



УДК 577.152.111 : 577.112.083 : 543.544

РОЛЬ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ В СПЕЦИФИЧЕСКОМ СВЯЗЫВАНИИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ АКТИВНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И СОРБЕНТАМИ НА ИХ ОСНОВЕ

Флаксайте С. С., Суджювене О. Ф., Меслякас Н.-Г. И.,
Глемжа А. А.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной энзимологии, Вильнюс

Исследовано взаимодействие активных красителей и сорбентов на их основе с алкогольдегидрогеназой дрожжей в присутствии ионов металлов первого переходного ряда. Методами КД-спектроскопии и хроматографии показана важная роль ионов металлов в процессе специфического связывания фермента красителями в растворимом и иммобилизованном виде.

Активные красители широко используются как лиганды при создании сорбентов групповой специфичности для очистки ферментов и белков [1, 2]. Предполагается, что в их связывании с коферментзависимыми ферментами участвуют гидрофобные, электростатические силы, взаимодействие с переносом заряда и, возможно, водородные связи [3, 4]. Многие активные красители содержат в своей структуре координационно-связанный ион металла — Cu^{2+} , Cr^{3+} или Co^{3+} , однако его роль при взаимодействии красителя с коферментзависимыми ферментами начали исследовать лишь в последнее время. Недавно Хьюз с сотр. [5, 6] показали, что ионы металлов при зарядке ими сорбентов с иммобилизованными красителями или нанесении на сорбент раствора фермента, содержащего низкие концентрации иона металла, способствуют связыванию некоторых ферментов, в частности щелочной фосфатазы, гексокиназы дрожжей и карбоксипептидазы G2. В таких случаях фермент, связанный сорбентом, может быть десорбирован подходящими хелатообразующими агентами. Ранее нами было показано [7], что среди активных азокрасителей существуют представители, достаточно специфичные к центру связывания NAD в алкогольдегидрогеназе дрожжей. Задачей настоящей работы явилось исследование влияния комплексообразования ионов металлов первого переходного ряда со свободным или иммобилизованным красителем на специфичность связывания алкогольдегидрогеназы.

Таблица 1

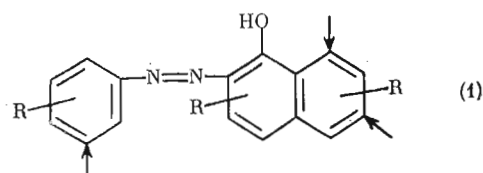
Константы диссоциации $K_{дис}$ комплексов металлов с активными красителями и рН декомплексобразования (дрН) для сорбента с иммобилизованным желтым светопрочным 2КТ, заряженным ионами металлов

Ион металла	$K_{дис} \cdot ММ$				дрН
	желтый светопрочный 2КТ	желтый 2КТ	оранжевый 4К	Ярко-красный 6С	
Cu^{2+}	0,084	0,811	0,064	0,064	1,80
Cd^{2+}	0,061	*	1,821	*	2,80
Zn^{2+}	0,098	1,390	1,254	*	3,27
Mg^{2+}	0,307	*	1,430	Не определено	
Ni^{2+}	0,105	Не определено		*	3,85
Mn^{2+}	0,568	*	1,435	*	4,05
Co^{2+}		Не определено			2,65

