



УДК 577.452.444.042

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  $\text{Cu(II)}$ -КОМПЛЕКСОВ АКТИВНЫХ  
КРАСИТЕЛЕЙ С АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗОЙ ДРОЖЖЕЙ.  
ВОЗМОЖНОСТЬ УЧАСТИЯ ОСТАТКА ГИСТИДИНА ФЕРМЕНТА  
В ОБРАЗОВАНИИ СМЕШАННОГО  $\text{Cu(II)}$ -КОМПЛЕКСА  
С ЖЕЛТЫМ СВЕТОПРОЧНЫМ 2КТ

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

*Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс*

Установлено, что при модификации одного остатка гистидина алкогольдегидрогеназы дрожжей (в расчете на субединицу) диэтилпирокربонатом ее активность понижается на 75–80%. Исследовано взаимодействие нативной и модифицированной алкогольдегидрогеназы с комплексом краситель желтый светопрочный 2КТ– $\text{Cu(II)}$  (ЖС– $\text{Cu(II)}$ )\*. Выявлены различия в спектрах КД смешанных комплексов ЖС– $\text{Cu(II)}$  с нативной или модифицированной алкогольдегидрогеназой. Константы диссоциации комплекса ЖС– $\text{Cu(II)}$  – алкогольдегидрогеназа, определенные методом дифференциального спектрофотометрического титрования, составляют 5,0 и 32,5 мкМ соответственно для нативного и модифицированного фермента. Установлено, что присутствие красителя предохраняет фермент от модифицирующего действия диэтилпирокрбоната. Предположено, что в образование смешанного комплекса с  $\text{Cu}^{2+}$  вовлечены три донорные группы красителя и донорный азот имидазола остатка гистидина алкогольдегидрогеназы дрожжей.

Природа специфического взаимодействия активных красителей с ферментами, зависящего от присутствия ионов металлов, до настоящего времени не выяснена. По мнению ряда авторов, ионы металла могут несколько изменять [1] или (и) стабилизировать за счет комплексообразования с красителем конформацию последнего таким образом, что образующийся комплекс более прочно связывается ферментом [2, 3]. Авторы работ [4–6] полагают, что ион металла образует координационные связи между ферментом и красителем, это приводит к формированию высокоселективного трехчленного комплекса, в состав которого входят фермент, ион металла и краситель [4–6].

Нами ранее показано [2, 3, 7], что алкогольдегидрогеназа дрожжей прочно связывает краситель желтый светопрочный 2КТ в присутствии ионов металлов первого переходного ряда.

При наличии зависящего от присутствия ионов металлов специфического взаимодействия ферментов с активными красителями в растворимом или иммобилизованном виде прочность связывания красителей ферментами в присутствии ионов металлов повышается [1, 5, 6], сорбционная емкость сорбентов с иммобилизованными активными красителями при этом возрастает [1, 4, 8–10] и появляется возможность десорбции фермента специфическими элюентами [1, 8–10] и хелатообразующими агентами [4, 10, 11]. Все это наблюдается и при взаимодействии алкогольдегидрогеназы дрожжей с красителем желтым светопрочным 2КТ в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  [2, 3, 7]. Нами установлено также, что в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  фермент более прочно связывает и ряд других красителей. Константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов алкогольдегидрогеназа–краситель и алкогольдегидрогеназа– $\text{Cu(II)}$ –краситель, определенные методом дифференциального спектрофотометрического титрования [3], составляют для красно-коричневого 2КТ – 459 и 0,32 мкМ, красно-фиолетового 2КТ – 279 и 30 мкМ, бордо СТ – 420 и 24 мкМ, желтого светопрочного 2КТ – 320,1

\* ЖС– $\text{Cu(II)}$  – комплекс красителя желтого светопрочного 2КТ с  $\text{Cu(II)}$ .

