



УДК 577.152.344'135

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БОРОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ С УРОКИНАЗОЙ  
И ТРИПСИНОМ

Иомтова В. М., Благоев Б.

*Институт органической химии Болгарской Академии наук, София*

Ротанова Т. В., Антонов В. К.

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Проведено сравнительное исследование взаимодействия борорганических кислот с урокиназой и трипсином. Показано, что алкилборные и фенилалкилборные кислоты являются неконкурентными ингибиторами обоих ферментов; фенилборная кислота ингибирует урокиназу по конкурентному, а трипсин — по неконкурентному типу. *n*-Аминометилфенилборная кислота проявляет свойства бифункционального ингибитора по отношению к обоим ферментам. Из анализа результатов двухкомпонентного ингибирования урокиназы и трипсина сделан вывод о том, что связывание заряженных конкурентных ингибиторов в активном центре каждого фермента приводит к изменению состояния каталитически активных групп, проявляющемуся в изменении сродства каталитического центра к борной кислоте. Обнаружены различия в структуре периферических областей активных центров урокиназы и трипсина, прилегающих к связывающим участкам.

Урокиназа (КФ 3.4.99.26) — трипсиноподобный фермент, обладающий очень высокой специфичностью. Природным субстратом урокиназы является плазминоген, который под действием фермента превращается в плазмин, при этом в молекуле плазминогена расщепляется только одна связь: Arg-Val. Природа такой высокой специфичности урокиназы недостаточно выяснена, поэтому систематическое изучение взаимодействия фермента с пептикомолькулярными эффекторами и сравнение его с трипсином представляется необходимым этапом в исследовании механизма его действия.

В литературе до недавнего времени имелись лишь разрозненные сведения о взаимодействии различных эффекторов с урокиназой и трипсином; опубликованы первые сравнительные данные об активных центрах урокиназы и трипсина [1]. Авторы работы [1] изучили ингибирующее действие алкпламинов, алкиламидинов и бензамидина на каталитическую активность урокиназы и трипсина и показали, что между отрицательно заряженным остатком, находящимся в связывающей области каждого из ферментов, и гидрофобным «карманом» активного центра существует небольшая (в одно метиленовое звено) негидрофобная зона. Глубина же гидрофобной полости у обоих ферментов оказалась одинаковой — три метиленовых звена. Различия в связывании алкиламидинов, бензиламина и бензамидина позволили авторам высказать предположение о том, что активный центр в урокиназе имеет менее жесткую структуру, чем в трипсине.

В плане продолжения этих исследований мы провели сравнительное изучение активных центров урокиназы и трипсина с помощью борорганических кислот, которые, как было показано ранее, являются специфическими бифункциональными ингибиторами сериновых гидролаз [2—5]. Анализ их взаимодействия с ферментами позволил сделать выводы о взаиморасположении каталитического и сорбционного участков в активных центрах и о размерах и тонкой структуре сорбционных участков ряда ферментов [6—10]. Результаты исследования взаимодействия борорганических кислот с урокиназой и трипсином представлены в настоящей работе.

Было изучено ингибирующее действие борной кислоты, алкилборных кислот  $\text{II}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  ( $n=2-4, 6$ ), аралкилборных кислот  $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_2)_n$ .

## Ингибирование урокиназы и трипсина борорганическими кислотами \*

Ингибитор	Урокиназа			Трипсин		
	тип ингибирования	$K_i$ , мМ	$-\Delta G_{асс}^{\circ}$ , ккал/моль	тип ингибирования	$K_i$ , мМ	$-\Delta G_{асс}^{\circ}$ , ккал/моль
$H_3BO_3$	Н	200	0,98	Н	200	0,98
$H(CH_2)_2B(OH)_2$	Н	30	2,10	Н	200	0,98
$H(CH_2)_3B(OH)_2$	Н	30	2,10	Н	200	0,98
$H(CH_2)_4B(OH)_2$	Н	30	2,10	Н	200	0,98
$H(CH_2)_5B(OH)_2$	Н	240	0,87	Н	100	1,40
$C_6H_5B(OH)_2$	К	3	3,50	Н	15	2,52
$C_6H_4(CH_2)_1B(OH)_2$	Н	10	2,80	Н	10	2,80
$C_6H_4(CH_2)_2B(OH)_2$	Н	10	2,80	Н	5	3,20
$C_6H_4(CH_2)_3B(OH)_2$	Н	10	2,80	Н	$\leq 5$	$\geq 3,20$
$NH_2CH_2C_6H_4B(OH)_2$	К	0,14	5,39	К	0,045	6,09
$NH_2CH_2C_6H_3^{**}$	К	1,8	3,85	К	0,50	4,62
$NH_2C(NH)C_6H_3^{**}$	К	0,16	5,32	К	0,044	6,10

