

УДК 577.152.3

© 1990 г.

О. А. КАЗЮЧИЦ, В. Н. НИКАНДРОВ, Г. С. ЯНКОВСКАЯ, П. Г. РЫТИК

## МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП МОЛЕКУЛЫ СРЕПТОКИНАЗЫ ПРИ ФОТООКИСЛЕНИИ

*Ключевые слова:* стрептокиназа, фотоокисление, фотоинактивация, L-гистидин.

При фотохимическом окислении в системе, содержащей в качестве фотосенсибилизатора метиленовый синий, происходит разрушение одного остатка гистидина стрептокиназы. Процесс модификации остатка гистидина стрептокиназы характеризуется константой скорости псевдопервого порядка  $5,1 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ , близкой значению таковой при фотоокислении свободного L-гистидина, и частичной утратой активаторной функции белка. Скорость фотоокисления и фотоинактивации зависит от pH среды. Судя по результатам КД-спектроскопии и гель-хроматографии, фотоокисление в слабнокислой среде приводит к изменению вторичной и третичной структур стрептокиназного белка, затрагивающему индольные группы остатков триптофана. В слабощелочной среде выраженных изменений конформации при фотоокислении стрептокиназы не наблюдается. Фотоокисляемая имидазольная группа не играет существенной роли в проявлении специфической активности стрептокиназы и в образовании устойчивого комплекса с плазминогеном человека. Обсуждаются вопросы специфичности модификации остатков гистидина при фотоокислении.

Исследование функциональных групп молекулы стрептокиназы — одного из наиболее сильных активаторов плазминогена — важно как для раскрытия механизма ее специфического действия, так и для конструирования на ее основе новых лекарственных препаратов и форм.

К настоящему времени нами получены материалы об изменении конформационных свойств и активности стрептокиназы при модификации ряда функциональных групп [1—4]. В частности, показано, что два из четырех имеющихся остатков триптофана существенны для проявления специфической активности белка [1]. При модификации гистидилов стрептокиназы диэтилпирокарбонатом наряду со снижением активаторной функции белка наблюдалось образование олигомеров [4], что не позволило сделать определенный вывод о роли остатков гистидина стрептокиназы в ее специфическом функционировании и поддержании нативной конформации.

В связи с этим настоящая статья посвящена исследованию активаторной функции и конформационных особенностей стрептокиназы при ее фотоокислении, так как применение этого метода позволяет исключить введение химического реагента в молекулу белка.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образцы стрептокиназы выделяли из культуральной жидкости  $\beta$ -гемолитического стрептококка штамм Н46А в экспоненциальной фазе его роста, а также из отечественного коммерческого препарата — целиазы. Процесс очистки белка описан нами в предыдущих статьях [1, 4]. Полученные образцы стрептокиназы были гомогенны при элек-

трофорезе в 12,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1%-ного DS-Na и имели удельную активность 100 тыс. международных ед. на 1 мг белка.

Очистка плазминогена из обогащенной  $\beta$ -глобулинами фракции плазмы крови человека проведена методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе [5]. Полученные образцы при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na характеризовались наличием основной (80%) белковой полосы с молекулярной массой 83 кДа (соответствует плазминогену) и минорной с молекулярной массой 72 кДа (соответствует плазмину). Активность полученных образцов, которую определяли казеинолитическим методом после активации стрептокиназой [6], соответствовала 19 казеинолитическим ед. на 1 мг белка.

Фотоокисление проводили в 0,06 М калий-натрий-фосфатном буфере при различных значениях pH. В качестве источника света использовали лампу накаливания мощностью 200 Вт с красным светофильтром, расстояние до поверхности образца составляло 20 см. Световую экспозицию проводили при охлаждении до 2°. Время освещения — 15 и 60 мин. В качестве фотосенсибилизатора использовали метиленовый синий ( $5 \cdot 10^{-6}$  М). Контролем служили образцы, содержащие такое же количество фотосенсибилизатора, но защищенные от действия света, а также образцы, освещавшиеся в отсутствие красителя. Отделение модифицированного белка от низкомолекулярных компонентов смеси после модификации проводили на колонке (1×10 см) с сефадексом G-25 в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,4 (в темноте).

Этоксиформилирование остатков гистидина проводили в ацетатном буфере, pH 5,9, при концентрации диэтилпиروкарбоната 1 мМ, концентрации стрептокиназы  $5 \cdot 10^{-6}$  М, температуре 20°. За ходом образования этоксиформилгистидина следили при помощи дифференциальной УФ-спектроскопии по образованию продукта с  $\lambda_{\text{макс}} = 240$  нм. Для расчета использовали величину коэффициента молярной экстинкции этоксиформилгистидина  $3200 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [7].

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Specord M-40 в кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Fica-55 при монохроматическом возбуждении 296 нм.

Спектры кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре J-20 в интервале длин волн 200—250 нм (при концентрации белка 0,2—0,5 мг/мл в кюветах с толщиной слоя 0,1 см при чувствительности прибора 0,01 и 0,005 град/см и скорости сканирования 5 нм/мин) и 250—350 нм (при концентрации белка 0,7—1,0 мг/мл в кюветах с толщиной слоя 1 см при чувствительности прибора 0,002 град/см и скорости сканирования 5 нм/мин). Значения молярной эллиптичности рассчитывали, принимая среднюю массу аминокислотного остатка равной 133,6, исходя из данных аминокислотного состава стрептокиназы [8]. Прибор калибровали по D-пантолактону и D-10-камфорсульфоной кислоте. Расчет относительной доли элементов вторичной структуры вели по пяти реперным спектрам [9] на ЭВМ СМ 1420.01.

Термоинактивацию стрептокиназы и ее модифицированных производных изучали при 50, 80 и 100° в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,4, при концентрации белка  $5 \cdot 10^{-6}$  М. Константу термоинактивации  $\gamma$  рассчитывали как тангенс угла наклона изотермы инактивации для каждой данной температуры, время полужизни — по формуле  $t_{1/2} = -\ln 2/\gamma$  [10].

Об образовании эквимольных комплексов стрептокиназы и плазминогена человека судили на основании результатов гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200 в 0,01 М трис-лизиновом буфере, pH 8,0, как подробно описано ранее [1].

Активность стрептокиназы определяли методом лизиса пластин и сгустков из человеческого фибрина, содержащего плазминоген [11, 12]. Расчет активности вели по международному стандарту «стрептокиназа — стрептодорназа» (Лондон, ВОЗ).

Концентрацию белка определяли колориметрически по методу Бредфорд [13], а также по величине абсорбции при 280 нм, используя значения коэффициента  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  для стрептокиназы и плазминогена соответственно 9,0 и 17,1 [14, 15].

