



УДК 577.112.088.3:543.544.4

## ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНСУЛИНА

© 1996 г. Е. В. Петрович<sup>#</sup>, П. А. Киселев

Институт биоорганической химии АНБ, 220141, Минск, ул. Жодинская, 5, корп. 2

Поступила в редакцию 14.03.95 г.

Изучено хроматографическое поведение при обращенно-фазовой ВЭЖХ свиного инсулина, флуоресцентно меченного дансилхлоридом, флуоресцеинизотиоцианатом и NSu-эфиром производного красителя нильского красного. Достигнуто аналитическое и полупрепаративное разделение моно-, ди- и три-Dns-производных инсулина (по остаткам Gly<sup>1</sup> цепи А и Phe<sup>1</sup> и Lys<sup>29</sup> цепи В), а также разделение изомерных 5'- и (6'-флуоресцеинтиокарбамоил)-Phe<sup>1</sup>-производных инсулина. Полученные данные интерпретированы на основании предположения о сохранении в модифицированных белках глобулярной структуры и об их поверхность-опосредованном взаимодействии с обращенно-фазным сорбентом. Время удерживания коррелирует с общей гидрофобностью поверхности в области введенной метки в случае монопроизводных и с гидрофобностью области, стерически доступной для контакта, заключенной между метками, в случае ди- и трипроизводных.

*Ключевые слова:* инсулин, флуоресцентно меченные производные, ВЭЖХ.

Введение в молекулу белка флуоресцентных меток позволяет получить ценную информацию о структурных и функциональных характеристиках исследуемого объекта. Особое значение имеет получение селективных модифицированных флуоресцентных конъюгатов белка [1]. Однако подобная задача достаточно сложна и, как правило, каждый конкретный случай требует индивидуального подхода. Вместе с тем ее решение может быть облегчено с помощью метода ВЭЖХ. Для белков и крупных пептидов, обладающих определенной третичной структурой, процесс взаимодействия с неподвижной фазой определяется пространственной укладкой полипептидных цепей, определяющей доступность поверхностных аминокислотных остатков [2]. Поэтому метод ВЭЖХ может позволить разделить меченые полипептиды в зависимости от места и степени модификации и тем самым получить набор селективно модифицированных белков, пригодных для дальнейшего исследования. Кроме того, хроматографический анализ флуоресцентно меченных полипептидов перспективен в плане получения дополнительной информации о характере поверхности, вовлеченной во взаимодействие с неподвижной фазой в процессе хроматографии, а также о пространственной структуре и конформационных характеристиках исследуемого полипептида.

Сокращения: FITC – флуоресцеинизотиоцианат, FITC – флуоресцеинтиокарбамоил-, NSu-эфир – N-оксисулцинимидный эфир.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

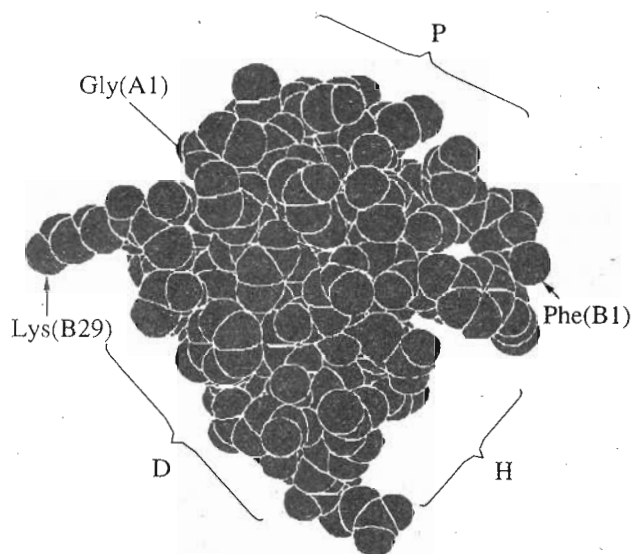
Объектом настоящего исследования выбран инсулин свиньи. Это связано как с важной физиологической функцией инсулина, так и с наличием данных о его третичной структуре [3].

Целью работы стало изучение хроматографического поведения модифицированного флуоресцентными метками инсулина с учетом его пространственных параметров.

