



УДК 577.112:577.152.34\*21.4.04:543.51

## ПРОТЕОЛИЗ ПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ НАТИВНЫМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ТРИПСИНОМ

© 1997 г. О. А. Миргородская<sup>#</sup>, Г. А. Казанина, Е. П. Миргородская, А. А. Шевченко,  
К. В. Мальцев\*, А. И. Мирошников\*, П. Ройпсторфф\*\*

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

\* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

\*\* Университет, г. Оденс, Дания

Поступила в редакцию 24.06.96 г.

С использованием офВЭЖХ и масс-спектрометрии изучен протеолиз рекомбинантного проинсулина человека нативным трипсином, трипсином, модифицированным сополимером винилпирролидона с акриловой кислотой, и таким образом модифицированным трипсином, иммобилизованным на силихроме 1.5. Определены константы скоростей основных стадий гидролиза проинсулина нативным трипсином. Показано, что значения констант скоростей расщепления наиболее быстро гидролизуемых связей (образованных парами основных аминокислот) в проинсулине одного порядка с константами, найденными для гидролиза связей, образованных изолированным остатком лизина (Lys<sup>7</sup>) и остатками С-концевого кластера из четырех основных аминокислот в мелиттине. Установлено, что ковалентное связывание трипсина с сополимером не изменяет соотношения скоростей реакций отдельных стадий гидролиза проинсулина, тогда как после иммобилизации модифицированного трипсина на силихроме образование инсулина-ArgArg, промежуточных форм деградированного проинсулина и desThr-инсулина идет с сопоставимыми скоростями.

*Ключевые слова:* трипсинолиз, проинсулин, модифицированный трипсин, иммобилизованный трипсин, кинетические параметры, масс-спектрометрия.

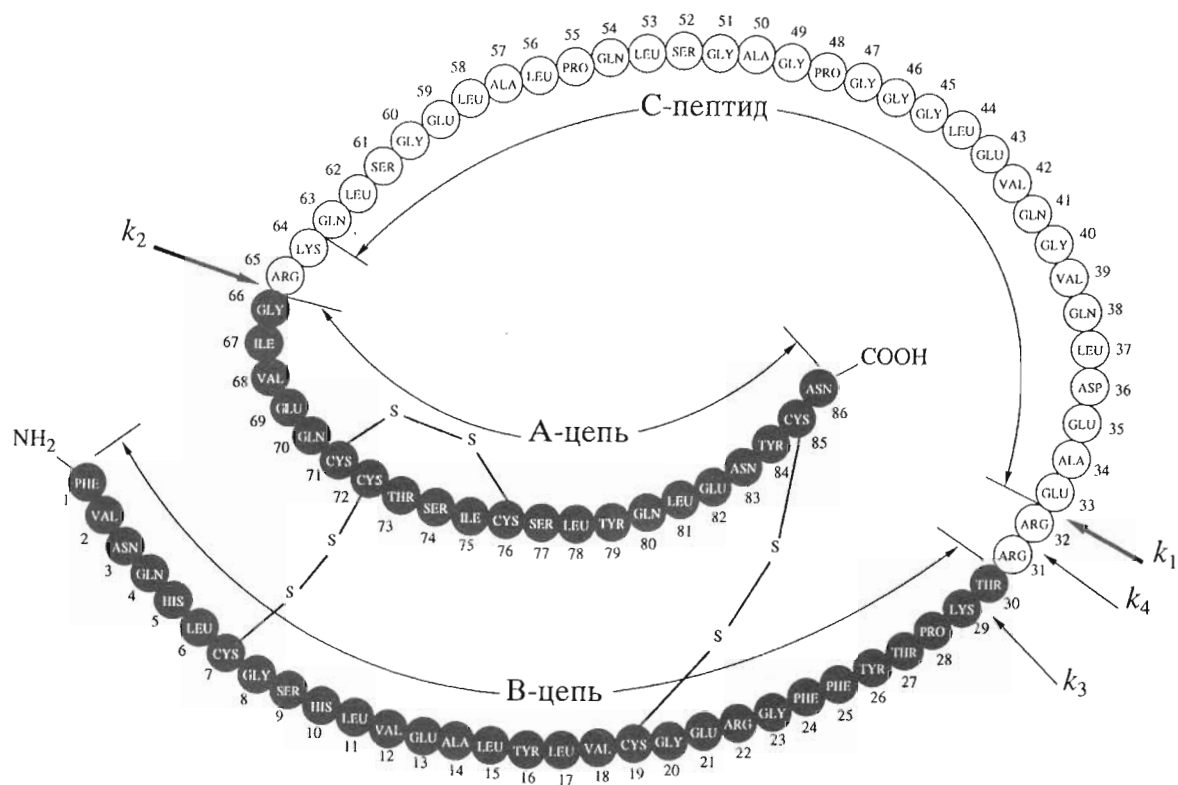
Свойство трипсина гидролизовать амидные связи, образованные карбоксильными группами основных аминокислот, широко используется в аналитической химии белка при получении пептидных фрагментов и последующем пептидном картировании [1]. Традиционно в этих случаях проводится исчерпывающий гидролиз белковых субстратов с идентификацией пептидных фрагментов с помощью ВЭЖХ или электрофореза. Однако, как показано в нашей предыдущей работе [2] на примере мелиттина, использование масс-спектрометрии (ESI-MS или MALDI-MS) при картировании на разных глубинах трипсинолиза позволяет не только выявить отдельные триптические фрагменты, но и установить их расположение в пептидной цепи. Для трипсинолиза мелиттина при этом не выявлено существенных различий в скоростях гидро-

