

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ  
СОЕДИНЕНИЯ  
1973

Том (A) XV

№ 1

УДК 541.64:547.96

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИЗИЛ-  
И ГЛУТАМИЛПРОИЗВОДНЫХ ИНСУЛИНОВ  
С ПОЛИМЕТАКРИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

*М. В. Гликина, Н. П. Кузнецова, В. Р. Глущенкова,  
Г. П. Власов, Г. В. Самсонов*

Образование молекулярных комплексов и явление молекулярной ассоциации связано с возникновением ряда межмолекулярных контактов. При исследовании взаимодействия белок — полиэлектролит (ПЭ) представляло интерес изучить влияние изменения структуры одного из компонентов, в данном случае проводилась модификация белка. Усложненная структуру инсулина «пришивкой» различных аминокислот, кислых и основных, можно было рассчитывать на существенные изменения в поведении белка при его взаимодействии с полиметакриловой кислотой (ПМАК). Как известно, в образовании молекулярных комплексов различаются три типа систем: стабильные комплексы [1], обратимо диссоциирующие системы [2] и квазистабильные, релаксирующие во времени, к которым относится выбранная система инсулин — ПМАК [3]. При модификации молекулы инсулина должна измениться энергия взаимодействия белок — ПЭ, и потому возможны переходы релаксирующих систем как в стабильные, так и в обратимо диссоциирующие.

Цель настоящего исследования — изучение полученных водорастворимых комплексов, а также состояния белка в них при усложнении структуры инсулина и введение дополнительных функциональных групп кислотного и основного характера. Модификация инсулина осуществлялась пришивкой по трем имеющимся в инсулине аминным группам остатков *L*-лизина и *L*-глутаминовой кислоты. Комплексы инсулина с ПМАК были выбраны потому, что для этой системы изучены условия образования, устойчивость во времени и поведение белка и поликислоты при комплексообразовании.

**Методы исследования**

Для модификации инсулина были использованы N-оксисукцинимидные эфиры олигопептидов общего вида БОК(глут.)<sub>n</sub> — ОСИ и БОК(лизин)<sub>n</sub>ОСИ, где  $n = 1-4$ , БОК — третичный бутилоксикарбонильный остаток; ОСИ — N-гидроксисукцинимидный эфир. Активированные эфиры брали в тридцатикратном мольном избытке по отношению к инсулину. Защитные группы с модифицированного производного снимали в одну стадию действием безводной трифторуксусной кислоты.

$n = 1$ . При введении *L*-лизина в молекулу инсулина замещаются две из трех имеющихся в белке свободных аминогрупп — N-концевой глицин цепи А и ε-NH<sub>2</sub>-группа лизина (№ 29 цепи В). Такая модификация в дальнейшем обозначена как дилизилинсулин или 2-лизилинсулин.

$n = 2, 3$  и  $4$ . Введение ди-, три- и тетраглизил соответственно по трем свободным аминогруппам: N-концевым — глицину и фенилаланину и ε-группе лизина (№ 29 цепи В). Эти три модификации обозначаются 6 или гексализилинсулин, 9-она и 12 или додекализилинсулин соответственно.

Фракционирование лизил- и глутамилпроизводных инсулина проводили гель-фильтрацией на сефадексе G-75 ( $1,8 \times 77$  см) в 0,1 н. аммиаке. Чистоту выделенных фракций проверяли высоковольтным электрофорезом при pH = 2,5 и определением N-концевых аминокислот. Продукты взаимодействия с ПМАК готовили смешением

равных объемов растворов модифицированных инсулинов и ПМАК одинаковой концентрации (весовое соотношение 1 : 1) в буферных растворах при pH = 8,8 и 9,1; ионной силе 0,1. Выделение водорастворимых продуктов взаимодействия проводили хроматографией на сепадексе Г-75 в 0,1 н. аммонийном буфере (pH = 8,8 и 9,1). В случае полиглутамилинсулиновых комплексов выделение вели на сепадексе Г-50 в 0,1 н. аммиаке. Условия фракционирования ПМАК и гидролиз протеазами модифицированных инсулинов и связанных поликислотой, а также фракционирование гидролизатов описаны ранее [3].

