛДГ мышц свиньи с окисленной или восстановленной формой кофермента и с аналогами лактата, замещенными в α - и β -положении.

Изученные аналоги лактата не окислялись NAD в присутствии ЛДГ и ингибировали реакцию конкурентно по отношению к лактату. На рис. 1 в качестве примера приведены результаты, полученные в опыте с Ph-лактатом. Рассмотрение констант ингибирования (K_i) (табл. 1 и 2) с учетом структуры аналогов позволяет сделать следующие выводы.

Исключение из структуры лактата метильной группы сильно ослабляет связывание: гликолевая кислота не ингибирует реакцию окисления лактата даже при концентрации более 10^{-1} М. Следовательно, метильная группа играет важную роль в связывании лактата, и в активном центре ЛДГ

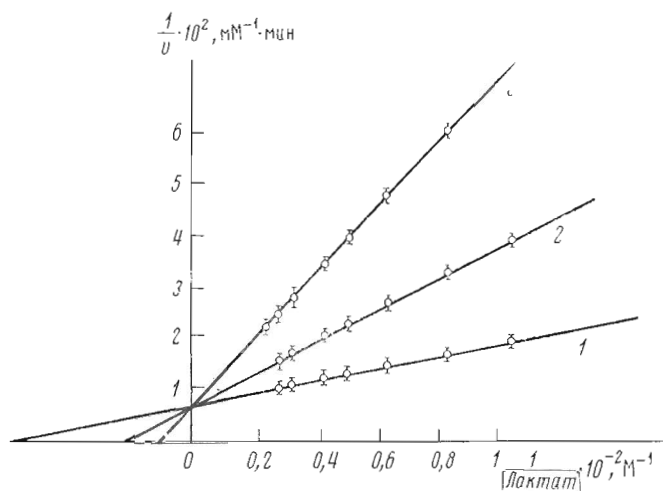
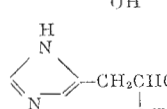
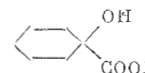


Рис. 1. Ингибирование реакции окисления лактата L-Ph-лактатом при концентрациях последнего 0 (1), $7,5 \cdot 10^{-4}$ (2), $1 \cdot 10^{-3}$ М (3). Концентрация NAD $1,5 \cdot 10^{-3}$, ЛДГ (активные центры) $7,1 \cdot 10^{-9}$ М

нужно ожидать соответствующего локуса связывания. Изучение атомной модели активного центра ЛДГ, собранной по координатам α -углеродных атомов [1], позволило нам прийти к заключению о взаимодействии метиль-

Таблица 1
Ингибирование ЛДГ производными лактата, содержащими различный β -заместитель

Аналог лактата	K_i , М
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, молочная кислота	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} (K_m)$
$\text{HC}(\text{OH})_2\text{COOH}$, гликолевая кислота	$> 1 \cdot 10^{-1}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, фенилмолочная кислота (Ph-лактат)	$(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, циклогексилмолочная кислота (сНх-лактат)	$(6,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, оксидекаповая кислота	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$
$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{OH})\text{COOH}$, изовалерьяновая кислота	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOCH}_3$, метиловый эфир фенилмолочной кислоты	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$
 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ *, имидазолмолочная кислота (Im-лактат)	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$ $(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$
 ; циклогексаномкарбоновая кислота	$(3,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-2}$
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, миндальная кислота	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$

* Значения K_i приведены для рН 8,0 и 6,0 соответственно.

Ингибирование ЛДГ производными лактата, содержащими различный α -заместитель

Аналог лактата	K_i , М
Молочная кислота	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-2} (K_m)$
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{COOH}$, тиомолочная кислота	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, аланин	$> 1 \cdot 10^{-1}$
$\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)(\text{OH})\text{COOH}$, оксизомаляная кислота	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$, изомасляная кислота	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$

ной группы субстрата с боковыми цепями остатков тирозина-246 и валина-241 (см. ниже).