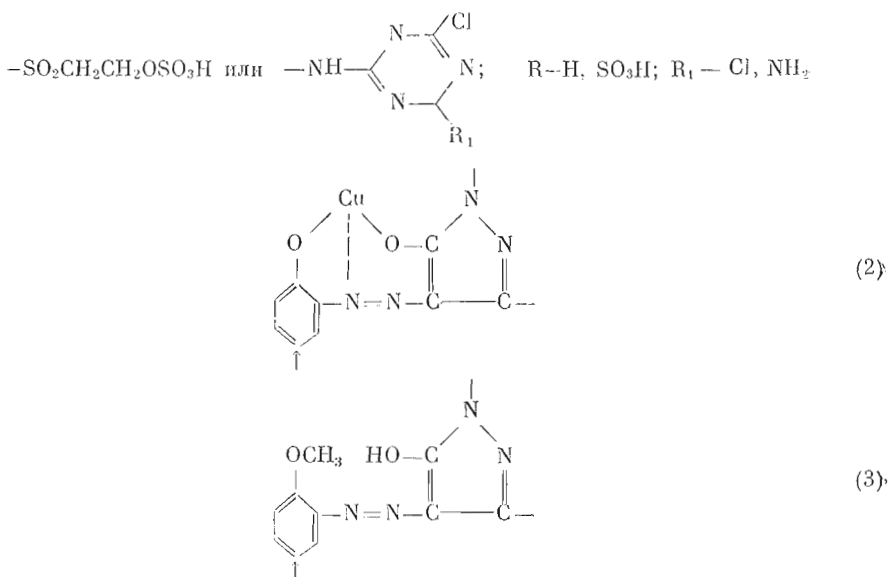
* Спектральных изменений нет.

Константы диссоциации комплексов ряда красителей с ионами металлов определены дифференциальной спектрофотометрией в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 6,5 (25° С) (рис. 1, 2) и представлены в табл. 1.

Активный азокраситель, содержащий вблизи азосвязи две свободные ОН-группы (желтый светопрочный 2КТ), образует более стабильные комплексы с ионами металлов, чем его аналог с одной замещенной ОН-группой (желтый 2КТ), или краситель, содержащий вблизи азосвязи только одну ОН-группу (оранжевый 4К).



Структура хелатного узла в активных красителях: оранжевом 4К и ярко-красном 6С (1), желтом светопрочном 2КТ (2) и желтом 2КТ (3). Стрелкой обозначены места введения звеньев, содержащих активные группы:



Как видно из табл. 1, ряд стабильности комплексов желтого светопрочного 2КТ с ионами металлов (за исключением Cd^{2+}) достаточно хорошо коррелирует с относительной стабильностью комплексов, образуемых иммобилизованным красителем, определяемой как рН декомплексообразования (дрН) хроматографически по методу Херинга [8].

Исследование взаимодействия красителей с алкогольдегидрогеназой в отсутствие и в присутствии ионов металлов проводили методами дифференциальной спектроскопии [9] и КД (рис. 3, табл. 2). КД был использован ранее группой Эдварда и Вуди [10, 11] для исследования конформации красителей — цибакои голубого F3GA, Конго красного и др. — при их связывании с коферментзависимыми ферментами.

Как видно из табл. 2, красители цибакои голубой F3GA и оранжевый 5К, выпускаемые в виде структур, не имеющих иона металла, при взаимодействии с алкогольдегидрогеназой вызывают появление спектра КД с характерными негативными максимумами в видимой области при 600 и 480 нм соответственно, интенсивность которых в обоих случаях снижается при введении NAD в комплекс краситель — фермент. Это указывает на взаимодействие красителей с ферментом по месту связывания NAD. Нам ранее было показано [7], что сорбенты с иммобилизованными цибакои голубым F3GA и оранжевым 5К специфичны для алкогольдегидрогеназы дрожжей, так как десорбция сорбированного фермента реализуется элюен-