лиза амидных связей, образованных одиночным остатком лизина (-Lys<sup>7</sup>-Val<sup>8</sup>-) или остатками основных аминокислот в С-концевом кластере (-Lys<sup>21</sup>-Arg<sup>22</sup>-Lys<sup>23</sup>-Arg<sup>24</sup>-Gln<sup>25</sup>), константы скоростей гидролиза связей 7–8 и 24–25 (наиболее быстро гидролизуемой в кластере) равны соответственно 1.4 и 2.0 с<sup>-1</sup>. Вместе с тем имеются данные о преимущественном гидролизе трипсином амидных связей во фрагментах полипептидной цепи, состоящих из основных аминокислот [3]. Именно этим обусловлено использование трипсина в реакциях ограниченного протеолиза, например при получении целевого продукта инсулина-ArgArg при конверсии проинсулина [4].

В настоящей работе изучена кинетика трипсинолиза проинсулина. Проинсулин представляет собой А- и В-цепи инсулина, скрепленные двумя дисульфидными мостиками и соединенные последовательно в общую пептидную цепь двумя остатками аргинина, С-пептидом, остатками лизина и аргинина (рис. 1, указаны положения связей, гидролизуемых трипсином при конверсии проинсулина). Цель работы – дать количественную оценку констант скоростей гидролиза всех указанных амидных связей основных аминокислот в проинсулине, а также сопоставить полученные значения с

Сокращения: офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ВПАК – сополимер винилпирролидона и акролеина; Ins – инсулин; proIns – проинсулин; PepC – С-пептид; ESI-MS – масс-спектрометрия с электрогидродинамическим способом ионизации; MALDI-MS – масс-спектрометрия с матрицей, связанной лазерной десорбцией; desT-Ins – дез-Thr<sup>30</sup>-инсулин; IntI, IntII – промежуточные продукты.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



**Рис. 1.** Схематическое изображение молекулы рекомбинантного проинсулина человека. Стрелками указаны места преимущественного ( $\downarrow$ ) и сопутствующего ( $\downarrow$ ) разрыва связей при трипсинолизе. Темными кружками обозначены остатки, составляющие молекулу проинсулина.

константами скоростей гидролиза отдельных связей в других пептидных субстратах. Можно полагать, что сопоставление констант скоростей гидролиза наиболее быстро расщепляемых амидных связей на примере трипсинолиза поможет понять, насколько переход к реакциям ограниченного протеолиза белка предопределен особенностями его структурной организации.

Другой аспект исследования связан с тем, что для ряда биохимических и биотехнологических задач остается привлекательной замена нативных ферментов их иммобилизованными формами. Это позволяет не только сделать биокатализаторы более устойчивыми к воздействию окружающей среды и исключить возможность автолиза, но и использовать их многократно [5]. Вместе с тем нельзя исключить, что иммобилизация фермента может привести к изменению в соотношении скоростей гидролиза им отдельных связей и тем самым к потере способности к ограниченному протеолизу. Трипсинолиз проинсулина представляется нам подходящим примером для оценки влияния модификации и иммобилизации фермента на его способность к ограниченному протеолизу, так как позволяет на одном субстрате сравнить изменение скоростей протеолиза всех гидролизующихся связей

(наиболее специфичных и менее специфичных для выбранного фермента).

