

ТОМ 37

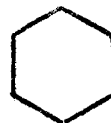
ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. А. ТУТЕЛЬЯН (зам. редактора), А. И. АРЧАКОВ, И. П. АШМАРИН, Т. Т. БЕРЕЗОВ,
Ю. В. БУКИН, А. В. ВАСИЛЬЕВ, Е. Н. ГЕРАСИМОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗЕАР-
СКИЙ, В. Л. КОЗЕЛЬЦЕВ (ответственный секретарь), А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВ-
КИН, Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Ю. А. РОМАКОВ, В. А. САКС, С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ, Е. А. СТРОЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТУРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛД Л. Я. (Тарту)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)



О. А. Казючиц, В. Н. Никандров

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП СТРЕПТОКИНАЗЫ В СИСТЕМЕ ВОДОРАСТВОРИМЫЙ КАРБОДИИМИД — НУКЛЕОФИЛ

Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск

Исследование структурно-функциональной специфики стрептокиназы — активатора плазминогена микробного происхождения — важно как для понимания механизма специфического функционирования этого белка, так и для конструирования на его основе новых препаратов и лекарственных форм.

Известно, что плазминоген, фенильные радикалы тирозилов которого подверглись нитрованию, утрачивают способность образовывать комплекс со стрептокиназой [25]. Это послужило основанием считать, что в образовании связи с зимогеном при белок-белковом взаимодействии вовлекаются свободные карбоксильные группы стрептокиназы [4, 25].

Поэтому мы считали необходимым исследовать роль свободных карбоксильных групп в молекуле стрептокиназы с помощью химической модификации. В настоящей статье отражены результаты изучения конформационных особенностей и активаторной функции стрептокиназы при ее химической модификации в системе с 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (ЭДК) и этилендиамином. При этом мы учитывали, что активацию карбоксильных групп карбодимидом и последующую реакцию с нуклеофилом [22] широко используют для их быстрой модификации в мягких условиях.

Методика. Стрептокиназу выделяли из коммерческого препарата целназы осаждением хлоридом натрия, хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе А-50, на голубой сефарозе CL-6B и на сефадексе G-100 [6, 7]. Полученные образцы были гомогенны при электрофорезе в 12,5 % полиакриламидном геле, содержащем 0,1 % додецилсульфата натрия, и имели удельную активность 100 000 МЕ на 1 мг белка. Плазминоген выделяли из фракции β -глобулинов плазмы крови человека аффинной хроматографией на лизин-сефарозе [18]. Полученные образцы содержали до 20 % свободного плазмина. Их активность, которую определяли казеинолитическим методом после активации стрептокиназой [28], соответствовала 17 казеинолитическим единицам на 1 мг белка.

Модификацию свободных карбоксильных групп проводили в 0,06 М калий-натрий-фосфатном буфере pH 5,35 при 20 °C в течение 0,5—4 ч 0,25 М этилендиамином в присутствии 5 мМ ЭДК [2], поддерживая постоянное значение pH с помощью 1 М HCl; избыток ЭДК дезактивировали эквивалентным количеством 2 М ацетата натрия. После обессоливания на колонке с сефадексом G-25 определяли активность стрептокиназы, как описано ниже, а также количество первичных аминогрупп в белке по цветной реакции с тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС) [20, 21]. О числе модифицированных карбоксильных групп судили по приросту первичных аминогрупп.

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

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлюориметре «Fica-55» при монохроматическом возбуждении 296 нм.

Спектры кругового дихроизма (КД) записывали на спектрополяриметре 1-20 в интервале длин волн 200—250 и 250—350 нм, как подробно описано ранее [6, 7].

Значения молярной эллиптичности рассчитывали, принимая среднюю массу аминокислотного остатка равной 133,6, исходя из данных аминокислотного состава стрептокиназы [24].

Расчет относительной доли элементов вторичной структуры вели по 5 реперным спектрам [15] на ЭВМ СМ 1420.01.

Термоинактивацию стрептокиназы и ее модифицированных производных изучали при 50, 80 и 100 °С в 0,06 М фосфатном буфере рН 7,4 при концентрации белка $5 \cdot 10^{-6}$ М. Константы термоинактивации (γ) и время полужизни ($t_{1/2}$) рассчитывали, как описано в работе [3].

Образование устойчивых комплексов стрептокиназы и человеческого плазминогена исследовали гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-200 [17], как описано ранее [6, 7].