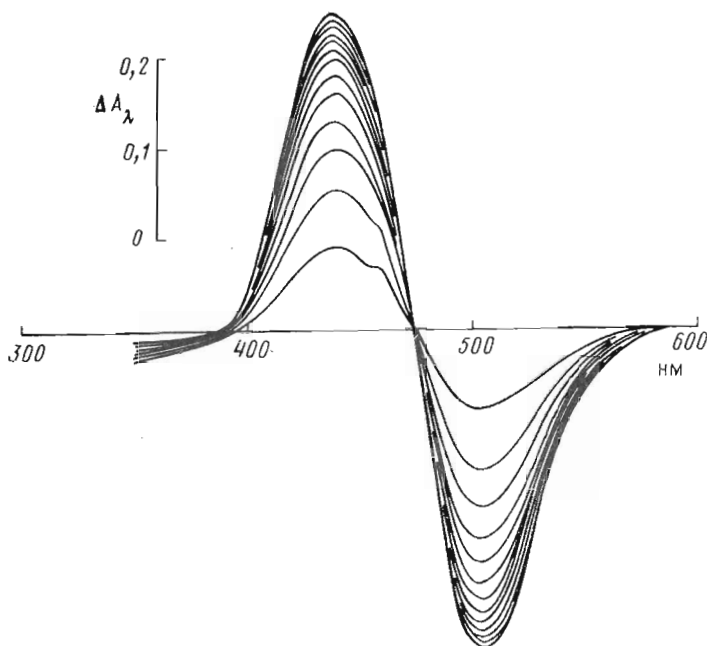


Рис. 1. Дифференциальное спектрофотометрическое титрование красителя желтого светопрочного 2КТ ионами Mg^{2+} в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 6,5. Начальная концентрация красителя 41 мМ, ионов Mg^{2+} 0–20 мМ

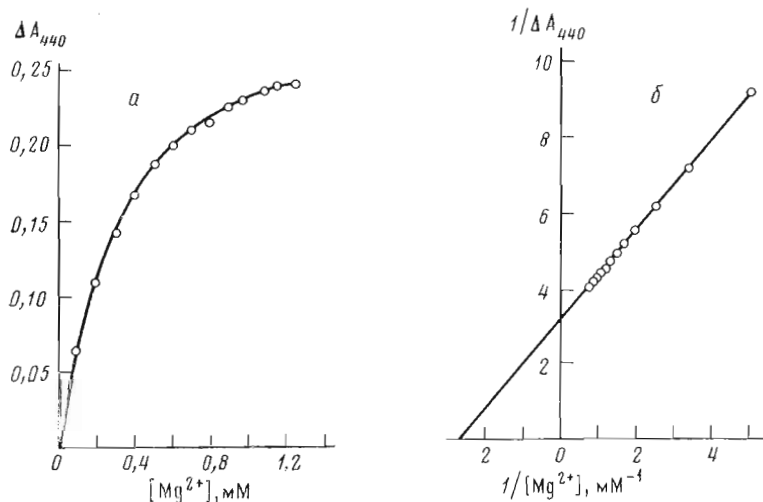


Рис. 2. Зависимость дифференциального поглощения при 440 нм красителя желтого светопрочного 2КТ от концентрации ионов Mg^{2+} в прямых (а) и обратных (б) координатах. Условия титрования как на рис. 1

тами, содержащими NAD. Взаимодействие красителей желтого светопрочного 2КТ, желтого 2КТ и оранжевого 4К с алкогольдегидрогеназой в отсутствие ионов металлов не вызывает в видимой области спектров КД никаких изменений. Введение же в раствор алкогольдегидрогеназы комплексов красителей с ионами металлов — Cu^{2+} или Zn^{2+} с желтым светопрочным 2КТ, Cu^{2+} с желтыми 2КТ или оранжевым 4К — приводит к появлению в видимой части спектров КД характерных максимумов положительного знака (табл. 2). При этом изменений в видимой области спектра при взаимодействии красителя или фермента с ионами исследованных металлов не обнаружено. Интенсивность максимумов спектров КД понижается при введении NAD в комплекс желтый светопрочный 2КТ — Cu^{2+} (или — Zn^{2+}) — E, желтый 2КТ — или оранжевый 4К — Cu^{2+} — алкогольдегидрогеназа. Исходя из идентичности спектров КД, индуцируемых взаимодействием Cu^{2+} - и Zn^{2+} -комплексов желтого светопрочного 2КТ с ферментом,