На первом этапе работы была изучена кинетика гидролиза проинсулина (proIns) нативным трипсином. Продукты реакции, полученные за определенные промежутки времени, разделяли хроматографически (рис. 2) и идентифицировали с использованием ESI-MS по молекулярным массам, рассчитанным по сериям многозарядных ионов в их масс-спектрах (табл. 1).

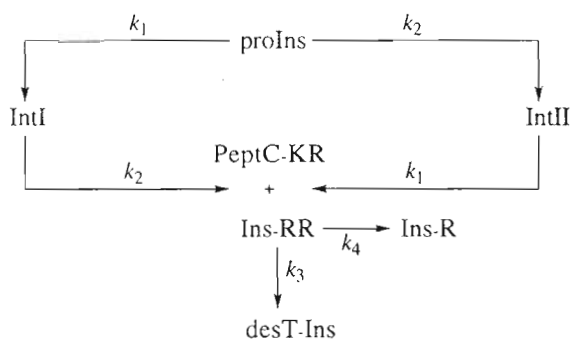
По данным ВЭЖХ были определены текущие концентрации всех зарегистрированных продуктов трипсинолиза (рис. 3). Из представленных данных видно, что, как и следовало ожидать, при гидролизе прежде всего образуются два промежуточных продукта: IntI и IntII (пики 3 и 4 на рис. 2) с различной хроматографической подвижностью и одинаковой молекулярной массой, на 18 а. е. м. превышающей массу проинсулина. Определение молекулярных масс пептидов, полученных при восстановлении S-S-связей в указанных интермедиатах (см. "Экспер. часть"), с использованием MALDI-MS-анализа позволило идентифицировать соответствующие каждому из них гидролизующиеся связи.

На рис. 4 в качестве примера приведен анализ масс-спектра, выполненный для IntI. Видно, что

после восстановления S-S-связей и алкилирования в различной степени образуются продукты, по молекулярной массе соответствующие отдельной В-цепи инсулина с двумя остатками Arg<sup>31</sup>Arg<sup>32</sup> на С-конце и С-пептиду (PeptC), связанному с А-цепью инсулина парой основных аминокислот -Lys<sup>64</sup>Arg<sup>65</sup>-. Следовательно, IntI однозначно образуется в результате гидролиза связи -Arg<sup>32</sup>-Glu<sup>33</sup>-. Для IntII аналогичным образом определено положение гидролизуемой связи: -Arg<sup>65</sup>-Gly<sup>66</sup>-.

Полученные данные об интермедиатах, образующихся при трипсинолизе проинсулина, соответствуют имеющимся к настоящему времени в литературе [4]. Последующий гидролиз этих промежуточных продуктов приводит к образованию целевого инсулина-ArgArg (Ins-RR) и С-пептиду с лизином и аргинином на конце (PeptC-KR). При увеличении времени реакции Ins-RR гидролизуется преимущественно по связи -Lys<sup>29</sup>-Thr<sup>30</sup> до desT-Ins (рис. 2в).

На основании кинетических данных может быть построена схема путей протеолиза проинсулина под действием трипсина, согласующаяся с результатами, имеющимися в литературе [4, 6].



Пути протеолиза проинсулина нативным трипсином

В соответствии со схемой и с учетом того, что  $k_4 \ll k_1, k_2$  и  $k_3$  (см. ниже), изменения концентраций регистрируемых продуктов могут быть описаны следующей системой уравнений:

$$d[\text{proIns}]/dt = -(k_1 + k_2)[\text{proIns}], \quad (1)$$

$$d[\text{IntI}]/dt = k_1[\text{proIns}] - k_2[\text{IntI}], \quad (2)$$

$$d[\text{IntII}]/dt = k_2[\text{proIns}] - k_1[\text{IntII}], \quad (3)$$

$$d[\text{Ins-RR}]/dt = k_1[\text{IntII}] + k_2[\text{IntI}] - k_3[\text{Ins-RR}], \quad (4)$$

$$d[\text{PeptC-KR}]/dt = k_1[\text{IntII}] + k_2[\text{IntI}], \quad (5)$$

$k_1, k_2$  и  $k_3$  – кажущиеся константы скоростей реакций с начальными условиями при  $t = 0$   $[\text{proIns}]_0 = A_0$ , а  $[\text{Ins-RR}], [\text{IntI}], [\text{IntII}]$  и  $[\text{PeptC-KR}]$  равны нулю.

При составлении этих уравнений предполагалось, что концентрации всех субстратов выше соответствующих  $K_m$ . Предполагается также, что за время реакции трипсин не автолизуется.