Концентрацию аминокислот в экспериментах по фотоокислению L-триптофана и L-тирозина оценивали по абсорбции при 280 нм, используя значения коэффициентов молярной экстинкции соответственно 5600 и 1040  $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [16]. Концентрацию метионина и гистидина определяли колориметрическими методами соответственно по реакции с нитропруссидом [17] и по реакции Паули [18].

Электрофорез проводили по [19] в режиме, описанном ранее [1].

Все эксперименты выполнены не менее чем трехкратно, результаты обработаны статистически.

В работе использовали сефадексы G-25, G-100, G-200, ДЭАЭ-сефадекс А-50, ВгCN-сефарозу и голубую сефарозу CL-6В («Pharmacia», Швеция), кумасси бриллиантовый голубой G-250, D-пантолактон, D-10-камфорсульфоновую кислоту, диэтилпирокарбонат («Serva», ФРГ), DS-Na («Koch-Light», Великобритания), L-лизин гидрохлорид, L-ги-

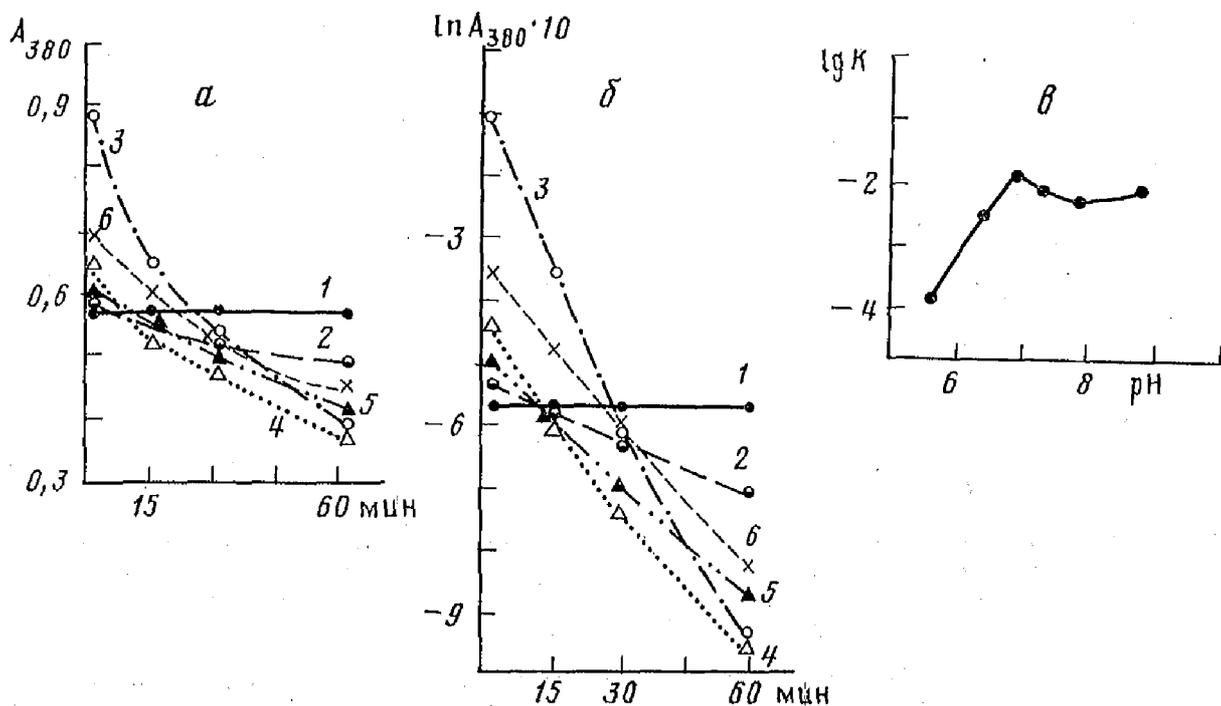


Рис. 1. Кинетика фотоокисления свободного L-гистидина в присутствии метиленового синего: *a* — кривые фотоокисления при различных значениях pH: 1 — 5,6, 2 — 6,4, 3 — 6,9, 4 — 7,3, 5 — 7,9, 6 — 8,7; *б* — те же зависимости в полулогарифмических координатах для определения констант скорости; *в* — зависимость константы скорости фотоокисления от pH

стидин, D,L-тирозин, L-триптофан, ДЭАЭ-целлюлозу, реагенты для электрофореза в полиакриламидном геле («Reanal», ВНР). Остальные реактивы были отечественного производства марок ос. ч., х. ч. или ч. д. а. Их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Фотоокисление отдельных аминокислот.** Данные литературы [20—22] свидетельствуют о том, что при фотохимическом окислении белка могут подвергаться разрушению остатки триптофана, гистидина, тирозина, метионина и цистеина. Не все аминокислотные остатки одинаково восприимчивы к фотоокислению. Разная чувствительность обусловлена как структурной спецификой конкретного белка, так и условиями реакции, в частности значением pH [23—25]. Сопоставление скорости фотоинактивации при разных величинах pH со скоростью фотоокисления свободных аминокислот широко используется при исследовании функциональных групп ферментов и других белков [26—29]. В связи с этим прежде всего для выяснения, какие же функциональные группы претерпевают изменение в процессе реакции фотоокисления в наших конкретных условиях, мы считали целесообразным исследовать специфику фотоокисления свободных аминокислот в зависимости от величины pH.

Поскольку молекула стрептокиназы не содержит остатков цистеина и цистина [8], модельных экспериментов со свободным цистеином мы не проводили.

При температуре 2° в интервале pH 5,6—8,7 изучена кинетика модификации L-гистидина (рис. 1, *a*). Спрявление кривых модификации в полулогарифмических координатах (рис. 1, *б*) показывает, что эта реакция псевдопервого порядка. Построение графика зависимости констант скорости фотоокисления от pH позволило определить значение  $pK_a$  ими-

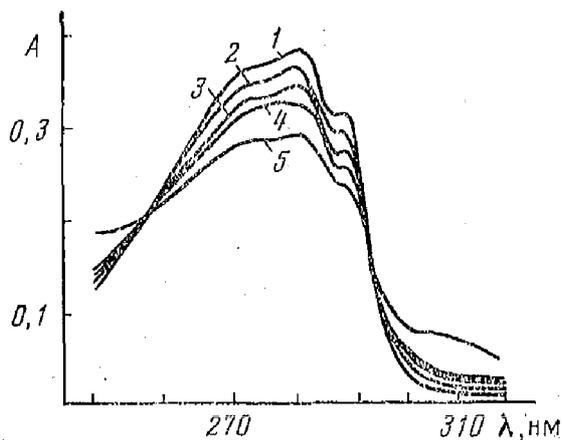


Рис. 2

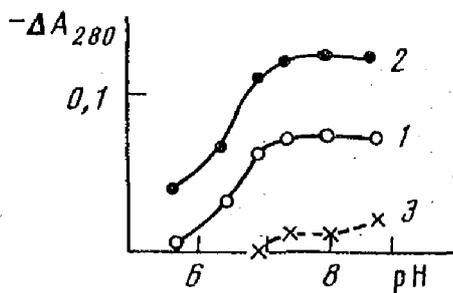


Рис. 3

Рис. 2. Динамика спектров абсорбции L-триптофана при фотоокислении. Спектры аминокислоты до окисления (1) и через 5 (2), 10 (3), 15 (4), 60 мин (5) после начала фотоокисления. Температура среды 2°, pH 7,0, концентрация метиленового синего  $5 \cdot 10^{-8}$  М