\* Тип ингибирования: К — конкурентный, Н — неконкурентный.

\*\* По данным работы [1].

$\cdot B(OH)_2$  ( $n=0, 2-4$ ) и *n*-алкилметилфенилборной кислоты  $H_2NCH_2C_6H_4 \cdot B(OH)_2$  при гидролизе *n*-нитроанилида  $N^\alpha$ -ацетил-*L*-лизина, катализируемом урокиназой и трипсином. Значения констант ингибирования и соответствующих им величин свободной энергии связывания ингибиторов с ферментами приведены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что алкилборные кислоты при значениях  $n=2-4$  ингибируют каталитическое действие урокиназы в большей степени, чем борная кислота. Это, по-видимому, свидетельствует о том, что осуществляется некоторое взаимодействие углеводородной части ингибиторов с молекулой фермента. Однако отсутствие зависимости величины  $K_i$  от размера алкильного радикала, а также неконкурентный характер ингибирования урокиназы алкилборными кислотами являются доказательством того, что эти ингибиторы располагаются в области, отличной от связывающего участка активного центра фермента. Энергия взаимодействия алкильного радикала алкилборных кислот с урокиназой, равная  $-1,1$  ккал/моль, сопоставима с энергией гидрофобного взаимодействия одной метиленовой группы ( $-0,7$  ккал/моль). Поэтому можно предположить, что после первичного «заякоривания» боратной группы в каталитическом участке активного центра урокиназы алкильная цепь ингибитора, пройдя некие «гидрофобные ворота», располагается в негидрофобной полости на молекуле фермента или вообще остается обращенной в водную фазу.

Аналогичные рассуждения допустимы по отношению к фенилалкилборным кислотам: аналоги алкилборных кислот ( $n=2-4$ ), содержащие в  $\omega$ -положении фенильный радикал, ингибируют урокиназу с одинаковой эффективностью (табл. 1). При этом энергия взаимодействия с ферментом лишь незначительно отличается от энергии взаимодействия с урокиназой соответствующих алкилборных кислот. Исключение составляет фенилборная кислота, наиболее эффективный из всех рассматриваемых ингибиторов. Однако в отличие от других борорганических кислот фенилборная кислота проявляет свойства конкурентного ингибитора по отношению к урокиназе, что свидетельствует о взаимодействии ее со связывающим участком активного центра фермента.

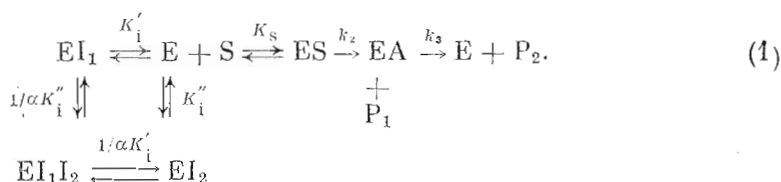
В случае трипсина константы ингибирования фермента борной и алкилборными кислотами равны (табл. 1), т. е. алкилборные кислоты своей углеводородной частью либо вовсе не взаимодействуют с ферментом, либо это взаимодействие не фиксируется с помощью выбранного субстрата. Введение же фенильного кольца в молекулу алкилборной кислоты способствует связыванию углеводородного радикала с ферментом, причем эффективность связывания зависит от размера радикала (табл. 1). При этом тип ингибирования трипсина алкилборными кислотами остается некон-

курентным, т. е. углеводородная часть молекулы ингибитора располагается вне зоны связывающего участка активного центра. Полученные результаты согласуются с данными работы [11], авторы которой показали, что вблизи активного центра трипсина расположен участок связывания незаряженных субстратов и ингибиторов.