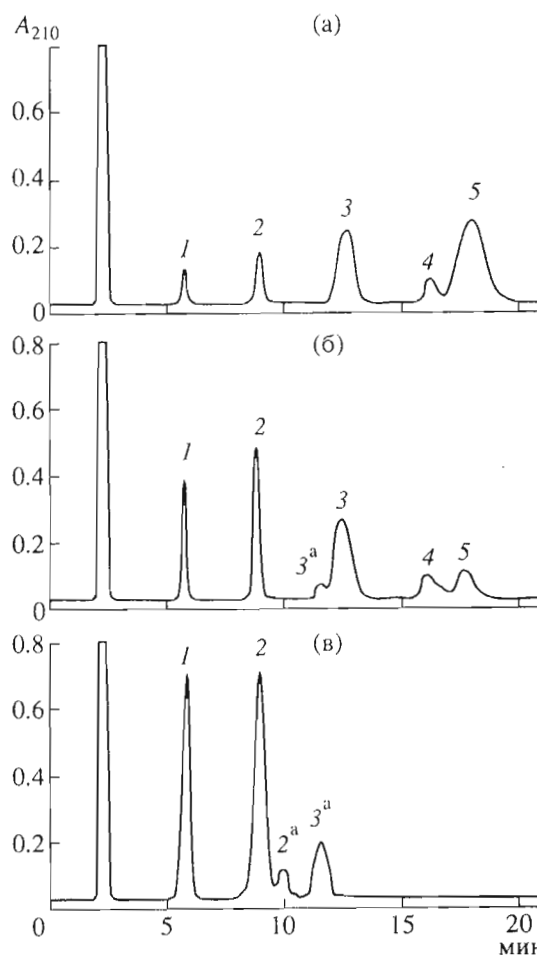


Рис. 2. ВЭЖХ-анализ гидролизатов проинсулина нативным трипсином. Время гидролиза 10 (а), 25 (б) и 150 мин (в). Идентификацию продуктов пиков см. в табл. 1.

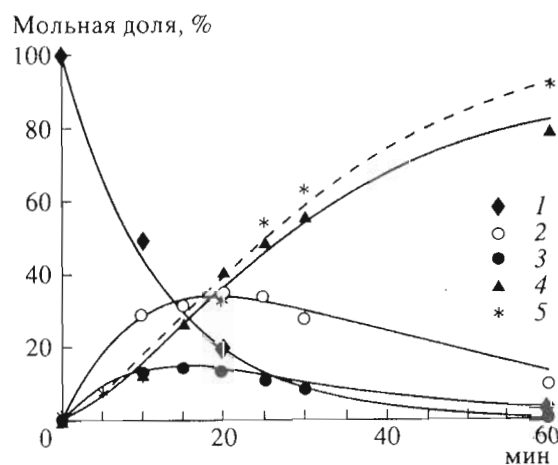


Рис. 3. Расчетные кинетические кривые накопления продуктов протеолиза проинсулина нативным трипсином: proIns (1), IntI (2), IntII (3), Ins-RR (4), PeptC-KR (5). Точки соответствуют экспериментальным аналитическим данным.