Rh- и сПх-лактаты прочно связываются с комплексом ЛДГ·NAD, но не окисляются вследствие дезориентации молекулы относительно пиридинового цикла. Силы гидрофобного взаимодействия фенильного и циклогексильного остатков с метильным локусом повышают прочность комплексов, что подтверждается результатами опытов с Im-лактатом. Величины K_i для протонированной и непротонированной форм Im-лактата гораздо выше, чем в случае аналогов, содержащих фенильный остаток.

Из сравнения K_i для Rh-лактата и миндальной кислоты следует, что уменьшение размеров молекулы на CH_2 -группу приводит к резкому ослаблению связывания (в 40 раз), по-видимому, вследствие утраты других точек связывания.

Наличие длинного или разветвленного углеводородного радикала при C^α -атоме приводит к низкой эффективности связывания, как видно из значений K_i для оксидскаповой и изовалериановой кислот.

Полученные результаты указывают на неизменность субстратсвязывающего участка для всех изученных аналогов.

Для сравнения прочности связывания лактата и Rh-лактата в комплексах с восстановленной формой кофермента проводили титрование двойного комплекса, наблюдая за увеличением интенсивности флуоресценции динуклеотида. В опытах использовали 3-ацетилдигидропиридинадениндинуклеотид (АРАДН), так как в этом случае спектральные изменения были более глубокими, чем при применении NADH. Найденные величины $K_{\text{дис}}$ комплексов ЛДГ·АРАДН·лактат и ЛДГ·АРАДН·Rh-лактат составляют соответственно $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ и $(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$ М (рис. 2). Малая

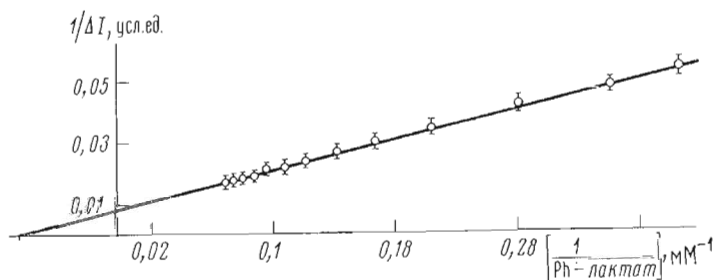


Рис. 2. Определение $K_{\text{дис}}$ тройных комплексов ЛДГ·АРАДН·Rh-лактат; концентрация ЛДГ (активные центры) $3,8 \cdot 10^{-4}$, АРАДН $5,5 \cdot 10^{-6}$ М

прочность связывания Ph-лактата с комплексом ЛДГ·АРАДН согласуется с низкой эффективностью ингибирования ($K_i > 10^{-1}$ М) этим соединением реакции восстановления пирувата NADH. По данным Хольбрука [2], введение в молекулу пирувата нитрофенильного остатка также ухудшает взаимодействие с комплексом ЛДГ·NADH.

Таким образом, введение фенильного остатка по-разному влияет на прочность тройных комплексов с окисленной и восстановленной формами кофермента. Следовательно, состояние активного центра, в частности субстратсвязывающего участка, зависит от того, в какой форме находится пиридиновый цикл кофермента.

Предположение о существовании в активном центре ЛДГ функционально важной неполярной области было высказано нами ранее при изучении ингибиторов типа N-ациламинокислот [3]. Типичным представителем таких ингибиторов является бензоиллейцин, структура которого формально сходна со структурой Ph-лактата, поскольку в молекулах обоих соединений имеется фенильный остаток и карбоксильная группа. Ранее было показано, что бензоиллейцин ингибирует реакцию окисления лактата [3]. Повторные опыты, проведенные нами в более широком диапазоне концентраций лактата, показали, что бензоиллейцин является конкурентным ингибитором по отношению к природному субстрату. Величина K_i для него составляет $(5,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$ М. Для решения вопроса, взаимодействует ли бензоиллейцин с метильным локусом активного центра, мы изучили совместное ингибирование реакции окисления лактата бензоиллейцином и Ph-лактатом. Анализ полученных данных показал (рис. 3), что связывание этих ингибиторов происходит в одном и том же участке.