### Результаты и их обсуждение

Изучение полученных производных инсулина гель-хроматографией показало, что в случае L-лизилпроизводных введение двух остатков L-лизина (дилизилинсулин) не оказывается на размерах молекул белка, и местоположение белка на выходной кривой при гель-фильтрации на сепадексе Г-75 остается таким же, как для немодифицированного инсулина (рис. 1). Введение шести и девяти остатков лизина приводит к незначительному сдвигу максимума на выходной кривой в сторону увеличения подвижности, т. е. больших размеров молекулы белка. Однако

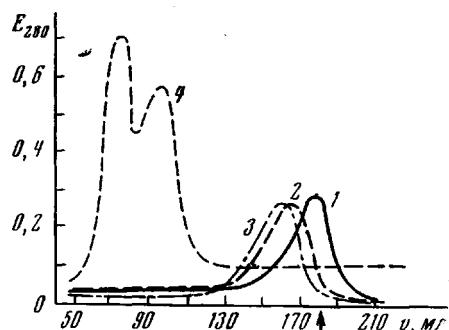


Рис. 1

Рис. 1. Гель-хроматография исходных лизилинсулинов на сепадексе Г-75 ( $1,8 \times 79$  см); 0,1 M аммонийный буфер; pH = 9,15; скорость 12 мл/час:  
1 — дилизилинсулин; 2 — гексализилинсулин; 3 — nonализилинсулин; 4 — додекализилинсулин.  
Стрелкой показано начало выделения инсулина.

Рис. 2. Выделение комплексов extemrega: дилизилинсулин — ПМАК (а); гексализилинсулин — ПМАК (б); nona- и додекализилинсулин — ПМАК (в) на сепадексе Г-75 ( $1,8 \times 79$  см) при pH = 9,15:

1 —  $E_{220}$ , 2 —  $E_{280}$ . Стрелками показано начало выделения соответствующих продуктов

эти производные имеют практически одно местоположение на выходной кривой. В случае 12-лизилинсулина картина меняется, на выходной кривой видно наличие двух компонентов (рис. 1), идущих близко к свободному объему колонки. Анализ обеих фракций, а также электрофоретическое исследование при pH = 2,5 показали идентичность обоих компонентов додекализилинсулинов, что свидетельствует об агрегации для данной модификации инсулина. Все модифицированные инсулины изучались с помощью гель-хроматографии и только в случае 12-лизилпроизводных отмечали, что местоположение фракций на выходной кривой зависело от взятой концентрации белка, что тоже свидетельствует об агрегации.

В случае L-глутамилпроизводных были исследованы два образца: nonаглутамилинсулин и полиглутамилинсулин с шестью пришитыми остат-

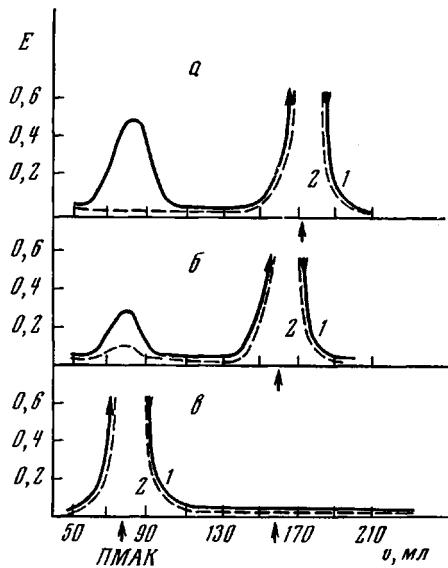


Рис. 2

ками L-глутаминовой кислоты. При изучении взаимодействия модифицированных инсулинов с ПМАК в водных буферных растворах исследовали два вида комплексов: полученные непосредственно после смешения растворов обоих компонентов, так называемые комплексы extempера, и комплексы, полученные при удлинении времени контакта компонентов до 48 час. Как видно из рис. 2, а, выделение гель-хроматографией комплексов, полученных extempера лизилпроизводных инсулина с ПМАК, показало, что введение двух остатков лизина в молекулу белка не меняет картины взаимодействия, которая наблюдалась при комплексообразовании нативного инсулина с ПМАК [3]. При введении шести остатков лизина местоположение фракции II совпадает с местоположением исходного гексализилинсулена. В этом случае во фракции I выделяется уже не свободная ПМАК, как это имело место в случае дилизилинсулена, а высокомолекулярный компонент,