Свиной инсулин представляет собой двухцепочечный полипептидный гормон ( $M_r$  5700), обладающий определенной трехмерной структурой [3]. Цепи А и В соединены дисульфидными связями А7–В7 и А20–В19\*. А-Цепь состоит из  $\alpha$ -спиральных участков А2–А8 и А13–А20, соединенных отрезком цепи, содержащим внутрицепочечную дисульфидную связь А6–А11. В-Цепь содержит  $\alpha$ -спираль В9–В19, изгиб В20–В23 и участки  $\beta$ -структуры В1–В8, В24–В30.  $\alpha$ -Спиральные участки составляют плотно упакованный и стабилизированный дисульфидными связями остов молекулы с более конформационно подвижными концевыми участками В-цепи.

На поверхности молекулы можно выделить две преимущественно неполярные области, участвующие в образовании димеров (D) и гексамеров (H), и большую полярную область (P) (рис. 1). Димеробразующая область включает участок В23–В26, В12, В16. Гексамеробразующая поверхность захватывает остатки В10, В14, В17, А13, А14 [4].

\* Здесь и далее буква соответствует маркировки цепи, цифра – номеру остатка в ней.



**Рис. 1.** Пространственная структура инсулина. Координаты атомов взяты из брукхавенского банка данных. D, H, P – димеробразующая, гексамеробразующая и преимущественно полярная поверхности. Атомы азота модифицированных по аминокетам аминогруппами аминокислотных остатков указаны стрелками.

В водных растворах инсулин существует в состоянии равновесия мономер – димер, которое при низких значениях pH смещается в сторону образования мономеров [3]. Присутствие ацетонитрила также препятствует димеризации и смещает равновесие в сторону мономера [5]. Таким образом, при экспериментальных условиях, использо-

ванных в работе (pH 2.5–3.0, 30–50% ацетонитрила), инсулин существует в растворе преимущественно в виде мономера [6].

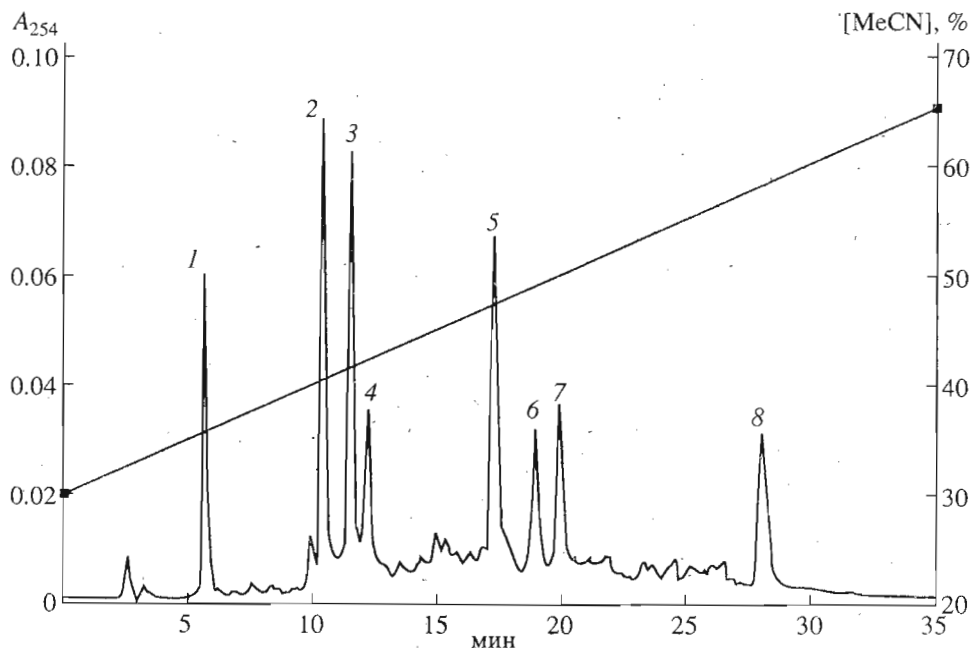
Исследования инсулина методом ЯМР показали, что в условиях низкого pH и в присутствии органического растворителя не нарушается основное строение остова молекулы и сохраняются  $\alpha$ -спиральные участки B15–B19 и A13–A20 [5, 6].