и 5,0 мкМ соответственно. При хроматографии частично очищенного препарата алкогольдегидрогеназы дрожжей (уд. акт. 6,5–7,2 ед./мг белка) на сепарозных сорбентах с иммобилизованными  $\text{Cu(II)}$ -комплексами красителей [12] специфическая десорбция алкогольдегидрогеназы с помощью NAD наиболее полно осуществляется в случае сорбента с иммобилизованным комплексом ЖС— $\text{Cu(II)}$  (58%) и менее эффективно в случае сорбентов с красно-коричневым 2КТ— $\text{Cu(II)}$  (25%) [12] и бордо СТ— $\text{Cu(II)}$  (2,4%) (данные настоящей работы). Фермент вовсе не десорбируется с сорбента с иммобилизованным красно-фиолетовым 2КТ— $\text{Cu(II)}$  [12].

Таким образом, среди исследованных  $\text{Cu(II)}$ -комплексов красителей наиболее высокую специфичность к алкогольдегидрогеназе дрожжей проявляет комплекс ЖС— $\text{Cu(II)}$ .

Ранее мы установили [7], что комплекс ЖС— $\text{Cu(II)}$  участвует в образовании смешанных  $\text{Cu(II)}$ -комплексов с имидазолом, EDTA, аденином, 8-оксихинолин-5-сульфокислотой, и это позволило нам выдвинуть предположение о возможном участии в образовании комплекса ЖС— $\text{Cu(II)}$ -алкогольдегидрогеназа одного из остатков гистидина фермента. Задачей настоящей работы явилось исследование взаимодействия комплекса ЖС— $\text{Cu(II)}$  с алкогольдегидрогеназой дрожжей, модифицированной диэтилпирокарбонатом по остатку гистидина.

Модификация остатков гистидина в ферментах диэтилпирокарбонатом используется для выяснения их роли в формировании активного центра фермента и участия в каталитическом процессе [13, 14]. Ход реакции модификации контролируется спектрофотометрически по увеличению дифференциального поглощения в интервале 230–250 нм [15].

Модификация алкогольдегидрогеназы дрожжей свежереприготовленным раствором диэтилпирокарбоната в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,5, приводит к появлению продукта, дифференциальный спектр поглощения которого имеет максимум при 237 нм (рис. 1), что характерно для N-карбэтоксигистидина [15]. Отсутствие негативного поглощения в диапазоне 260–280 нм свидетельствует, как принято считать [14, 16], об отсутствии модификации остатков тирозина. Как видно из рис. 2, в использованных нами условиях модификации активность алкогольдегидрогеназы дрожжей падает на 75–80%. Экстраполяция прямолинейного участка кривой зависимости количества модифицированных остатков гистидина от остаточной активности фермента к 100% падению активности показывает, что модифицируется один остаток гистидина на субъединицу ( $M_r$  37 000) фермента. При этом важно отметить, что модификация алкогольдегидрогеназы диэтилпирокарбонатом не вызывает каких-либо необратимых изменений в ферменте. После 2-часовой обработки модифицированной алкогольдегидрогеназы 0,1 М раствором гидроксилamina каталитическая активность практически полностью восстанавливается (рис. 2, 2). Полученные нами данные достаточно хорошо согласуются с результатами модификации алкогольдегидрогеназы дрожжей диэтилпирокарбонатом при pH 6,0 [16], что еще раз подтверждает, что в нашем случае происходит селективная модификация одного остатка гистидина на субъединицу фермента.

Исследование взаимодействия нативной и модифицированной алкогольдегидрогеназы дрожжей с комплексом ЖС— $\text{Cu(II)}$  проводили методами КД и дифференциальной спектрофотометрии. Для дифференциальной спектроскопии использовалась алкогольдегидрогеназа, модифицированная 0,18 мМ диэтилпирокарбонатом в течение 1 ч. Остаточная активность модифицированного фермента составляла 20%. Спектры КД записывали, используя фермент, модифицированный 0,18 мМ диэтилпирокарбонатом в течение 25 мин, с остаточной активностью 30% (см. рис. 4 и 5). Оказалось, что при взаимодействии нативной алкогольдегидрогеназы с комплексом ЖС— $\text{Cu(II)}$  в длинноволновой области индуцируется спектр КД с положительным при 490 нм и отрицательным при 440 нм максимумами (рис. 3, 1). Однако в случае фермента, модифицированного диэтилпирокарбонатом, спектр КД изменяется: максимум при 490 нм исчезает и остается только отрицательный максимум при 440 нм (рис. 3, 2). Так как различие между нативной и модифицированной алкогольдегидрогеназой дрожжей состоит