Рис. 3

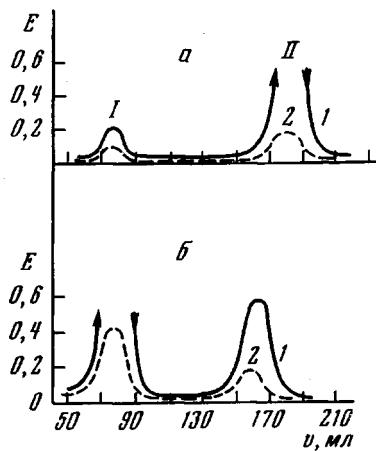


Рис. 4

Рис. 3. Выделение комплекса extempера (а) и 48-часового комплекса (б) гексализилинсулин – ПМАК на сефадексе Г-75 (1,8 × 79 см) при pH = 9,45; I – начало выделения ПМАК, II – гексализилинсулин

Рис. 4. Рехроматография комплекса гексализилинсулин – ПМАК (а) и 48-часового комплекса (б) гексализилинсулин – ПМАК сразу после выделения: 1 –  $E_{220}$ , 2 –  $E_{280}$

содержащий следы белка. Таким образом, в системе гексализилинсулин – ПМАК идет образование одновременно двух видов комплексов (рис. 2, б). Введение 9 и 12 остатков лизина по 3 аминным группам в молекулу инсулина существенно сказывается на комплексообразовании. Как видно из рис. 2, в, образуется один высокомолекулярный комплекс, идущий с объемом задержки колонны, т. е. на месте ПМАК.

Исследование комплексообразования при удлинении времени контакта компонентов до 48 час. было проведено на примере двух образцов – гексализил- и ионализилинсулинов. Анализ 48-часовых комплексов с помощью гель-хроматографии показал, что в случае ионализилинсулена картина взаимодействия не меняется, т. е. имеется один высокомолекулярный продукт, как и в случае комплексов extempера (рис. 2, в). Для комплексообразования гексализилинсулена с ПМАК выходные кривые существенно различны (рис. 3). В случае 48-часового комплекса основная масса белка переходит в высокомолекулярный продукт (фракция I, рис. 3, б). Таким образом, при удлинении времени контакта в данной системе происходит перестройка первоначально образованного комплекса (фракция II, рис. 3, а).

Исследование стабильности выделенных комплексов extempера и 48-часовых проводили методом повторной хроматографии в тех же условиях.

При анализе стабильности комплексов extemпera оказалось, что только комплекс ионализилинсулин — ПМАК был стабилен при рехроматографии как сразу, так и через 48 час. после его выделения. Остальные три системы были нестабильны и перестраивались во времени. Комплекс extemпera дилизилинсулин — ПМАК вел себя аналогично комплексу инсулин — ПМАК [3].

Комплекс додекализилинсулин — ПМАК был стабилен сразу после выделения, но через 48 час. отмечалось появление фракции II, местоположение которой на выходной кривой близко к ионализилинсулину. Можно думать, что это истинное положение додекализилинсулина, когда он не претерпевает агрегации.

Комплекс гексализилинсулин — ПМАК как extemпera, так и 48-часовой давали иную картину при рехроматографии. В обоих случаях комплекс перестраивался: комплекс extemпera — фракция II (рис. 3, а) давал при рехроматографии появление высокомолекулярного комплекса (рис. 4, а), причем со временем наблюдалось увеличение фракции I за счет уменьшения фракции II. При рехроматографии 48-часового высокомолекулярного комплекса I (рис. 3, б) отмечалась его перестройка с накоплением фракции II (рис. 4, б), т. е. оба комплекса квазистабильны и в зависимости от условий обратимо переходят один в другой.