Другой точкой связывания Ph-лактата является карбоксильная группа [1]. Этерификация Ph-лактата сопровождается ослаблением связывания. Величина K_i для метилового эфира Ph-лактата в 4 раза больше, чем для Ph-лактата. Отсюда разница в изменении свободной энергии при связывании составляет $\Delta\Delta G = -RT \ln (K_i' / K_i'') = 0,84$ ккал/моль. Эта величина удовлетворительно объясняет образование ионной пары карбоксилата с катионной группой активного центра, предположительно с остатком аргинина-171 [1]. Из приведенных выше результатов следует, что в комплексе ЛДГ·NAD·Ph-лактат молекула субстрата взаимодействует фенильным остатком и карбоксильной группой с соответствующими локусами активного центра.

Оксигруппа также, по-видимому, может образовывать связь, например, с имидазольным циклом остатка гистидина. Участие гистидина в образовании тройных комплексов с пируватом было показано в работах Хольбрука [4] и Россмана [1]. Для выяснения вопроса, образует ли оксигруппа лактата и его аналогов водородную связь с функциональной группой активного центра, нами проанализированы величины K_i аналогов лактата, содержащих различные заместители в α -положении. Из данных табл. 2 видно, что замена оксигруппы на метильную группу (изомасляная кислота) обуславливает слабое связывание. Интересный случай представляет оксизомасляная кислота. Несмотря на наличие оксигруппы, водородная связь, вероятно, не образуется.

Тиолактат связывается прочнее, чем изомасляная кислота, что позволяет сделать предположение об образовании водородной связи меркаптогруппой. И наконец, аланин не ингибирует реакцию окисления лактата даже при концентрации 0,5 М, по-видимому, вследствие электростатического отталкивания между положительно заряженной аминогруппой аланина и имидазольным остатком гистидина в активном центре белка.

Исследованы кривые рН-зависимостей величин K_m лактата и K_i его аналогов. Как видно, сродство лактата (K_m) увеличивается с повышением рН (рис. 4). Аналогичная зависимость была получена ранее Швертом для изофермента H_4 ЛДГ и объяснена участием в связывании лактата протонированной группы с $pK \sim 7$ [5]. Кривые для тиолактата и Ph-

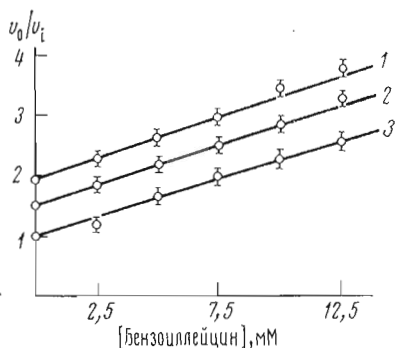


Рис. 3

Рис. 3. Совместное ингибирование окисления лактата ($1,4 \cdot 10^{-2}$ M) бензоиллейцином ($2,5 \cdot 10^{-3}$ — $1,25 \cdot 10^{-2}$ M) и Ph-лактатом при концентрациях последнего $8,0 \cdot 10^{-3}$ (1), $4,0 \cdot 10^{-3}$ (2) и 0 M (3). Концентрация NAD $1,5 \cdot 10^{-3}$, ЛДГ (активные центры) $1,4 \cdot 10^{-8}$ M

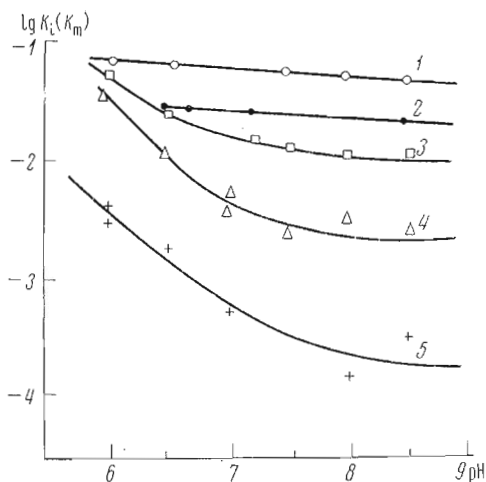


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость от pH величины K_m для лактата (3) и констант связывания для оксизомасляной (1), изомасляной (2), тиомолочной (4) и фенилмолочной (5) кислот

лактата имеют такой же вид, что свидетельствует в пользу образования водородных связей в тройных комплексах. Таким образом, оксигруппы лактата, Ph-лактата, а также меркаптогруппа тиолактата взаимодействуют с функциональной группой активного центра — по-видимому, с остатком гистидина-195.