Возможными участками модификации в молекуле инсулина флуоресцентными метками (FITC, дансилхлорид, NSu-эфир производного нильского красного), использованными в работе, являются аминокетамы N-концевых остатков A1 и B1 (Gly и Phe),  $\epsilon$ -аминогруппа лизина B29 и, в случае модификации дансилхлоридом, гидроксильные группы остатков тирозина A14, A19, B16, B26.

Из анализа хроматограмм продуктов реакции инсулина с дансилхлоридом (рис. 2) и смесью 5'- и 6'-изомеров FITC (рис. 3) можно сделать несколько общих замечаний.

Хроматограммы характеризуются хорошо разрешенными острыми пиками, что свидетельствует об отсутствии значительной денатурации и ионной сорбции разделяемых молекул на поверхности сорбента. Профили элюции совпадают при хроматографии на сорбентах Ultrasphere ODS и Zorbax ODS.

Инсулин и его моно-, ди- и тризамещенные производные значительно различаются по времени удерживания даже в условиях градиентной элюции (1%/мин). Так, немодифицированный инсулин, его моно-, ди- и трипроизводные с дансилхлоридом и



**Рис. 2.** Хроматограмма продуктов реакции инсулина с дансилхлоридом при pH 8.0. 1–8 – пики инсулина, Dns-A1, Dns-B1, Dns-B29, Dns<sub>2</sub>-A1B1, Dns<sub>2</sub>-B1B29, Dns<sub>2</sub>-A1B29, Dns<sub>3</sub>-A1B1B29-производных инсулина соответственно на колонке Ultrasphere ODS. Условия хроматографии см. "Экспер. часть".



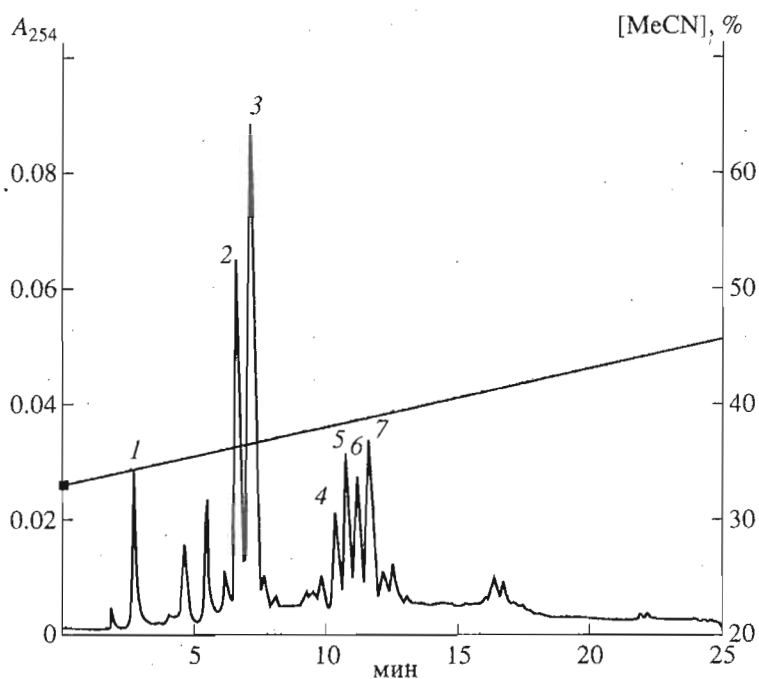


Рис. 3. Хроматограмма продуктов реакции инсулина со смесью изомеров FITC. 1 – инсулин, 2 – (5'-FITC)-B1-инсулин, 3 – (6'-FITC)-B1-инсулин, 4–7 – (5'(6')FITC)<sub>2</sub>-A1B1-инсулины. Условия хроматографии см. подпись к рис. 2.

FITC элюировались при 35, 40–44, 45–50, 55–60% ацетонитрила соответственно. Общая картина разделения сохраняется для различных флуоресцентных меток: каждое последующее введение флуоресцентной метки ощутимо увеличивает сродство молекулы к неподвижной фазе.