Рис. 3. Зависимость фотоокисления L-триптофана (1, 2) и D,L-тирозина (3) от pH среды через 15 (1) и 60 мин (2, 3) после начала реакции. Температура 2°, начальная концентрация триптофана  $8 \cdot 10^{-5}$  М, тирозина  $40 \cdot 10^{-5}$  М

дазольной группы (рис. 1, в), равное 6,9, что несколько превышает данные литературы [25] относительно значения  $pK_a N_3$  для свободного гистидина, но близкое к значению  $pK_a N_3$  для свободного имидазола [26].

Фотоокисление в избранных нами условиях L-триптофана вызывало постепенное изменение спектра абсорбции аминокислоты с изменением поглощения при 280 нм (рис. 2) и образованием изобестических точек при 257 и 295 нм. Реакция протекает в слабнокислой, нейтральной и щелочной средах, достигая максимальной скорости при  $pH > 7,0$ . В этой области кривая убыли аминокислоты имеет плато (рис. 3).

Как видно из зависимости скорости фотоокисления тирозина от pH (рис. 3), разрушение аминокислоты происходит только в щелочной области, ибо, как известно [27], реакционной способностью обладает только ионизированное фенольное ядро ( $pK_a \sim 10,0$ ).

При фотооблучении в наших условиях метионина при pH 6,9 и 7,3 не происходило изменения концентрации аминокислоты в течение 60 мин. Это дает основания полагать, что при модификации в указанной системе стрептокиназы фотоокисления остатков метионина не происходит.

Сравнение констант скорости реакции фотоокисления триптофана, гистидина и тирозина (табл. 1) показало, что в избранных условиях быстрее других модифицируется гистидин, а медленнее (при  $pH > 7,0$ ) — тирозин. Значения констант скорости фотоокисления триптофана превышают таковые величины для тирозина, но меньше их значений для гистидина.

**Фотоокисление стрептокиназы.** При фотооблучении стрептокиназы происходит изменение спектров абсорбции белка, при этом снижается поглощение при 280 нм и выявляются изобестические точки при 260 и 297 нм (рис. 4), соответствующие значениям изобестических точек на спектрах при фотоокислении свободного триптофана. Исследование кинетики процесса позволило определить константы скорости псевдпервого порядка (табл. 1), значения которых превышают константы скорости

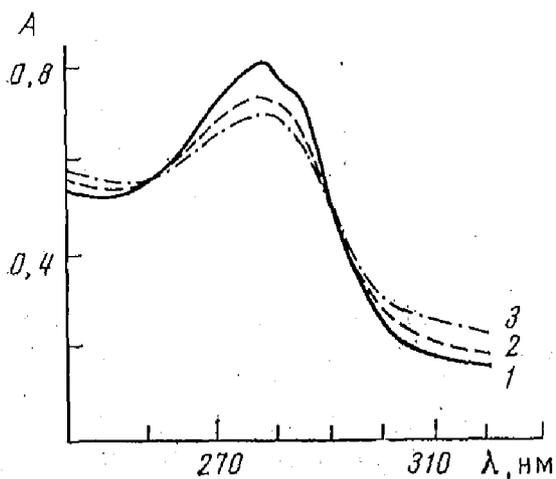


Рис. 4

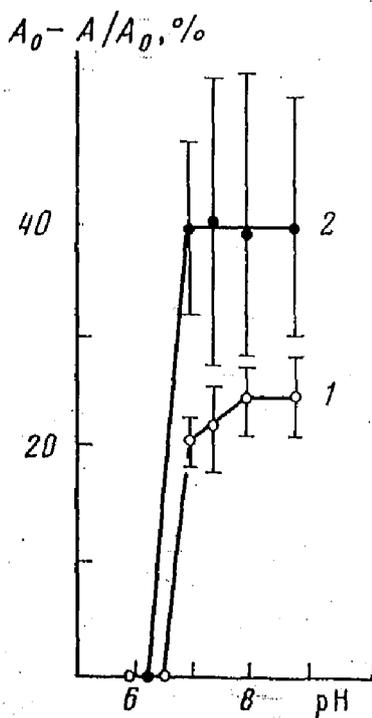


Рис. 6

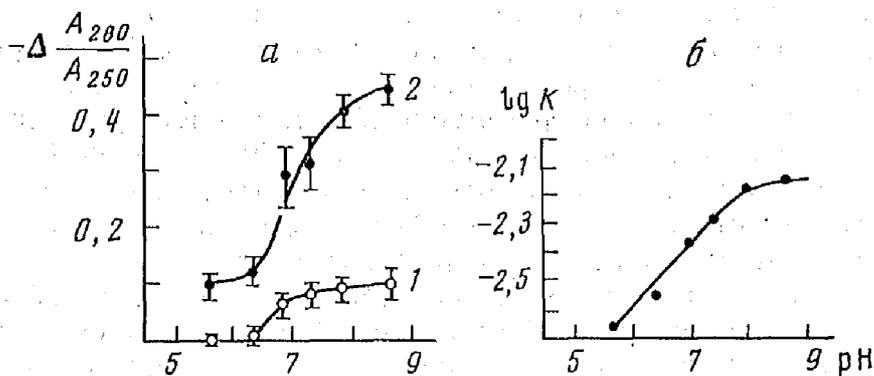


Рис. 5

Рис. 4. Динамика спектров абсорбции стрептокиназы при фотоокислении в присутствии метиленового синего до реакции (1) и через 15 (2) и 60 мин (3) после начала реакции. Концентрация стрептокиназы  $2 \cdot 10^{-5}$  М, рН 6,9, остальные условия — те же, что на рис. 2

Рис. 5. Фотоокисление стрептокиназы при разных значениях рН: а — кривые фотоокисления за 15 (1) и 60 мин (2), б — зависимость константы скорости фотоокисления от рН

Рис. 6. Фотоинактивация стрептокиназы при различных значениях рН. Время реакции 60 мин. Активность стрептокиназы определяли по лизису пластин (1) и сгустков (2) фибрина. Концентрация стрептокиназы  $2 \cdot 10^{-5}$  М, концентрация метиленового синего  $5 \cdot 10^{-8}$  М

фотоокисления свободного триптофана, но несколько ниже величин констант скорости фотоокисления свободного гистидина.