Представлялось интересным исследовать ингибирующее действие на урокиназу и трипсин борорганического соединения — аналога специфического субстрата. Такой препарат — *n*-аминометилфенилборная кислота — был любезно предоставлен нам В. Х. Акпаровым (ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов) [12]. Как следует из табл. 1, *n*-аминометилфенилборная кислота является самым эффективным из всех изученных борорганических ингибиторов по отношению к обоим ферментам. Но в отличие от алкилборных кислот и фенилборной кислоты *n*-аминометилфенилборная кислота более прочно связывается с трипсином, чем с урокиназой. Аналогичная разница ранее была отмечена для конкурентных ароматических ингибиторов трипсина и урокиназы (в табл. 1 приведены для сравнения данные по ингибирующему действию бензамидина и бензиламина на трипсин и урокиназу, полученные в работе [1]). Сопоставление приведенных констант ингибирования свидетельствует о том, что ингибирующее действие *n*-аминометилфенилборной кислоты определяется в основном ее взаимодействием с ферментом в связывающем участке активного центра, хотя вклад боковой группы в связывание (определенный как разность между энергиями связывания *n*-аминометилфенилборной кислоты и бензиламина) составляет для обоих ферментов ~1,5 ккал/моль.

Для более определенной локализации места связывания борорганических ингибиторов на молекулах урокиназы и трипсина был проведен ряд опытов по двухкомпонентному ингибированию ферментативной активности.

Схема реакции ферментативного гидролиза в присутствии двух конкурентных ингибиторов имеет вид:

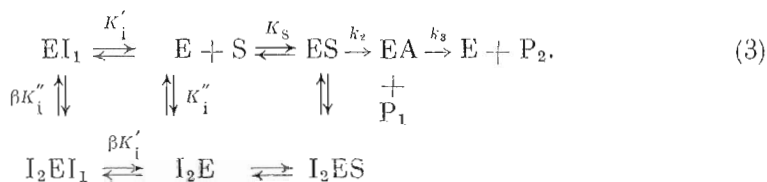


Степень взаимовлияния ингибиторов ( $\alpha$ ) рассчитывали по уравнению (2) [10]:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_m}{K_m + [S]_0} \left[ \frac{[I_1]}{K'_i} + \frac{[I_2]}{K'_i} + \alpha \frac{[I_1][I_2]}{K'_i K''_i} \right], \quad (2)$$

где при  $\alpha=0$  связывание одного из ингибиторов полностью препятствует связыванию второго ( $I_1$  и  $I_2$  — взаимозависимые ингибиторы), а при  $\alpha=1$  оба ингибитора могут одновременно связываться с активным центром фермента ( $I_1$  и  $I_2$  — взаимонезависимые ингибиторы) [10, 13]. При  $0 < \alpha < 1$  связывание одного из ингибиторов мешает связыванию другого, и ингибиторы считаются частично взаимозависимыми.

В случае, когда один из ингибиторов ( $I_1$ ) является конкурентным, а другой ( $I_2$ ) — неконкурентным, схема реакции ферментативного гидролиза принимает вид:



Двухкомпонентное ингибирование урокиназы и трипсина

Пары ингибиторов		Степень взаимовлияния ингибиторов	
		Урокиназа	Трипсин
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ацетамидин	Совместимые; $\beta=0,8$	Совместимые; $\beta=0,53$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Пропиоамидин	Частично совместимые; $\beta=3,5$	» ; $\beta=0,8$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Бензамидин	» ; $\beta=4,7$	Частично совместимые; $\beta=4,9$
H (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> V (OH) <sub>2</sub>	Ацетамидин	Совместимые	Совместимые
H (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> V (OH) <sub>2</sub>	»	»	Частично совместимые; $\beta=2,04$
H (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> V (OH) <sub>2</sub>	»	»	Несовместимые
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> V (OH) <sub>2</sub>	Ацетамидин	Частично взаимозависимые; $\alpha=0,33$	Совместимые
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> V (OH) <sub>2</sub>	Бензамидин	»; $\alpha=0,23$	»
NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> V(OH) <sub>2</sub>	Бензамидин	Взаимозависимые	Взаимозависимые
NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> V(OH) <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> V(OH) <sub>2</sub>	»	Частично совместимые; $\beta=4,54$

