

УДК 577.152.3

© 1990 г.

**В. Н. НИКАНДРОВ, О. А. КАЗЮЧИЦ, Г. С. ЯНКОВСКАЯ****ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОСТАТКОВ ГИСТИДИНА  
В МОЛЕКУЛЕ СРЕПТОКИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ МОДИФИКАЦИИ  
ДИЭТИЛПИРОКАРБОНАТОМ**

*Ключевые слова:* стрептокиназа, остатки гистидина, инактивация, структура белка.

Изучено взаимодействие стрептокиназы с диэтилпирокарбонатом. Установлено, что при pH 6,0 диэтилпирокарбонат реагирует с восемью остатками гистидина на молекулу белка, что сопровождается существенным снижением функциональной активности последнего. Процесс модификации гистидилов стрептокиназы характеризуется константой скорости псевдопервого порядка, равной  $0,1 \text{ мин}^{-1}$  и близкой к таковой для процесса этоксиформилирования свободного L-гистидина, и частичной утратой активаторной функции белка. Два остатка гистидина этоксиформилируются необратимо, обработка модифицированной стрептокиназы гидроксиламином не приводит к ее реактивации. Судя по характеру спектров кругового дихроизма, модифицируемые диэтилпирокарбонатом остатки не вносят существенного вклада в стабилизацию вторичной структуры белка. Обсуждаются вопросы специфичности модификации гистидилов диэтилпирокарбонатом. На основании данных гель-хроматографии предполагается, что частичная инактивация стрептокиназы обусловлена образованием олигомеров белка с пониженной активаторной функцией.

Структурно-функциональная специфика одного из наиболее сильных белковых активаторов плазминогена — стрептокиназы — остается понятой не до конца. Это касается структурной организации молекулы, реализации ее функциональной активности, в частности функциональных групп молекулы. К настоящему времени получены материалы об изменении конформационных свойств и активности стрептокиназы при модификации остатков триптофана, тирозина, аминок групп [1—3].

Одной из гипотез, трактующих специфику стрептокиназы, является «квазипротеазная», основанная на обнаруженной гомологии первичной структуры стрептокиназы и некоторых сериновых протеиназ [4]. Согласно этой гипотезе стрептокиназа происходит от сериновых протеиназ, а вследствие замены остатка His остатком Gly она утрачивает протеолитическую активность.

Учитывая, что в формировании активных центров многих ферментов принимает участие имидазольная группа гистидина, мы посвятили настоящую работу исследованию активаторной функции стрептокиназы, а также ее конформационных особенностей при модификации остатков гистидина диэтилпирокарбонатом.

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использованы образцы стрептокиназы, полученные непосредственно из культуральной жидкости  $\beta$ -гемолитического стрептококка штамм Н46А в экспоненциальной фазе его роста либо из отечественного коммерческого препарата стрептокиназы — цели-

азы. Очистку стрептокиназы из культуральной жидкости проводили методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, как подробно описано нами в предыдущей статье [1]. В случае использования в качестве источника стрептокиназы препарата «целиаза» стрептокиназу выделяли последовательно осаждением белков хлоридом натрия в конечной концентрации 10% при pH 2,5, ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50 в 0,1 М трис-НСl-буфере, pH 6,8, с элюцией 0,15 М раствором NaCl, хроматографией на голубой сефарозе CL-6В в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,5 М NaCl, и гель-хроматографией на сефадексе G-100 в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,4. Полученные образцы стрептокиназы были гомогенны при электрофорезе в 12,5% -ном полиакриламидном геле в присутствии 0,1% DS-Na и имели удельную активность 100 000 международных единиц 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, соответствующей плазмину. Активность полученных образцов, которую определяли казеинолитическим методом после активации стрептокиназой [6], соответствовала 19 казеинолитическим единицам на 1 мг белка.