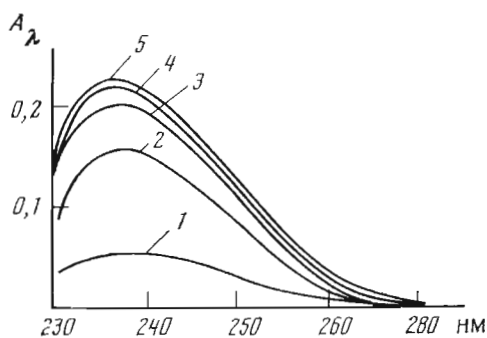


Рис. 1

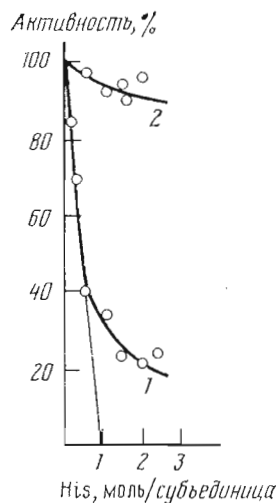


Рис. 2

Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения алкогольдегидрогеназы (28 мкМ, в расчете на одну субъединицу) при ее модификации 0,18 мМ диэтилпиروкарбонатом в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 6,5, в течение 2 (1), 12 (2), 24 (3), 37 (4), 40 мин (5)

Рис. 2. Зависимость остаточной активности алкогольдегидрогеназы от количества модифицированных диэтилпирокарбонатом (0,18 мМ) остатков гистидина на субъединицу фермента (1). Кривая 2 — реактивация модифицированного фермента 0,1 М гидроксиламином. Условия реактивации см. «Экспер. часть»

только в различии состояния остатка гистидина, изменение спектра КД свидетельствует об участии остатка гистидина в формировании комплекса алкогольдегидрогеназа—ЖС—Cu(II). Реактивация модифицированной алкогольдегидрогеназы гидроксиламином приводит к частичному восстановлению положительного максимума при 490 нм в спектре КД (рис. 3, 3), что также подтверждает участие гистидина в образовании комплекса. Значение остатка гистидина при связывании алкогольдегидрогеназы с красителем подтверждают и результаты спектрофотометрического титрования. При рН 6,5 константа диссоциации ( $K_d$ ) для комплекса ЖС—Cu(II)—алкогольдегидрогеназа составляет 5,0 и 32,5 мкМ соответственно для нативного и модифицированного диэтилпирокарбонатом фермента.

Присутствие красителя в реакционной смеси во время модификации алкогольдегидрогеназы 0,03 и 0,18 мМ диэтилпирокарбонатом предохраняет (примерно на 50%) остатки гистидина от модификации (рис. 4). При этом фактически не происходит инактивации алкогольдегидрогеназы диэтилпирокарбонатом и остаточная активность фермента сохраняется на уровне 75–85% независимо от того, каким количеством диэтилпирокарбоната (0,03 или 0,18 мМ) обрабатывался фермент (рис. 5). Предохранение алкогольдегидрогеназы от ингибирующего действия диэтилпирокарбоната в присутствии ЖС—Cu(II) может быть объяснено вовлечением донорного азота имидазола остатка гистидина в комплексообразование с ионами  $Cu^{2+}$ . Ионы меди координированы в красителе желтом светопрочном 2КТ тремя донорными группами [3] и, как показано нами [7], способны образовывать с участием свободной координационной связи смешанные комплексы с имидазолом, аденином, EDTA и другими агентами, содержащими донорный азот. Константа диссоциации смешанного Cu(II)-комплекса желтого светопрочного 2КТ с имидазолом составляет при рН 6,5 величину 0,26 мМ [7]. Таким образом, представленные нами результаты позволяют предположить, что главная роль ионов  $Cu^{2+}$  при связывании красителя желтого светопрочного 2КТ с алкогольдегидрогеназой дрожжей состоит в образовании смешанного комплекса, в координационные связи которого с  $Cu^{2+}$  вовлечены три донорные группы красителя и донорный азот имидазола остатка гистидина алкогольдегидрогеназы дрожжей.