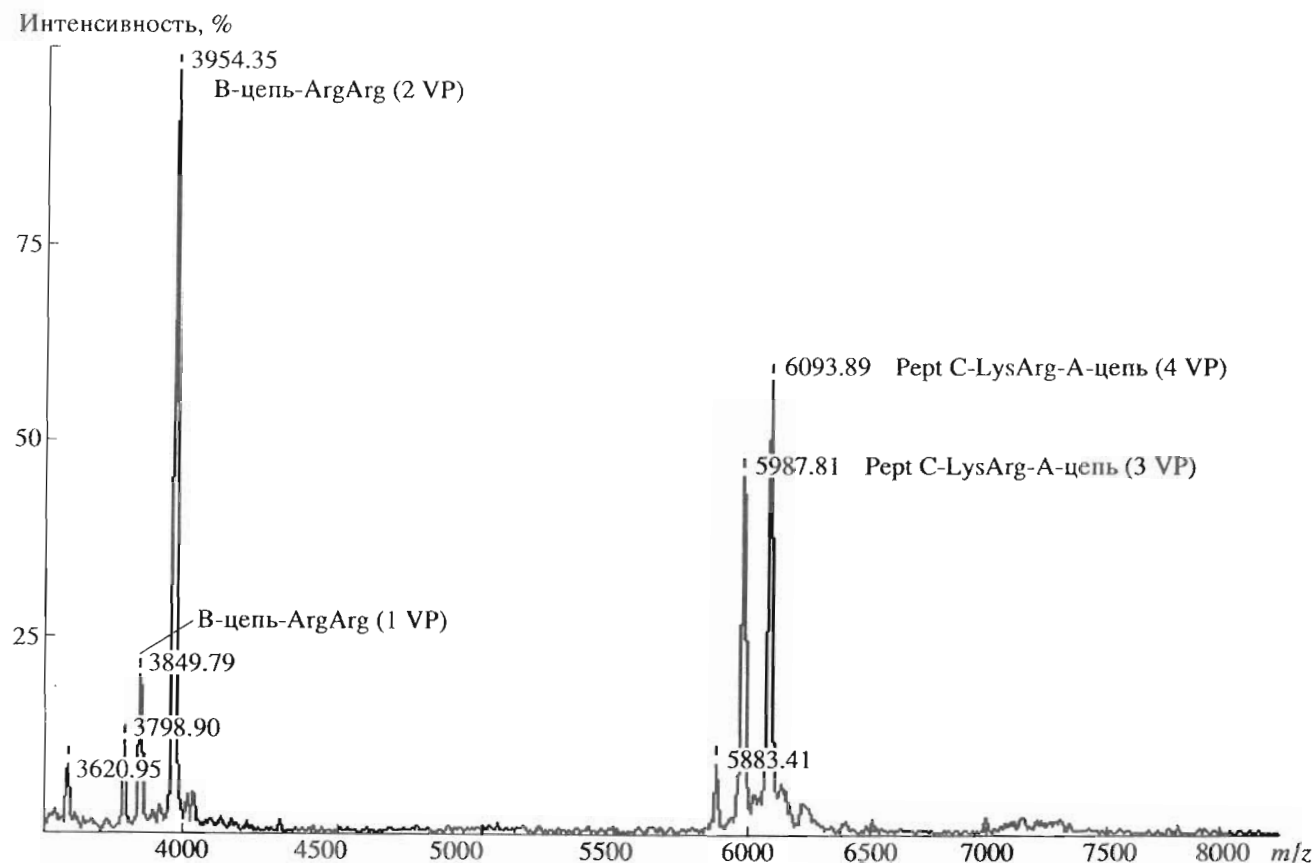


Рис. 4. Результаты масс-спектрометрического анализа (MALDI-MS) производного IntI после восстановления и алкилирования. В скобках указано количество винилпиридильных остатков (VP), модифицирующих SH-группы соответствующих фрагментов проинсулина.

Из этих уравнений при условии  $[E] = [E]_0$  для концентраций proIns, IntI, IntII, PeptC-KR и Ins-RR найдены следующие соотношения:

$$[\text{proIns}] = A_0 e^{-(k_1+k_2)t},$$

$$[\text{IntI}] = A_0 (e^{-k_2 t} - e^{-(k_1+k_2)t}),$$

$$[\text{IntII}] = A_0 (e^{-k_1 t} - e^{-(k_1+k_2)t}),$$

$$[\text{Ins-RR}] = A_0 \left\{ \frac{k_1}{k_1 - k_3} + \frac{k_2}{k_2 - k_3} + \frac{k_1 + k_2}{k_1 + k_2 - k_3} \right\} e^{-k_3 t} - \frac{k_1}{k_1 - k_3} e^{-k_1 t} - \frac{k_2}{k_2 - k_3} e^{-k_2 t} + \frac{k_1 + k_2}{k_1 + k_2 - k_3} e^{-(k_1+k_2)t},$$

$$[\text{PeptC-KR}] = A_0 \{ 1 - e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} + e^{-(k_1+k_2)t} \}.$$

В соответствии с указанными уравнениями из экспериментальных данных были найдены каталитические константы:  $k_1 + k_2$  из уравнения 1,  $k_1$  – из суммы уравнений 1 и 3, а  $k_2$  – из суммы уравнений 1 и 2, представленных в полулогарифмических координатах;  $k_3$  определяли аналогично по

убыли Ins-RR при временах реакции, когда сам проинсулин и интермедиаты были уже полностью израсходованы. С учетом абсолютной концентрации фермента найденные константы равны:  $k_1$  3.4,  $k_2$  2.1,  $k_3$  0.1  $\text{с}^{-1}$ .