Активность стрептокиназы определяли методом лизиса пластин и сгустков из человеческого фибрина, содержащего плазминоген [8, 10]. Расчет активности вели по международному стандарту «стрептокиназа, — стрептодорназа» (Лондон, ВОЗ).

Концентрацию белка определяли колориметрически [16], а также по величине абсорбции при 280 нм, используя значения коэффициента $A_{1\%}^{1\text{см}}$ для стрептокиназы и плазминогена соответственно 9,0 и 17,1 [9, 23].

Электрофорез в 12,5 % полиакриламидном геле, содержащем 0,1 % додецилсульфата натрия, проводили, как описано ранее [7].

В работе использовали сефадексы G-25, G-100, G-200, ДЭАЭ-сефадекс А-50, ВгСN-сефарозу и голубую сефарозу СL-6В («Pharmacia», Швеция), кумасси бриллиантовый голубой G-250, D-пантолактон, D-10-камфорсульфоновую кислоту, 2,4,6-тринитробензолсульфоновую кислоту («Serva», ФРГ), ЭДК («Bio-Rad», США), додецилсульфат натрия («Koch-Light», Великобритания), L-лизин гидрохлорид, L-триптофан, D,L-тирозин, 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 обсуждение. При инкубации стрептокиназы в системе, содержащей 5 мМ ЭДК и 250 мМ этилендиамина рН 5,35, происходило снижение ее специфической активности (рис. 1). Константа инактивации при определении функции стрептокиназы по лизису фибриновых пластин (время реакции лизиса 18 ч) равна

$8,3 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$; за 4 ч взаимодействия с химическими реагентами терялось до половины специфической активности белка.

Константа инактивации стрептокиназы при определении активности последней по лизису фибриновых сгустков (время реакции лизиса 0,5 ч) составляла $1,7 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$; уже через 2 ч инкубации с ЭДК и этилендиамином наблюдалась полная инактивация белка. Такая же картина имела место при увеличении времени инкубации фибриновых сгустков до 18 ч.

Мы оценили число первичных аминогрупп стрептокиназы в процессе ее инкубации с ЭДК и этилендиамином по цветной реакции с ТНБС. Молекула нативной стрептокиназы содержит 32 свободные аминогруппы. Через 30 мин после добавления в реакционную смесь ЭДК число первичных аминогрупп снижается (до 24—25), а затем начинает возрастать, через 2 ч после начала инкубации превышая первоначальное значение. За 4 ч модификации число свободных аминогрупп увеличивается до 62. Итак, за 4 ч взаимодействия с химическими реагентами в молекуле стрептокиназы модифицируются $32 - 24 = 8$ свободных аминогрупп и $62 - 24 = 38$ свободных карбоксильных групп.

Сопоставляя кривые инактивации стрептокиназы и нарастание первичных аминогрупп белка в процессе химического взаимодействия, можно заключить, что свободные карбоксильные группы несущественны для проявления специфической активности стрептокиназы, а инактивация белка происходит из-за повреждения других функциональных групп стрептокиназы, возможно, имеющих существенное значение для ее специфического функционирования.

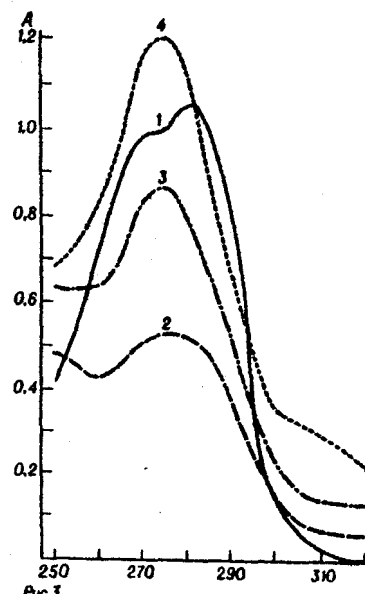
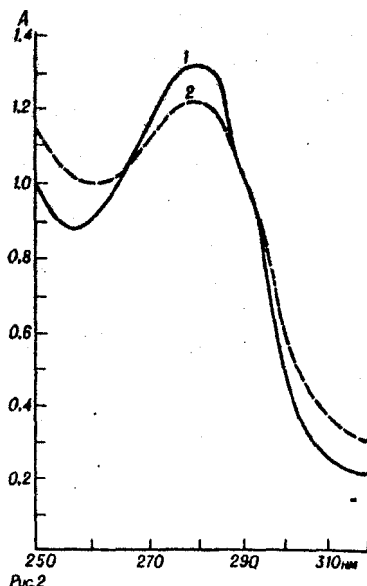
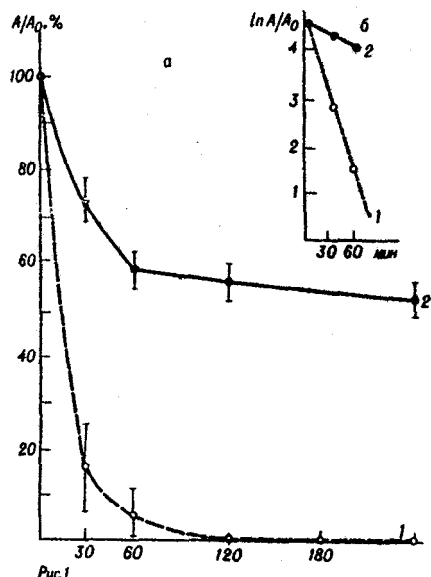