Модификацию гистидиновых остатков проводили при 20° диэтилпиروкарбонатом в 0,1 М ацетатном буфере, pH 6,0 [7]. К раствору стрептокиназы (1 мг) в указанном буфере добавляли 10—1000-кратный молярный избыток диэтилпирокарбоната в абсолютном этаноле. Кинетику модификации гистидиновых остатков регистрировали по величине адсорбции при 240 нм, отражающей образование N-этоксиформилгистидина и N,N'-диэтоксиформилгистидина. Для расчета числа модифицированных остатков использовали величины коэффициентов молярной экстинкции карбэтоксид- и дикарбэтоксипроизводных гистидина в зависимости от концентрации диэтилпирокарбоната:  $3200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при 1,15 мМ и  $5200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  при 11,5 мМ [7]. Это дает возможность рассчитать число модифицированных гистидилов без определения отдельно содержания моно- и дизамещенных производных [7]. Отделение модифицированного белка от избытка реагента проводили на колонке с сефадексом G-25 в 0,06 М фосфатном буфере, pH 7,4.

Титрование свободных аминогрупп стрептокиназы и ее этоксиформилированных производных проводили 100-кратным молярным избытком 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты при pH 9,0. При расчете количества тринитрофенилированных аминогрупп использовали коэффициент  $\epsilon_{340}$ , равный  $14\,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [8]. При модификации отдельных аминокислот (L-гистидина, L-тирозина, L-триптофана) их использовали в конечной концентрации  $1,2 \cdot 10^{-4}$ — $1,9 \cdot 10^{-3}$  М.

Спектры абсорбции записывали на спектрофотометре Specord M-40 («Carl Zeiss», ГДР) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Дифференциальные спектры записывали по 4-кюветной системе.

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Fica-55 (Франция) при возбуждении светом с длиной волны 296 нм.

Спектры кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре J-20 («Jasco»), Япония) в интервалах 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 0,005 град/см и скорости сканирования 25 нм/мин) и 250—300 нм (при концентрации белка 1 мг/мл в 1-см кюветах при чувствительности прибора 0,005 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 [9]. Прибор калибровали по D-пантолактону и D-10-камфорсульфоновой кислоте. Расчет относительной доли элементов вторичной структуры вели по реперным спектрам [10] на ЭВМ СМ 1420.01.

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

Активность стрептокиназы определяли методом лизиса густок или пластин 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, принимая значения коэффициента абсорбции  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  для стрептокиназы и плазминогена человека равными соответственно 9,0 и 17,1 [14, 15].

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

В работе использованы сефадексы G-25, G-100, G-200, ДЭАЭ-сефадексы А-50, ВгСN-сефароза и голубая сефароза CL-6В («Pharmacia», Швеция); 2,4,6-тринитробензолсуль-

фоновая кислота, диэтилпирокарбонат, кумасси бриллиантовый голубой G-250, D-пантолактон, D-10-камфорсульфоновая кислота («Serva», ФРГ); DS-Na («Koch-Light», Англия); L-лизингидрохлорид, L-гистидин, L-тирозин, L-триптофан, ДЭАЭ-целлюлоза, реагенты для полиакриламидного геля («Reanal», Венгрия). Остальные реактивы были отечественного производства марки ос. ч., х. ч. или ч. д. а. Их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Модификация отдельных аминокислот.** Обработка L-гистидина диэтилпирокарбонатом приводила к увеличению абсорбции при 240 нм, причем кинетика процесса описывалась кривой с насыщением (рис. 1). Преобразование кинетических кривых в полулогарифмических координатах дает основание считать, что этоксиформилирование L-гистидина диэтилпирокарбонатом подчиняется уравнению кинетики первого порядка. Увеличение в инкубационной смеси концентрации аминокислоты с 0,76 до 1,90 мМ практически не отражается на величине константы скорости реакции (соответственно 0,14 и 0,17 мин<sup>-1</sup>). В целом процесс модификации L-гистидина завершается за 15 мин. Полученные результаты при двух избранных концентрациях аминокислоты позволили также определить истинную концентрацию диэтилпирокарбоната [16], которая в данном случае равна 0,94 мМ. Обработка диэтилпирокарбонатом L-триптофана или L-тирозина в течение 2 ч при конечной концентрации этих аминокислот соответственно  $1,2 \cdot 10^{-4}$  и  $4,3 \cdot 10^{-4}$  М и 10-кратном молярном избытке модифицирующего реагента не вызывала появления дифференциальных спектров в области 240—340 нм. Это свидетельствует об отсутствии образования продуктов реакции, дающих вклад абсорбции в указанном диапазоне спектра.