Скорость фотоокисления зависит от рН среды (рис. 5, а). Построение графика зависимости константы скорости от рН позволило определить величину рК фотоокисляемой группы (рис. 5, б), равную  $\sim 7,5$ . Известно, что при фотооблучении разрушается только непротопированная форма имидазольного кольца гистидина [6]. В соответствии с этим увеличение

Константы скорости реакции фотоокисления свободных аминокислот и стрептокиназы  
( $T = 2^\circ$ , концентрация метиленового синего  $5 \cdot 10^{-8}$  M)

Начальная концентрация аминокислоты (белка), M	$K_{pH 6,0}$ , мин <sup>-1</sup>	$K_{pH 7,3}$ , мин <sup>-1</sup>
L-Гистидин, $18 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$8,1 \cdot 10^{-3}$
L-Триптофан, $8 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
D, L-Тирозин, $40 \cdot 10^{-5}$	реакция не идет	$1,6 \cdot 10^{-4}$
Стрептокиназа $2 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$

скорости процесса фотоокисления данной аминокислоты в кислой среде с повышением рН обусловлено депротонизацией атома азота, стоящего в третьем положении имидазольного кольца, его  $pK_a$  равно 6 [25, 26]. Другое значение  $pK_a$  N<sub>3</sub> для имидазола равно 7 [26]. Приводимые в литературе величины  $pK_a$  N<sub>3</sub> имидазольной группы гистидилов белков варьируют от 7,15 до 7,52 [28, 29]. Таким образом, можно полагать, что в молекуле стрептокиназы при избранных условиях фотоокислению подвергается имидазольная группа (или имидазольные группы) гистидина. Однако вопрос о статусе триптофанилов в молекуле модифицированной фотоокислением стрептокиназы остается открытым и требует своего разрешения, поэтому мы проводили флуоресцентную спектроскопию и спектроскопию КД в ароматической области модифицированной стрептокиназы в сравнении с нативным белком (результаты приведены ниже).

Фотоокисление стрептокиназы (рис. 6) сопровождалось снижением ее активаторной функции. При определении методом лизиса фибриновых пластин активность стрептокиназы снижалась до 25%, а при определении по методу лизиса сгустков фибрина снижение активности стрептокиназы было более выраженным, однако необходимо учитывать большую погрешность этого метода. Скорость фотоинактивации зависела от рН, причем потеря активности стрептокиназы происходила при  $pH > 6,4$  (рис. 6). Известно, что выраженная зависимость скорости фотоинактивации от рН наблюдается только при фотоокислении остатков гистидина [25]. Это связано с наиболее быстрыми и глубокими изменениями, происходящими в структуре имидазольного кольца при  $pH 6,0-8,0$ . [29]. С другой стороны, как нами было показано ранее [1], модификация даже одного из имеющихся в молекуле стрептокиназы четырех триптофанилов приводит к сильному (до 50—80%) снижению функциональной активности белка, а окисление двух остатков триптофана сопровождается полной инактивацией. Все это свидетельствует в пользу модификации гистидиновых остатков при фотоокислении стрептокиназы.

Кроме того, титрование остатков гистидина, нативного и модифицированного фотоокислением, при  $pH 6,9$  белка диэтилпирокарбонатом дало соответственно значения 8,5 и 7,2 остатков на молекулу, т. е. фотоокисленный белок содержал на один остаток гистидина меньше.

Нами изучена кинетика термоинактивации ряда производных стрептокиназы при 50, 80 и 100° (рис. 7). Выявлено (табл. 2), что значения константы термоинактивации  $\gamma$  и времени полужизни  $t_{1/2}$  стрептокиназы, модифицированной при  $pH 6,9$ , близки к кинетическим параметрам про-

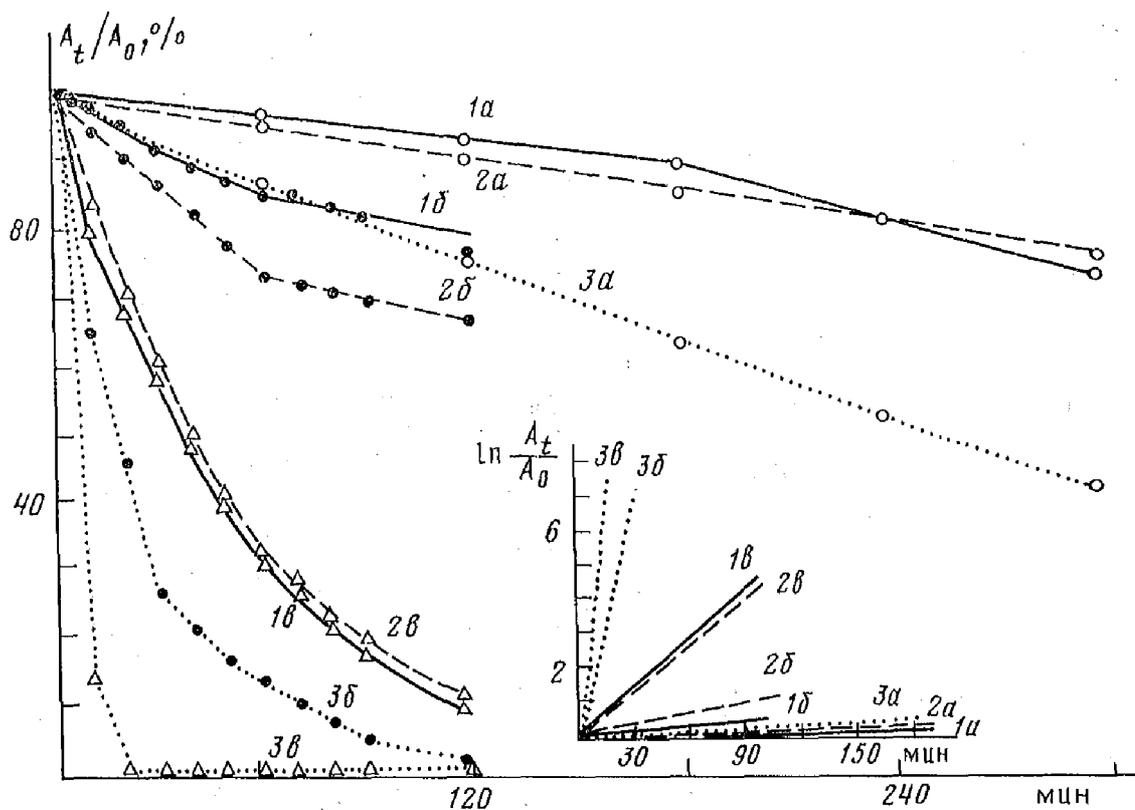


Рис. 7. Кинетика термноинактивации этоксиформилированной стрептокиназы (1), модифицированной фотоокислением при рН 6,9 (2) и белка с модифицированным в системе  $H_2O_2$  — диоксан одним остатком триптофана (3) при 50 (а), 80 (б) и 100° (в)

цесса термноинактивации производного стрептокиназы с одним этоксиформилированным гистидилом, но существенно отличаются от величин  $\gamma$  и  $t_{1/2}$  стрептокиназы с одним окисленным в системе  $H_2O_2$  — диоксан остатком триптофана.