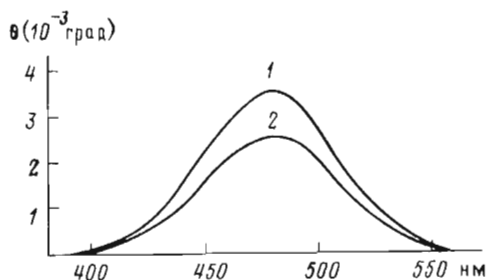


Рис. 3. Спектры КД комплекса алкогольдегидрогеназы — желтый светопрочный 2КТ — Cu^{2+} в 10 мМ трис-НСI-буфере, рН 6,5, в отсутствие NAD (1) и в присутствии 2,7 мМ NAD (2), концентрация красителя 157 мкМ, фермента 14,2 мкМ (по субъединице), NAD 2,7 мМ, Cu^{2+} 157 мкМ

можно предположить, что комплексообразование красителя с ионами Cu^{2+} и Zn^{2+} приводит к идентичному изменению и стабилизации конформации красителя, и притом таким образом, что она становится стерически благоприятной для связывания с NAD-связывающей областью алкогольдегидрогеназы. Для красителей желтый 2КТ и оранжевый 4К наиболее стабильны комплексы с Cu^{2+} и, кроме того, по-видимому, ионы Cu^{2+} способны также изменять или (и) стабилизировать конформацию обоих красителей так, что она становится комплементарной к алкогольдегидрогеназе. Краситель красно-коричневый 2КТ, выпускаемый в виде медного комплекса, вызывает при связывании с алкогольдегидрогеназой появление в спектре КД положительного максимума при 505 нм, интенсивность которого «тушится» введенным NAD.

Результаты КД-спектроскопии согласуются с константами диссоциации комплексов красителей с алкогольдегидрогеназой, определенными методом дифференциального титрования. Для красителей желтого 2КТ и желтого светопрочного 2КТ (в отсутствие ионов металлов) эта константа составляет соответственно 450,2 и 320,1 мкМ. Однако при использовании комплексов желтого светопрочного 2КТ с ионами металлов (например, Cu^{2+} или Zn^{2+}) значение константы заметно снижается и составляет 4,74 и 12,5 мкМ соответственно. Это указывает на прочное взаимодействие алкогольдегидрогеназы с красителями при наличии в системе ионов металлов.

Результаты исследования взаимодействия алкогольдегидрогеназы с красителями в растворе подтверждаются данными хроматографического поведения частично очищенного фермента на сорбентах с иммобилизованными красителями (табл. 3). Как видно из табл. 3, на сорбентах с иммобилизованными красителями при отсутствии ионов металлов алкогольдегидрогеназа либо вовсе не сорбируется (желтый 2КТ), либо сорбируется частично, но специфическая десорбция в присутствии NAD или не реализуется (желтый светопрочный 2КТ), или выход фермента невысок (оранжевый 4К). При зарядке сорбента с желтым светопрочным 2КТ ионами металлов первого переходного ряда (кроме Co^{3+}) алкогольдегидрогеназа приобретает способность связываться сорбентом. Однако десорбция фермента с помощью NAD реализуется с достаточно высоким выходом только при зарядке сорбента ионами Cu^{2+} (степень очистки 15 раз, выход активности 56%), Zn^{2+} (17 раз; 61%) и Cd^{2+} (20 раз, 68%). Сорбент в виде комплексов с Mn^{2+} или Ni^{2+} проявляет низкое сродство к NAD-связывающему участку алкогольдегидрогеназы — выход фермента при десорбции с помощью NAD при зарядке ионами Mn^{2+} и Ni^{2+} составляет 15,8 и 2,2% соответственно. Сорбент в виде комплексов с Co^{2+} и Fe^{3+} , по-видимому, неспецифически связывает алкогольдегидрогеназу.