**Модификация стрептокиназы.** В избранных условиях этоксиформилирования гистидиновых остатков инкубация стрептокиназы с диэтилпирокарбонатом (40-кратный молярный избыток реагента) приводила к росту абсорбции при 240 нм (рис. 2). Процесс практически полностью завершается к 25 мин и удовлетворительно описывается уравнением кинетики первого порядка с константой скорости 0,09 мин<sup>-1</sup>. Это значение в целом соответствует таковому при модификации свободного L-гистидина. Расчет общего числа гистидиновых остатков с использованием коэффициента молярной экстинкции  $3200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  (концентрация диэтилпирокарбоната 0,26 мМ) показал, что оно соответствует восьми. При этом в первые 10 мин модифицируются пять гистидилов. Модификация гистидилов стрептокиназы обратима: после добавления гидроксиламина (0,5 М) [19] наблюдается уменьшение величины абсорбции. Вместе с тем характер полученной зависимости дает основание думать, что два остатка гистидина этоксиформилируются необратимо (рис. 2).

Известно, что скорость модификации остатков гистидина диэтилпирокарбонатом в значительной степени зависит от рН. Так, полагают, что вследствие депротонирования имидазольной группы при рН 7,5 скорость модификации гистидина заметно растет [17]. В случае стрептокиназы переход от ацетатного буфера, рН 6,0, к фосфатному, рН 7,5, полностью предотвращал этоксиформилирование гистидилов.

В целях определения полноты модификации остатков гистидина диэтилпирокарбонатом в молекуле стрептокиназы мы исследовали влияние величины молярного избытка модифицирующего реагента на число этоксиформилируемых гистидилов, а также влияние на процесс их модификации предварительной обработки макромолекулы белка 6 М гуани-

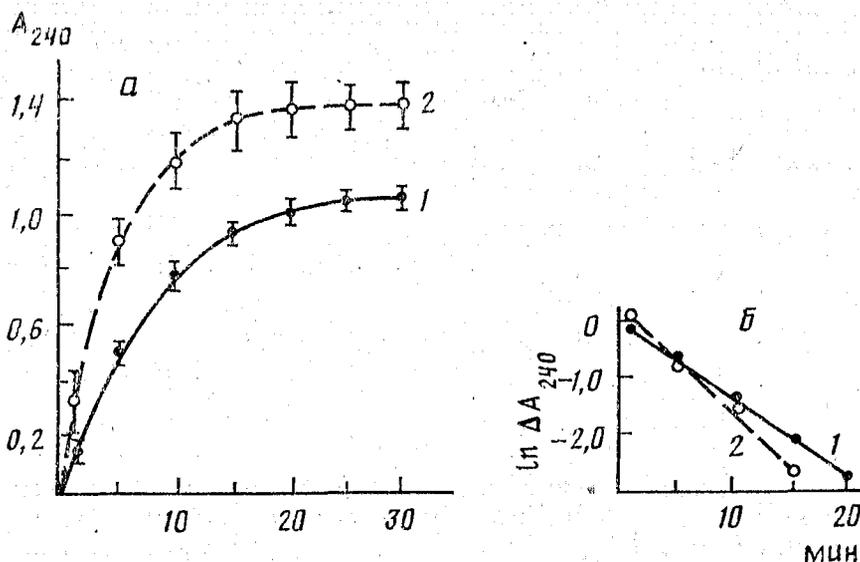


Рис. 1. Кинетика модификации L-гистидина в 0,1 М ацетатном буфере, рН 6,0. Концентрация гистидина — 0,76 (1) и 1,90 мМ (2), концентрация диэтилпирокарбоната — 1,15 мМ, температура среды — 25°