Таким образом, можно предполагать, что при фотоокислении в избранных условиях происходит разрушение лишь одного остатка гистидина, количество остатков триптофана, вероятно, не меняется.

Таблица 2

Значения констант термноинактивации и времени полужизни нативной и модифицированной стрептокиназы при различных температурах

Образец стрептокиназы	50°		80°		100°	
	$\gamma$ , мин <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , мин	$\gamma$ , мин <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , мин	$\gamma$ , мин <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , мин
Модифицированная фотоокислением при рН 6,9	$1,1 \cdot 10^{-3}$	630	$4,7 \cdot 10^{-3}$	147	$1,9 \cdot 10^{-2}$	36
С одним этоксиформилированным остатком гистидина	$1,0 \cdot 10^{-3}$	693	$3,1 \cdot 10^{-3}$	224	$1,9 \cdot 10^{-2}$	36
С одним окисленным в системе $H_2O_2$ — диоксан остатком триптофана	$2,8 \cdot 10^{-3}$	248	$4,2 \cdot 10^{-2}$	17	$19,7 \cdot 10^{-2}$	4
Нативная (контроль)	$0,9 \cdot 10^{-3}$	770	$5,8 \cdot 10^{-3}$	119	$1,5 \cdot 10^{-2}$	46

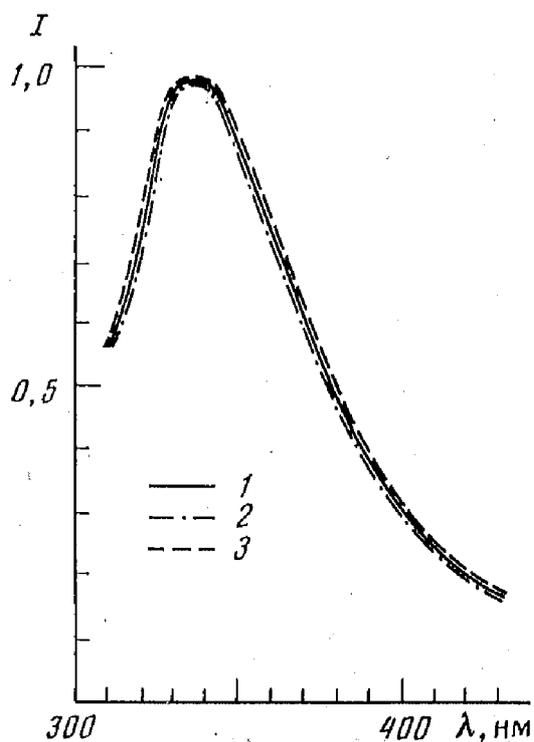


Рис. 8

Рис. 8. Спектры триптофановой флуоресценции нативной стрептокиназы (1) и модифицированной фотоокислением при рН 7,3 в течение 15 (2) и 60 мин (3). Концентрация белка 0,3—0,5 мг/мл, растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, рН 7,4

Рис. 9. Спектры триптофановой флуоресценции нативной стрептокиназы (1) и модифицированной фотоокислением при рН 6,9 в течение 15 (2) и 60 мин (3). Концентрация белка 0,3—0,5 мг/мл, растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, рН 7,4 (а) и 0,06 М фосфатный буфер, рН 7,4, с 6 М мочевиной (б)

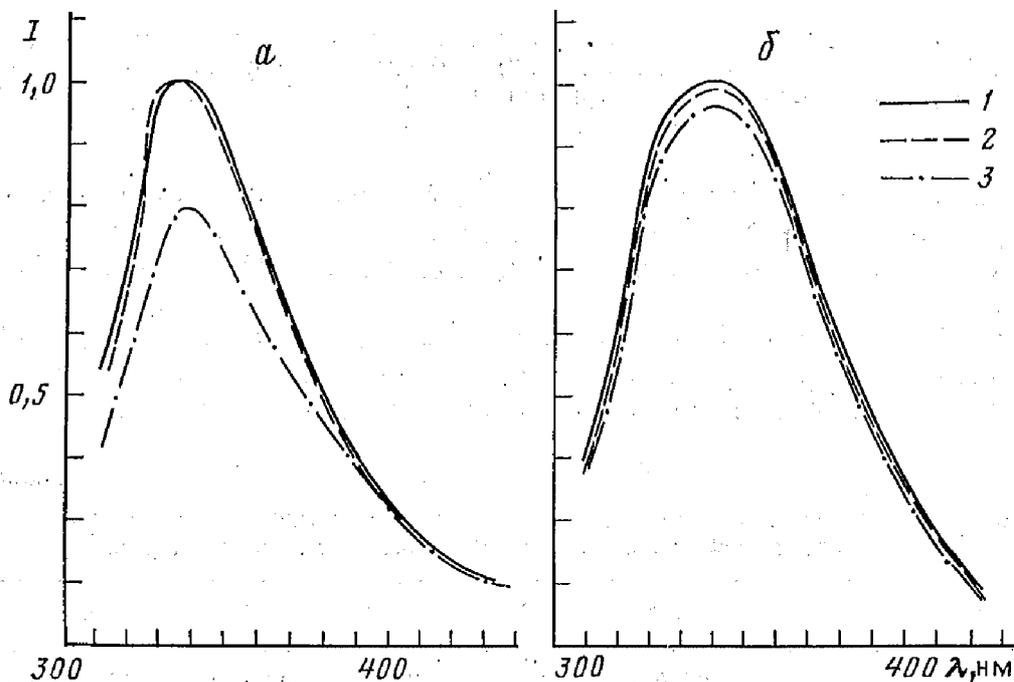


Рис. 9

Тем не менее поскольку абсорбция стрептокиназы снижается в области поглощения ароматических аминокислот, мы считали необходимым прямо проверить, не происходит ли фотоокисление ее триптофанилов.