Степень взаимовлияния ингибиторов ( $\beta$ ) определяется из уравнения (4) [14]:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{[I_2]}{K_i''} + \frac{K_m}{K_m + [S]_0} \cdot \frac{[I_1]}{K_i'} + \frac{K_m}{K_m + [S]_0} \cdot \frac{[I_1][I_2]}{\beta K_i' K_i''}, \quad (4)$$

где при  $0 < \beta \leq 1$  оба ингибитора могут одновременно связываться с ферментом, образуя тройной комплекс ( $I_1$  и  $I_2$  — совместимые ингибиторы). При этом, если  $\beta=1$ , связывание одного ингибитора не влияет на связывание другого, а если  $\beta < 1$ , связывание одного ингибитора вызывает улучшение связывания другого; при значениях  $\beta > 1$  связывание одного ингибитора затрудняет связывание другого ( $I_1$  и  $I_2$  — частично совместимые ингибиторы); при  $\beta \rightarrow \infty$  тройной комплекс образоваться не может ( $I_1$  и  $I_2$  — несовместимые ингибиторы). Таким образом, величина  $\beta \neq 1$  характеризует степень «аллостерического» влияния связывания ингибитора в одном локусе фермента на фермент-ингибиторное взаимодействие в другом локусе и является критерием конформационной подвижности активного центра фермента [14].

Прежде всего было определено взаимовлияние некоинкурентного ингибитора борной кислоты и типичных конкурентных ингибиторов урокиназы и трипсина, ацетамидина и бензамидина. Следовало ожидать, что борная кислота и ацетамидин (или бензамидин) проявят себя как полностью совместимые ингибиторы (с  $\beta=1$ ). Однако оказалось (см. табл. 2), что взаимодействие ацетамидина с урокиназой и трипсином приводит даже к некоторому улучшению связывания борной кислоты ( $\beta=0,80$  и  $0,53$  соответственно). В то же время образование комплекса фермент — бензамидин препятствует взаимодействию борной кислоты с ферментами ( $\beta=4,7$  для урокиназы и  $4,9$  для трипсина). Из этих данных следует, что взаимодействие заряженных ингибиторов со связывающим участком активного центра каждого из ферментов вызывает изменение состояния каталитически активных групп, что обусловлено, по-видимому, конформационной перестройкой молекулы фермента. При этом либо гидрофобное взаимодействие фенильного радикала со связывающим участком, либо его индукционное влияние приводит к значительному ухудшению связывания борной кислоты в каталитическом центре.

Чтобы определить, какое именно, гидрофобное или электронное, влияние бензамидина вызывает такое изменение в каталитическом центре, было изучено двухкомпонентное ингибирование ферментов борной кислотой и пропиоамидином, соединением, более гидрофобным, чем ацетамидин. Оказалось (см. табл. 2), что в случае урокиназы ингибиторы являются

ся частично совместимыми ( $\beta=3,5$ ), а в случае трипсина — полностью совместимыми ( $\beta=0,8$ ). Это указывает на то, что основной вклад в изменение состояния каталитических групп в урокиназе вносит гидрофобное взаимодействие фенильного радикала в сорбционном участке, а в трипсине, вероятно, более существенны электронные эффекты. Этот вывод подтверждается и непосредственным сопоставлением эффективности ингибирования трипсина алкил- и аралкилборными кислотами (табл. 1). Из табл. 1 следует, что наличия одних только гидрофобных свойств заместителя в борорганической кислоте недостаточно для связывания ее с трипсином. Только у фенилалкилборных кислот появляется способность к связыванию с ферментом. При этом энергии взаимодействия с трипсином фенилборной кислоты и сходной с ней по гидрофобности бутилборной кислоты различаются более чем на 1,5 ккал/моль.