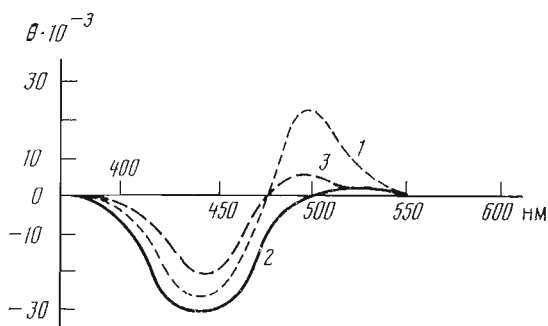


Рис. 3. Спектры КД комплексов ЖС—Cu(II) с нативной алкогольдегидрогеназой (1), алкогольдегидрогеназой, модифицированной 0,18 мМ диэтилпирокарбонатом в течение 25 мин (2) и в течение 40 мин с реактивацией 0,1 М гидроксиламином (35 мин) (3). Концентрация красителя 100 мкМ, фермента 28 мкМ (в расчете на одну субъединицу)

Присутствие красителя при реакции с диэтилпирокарбонатом в большей степени предохраняет алкогольдегидрогеназу от инактивации, чем остатки гистидина от модификации (рис. 4, 5). Поэтому можно предположить, что краситель ЖС—Cu(II) вовлекает в образование смешанного комплекса именно остаток гистидина, находящийся в активном центре фермента. Для алкогольдегидрогеназы дрожжей показано [16], что модифицированный диэтилпирокарбонатом фермент утрачивает способность связывать ацетамид с образованием трехчленного комплекса фермент—NADH—ацетамид, но не утрачивает способности связывать NADH. Инактивация алкогольдегидрогеназы печени лошади под действием диэтилпирокарбоната без предохраняющих агентов [17] сопровождается модификацией двух остатков гистидина на субъединицу фермента, причем модифицированный фермент в 40 раз слабее связывает NAD в присутствии пиразола, чем нативный. Полное предохранение этого фермента от ингибирующего действия диэтилпирокарбоната достигается в присутствии NADH и амида изомасляной кислоты или NAD и трифторэтанола, при этом количество модифицированных остатков гистидина достигает соответственно трех и двух остатков на субъединицу фермента. Авторы работы [17] считают маловероятным модификацию остатка His<sup>67</sup>, который образует координационные связи с ионами цинка и находится в активном центре фермента, и предполагают, что модифицируется His<sup>34</sup>, который является важным для активности фермента и модификация которого ухудшает связывание NAD.

Наблюдаемое нами повышение константы диссоциации комплекса ЖС—Cu(II)—модифицированная алкогольдегидрогеназа ( $K_d=32,5$  мкМ) более чем в 6 раз по сравнению с  $K_d$  комплекса ЖС—Cu(II)—нативный фермент (5,0 мкМ) и то, что краситель предохраняет фермент от инактивации позволяет предположить, что краситель связывается в NAD-связывающей области фермента, вовлекая в образование смешанного комплекса остаток гистидина, подобный остатку His<sup>51</sup> в алкогольдегидрогеназе печени. Однако наряду с образованием координационной связи между ионами Cu(II) и остатками гистидина алкогольдегидрогеназы в связывании ферментом ЖС—Cu(II) участвуют, по-видимому, и иные силы связывания, в первую очередь гидрофобные. При связывании алкогольдегидрогеназы с желтым светопрочным 2КТ без ионов  $Cu^{2+}$   $K_d$  для комплекса составляет 320,1 мкМ [3]. Если роль ионов  $Cu^{2+}$  состоит только в образовании смешанного комплекса с красителем и ферментом, то следовало ожидать, что  $K_d$  для комплекса ЖС—Cu(II) с модифицированной диэтилпирокарбонатом алкогольдегидрогеназой повысится до значения 320,1 мкМ. Однако мы наблюдаем в этом случае повышение значения  $K_d$  до 32,5 мкМ. Известно [18, 19], что производные фенантролина, бензохинолина, хинолина связываются с алкогольдегидрогеназой дрожжей при участии гидрофобных сил, конкурируя с NAD за никотинамидсвязывающий участок фермента. Мы показали [7], что 8-оксихинолин-5-сульфо кислота в концентрации до 6 мМ,