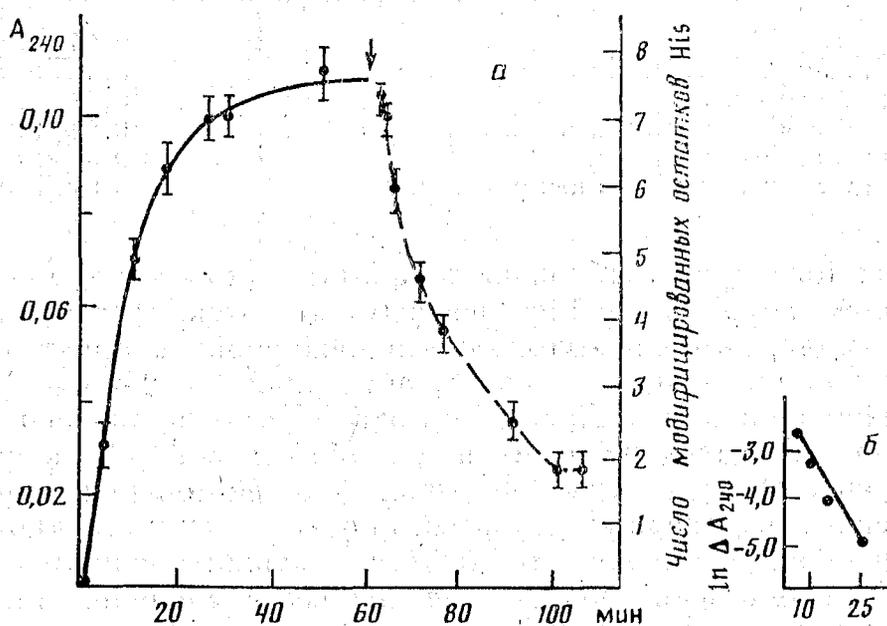


Рис. 2. Кинетика этоксиформилирования и деацилирования гистидилов стрептокиназы. Концентрация стрептокиназы —  $6,5 \cdot 10^{-6}$  М, диэтилпирокарбоната — 40-кратный молярный избыток. Стрелкой показано добавление 0,5 М гидроксилamina. Остальные условия — те же, что на рис. 1

дин-гидрохлоридом или 6 М мочевиной. Как было показано нами ранее, при данных условиях наблюдаются глубокие изменения молекулы стрептокиназы, выражающиеся в разупорядочении вторичной и третичной структур [18]. Исследования показали, что уже при 60-кратном молярном избытке диэтилпирокарбоната модифицируются восемь остатков гистидина и лишь при 130-кратном избытке реагента, по-видимому, модифицируется дополнительно еще один остаток (табл. 1). Полученные нами данные о числе остатков гистидина в молекуле стрептокиназы хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными аминокислотного анали-

Таблица 1

Число модифицируемых диэтилпиروкарбонатом остатков гистидина стрептокиназы в 0,1 М ацетатном буфере, pH 6,0 ( $n = 3$ )

Молярный избыток диэтилпирокарбоната	Концентрация диэтилпирокарбоната, мМ	$\epsilon_m$ , М <sup>-1</sup> ·см <sup>-1</sup> [7]	Число модифицируемых гистидилов
40	0,26	3200	7,2±0,6
60	3,30	3900	8,8±0,4
240	1,12	3200	8,1±0,9
130	5,60	4600	8,9±0,8

Таблица 2

Влияние денатурирующих соединений на модификацию остатков гистидина в молекуле стрептокиназы

Концентрация стрептокиназы  $10^{-5}$  М, 20-кратный молярный избыток диэтилпирокарбоната, преинкубация с денатурирующими агентами — 6 М мочевиной и 6 М гидрохлоридом гуанидиния — при 37° в течение 30 мин ( $n = 3$ )

Исследуемый образец	$A_{240}$
Стрептокиназа	0,65±0,05
Стрептокиназа + диэтилпирокарбонат	0,70±0,05
Стрептокиназа + 6 М G-HCl	0,48±0,05
Стрептокиназа + 6 М G-HCl + диэтилпирокарбонат	0,52±0,05
Стрептокиназа + 6 М мочевины	0,58±0,05
Стрептокиназа + 6 М мочевины + диэтилпирокарбонат	0,61±0,05

за [9]. Более того, предварительная обработка стрептокиназы гуанидин-гидрохлоридом или мочевиной при последующем этоксиформилировании 20 кратным молярным избытком диэтилпирокарбоната практически не приводит к дополнительному приросту абсорбции при 240 нм (табл. 2). Можно предположить, что доступность остатков гистидина белка модифицирующему реагенту определяется не грубой структурой глобулы белка, а устойчивостью структуры небольших областей молекулы стрептокиназы. Косвенным подтверждением такого предположения можно считать обнаруженную нами высокую устойчивость функции стрептокиназы к ряду повреждающих факторов на фоне глубоких изменений третичной и вторичной структур ее молекулы [18].