Поскольку реакции образования desT-Ins и Ins-R из Ins-RR идут параллельно, по величине соотношения этих компонентов при длительных временах гидролиза удалось оценить собственно  $k_3$  и  $k_4$ , которые оказались равными соответственно 0.1 и 0.04  $\text{с}^{-1}$ . Как видно из рис. 3, кинетические кривые, построенные по найденным константам, хорошо соответствуют экспериментальным данным по текущим концентрациям отдельных компонентов в процессе трипсинолиза проинсулина.

Отметим, что единичная хроматограмма реакционной смеси, полученной в аналогичных условиях, представленная в работе [4] и обработанная нами по описанному выше методу, дает значения концентраций промежуточных продуктов, соответствующие кинетическим кривым рис. 3.

Таким образом, полученные нами кинетические зависимости позволяют предсказать соотношения концентраций образующихся продуктов

**Таблица 1.** Масс-спектрометрический анализ (ESI-MS) хроматографических пиков триптического гидролизата проинсулина (рис. 2)

Номер пика	Масс-спектрометрические данные		M, Да		Продукты
	m/z (I, %)	z	экспериментальная	расчетная	
1	1102.7 (100)	+3	3305.1	3304.8	PeptC-KR
	827.5 (58)	+4	3305.6		
2	1225.2 (27)	+5	6121.0	6120.6	Ins-RR
	1021.3 (64)	+6	6121.8		
	875.4 (82)	+7	6120.8		
	765.9 (24)	+8	6119.2		
	1193.9 (15)	+5	5964.5		
2 <sup>a</sup>	994.8 (29)	+6	5964.5	5963.9	Ins-R
	1427.9 (16)	+4	5707.6		
3 <sup>a</sup>	1142.4 (62)	+5	5707.0	5707.1	desT-Ins
	951.8 (15)	+6	5704.8		
	1177.2 (48)	+8	9409.6		
3	1046.3 (57)	+9	9407.7	9407.4	IntI
	1177.0 (24)	+8	9408.0		
4	1046.2 (36)	+9	9406.8	9407.4	IntII
	1878.5 (13)	+5	9387.5		
5	1566.0 (28)	+6	9390.0	9389.4	proIns
	1342.3 (54)	+7	9389.1		
	1174.6 (23)	+8	9388.8		

**Таблица 2.** Концентрации продуктов при протеолизе проинсулина различными формами трипсина (в % от исходной молярной концентрации проинсулина)

Форма трипсина	Время гидролиза, мин	Продукты						
		PeptC-KR	Ins-RR	Ins-R	desT-Ins	IntI	IntII	proIns
Нативный	10	10	12	0	0	30	8	48
	15	29	30	0	0	31	15	28
	20	39	41	0	0	35	15	20
	25	51	48	0	5	31	12	11
Модифицированный ВПАК	45	34	34	0	0	35	10	21
Иммобилизованный на силохроме 1.5	5.5	33	12	8	12	34	4	30
	11.5	82	9	22	51	1	3	14

при любой степени превращения субстрата и выбрать условия для получения наибольшего выхода целевого производного инсулина – Ins-RR.

Нам также представляется полезным использование полученных кинетических параметров гидролиза проинсулина трипсином для продолжения сравнительного изучения специфичности трипсиноподобных ферментов. Ранее подобное сравнительное исследование трипсина, плазмина и дуоденазы было выполнено на примере гидролиза линейной полипептидной цепи мелиттина [7].

Аналогичным образом с использованием ВЭЖХ и ESI-МС был изучен состав продуктов при гидролизе проинсулина трипсином, модифицированным ВПАК [10]. Показано, что как характер хроматограмм на разных глубинах гидролиза проинсулина, так и масс-спектры продуктов трипсинолиза не отличаются от соответствующих данных, полученных для нативного фермента. В табл. 2 приведены сравнительные данные по концентрации продуктов протеолиза проинсулина различными формами трипсина, из которых

следует, что само по себе ковалентное связывание с ВПАК, приводящее к стабилизации исходного фермента [8], не изменяет его специфичности – соотношения скоростей гидролиза отдельных стадий этого процесса остаются такими же, как и для нативного трипсина.

Иная картина наблюдается при проведении гидролиза проинсулина модифицированным таким образом трипсином, сорбированным на силохроме 1.5, т.е. иммобилизованным ферментом (табл. 2). В этом случае еще в присутствии исходного субстрата и интермедиатов IntI и IntII наблюдается появление desT-Ins, а также Ins-R, по-видимому, из Ins-RR. Такой состав реакционной смеси подтверждается также данными масс-спектрометрии (не приводятся). Таким образом, иммобилизация трипсина приводит к утрате ферментом способности к ограниченному протеолизу проинсулина. Отметим, что сам продукт Ins-R в принципе не является нежелательным в технологическом процессе, поскольку в конечном итоге получение инсулина из него, так же как и из Ins-RR, осуществляется с использованием карбоксипептидазы В. Однако образование значительного количества desT-Ins до израсходования проинсулина не позволяет рекомендовать иммобилизованный трипсин для технологического процесса.