Исследование атомной модели позволило наглядно изобразить расположение Ph-лактата в активном центре ЛДГ (рис. 5). Карбоксилат и оксигруппы образуют связи с остатками аргинина-171 и гистидина-195. Эффективное взаимодействие фенильного остатка с метильным локусом вызывает перемещение молекулы в направлении от пиридинового цикла и делает расстояние между атомами углерода, обменивающимися водородом, слишком большим для осуществления его переноса. Из модели видно, почему невозможно превращение тиолактата. Структура лактата и тиолактата идентична, за исключением заместителя в α -положении. Меркаптогруппа по сравнению с оксигруппой обладает большей поляризуемостью, меньшей энергией связи H-атома [6]. Эти факторы должны были бы облегчить реакцию окисления, но большие размеры атома серы вызывают смещение молекулы, в результате чего перенос водорода становится невозможным.

Изменения в структуре субстрата, расположение его относительно кофермента не влияют на электронное состояние пиридинового цикла. В опытах, проведенных с комплексом ЛДГ·NADH, наблюдалось увеличение интенсивности флуоресценции дигидропиридинового цикла при связывании не только лактата, Ph-лактата и тиолактата, но и изомасляной и оксизомасляной кислот, не образующих водородную связь с гистидином активного центра.

Если при связывании пирувата и его аналогов с комплексом ЛДГ·NADH происходит вынужденное протонирование имидазольного цикла гистидина [7], то при взаимодействии аналогов лактата с ЛДГ·NAD должно наблюдаться депротонирование. Это предположение подтвердилось опытами, в которых ионное состояние комплекса ЛДГ·NAD изучалось в зависимости от окислительно-восстановительной формы кофермента и строения аналога субстрата. В каждом опыте смешивали растворы двой-

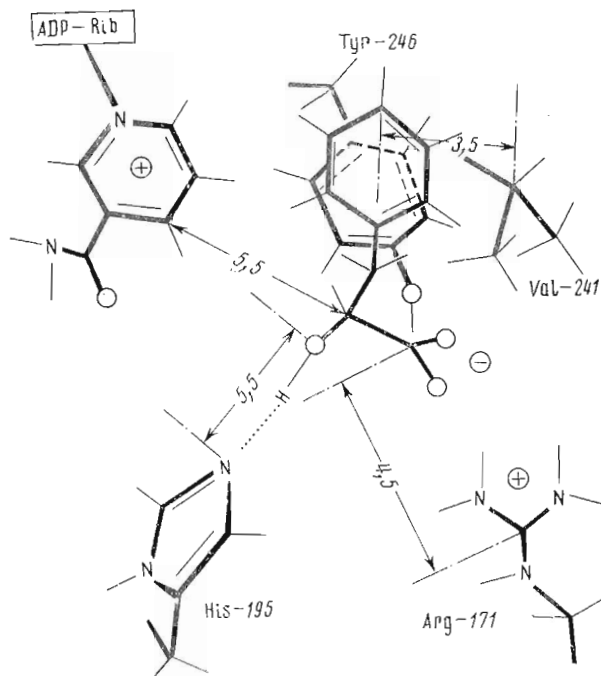


Рис. 5. Модель взаимодействия Ph-лактата с функциональными группами активного центра в комплексе ЛДГ·NAD. Приведены расстояния в Å

ного комплекса ЛДГ и аналога при одинаковых значениях pH. Об изменении ионного состояния комплекса судили по величине pH раствора, определенному потенциометрически на pH-метре стеклянным электродом или по изменению оптической плотности индикатора. Как и следовало ожидать, выделение H^+ наблюдали при образовании тройных комплексов ЛДГ·NAD·тиолактат и ЛДГ·NAD·оксалаат, а для комплексов ЛДГ·NADH·тиолактат и ЛДГ·NADH·оксалаат регистрировали поглощение H^+ . Количество H^+ , определенное обратным титрованием, в каждом случае соответствовало изменению ионного состояния единственной функциональной группы с $pK \sim 7,0 \pm 0,2$.