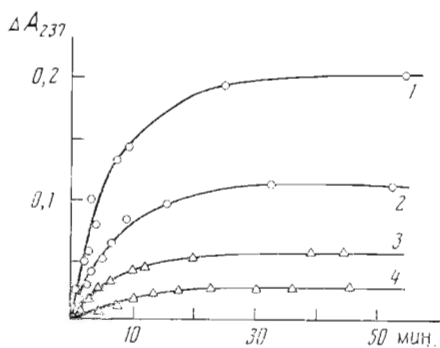


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика модификации алкогольдегидрогеназы диэтилпирикарбонатом 0,18 мМ (1, 2) и 0,030 мМ (3, 4) в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,5, в отсутствие (1, 3) и в присутствии ЖС—Cu(II) (2, 4). Концентрация красителя 65,4 мкМ, фермента 28 мкМ

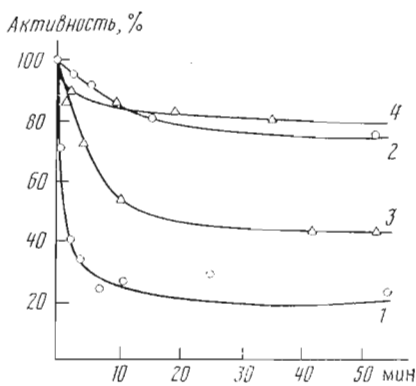


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика инактивации алкогольдегидрогеназы диэтилпирикарбонатом 0,18 мМ (1, 2) и 0,030 мМ (3, 4) в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,5, в отсутствие (1, 3) и в присутствии ЖС—Cu(II) (2, 4). Условия как в рис. 4

NAD — до 8 мМ вызывают десорбцию фермента с сорбента, содержащего иммобилизованный ЖС—Cu(II), на 69,7 и 74,5% соответственно, тогда как раствор с ионной силой до 1 М (NaCl) неспособен десорбировать фермент. В связи с этим можно предположить, что ЖС—Cu(II) также связывается преимущественно с комплементарной никотинамиду частью NAD-связывающей области алкогольдегидрогеназы, вовлекая в образование смешанного Cu(II)-комплекса остаток гистидина активного центра фермента.

Первоначальным условием для образования смешанного комплекса ион металла—краситель—фермент, по-видимому, следует считать стабилизацию конформации красителя за счет его комплексообразования с ионом металла, т. е. образование пространственной структуры комплекса, которая может быть благоприятной или неблагоприятной для специфического связывания с ферментом. Такое предположение подтверждается различиями во взаимодействии алкогольдегидрогеназы дрожжей и лактатдегидрогеназы мышц кролика с ЖС—Cu(II). Алкогольдегидрогеназа дрожжей связывает селективно краситель желтый светопрочный 2КТ только в виде его комплекса с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  [2, 3]. Лактатдегидрогеназа мышц кролика, наоборот, не требует присутствия ионов  $\text{Cu}^{2+}$  при взаимодействии с этим красителем [7]. Лактатдегидрогеназа при хроматографии на сорбенте с иммобилизованным ЖС—Cu(II) в отличие от алкогольдегидрогеназы дрожжей не десорбируется в присутствии низких концентраций хелатообразующих агентов, а также специфических элюентов, содержащих NADH [7]. Более того, только удаление ионов  $\text{Cu}^{2+}$  из сорбента обеспечивает возможность для десорбции фермента с помощью NADH. Из этого следует, что, по-видимому, пространственная структура ЖС—Cu(II) не является благоприятной для связывания с лактатдегидрогеназой мышц кролика и ионы  $\text{Cu}^{2+}$  не вовлекают в комплексообразование ионорные группы фермента.

Полученные нами результаты по исследованию роли ионов  $\text{Cu}^{2+}$  при специфическом связывании желтого светопрочного 2КТ с алкогольдегидрогеназой дрожжей более определенно свидетельствуют об участии иона металла в формировании трехчленного комплекса фермент—ион металла—краситель, чем данные работы [6]. Однако бесспорно, что непосредственное доказательство наличия такого взаимодействия может быть получено на основании данных рентгеноструктурного анализа, как это показано для связывания цибакрол голубого F3GA с алкогольдегидрогеназой печени [20].

