

УДК 577.152.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОСТАТКОВ ТРИПТОФАНА В МОЛЕКУЛЕ СРЕПТОКИНАЗЫ МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

НИКАНДРОВ В. Н., КАЗЮЧИЦ О. А.

Инкубация стрептокиназы в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер, pH 8,5; приводит к окислению остатков триптофана, регистрируемому по изменению спектров поглощения и триптофановой флуоресценции. За 3 ч происходит полное окисление остатков триптофана в белке, число остатков равно четырем. Наиболее легко окисляется первый остаток триптофана, при этом активность стрептокиназы падает на 50%. Модификация еще одного остатка приводит к полной инактивации стрептокиназы. Значения констант скорости окисления первого, двух первых, а также третьего и четвертого остатков триптофана в молекуле стрептокиназы равны соответственно  $1,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $1,1 \cdot 10^{-2}$  и  $0,5 \cdot 10^{-2}$  мин<sup>-1</sup>. Полное окисление остатков триптофана ведет к утрате способности стрептокиназы образовывать устойчивые эквимольные комплексы с плазминогеном человека, однако не вызывает, судя по спектрам КД, разрушения вторичной структуры. Обсуждаются вопросы специфичности окисления остатков триптофана в белке. Сделано заключение о важности легко окисляемых остатков триптофана для функции стрептокиназы.

Стрептокиназа — синтезируемый рядом  $\beta$ -гемолитических стрептококков белок — является одним из наиболее эффективных активаторов плазминогена. До сих пор механизм ее активаторной функции, и в частности, функциональные группы изучены недостаточно. В отношении функциональных групп имеются лишь фрагментарные сведения. Так, показано, что модификация одного триптофанового остатка 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом приводит к утрате 50% активности стрептокиназы, но не препятствует формированию ее стехиометрического комплекса с плазминогеном человека [1]. Модификация второго остатка триптофана не приводит к дополнительным изменениям функции.

Ранее нами [2] при исследовании состояния остатков триптофана в молекуле стрептокиназы из стрептококка штамма Н46А было выявлено наличие четырех триптофановых остатков, локализованных в несущих положительный заряд «карманах» поверхности молекулы. Исследование их состояния в зависимости от pH, ионной силы раствора, присутствия декстрана позволило предположить, что остатки триптофана гетерогенны по микроокружению [3]. Однако роль каждого из остатков для функции стрептокиназы и сохранения нативной структуры оставалась неясной.

В связи с изложенным настоящая статья посвящена исследованию активаторной функции стрептокиназы, а также ее конформационных особенностей при модификации остатков триптофана перекисью водорода. Учитывая полное отсутствие в стрептокиназе сульфгидрильных групп и дисульфидных связей [4], указанный прием является в данном случае достаточно специфичным и в то же время «мягким» приемом модификации триптофановых остатков [5].

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Стрептокиназу выделяли из культуральной жидкости, полученной в экспоненциальной фазе роста  $\beta$ -гемолитического стрептококка штамма Н46А в режиме pH-статирования на питательной среде сложного состава [6]. В ряде случаев стрептокиназу выделяли также из отечественного коммерческого препарата — целназы.

Очистка стрептокиназы из культуральной жидкости проведена путем сорбции на двуокиси кремния с элюированием 0,1 М раствором карбоната натрия, последующей

хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе в хлоридной форме в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,4, с элюированием 0,3 М раствором хлорида натрия, осаждениями этанолом при рН 5,0 и хлоридом натрия в конечной концентрации 10% при рН 2,0 [7]. Коммерческий препарат стрептокиназы (целиазу) дополнительно очищали переосаждением 10%-ным хлоридом натрия при рН 2,0 и последующей хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50 в 0,1 М трис-НСI-буфере, рН 6,8, с элюированием 0,15 М раствором хлорида натрия.

Полученные образцы стрептокиназы были гомогенны при электрофорезе в 12,5%-ном полиакриламидном геле в присутствии DS-Na и имели удельную активность 50 000 международных ед/мг белка.