Таким образом, получение четырех водорастворимых комплексов: ди-, гекса-, иона- и додекализилинсулинов с ПМАК, полученных extemпera и при контакте в течение 48 час., показало, что усложнение структуры инсулина путем пришивки остатков L-лизина приводит к существенному изменению во взаимодействии с ПМАК. Введение двух остатков лизина практически не меняет картины взаимодействия по сравнению с комплексом инсулин — ПМАК. Это квазистабильный, перестраивающийся во времени комплекс. Введение шести остатков лизина приводит к образованию при взаимодействии с ПМАК двух типов комплексов, которые взаимно переходят друг в друга, т. е. их образование равновероятно. Только при введении девяти остатков лизина в молекулу инсулина образуется стабильный комплекс. Видимо, наличие девяти дополнительных аминных групп в молекуле инсулина обеспечивает значительное насыщение функциональных групп ПМАК при ее взаимодействии с ионализилинсулином, что и обеспечивает стабильность продукта взаимодействия.

Введение 12 дополнительных аминных групп в случае додекализилинсулина приводит к такой модификации инсулина, которая дает агрегацию гораздо более ярко выраженную, чем у нативного инсулина. Комплекс додекализилинсулин — ПМАК показал большую стабильность при рехроматографии, чем комплексы ди- и гексализилинсулинов, однако, когда белок имеет такую склонность к агрегации, трудно делать какие-либо выводы о его стабильности.

Кроме исследования стабильности выделенных комплексов ди-, гекса-, иона- и додекализилинсулинов — ПМАК было проведено изучение гидролизуемости исходных модифицированных инсулинов, а также белка в комплексе с ПМАК. Были выбраны два фермента разного спектра действия: кристаллический трипсин и кристаллический пепсин. При изучении гидролизуемости исходных гекса-, иона-, додекализилинсулинов оказалось, что, несмотря на включение остатков L-лизина, все изученные производные гидролизуются сравнимо или медленнее, чем исходный инсулин. Так, соотношение количества белка в пиках I / II при хроматографическом разделении гидролизата составляет при гидролизе трипсином для немодифицированного инсулина 1,94, для гексализилинсулина 2,0 и 2,4 (исходного и в комплексе), для ионализилинсулина 4,7 и 0,6 (исходного и в комплексе) и для додекализилинсулина 3,3 и 3,4 (исходного и в комплексе соответственно). Вероятно, это можно объяснить недоступностью связи аргинин — аланин в цепи В инсулина для фермента из-за объемных боковых цепей L-лизина.

Гидролиз выделенных комплексов показал, что гекса- и додекализилинсулин в комплексах с ПМАК гидролизуются сравнимо с исходным модифицированным белком, тогда как в случае ионализилинсулина в комплексе с ПМАК гидролиз белка идет необычайно активно в случае обоих ферментов (рис. 5, а). Видимо, в отличие от квазистабильных комплексов с ПМАК в случае стабильного комплекса ионализилинсулина отсутствует экранирование ряда пептидных связей участками цепи ПМАК.

В случае гидролиза пепсином лизильных производных инсулина картина аналогична действию трипсина. Все модифицированные инсулины и их комплексы стабильны к действию пепсина по сравнению с исходным инсулином. Только в случае стабильного комплекса ионализилинсулин — ПМАК наблюдается активный гидролиз белка (рис. 5, б). Можно предположить, что помимо экранирования ПМАК определенных пептидных связей данный факт может быть связан со значительными конформационными изменениями молекулы белка при образовании стабильного комплекса. Следует отметить, что анализ биологической активности комплексов показал, что все комплексы активны, за исключением комплекса ионализилинсулин — ПМАК. Таким