## Экспериментальная часть

В работе использовали активные красители отечественного производства – желтый светопрочный 2КТ, красно-коричневый 2КТ, красно-фиолетовый 2КТ, бордо СТ, которые очищали согласно методике [3]. Ионы  $\text{Cu}^{2+}$  из красителей удаляли экстракцией с дитизоном, как описано в работе [3]. Использовали высокоочищенную алкогольдегидрогеназу дрожжей (КФ 1.4.1.1, Boehringer, ФРГ) и следующие реактивы: EDTA, NAD, трис, гидроксиламин (Serva, ФРГ), диэтилпирокарбонат, ацетонитрил (Fluka, Швейцария), имидазол (Merck, ФРГ), сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция), соли металлов квалификации х.ч. или ос.ч. (Союзреактив).

Модификацию алкогольдегидрогеназы дрожжей (28 мкМ, в расчете на одну субъединицу) диэтилпирокарбонатом (конечная концентрация 0,18 или 0,030 мМ) проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 6,5, при 25°С в течение ~1 ч [14]. Использовали свежеприготовленный раствор диэтилпирокарбоната в холодном ацетонитриле. Концентрацию реагента определяли спектрофотометрически по его реакции с 10 мМ имидазолом при pH 7,5, используя коэффициент молярного поглощения  $3000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при 230 нм [15].

В процессе реакции модификации алкогольдегидрогеназы записывали дифференциальный спектр поглощения в интервале 300–230 нм на двухлучевом спектрофотометре (Hitachi-330, Япония) в кюветах толщиной 1 см. Количество модифицированных остатков гистидина в ферменте рассчитывали, используя молярный коэффициент поглощения  $3200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [15] при длине волны 237 нм.

Модификацию алкогольдегидрогеназы диэтилпирокарбонатом в присутствии ЖС–Cu(II) проводили при концентрации последнего в реакционной смеси 65,4 мкМ.

Для реактивации модифицированной алкогольдегидрогеназы к аликвоте реакционной смеси (0,4 мл) добавляли 0,4 мл 0,2 М гидроксиламина, pH 7,5, и инкубировали в течение 2 ч.

Активность алкогольдегидрогеназы в процессе ее модификации диэтилпирокарбонатом и при реактивации гидроксиламином определяли после удаления избытка диэтилпирокарбоната путем введения 0,3 мл реакционной смеси к 0,3 мл 10 мМ имидазола, pH 7,5, и после соответствующего разбавления смеси 0,1 М калий-фосфатным буфером, pH 6,5, по методике [21] при концентрации NADH  $1,5 \cdot 10^{-2}$  М.

Спектры КД записывали на спектрофотополяриметре JASCO J-40 (Япония) в кювете с оптическим путем 1 см при 25°С. Алкогольдегидрогеназу (28 мкМ) ингибировали 40 мин 0,18 мМ диэтилпирокарбонатом, в смесь вводили краситель ЖС–Cu(II) (100 мкМ) и записывали спектр КД. В другом случае после модификации алкогольдегидрогеназы добавляли 0,1 М гидроксиламин, pH 7,5, выдерживали не 2 ч, как ранее, а 35 мин, так как было установлено, что для реактивации модифицированного фермента гидроксиламином достаточно инкубация и в течение более короткого времени. Гидроксиламин удаляли гель-фильтрацией реакционной смеси на колонке (5×1,6 см) с сефадексом G-25. В раствор реактивированной алкогольдегидрогеназы вводили краситель ЖС–Cu(II) (100 мкМ) и записывали спектр КД.

Дифференциальное спектрофотометрическое титрование и определение константы диссоциации комплексов красителей с нативной или модифицированной алкогольдегидрогеназой проводили согласно методике [3].