С этой целью проведено исследование флуоресценции образцов стрептокиназы, подвергшихся фотоокислению при рН 6,9 и 7,3 при возбуждении хромофоров триптофана ( $\lambda_{\text{возб}} = 296 \text{ нм}$ ). Спектры триптофановой флуоресценции модифицированных при рН 7,3 образцов стрепто-

Относительные доли (%) элементов вторичной структуры стрептокиназы при ее фотоокислении ( $n = 3$ )

Исследуемые образцы	$\alpha$ -Спирали	$\beta$ -Структуры		$\beta$ -Изгибы	Неупорядоченная конформация
		антипараллельные	параллельные		
Стрептокиназа, модифицированная фотоокислением при рН 6,9 в течение					
0 мин	22,5 $\pm$ 1,7	10,1 $\pm$ 1,1	1,9 $\pm$ 1,4	15,1 $\pm$ 1,2	50,4 $\pm$ 2,2
15 мин	15,8 $\pm$ 2,3	0,4 $\pm$ 0,3	12,8 $\pm$ 3,3	18,4 $\pm$ 0,9	52,9 $\pm$ 2,7
60 мин	13,5 $\pm$ 2,3	5,4 $\pm$ 1,8	9,1 $\pm$ 2,5	16,4 $\pm$ 1,4	55,6 $\pm$ 1,8
Стрептокиназа, модифицированная фотоокислением при рН 7,3 в течение					
0 мин	19,6 $\pm$ 2,4	12,5 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,4	13,5 $\pm$ 0,6	53,5 $\pm$ 2,3
15 мин	21,4 $\pm$ 1,9	12,1 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,2	13,7 $\pm$ 0,9	52,8 $\pm$ 1,9
60 мин	21,9 $\pm$ 1,3	12,8 $\pm$ 0,9	0,4 $\pm$ 0,2	14,0 $\pm$ 0,6	51,4 $\pm$ 2,3

киназы совпадали со спектрами нативного белка (рис. 8); это свидетельствует о том, что хромофоры триптофанилов не разрушаются в процессе фотоокисления белка при данном значении рН. У подвергшихся фотоокислению в течение 60 мин при рН 6,9 образцов стрептокиназы наблюдалось некоторое снижение интенсивности флуоресценции (рис. 9, а). При добавлении 6 М мочевины, т. е. в условиях, когда происходит разупорядочение вторичной структуры стрептокиназы [30], спектры нативного и модифицированного белков практически совпадали (рис. 9, б). Это вероятно, свидетельствует о том, что при значении рН среды, равном 6,9, фотоокисление стрептокиназы приводит к изменению микроокружения остатков триптофана, что влечет за собой снижение интенсивности их флуоресценции. Однако неизвестно, микроокружение скольких триптофанилов при этом затрагивается.

Чтобы выяснить, не происходит ли изменений вторичной и третичной структур молекулы стрептокиназы после фотоокисления, мы провели спектроскопию кругового дихроизма образцов нативного и модифицированного фотоокислением белков. Показано, что спектры КД образцов стрептокиназы, подвергшихся фотоокислению при рН 7,3, в области поглощения пептидных хромофоров имеют небольшие отличия от спектров нативного белка (рис. 9, а): в области  $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода ( $\lambda < 215$  нм) значения молярной эллиптичности по абсолютной величине возрастают с увеличением времени фотоокисления. В области  $n \rightarrow \pi^*$ -перехода пептидных хромофоров ( $215 \leq \lambda \leq 240$  нм) спектры КД нативной и модифицированной фотоокислением в указанных выше условиях стрептокиназы практически идентичны. Рассчитанные по реперным спектрам относительные доли пяти элементов вторичной структуры нативного и модифицированного белков практически не различаются (табл. 3).

КД-Спектры в области поглощения боковых хромофоров ароматических аминокислот модифицированной фотоокислением при рН 7,3 стрептокиназы не выявляют принципиальных изменений при сравнении их с аналогичными спектрами нативного белка (рис. 9, б). Сохраняются все

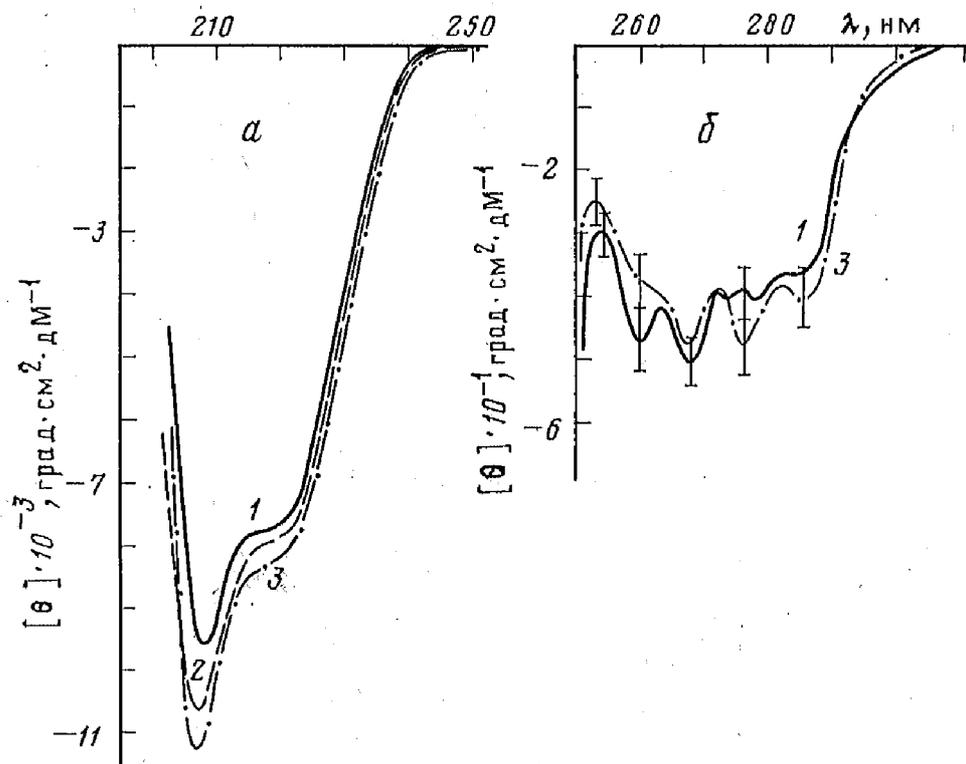


Рис. 10. Спектры кругового дихроизма нативной стрептокиназы (1) и модифицированной фотоокислением при pH 7,3 в течение 15 (2) и 60 мин (3) в пептидной (а) и ароматической (б) областях. Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4