Изменение скоростей гидролиза для отдельных стадий трипсинолиза при иммобилизации, по-видимому, следует отнести за счет уменьшения скоростей расщепления наиболее быстро гидролизуемых связей. Однако полученные данные не позволяют четко сформулировать причины столь резкого изменения в специфичности. Можно лишь определенно считать, что изменение соотношения констант скоростей первых параллельных стадий процесса не обусловлено чисто диффузионными причинами, поскольку массы как исходного субстрата, так и двух промежуточных продуктов равны. Характер гидролиза проинсулина модифицированным трипсином исключает также влияние ковалентного связывания фермента с ВПАК.

В заключение необходимо отметить, что кинетический анализ трипсинолиза не выявил различий в константах скоростей гидролиза одних и тех же пептидных связей как в исходном проинсулине, так и в его интермедиатах. Таким образом, различия в структурной организации исходного субстрата и его интермедиатов, которые безусловно должны существовать вследствие гидролиза одной из пептидных связей, не являются определяющими при трипсинолизе проинсулина.

Абсолютные значения констант скоростей гидролиза связей, образованных парами основных аминокислот проинсулина, как при первичном разрыве, так и при последующем, приводящем к образованию Ins-RR, достаточно близки величинам, полученным для трипсинолиза мелиттина. В то же

время вторичный гидролиз в В-цепи Ins-RR амидной связи изолированного остатка Lys<sup>29</sup> с образованием desT-Ins осуществляется со скоростью, на порядок меньшей. Наблюдаемый ограниченный протеолиз проинсулина следует, скорее, отнести за счет низкой скорости гидролиза связи Lys<sup>29</sup>-Thr<sup>30</sup> в В-цепи инсулина. Таким образом, наличие кластерных серий или пар основных аминокислот, характерных для ряда предшественников биологически активных пептидов [3], по-видимому, еще не является достаточным условием для протекания реакции ограниченного протеолиза с участием трипсина.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трипсин (Spofa, Чехословакия), сополимер винилпирролидона и акролеина ("Фармакон", Россия), силохром 1.5 (ГОЗ ВНИИОП, Россия), ацетонитрил ос. ч. для жидкостной хроматографии (Львовский хим. завод, Украина), TFA (Merck, ФРГ). Остальные реактивы имели квалификацию ч. Концентрацию активного фермента определяли титрованием активных центров с использованием *n*-нитрофенилгуанидинбензоата [9]. В использованном образце трипсина содержание активного белка соответствовало 45%.

Рекомбинантный проинсулин человека получен в лабораторных условиях в ИБХ РАН.

Модификацию трипсина ВПАК и иммобилизацию его на силохроме проводили как описано в работе [10]. Содержание активного трипсина в модифицированном препарате составляло 130 мг/г сополимера, в иммобилизованном – 1,6 мг активного фермента/г силохрома.

Гидролиз проинсулина проводили в 0.1 М трис-HCl-буфере, pH 8.0 (25°C), при исходной концентрации субстрата 0.25 мМ и мольном соотношении фермент-субстрат 1 : 3700. Реакцию останавливали добавлением 10% уксусной кислоты.

Гидролиз проинсулина иммобилизованным трипсином осуществляли в колонках хроматографа "Милихром", вводя в колонку 50 мкл 0.25 мМ раствора проинсулина. Время реакции регулировали скоростью подачи 0.1 М трис-HCl, pH 8.0 (15–100 мкл/мин).

ВЭЖХ гидролизатов проводили на жидкостном хроматографе "Милихром" (Россия) на колонках из нержавеющей стали (2 × 62 мм), упакованных суспензионно сорбентом Nucleosil 5 C<sub>18</sub> (Macherey Nagel, ФРГ), в градиенте ацетонитрила (от 20 до 40%) в 0.1% TFA (по объему), спектрофотометрическое детектирование осуществляли при 210 нм.