Интересно сопоставить изменение ионного состояния комплексов ЛДГ·NAD и ЛДГ·NADH со структурой субстратов. Связывание тиолактата с комплексом ЛДГ·NAD приводит к выделению H^+ , а с комплексом ЛДГ·NADH — к поглощению. Следовательно, на свойства гистидина активного центра решающее влияние оказывает окислительно-восстановительное состояние пиридинового цикла. Этот вывод согласуется с результатами опытов с оксалаатом, карбоксильные группы которого, возможно, могут образовывать ионную пару с протонированным имидазольным циклом. Однако, как и в случае комплекса с тиолактатом, происходит депротонирование гистидина. По-видимому, ионное состояние гистидина определяет не структуру субстрата, а конформационное состояние активного центра. Сближенность других функциональных групп — карбоксильной группы остатка глутаминовой кислоты-107, оксигруппы серина-268 — может изменять кислотно-основные свойства имидазольного цикла гистидина. В свою очередь, локальные изменения в активном центре могут происходить при переходе пиридинового цикла из окисленного в восстановленное состояние, так как это сопровождается изменением пространственного расположения заместителя у $C_{(3)}$ никотинамидного кольца и свойств гетероцикла.

Экспериментальная часть

Применялись препарат лактатдегидрогеназы — изофермент M_4 мышц свиный, выделенный из кристаллического препарата (Reanal, Венгрия), по методу Ечаи [8], препараты NAD, NADH, пируват натрия (Reanal), APAD (Serva, ФРГ). APADH был получен ферментативным восстановлением APAD [9]. NADH и APADH очищались хроматографией на DEAE-целлюлозе в градиенте фосфатного буфера 0,005—0,1 М; pH 7,2. Использовались хлорфеноловый красный (Chemapol, Чехословакия), изомаляная, α -меркаптопропионовая, гликолевая, миндальная, α -оксиизомаляная кислоты (Schuchart, ФРГ). α -Меркаптопропионовая кислота очищалась перегонкой в токе азота (т. кип. 72,5°/15 мм рт.ст.). *L*-Ph-лактат, *L*-сНх-лактат, метиловый эфир *L*-Ph-лактата, *L*- α -оксидекаановая, оксизовалериановая, циклогексанолкарбоновая кислоты были любезно предоставлены Н. Г. Крит (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина). *L*-Имидозолиллактат был синтезирован в Новочеркасском политехническом институте (т. пл. 204°).

Концентрации ЛДГ и динуклеотидов определяли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции: ЛДГ — $E_{280}^{0,1\%}$ 1,29 [9], NADH — ϵ_{340} 6,22·10³, NAD — ϵ_{280} 17,8·10³, APADH — ϵ_{360} 9,1·10³ [10].

Величину начальной скорости определяли по изменению концентрации NADH на приборе Reaction Rate Analyzer LKB-8600-A (Швеция), используя шкалу 0,05 ед. оптической плотности на 20 см при 35°. Характер ингибирования исследовали, определяя зависимость начальной скорости реакции от концентрации лактата и кофермента при постоянной концентрации ингибитора.

Опыты по измерению константы ингибирования проводились при pH 7,2 в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 0,05 М семикарбазид. Значения K_i вычисляли по Лайлуиверу — Берку [11].

Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Hitachi MPF-2A (Япония) с самописцем QPD₃₃. Флуоресценцию нуклеотидов возбуждали светом с длиной волны 340 нм в случае NADH и 360 нм в случае APADH.