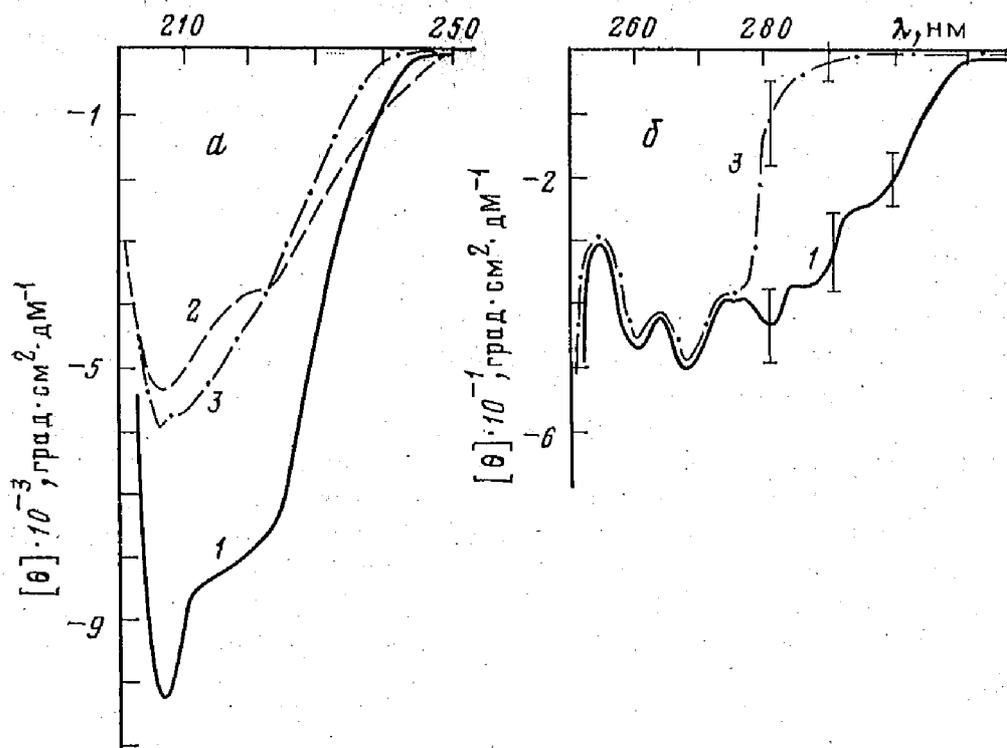


Рис. 11. Спектры кругового дихроизма нативной стрептокиназы (1) и модифицированной фотоокислением при pH 6,9 в течение 15 (2) и 60 мин (3) в пептидной (а) и ароматической (б) областях. Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4

Рассчитанные по результатам гель-хроматографии на сефадексе G-200 значения кажущейся молекулярной массы белков ( $V_0 = 4,3$ )

Исследуемый образец	$V_e$ , мл	$M_r$ , кДа
Нативная стрептокиназа	8,5	51
Плазминоген	7,6	82
Эквимольная смесь стрептокиназы и плазминогена	6,6	127
Модифицированная фотоокислением при pH 6,9 в течение 60 мин стрептокиназа	7,9	68
Эквимольная смесь модифицированной стрептокиназы с плазминогеном	7,2	119

имеющиеся в спектре нативной стрептокиназы полосы при некотором снижении интенсивности экстремума при 260 нм и увеличении интенсивности при 276 и 286 нм, что, по-видимому, свидетельствует об изменении оптических переходов остатков тирозина и триптофана в молекуле модифицированной фотоокислением в слабощелочной области стрептокиназы.

В пептидной области спектры кругового дихроизма фотоокисленной при pH 6,9 стрептокиназы отличаются от спектров нативного белка, (рис. 10, а). Значения молярной эллиптичности модифицированного белка в областях как  $\pi \rightarrow \pi^*$ -, так и  $n \rightarrow \pi^*$ -перехода ниже по абсолютной величине, чем у нативного белка. Расчет вклада элементов вторичной структуры (табл. 3) указывает на снижение относительной доли  $\alpha$ -спиралей и некоторое увеличение суммарной доли  $\beta$ -структуры и неупорядоченной конформации (до 5%). В то же время характер спектров КД в ближней ультрафиолетовой области, по-видимому, указывает на изменение третичной структуры молекулы (рис. 10, б). После фотоокисления стрептокиназы в слабокислой среде исчезают экстремумы при 288 и 295 нм, отражающие оптические переходы остатков триптофана.

Таким образом, при фотоокислении стрептокиназы существенное значение имеет pH среды. Фотоокисление в слабокислой среде приводит к изменению вторичной и третичной структур белка. В слабощелочной среде таких изменений и не наблюдается. Это может быть связано с различным состоянием (в зависимости от pH) группы (или групп), входящей в микроокружение фотоокисляемого остатка гистидина и оказывающей влияние на реакционную способность имидазольной группы. Возможно, последняя функционирует в составе области, имеющей выраженный нуклеофильный характер. На то, что такое явление возможно в белках, указывает ряд авторов [25, 31].

Необходимо отметить, что при гель-хроматографии нативной и модифицированной фотоокислением при pH 6,9 стрептокиназы выявилась следующая картина: нативный белок выходит с колонки при таком соотношении  $V_e/V_0$ , что рассчитанная его кажущаяся молекулярная масса соответствует величине порядка 51 кДа (рис. 11, табл. 4), а модифицированная стрептокиназа выходит в объеме, который соответствует кажущейся молекулярной массе  $\sim 68$  кДа. Этот факт также является подтверждением изменения конформации стрептокиназы.

Исследование способности модифицированной фотоокислением при pH 6,9 стрептокиназы к образованию устойчивого комплекса с плазминогеном методом гель-хроматографии на сефадексе G-200 показало, что

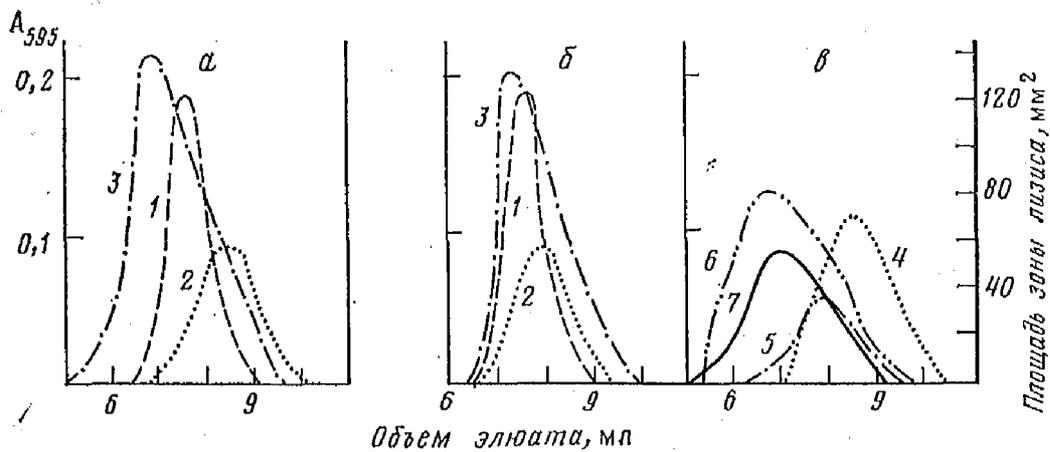


Рис. 12. Гель-хроматография стрептокиназы, плазминогена и их эквимольной смеси на колонке с сефадексом G-200 в 0,01 М трис-буфере, рН 8,0, содержащем 0,1 М L-лизина (1 — плазминоген, 2 — стрептокиназа, 3 — эквимольная смесь плазминогена и стрептокиназы) при использовании нативной стрептокиназы (а) или модифицированной фотоокислением при рН 6,9 (б). в — Активность фракций нативной стрептокиназы (4), фракций модифицированной стрептокиназы (5), фракций смеси нативной стрептокиназы с плазминогеном (6), фракций смеси модифицированной стрептокиназы с плазминогеном (7)