В случае двухкомпонентного ингибирования урокиназы и трипсина алкилборными кислотами (неконкурентные ингибиторы) и ацетамидином (конкурентный ингибитор) можно было ожидать получения одного из двух вариантов результатов: либо эти соединения окажутся полностью совместимыми, либо эффект связывания алкилборных кислот резко усилится за счет «переброски» алкильного радикала из места его локализации в связывающий центр фермента и «доставления» его до аналога специфического субстрата производным амидина. На практике для урокиназы были получены результаты, соответствующие первому варианту (табл. 2). Связывание же алкилборных кислот с комплексом трипсин-ацетамидин зависит от величины углеводородного радикала в молекуле ингибитора (табл. 2). Так, ацетамидин и этилборная кислота являются совместимыми, а ацетамидин и бутилборная кислота — полностью несовместимыми парами ингибиторов. Эти результаты свидетельствуют о различиях в структуре областей, прилегающих к активным центрам урокиназы и трипсина. По-видимому, область связывания алкилборных кислот на поверхности трипсин-амидинового комплекса частично перекрывается со связывающим участком активного центра фермента, тогда как в комплексе урокиназы с амидином эти области разобщены.

Как уже отмечалось выше, фенилборная кислота является конкурентным ингибитором урокиназы. Поэтому неудивительно, что по отношению к амидинам фенилборная кислота проявляет свойства частичной взаимозависимости (табл. 2). Причем, как и следовало ожидать, степень взаимозависимости этих ингибиторов возрастает при замене  $\text{NH}_2$ -группы в ацетамидине объемным фенильным радикалом в бензамидине ( $\alpha=0,33$  и  $0,23$  соответственно). Таким образом, эти данные являются подтверждением того, что фенилборная кислота частично занимает связывающий участок активного центра урокиназы (что и объясняет высокую эффективность ингибирования фермента фенилборной кислотой (табл. 1)).

В то же время по отношению к трипсину фенилборная кислота и ацетамидин (или бензамидин) являются полностью совместимыми ингибиторами (табл. 2), т. е. связываются в различных участках молекулы фермента. Сопоставляя эти данные с результатами двухкомпонентного ингибирования трипсина алкилборными кислотами и ацетамидином (табл. 2), можно сделать заключение, что фенилборная кислота и алкилборные кислоты связываются не в одном и том же участке молекулы трипсина, иначе фенилборная кислота была бы обязана проявлять свойства несовместимости и с ацетамидином и тем более с бензамидином. Таким образом, введение фенильного радикала приводит к переориентации молекулы борорганической кислоты на поверхности трипсина.

Доказательством связывания *n*-аминометилфенилборной кислоты в активных центрах урокиназы и трипсина являются результаты по взаимозависимому характеру ингибирования ферментативной активности *n*-аминометилфенилборной кислотой и бензамидином (табл. 2). По отношению к фенилборной кислоте, как и следовало ожидать, *n*-аминометилфенилборная кислота проявляет свойства взаимозависимости в случае урокиназы и частичную совместимость в случае трипсина (табл. 2). Таким образом, из всех исследованных борорганических кислот только *n*-амино-

метилфенилборная кислота, несущая заряженную аминогруппу, является бифункциональным ингибитором трипсина и урокиназы, одновременно взаимодействующим как с каталитическим, так и с сорбционным участком активного центра.

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что, несмотря на большое сходство строения связывающих участков активных центров урокиназы и трипсина, отмеченное в работе [4], структура периферических областей, примыкающих к их активным центрам, неидентична. И вероятно, основной ответ на вопрос о природе высокой специфичности урокиназы может дать сравнительное изучение вторичной специфичности урокиназы и трипсина.

### Экспериментальная часть

Использовали препарат кристаллического трипсина (КФ 3.4.21.4; Worthington). Урокиназу (КФ 3.4.99.26) с уд. акт. 20 000 СТА/мг белка получали по ранее описанной методике [15] с помощью аффинной хроматографии. Исходные растворы ферментов готовили в 0,5 М NaCl и хранили при 0° С. В этих условиях активность ферментов в течение месяца практически не менялась. Концентрацию трипсина определяли титрованием по методу, описанному в работе [16]. Для определения концентрации урокиназы использовали соотношение  $10 \cdot 10^{12}$  СТА = 1 моль [17].