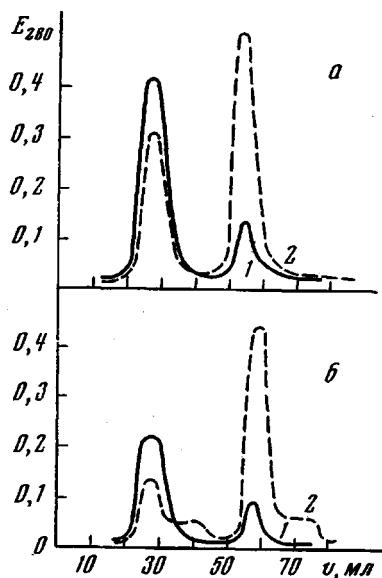


Рис. 5

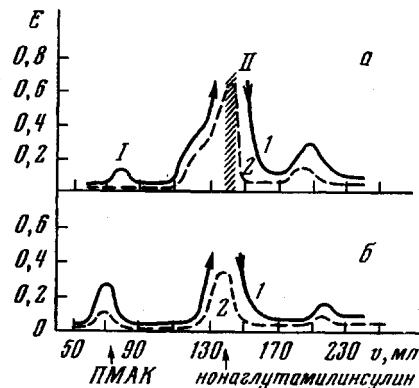


Рис. 6

Рис. 5. Фракционирование на сефадексе Г-25 ( $1,4 \times 44$  см) 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  продуктов гидролиза трипсином (а) и пепсином (б) для ионализилинсулина (1) и комплекса (2)

Рис. 6. Выделение (а) и рехроматография (б) комплекса ионаглутамилинсулин — ПМАК на сефадексе Г-75 ( $20 \times 78$  см) (амонийный буфер  $\text{pH} = 8,8$ ):

1 —  $E_{280}$ , 2 —  $E_{260}$ ; I — начало выделения ПМАК, II — ионаглутамилинсулина

образом, видно, что из исследованной серии продуктов взаимодействия только стабильный комплекс ионализилинсулин — ПМАК резко отличается по своим свойствам от других комплексов лизилинсулинов с ПМАК.

Получение и выделение комплексов ионаглутамилинсулина — ПМАК проводили аналогично лизильным производным, но при  $\text{pH} = 8,8$ . Как видно из рис. 6, а, картина взаимодействия более сложная, чем в случае лизильных производных. Комплекс ионаглутамил — ПМАК выходит во фракции II, но имеется более низкомолекулярный компонент (фракция III) и свободная ПМАК (фракция I). При рехроматографии фракции II (заштрихованные полосы рис. 6, а) видно, что в отличие от комплекса ионализилинсулин — ПМАК данная система крайне неустойчива при рехроматографии (рис. 6, б), и ее неустойчивость увеличивается во времени

Таким образом, как и следовало ожидать, модификация инсулина путем пришивки остатков *L*-лизина в одном случае и остатков *L*-глутаминовой кислоты – в другом оказывается на взаимодействии с ПМАК и на стабильности образованных комплексов. При пришивке девяти глутамильных остатков по трем аминогруппам происходит увеличение кислотности макромолекулы за счет введения девяти дополнительных карбоксильных групп при сохранении прежнего количества аминогрупп. Такое сильное увеличение суммарного отрицательного заряда молекулы белка объясняет крайнюю нестабильность комплексов нонаглутамилинысулина с ПМАК. Для этого комплекса также исследовалась его гидролизуемость протеазами (трипсином и пепсином) по сравнению с исходным нонаглутамилинысулином. Оказалось, что исходный модифицированный белок и белок в комплексе с ПМАК гидролизуются сравнимо обоими ферментами, т. е. в данном случае пришивка девяти остатков глутаминовой кислоты не привела к заметному изменению состояния белка при его взаимодействии с ПМАК. В случае полиглутамилпроизводного инсулина в молекулу белка введено шесть остатков *L*-глутаминовой кислоты. Пришивка в данном случае носила статистический характер в отличие от предыдущего образца. Поскольку картина взаимодействия нонаглутамилинысулина с ПМАК была сложной и выделенный комплекс оказался нестабильным и релаксировал во времени, для полиглутамилинысулина изучали взаимодействие не с ПМАК, а с основным белком – протамином в соотношении 1 : 1. Комплексообразование проводили также при pH = 8,8, продукт взаимодействия был нерастворим в пределах pH = 3–9,9, и выделение комплекса проводили в 0,1 н. NH<sub>4</sub>OH. В исходном образце имелось два компонента, выделение которых не проводилось. При выделении комплекса полиглутамилинысулин – протамин также видно образование двух типов комплексов, местоположение которых на выходной кривой сдвинуто в область больших объемов задержки, особенно в случае фракции II. Можно предположить, что такой сдвиг (50 мл) в сторону меньших размеров белка определяется задержкой данного комплекса на сефадексе вследствие возможных конформационных изменений в молекулах обоих компонентов (например, различная доступность NH<sub>2</sub>-групп протамина).