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [22].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Clonis I. D., Goldfinch M. J., Lowe C. R. Biochem. J., 1981, v. 197, № 1, p. 203–211.
2. Flaksaitė S. S., Sudzhiuvėnė O. F., Pestiakė J.-H. J., Glemzha A. A. Inorg. chim. acta, 1983, v. 79, № 1–6, p. 157–158.
3. Флаксайте С. С., Судзювене О. Ф., Песлякас И.-Г. И., Глемжа А. А. Биооргани. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 25–31.
4. Hughes P., Lowe C. R., Sherwood R. F. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 700, № 1, p. 90–100.
5. Hughes P., Sherwood R. F., Lowe C. R. Biochem. J., 1982, v. 205, № 8, p. 453–456.

6. Hughes P., Sherwood R. F., Lowe C. R. Eur. J. Biochem., 1984, v. 144, № 1, p. 135–142.
7. Флаксайте С. С., Суджювене О. Ф., Песлякас И.-Г. И., Глемжа А. А. Биохимия. 1986, т. 51, № 11, с. 1887–1894.
8. Small D. A. P., Atkinson T., Lowe C. R. J. Chromatogr., 1981, v. 216, № 1, p. 175–190.
9. Rajgopal S., Vijayalakshmi M. A. J. Chromatogr., 1984, v. 315, № 1, p. 175–184.
10. Rajgopal S., Vijayalakshmi M. A. Enzyme Microb. Technol., 1984, v. 6, № 12, p. 555–559.
11. Sherwood R. F., Melton R. G., Alwan S. M., Hughes P. Eur. J. Biochem., 1985, v. 148, № 3, p. 447–453.
12. Флаксайте С. С., Суджювене О. Ф., Песлякас И.-Г. И., Глемжа А. А. Прикл. биохимия и микробиология, 1985, т. 21, № 1, с. 25–34.
13. Аваева С. М., Краснова В. И. Биоорг. химия, 1975, т. 1, № 11, с. 1600–1605.
14. Miles E. W. Meth. Enzymol., 1977, v. 47, p. 431–442.
15. Ovadi J., Libor S., Elodi P. Biochim. et biophys. acta, 1967, v. 2, № 4, p. 455–458.
16. Leskova V., Pavlov-Pericin D. Biochem. J., 1975, v. 145, № 3, p. 581–590.
17. Hennecke M., Plapp B. V. Biochemistry, 1983, v. 22, № 16, p. 3721–3728.
18. Anderson B. M., Reynolds M. L., Anderson C. D. Biochim. et biophys. acta, 1966, v. 113, № 2, p. 235–243.
19. Anderson B. M., Reynolds M. L. Arch. Biochem. and Biophys., 1966, v. 114, № 2, p. 299–308.
20. Biellmann J. F., Samama J. P., Branden C. I., Eklund H. Eur. J. Biochem., 1979, v. 102, № 1, p. 107–110.
21. Кочеров Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. школа, 1974, с. 127–130.
22. Bradford M. M. Anal. Biochem., 1976, v. 72, № 1–2, p. 248–254.

Поступила в редакцию  
14.III.1986  
После доработки  
2.VII.1986

**THE INTERACTION BETWEEN REACTIVE DYES-Cu (II) COMPLEXES WITH  
THE YEAST ALCOHOLDEHYDROGENASE. THE POSSIBILITY OF THE  
INVOLVEMENT OF THE HISTIDINE RESIDUE OF THE ENZYME IN THE  
FORMATION OF A MIXED Cu(II)-COMPLEX WITH LIGHT-RESISTANT  
YELLOW 2KT**

FLAKSAITE S. S., SUDZIUVIENE O. F., PESLIAKAS J.-H. J., GLEMZA A. A.

*ESP «Vermentas», Vilnius*

Modification of the yeast alcoholdehydrogenase (ADH) with diethyl pyrocarbonate, leading to substitution of one histidine residue per the enzyme subunit, reduces the enzyme activity by 75–80%. Interaction of native and modified ADH with Cu(II) light-resistant yellow 2KT dye has been studied. Differences were revealed between the CD spectra of light-resistant yellow 2KT–Cu(II) complexes with either native or modified ADH. Dissociation constants of the complexes determined by differential spectroscopy were found to be 5,0 and 32,5 M for native and modified ADH, resp. Presence of the dye protects ADH from the diethyl pyrocarbonate modification. We assume that a mixed complex of the dye and ADH with Cu(II) ions is formed involving dye's three donor groups and the imidazole donor nitrogen from the histidine residue of the yeast ADH.