Рис. 1. Инактивация стрептокиназы ($5 \cdot 10^{-6}$ М) в процессе ее реакции с 5 мМ ЭДК и 250 мМ этилендиамином в 0,06 М фосфатном буфере рН 5,35 (а) и определение констант скорости в полулогарифмических координатах (б). Температура смеси 20 °С. По оси абсцисс — время (в мин). 1 — активность определена по лизису фибриновых сгустков; 2 — активность определена по лизису фибриновых пластин.

Рис. 2. Спектры абсорбции нативной (1) и модифицированной в системе ЭДК — этилендиамин (2) стрептокиназы. Здесь и на рис. 3 — по оси абсцисс — длина волны (в нм).

Рис. 3. УФ-спектры свободного L-триптофана ($1,9 \cdot 10^{-4}$ М) при инкубации его в системе ЭДК — этилендиамин. Условия опыта те же, что на рис. 1. 1 — время инкубации 0 мин, 2 — 10 мин, 3 — 30 мин, 4 — 60 мин.

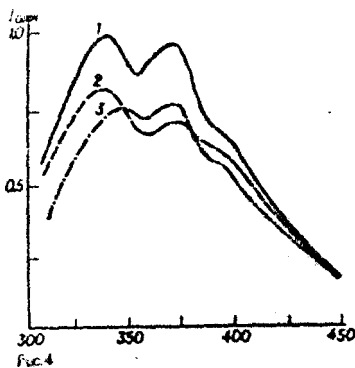


Рис. 4. Спектры триптофановой флуоресценции нативной (1) и модифицированной в системе ЭДК — этилендиамина (2, 3) стрептокиназы.

Концентрация белка 0,3—0,4 мг/мл, растворитель — 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4 (1, 2) и 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4 с добавлением 6 М мочевины (3).

Что касается свободных аминогрупп, то, как ранее нами было показано [26], модификация 8 из них хотя и сопровождается некоторым снижением активности стрептокиназы, но не отражается на способности белка образовывать устойчивый комплекс с плазминогеном.

Известно, что водорастворимые карбодимиды, помимо свободных карбоксильных и аминогрупп, образуют стабильные производные также с фенол-гидроксильными группами в белках [14, 19].

Образцы стрептокиназы, обработанные химическими реагентами, в отличие от нативного белка имеют более низкую абсорбцию при 260—280 нм, но сильнее поглощают в области 250—260 и 285—320 нм (рис. 2), что может свидетельствовать об изменении состояния ароматических аминокислот в молекуле белка [12].

В связи с этим нами были исследованы спектры абсорбции свободных тирозина и триптофана при инкубации их с этилендиамин и ЭДК. Практическая неизменность спектров поглощения D,L-тирозина свидетельствует об отсутствии модификации оксигруппы этой аминокислоты в избранных нами условиях. Модельные эксперименты со свободным L-триптофаном, напротив, показали, что, судя по характеру спектров абсорбции (рис. 3), в наших условиях протекает реакция между аминокислотой и компонентами системы ЭДК — этилендиамин, приводящая к снижению абсорбции триптофана.

При исследовании триптофановой флуоресценции нативной и модифицированной стрептокиназы как в исходном спектре (реакцию останавливали сразу после добавления ЭДК), так и после инкубации с реагентами наблюдали 2 полосы с максимумами при 338 нм (соответствует максимуму флуоресценции нативной стрептокиназы) и 370 нм (соответствует флуоресценции этилендиамина) (рис. 4). Интенсивность флуоресценции хромофоров остатков триптофана, модифицированного в системе белка, снижена. Добавление к модифицированному белку 6 М мочевины, т. е. создание условий, когда вторичная структура стрептокина-



Рис. 5. Спектры кругового дихроизма нативной (1) и модифицированной в течение 2 ч (2) и 4 ч (3) стрептокиназы в пептидной (а) и ароматической (б) области.