Производные инсулина с флуорофорами различной химической структуры также различаются по времени удерживания. Так, моно-Dns-замещенные инсулины элюируются в диапазоне концентраций ацетонитрила 40–42%, моно-FITC-замещенные инсулины – 41–44% ацетонитрила. Конъюгаты инсулина с гидрофобной флуоресцентной меткой – NSu-эфиром производного нильского красного [7] – характеризовались сильным удерживанием на колонке. Монопроизводные элюировались 55% ацетонитрилом. Ди- и трипроизводные необратимо сорбировались на колонке и с трудом элюировались при концентрации ацетонитрила в элюате 70 и 75% соответственно (данные не показаны).

В описанных экспериментальных условиях достигается разделение моно- и дизамещенных инсулинов, модифицированных 5'- и 6'-изомерами FITC и различающихся лишь положением изотиоцианатной группы в бензольном кольце молекулы флуорофора (рис. 3). Полученный состав продуктов реакции согласуется с данными работы [8] о первоочередной модификации остатка B1 с последующим вступлением в реакцию остатка A1 и практически отсутствием конъюгирования FITC с остатком B29 в использованных нами условиях.

Изомеры инсулина, модифицированные дансилхлоридом по различным аминокислотным ос-

таткам (A1, B1, B29), имеют различное время удерживания. В случае проведения реакции дансилхлорида с инсулином при pH 9.5 обнаруживаются все семь возможных изомеров Dns-инсулина – по остаткам A1, B1, B29, A14, A19, B26, B16 (данные не показаны).

Тризамещенные производные инсулина значительно отличаются по времени удерживания от дипроизводных (см. рис. 2).

Использованные в работе флуоресцентные метки представляют собой объемные гидрофобные заместители. Основываясь на рентгеноструктурных данных для тиазолидинпроизводного инсулина [9] и учитывая высокий процент органического растворителя в растворе, можно предположить, что вводимые заместители не нарушают основной упаковки молекулы, а находятся за пределами поверхности белковой глобулы, свободно контактируя с поверхностью сорбента. Значительное увеличение сродства монозамещенных конъюгатов инсулина к неподвижной фазе по сравнению с исходным инсулином, а также тот факт, что время удерживания монозамещенных конъюгатов зависит от гидрофобности флуорофора, указывают на то, что заместители играют определяющую роль во взаимодействии конъюгатов инсулина с обращенной фазой.

Некоторое изменение ориентации объемной неполярной группы флуоресцентной метки на поверхности белковой глобулы сказывается на удерживании. Так, производные инсулина с изомерами FITC различаются по положению присоединения тиокарбамойльного спейсера к гидрофобному ядру флуорофора и соответственно по времени

удерживания. Более сильное удерживание на колонке 5'-FITC-инсулина может быть связано с более вытянутой конформацией и, следовательно, с большей степенью экспонирования гидрофобного остатка 5'-флуоресцеина.

Кроме того, различное удерживание производных инсулина, замещенных по различным остаткам, говорит в пользу вовлечения в процесс взаимодействия с неподвижной фазой не только самой метки, но и окружающих ее поверхностных аминокислотных остатков. Маклеод и Вуд анализировали различия во времени удерживания Ас-А1- и Ас-В1-производных инсулина в сходных с нашими условиях [9]. Ас-В1-инсулин элюировался позже Ас-А1-производного, хотя аминокислотное окружение остатка А1 характеризуется более высокой гидрофобностью по сравнению с окружением остатка В1. Авторы объясняли этот факт меньшей экспонированностью небольшого ацетильного заместителя остатка Ас-А1, находящегося в углублении поверхности молекулы (см. рис. 1). В нашем случае объемные заместители локализованы на поверхности глобулы и скорее всего нивелируют незначительные детали ее поверхности, что выводит на первый план гидрофобность поверхностных аминокислотных остатков, окружающих флуоресцентную метку. Это, по-видимому, и приводит к обратному порядку элюции Dns-монозамещенных инсулинов в сравнении с данными работы [10]: время элюций  $B1 \ll A1 < B29$ . Dns-B29-инсулин элюируется лишь несколько позже А1-производного. Отметим, что близлежащие остатки А1 и В29 находятся на границе обширной неполярной области, вовлеченной в образование димеров и взаимодействие с рецептором. В этом случае введение заместителя, по-видимому, приводит к образованию сходных конъюгатов.