Модификация двух наиболее легко этоксиформилируемых остатков гистидина приводит к заметному снижению ее активаторной функции (рис. 3). Наиболее резкое снижение обнаруживается при анализе методом лизиса фибриновых сгустков, в котором учитывается ранняя фаза процесса фибринолиза. В то же время при исследовании методом лизиса фибриновых пластин в течение более длительного времени снижение активаторной функции менее сильно. Следовательно, после этоксиформилирования остатков гистидина молекула стрептокиназы частично утрачивает функциональную активность, причем эта потеря сопряжена с модификацией лишь двух остатков гистидина. Вместе с тем деацилирование модифицированных остатков с помощью 0,5 М гидроксиламина не вело к восстановлению активности стрептокиназы. Как мы указывали выше, обработка этоксиформилированной стрептокиназы гидроксиламином не приводит к полному деацилированию всех модифицированных гистиди-

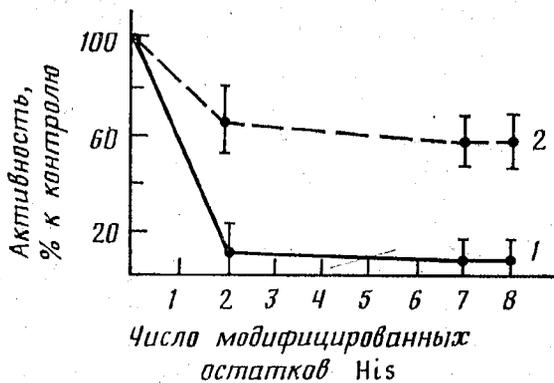


Рис. 3

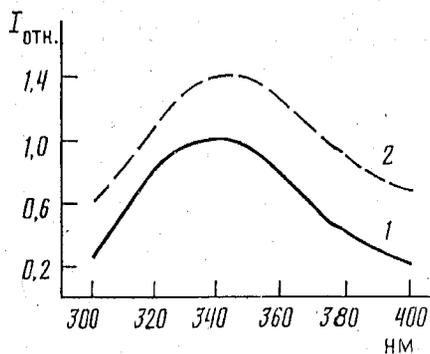


Рис. 4

Рис. 3. Инактивация стрептокиназы в процессе модификации ее гистидилов. Определенные активности по лизису сгустков фибрина (1) и фибриновых пластин (2)

Рис. 4. Спектры триптофановой флуоресценции нативной (1) и модифицированной диэтилпирокарбонатом (2) стрептокиназы. Концентрация белка — 0,33 мг/мл, растворитель — 0,06 М фосфатный буфер (рН 7,4) с добавлением 6 М мочевины

лов: два остатка остаются модифицированными. Исходя из этих фактов, можно думать, что модификация двух остатков гистидина молекулы стрептокиназы диэтилпирокарбонатом идет с образованием дикарбэтоксипроизводных. Как известно, в этом случае обработка гидроксиламином не ведет к реактивации ферментов [24].

Вместе с тем учитывая способность диэтилпирокарбоната взаимодействовать с OH-, SH-, NH<sub>2</sub>- и индольными группами [20], не следует отбрасывать возможность инактивации стрептокиназы из-за модификации этих групп. Известно, что SH-группы в молекуле стрептокиназы полностью отсутствуют [9], а обработка ее диизопропилфторфосфатом, модифицирующим OH-группы серина, не оказывает влияние на активаторную функцию [21]. Определение числа свободных аминогрупп в нативной и модифицированной диэтилпирокарбонатом стрептокиназе показало, что в молекуле белка с двумя этоксиформилированными остатками гистидина интактными остаются лишь 14 аминогрупп (табл. 3). Однако, как было показано ранее, модификация 15 аминогрупп слабо меняет активность стрептокиназы [3]. Все изложенное позволяет считать, что при обработке стрептокиназы диэтилпирокарбонатом модификации подвергается и ~50% свободных аминогрупп макромолекулы стрептокиназы, но прямой связи этого явления с частичной инактивацией молекулы скорее всего нет. Возможность модификации остатков триптофана при обработке стрептокиназы диэтилпирокарбонатом была дополнительно изучена

Таблица 3

Изменение количества свободных аминогрупп стрептокиназы при ее модификации диэтилпирокарбонатом

Число этоксиформилированных гистидилов	Число триинтрофенилируемых аминогрупп
0	28
1,9	14
4,0	5
4,7	4

