



УДК 577.158.347.02

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА АНАЛОГОВ  
НИКОТИНАМИДАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА, СОДЕРЖАЩИХ  
В ПОЛОЖЕНИИ 3 ПИРИДИНОВОГО ЦИКЛА  
ТРИХЛОРАЦЕТИЛЬНУЮ И ТРИФТОРАЦЕТИЛЬНУЮ ГРУППЫ

*Воронцов Е. А., Калачева Н. И., Мальцев П. И.*

*Всесоюзный научно-исследовательский витаминный институт, Москва*

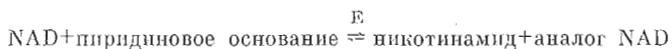
Синтезированы аналоги NAD, содержащие в положении 3 пиридинового цикла трихлорацетильную и трифторацетильную группы (аналоги I и II). Структура динуклеотидов подтверждена спектрами ПМР и кислотным гидролизом. Аналоги не взаимодействуют с сульфитом и дитионитом натрия, очевидно, вследствие электронодонорного влияния заместителя в форме гем-диола. Они не являются субстратами в реакциях, катализируемых лактатдегидрогеназой, но эффективно ингибируют их, конкурентно по отношению к NAD. Связывание в активном центре фермента аналога (I) сопровождается изменением его спектров флуоресценции подобно тому, как это происходит в модельных опытах при повышении полярности среды. Образование тройных комплексов с лактатом и оксаматом, по-видимому, не происходит. Обсуждается взаимодействие аналогов с функциональными группами активного центра.

Перспективным направлением поиска новых лекарственных средств является химическое модифицирование природных субстратов и коферментов. Получаемые при этом соединения могут также успешно применяться для изучения механизма действия ферментов.

Аналоги никотинамидадениндинуклеотида (NAD) широко использовались в исследовании механизмов реакций, катализируемых дегидрогеназами [1, 2]. Наибольший интерес представляет модифицирование амидной группы в положении 3 пиридинового цикла NAD, поскольку этот заместитель в фермент-субстратном комплексе расположен в непосредственной близости к центру катализа.

Цель данной работы — синтез аналогов NAD, содержащих трихлорацетильную (аналог I) и трифторацетильную (аналог II) группы, и испытание их коферментной (субстратной) способности в реакциях, катализируемых изоферментом  $M_1$  лактатдегидрогеназы мышц свиньи (КФ 1.1.1.27, ЛДГ).

Синтез аналогов I и II проводили в соответствии с методом Каплана и сотр., используя реакцию переноса, катализируемую  $\beta$ -NAD-гликогидролазой (КФ 3.2.2.5) [3].



При этом NAD выступает в роли донора остатка аденозиндифосфата, а соответствующее пиридиновое основание — как акцептор. В качестве

Рис. 1. Кинетические кривые образования аналога I (1) и убыли NAD (2) (см. «Эксперим. часть»)

Рис. 2. Профиль хроматографической очистки аналогов I (а) и II (б) (пики 2; пики 1 — NAD). а — колонка (30×3 см) с DEAE-целлюлозой ( $\text{HCO}_3^-$ ), элюция в градиенте концентрации триэтиламонийбикарбонатного буфера, pH 7 (указаны ступени градиента); б — колонка (100×1 см) с дауэком 1×2 ( $\text{HCOO}^-$ ), элюция в градиенте  $\text{HCOOH}$

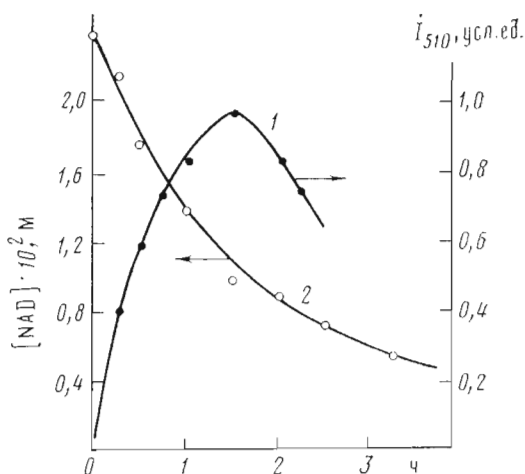


Рис. 1

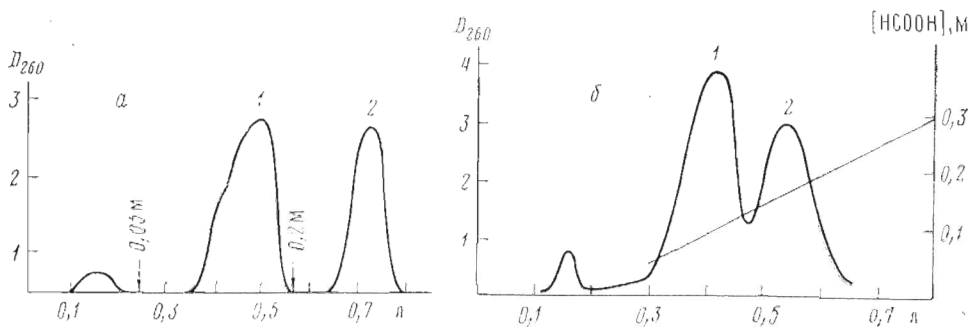


Рис. 2

препарата  $\beta$ -NAD-гликогидролазы использовали микросомальную фракцию селезенки свиньи [4]. Поскольку фермент катализирует образование  $\beta$ -гликозидной связи, примененный метод синтеза однозначно определяет структуру образующегося аналога.