при нанесении на колонку эквимольной смеси модифицированной стрептокиназы и плазминогена пик белка (и активности) элюируется быстрее, чем плазминоген и модифицированная стрептокиназа, но несколько медленнее, чем пик, соответствующий комплексу нативной стрептокиназы с плазминогеном (рис. 12). При этом кажущаяся величина молекулярной массы соответствует  $\sim 120$  кДа, несмотря на то, что кажущаяся величина молекулярной массы модифицированной стрептокиназы, найденная в этих же условиях, выше, чем кажущаяся величина молекулярной массы нативного белка (табл. 4). По-видимому, модифицированная фотоокислением стрептокиназа сохраняет способность к образованию эквимольных комплексов с плазминогеном человека, но характер образованных комплексов несколько иной. Это требует специального изучения.

На основании изложенного можно заключить, что при фотоокислении стрептокиназы происходит разрушение имидазольной группы одного остатка гистидина. Это свидетельствует о том, что гистидилы стрептокиназы (их число, как нами показано ранее [4], равно 9) гетерогенны в функциональном отношении. Фотоокисляемая имидазольная группа стрептокиназы не играет существенной роли в проявлении специфической активности белка, что хорошо согласуется с результатами этоксиформилирования стрептокиназы [4]. Однако при фотоокислении в слабощелочной области происходит изменение конформации стрептокиназного белка, затрагивающее индольные группы остатков триптофана. В слабощелочной среде выраженных изменений конформации при фотоокислении стрептокиназы не наблюдается. Вероятно, на реакционную способность имидазольной группы оказывают влияние другие остатки, состояние которых зависит от величины рН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никандров В. Н., Казючич О. А. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 3. С. 508—515.
2. Никандров В. Н., Казючич О. А. // Вопр. мед. химии. 1989. № 1. С. 41—47.
3. Nikandrov V. N., Kazuyuchits O. A. // 13th Intern. Congress of Biochemistry. Abstr. Amsterdam, 1985. V. 11. P. 302.

4. Никандров В. Н., Казюциц О. А., Янковская Г. С.//Биохимия. 1990. Т. 55. № 5.
5. Deutch D. J., Mertz E. T.//Science. 1970. V. 170. № 3962. P. 1095—1096.
6. Robbins K. C., Summaria L.//Methods Enzymol. 1970. V. 19. P. 184—186.
7. Rosemont J. L.//Anal Biochem. 1978. V. 88. P. 314—320.
8. Morgan F., Henschel A.//Biochim. et biophys. acta, 1969. V. 181. № 7. P. 93—104.
9. Bolotina I. A., Chechov V. O., Lugauskas V.//Int. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. P. 819—824.
10. Кравцов В. В., Кравцов А. В., Капля А. А., Горшняк В. П.//Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. № 6. С. 23—28.
11. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И.//Вопр. мед. химии. 1987. № 1.
12. Савельвольф Л. Б., Сисенко В. И.//Острая и хроническая стрептококковая инфекция. Л.: Медицина, 1967. С. 106—115.
13. Bradford M. M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
14. Kirschenbaum D. H.//Anal. Biochem. 1975. V. 68. P. 465—484.
15. Роббинз К. К., Маркус Г.//Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции. М.: Медицина, 1982. С. 69—84.
16. Бурштейн Э. А.//Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. Т. 6. М.: ВИНТИ, 1976. 216 с.
17. Гарнак Н. М., Полупанов В. С., Дукшина В. В.//Микробы и их метаболиты. Минск: Наука и техника, 1974. С. 130—133.
18. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А.//Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. С. 23.
19. Weber K., Osborn M.//J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 4406—4411.
20. Weil L.//Arch. Biochem. and Biophys. 1965. V. 110. P. 57—68.
21. Billin J. S., Jankus C. A.//Arch. Biochem. and Biophys. 1986. V. 123. P. 18.
22. Коцегов Л. А., Кобылянская К. Р.//Вопр. мед. химии. 1970. № 6. С. 603—606.
23. Westhead E. W.//Biochemistry. 1965. V. 4. P. 2139—2144.
24. Martinez-Carrion M., Turano C., Riva F., Fasella P.//J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 1426—1430.
25. Коцегов Г. А. Дисс. ... докт. биол. наук. М.: МГУ, 1975. С. 15—19.
26. Коцегов Г. А.//Тиаминные ферменты. М.: Наука, 1978. С. 74—87.
27. Feeney R. E., Yamasaki R. B., Georghegan K. F.//Adv. in Chemistry. Ser. Modification of Proteins. 1982. № 198. P. 3—55.
28. Ковалева С. В., Дорожко А. И., Каган З. С.//Биохимия. 1984. Т. 52. № 8. С. 1253.
29. Игамбердиев А. У., Землянухин А. А.//Биохимия. 1987. Т. 52. № 8. С. 1286—1293.
30. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С., Пыжова Н. С., Микуц Н. В.//Изв. АН БССР. Сер. биол. наук. 1986. № 6. С. 47—52.
31. Николаев Л. А.//Основы физической химии биологических процессов. М.: Высшая школа, 1971. С. 174—175.

Белорусский НИИ эпидемиологии  
и микробиологии Минздрава БССР,  
Минск

Поступила в редакцию  
25.12.89

*O. A. KAZYUCHITS, V. N. NIKANDROV, G. S. YANKOVSKAYA, P. G. RYTIK*

### MODIFICATION OF FUNCTIONAL GROUPS OF THE STREPTOKINASE MOLECULE DURING PHOTOOXIDATION

*Key words:* streptokinase, photooxidation, photoinactivation, L-histidine.

Photochemical oxidation with methylene blue as photosensitizer results in the destruction of one histidine residue in the streptokinase molecule. This process is characterized by the rate constant corresponding to the modification of free L-histidine and results in partial inactivation of the protein. The rate of protein photo oxidation and photoinactivation is pH-dependent. As can be judged from the results of CD spectroscopy and gel chromatography, in weakly acidic (but not in weakly alkaline) media the reaction results in conformation changes of the streptokinase globule which affect the state of the protein tryptophanyl residue. It was found that the imidazole group destroyed during the photooxidation reaction is not essential either for the specific activity of streptokinase or for the formation of its stable complex with human plasminogen. The specificity of modification of the streptokinase histidine residue during the photooxidation reaction is discussed.