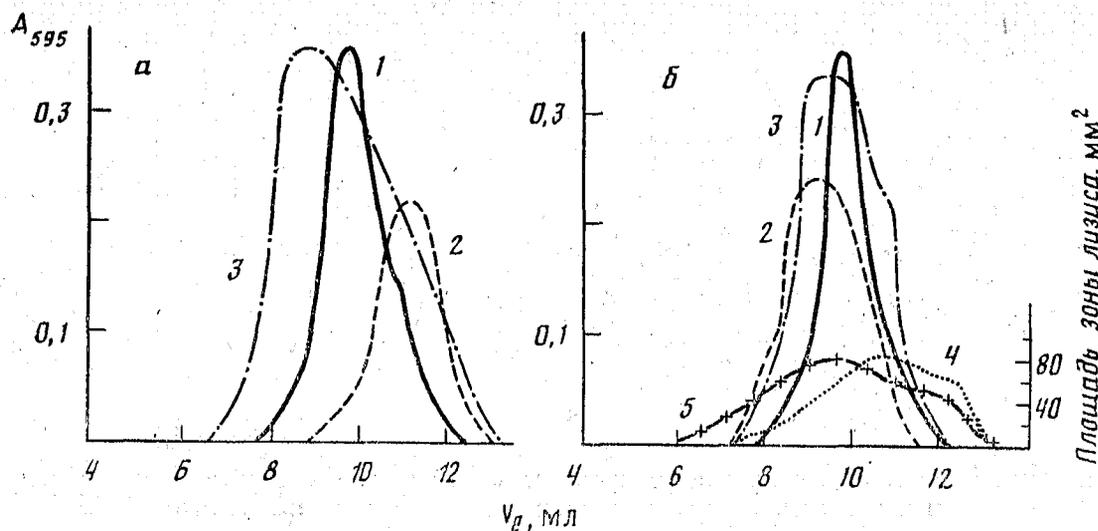


Рис. 5. Гель-хроматография плазминогена человека (1), стрептокиназы (2) и их эквимолярной смеси (3) на колонке с сефадексом G-200 в 0,01 М трис-буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 М L-лизин, при использовании нативной (А) или модифицированной стрептокиназы (Б). Активность фракций модифицированной стрептокиназы — 4, фракций эквимолярной смеси модифицированной стрептокиназы с плазминогеном — 5

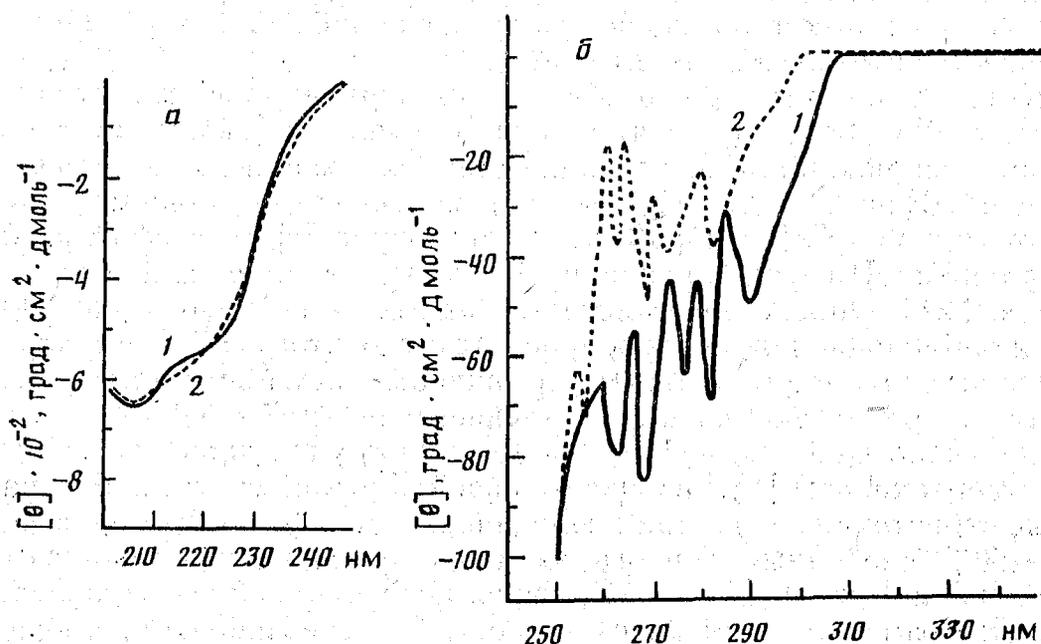


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма нативной (1) и модифицированной диэтилпирокарбонатом (2) стрептокиназы в пептидной (А) и ароматической (Б) областях. Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4