Очистка плазминогена из обогащенной  $\beta$ -глобулинами фракции плазмы крови человека проведена методом аффинной хроматографии на лизин-сефарозе [8, 9]. Полученные образцы при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na характеризовались наличием трех белковых полос: основная (80%) с молекулярной массой 83 кДа соответствовала плазминогену и две фракции с молекулярными массами соответственно 72 (плазмин) и 8—10 кДа (продукты частичного протеолиза плазминогена). Активность полученных образцов, которую определяли казеинолитическим методом после активации стрептокиназой [10], соответствовала 14 казеинолитических ед/мг белка.

Модификацию триптофановых остатков проводили в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — 0,5 М бикарбонатный буфер, рН 8,5 [5]. Концентрация диоксана составляла 10%, концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  — 2—20 мМ. Стрептокиназу (0,6 мг) инкубировали в указанной системе при температуре 4°. Через определенные интервалы времени регистрировали УФ-спектры и отбирали аликвоты для определения активности стрептокиназы. Расчет количества окисленных остатков триптофана вели, используя коэффициент  $\Delta\epsilon = 3,49 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [5]. Кроме того, модификацию стрептокиназы проводили смесью  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ) — диоксан — 0,5 М ацетатный буфер, рН 2,8. Отделение белка от низкомолекулярных компонентов после модификации проводили на колонке размером  $1 \times 10 \text{ cm}$  с сефадексом G-25 в 0,06 М фосфатном буфере, рН 7,4.

При модификации отдельных аминокислот (L-триптофана, L-тирозина, DL-метионина) их инкубировали в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — 0,5 М бикарбонатный буфер, рН 8,5, при температуре 4, 20 и 25°.

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

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Fica-55 при возбуждении светом с длиной волны 296 нм (возбуждаются только остатки триптофана) и 280 нм (возбуждаются остатки триптофана и тирозина).

Спектры кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре J-20 в интервале длин волн 205—240 нм при концентрации белка 0,2—0,5 мг/мл в кюветах с толщиной слоя 0,1 см и 0,1 мм при чувствительности прибора  $0,005^\circ/\text{cm}$  и скорости сканирования 0,04 нм/с. Значения молярной эллиптичности рассчитывали, принимая среднюю массу аминокислотного остатка равной 133,6, исходя из данных аминокислотного состава стрептокиназы [4]. Прибор калибровали по D-пенталактону и цианкобаламину.

Образование эквимоллярных комплексов стрептокиназы и плазминогена учитывали при концентрации белков  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200 [11, 12] размером  $0,5 \times 80 \text{ cm}$  в 0,01 М трис-НСI-буфере, рН 8,0, содержащем 0,1 М L-лизина, при скорости элюирования 3 мл/ч и объеме фракций 0,5 мл.

Активность стрептокиназы определяли методом лизиса суспензий или пластин из человеческого фибрина, содержащего плазминоген [13, 14]. Для построения калибровочных графиков использовали международный стандарт «стрептокиназа-стрептодорназа» (Лондон, ВОЗ). При определении активности стрептокиназы методом лизиса фибриновых пластин расхождения в параллельных исследованиях не превышали 7%.

Концентрацию белка определяли колориметрически по Бредфорд [15], а также по величине абсорбции при 280 нм, используя значения коэффициента  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  для стрептокиназы и плазминогена соответственно 9,0 и 17,1 [16, 17].

Концентрацию аминокислот в экспериментах по окислению L-триптофана и L-тирозина оценивали по абсорбции при 280 нм, используя значения коэффициентов молярной экстинкции соответственно 5600 и  $1040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [18]. Концентрацию метионина определяли колориметрическим методом по реакции с нитропруссидом [19].

Электрофорез проводили в 12,5% полиакриламидном геле с DS-Na при температуре 4° в течение 16 ч в режиме  $40 \text{ V} \times 20 \text{ mA}$  [20].

Все эксперименты выполнены не менее чем трехкратно.

В работе использовали сефадексы G-25, G-200, BrCN-сефарозу, ДЭАЭ-сефадекса А-50 («Pharmacia», Швеция), дитиозиритол («Sigma», США), DS-Na («Koch-Light», Англия), кумасси G-250 («Serva», ФРГ), L-триптофан, L-тирозин, DL-метионин, L-цистеин хлоридрат, L-лизин хлоридрат, ДЭАЭ-целлюлозу, реагенты для полиакриламидного геля («Reanal», Венгрия). Остальные реактивы были отечественного производства марок ос. ч., х. ч. или ч. д. а. Их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Модификация отдельных аминокислот.** Литературные данные [5] свидетельствуют о высокой избирательности системы  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер по отношению к остаткам триптофана при обра-

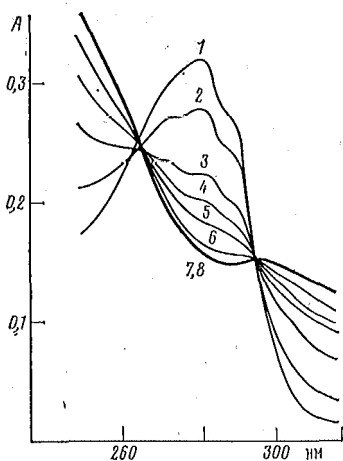


Рис. 1

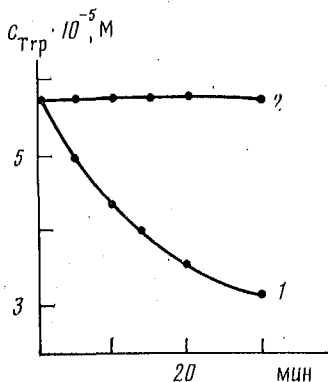


Рис. 2

Рис. 1. Изменения спектра поглощения L-триптофана при окислении его в системе:  $H_2O_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер. Спектры аминокислоты до окисления (1) и через 5 мин (2), 14 мин (3), 20 мин (4), 30 мин (5), 45 мин (6), 50 мин (7), 60 мин (8) после начала окисления. Температура среды  $20^\circ$ , концентрация триптофана —  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $H_2O_2$  —  $2 \cdot 10^{-3}$  М

Рис. 2. Кинетика окисления триптофана системой  $H_2O_2$  — диоксан в 0,5 М бикарбонатном (1) или 0,5 М боратном (2) буфере, pH 8,6. Температура системы  $25^\circ$ , концентрация триптофана —  $5,75 \cdot 10^{-5}$ ,  $H_2O_2$  —  $2 \cdot 10^{-3}$  М

ботке ряда белков. Остальные аминокислотные остатки при этом не модифицируются. Указанный прием был использован при модификации лизоцима,  $\alpha$ -химотрипсиногена,  $\alpha$ -химотрипсина, трипсиногена и трипсина.

Однако следует полагать, что в зависимости от структурной специфики конкретного белка условия модификации триптофановых остатков могут значительно отличаться от описанных авторами метода [5]. В этой связи мы прежде всего дополнительно изучили возможности модификации аминокислот L-триптофана, L-тирозина и D, L-метионина в широком диапазоне условий.

Добавление к системе  $H_2O_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер L-триптофана вызвало постепенное изменение спектра абсорбции аминокислоты с уменьшением поглощения при 280 нм (рис. 1). Исследование динамики изменения спектров позволило выявить образование изобеситических точек при 267 и 295 нм. Это может свидетельствовать о постепенном окислении триптофана с образованием двух продуктов. При температуре  $20^\circ$  изменения спектров абсорбции продолжались в течение 60 мин, дальнейших сдвигов не наблюдалось. Исследование кинети-

Константы скорости окисления L-триптофана и D, L-метионина в системе  $H_2O_2$  — диоксан — 0,5 М бикарбонатный буфер, pH 8,5

Условия эксперимента		Температура, $^\circ C$	Порядок реакции по аминокислоте	Константа скорости $k$ , мин $^{-1}$
Начальная концентрация аминокислоты, М	Начальная концентрация $H_2O_2$ , мМ			
Триптофан				
$5,75 \cdot 10^{-5}$	2,0	20	1	$2,5 \cdot 10^{-2}$
$5,60 \cdot 10^{-5}$	20,0	20	1	$4,0 \cdot 10^{-2}$
$4,05 \cdot 10^{-5}$	2,0	4	1	$2,4 \cdot 10^{-2}$
Метионин				
$14,5 \cdot 10^{-3}$	9,0	20	1	$1,9 \cdot 10^{-2}$
$1,7 \cdot 10^{-3}$	9,0	4	1	$7,5 \cdot 10^{-3}$
$4,2 \cdot 10^{-3}$	9,0	4	1	$4,0 \cdot 10^{-2}$
$4,2 \cdot 10^{-3}$	2,2	4	1	$7,5 \cdot 10^{-3}$

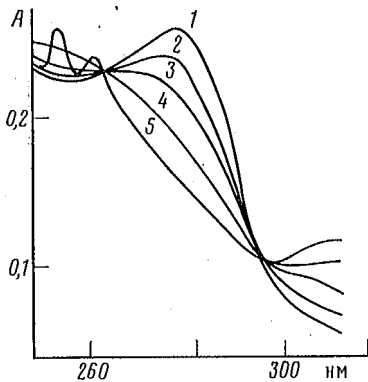


Рис. 3

Рис. 3. Динамика спектров абсорбции стрептокиназы в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер. Спектры белка до окисления (1) и через 8 мин (2), 50 мин (3), 150 мин (4), 180 мин (5) после начала окисления. Температура системы  $4^\circ$ , концентрация стрептокиназы —  $5,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  —  $6,5 \cdot 10^{-3}$  М

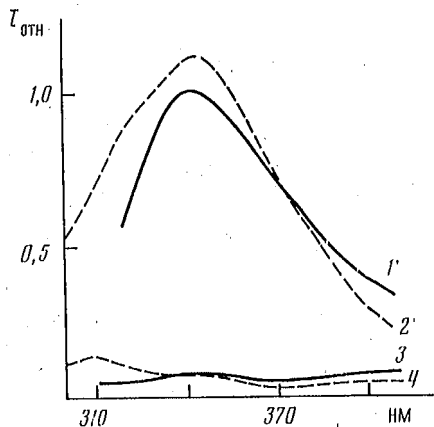


Рис. 4

Рис. 4. Спектры флуоресценции нативной (1, 2) и модифицированной окислением в течение 3 ч в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер (3, 4) стрептокиназы при возбуждении флуоресценции при 296 (1, 3) и 280 нм (2, 4). Концентрация белка — 1 мг/мл, растворитель — 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4

ки окисления L-триптофана показало, что реакция соответствует кинетике первого порядка, в избранном диапазоне температур константа скорости практически мало зависела от температуры (таблица). В отсутствие  $\text{H}_2\text{O}_2$  или при замене бикарбонатного буфера 0,5 М боратным (рис. 2) даже при продолжительной инкубации L-триптофана его модификации не происходило.

Инкубация в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер L-тирозина при температуре 4 или  $10^\circ$  не вызвала изменений спектров абсорбции аминокислоты, что свидетельствует об отсутствии модификации тирозина. Это дает основания считать, что при модификации в указанной системе стрептокиназы окисление остатков тирозина не происходит. Такой вывод согласуется с данными литературы [5].

В то же время инкубация в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер D, L-метионина вызывает окисление его со скоростью окисления, сопоставимой с таковой L-триптофана (см. таблицу). Однако, как показано ниже, если при окислении стрептокиназы в указанной системе и происходит модификация остатков метионина, то это не отражается заметно на активности стрептокиназы и не вызывает разрушения вторичной структуры.

В целом же полученные результаты позволили подобрать следующие условия для окисления остатков L-триптофана в стрептокиназе: концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  — 3—10 мМ, температура —  $4^\circ$ , бикарбонатный буфер, pH 8,5.

**Модификация стрептокиназы.** В избранных нами для окисления триптофана условиях инкубация стрептокиназы в смеси  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер вызывает изменения УФ-спектров с уменьшением абсорбции при 280 нм и появлением изобестических точек при 263 и 297 нм (рис. 3). Исследование остатков триптофана методом собственной триптофановой флуоресценции белка показало, что за 3 ч в молекуле стрептокиназы происходит полное разрушение всех остатков триптофана (рис. 4). Однако одновременно практически полностью исчезает спектр флуоресценции белка при возбуждении светом с длиной волны 280 нм. Это, по-видимому, не означает, что происходит модификация остатков тирозина. Как видно из приведенных спектров (рис. 4), тирозиновая компонента флуоресценции у стрептокиназы невелика. Это согласуется с низким квантовым выходом флуоресценции тирозиновых

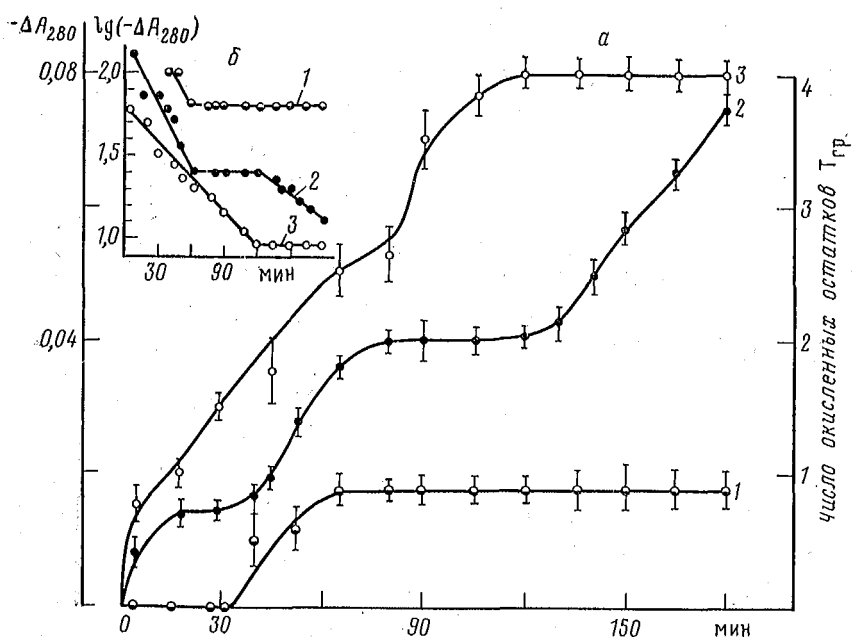


Рис. 5. Кинетика окисления остатков триптофана молекулы стрептокиназы в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер (а) и исследование кинетики в полулогарифмических координатах (б). Температура системы  $4^\circ$ , концентрация стрептокиназы —  $6,0 \cdot 10^{-6}$  М, концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $3 \cdot 10^{-3}$  М (1),  $5 \cdot 10^{-3}$  М (2),  $6 \cdot 10^{-3}$  М (3)

остатков в белках, особенно при локализации данных хромофоров вблизи заряженных групп [21]. Ранее нами было показано, что все остатки тирозина у стрептокиназы расположены на поверхности глобулы вблизи заряженных групп [2]. Поэтому исчезновение спектров флуоресценции стрептокиназы при возбуждении светом с длиной волны и 296 и 280 нм, вероятно, свидетельствует о том, что после модификации триптофановых остатков изменяется конформация белка и в том числе окружение тирозиновых остатков.

Таким образом, учитывая максимальные изменения спектра поглощения стрептокиназы под действием системы  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер и принимая значение коэффициента молярной экстинкции модифицированных триптофанов  $2110 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (рассчитан из коэффициента молярной экстинкции триптофана  $5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [18] и  $\Delta \varepsilon = 3490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при его окислении [5]), мы нашли число модифицированных остатков. Оно равно четырем, что совпадает с данными спектроскопии [2].

Исследования кинетики изменений полосы поглощения 280 нм УФ-спектров стрептокиназы при инкубации ее в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер, содержащей разные концентрации перекиси водорода, позволили заключить, что четыре триптофановых остатка стрептокиназы неодинаковы по окисляемости (рис. 5). Особенно четко это проявляется при концентрации  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 мМ, когда можно выделить три стадии модификации триптофана. Быстрой модификации подвергается один остаток, остальные три — более устойчивы. При более низкой концентрации перекиси водорода (3 мМ) окислялся лишь первый остаток триптофана на молекулу стрептокиназы, а при более высокой — окисление триптофанов идет быстро и различия между ними сглаживаются.

Анализ кинетики модификации остатков триптофана в координатах  $\text{lg}(\Delta A_{280}) - t$  позволяет предположить, что процесс окисления сложен и состоит по крайней мере из двух реакций, подчиняющихся кинетике первого порядка (рис. 5). Исходя из полученных данных, мы рассчитали, что константа скорости окисления первого остатка триптофана ( $\text{H}_2\text{O}_2 = 3 \text{ мМ}$ ) равна  $1,5 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ , константа скорости окисления пер-

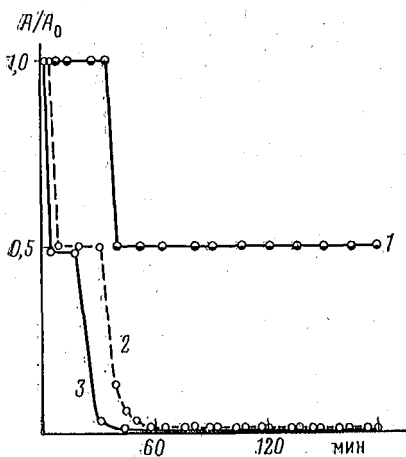


Рис. 6

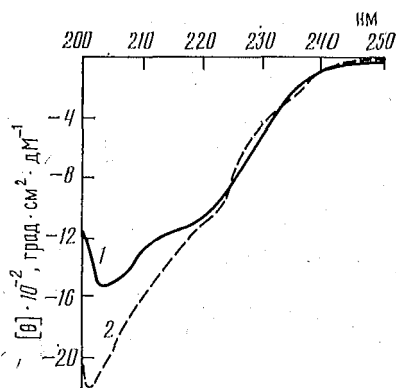


Рис. 8

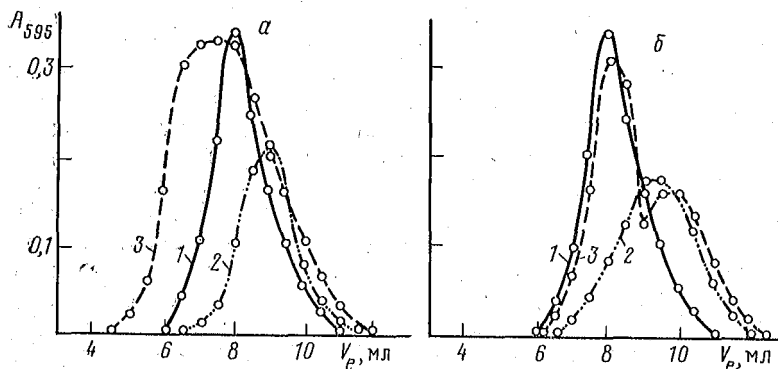


Рис. 7

Рис. 6. Кинетика инактивации стрептокиназы при ее окислении в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер. Условия опыта и обозначения те же, что на рис. 5

Рис. 7. Гель-хроматография стрептокиназы, плазминогена человека и их эквимольной смеси на колонке с сефадексом G-200 в 0,01 M трис-HCl-буфере, pH 8,0, содержащем 0,1 M L-лизина: при использовании нативной стрептокиназы (а) или модифицированной стрептокиназы (б). 1 — плазминоген, 2 — стрептокиназа; 3 — смесь плазминогена со стрептокиназой

Рис. 8. Спектры кругового дихроизма нативной (1) и модифицированной в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер стрептокиназы (2). Растворитель — 0,06 M фосфатный буфер, pH 7,4

вых двух остатков —  $1,1 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ , а третьего и четвертого ( $\text{H}_2\text{O}_2 = 5 \text{ мМ}$ ) —  $0,5 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ . При этом модификация уже первого остатка триптофана приводит к утрате 50% активаторной функции стрептокиназы (рис. 6). Это согласуется с ранее полученными данными по модификации стрептокиназы с помощью 2-гидрокси-5-нитробензилбромида [1]. Однако мы установили, что модификация еще одного остатка триптофана ведет к полной утрате активности стрептокиназы, что отличается от ранее полученных данных [1]. В связи с этим возник вопрос о том, не происходит ли при окислении стрептокиназы в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  — диоксан — бикарбонатный буфер модификация еще и остатков метионина. Как было показано нами выше, такая возможность реально существует.

Однако окисление стрептокиназы в системе  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 мМ) — диоксан — 0,2 M ацетатный буфер, pH 2,8 (в этих условиях тиоэфирная группа остатка метионина сохраняет реакционную способность, а индольная группа триптофана не сохраняет [22]), на протяжении 2,5 ч не приводит к каким-либо существенным изменениям спектров поглощения белка и не вызывает изменений активности, несмотря на то что кон-

центрация перекиси водорода на порядок выше используемой для модификации триптофановых остатков в белке в бикарбонатном буфере. Таким образом, окисление стрептокиназы в бикарбонатном буфере не исключает той возможности, что при этом происходит наряду с модификацией триптофана модификация и метиониновых остатков. Однако можно думать, что, если таковая и происходит, то это практически не отражается на активности стрептокиназы.

Оценка способности стрептокиназы к образованию эквимольных комплексов с плазминогеном человека показала, что при нанесении на колонку с сефадексом G-200 смеси нативной стрептокиназы с плазминогеном белковый пик элюируется быстрее, чем индивидуальные белки (рис. 7). Это свидетельствует о том, что нативная стрептокиназа образует комплекс с плазминогеном. При элюировании же смеси модифицированной стрептокиназы с плазминогеном наблюдались два неполностью разрешенных пика белка (рис. 7), по-видимому, соответствующих индивидуальным компонентам смеси. Поэтому можно полагать, что стрептокиназа, у которой модифицированы все остатки триптофана, не способна образовывать устойчивый комплекс с плазминогеном.

Судя по характеру спектров КД в пептидной области (рис. 8), заметных нарушений вторичной структуры стрептокиназы после окисления остатков триптофана не происходит: значения молярной эллиптичности нативного и модифицированного белков при  $\lambda \geq 220$  нм практически равны. Различия же спектров в диапазоне 205—220 нм, по нашему мнению, не свидетельствуют о нарушениях вторичной структуры. Известно, что хромофорные группы белка способны вносить вклад в спектры КД в дальней ультрафиолетовой области [23]. При этом вклад триптофана может обусловить повышение значений молярной эллиптичности в рассматриваемой части спектра. Можно полагать, что обнаруженные изменения спектров КД после модификации стрептокиназы обусловлены «снятием» вклада триптофановых остатков.

Полученные данные подтверждают существенную роль триптофановых остатков в реализации активаторной функции стрептокиназы. По-видимому, функциональную нагрузку несут лишь два легко окисляемых остатка. Однако это не означает, что именно триптофановые остатки формируют специфические центры взаимодействия с плазминогеном. Вполне возможно, что при модификации триптофановых остатков происходят локальные изменения молекулы, смещения соседних остатков, непосредственно играющих функциональную роль.

Авторы выражают благодарность Г. С. Янковской за помощь при записи спектров кругового дихроизма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Buck F. F., Boggiano E. // *J. Biol. Chem.* 1971. V. 246. № 7. P. 2091—2096.
2. Никандров В. Н., Воробьева Г. В. // *Изв. АН БССР. Сер. биол. наук.* 1984. № 5. С. 74—78.
3. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Пыжова Н. С. и др. // *V Всесоюз. биохимический съезд. Тез. стендовых сообщений.* Т. 2. М.: Наука, 1986. С. 14—15.
4. Morgan F., Henschen A. // *Biochim. et biophys. acta.* 1969. V. 181. № 7. P. 93—104.
5. Nachimori Yu., Horinishi H., Kurthara K., Shibata K. // *Biochim. et biophys. acta.* 1964. V. 93. P. 346—360.
6. Давыдова Г. С., Рытик П. Г., Шатило Н. Л. // *Стрептокиназа в регуляции свертывающей и противосвертывающей систем крови.* Минск, 1985. С. 58—64.
7. Никандров В. Н., Судник Ю. М., Вояков В. И. // *Докл. АН СССР.* 1986. Т. 287. № 3. С. 751—755.
8. Deutch D. J., Mertz E. T. // *Science.* 1970. V. 170. № 3962. P. 1095—1096.
9. Самойлова Н. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В., Кудинов С. А. // *VI Всесоюз. симпоз. Синтетические полимеры медицинского назначения. Тез. докл. Алма-Ата.* 1983. С. 189—190.
10. Robbins K. C., Summaria L. // *Methods Enzymol.* New York—London, 1970. V. 19. P. 184—186.
11. De Renzo E. C., Boggiano E., Barg W. F., Buck F. F. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. № 10. P. 2428—2434.
12. *Sephadex: Gel filtration in theory and practice.* Sweden: Pharmacia Fine Chemicals, 1975. 64 p.

13. Савельвольф Г. Б., Сисенко В. И.//Острая и хроническая стрептококковая инфекция. Л.: Медицина, 1967. С. 106—115.
14. Андреевко Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М.: Изд-во МГУ, 1981. 132 с.
15. Bradford M. M.//Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248—254.
16. Kirschenbaum D. M.//Anal. Biochem. 1975. V. 68. P. 465—484.
17. Роббинз К. К., Маркус Г.//Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции. М.: Медицина, 1982. С. 69—84.
18. Бурштейн Э. А.//Люминесценция белковых хромофоров. Итоги науки и техники. Биофизика. М.: Изд-во ВИНТИ, 1976. Т. 6. 216 с.
19. Гарлак Н. М., Полунов В. С., Дуксина В. В., Коваленко С. П.//Микробы и их метаболиты. Минск: Наука и техника, 1974. С. 130—133.
20. Weber K., Osborn M.//J. Biol. Chem. 1969. V. 244. P. 4406—4411.
21. Бурштейн Э. А.//Собственная люминесценция белка. Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 7. М.: Изд-во ВИНТИ, 1977. 189 с.
22. Торчинский Ю. М.//Успехи совр. биологии. 1976. Т. 82. № 3. С. 323—387.
23. Болотина И. А., Лугаускас В. Ю.//Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. № 5. С. 1409—1421.

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

Поступила в редакцию  
11.III 1987

## STUDY OF THE ROLE OF TRYPTOPHAN RESIDUES IN THE STREPTOKINASE MOLECULE, USING THE CHEMICAL MODIFICATION METHOD

NIKANDROV V. N., KAZYUCHITS O. A.

*Byelorussian Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk*

Incubation of streptokinase in an  $H_2O_2$ -dioxane-bicarbonate buffer (pH 8.5) system leads to the oxidation of tryptophan residues as can be evidenced from the changes in absorption and tryptophan fluorescence spectra. A complete oxidation of tryptophan residues of the protein takes place within 3 hours, the number of the residues is 4. The first tryptophanyl of the protein is oxidized the most easily; the activity of streptokinase decreases thereby by 50%. Modification of the second residue leads to complete inactivation of streptokinase. The rate constants for the oxidation of the first, of the two first and of the third plus fourth tryptophanyles are equal to  $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ,  $1.1 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  and  $0.5 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ , respectively. The complete oxidation of tryptophan residues is concomitant with the inability of streptokinase to form stable equimolar complexes with human plasminogen, but in does not result (as can be judged from the CD spectroscopy data) in the breakdown of the protein secondary structure. The specificity of oxidation of the protein tryptophan residues is discussed. The importance of readily oxidized tryptophan residues for the streptokinase function is postulated.