За образованием аналога I следили по флуоресценции раствора при 500 нм (см. ниже). Количество NAD определяли реакцией с этанолом, катализируемой алкогольдегидрогеназой дрожжей [5] (рис. 1). Кинетику образования аналога II проследить не удалось, так как этот аналог и NAD обладают исходными спектральными свойствами. Реакцию синтеза останавливали при почти полном исчерпании NAD (>90%).

При синтезе аналога II вследствие низкой растворимости 3-трифтор-ацетилпиридина в водном растворе в реакционную смесь добавляли диметилсульфоксид в концентрации 37% (в контрольных опытах диметилсульфоксид в такой концентрации не влиял на скорость гидролиза NAD). После окончания реакции белки осаждали трихлоруксусной кислотой, а смесь нуклеотидов из надосадочного раствора выделяли добавлением ацетона на холоду. Осаждение нуклеотидов из водного раствора проводили еще 2—3 раза для удаления основного количества пиридиновых оснований, а затем нуклеотиды хроматографировали на ионообменных смолах. На этой стадии очистки задача сводилась к подбору таких условий, в которых бы удовлетворительно разделялись аналог и примесь непрореагировавшего NAD.

Хроматографическую очистку аналога I проводили на DEAE-целлюлозе в триэтиламонийбикарбонатном буфере, используя метод ступенчатой элюции (рис. 2а).

**Величины химических сдвигов в спектрах ПМР NAD, аналогов I и II  
при концентрации динуклеотида 0,03 М, пиридиновых оснований  
0,1 М в D<sub>2</sub>O**

Соединение	Протоны пиридинового цикла *				Протоны аденинового цикла *	
	2-Н	4-Н	5-Н	6-Н	2-Н	8-Н
Аналог I	9,27	8,89	8,24	9,23	8,38	8,50
Аналог II	9,20	8,94	8,18	9,04	8,21	8,35
NAD	9,30 (9,38)	8,86 (8,90)	8,16 (8,26)	9,20 (9,22)	8,06 (8,10)	8,38 (8,40)
3-Трихлорацетилпиридин	9,20	8,77	8,18	9,00	—	—
3-Трифторацетилпиридин	9,04	8,91	8,22	8,93	—	—

\* В скобках приведены данные для NAD из работы [6].

Аналог II и NAD не удалось разделить на DEAE-целлюлозе или DEAE-сефадексе А-25 при pH 6—7 в условиях возрастающего градиента концентрации NaCl. Удовлетворительное разделение было достигнуто при хроматографии на колонках с даунксом 1×2 в форматной форме в линейном градиенте концентрации муравьиной кислоты (рис. 2б). Повторная хроматография в тех же условиях позволяла получить препарат аналога II, не содержащий примесь NAD.

Для идентификации полученных соединений использовали кислотный гидролиз и спектральные методы. Гидролиз аналогов проводили нагреванием в 5,7 н. HCl, после чего продукты деструкции анализировали методом хроматографии в тонком слое силикагеля. Помимо аденина в гидролизатах аналогов I и II обнаружены трихлорацетилпиридин и трифторацетилпиридин соответственно.

В спектрах ПМР аналогов (рис. 3 и таблица) имеются сигналы протонов пуринового, пиридинового и пентафуранозного циклов (в области 6 м.д.). Из сравнения величин химических сдвигов протонов видно, что сигналы пиридиновых циклов динуклеотидов имеют заметное смещение в область сильного поля по сравнению с сигналами оснований — трифторацетилпиридином и трихлорацетилпиридином. Аналогичное смещение сигналов протонов пиридинового цикла NAD в область сильного поля по сравнению с соответствующими сигналами никотинамида было ранее объяснено электрооттягивающим влиянием остатка рибозы, а также стеккинг-взаимодействием между гетероциклами в молекуле динуклеотида в «свернутой» конформации [6, 7]. Таким образом, результаты опытов по кислотному гидролизу и спектры ПМР соответствуют структуре аналогов I и II.

При изучении пиридиновых динуклеотидов большой интерес представляют их спектральные свойства, позволяющие следить за взаимодействием с дегидрогеназами. В спектре поглощения аналога I кроме максимума при 260 нм имеются две слабые полосы в области 360—420 нм (рис. 4). Аналог I интенсивно флуоресцирует, причем в спектре флуоресценции наблюдаются полосы при 450 и 500 нм, соответствующие полосам в спектре поглощения. Интенсивность флуоресценции и оптическая плотность растворов аналога I зависят от pH раствора (рис. 4 и 5а). В спектре флуоресценции при кислых значениях pH наблюдается полоса в области 450 нм, а при щелочных значениях — в области 500 нм.