методом флуоресценции. В 6 М мочеvine, где доступность триптофановых остатков стрептокиназы растворителю практически полная [18], обработка бслка диэтилпирокарбонатом не меняет положение максимума спектра, но существенно увеличивает интенсивность флуоресценции (рис. 4). По-видимому, это свидетельствует о сохранности остатков триптофана и об одновременной модификации тушащих соседних групп. К числу последних могут относиться и аминокруппы [22].

Относительная доля (%) элементов вторичной структуры нативной и модифицированной диэтилпирокарбонатом стрептокиназы ( $n = 4$ )

Исследуемый образец	$\alpha$ -Спирали	$\beta$ -Структуры		$\beta$ -Изгибы	Неупорядоченная конформация
		антипараллельные	параллельные		
Нативная стрептокиназа	$20,0 \pm 2,1$	$2,0 \pm 1,5$	$5,4 \pm 2,2$	$15,1 \pm 1,4$	$57,5 \pm 5,7$
Модифицированная стрептокиназа	$20,8 \pm 4,2$	$5,3 \pm 2,1$	$7,4 \pm 1,6$	$16,9 \pm 3,2$	$49,6 \pm 4,8$

Результаты исследования способности стрептокиназы к образованию эквимольных комплексов с плазминогеном человека показали, что смесь нативной стрептокиназы с плазминогеном элюируется быстрее, чем индивидуальные белки (рис. 5). Это однозначно свидетельствует об образовании комплекса двух указанных белков [23]. Иная картина наблюдается в случае стрептокиназы, модифицированной диэтилпирокарбонатом. Прежде всего обращает на себя внимание значительное увеличение скорости элюции: стрептокиназа выходит практически сразу за свободным объемом колонки. Логическим объяснением этого явления может быть образование олигомеров стрептокиназы с большей молекулярной массой вследствие межмолекулярных сшивок. Подобная ситуация отмечена при модификации диэтилпирокарбонатом ряда ферментов, например глутаматдегидрогеназы печени быка [24]. Сопоставление профиля элюции модифицированной стрептокиназы по белку с таковым по ее активаторной функции, на наш взгляд, достаточно четко показывает, что наиболее высокая активность стрептокиназы сосредоточена в зоне медленнее всего элюирующихся фракций. Этот факт дает основание думать, что частичная инактивация стрептокиназы при обработке диэтилпирокарбонатом может быть обусловлена образованием олигомеров белка с пониженной активаторной функцией. При нанесении на колонку с сефадексом G-200 эквимольной смеси плазминогена человека и модифицированной стрептокиназы профиль элюции белка практически не меняется в сравнении с таковым для стрептокиназы. Вместе с тем распределение активности в сравнении со стрептокиназой иное: отмечается более быстрая элюция с колонки активных фракций (рис. 5). По-видимому, молекулы стрептокиназы, не включенные в олигомеры, сохраняют функциональную способность и способность к образованию эквимольных комплексов с плазминогеном человека.

Судя по характеру спектров кругового дихроизма в дальней ультрафиолетовой области, заметных изменений вторичной структуры стрептокиназы при модификации ее диэтилпирокарбонатом не происходит (рис. 6). Действительно, расчет вклада элементов вторичной структуры по реперным спектрам указывает лишь на тенденцию к уменьшению доли неупорядоченной конформации (табл. 4). В то же время характер спектров кругового дихроизма в ближней ультрафиолетовой области, по-видимому, указывает на изменения третичной структуры молекулы (рис. 6). Спектр кругового дихроизма нативной стрептокиназы характеризуется наличием слабых отрицательных полос с экстремумами при 263, 267, 277, 283 и 290 нм, отражающих оптические переходы остатков тирозина и триптофана. После обработки стрептокиназы диэтилпирокарбонатом сте-

пень асимметрии окружения хромофорных групп заметно уменьшается, а экстремум при 290 нм исчезает (рис. 6).