Растворитель — 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4.

зы нарушается [5], не приводит к возрастанию интенсивности триптофановой флуоресценции. Следует отметить, что снижение интенсивности флуоресценции даже у деструктурированного белка не может однозначно свидетельствовать о разрушении хромофоров [1].

В целом на основании результатов модельных экспериментов со свободными аминокислотами, УФ- и флуоресцентной спектроскопии можно сделать вывод о том, что состояние остатков триптофана стрептокиназы при модификации ее в системе ЭДК — этилендиамин изменяется. Об этом же свидетельствует и характер спектров КД нативного и модифицированного белка в ароматической области.

В частности, при модификации снижается интенсивность экстремумов при 286 и 292 нм (рис. 5), отражая уменьшение степени асимметрии окружения хромофорных групп остатков триптофана.

Как нами было показано ранее [6], триптофановые группы имеют существенное значение для проявления специфической активности стрептокиназы. При разрушении даже одной индольной группы активность белка (независимо от метода определения) снижается наполовину. Кроме того, такая стрептокиназа становится неустойчивой к действию повреждающих факторов, η ее на порядок превышает таковую нативного белка.

В этой связи мы изучили кинетику инактивации при температуре 50, 80 и 100 °C модифицированного смеси ЭДК — этилендиамин белка в сравнении с нативной стрептокиназой. Найденные значения η и $t_{1/2}$ нативного и модифицированного белка близки между собой (табл. 1). Этот факт косвенно свидетельствует о том, что остатки триптофана стрептокиназы не повреждаются в процессе вза-

Таблица 1

Значения η и $t_{1/2}$ нативной и модифицированной в течение 4 ч в системе ЭДК — этилендиамин стрептокиназы при различной температуре, °C

Исследуемый образец	50		80		100	
	η , мин ⁻¹	$t_{1/2}$, мин	η , мин ⁻¹	$t_{1/2}$, мин	η , мин ⁻¹	$t_{1/2}$, мин
Нативная стрептокиназа	0,9 · 10 ⁻³	770	5,8 · 10 ⁻³	119	1,5 · 10 ⁻²	46
Модифицированная стрептокиназа	1,3 · 10 ⁻³	533	5,0 · 10 ⁻³	139	1,5 · 10 ⁻²	46

Относительные доли элементов вторичной структуры стрептокиназы при химической модификации в системе ЭДК — этилендиамин ($n=3$)

Исследуемый образец	α -Спирали, %	β -Структуры, %		β -Изгибы, %	Неупорядоченная конформация, %
		антипараллельные	параллельные		
Стрептокиназа после 0 мин инкубации в системе	25,9±6,1	11,9±1,1	1,0±0,9	17,1±1,5	44,0±8,2
Стрептокиназа после 120 мин инкубации в системе	25,5±1,9	14,4±2,4	0	15,8±0,5	44,2±0,1
Стрептокиназа после 240 мин инкубации в системе	22,4±3,7	9,7±3,2	2,6±2,5	16,2±1,0	48,8±5,8

и взаимодействия белка с компонентами системы ЭДК — этилендиамин.

Для выяснения вопроса о том, с чем связано изменение состояния триптофанилов в молекуле стрептокиназы при взаимодействии последней с химическими реагентами, мы провели спектроскопию КД нативного и модифицированного белка в пептидной области. Показано, что абсолютная величина молярной эллиптичности стрептокиназы при модификации снижается (см. рис. 5). Рассчитанные на ЭВМ по реперным спектрам относительные доли элементов вторичной структуры стрептокиназы в процессе ее модификации приведены в табл. 2. Можно полагать, что у белка после 4 ч модификации несколько снижается доля α -спиралей и за счет этого возрастает доля неупорядоченной конформации.

Кроме того, профиль элюции с колонки, заполненной сефадексом G-200, модифицированной в системе ЭДК — этилендиамин стрептокиназы имеет иной вид, чем при нанесении на колонку нативного белка (рис. 6). Нативная стрептокиназа выходит с колонки симметричным пиком с максимумом, соответствующим величине кажущейся мол. м. 48 кДа. Максимум в профиле элюции модифицированной стрептокиназы соответствует кажущейся мол. м. 58 кДа, а плечо — мол. м. 25 кДа.