Для восстановления и последующего алкилирования S-S-связей в интермедиатах объединенные фракции, соответствующие IntI и IntII, лиофилизовали и около 150 пкмоль образца растворяли

в 200 мкл 0.5 М трис-НСl-буфера (рН 7.6), содержащего 6 М гуанидингидрохлорид, затем добавляли 5 мкл 1.4 М дитиотреита и, после выдерживания в течение 10 мин при комнатной температуре, 1 мкл 4-винилпиридина. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением 5 мкл 1.4 М дитиотреита. Избыток реагентов удаляли непосредственно перед измерением.

Концентрации идентифицированных продуктов протеолиза проинсулина оценивали по площадям хроматографических пиков с учетом молярных коэффициентов поглощения, рассчитанных по аддитивной схеме [11].

Масс-спектры продуктов протеолиза, предварительно разделенных с помощью оФВЭЖХ, анализировали на времяпролетном масс-спектрометре с электродинамическим источником ионов [12]. Аликвоту, собранную вблизи вершины хроматографического пика, разбавляли ацетонитрилом в соотношении 1 : 1 и вводили в масс-спектрометр.

Масс-спектры реакционных смесей, полученных алкилированием после предварительного восстановления S-S-связей, без дополнительного фракционирования снимали на масс-спектрометре Reflex TOF (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Германия) в линейной моде. Пробу в объеме 1 мкл помещали на мишень с предварительно нанесенной в объеме 1 мкл матрицей (циано-4-гидроксикоричная кислота, 20 мкг/мкл). Мишень с нанесенной пробой перед измерениями дважды промывали без обессоливания 10 мкл 0.1% TFA.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zener B., Bond R.P.M., Bender M.L. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. P. 36–74.
2. Mirgorodskaya E.P., Mirgorodskaya O.A., Dobretsov S.V., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Kozlovskiy V.I., Raznikov V.V. // Anal. Chem. 1995. V. 67. P. 2864–2869.
3. Лобарева Л.С., Степанов В.М. // Успехи соврем. биологии. 1983. Т. 95. С. 209–224.
4. Howard W., Davidson J., Hutton C. // J. Biochem. 1987. V. 245. P. 575–582.
5. Березин И.В., Антонов В.К., Мартинек К. Иммуобилизованные ферменты. М.: МГУ, 1976. С. 7–9.
6. Docherty K., Steiner D.F. // Ann. Rev. Physiol. 1982. V. 44. P. 625–687.
7. Mirgorodskaya O., Kazanina G., Mirgorodskaya E., Matveev V., Tiede B., Khaitlina S. // Protein Pept. Lett. 1996. V. 3. P. 81–88.
8. Богачева Т.И., Миргородская О.А., Москвичев Б.В. // Биохимия. 1977. Т. 7. Вып. 10. С. 609–615.
9. Chase T., Shaw E. // Methods Enzymol. 1970. V. 19. P. 20–27.
10. Иванова Г.П., Миргородская О.А., Москвичев Б.В. // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. С. 92–97.
11. Yang C.-Y., Pownall H.J., Gotto A.M. // Anal. Biochem. 1985. V. 145. P. 67–72.
12. Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Miroshnikov A.I. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 99–107.

## Proteolysis of Human Proinsulin Catalyzed by Native, Modified, and Immobilized Trypsins

O. A. Mirgorodskaya, G. A. Kazanina, E. P. Mirgorodskaya, A. A. Shevchenko, K. V. Mal'tsev\*, A. I. Miroshnikov\*, and P. Roipstorff\*\*

*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064, Russia*

*\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

*\*\*Odense University, Denmark*

**Abstract**—Proteolysis of recombinant human proinsulin by the native trypsin, by trypsin modified with a copolymer of vinylpyrrolidone and acrolein, and by the same modified trypsin immobilized on Silochrom 1.5 was studied by RP HPLC and mass spectrometry. Rate constants of the main stages of proinsulin hydrolysis by the native trypsin were estimated. The values of rate constants of the digestion of the most easily hydrolyzable bonds (those formed by the pairs of the basic amino acid residues) in proinsulin were found to be of the same order as those formed by the separate lysine residues (Lys<sup>7</sup>) and those formed by the four basic amino acid residues of the C-terminal cluster of melittin. It was established that covalent trypsin binding to the copolymer did not change the ratio of the rate constants of the individual stages of proinsulin hydrolysis, whereas after the immobilization of modified trypsin on the Silochrome, the formation of diarginyl insulin-ArgArg, intermediate forms of hydrolyzed insulin, and desThr-insulin proceeds with comparable rates.

*Key words: trypsinolysis, proinsulin, modified trypsin, immobilized trypsin, kinetic parameters, mass spectrometry.*