Изложенные материалы свидетельствуют о том, что обработка стрептокиназы диэтилпирокарбонатом приводит к модификации остатков гистидина, аминокрупп и сопровождается существенным снижением функциональной активности. Последнее отмечается уже при модификации двух остатков гистидина. Модифицируемые диэтилпирокарбонатом остатки не вносят существенного вклада в стабилизацию вторичной структуры молекулы белка. По-видимому, наиболее вероятным следствием обработки стрептокиназы диэтилпирокарбонатом является межмолекулярная сшивка с образованием олигомеров и обусловленным им снижением активности, причем формирование подобных олигомеров не ведет к изменению вторичной структуры молекулы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никандров В. Н., Казючиц О. А.//Биохимия. 1988. Т. 53. № 3. С. 508—515.
2. Buck F. F., Boggiano E.//J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 7. P. 2091—2096.
3. Nikandrov V. N., Kazuyuchys O. A.//XIII Intern. Congr. Biochemistry. Abstracts. Amsterdam, 1985. V. 11. P. 302.
4. Jackson K., Tang J.//Thromb. Res. 1978. V. 13. P. 693—699.
5. Deutsch D. J., Mertz E. T.//Science. 1970. V. 170. № 3962. P. 1095—1096.
6. Robbins K. S., Summaria L.//Methods Enzymol. 1970. V. 19. P. 184—186.
7. Rosemont J. L.//Anal. Biochem. 1978. V. 88. № 3. P. 314—320.
8. Habeeb A. F. S.//Anal. Biochem. 1966. V. 14. № 3. P. 328—336.
9. Morgan F., Henschen A.//Biochim. et biophys. acta. 1969. V. 181. № 7. P. 93—104.
10. Bolotina I. A., Chechov V. O., Lugauskas V.//Int. J. Quant. Chem. 1979. V. 16. P. 816—824.
11. Савельвольф Г. Б., Сисенко В. И.//Острая и хроническая стрептококковая инфекция. Л.: Медицина, 1967. С. 106—115.
12. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Вотяков В. И.//Вопр. мед. химии. 1987. Т. 33. № 1. С. 84—87.
13. Bradford M. M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
14. Kirschenbaum D. M.//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. Holbrook J. J., Ingram V. A.//Biochem. J. 1973. V. 131. P. 729—738.
17. Лосева Л. П., Бендианишвили М. В., Шатилов В. Р., Шубин В. В., Кретович В. Л.//Биохимия. 1986. Т. 51. № 5. С. 840—848.
18. 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.
19. Miles E. W.//Methods Enzymol. 1977. V. 47. P. 431—442.
20. Feeney R. E., Yamasaki K. B., Geoghegan R. F.//Adv. in Chem. Ser.: Modification of Proteins. 1982. P. 3—55.
21. Buck F. F., Hummel B. C., DeRenzo E. C.//J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 13. P. 3648—3654.
22. Буриштейн Э. А.//Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 7. М.: ВИНТИ, 1977.
23. DeRenzo E. C., Boggiano E., Barg W. F., Buck F. F.//J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 10. P. 2428—2434.
24. Лосева Л. П., Бендианишвили М. В., Шатилов В. Р., Кретович В. Л.//Биохимия. 1985. Т. 50. № 12. С. 2016—2022.

Белорусский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии  
Минздрава БССР, Минск

Поступила в редакцию  
14.02.89  
После доработки  
12.07.89

V. N. NIKANDROV, O. A. KAZYUCHITS, G. S. YANKOVSKAYA

**STUDY OF THE ROLE OF HISTIDINE RESIDUES  
IN THE STREPTOKINASE MOLECULE USING MODIFICATION  
WITH DIETHYLPYROCARBONATE**

*Byelorussian Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk*

*Key words:* streptokinase, histidine residues, inactivation, protein structure.

The interaction of streptokinase with diethylpyrocarbonate resulting in partial inactivation of the protein was studied. Eight histidine residues are blocked per streptokinase molecule by this reagent. Ethoxyformylation of streptokinase histidyls is characterized by a rate constant corresponding to modification of free L-histidine. No reactivation of streptokinase was achieved by treatment of the modified protein with hydroxylamine. The CD spectroscopy data suggest that the residues modified by diethylpyrocarbonate are of no consequence for the stabilization of the protein secondary structure. The specificity of modification of streptokinase histidine residues by diethylpyrocarbonate is discussed. Based on the gel chromatography data, it was assumed that partial inactivation of streptokinase depends on the formation of protein oligomers with a decreased activatory function.