В случае дизамещенных производных порядок элюции (время удерживания) оказался следующим:  $A1B1 < B1B29 < A1B29$  (рис. 2). Все модифицированные остатки расположены на поверхности молекулы инсулина так, что стерически не затрудняют одновременное парное взаимодействие заместителей с неподвижной фазой. Тогда различия в сорбции к стационарной фазе можно объяснить характеристиками участков поверхности молекулы инсулина, заключенных между двумя заместителями. Между остатками А1 и В1 и В1 и В29 находится преимущественно гидрофильная поверхность [4]. Однако концевые фрагменты В-цепи, включающие остатки В1 и В29, конформационно подвижны [11], что может приводить к выходу заместителей за плоскость гидрофильной поверхности. Введение флуоресцентных меток в положения А1 и В29 по соседству с димеробразующей поверхностью с учетом возможности сегментной подвижности С-концевого участка В-цепи [12] обуславливает увеличение общей неполярной площади молекулы (рис. 1) и соответственно макси-

мальное удерживание этих производных при хроматографии.

Большее удерживание тризамещенных производных в сравнении с дизамещенными (рис. 2) предполагает возможность трехточечного взаимодействия Dns-тризамещенного инсулина с неподвижной фазой, что стерически осуществимо только благодаря гидрофильным группам, экспонированным на поверхности (рис. 1).

Полученные экспериментальные данные по хроматографическому поведению производных инсулина хорошо согласуются с теоретическими предсказаниями о поверхность-опосредованном характере взаимодействия белков с носителем [2] в рамках предположения, что при использованных условиях хроматографии сохраняется основная третичная структура молекулы инсулина и процесс взаимодействия с сорбентом определяется поверхностными остатками конъюгатов. Вводимые гидрофобные заместители имеют определяющее значение во взаимодействии с образцово-фазным сорбентом. Сайты модификации определяют, какие участки поверхности белковой глобулы будут преимущественно вовлечены во взаимодействие с неподвижной фазой. Время удерживания коррелирует с общей гидрофобностью поверхности в области введенной метки в случае монопроизводных и области стерически доступной поверхности, заключенной между метками в случае ди- и трипроизводных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали кристаллический Zn-инсулин свиньи (Завод медпрепаратов, Белоруссия), дансилхлорид, смесь изомеров FITC (Fluka, Швейцария), 5'-FITC (Molecular probes, США), NSu-эфир 9-диэтиламинобензофеноксазин-5-он-3-оксиуксусной кислоты [7], DEAE-целлюлозу Servacel-32 (Serva, Швейцария), сефадекс G-15 (Pharmacia, Швеция). Хроматограф состоял из двух насосов 114M Solvent Delivery Module, динамического смесителя, двухволнового сканирующего детектора Model 165, контроллера и системы обработки данных Data System/Controller 450 (Beckman, Австрия).

После модификации инсулина флуоресцентными метками непрореагировавший избыток реагента отделяли гелем-фильтрацией на сефадексе G-15 и меченые производные инсулина разделяли на колонке (0.46 × 25 см) Ultrasphere ODS, 5 мкм (Beckman, Австрия) в системе 0.1 М Na-фосфатный буфер, pH 2.5–3.0, – ацетонитрил. Полу препаративное разделение проводили на колонке (0.9 × 25 см) Zorbax ODS, 10 мкм (DuPont, США), скорость потока 1 мл/мин.

Для получения конъюгатов инсулина с дансилхлоридом к 10 мг (1.7 мкмоль) Zn-инсулина свиньи в 1 мл 0.2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0 (или 9.5), добавляли дансилхлорид (молярное соотношение



реагентов 2 : 1). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 20°C, центрифугировали, обессоливали на сефадексе G-15. Анализировали пробы объемом 20 мкл (рис. 2).

Для получения FITC-инсулинов к 10 мг инсулина в 1 мл 0.2 М NaHCO<sub>3</sub> добавляли смесь 5'-, 6'-изомеров FITC (молярное соотношение реагентов 2 : 1). Реакцию проводили 2 ч при 20°C, обессоливали на сефадексе G-15. Аналогично получали производные инсулина с 5'-FITC. Анализировали пробу объемом 20 мкл (рис. 3).Mono-, ди- и тризамещенные FITC-производные инсулина разделяли хроматографией на DEAE-целлюлозе, как в работе [8].