В спектре поглощения аналога II отсутствуют длинноволновые полосы и не наблюдается флуоресценция в диапазоне 300—600 нм.

Спектры поглощения аналогов I и II не изменяются при добавлении Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> при pH 8,0. По-видимому, по положению 4 пиридинового цикла аналогов образования аддуктов не происходит. Мы не наблюдали также образования восстановленной формы аналогов I и II при действии дитио-

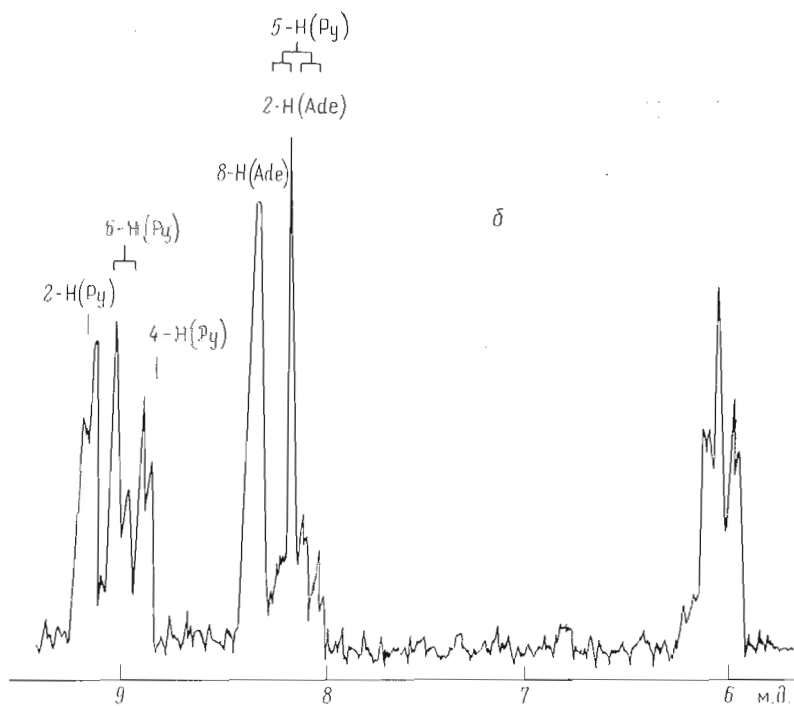
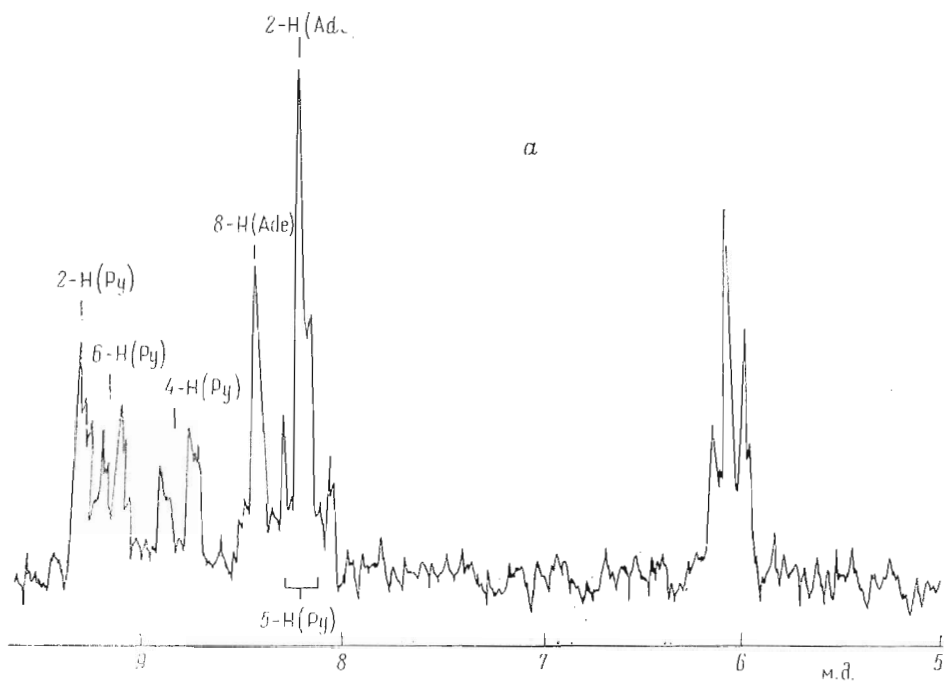


Рис. 3. Спектры ПМР аналогов I (а) и II (б) в  $D_2O$  при рD 7 и  $34^\circ$ . Концентрация нуклеотида 30 мМ