Константы диссоциации комплексов ЛДГ·APADH·лактат и ЛДГ·APADH·Ph-лактат определяли методом флуориметрического титрования, наблюдая изменение флуоресценции нуклеотида при 7° в 0,02 М пиррофосфатном буфере, pH 6,0. Концентрация APADH составляла 5,5·10⁻⁶ М, ЛДГ — 3,8·10⁻⁴ М активных центров. Изменение объема в кювете к концу титрования не превышало 2%. Величины $K_{дис}$ рассчитывали из графиков в координатах двойных обратных величин, так как $[L_0] \gg \gg [E_0] < K_{дис}$, где $[E_0]$ — общая концентрация APADH·ЛДГ, $[L_0]$ — концентрация лиганда [12].

Опыты по выделению и поглощению протона проводили на двухлучевом спектрофотометре SP-800 Pye Unicam и на pH-метре ЛПУ-01 с выносным самописцем ЭПН-09 [13]. Выделение или поглощение протона при образовании тройных комплексов регистрировали потенциометрически с помощью стеклянного электрода или спектрофотометрически при 580 нм с использованием индикатора хлорфенолового красного. К раствору двойного комплекса ЛДГ·NAD или ЛДГ·NADH, содержащему индикатор, добавляли раствор аналога субстрата, также содержащий индикатор. Изменение оптической плотности или pH после смешивания свидетельствовало о поглощении или выделении протона в среду. Затем проводилось обратное титрование 0,001 н. NaOH или 0,001 н. HCl. Исходные растворы двойного комплекса и аналога субстрата не различались по значению pH и по оптической плотности при 580 нм. Растворы двойных комплексов и аналогов при образовании тройных комплексов ЛДГ·NAD·тиолактат, ЛДГ·NADH·тиолактат, ЛДГ·NAD·оксалат имели pH 6,0, а при образо-

вании комплекса ЛДГ·NADH·оксалат — 6,5. Изменения после смешивания растворов составляли 0,015—0,02 единицы рН, изменения оптической плотности — 0,014—0,04.

ЛИТЕРАТУРА

1. Holbrook J. J., Liljas A., Stendel S. I., Rossman M. G. (1975) in *The Enzymes*, XI, Part A, Acad. Press.
2. Holbrook J. J., Stinson R. A. (1973) *Biochem. J.*, **131**, 739—748.
3. Воронцов Е. А., Мальцев Н. И., Щорс Е. И., Яковлев В. А. (1974) *Биохимия*, **39**, 252—265.
4. Holbrook J. J., Ingram V. A. (1973) *Biochem. J.*, **131**, 729—735.
5. Schwert G. W., Miller V. A., Peanasky R. J. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 3245—3248.
6. Пюльман Б., Пюльман А. (1965) *Квантовая биохимия*, с. 425, «Мир», М.
7. Holbrook J. J., Gutfreund H. (1973) *FEBS Lett.*, **31**, 157—162.
8. Ecsai G. (1961) *Acta physiol. Acad. sci. hung.*, **20**, 339—342.
9. Kaplan N. O., Ciotty M. M. (1965) *J. Biol. Chem.*, **221**, 823—832.
10. Siegel J. M., Montgomery G. A., Bock R. M. (1969) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **82**, 288—299.
11. Lineweaver H., Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658—660.
12. Luisi P. L., Olomucki A., Karboric D. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4100—4105.
13. Малахов А. А., Волков В. В., Познанская А. А., Яковлев В. А. (1972) *Биохимия*, **36**, 1166—1171.

Поступила в редакцию
28.IX.1976

LACTATE DEHYDROGENASE INTERACTION WITH THE LACTATE ANALOGS

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

All-Union Institute for Vitamin Research, Moscow

A study has been performed of the lactate dehydrogenase (LDH) M₄ interaction with the analogs of lactate. The carboxy, methoxy and hydroxy groups of the substrates were shown to bind to the respective loci of the active site. The analogs comprising cyclic non-polar moieties form stable complexes which, however, are incapable of further reaction. Analysis of model of LDH three-dimensional structure allowed to suggest that methyl group of lactate molecule interacts with a locus in the vicinity of Tyr 246 and Val 241 residues. It is only for ternary complexes formed by LDH·NAD and lactate or its analogs that the deprotonation of a functional group (presumably, that of histidine) in the active site does occur. On the other hand, in complexes with NADH, independently of the substrate structure the protonation is observed.