Использувавшийся в качестве субстрата *n*-нитроанилид *N*<sup>α</sup>-ацетил-*L*-лизина был любезно предоставлен нам Е. Христовой (Институт органической химии Болгарской Академии наук). Исходный раствор субстрата с концентрацией 12 мМ готовили в 0,5 М NaCl.

Синтез и свойства борорганических кислот описаны ранее [18]. Борную кислоту марки ч.д.а. использовали без дополнительной очистки.

Кинетические измерения проводили в термостатированных при 37° С кюветах (*l* = 1 см) на спектрофотометрах Gilford (США) и Spесord (ГДР), определяя начальные скорости реакций по выделению *n*-нитроанилина (контроль поглощения при 405 нм) в 0,05 М трис-НСl-буфере (рН 7,5), содержащем 0,1 М NaCl в присутствии 12% СН<sub>3</sub>ОН. Концентрация ферментов в кювете  $10^{-8}$  М, субстрата — 1 мМ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Christova E., Yomtova V., Blagoev B. Int. J. Peptide Protein Res., 1980, v. 15, № 5, p. 459-463.
2. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Докл. АН СССР, 1968, т. 183, № 6, с. 1435-1438.
3. Rawn J. D., Lienhard G. E. Biochemistry, 1974, v. 13, № 15, p. 3124-3130.
4. Nakatani H., Hanai K., Uehara Y., Hiromi K. J. Biochem. (Tokyo), 1975, v. 77, № 4, p. 905-908.
5. Matthews D. A., Alden R. A., Bircloft J. J., Freer S. T., Kraut J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 18, p. 7120-7126.
6. Antonov V. K., Ivanina T. V., Berezin I. V., Martinek K. FEBS Lett., 1970, v. 7, № 1, p. 23-25.
7. Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjieva A., Blagoev B. Int. J. Peptide Protein Res., 1976, v. 8, № 3, p. 225-231.
8. Ротанова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорганич. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 837-845.
9. Ротанова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман Л. М., Антонов В. К. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 694-698.
10. Яре Я. Л., Спэж М. А., Лангсэль Ю. Л., Ротанова Т. В. Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1364-1371.
11. Sanborn B., Hein G. Biochemistry, 1968, v. 7, № 10, p. 3616-3624.
12. Акпаров В. К., Степанов В. М. J. Chromatogr., 1978, v. 155, № 2, p. 329-336.
13. Березин И. В., Мартинек К. Теор. и эксперим. химия, 1967, т. 3, вып. 4, с. 458-462.
14. Berezin I. V., Savin Yu. V., Martinek K. FEBS Lett., 1971, v. 14, № 3, p. 178-180.
15. Yomtova V., Blagoev B. Commun. Departm. Chem., Bulg. Acad. Sci., 1977, v. 10, № 4, p. 491-497.
16. Chase T., Ahaw E. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1967, v. 29, № 4, p. 508-514.

17. Soberano M. E., Ong E. B., Johnson A. J., Levy M., Schoellman G. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 445, № 3, p. 763-773.
18. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. *Молекулярн. биология*, 1970, т. 4, № 4, с. 558-570.

Поступила в редакцию  
16.VI.1982

## INTERACTION OF ORGANOBORONIC ACIDS WITH UROKINASE AND TRYPSIN

IOMTOVA V., BLAGOEV B., ROTANOVA T. V., ANTONOV V. K.

*Institute of Organic Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia;  
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The interactions between organoboronic acids and urokinase and trypsin have been compared. Alkylboronic and phenylalkylboronic acids are noncompetitive inhibitors for both enzymes; phenylboronic acid inhibits urokinase competitively, and trypsin – non-competitively. *p*-Aminomethylphenylboronic acid was shown to be effective bifunctional inhibitor of both enzymes. Binding of charged competitive inhibitors in the active site of each enzyme resulted in changes in the state of catalytically active groups. Differences in the structure of the areas adjacent to binding subsites of urokinase and trypsin have been detected.