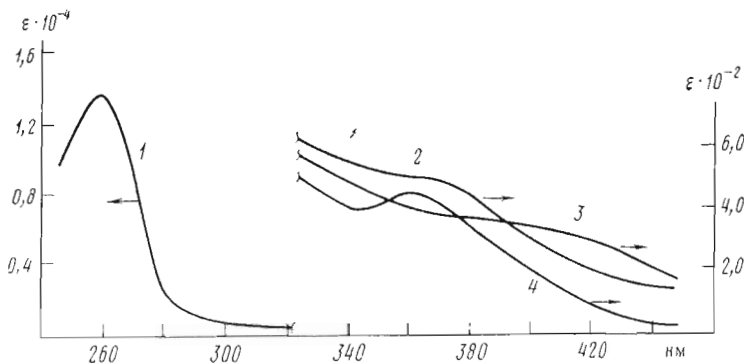


Рис. 4. Спектры поглощения аналога I при pH 6,0 (1), 10 (2), 7,0 (3) и 1,0 (4)

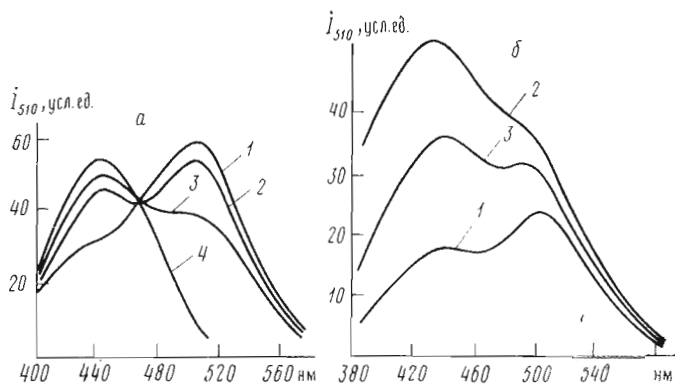


Рис. 5. Спектры флуоресценции аналога I: а — в водном растворе, pH 8,1 (1), 7,0 (2), 5,5 (3), 4,0 (4); б — в водном растворе, pH 6,0 (1), в тех же условиях в комплексе с ЛДГ (2), в водно-этанольном растворе (1:1 по объему) (3). Условия: 0,02 М пирофосфатный буфер, pH 6,0, при 20°; концентрация аналога I — 50 и ЛДГ — 520 мкМ (активных центров); длина волны возбуждающего света 360 нм

цита натрия при pH 8,0: в течение 1,5 ч при 25° в области 280—360 нм не происходило спектральных изменений. Эти данные указывают на то, что электрофильность пиридинового цикла в аналогах I и II по сравнению с молекулой NAD понижена, хотя введение в положение 3 пиридинового цикла таких электроноакцепторных группировок, как трифтор- или трихлорацетильная, должно было привести к ее увеличению.

Хорошо известно, что многие альдегиды и кетоны, содержащие электроотрицательные заместители, легко гидратируются. Было показано, что кетогруппа 3-трифторацетилпиридина легко гидратируется, а образующийся гидрат стабилен — кристаллизуется из безводных растворителей и сублимируется без потери воды [8]. Следует отметить, что полученный Фандом и Лутомским 3-трихлорацетилпиридин имел состав, отвечающий моногидрату [9]; не исключено, что и это соединение существует в виде гем-диола, однако более детальное изучение этого вопроса авторами не проводилось. По сравнению с пиридиновыми основаниями кетогруппа заместителей в аналогах I и II должна удерживать воду еще прочнее вследствие сильного электроноакцепторного влияния пиридиниевого катиона и пентафуранозного цикла. В форме гем-диола заместитель обладает более слабым электроноакцепторным свойством по сравнению с амидной группой NAD. Это приводит к увеличению электронной плотности в по-

Рис. 6. Интенсивность флуоресценции аналога I в зависимости от pH. Длина возбуждающего света 434 нм, концентрация аналога 0,5 мМ

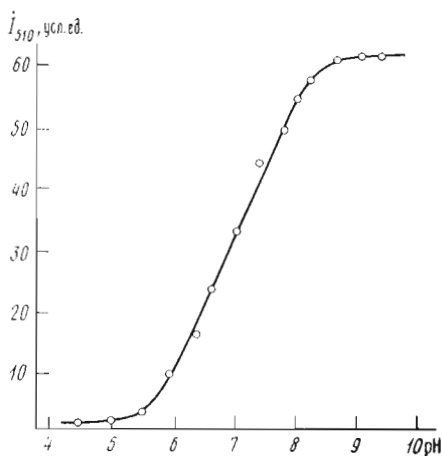


Рис. 6

Рис. 7. Влияние аналога I в концентрации 0 (1), 0,044 (2) и 0,22 мМ (3) (а) и аналога II в концентрации 0 (1) и 0,18 мМ (2) (б) на скорость окисления молочной кислоты лактатдегидрогеназой. Условия: аналог, 50 мМ L-молочная кислота, 9,0 нМ активных центров фермента в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7) при 35°

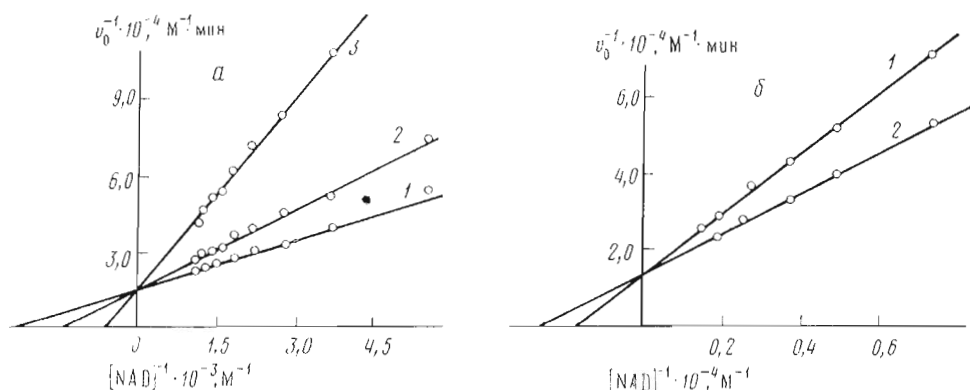
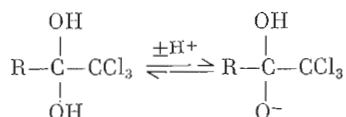


Рис. 7

ложении 4 пиридинового цикла аналогов I и II, и в результате становится невозможным как образование аддуктов, так и восстановление.

Величина рК-перехода (рис. 6) составляет  $7,0 \pm 0,2$ . Эта величина существенно отличается от величин, определенных ранее для NAD [6, 10], и соответствует, по-видимому, диссоциации одной из оксигрупп *гем*-диола аналога I:



Полоса в области 450 нм в спектре флуоресценции аналога I соответствует, вероятно, протонированной форме заместителя, а полоса в области 510 нм — депротонированной форме.

Флуоресценция аналога I зависит от полярности растворителя. Уменьшение полярности приводит к изменению соотношения интенсивностей полос в спектре (рис. 5б), что указывает на сдвиг равновесия в сторону образования протонированной формы. Увеличивается также квантовый выход флуоресценции аналога I.

Не исключено, что и в случае аналога II оксигруппы заместителя способны к ионизации. Известно, что в водном растворе *гем*-диольная группа трифторацетофенона имеет рК 10,0 [11]. Для аналога II ионизация одной из оксигрупп должна происходить еще легче вследствие более

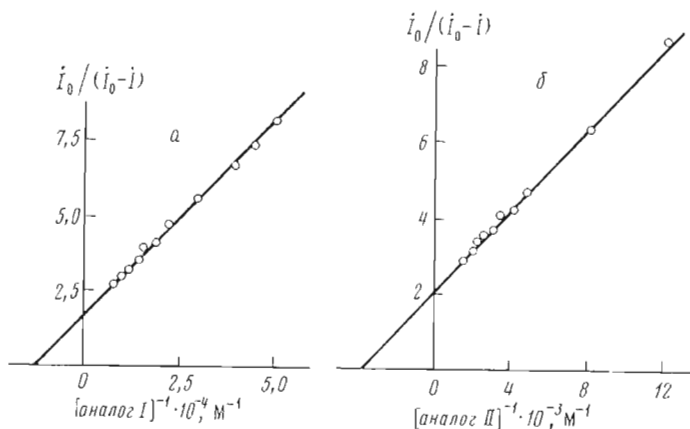


Рис. 8. Результаты флуориметрического титрования лактатдегидрогеназы аналогом I (а) и аналогом II (б). Концентрация фермента 0,12 мкМ активных центров, 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,0) при 8°. Длина волны возбуждения 280 нм, флуоресценции — 350 нм

сильного электронооттягивающего влияния пиридинового катиона по сравнению с фенильным циклом.

При расщеплении динуклеотидов фосфодиэстеразой до смеси мононуклеотидов происходит увеличение поглощения при 260 нм. Степень гиперхромизма, вычисленная по разностным спектрам как отношение площадей под спектрами поглощения [12] динуклеотидов и мононуклеотидов, полученных при гидролизе, составила для аналогов I и II 9 и 15% соответственно, что близко к величине 8%, найденной нами для NAD. Вероятно, взаимодействие гетероциклических оснований в этих динуклеотидах происходит примерно одинаково.

Так как аналоги I и II не образуют аддукты с нуклеофильными агентами и не восстанавливаются дитионитом натрия, можно было ожидать, что они не будут реагировать и в реакциях, катализируемых лактатдегидрогеназой. Действительно, при инкубации стандартного раствора [7] фермента не наблюдалось изменения спектров поглощения или флуоресценции. Восстановления аналогов I и II не произошло, очевидно, в результате связывания заместителя в форме гем-диола.

Аналоги эффективно связывались с ферментом и ингибировали реакцию окисления лактата конкурентно по отношению к NAD (рис. 7). Величины  $K_i$  составили для аналогов I и II  $0,09 \pm 0,01$  и  $0,34 \pm 3$  мМ соответственно.

Образование комплекса ЛДГ-аналог I сопровождается увеличением квантового выхода флуоресценции и изменением соотношения интенсивностей полос при 450 и 510 нм в спектре флуоресценции динуклеотида (рис. 5б). Аналогичные изменения спектра флуоресценции аналога I происходят при уменьшении полярности среды в водно-этанольном растворе. По-видимому, в активном центре лактатдегидрогеназы пиридиновый цикл динуклеотида находится в неполярном окружении, а гем-диольная группа аналога I — в неионизованной форме. Заключение о неполярной природе пиридинсвязывающего участка активного центра фермента согласуется с выводами Скотта и сотр., исследовавших флуоресценцию NADH в комплексе ЛДГ·NADH [13].

Образование комплекса фермента с аналогами I и II сопровождается тушением флуоресценции белка, что позволило определить величины констант диссоциации ( $K_{дис}$ ) (рис. 8), составляющие  $0,074 \pm 0,03$  и  $0,25 \pm \pm 0,02$  мМ соответственно и практически совпадающие с величинами  $K_i$ . Величина  $K_{дис}$  комплекса ЛДГ·NAD, определенная ранее, равна 0,3 мМ

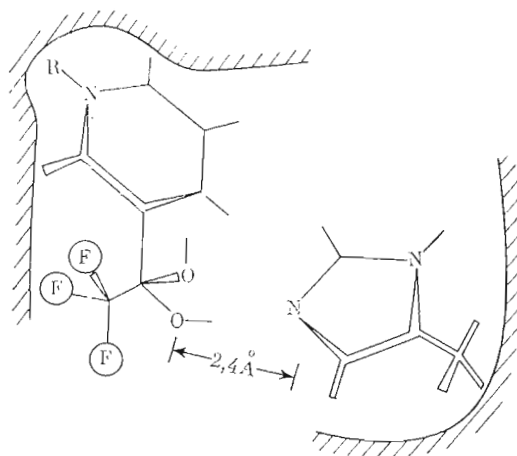


Рис. 9. Участок взаимодействия *gem*-диола трифторацетильной группы аналога II с имидазольным циклом остатка His<sup>195</sup> активного центра лактатдегидрогеназы. R — остаток аденозиндифосфатрибозы

[14]. Прочность комплексов лактатдегидрогеназы с NAD и с аналогом II различается, таким образом, незначительно. Очевидно, гидратированная трифторацетильная группа аналога II взаимодействует с функциональными группами активного центра так же эффективно, как и амидная группа NAD.

Добавление *L*-лактата или оксамата натрия к комплексам аналога I и аналога II с лактатдегидрогеназой не вызывало изменений в спектрах поглощения и флуоресценции. Образование тройного комплекса оказывается невозможным в результате взаимодействия заместителя пиридинового цикла с субстратсвязывающим участком активного центра.

Анализ модели тройного комплекса ЛДГ·NAD·пируват [15] показал, что трифторацетильная группа аналога II при неизменном по сравнению с NAD положении пиридинового цикла может образовать прочную водородную связь с остатком His<sup>195</sup>. Расстояние между атомами кислорода заместителя и атомом азота имидазольного цикла составляет примерно  $2,4 \pm 0,2$  Å (рис. 9).

### Экспериментальная часть

В работе использовали препараты NAD и ЛДГ мышц свиньи (Reanal, Венгрия), лактат лития и пируват натрия (Schuchardt, ФРГ).

3-Трихлорацетилпиридин синтезировали хлорированием 3-ацетилпиридина по методике, описанной для получения трихлорацетофенона [9]. Выделение  $\beta$ -NAD-гликогидролазы из селезенки свиньи проводили в соответствии с методом [16]. Препарат фермента в виде микросомальной фракции имел уд. акт. 1 мкат/мл суспензии.

Изофермент M<sub>1</sub> выделяли из кристаллического препарата лактатдегидрогеназы мышц свиньи хроматографией на DEAE-целлюлозе в соответствии с методом [17]. Фосфодигестераза змеиного яда — фирмы Worthington (США).

УФ-спектры снимали на приборе Pye-Unicam SP-800 (Англия), спектры флуоресценции — на приборе Hitachi MPF-2A (Япония), проводя коррекцию на интенсивность источника света с использованием лампы СИ 8—200 У, T<sub>ин</sub> 2850 К.

Спектры ПМР снимали в D<sub>2</sub>O на приборе Perkin-Elmer Hitachi R-20A (Япония) с рабочей частотой 60 МГц. Величину рD раствора нуклеотида доводили до 7,0—7,2 с помощью NaOD. В качестве внутреннего стандарта использовали натриевую соль 2,2-диметил-2-силапентансульфокислоты. Точность измерения химических сдвигов составляла  $\pm 0,02$  м.д. Число прохождений 6—10.



*3-Трихлорацетилпиридинадениндинуклеотид (аналог I).* Инкубировали, как описано в работе [3], раствор 2 г NAD, 3,24 г 3-трихлорацетилпиридина и 1,7 мл суспензии микросомальной фракции селезенки свиньи ( $\beta$ -NAD-гликогидролаза) в 50 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,2. Из реакционной массы отбирали пробы и количество NAD определяли реакцией с алкогольдегидрогеназой [7]; одновременно определяли флуоресценцию при длине возбуждающего света 360 нм (рис. 1). По окончании реакции (3,5 ч) добавляли 5,2 мл 50% трихлоруксусной кислоты, выпавшие в осадок белки отделяли центрифугированием (10 000 g, 10 мин) и надосадочную жидкость смешивали с 250 мл ацетона. Осаждение динуклеотидов проводили при 4° в течение 6 ч, после чего центрифугировали (25 000 g, 20 мин). Осадок растворяли в 10 мл воды и добавляли 50 мл ацетона, нуклеотиды отделяли центрифугированием. Эту операцию повторяли 2 раза. Осадок растворяли в 2 мл воды, доводили pH до 7,5 и наносили на колонку с DEAE-целлюлозой (30×3 см), уравновешенную 0,005 М триэтиламонийбикарбонатным буфером (pH 7,5). Колонку промывали 250 мл исходного буфера, а затем 0,05 и 0,2 М буфером (рис. 2a). Фракции, содержащие аналог I, объединяли и упаривали в вакууме при 20°. К остатку добавляли 25 мл воды и вновь упаривали. Эту операцию проводили еще 3 раза. Выход аналога I 0,8 г (40%).

*3-Трифторацетилпиридинадениндинуклеотид (аналог II).* Раствор 1 г NAD, 2,8 г 3-трифторацетилпиридина и 2,5 мл суспензии  $\beta$ -NAD-гликогидролазы в смеси 30 мл диметилсульфоксида и 46 мл 0,05 М фосфатного буфера (pH 7,5) инкубировали 3 ч при 37°. После окончания реакции обработку раствора проводили так же, как в синтезе аналога I. Нуклеотиды хроматографировали на колонке с дауэксом 1×2 (100×1 см, ПСОО<sup>-</sup>-форма), уравновешенной 0,005 М муравьиной кислотой, в условиях градиента концентрации муравьиной кислоты 0,05→0,3 М (рис. 2б). Фракции, содержавшие аналог II (пик 2), упаривали при 20° в вакууме. Выход 0,15 г (15%).

Полученные препараты аналогов были гомогенны при хроматографии на бумаге Filtrak FN-I (ГДР) в системе 0,1 М уксусная кислота — этанол (1:1) и при электрофорезе на бумаге. Величины  $R_f$  для аналогов I и II составляли 0,44 и 0,65 соответственно. Величина  $R_f$  для NAD равна 0,51.

*Определение коэффициента молярной экстинкции аналогов NAD* проводили по содержанию рибозы в образце орциновым методом [18]. Для построения калибровочного графика использовали NAD. Исходную концентрацию NAD изменяли от 88 до 360 мкМ. К 1,5 мл раствора динуклеотида добавляли 1,5 мл 0,1% раствора FeCl<sub>3</sub> в 12 н. HCl и 0,15 мл 10% раствора орцина в 95% этаноле. Реакцию проводили на кипящей водяной бане в течение 40 мин, охлаждали до 20° и измеряли поглощение раствора при 670 нм. Полученные результаты выражали в виде калибровочной кривой зависимости оптической плотности от концентрации NAD. Реакцию орцина с аналогами NAD проводили таким же образом. Пользуясь калибровочным графиком, находили концентрацию динуклеотида в растворе. Величину  $\epsilon$  рассчитывали по известной оптической плотности исходного раствора динуклеотида (при 260 нм) и его концентрации, она составляла для аналога I 13600, для аналога II 15600.

*Гидролиз аналогов NAD. а. Кислотный гидролиз.* Динуклеотид (~10 мг) растворяли в 1,5 мл 5,7 н. HCl и нагревали в ампуле при 120° в течение 12 ч. Гидролизат упаривали 5 раз с водой для удаления следов HCl, остаток растворяли в 1 мл воды и хроматографировали в тонком слое силикагеля на пластинках Silufol.

*б. Гидролиз под действием фосфодиэстеразы.* Реакцию проводили при 20° в 0,1 М трис-буфере (pH 8,7), содержащем 0,025 М MgCl<sub>2</sub>. Концентрация динуклеотида составляла примерно 0,1 мМ, фосфодиэстеразы яда змеи 0,015—0,15 мг белка/мл. За ходом реакции следили по увеличению оптической плотности при 260 нм.

*Определение степени гиперхромизма NAD и его аналогов* проводили интегральным методом, так, как описано в работе Тиноко [12], сравнивая площади под разностными спектрами поглощения в области 260—420 нм до и после расщепления динуклеотида фосфодиэстеразой. Разностные УФ-спектры регистрировали, соблюдая предосторожности, описанные в работе [19]. В две кюветы (1 см) луча сравнения помещали по 3 мл раствора. Такими же растворами заполняли кюветы луча образца и регистрировали нулевую линию. Затем содержимое кювет луча образца тщательно смешивали и разливали снова в кюветы, после чего регистрировали разностный спектр. Растворы перед опытом тщательно фильтровали, а для заполнения кювет использовали одну и ту же пипетку. Перед регистрацией нулевой линии и разностного спектра кюветы термостатировали в течение 15 мин.

*Для определения рК-перехода* в аналоге I снимали при  $\lambda$  510 нм зависимость интенсивности флуоресценции динуклеотида от pH раствора. Титрование проводили при пяти разных концентрациях NaCl (0,01; 0,05; 0,1; 0,25 и 0,5 М) и величину рК определяли экстраполяцией к нулевой ионной силе. Приведенное значение рК является средним арифметическим из трех опытов.

*Определение скорости реакций*, катализируемых лактатдегидрогеназой, проводили, регистрируя оптическую плотность раствора при 340 нм. Начальную скорость реакции определяли как тангенс угла наклона касательной к начальному участку кинетической кривой. При расчете количества NADH величину  $\epsilon_{340}$  принимали равной 6200. Характер ингибирования определяли по зависимости скорости реакции от концентрации NAD в отсутствие и в присутствии ингибитора. Константы ингибирования вычисляли из зависимости скорости реакции от концентрации ингибитора при постоянных концентрациях NAD [20] или из зависимости скорости реакции от концентрации NAD при постоянных концентрациях ингибитора [21]. Среднеквадратичное отклонение при пятикратном определении  $K_i$  составило  $\pm 11\%$ , для величины  $K_{\text{динс}}$  не более  $\pm 10\%$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Everse J., Kaplan N. O. (1973) *Adv. Enzymol.*, **28**, 61—98.
2. Colowick S. P., Eyes J., Park J. H. (1966) *Comprech. Biochem.*, **14**, 1—63.
3. Eyes J., Ciotti M. M., Kaplan N. O. (1958) *J. Biol. Chem.*, **231**, 571—578.
4. Anderson B. M., Ciotti M. M., Kaplan N. O. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 1219—1224.
5. Kaplan N. O., Ciotti M. M. (1954) *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 1713—1719.
6. Jardetzky O., Wade-Jardetzky N. G. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 85—92.
7. Мальцев Н. И., Воронцов Е. А., Щорс Е. И., Рубчинская Ю. М., Мыщенко В. В., Яковлев В. А. (1973) *Молекулярн. биология*, **7**, 269—277.
8. Salvador R. L., Saucier M. (1971) *Tetrahedron*, **27**, 1221—1226.
9. Fand T. I., Lutomski C. F. U. S. 2670352 (1954) *CA*, **49**, 2523 (1955).
10. Moore C. E., Underwood A. L. (1969) *Anal. Biochem.*, **29**, 149—153.
11. Steward R., Vanlinden R. (1960) *Can. J. Chem.*, **38**, 399—408.
12. Tinoko I. G. (1960) *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 4786—4790.
13. Scott T. G., Spencer R. D., Leonard N. J., Weber G. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.*, **92**, 687—698.
14. Gutfreund H., Stinson R. A. (1971) *Biochem. J.*, **121**, 235—240.
15. Helbrook J. J., Liljas A., Steindel S. J., Rossmann M. G. (1975) in: *The Enzymes*, v. 11, Part A, pp. 191—292.
16. Kaplan N. O., Colowick S. P., Nason A. (1951) *J. Biol. Chem.*, **191**, 473—483.
17. Jecsei G. (1961) *Acta physiol. Acad. Sci. hung.*, **20**, 339—342.
18. Mejbbaum W. (1939) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **258**, 117—126.
19. Swaney J. B. (1971) *Anal. Biochem.*, **43**, 388—394.
20. Dixon M. (1953) *Biochem. J.*, **55**, 170—179.
21. Lineweaver H., Burk D. (1934) *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658—669.

Получена в редакцию  
20.XI.1978

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NAD ANALOGS CONTAINING  
TRICHLOROACETYL AND TRIFLUOROACETYL GROUPS IN THE  
POSITION 3 OF PYRIDINE RING

VORONTSOV E. A., KALACHEVA N. I., MAL'TSEV N. J.

*All-Union Vitamin Research Institute, Moscow*

NAD analogs bearing the trichloroacetyl and trifluoroacetyl groups in the position 3 of pyridine ring (analogs I and II) were synthesized. The dinucleotide structures were confirmed by PMR spectra and acid hydrolysis. These analogs did not interact either with sodium sulfite or dithionite, seemingly because of the electron donating effect of the *gem*-diol substituent. The analogs I and II showed no substrate properties in the lactate dehydrogenase catalyzed reactions, however effectively and competitively inhibited them in respect to NAD. The analog I binding in the enzyme active site produced concomitant changes in the fluorescence spectra of the former, analogous to these in model experiments brought about by lowering the solvent polarity. The ternary complex formation was not observed with lactate or oxamate. The possible interactions between the analogs and functional groups of the lactate dehydrogenase active center were discussed.

---