Как отмечалось в работе [5], фермент, связанный сорбентом с иммобилизованным красителем в присутствии в системе ионов металлов, может быть эффективно десорбирован хелатообразующими агентами. Полученные нами результаты показывают, что комплексообразование некоторых сорбентов, содержащих иммобилизованные красители, с ионами металлов меняет специфичность сорбентов по отношению к алкогольдегидрогеназе вплоть до появления возможности специфической десорбции фермента с помощью NAD. Сорбент с желтым светопрочным 2КТ, заряженный ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} или Cd^{2+} , проявляет себя по отношению к алкогольдегидрогеназе не как обычный хелатообразующий, а как специфический. Это под-

**Максимумы в спектрах КД при взаимодействии красителей
с алкогольдегидрогеназой**

Активный краситель	Ион металла	КД _{макс} , нм (знак вращения)	«Тушение» спектра КД под действием NAD
Желтый светопрочный 2КТ	—	*	
	Cu ²⁺	480 (+)	+
	Zn ²⁺	480 (+)	+
	Ni ²⁺	*	
Желтый 2КТ	—	*	
	Cu ²⁺	390 (+)	+
	Zn ²⁺	*	
	Mn ²⁺	*	
Оранжевый 4К	—	*	
	Cu ²⁺	435 (+)	+
	Zn ²⁺	*	
	Ni ²⁺	*	
Красно-коричневый 2КТ	Cu ²⁺	505 (+)	+
	Zn ²⁺	*	
Цибакрон голубой F3GA	—	600 (-)	+
Оранжевый 5К	—	480 (-)	+

* Спектральных изменений нет.

Таблица 3

**Хроматография алкогольдегидрогеназы на сорбентах, заряженных
ионами металлов**

Лиганд сорбен- та	Ион металла	Емкость сорбен- та ед. акт. Е/мкмоль лиганда	Выход, %	Степень очистки фер- мента
Желтый свето- прочный 2КТ	—	6,1		
	Cu ²⁺	20,3	56,3	15,0
	Zn ²⁺	17,3	61,0	17,0
	Cd ²⁺	21,7	68,0	20,0
	Mn ²⁺	6,6	15,8	6,5
	Ni ²⁺	5,3	2,2	—
	Co ²⁺	3,2	0	—
	Co ³⁺	0	0	—
Желтый 2КТ	Fe ³⁺	12,1	0	—
Оранжевый 4К	—	0	—	—
Имидодиуксус- ная кислота	—	18,5	23	2
	—	22,3 ед/мл	0	—
	Cu ²⁺	104,2	0	—

Примечание. Хроматография в 10 мМ трис-малеат-NaOH-буфере, pH 6,5, содержащем 0,5 мМ EDTA, 0,05 мМ β-меркаптоэтанол и 5 мМ Mg²⁺. Десорбция фермента NAD (0 → 5 мМ).

тверждается данными хроматографического поведения фермента на хелатообразующем сорбенте с имидодиуксусной кислотой, который используется для лигандообменной хроматографии белков и ферментов [12, 13]: десорбции алкогольдегидрогеназы, сорбированной на исходном сорбенте и его медном комплексе (табл. 3), не удается достичь с помощью NAD.

Как видно из табл. 1 и 3, для проявления специфического взаимодействия сорбентов, содержащих заряженные ионами металлов красители, с алкогольдегидрогеназой важную роль играют стабильность комплексов, природа ионов металлов и, по-видимому, структура образующихся комплексов металл — краситель, причем два последних фактора являются определяющими. Так, желтый 2КТ и оранжевый 4К в форме малостабильных комплексов с Zn²⁺ не взаимодействуют с алкогольдегидрогеназой, а ионы Co³⁺ и Fe³⁺ образуют с сорбентом на основе желтого светопрочного 2КТ наиболее стабильные комплексы среди исследованных ионов металлов (дрН ниже 1,0) и тем не менее специфическая десорбция фермента с заряженного ими сорбента не реализуется.

Таким образом, природа ионов металлов в комплексах с растворимыми или иммобилизованными красителями оказывает существенное влияние

на специфичность связывания таких комплексов с коферментзависимыми ферментами, и изменением природы иона металла можно менять специфичность сорбентов с иммобилизованными красителями. Сорбент с иммобилизованным красителем желтым светопрочным 2КТ в форме комплексов с ионами Cu^{2+} , Zn^{2+} или Cd^{2+} может быть использован для очистки алкогольдегидрогеназы дрожжей и, по-видимому, других NAD-зависимых дегидрогеназ.

Экспериментальная часть

В работе использовали краситель цибакрон голубой F3GA (Serva, ФРГ) без дополнительной очистки и активные красители отечественного производства — желтый 2КТ, желтый светопрочный 2КТ, оранжевый 5К, оранжевый 4К, ярко-красный 6С, красно-коричневый 2КТ, которые очищали перекристаллизацией из воды или водно-этанольной смеси. Ионы Cu^{2+} из красителя желтого светопрочного 2КТ удаляли экстракцией дитизоном в хлороформе. Полноту удаления Cu^{2+} контролировали атомной адсорбционной спектроскопией на приборе Perkin-Elmer 400 (США). Сорбенты на основе сефарозы CL-6В и активных красителей синтезировали по методике [14], концентрация красителей в сорбентах 1,5–5,9 мкмоль/мл. Сорбент с имидодуксусной кислотой получали по методике [12] с тем отличием, что использовали сефарозу, активированную эпихлоргидрином. Препарат алкогольдегидрогеназы (6,5–7,2 ед. акт./мг белка) получали из пекарских дрожжей согласно начальным стадиям очистки методики [15]. Использовали высокоочищенную алкогольдегидрогеназу (КФ 1.1.1.1, Boehringer, ФРГ, или Calbiochem, Швейцария), NAD и трис (Serva, ФРГ). Соли металлов квалификации х.ч. или ос. ч. (Союзреактив).

Дифференциальная спектроскопия. Растворы красителей, ионов металлов и алкогольдегидрогеназы готовили в буферных растворах в деионизированной воде. Титрование красителей ионами металлов проводили на двухлучевом спектрофотометре (Hitachi, Япония) в кюветах с толщиной слоя раствора 1 см при 25°С в 10 мМ трис-НСI-буфере, рН 6,5, путем введения в раствор красителя (2 мл, начальная концентрация 45–90 мкМ) по 10–30 мкл раствора ионов металлов (начальная концентрация 0,2–20 мМ). В кювету сравнения добавляли соответственно равный объем буфера. Константы диссоциации $K_{\text{дис}}$ комплексов ионов металлов с красителями определяли из зависимости I/Δ от $I/[\text{Me}]$ после регрессионного анализа, как в работе [5]. Титрование высокоочищенной алкогольдегидрогеназы желтым светопрочным 2КТ и желтым 2КТ проводили при 30°С в 10 мМ трис-НСI-буфере, рН 6,5, согласно методике [9]. Начальная концентрация фермента в кювете измерения составляла 7–10 или 56 мкМ (по субъединице), начальная концентрация красителей — 200–900 мкМ. Константы диссоциации комплексов желтого светопрочного 2КТ — ион металла — E определяли трансформированием данных титрования в координатах Скэтчарда, как в работе [16], а комплексов желтый светопрочный 2КТ и желтый 2КТ с алкогольдегидрогеназой — из зависимости I/Δ от $I/[\text{краситель}]$.

Спектры КД записывали на спектрофотометре JASCO J-20 (Япония) в кювете с оптическим путем 1 см при 25°С в 10 мМ трис-НСI-буфере, рН 6,5. Начальная концентрация фермента 57–70 мкМ (по субъединице), концентрация красителя в кювете 5–60 мкМ, иона металла — 20–60 мкМ.