### Выводы

1. Исследовано взаимодействие ди-, гекса-, нона- и додекализылинысулинов с полиметакриловой кислотой (ПМАК), приводящие к образованию водорастворимых комплексов. Выделение комплексов и изучение их стабильности проведено методом хроматографии.

2. Показано, что при введении девяти остатков *L*-лизина в молекулу инсулина по трем аминным группам образуется с ПМАК высокомолекулярный стабильный комплекс. Таким образом, введение девяти дополнительных аминных групп привело к переходу квазистабильного комплекса, такими являются продукты взаимодействия инсулин – ПМАК и ди- и додекализылинысулин – ПМАК, в стабильную систему. В случае додекализылинысулина модифицированный белок существует только в агрегированном состоянии, что осложняет интерпретацию стабильности его комплекса с ПМАК.

3. Для комплексов гексализилинысулин – ПМАК отмечается одновременное образование двух равновероятных продуктов взаимодействия, которые в зависимости от условий образования и времени контакта взаимно переходят друг в друга.

4. Гидролизуемость исходных лизилинысулинов и их комплексов с ПМАК показала, что исходные лизилпроизводные гидролизуются трипсином и пепсином медленнее или сравнимо с инсулином. Белок в комплексе с ПМАК гидролизуется указанными ферментами сравнимо с исходными модифицированными инсулинами. Только в случае комплекса нона-

лизилинсулин — ПМАК наблюдается значительно большая глубина гидролиза обоими ферментами по сравнению с исходными нонализилинсулинами.

5. Изучение взаимодействия нонаглутамилинсулин — ПМАК показало образование нестабильного комплекса, состояние белка в котором в отношении гидролизуемости его трипсином и пепсином, не меняется при взаимодействии с ПМАК.

Институт высокомолекулярных  
соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
28 V 1971

#### ЛИТЕРАТУРА

1. H. Morawetz, W. L. Hughes, J. Phys. Chem., 56, 64, 1952.
2. Г. В. Самсонов, Р. Б. Пономарева, Биофизика, 13, 213, 1968.
3. М. В. Гликкина, Н. П. Кузнецова, И. А. Болотина, Г. В. Самсонов, Молек. биол., 4, 692, 1970.

---

#### INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF MODIFIED LYSYL- AND GLUTAMYL DERIVATIVES OF INSULINS WITH POLY (METHACRYLIC ACID)

*M. V. Glikina, N. P. Kuznetsova, V. R. Glushenkova,  
G. P. Vlasov, G. V. Samsonov*

#### Summary

Modified forms of insulin have been obtained by bonding lysine, glutamic acid and their di-, tri- and tetrapeptides to insulin through its three amino groups. The influence of such modifications of insulin on its interaction with poly(methacrylic acid) (PMA) has been studied by gel filtration technique. It has been shown that di- and tetralysylinsulins form with PMA methastable, slowly relaxing complexes. In case of trilysylinsulin, two complexes are formed simultaneously, which, depending on the formation conditions, undergo mutual transition. Only trilysylinsulin forms with PMA a stable complex. By varying the number of added lysyl radicals, the methastable complex can be converted to an inversely dissociating system, or to a stable one. The influence of PMA in complexes on the state of insulin has been studied with the aid of proteolysis. In all complexes the state of modified insulin is not changed during interaction with PMA. Only the stable complex of trilysylinsulin-PMA has shown a very high efficiency of proteolysis, i. e. an alteration in the state of insulin molecule. Two samples of glutamylinsulins have been used. Triglutamylinsulin forms with PMA several highly unstable complexes. The state of protein in these complexes does not differ from the state of initial triglutamylinsulin.