Таким образом, при инкубации в системе ЭДК — этилендиамин происходит изменение конформации стрептокиназного белка; при этом образуются две формы, отличающиеся от нативной стрептокиназы.

Анализируя данные литературы о механизмах действия пары карбодимид — нуклеофил на белки, можно выделить 3 возможные причины гетерогенности модифицированной стрептокиназы. Во-первых, такая гетерогенность может быть связана с различной реакционной способностью «погруженных» и «экспонированных» свободных карбоксильных групп [13, 27]. Во-вторых, гетерогенность модифицированного белка может быть результатом модификации свободных аминокетильных групп

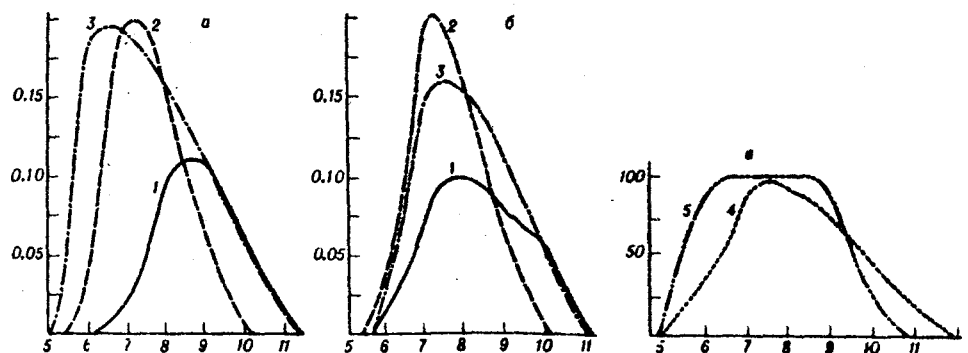
[14], что имеет место в нашем случае. Отметим, что модификация свободных аминокетильных групп стрептокиназы ТНБС приводит к снижению величины кажущейся мол. м. белка до 30 кДа. Наконец, в-третьих, считают [11], что при использовании бифункциональных реагентов нельзя исключить возможности внутри- и межмолекулярной сшивки белка.

При гель-хроматографии на сефадексе G-200 эквивалентной смеси нативной стрептокиназы с человеческим плазминогеном белковый пик выходил раньше, чем при нанесении на колонку индивидуальных белков (см. рис. 6). Это свидетельствует об образовании устойчивого комплекса стрептокиназа — плазминоген. Значение V_i кажущейся мол. м. комплекса составляет ~145 кДа, что близко к сумме молекулярных масс индивидуальных белков (кажущаяся мол. м. плазминогена равна 91 кДа, а стрептокиназы — 48 кДа). При использовании модифицированной стрептокиназы профиль элюции смеси отличался от профиля элюции комплекса стрептокиназа — плазминоген (см. рис. 6). Значение V_i в максимуме соответствовало V_i плазминогена, а V_i плеча соответствовало V_i модифицированной стрептокиназы. Таким образом, можно полагать, что после модификации в системе ЭДК — этилендиамин стрептокиназа утрачивает способность образовывать устойчивый комплекс с плазминогеном. Однако при этом сохраняется способность модифицированной стрептокиназы активировать зимоген (см. рис. 6).

Итак, в процессе инкубации стрептокиназы в системе ЭДК — этилендиамин происходит модификация до 38 свободных карбоксильных групп и до 8 свободных аминокетильных групп. При этом снижается специфическая активность стрептокиназы. Однако, по всей вероятности, свободные карбоксильные группы не играют существенной роли в проявлении функции белка. Модификация в системе ЭДК — этилендиамин приводит к изменению конформации стрептокиназы. При этом претерпевает изменение состояние остатков триптофана в

Рис. 6. Гель-хроматография стрептокиназы (1), плазминогена (2) и их эквимольной смеси (3) на колонке с сефадексом G-200 в 0,01 М трис-НСI буфере pH 8,0, содержащем 0,1 М L-лизин, при использовании нативной (а) или модифицированной (б, в) стрептокиназы.

По оси абсцисс — объем элюата (в мл); по осям ординат слева и в центре — оптическая плотность при 595 нм, справа — площадь зоны лизиса (в мм²).