рН декомплексобразования для ионов металлов при десорбции их с сорбента сефароза CL-6В — желтый светопрочный 2КТ определяли по методике Херинга [8]. Хроматографию частично очищенного препарата алкогольдегидрогеназы проводили в колонках (2×1,2 см), содержащих 1 мл сорбента. Сорбент на основе желтого светопрочного 2КТ предварительно промывали 1 мМ НСI и 100 мМ ЕДТА для удаления ионов Cu^{2+} . В последующем проводили перезарядку сорбента ионами других металлов, промывая сорбент 1–2 мМ растворами соответствующих солей. На колонку с сорбентом, уравновешенным 10 мМ буфером трис — малеиновая кислота — NaOH, рН 6,5, содержащим 5 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 мМ ЕДТА и 0,05 мМ β-меркаптоэтанол, наносили 150–200 ед. акт. алкогольдегидрогеназы. По-

сторонние белки удаляли промыванием исходным буфером. Фермент десорбировали линейным градиентом NAD (0–5 мМ) со скоростью элюции 10–12 мл/ч.

Активность алкогольдегидрогеназы определяли по методике [15] при концентрации NAD $1,5 \cdot 10^{-2}$ М. За единицу активности принимали количество фермента, способствующего образованию 1 мкмоль за 1 мин при 30° С.

Концентрацию белка определяли по методу Брадфорда [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Dean P. D. G., Watson D. H. J. *Chromatogr.*, 1979, v. 165, № 3, p. 301–319.
2. Песлякас И. И., Суджювене О. Ф., Глемжа А. А. *Прикл. биохим. и микробиол.*, 1981, т. 17, вып. 3, с. 456–471.
3. Beissner R. S., Rudolph F. B. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1978, v. 189, № 1, p. 76–80.
4. Porath J. In: *Affinity chromatography and related techniques* / Eds Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. Amsterdam: Elsevier, 1982, p. 3–8.
5. Hughes P., Lowe C. R., Sherwood R. F. *Biochim. et biophys. acta*, 1982, v. 700, № 1, p. 90–100.
6. Hughes P., Sherwood R. F. *Biochem. J.*, 1982, v. 205, № 8, p. 453–456.
7. Флаксайте С. С., Суджювене О. Ф., Песлякас И. И., Глемжа А. А. В сб. тезисов Всесоюз. конф. по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокоочищенных ферментов. Вильнюс, 1982, с. 76–77.
8. Hering R. J. *Prakt. Chem.*, 1966, v. 34, p. 69.
9. Thompson S. T., Stellwagen E. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 1976, v. 73, № 2, p. 361–365.
10. Edwards R. S., Woody R. W. *Biochem. and Biophys Res. Commun.*, 1977, v. 79, № 2, p. 470–476.
11. Edwards R. S., Woody R. W. *Biochemistry*, 1979, v. 18, № 23, p. 5197–5204.
12. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Beltrage G. *Nature (London)*, 1975, v. 258, № 5536, p. 598–599.
13. Porath J. *J. Chromatogr.*, 1978, v. 159, № 1, p. 13–24.
14. Böhme H. J., Kopperschläger G., Schulz J., Hofmann J. J. *Chromatogr.*, 1972, v. 69, p. 209–214.
15. Кочетов Г. А. *Практическое руководство по энзимологии*. М.: Высшая школа, 1971, с. 127–130.
16. Barden R. E., Darke P. L., Deems R. A., Dennis E. A. *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 8, p. 1621–1625.
17. Bradford M. M. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 72, № 1–2, p. 248–254.

Поступила в редакцию
11.IV.1983
После доработки
25.VII.1983

ROLE OF METAL IONS IN SPECIFIC BINDING OF YEAST ALCOHOL DEHYDROGENASE BY FREE DYES AND DYE-ADSORBENTS

FLAKSAITE S. S., SUDZHUVIENE O. F., PESLIKAS J.-H. J.,
GLEMZHA A. A.

All-Union Research Institute of Applied Enzymology, Vilnius

The interaction of dyes and dye-adsorbents with yeast alcohol dehydrogenase in the presence of the first row transition metal ions is studied. By the CD spectroscopy and chromatography the essential role of metal ions in specific binding of enzyme by free and immobilized dyes is shown.