Конъюгаты инсулина с бензфеноксазином получали так, как описано ранее [7]. Количество введенной метки оценивали по соотношению оптической плотности при 280 и 560 нм, используя коэффициент молярной экстинкции для производного бензфеноксазина  $\epsilon_{560}$  30000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

Для идентификации модифицированных дансилхлоридом аминокислотных остатков проводили гидролиз конъюгатов в 6 н. HCl (155°C, 30 мин) [13], упаривали растворитель и разделяли Dsp-аминокислоты хроматографией на колонке (0.2 × 25 см) Ultrasphere ODS в системе 0.1% трифторуксусная кислота – 50% ацетонитрил.

Доминирующие пики при хроматографии FITC-производных инсулина (рис. 3) идентифицировали, используя гидролиз конъюгатов 50% трифторуксусной кислотой (80°C, 10 мин) [14] с последующим определением флуоресценттигидантоин-

производных с помощью ТСХ на силикагеле Kieselgel 60 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ–метанол, 9 : 1.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лакович Дж. Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986.
2. Regnier F.E. // Science. 1987. V. 238. P. 319–323.
3. Blundell T.L., Dodson G.G., Hodgkin D.C., Mercola D.A. // Adv. Protein Chem. 1972. V. 26. P. 279–402.
4. Dodson E.J., Dodson G.G., Hubbard R.E., Reynolds C.D. // Biopolymers. 1983. V. 22. P. 281–291.
5. Weiss M.A., Nguyen D.T., Khait I., Inouye K., Frank B.H., Beckage M., O'Shea E., Shoelson S.E., Karplus M., Neuringer L.J. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 9855–9873.
6. Kline A.D., Justice R.M. // Biochemistry. 1989. V. 28. P. 2906–2913.
7. Петроченко Е.В., Алексеев Н.Н., Гореленко А.Я., Ахрем А.А. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35. С. 918–922.
8. Bromer W.W., Sheehan S.R., Berns A.W., Arquilla E.R. // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 2378–2388.
9. Pullen R.A., Lindsay D.G., Wood S.P., Tickle I.J., Blundell T.L., Wollmer A., Krail G., Bradenburg D., Zahn H., Gliemann J., Gammeltoft S. // Nature. 1976. V. 259. P. 369–373.
10. McLeod A., Wood S.P. // J. Chromatogr. 1984. V. 285. P. 319–331.
11. Chotia C., Lesk A.M., Dodson G.G., Hodgkin D.C. // Nature. 1983. V. 302. P. 500–505.
12. McLeod A., Auf Der Mauer A., Wood S.P. // J. Chromatogr. 1990. V. 502. P. 325–336.
13. Практическая химия белка. М.: Мир, 1989. С. 251.
14. Muramoto K., Kawachi H., Tuzimura K. // Agric. Biol. Chem. 1978. V. 42. P. 1559–1563.

## High-Performance Liquid Chromatography of Fluorescent Insulin Derivatives

E. V. Petrochenko<sup>1</sup> and P. A. Kiselev

Institute of Bioorganic Chemistry, Belarussian Academy of Sciences,  
ul. Zhodinskaya 5, korp. 2, Minsk, 220141 Belarus

**Abstract**—The reversed-phase HPLC of porcine insulin modified by fluorescent labeling with dansyl chloride, fluorescein isothiocyanate, and an *N*-hydroxysuccinimide ester of 3-carboxyl derivative of Nile Red was studied. Mono-, di-, and tri-Dns-insulins (substituted at residues Gly<sup>1</sup> of the A-chain and Phe<sup>1</sup> and Lys<sup>29</sup> of the B-chain), as well as isomeric 5'- and 6'-fluoresceinthiocarbonyl-Phe<sup>1</sup> insulin derivatives were separated on the analytical and semipreparative scale. The results were interpreted in terms of conservation of the globular structure in the modified proteins and their surface-mediated interaction with the reversed-phase sorbent. Observed retention times correlated with the total hydrophobicity of the surface region containing the incorporated label (in the case of monosubstituted derivatives) or with the total hydrophobicity of chromatographic contact regions located between labels (in the case of di- and trisubstituted derivatives).

*Key words:* insulin; fluorescent labeling; HPLC.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.