молекуле белка. Модифицированная ЭДК и этилендиамином стрептокиназа утрачивает способность образовывать устойчивый комплекс с человеческим плазминогеном.

carbodiimide (EDC) — ethylene diamine. Under these conditions about 8 free amino groups and 38 free carboxylic groups were modified in the streptokinase molecule. The protein conformation and the state of tryptophane residues were altered. The streptokinase modified by means of EDC-ethylene diamine treatment lost its ability to form a stable complex with human plasminogen.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурыйтсйн Э. А. Собственная люминесценция белка: (Природа и применение). — М., 1977.
2. Галевиц С. Н., Гурьев О. Л., Шкуматов В. М. и др. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 2. — С. 198—213.
3. Кравцов В. В., Кравцов А. В., Капля А. А., Горшник В. П. // Укр. биохим. журн. — 1985. — Т. 57, № 6. — С. 23—28.
4. Никандров В. Н. // Энзимология тромболитика и стрептокиназа. — Минск, 1982. — С. 23—34.
5. Никандров В. Н., Воробьева Г. В., Янковская Г. С. и др. // Изв. АН БССР. Сер. биол. наук. — 1986. — № 6. — С. 47—52.
6. Никандров В. Н., Казюциц О. А. // Биохимия. — 1988. — № 3. — С. 508—515.
7. Никандров В. Н., Казюциц О. А. // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 2. — С. 41—47.
8. Никандров В. Н., Пыжова Н. С., Воляков В. И. // Вопр. мед. химии. — 1987. — № 1. — С. 84—87.
9. Роббинз К. К., Маркус Г. // Фибринолиз. Современные фундаментальные и клинические концепции. — М., 1982. — С. 69—84.
10. Савельвольф Л. Б., Сисенко В. И. // Острая и хроническая стрептококковая инфекция. — Л., 1967. — С. 106—115.
11. Торчилин В. П. Новые физико-химические подходы к получению стабилизированных физиологически активных соединений: Автореф. дис. ... д-ра хим. наук. — М., 1980. — С. 17—20.
12. Фрайфельдер Д. // Физическая биохимия. — М., 1980. — С. 392.
13. Шерман С. А., Андрианов А. М., Ахрем А. А. // Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. — Минск, 1989. — С. 41—50.
14. Banks T. E., Blossey B. K., Shafer J. A. // J. biol. Chem. — 1969. — Vol. 244, N 23. — P. 6323—6333.
15. Bolotina I. A., Chechov V. O., Lugauskas V. // Int. J. quant. Chem. — 1979. — Vol. 16. — P. 819—824.
16. Bradford M. M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
17. De Renzo E. C., Boggiano E., Barg W. F., Buck F. F. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 10. — P. 2428—2434.
18. Deutch D., Mertz E. T. // Science. — 1970. — Vol. 170. — P. 1095—1096.
19. Feeney R. E., Yamasaki K. B., Georghegan R. F. // Advanc. Chem. Ser.: Modification of Proteins. — 1982. — P. 3—55.
20. Fields R. // Biochem. J. — 1971. — Vol. 124. — P. 581—590.
21. Habeeb A. F. S. A. // Analyt. Biochem. — 1966. — Vol. 14, N 3. — P. 328—336.
22. Hoare D. G., Koshland D. E.-Jr. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242, N 10. — P. 2447—2453.
23. Kirschenbaum D. H. // Analyt. Biochem. — 1975. — Vol. 68. — P. 465—484.
24. Morgan F., Henschen A. // Biochim. biophys. Acta. — 1969. — Vol. 181, N 7. — P. 93—104.
25. Nedkov P., Nink K. Z. // Изв. Българ. Акад. наук. Хим. — 1978. — № 11. — С. 1.
26. Nikandrov V. N., Kazuyuchits O. A. // International Congress of Biochemistry, 13-th: Abstracts. — Amsterdam, 1985. — Vol. 11. — P. 302.
27. Riem J. P., Sheraga H. A. // Biochemistry (Wash.). — 1966. — Vol. 5, N 1. — P. 99—115.
28. Robbins K. C., Summaria L. // Meth. Enzymol. — 1970. — Vol. 19. — P. 184—186.

Поступила 23.01.90

CHEMICAL MODIFICATION OF THE STREPTOKINASE FUNCTIONAL GROUPS IN THE SYSTEM CONTAINING SOLUBLE CARBODIIMIDE — NUCLEOPHIL

O. A. Kazuyuchits, V. N. Nikandrov

Byelorussian Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Minsk

Specific activity of streptokinase was decreased after incubation in the system containing 1-ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl)