

КЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

УДК 612.015 (088.8)

©Коллектив авторов

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНСУЛИНА И МЕХАНИЗМА ЕГО ДЕЙСТВИЯ

В.Н. Прозоровский, П.Г. Лохов, Д.Л. Маслов, О.М. Ипатова

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10 факс (095) 245-0857.

На основании результатов собственных исследований, а также анализа и обобщения литературных данных обсуждается возможный механизм взаимодействия молекулы инсулина с рецептором. Выявлены локализованные в 3D-структуре гормона центры связывания с рецептором.

В статье рассматривается также важнейшая роль реакций тиолдисульфидного обмена между инсулином и рецептором в активации внутриклеточного домена тирозинкиназы и включении дальнейшего каскада внутриклеточных реакций, ответственных за передачу сигнала внутри клетки.

Наряду с известным механизмом трансдукции сигнала инсулина, приводящим к активации тирозинкиназы рецептора, обсуждается существование механизма трансдукции сигнала инсулина внутри клетки, опосредованного инсулин связывающими белками цитозоля.

Кроме того, рассматривается путь внутриклеточной деградации инсулина в процессе трансдукции сигнала, опосредованного инсулин деградирующим ферментом.

Ключевые слова: инсулин, рецептор инсулина, тиоредоксиновый домен, инсулин связывающие белки цитозоля, инсулин деградирующий фермент.

Инсулин является одним из наиболее изученных белков. Накоплен обширный материал по строению, физическим, химическим и биологическим свойствам этой молекулы. Инсулин является первым гормоном белковой природы с расшифрованной первичной структурой, выделенным в гомогенном виде и полученным в виде кристалла. Он был также получен методами химического синтеза и генной инженерии. Инсулин имеет большое значение в качестве лекарственного средства для лечения сахарного диабета, которым, по данным ВОЗ, болеет 0,5-1% населения земного шара и примерно столько же предрасположены к этому заболеванию. Инсулин - первый рекомбинантный белок, который был использован в клинической практике. К настоящему времени разработан и получен широкий спектр различных лекарственных форм этого гормона, обладающих как быстрым, так и пролонгированным действием, разной активностью и т.д.

Хорошо известна и биологическая роль инсулина, связанная с трансдукцией сигнала в клетку. Однако сам механизм трансдукции до конца не изучен и до настоящего времени привлекает пристальное внимание исследователей.

Сигнальная система инсулина включает в себя три основных компонента:

инсулин (и его секрецию) (I), рецептор (II) и сопряженные с рецептором белки, реализующие сигнал инсулина внутри клетки (III). Нарушения в компонентах сигнальной системы инсулина приводят к развитию сахарного

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

диабета. Различают два основных типа диабета - диабет 1-го и диабет 2-го типа. В основе инсулин-зависимого сахарного диабета (диабет 1-го типа) лежит недостаточность инсулина в организме, связанная либо с нарушением его биосинтеза, либо с нарушением его структуры вследствие патологических мутаций в синтезированной молекуле. Так, например, недостаток инсулина в организме вследствие деструкции панкреатических β -клеток, приводит к развитию диабета 1-го типа (инсулин-зависимый диабет). Развитие диабета 2-го типа (инсулин-независимого) на фоне достаточного количества гормона связано, главным образом, с резистентностью клеток-реципиентов к инсулину, возникшей по целому ряду причин.

Известно, что в норме связывание инсулина с внеклеточным доменом инсулинового рецептора (ИР) в конечном итоге приводит к фосфорилированию и активации тирозинкиназы (ТК) внутриклеточного цитоплазматического домена рецептора. Далее внутриклеточный сигнал от ИР опосредуется первоначально через специфическое фосфорилирование тирозиновых остатков в белках-субстратах семейства ИР, таких как 185 кД белок (ИРС-1), которые, в свою очередь, связываются с различными SH₂-домен-содержащими белками [1]. Это, в свою очередь, приводит к активации целого ряда внутриклеточных белков, таких как фосфолипаза С- γ , фосфатидилинозитол-3-киназа, GTPаза активируемый белок, p135cas, p21ras, Raf-1-киназа и MAP-киназа [2]. Существует несколько путей внутриклеточной передачи сигнала, основанной на фосфорилировании тирозиновых остатков в белках-субстратах. Например, взаимодействие ИРС-1 с фосфатидилинозитол-3-киназой в конечном итоге приводит к активации сигнального пути, способствующего усилению транспорта глюкозы в клетку [3]. Этот путь связан с регулируемой инсулином системой транспорта глюкозы (GLUT4), в результате чего происходит высвобождение GLUT4 белков из внутриклеточного пула и их транслокация в плазматическую мембрану. Другой путь реализации сигнала инсулина связан с увеличением ферментативной активности гликогенсинтазы [4]. Кроме того, необходимо отметить, что метаболический эффект трансдукции сигнала инсулина проявляется в его действии на липидный обмен, синтез белка, синтез ДНК и дифференцировке клеток и т.д. [1]. Неудивительно, что такой широкий спектр в случае нарушения трансдукции сигнала приводит к развитию целого ряда патологий, таких как диабет, нейропатии, ретинопатии, сердечно-сосудистые заболевания и т.д.

Таким образом, трансдукция сигнала инсулина в клетку представляет собой сложнейшую цепь вне и внутриклеточных взаимодействий, часть из которых до настоящего времени неизвестна. В связи с этим, целью настоящей работы является обобщение и анализ накопленных в мировой литературе данных, выявление обнаруженных закономерностей и на их основании предположение основных, важнейших условий вне и внутриклеточной трансдукции сигнала инсулина.

Выявление центров взаимодействия инсулина с рецептором.

Анализ данных литературы показал, что для выявления центров взаимодействия инсулина с рецептором и непосредственно аминокислотных остатков, ответственных за связывание инсулина использовали в основном три подхода:

- анализ связывания с рецептором и проявление биологической активности обнаруженных природных мутантных форм инсулина, и полученных направленным мутагенезом его рекомбинантных форм;
- синтез и анализ действия химически реконструированных форм инсулина (замена того или иного остатка в соответствующей позиции);
- синтез и анализ действия пептидов и отдельных минимальных фрагментов молекулы гормона.

Анализируя данные по взаимодействию инсулина с рецептором, многими исследователями отмечена, прежде всего, важность вовлечения остатков 22-26 β -цепи инсулина как во взаимодействие с рецептором, так и в образование димера

инсулина, полагая, что данный район должен взаимодействовать с такой структурой в составе рецептора, которая напоминает поверхность контакта в димере инсулина.

Данные по мутантным инсулинам [5] и по различным полусинтетическим аналогам [6 - 8] подтверждают важность С-концевого района В-цепи инсулина с акцентированием внимания на Phe (B24) и Phe (B25), как наиболее аффинных в инсулин-рецепторном взаимодействии. Так, удаление B26-B30 лишь в незначительной степени уменьшает сродство к рецептору [9], в то время как, des-B25-B30 инсулин обладает сниженной в 500 раз аффинностью [10].

Интересно отметить, что аминокислотная последовательность Gly (B23)-Phe (B24)-Phe (B25)-Tyr (B26) является неизменной в ходе эволюции животных.

Исключение составляют акула и нутрия, у которых Phe (B25) заменен на Tyr [11,12]. Эти данные позволили предположить, что аминокислотные остатки глицина (B23), фенилаланина (B24 и B25) и тирозина (B26) формируют активную область молекулы инсулина. Кристаллографический анализ 2-Zn гексамера инсулина показал, что Phe (B24), Phe (B25), Tyr (B26) на С-конце В-цепи с Val (B12) и Tyr (B16) образуют кластер инвариантных гидрофобных остатков на поверхности мономера инсулина, ответственный за взаимодействие с рецептором [13]. Домен, образованный Phe (B24), Phe (B25), Tyr (B26) формирует димер со второй молекулой инсулина в 2-Zn гексамерной форме. Причем Phe (B24) и Tyr (B26) располагаются вдоль мономер-мономерной поверхности таким образом, что являются наиболее защищенными от растворителя.

Попытки замены Phe (B24) на другой неароматический аминокислотный остаток ведут к резкому снижению биологической активности. Так, Ala (B24)-инсулин проявляет лишь 2% биологической активности нативного инсулина [14,15]. Авторы делают вывод о невозможности замены Phe (B24) боковой цепи молекулы без снижения рецепторного связывания в результате изменения оптимальной конформации инсулинового мономера. Вместе с тем, замена L-Phe (B24) на D-Tyr или D-Phe не приводят к изменению активности гормона [16 - 18]. Это свидетельствует о том, что L-Phe-(B24) не участвует непосредственно в лиганд-рецепторном взаимодействии, а играет важную роль в формировании оптимальной конформации главной цепи молекулы инсулина.

Многочисленные попытки заменить Phe в позиции B25 на неароматические аминокислоты или оптический антипод приводили к практически полной потере рецепторной аффинности. Так, аналог (Asp (B25) инсулин) обладает 0,05% аффинности инсулина, (Leu (B25) инсулин) - 1%, а (D-Phe (B25) инсулин) - около 5% [19,20]. Полученные данные свидетельствуют о наличии безусловного соответствия определенной конформации обсуждаемого участка молекулы инсулина успешному рецепторному связыванию.

Ниа и др., [21] получили неприродный аналог с измененным положением дисульфидных связей A7- A11, A6- B7 (вместо A6-A11 и A7-B7 как у нативного инсулина), оставив дисульфидную связь в позициях A20-B19 без изменений, сохранив, таким образом, количество дисульфидных связей. Полученный изомер приобрел ряд существенных конформационных изменений (изменилась конфигурация N-конца А-цепи, на 30 градусов произошло смещение α -спирали А-цепи (A12-A18) относительно α -спирали В-цепи (B9-B19)). Но, поскольку подобные изменения принципиально не повлияли на пространственную ориентацию С-концов А- и В-цепей (вследствие сохранения A20-B19 дисульфидной связи) и рецептор связывающая поверхность в этом районе оказалась мало измененной, полученный неприродный аналог сохранил аффинность к рецептору. Таким образом, данная дисульфидная связь (A20-B19) необходима для придания оптимальной пространственной ориентации С концов А- и В-цепей инсулина в организации полноценного активного центра.

Несомненно ценной информацией явились данные по заменам аминокислотных остатков в интересующих нас районах, вызванных точечными

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

мутациями. К примеру, изучено 10 семей, которые имеют одного или более членов с точечными мутациями в гене, кодирующем инсулин [22]. Оказывается, что в шести случаях секретируется биологически дефектная молекула инсулина из-за замен в А- и В-цепях. Мутации, приводящие к заменам Phe (B24) на Ser (Лос-Анжелесский инсулин), Phe (B25) на Leu (Чикагский инсулин) влекут за собой резкое снижение биологической активности до 0,5-2% и 1% соответственно [23 - 25]. Как следствие этого - наличие синдрома невыраженного диабета или непереносимости глюкозы, который наследуется по аутосомально-доминантному типу и ассоциирован с гиперинсулинемией. Исходя из низкой активности Лос-Анжелесского инсулина, можно заключить, что привнесенная гидрофильность в гидрофобную часть конца В-цепи критически снижает функциональные свойства молекулы. Подтверждением этому служит тот факт, что искусственно полученный аналог с Ser B25 обладает активностью 1-4% [26].

Кроме того, установлено, что наличие остатка аргинина в позиции B22 также необходимо для проявления биологической активности [27]. Замена его на L-орнитин и L-лизин оставляет соответственно 25% и 20% биологической активности инсулина. Приведенные результаты свидетельствуют о необходимости гуанидиновой группы Arg для проявления биологического эффекта. Другие же группы, способные в какой-то мере имитировать функции гуанидиновой группы аргинина (ϵ -аминогруппа лизина, аминогруппа орнитина), не оказывают подобного действия. С другой стороны, известен вид дикобраза *Hystrix cristata*, который имеет необычную для других видов замену аргинина в положении B22 на аспарагиновую кислоту. Биологическая активность такого инсулина составляет 43% от активности нативного бычьего [28]. Следовательно, нельзя однозначно утверждать о необходимости гуанидиновой группы Arg в положении B22 для проявления биологического эффекта.

Укороченные пептидные аналоги В-цепи инсулина, не содержащие ароматические аминокислоты B24-26, после комбинации с природной А-цепью инсулина проявляют слабую активность (<4%) [29-31]. Еще раз отметим, что аминокислотная последовательность Gly(B23) -Phe(B24) -Phe(B25) -Tyr(B26) является неизменной в ходе эволюции животных, поэтому авторами [32,33] были синтезированы пептидные фрагменты Arg-Gly-NH₂, Arg-Gly-Phe-NH₂, Arg-Gly-Phe-Phe-NH₂, соответствующие этому району В-цепи инсулина. Ими обнаружено, что такие пептиды обладают биологической активностью *in vitro* (активность увеличивается по мере роста цепи). Были получены аналоги в виде амидов, метиловых эфиров, свободных карбоксилов. Показано, что биологическая активность снижается в ряду амиды > метиловые эфиры > свободные карбоксилы. Добавление аминокислотного остатка тирозина (Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH₂) приводит к значительному увеличению биологической активности: Arg-Gly-NH₂ - 14%; Arg-Gly-Phe-NH₂ - 36%; Arg-Gly-Phe-Phe-NH₂; Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH₂ - 61%. Кроме того, было показано, что синтетический тетрапептид В-цепи инсулина Arg-Gly-Phe-Phe-NH₂ обладает инсулиноподобной биологической активностью, но при связывании с рецептором не активирует ТК рецептора. К сожалению, основная часть экспериментов с теми или иными аналогами инсулина выполнена без оценки активации ТК инсулинового рецептора, а выводы сделаны только на основе данных по утилизации глюкозы, синтезу гликогена и т.д. или по связыванию с рецептором. Поэтому можно сделать предположение, что вышеупомянутые синтетические пептидные фрагменты инсулина могут быть интернализированы в клетку в комплексе с рецептором без активации ТК рецептора, а их инсулиноподобная биологическая активность связана уже с его действием непосредственно внутри клетки [34].

Установлено, что не только С-концевые аминокислотные остатки В-цепи, но и С-концевые остатки А-цепи играют важную роль в экспрессии биологической активности гормона. Энзиматическое удаление Asn (A21) и Ala (B30) аминокислотных остатков из молекулы инсулина воздействием карбоксипеп-

тидазой А, приводит к получению аналога инсулина (des-Asn (A21) и des-Ala (B30)), имеющего сниженную активность [35]. Детальный анализ 3D-структуры аналогов инсулина с заменой Asn (A21) на остатки аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аланин и глутамин указывает на то, что все эти замены приводят к нарушению взаимодействия с рецептором и нарушению взаимодействия с фенилаланином B25 и соответственно к изменению "активной конформации" в С-концевом сегменте инсулина [36].

На основе всех вышеперечисленных данных нами было установлено, что один из районов связывания гормона с рецептором сформирован на С-концевых участках А-цепи (20-21) и В-цепи (19-26) инсулина, пространственно сближенных между собой и формирующих область одного из активных центров гормона. Используя программу визуализации пространственной структуры инсулина (ONIX, IBMX RAMH), были помечены эти аминокислотные остатки и выявлено расположение их в структуре инсулина (рис.1, 2, центр связывания 1).

В дальнейшем нами был проведен синтез низкомолекулярного пептидного аналога инсулина - фрагмента инсулина (ФИ), состоящего из дипептида Cys-Asn А-цепи и Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr октапептида В-цепи, соединенных между собой дисульфидной связью. Результаты тестов на биологическую активность ФИ представлены на рис. 3 (А, Б). Показано, что как ФИ, так и коммерческий тетрапептид В22-В25 достоверно увеличивали (хотя в меньшей степени, чем инсулин) скорость встраивания [14 C] глюкозы в гликоген адипоцитов крысы. Количество [14 C] глюкозы, встроенной в гликоген, в течение 20 мин оценивалось по отношению к контролю как 185, 155 и 125% для инсулина, ФИ и тетрапептида соответственно. Также исследовалось влияние ФИ на поглощение [14 C] глюкозы. Оба пептида достоверно усиливают поглощение [14 C] глюкозы, причем ФИ в большей степени, чем тетрапептид. При концентрации 0,1 мкМ, тетрапептид не влиял на поглощение глюкозы, в то время как ФИ усиливал поглощение на 180% по отношению к контролю. При более высокой концентрации (1 мкМ) поглощение [14 C] глюкозы усиливалось тетрапептидом и ФИ до 150% и 305% соответственно.

Таким образом, наряду с описанными в литературе синтезированными пептидами, созданный нами новый синтетический фрагмент инсулина, состоящий из дипептида и октапептида, соединенных дисульфидной связью, имеет хотя и слабую инсулиноподобную биологическую активность, но все же сравнимую с таковой у нативного гормона. Полученные результаты указывают на возможность хотя бы частичной замены целой молекулы инсулина относительно маленьким его фрагментом с имитацией функциональных свойств [37].

Как уже было отмечено выше, синтезированный фрагмент инсулина не воспроизводит полной биологической активности гормона, т.к. не активирует ТК инсулинового рецептора. Однако непонятно как без активации ТК инсулинового рецептора ФИ (синтетические фрагменты инсулина) способны проявлять пусть даже низкую инсулиноподобную биологическую активность. По всей видимости, ответ на этот вопрос может быть получен при анализе механизмов трансдукции сигнала инсулина.

Как уже отмечалось ранее, консервативные районы А-цепи инсулина имеют также большое значение для связывания с рецептором и проявление биологической активности. Так, полученный аналог инсулина des-A1 глицин инсулин не обладает биологической активностью [38]. Установлено, что N-концевая последовательность А-цепи входит в центр связывания инсулина с рецептором и замены в ней приводят к резкому снижению биологической активности инсулина [39]. Так, замена А2 изолейцина на норлейцин в этой позиции приводит к значительным изменениям в связывании с рецептором и проявление биологической активности такого аналога по сравнению с нативным инсулином составляет 0,6% и 0,9% соответственно. Более того, Okada и др. считают, что нарушения в α -спиральном сегменте А2 -А8 приводят к изменениям

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

в местоположении остатков A1, A5, A19, которые непосредственно вовлечены в связывание с рецептором [40]. Аналоги инсулина, содержащие Gly (A2) и Ala (A2), имеют активность 0,05% и 0,4% соответственно. Считается, что Ile (A2) взаимодействует с фенольным кольцом Tyr (A19) и это необходимо для взаимодействия с рецептором [41]. Замена изолейцина в позиции A2 на валин также приводит к значительному снижению биологической активности инсулина до 20% [42]. Мутация, приводящая к замене Val (A3) на Leu (A3) (инсулин Якаума) влечет за собой резкое снижение биологической активности гормона до 0,14%.

Замены валина в позиции A3 и тирозина в позиции A19 на триптофан приводят к значительному снижению в связывании с рецептором таких аналогов инсулина (3% и 0,7% соответственно), а также к снижению биологической активности по сравнению с аналогичными заменами в позициях A10, A13, A14, A15 [43]. Аналоги инсулина с метилированными остатками изолейцина в позиции A2 и валина в позиции A3 также теряют способность к связыванию с рецептором (2,3% и 1,0% соответственно) и обладают слабой биологической активностью (4,6% и 2,1%) по сравнению с нативным инсулином [44]. Таким образом, эти остатки аминокислот (A2 и A3) определенно ответственны за связывание с рецептором [45].

Необходимо отметить, что остаток тирозина в позиции A19 также является строго консервативным в молекуле инсулина и замена его на ароматические остатки (фенилаланин или триптофан) приводит к значительному снижению способности таких аналогов к связыванию с рецептором и проявлению биологической активности [46-48].

В последние годы ряд работ посвящен изучению механизмов взаимодействия рецептора с молекулой проинсулина. Проинсулин является слабым агонистом инсулина и его активность связывания с рецептором составляет лишь 2% по отношению к инсулину. Значительное увеличение этой активности наблюдается у производных проинсулина со свободным N-концом А-цепи (14-22%) [49,50]. Считается, что N-концевой остаток глицина со свободной α -аминогруппой также важен для связывания инсулина с рецептором и проявления им биологической активности [51]. Любопытным является факт, обнаруженный для искусственного минипроинсулина -одноцепочечный полипептид M2P1, в котором В-цепь инсулина соединена с α -цепью посредством короткого пептида. Такой минипроинсулин имеет активность связывания с рецептором ровно 50% по сравнению с нативным инсулином [52]. Естественно, что в таком проинсулине один центр связывания, в который входит концевой глицин А-цепи инсулина, не взаимодействует с рецептором, в то время как связывание с рецептором этой молекулы происходит за счет второго центра (С-концевые районы А- и В-цепи).

И, наконец, еще одним остатком, участвующим в организации центра связывания с рецептором, является Gln (A5) [41]. Замены аминокислотного остатка глутамина в этой позиции также приводят к значительному снижению как биологической активности инсулина, так и способности связываться с рецептором.

Анализ данных литературы позволяет предположить, что еще один район связывания гормона с рецептором сформирован N-концевой областью А-цепи (A-1,2,3,5) и С-концевым тирозином (A19) инсулина, пространственно сближенных между собой и формирующих дополнительную область активного центра гормона, которая была локализована нами также с помощью компьютерной программы визуализации пространственной структуры молекулы инсулина (ONIX), рис.1, 2 (центр связывания 2).

Ясно, что различные вышеупомянутые синтетические пептидные фрагменты взаимодействуют только с одним центром связывания рецептора и поэтому не способны вызвать активацию его ТК. Проявление в той или иной мере биологической активности таких аналогов не связано с активацией рецепторной ТК и дальнейшей трансдукцией сигнала по основному пути как для нативного инсулина, а, скорее всего, является результатом трансдукции сигнала,

опосредованного внутриклеточными инсулин связывающими белками цитозоля, вероятно, способными связывать и синтетические пептиды, и фрагменты инсулина.

Таким образом, в настоящее время в инсулине выявлены практически все аминокислотные остатки, непосредственно ответственные за связывание гормона с рецептором (рис.1). Аминокислотные остатки, участвующие в связывании с рецептором обнаружены как в А-цепи инсулина, так и в В-цепи. Обращает на себя внимание тот факт, что все они, как правило, обнаружены в строго консервативных районах молекулы. Используя программу визуализации пространственной структуры инсулина (ONIX), эти аминокислотные остатки были помечены и выявлено их расположение в структуре. Это позволило установить, что наиболее важные для связывания с рецептором аминокислотные остатки инсулина группируются в двух, четко различных районах. Так G-23, F-24, F-25, Y-26 В-цепи и N-21 А-цепи формируют центр связывания инсулина с рецептором, условно обозначенный как 1, рис. 1, а остатки G-1, I-2, V-3, Q-4, Y-19 А-цепи формируют второй центр связывания (2) (рис. 2.)

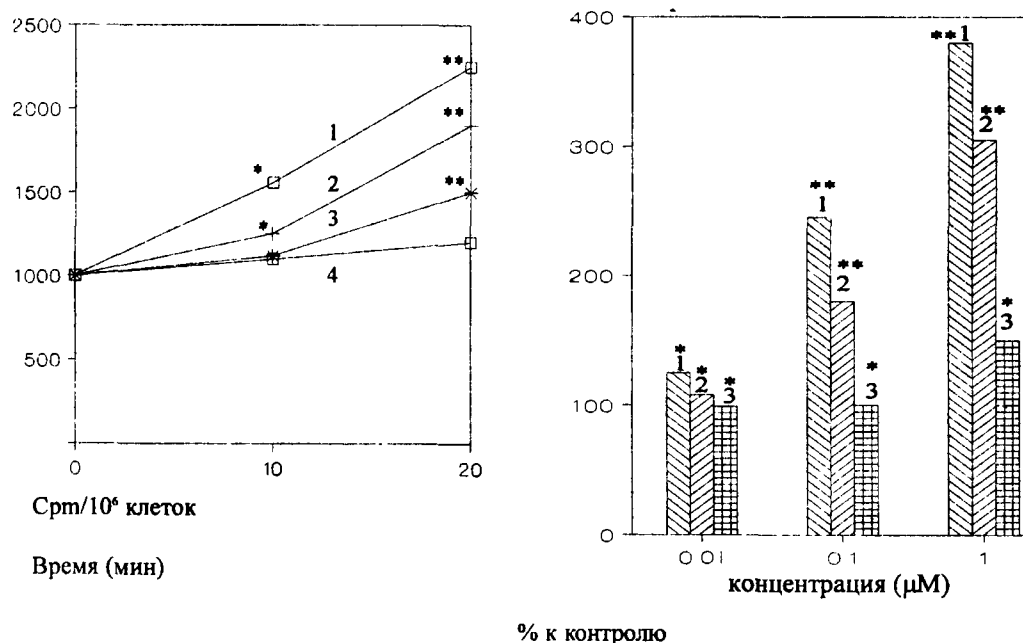


Рисунок 1

Первичная структура инсулина человека.

Н аминокислотные остатки, принимающие участие в связывании инсулина с рецептором.

Следует отметить, что район 2 содержит N-концевой остаток глицина со свободной α-аминогруппой (заряд +), а район 1 содержит С-концевой остаток аспарагина с карбоксильной группой (заряд-). Возможно, что такое распределение зарядов на концевых аминокислотных остатках двух различных районов способствует ориентации молекулы инсулина при взаимодействии с рецептором. Обнаруженные для инсулина районы связывания с рецептором указывают на то, что и в рецепторе инсулина должны присутствовать также два района для связывания одной молекулы гормона.

Механизм взаимодействия инсулина с рецептором.

Координация физиологической функции клеток многоклеточных организмов осуществляется с помощью сигнальных лигандных молекул и их взаимодействия со специфическими рецепторами поверхности клеток-мишеней, воспринимающих

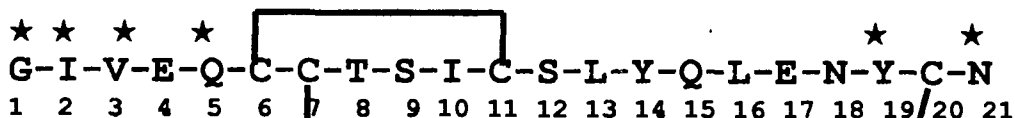
СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

этот сигнал. Такие рецепторы поверхности клеток-мишеней осуществляют трансдукцию сигнала лигандной молекулы через клеточную мембрану и инициируют целый каскад последующих реакций внутри клетки, приводящий к соответствующим физиологическим эффектам у клеток-мишеней. Механизм взаимодействия ряда лигандов с соответствующими рецепторами, получаемыми в кристаллическом состоянии, был выявлен, в основном, благодаря применению методов кристаллографии. Но исследование механизма взаимодействия и трансдукции сигнала через клеточную мембрану, опосредованное мембраносвязанными рецепторами, к которым относится и инсулиновый рецептор, до настоящего времени вызывает значительные затруднения. Для решения таких задач исследователи используют другие методологические подходы. Так, сравнительно недавно методом электронной микроскопии была сделана попытка расшифровки 3D-структуры комплексов инсулинового рецептора с инсулином [53]. В результате этих исследований были установлены не только некоторые детали взаимодействия инсулина с рецептором, но также получены и определенные сведения о механизме трансмембранной передачи сигнала [54].

Существование мембранного рецептора, специфического для инсулина (ИР), было постулировано еще 30 лет тому назад [55], а в 1985 г. была расшифрована его первичная структура [56]. ИР (480 кДа) является трансмембранной тирозинкиназой (ТК) и состоит из двух гетеродимеров, соединённых дисульфидными связями. Каждый из гетеродимеров представлен α - и β -субъединицами. α -субъединицы ИР составляют внеклеточный примембранный димер, связывающий инсулин. β -субъединицы образуют внутриклеточный цитоплазматический примембранный димер с потенциальной тирозинкиназной активностью [57,58]. В результате связывания инсулина с внеклеточным димером (α -цепи ИР) происходит аутофосфорилирование специфических тирозиновых остатков в цитоплазматическом димере рецептора или, другими словами, активация ТК и инициация каскада внутриклеточной трансдукции сигнала инсулина [59,60]. Еще в 1976 г. была предсказана теоретическая модель молекулы ИР, в которой обе α -субъединицы, образующие внеклеточный примембранный димер, участвуют в высокоаффинном связывании инсулина. А в 1999 г. были получены первые экспериментальные доказательства высокоаффинного связывания **только одной молекулы инсулина двумя α -субъединицами рецептора** [53]. Связывание этой единственной молекулы инсулина происходит в результате контакта богатого цистеином L1 района одной α -субъединицы рецептора и L-2 района другой α -субъединицы. Эти данные хорошо подтверждаются исследованиями по связыванию инсулина мономерным рецептором [61], в которых показана отрицательная кооперативность и низкая аффинность связывания гормона. Установлено, что связывание единственной молекулы инсулина приводит к конформационным изменениям во внутриклеточном примембранном димере (ТК) рецептора, приводя его в активную форму и делая доступным для фосфорилирования тирозин 1162 β -субъединиц.

Таким образом, выявленные нами два района (рис. 2) в молекуле инсулина находятся в соответствии с данными о связывании гормона с разными областями в каждой α -субъединице внеклеточного примембранного домена рецептора. Только такое связывание является высокоаффинным, оно приводит к активации внутриклеточного ТК домена рецептора, дальнейшему каскаду трансдукции сигнала инсулина и проявлению полной биологической активности гормона. Именно в свете этих знаний и данных о взаимодействии инсулина с рецептором следует рассматривать многочисленные результаты различных исследований, посвященных определению связывания и биологической активности: проинсулина, различных мутантных и рекомбинантных форм молекулы гормона, химически реконструированных его форм, отдельных фрагментов и пептидов, веществ, в той или иной мере имитирующих действие инсулина. Понимание существования двух центров связывания как в самом инсулине, так и в его

А-цепь



В-цепь

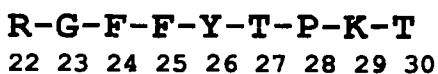
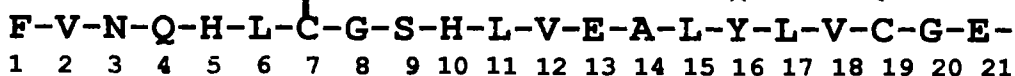


Рисунок 2

Центры связывания с рецептором в молекуле инсулина

1- (Гли-1А, Иле-2А, Вал-3А, Гли-5А, Тир-19А). 2- (Гли-23В, Фен-24В, Фен-25В, Тир-26В, Асп-21А)

рецепторе, необходимо как для правильной оценки уже полученных данных, так и для постановки и определения перспективы дальнейших целей и задач. Например, поиск пептидов для связывания в каждом центре рецептора не лишен смысла, однако эти синтезированные фрагменты или выявленные пептидомиметики должны быть объединены в единую молекулу, обеспечивающую их необходимую пространственную конфигурацию и высокоаффинное связывание. Кроме того, необходимо учитывать, что связывание пептидов или пептидомиметиков с рецептором должно приводить обязательно к активации рецепторной тирозинкиназы. Например, проинсулин способен связываться с рецептором за счет только одного центра связывания (второй центр образуется в результате созревания инсулина вследствие протеолиза и высвобождения С-пептида), но к активации ТК не приводит. Поэтому проинсулин не обладает биологической активностью самого инсулина. Аналогично, как было показано выше, мутантные формы инсулина, химически модифицированные молекулы гормона с заменой той или иной функционально важной для связывания с рецептором аминокислотой, синтетические пептиды и фрагменты, имитирующие только один центр связывания, несмотря на связывание с рецептором, полной биологической активностью нативного инсулина не обладают.

Однако необходимо отметить, что связывание нативного инсулина с рецептором приводит к значительным структурным изменениям, которые способны изменить конформацию в цитозольном домене рецептора с активацией ТК. Такие конформационные изменения осуществляются, как показали исследования [53], с разрывом одной из дисульфидных связей между α -субъединицами рецептора. Предполагается, что в этой связи участвует один из остатков цистеина α -субъединицы в позиции 682, 683 или 685, в так называемом встроенном домене (insert domain, α -662-719), с не установленной пространственной структурой. Возникает вопрос, каким же образом может произойти перераспределение дисульфидных связей в молекуле рецептора, восстановление межсубъединичной и образование внутрисубъединичной дисульфидной связи? По всей видимости, этот процесс возможен только в результате реакции тиолдисульфидного обмена.

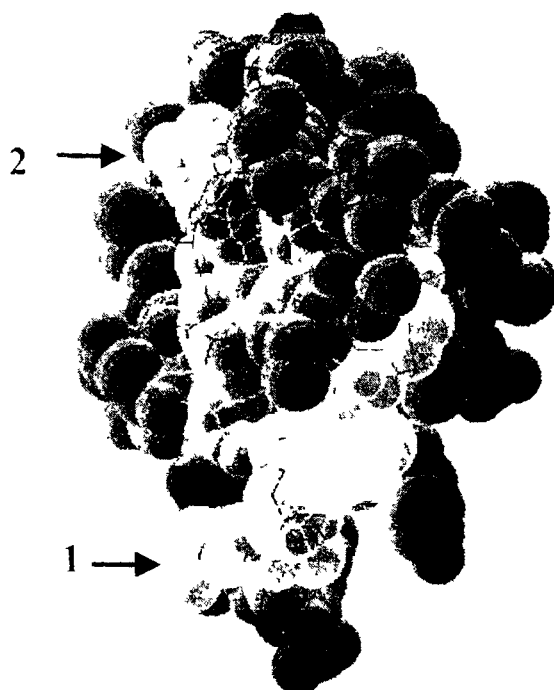


Рисунок 3

Биологическая активность фрагмента инсулина (ФИ)

А Действие ФИ на синтез гликогена в адипоцитах крысы

1 - инсулин 2 - ФИ, 3 - тетрапептид, 4 - контроль (концентрации 1 мМ) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Б Влияние ФИ на поглощение $[^{14}C]$ глюкозы клетками L-929 1 - инсулин 2 - ФИ

3 - тетрапептид * - $p < 0,01$ ** - $p < 0,001$

Такие серьезные конформационные изменения при взаимодействии инсулина и рецептора (реакции тиодисульфидного обмена) приводят к структурным изменениям в самом рецепторе и к активации ТК его цитозольного домена. Данные литературы подтверждают, что в целом активность рецептора связана с окислительно-восстановительным состоянием самой молекулы [62,63]. Логично предположить, что реакции тиодисульфидного обмена между инсулином и рецептором возможны, если в рецепторе имеется домен с дисульфидной изомеразной активностью.

Для выявления домена, обладающего дисульфидизомеразной активностью, нами был проведен сравнительный анализ первичных структур α -субъединиц рецептора (аминокислотные остатки 662-719), и тиоредоксиновых доменов белковой дисульфидизомеразы. Такой анализ (выравнивание первичных структур) позволяет выявить наличие тиоредоксино-подобного домена в λ -цепи рецептора (рис. 4). Как показано на рис. 4, остатки цистеина в позициях 682 и 685 входят в каталитический центр тиоредоксинового домена рецептора. Цистеин в позиции 683 одной α -субъединицы образует межузельную дисульфидную связь с аналогичным цистеином другой α -субъединицы. При этом следует отметить близость расположения к остаткам цистеина района 707-719 рецептора, необходимого для связывания молекулы инсулина [53,54].

Другими словами, на основании данных литературы и собственных исследований мы считаем, что в рецепторе, наряду с выявленными центрами связывания инсулина, существует внеклеточный каталитический домен с дисульфидизомеразной активностью, ответственный за конформационные изменения, приводящие к активации внутриклеточной ТК рецептора.

Прозоровский и др.

	662	682 685	
ИР	FESEDSQKHNSQSE	EDSAGECCSCPKT	DSQIL--KEL
	72		
ПДИ	FDNFVADKDT-VL	EFAPWCGHCKQ	FAPEYEKIANIL
72kD	187		
	FDEVVNDADII-L	EFYAPWCGHCKK	FAPEYKAA-KEL
	535		
	FDSIVMDPKK	DVLI	EFYAPWCGHCKQLEPVYNSLAKKY
	34		
ПДИ	FAEALAAHKY-LL	EFYAPWCGHCK	FAPEYAKA-AGKL
57kD	377		
	FEDVAFDEKKNVF	EFYAPWCGHCKQ	LAPIWDKLGETY

ИР	EES	SFRK--TFEDYLHN	VVFVPRKTS	SGTGAEDPRPSRKRR
ПДИ	KDKDPPIPVAKIDATSAS	VLASRFDV	SGYPTIKIL--	KKGQ
72kD				
	SKRS	PPIPLAKV	DATAETDLAKR	FDVSGYPTLKIF--RKGR
	--KQKGLVIAKMD	ATANDVPS	DRYKVEGF	PTIYFAPSGDKK
ПДИ	KAEGSEIRLAKV	DATEESDLA	QQYGV	RGYPTIKFF--RNGD
57kD				
	KDHE--NKVAKMD	STANEVEA	VKVHS	-FPTLKF-PASDRT

Рисунок 4.

Тиоредоксиновые домены рецептора инсулина и протеин-дисульфид-изомеразы

ИР- инсулиновый рецептор (человек).

ПДИ- протеин-дисульфидизомераза (человек).

-жирным шрифтом выделены идентичные остатки аминокислот в тиоредоксиновых доменах ПДИ, совпадающие с остатками тиоредоксинового домена ИР.

-рамкой выделен активный центр тиоредоксинового домена.

Таким образом, механизм взаимодействия инсулина с рецептором представляется сложным процессом, связанным с определенными и строгими структурными требованиями к сигнальной молекуле лиганда (гормона) и исчерпывающими знаниями о соответствующей структурно-функциональной организации молекулы рецептора. Поэтому моделирование центров межмолекулярного взаимодействия, конструирование пептидомиметиков-центров взаимодействия с заданными свойствами, создание искусственной лигандной молекулы, все это связано, с одной стороны, с необходимостью получения дополнительных знаний в этой области, а с другой стороны, с решением целого ряда новых и сложных экспериментальных задач.

Внутриклеточная трансдукция сигнала инсулина, опосредованная инсулин связывающими белками цитозоля (CIBPs).

Анализ литературы показал, что механизм трансдукции сигнала, опосредованный рецептором инсулина и осуществляющийся через активацию ТК ИР, достаточно хорошо изучен. Процесс же, протекающий внутри клетки и связанный с непосредственным взаимодействием гормона со специфическими белками и дальнейшей трансдукцией сигнала, изучен мало, но в настоящее время привлекает внимание многих исследователей. Утверждают, что внутриклеточный процесс переноса сигнала осуществляется с помощью инсулин связывающих белков цитоплазмы.

В последние годы в научных работах различных исследователей было показано, что интернализированный в клетку инсулин взаимодействует с целым рядом белков цитоплазмы инсулин - связывающими белками цитоплазмы (CIBPs).

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

Среди них наиболее изучены белковая дисульфидизомераза (PDI - 55 кДа) и инсулин деградирующий фермент (IDE - 110 кДа) или инсулиназа. Обнаружены, но не идентифицированы белки: 27 кДа, 32 кДа, 41 кДа, 45 кДа, 82 кДа [64]. Взаимодействие инсулина с этими белками является специфическим. Ряд известных соединений, таких как дексаметазон, 1,10-фенантролин и др., избирательно влияют на связывание инсулина с CIBPs [65]. Высказаны предположения, что комплексы инсулина с этими белками выполняют определенные биологические функции и вовлечены в пока еще неизвестный механизм внутриклеточной трансдукции сигнала, связанный с регуляцией процессов клеточного роста, дифференцировки, белкового метаболизма и т.д. [66].

В связи с этим становится очевидным, что скорость деградации внутриклеточного инсулина, диссоциирующего в эндосомах от рецептора, является одним из важнейших процессов, контролирующими образование комплексов инсулина с CIBPs (cytosolic insulin binding proteins).

Деградация инсулина является регулируемым процессом, нарушение которого приводит к развитию различных патологий в организме, включая сахарный диабет [67]. Один из главных внутриклеточных метаболических эффектов инсулина связан с ингибированием клеточного протеолиза. Последние исследования в этом направлении указывают на важную и мультифункциональную роль инсулин-деградирующего фермента (инсулиназы). Инсулиназа, образуя комплекс с протеасомами, активирует их. Кроме того, инсулиназа активирует ядерные рецепторы стероидных гормонов. Очень важно, что инсулин делает этот процесс активации обратимым. Установлено, что взаимодействие инсулина с инсулиназой приводит к ингибированию процессов активации протеасом и рецепторов стероидных гормонов. Таким образом, непосредственное взаимодействие внутриклеточного инсулина с инсулиназой модулирует как белковый метаболизм [68,69], так и реализацию сигнала стероидных гормонов, регулирующих рост и дифференцировку клеток [70].

Исследования показали, что в деградации инсулина кроме специфичной инсулиназы принимает участие и белковая дисульфидизомераза. Интернализированный инсулин может быть непосредственно восстановлен дисульфидизомеразой. На это указывает тот факт, что восстановленный по дисульфидным связям инсулин (нарушенный фолдинг белковой молекулы) в отличие от нативной формы подвергается внутри клетки ускоренной деградации инсулиназой. Так, например, показано, что В-цепь инсулина обладает в 30 раз большей аффинностью к инсулиназе и гидролизуетсся с её помощью в 6 раз быстрее, чем нативный инсулин [71].

Анализ вышеприведенных данных литературы позволяет утверждать, что в зависимости от условий внутри клетки инсулин подвергается либо ускоренной, либо замедленной деградации. Скорость этой деградации контролируется ферментом дисульфидизомеразой. Необходимо отметить, что для восстановления дисульфидных связей внутри молекулы инсулина этот фермент должен быть в восстановленном состоянии. Для восстановления дисульфидизомеразы необходимо присутствие восстановленного глутатиона. Поэтому дисульфидизомеразу также называют глутатион-инсулин-трансгидрогеназа. Восстановление глутатиона сопряжено с окислительно-восстановительным потенциалом клетки и зависит от NADP/NADPH и соответственно сопряжено с целым рядом метаболических процессов (например, пентозофосфатным шунтом), приводящих к образованию NADPH. Поэтому в зависимости от концентраций восстановленного глутатиона и NADPH деградация инсулина внутри клетки может быть ускоренной или замедленной.

Интересно отметить, что один из главных метаболических эффектов инсулина, связанный с ингибированием клеточного протеолиза, можно имитировать применением солей ванадия (сульфата ванадила). Внутри клетки катион ванадия обнаруживают, главным образом, в комплексе с глутатионом

(VO₂⁺-GSH) [72]. Установлено, что сульфат ванадия снижает концентрацию восстановленного глутатиона, образуя с ним комплекс. Снижение концентрации восстановленного глутатиона приводит и к замедлению процесса восстановления нативного инсулина ферментом глутатион-инсулин-трансгидрогеназой. В результате этого повышается внутриклеточная концентрация нативного инсулина, который, взаимодействуя с инсулин-деградирующим ферментом, ингибирует процесс активации протеосом (путь замедленной деградации инсулина в клетках) и, таким образом ингибируется процесс катаболизма белков в клетке.

Для понимания того, каким все же образом те или иные мутантные формы инсулина (в том числе синтетические фрагменты) все же проявляют инсулиноподобную биологическую активность, важно отметить, что один из районов гормона, ответственный за взаимодействие с рецептором, перекрывается с районом, ответственным за взаимодействие с инсулин-деградирующим ферментом. Этот район представлен С-концевым участком В-цепи В22-30 с мотивом Фен24, Фен25, Тир26 и обладает высокой специфичностью молекулярного взаимодействия инсулина с инсулиназой и рецептором инсулина. Выше приведенные данные позволяют утверждать, что проявление биологической активности мутантных форм инсулина или его синтетических фрагментов связано не с внеклеточными взаимодействиями с рецептором, а именно с внутриклеточной трансдукцией сигнала, с взаимодействием с инсулин-деградирующим ферментом, контролирующим этот процесс.

В связи с этим чрезвычайно интересны данные об аналоге инсулина с заменой остатка глицина (В21) на остаток пролина. У такого аналога способность к связыванию с рецептором значительно снижена по сравнению с биологической активностью (33,2% биологическая активность и 15,9 % связывания с рецептором по отношению к нативному инсулину) [73]. Повышенная биологическая активность, несмотря на низкую способность взаимодействия с рецептором, связана с тем, что такой аналог взаимодействует внутри клетки с инсулин-деградирующим ферментом, являясь его ингибитором (близость остатка пролина к району взаимодействия с инсулиназой). Известно, что остаток пролина в том или ином районе полипептидной цепи в значительной степени ограничивает действие ряда протеолитических ферментов в этих районах (так называемые трудногидролизуемые связи, например X-Pro).

Ряд природных органических веществ, на основе которых созданы лекарственные препараты, вероятно, имитирует строение данного района инсулина и, в какой-то мере, его биологическое действие внутри клетки на уровне фермента, деградирующего молекулу гормона. Вполне вероятно взаимодействие этих соединений с другими инсулин-связывающими белками цитозоля, связывающимися с ДНК и влияющими на экспрессию генов [74].

Инсулин-деградирующий фермент, возможно, принимает участие и в активации ядерных рецепторов, относящихся к суперсемейству белковых факторов транскрипции и содержащих в своей структуре ДНК-связывающие домены (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR). Эти рецепторы представлены тремя типами - PPAR-α, PPAR-β, PPAR-γ и участвуют в регуляции процесса транскрипции, взаимодействуя с соответствующими лигандами (стероиды, тироксин, ретиноиды). Все три типа рецепторов или факторов транскрипции играют специфические роли в различных клетках организма. PPAR-α экспрессируется, главным образом, в печени и принимает участие в регуляции метаболизма жирных кислот. PPAR-γ экспрессируется преимущественно в адипоцитах. Высокий уровень экспрессии PPAR-β обнаружен в липид-метаболизирующих тканях. Сегодня известны природные и синтетические вещества (антидиабетические лекарства), которые являются лигандами для этих ядерных рецепторов, контролирующими их транскрипционную активность [75]. К таким соединениям можно отнести недавно открытый класс антидиабетических препаратов, усиливающих действие инсулина -

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

тиазолидиндионы (TZD). Тиазолидиндионы оказывают выраженный гипогликемический эффект, взаимодействуя с изоформой ядерных рецепторов PPAR- γ - фактором транскрипции, контролирующим экспрессию определенных генов [76]. В последнее время было обнаружено, что тиазолидиндионы, взаимодействуя с рецептором PPAR- γ , контролируют экспрессию секретируемого адипоцитами белка резистина, который непосредственно и ограничивает чувствительность рецепторов к инсулину при диабете второго типа [77].

В целом, наша концепция заключается в том, что регуляция внутриклеточной трансдукции сигнала инсулина, опосредованная инсулин-связывающими белками цитозоля, осуществляется с помощью изменения скорости деградации внутри клетки молекулы нативного гормона. Ускоренная или замедленная деградация инсулина связана с основными процессами метаболизма, влияющими на окислительно-восстановительный потенциал клетки и ее отдельных компартментов. Быстрая деградация инсулина приводит и к ускоренному распаду комплекса инсулин-инсулиназа и соответственно к инсулиназа-зависимой активации протеасом и ядерных рецепторов. Другими словами, быстрая деградация инсулина способствует ускоренному протеолизу внутриклеточных белков и соответственно приводит к изменениям в составе инсулин взаимодействующих белков цитоплазмы. Это, в свою очередь, приведет к изменениям в образовании комплексов инсулина с белками, непосредственно взаимодействующих с нуклеосомами, что связано с регуляцией экспрессии генов. Поэтому одна из задач дальнейших исследований связана с поиском и созданием принципиально новых лекарственных препаратов, влияющих на процесс внутриклеточной трансдукции сигнала инсулина - снижение скорости деградации инсулина.

Таким образом, на основании анализа и обобщения литературных данных о взаимодействии инсулина с рецептором, в молекуле инсулина выявлены локализованные в 3D-структуре два центра связывания с рецептором.

Установлено, что:

- внеклеточные домены двух α -субъединиц рецептора связывают соответственно по этим центрам молекулу инсулина;

- важную роль при взаимодействии рецептора с инсулином играют реакции тиолдисульфидного обмена, приводящие к конформационным изменениям рецептора, что, в свою очередь, ведет к активации внутриклеточного домена тирозинкиназы и включает дальнейший каскад внутриклеточных реакций (передача сигнала внутри клетки). Проведенный сравнительный анализ первичных структур тиоредоксиновых доменов дисульфидизомеразы и С-концевого домена α -субъединицы рецептора инсулина, позволил выявить существование тиоредоксинового домена в рецепторе;

- наряду с известным механизмом внеклеточной трансдукции сигнала инсулина, приводящей к активации тирозинкиназы рецептора, существует механизм трансдукции сигнала инсулина внутри клетки, опосредованный инсулин связывающими белками цитозоля. Важнейшими компонентами внутриклеточной трансдукции сигнала являются: белковая дисульфидизомераза и инсулин деградирующий фермент.

Кроме того, изменение скорости деградации инсулина внутри клетки, по-видимому, может играть важную роль в процессе трансдукции сигнала, опосредованного инсулин деградирующим ферментом.

ЛИТЕРАТУРА

1. White M F (1994) Curr Opin. Genet. Dev. **1**, 47-54
2. Fantl W J, Johnson D E, Williams L T (1993) Annu. Rev. Biochem. **62**, 453-481
3. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M (1994) J. Biol. Chem., **269**, 3568-3573.
4. Dent P, Lavoie A, Nakielny S, Caudwell F B, Watt P, Cohen P (1990) Nature, **348**, 302-308.
5. Tager H (1990) Handbook of Experimental Pharmacology, **92**, 41-64
6. Mirmira R G and Tager H S (1989) J. Biol. Chem., **264**, 6349-6354.
7. Mirmira R G, Nakagawa S H and Tager H S (1991) J. Biol. Chem., **266**, 1428-1436
8. Mirmira R G and Tager H S (1991) Biochemistry, **30**, 8222-8229
9. Hartmann H, Oberhaus K, Spahr R, Branderburg D (1989) Diabetologia, **32**, 416-420
10. Nakagawa S H, Tager H S (1986) J. Biol. Chem., **261**, 7332-7341.
11. Bajaj M, Blundell T, Pitts J E, Wood S P, Tatnell M A, Falkmer S, Emdin S O, Gowan L K. (1983) Eur. J. Biochem., **135**, 535-542.
12. Bajaj M, Blundell T, Horuk R, Pitts J E, Wood S P, Gowan L K, Schwabe C, Wollmer A, Gliemann J, Gammeltoft S (1986) Biochem. J., **238**, 345-351.
13. Murray-Rust J, McLeod A N, Blundell T L and Wood S. (1992) BioEssays, **14**, 325-331.
14. Assouan R K, Thomas N E, Kaiser E T and Tager H S (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5147-5151.
15. Inouye K, Watanabe K, Tochino Y, Kobayashi M and Shigeta Y. (1981) Biopolymers, **20**, 1845-1858.
16. Kobayashi M, Ohgaku S, Iwasaki M, Maegawa H. (1982) Biochem Biophys. Res. Commun., **107**, 329-336.
17. Kobayashi M (1982) Biochem. J., **206**, 597-603.
18. Kobayashi M, Ohgaku S, Iwasaki M, Maegawa H (1983) In Current and Future Therapies with Insulin, Sakamoto M. and Alberti K. Excerpta Med. Amsterdam, pp. 136-141.
19. Tager H, Thomas N, Assouan R, Rubenstein A, Saekow M, Olefsky J, Kaiser E T. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 3181-3185.
20. Keefer L M, Piron M A, De Meyts P, Guttner H G (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., **100**, 1229-1236.
21. Hua Q X, Gozani S N, Chance R E, Hoffmann J A, Frank B H, Weiss M A (1995) Structural Biology, **2**, (2), 129-138
22. Steiner D F, Tager H S, Chan S J, Nanjo K, Sanke T, Rubenstein A H (1990) Diabetes Care, **13**, 600-609.
23. Nanjo K, Miyano M, Kondo M, Sanke T, Nishimura S, Miyamura K, Given B D, Chan S J, Polonsky K S, Inouye K. (1987) Diabetologia, **30**, 87-92.
24. Hua Q X, Shoelson S E, Inouye K, Weiss M. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 582-586.
25. Haneda M, Kobayashi M, Maegawa H, Watanabe N, Takata Y, Ishibashi O, Shigeta Y, Inouye K. (1985) Diabetes, **34**, 568-573.
26. Weitzel G (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**, 1005-1013.
27. Horuk R, Blundell T L, Lazarus N R, Neville R W, Stone D, Wolmer A (1980) Nature, **286**, 822-824.
28. Carpenter F H, Baum W E. (1962) J. Biol. Chem., **237**, 409-412.
29. Carpenter F H. (1966) Am. J. Med., **40**, 750-758.
30. Weitzel G, Eisele K, Guglielmi H, Stock W, Remmel R. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 187-200.
31. Weitzel G. (1971) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **352**, 1735-1738

СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

32. *Weitzel G., Eisele K., Guglielmi H., Stock W., Remvel R.* (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **354**, 321-330.
33. *Ng F.M., Zhu S.Q., Cui D.F., Fan L., Huang Y.D., Zhang Y.S.* (1989) Biochem Int., **18**, (2), 373-381.
34. *Chu Y.C., Wang R.Y., Burke G.T., Chanley J.D., Katsoyannis P.G.* (1987) Biochemistry, **26**, (22), 6966-6971.
35. *Burke G.T., Chanley J.D., Okada Y., Cosmatos A., Ferderigos N., Katsoyannis P.G.* (1980) Biochemistry, **19**, (20), 4547-4556.
36. *Zeng Z.H., Liu Y.S., Jin L., Zhang Y., Havelund S., Markussen J., Wang D.C.* (2000) Biochim. Biophys. Acta., **1479**, 225-236.
37. *Prozorovsky V.N., Maksimova E.M., Alekseeva A.E., Grebenshikova O.G., Abakumova O.Yu., Kutsenko N.G., Ivanov A.S., Kniazhev V.N., Archakov A.I.* (1999) Biochem. Mol. Biol. Int., **47**, (6), 957-963.
38. *Berndt H., Gattner H.G., Zahn H.* (1975) Hoppe Seyler's Z. Physiol.Chem., **9**, 1469-1472.
39. *Olsen H.B., Ludvigsen S., Kaarsholm N.C.* (1998) J.Mol.Biol., **284**, (2), 477-488.
40. *Okada Y., Chanley J.D., Burke G., Katsoyannis P.G.* (1981) Hoppe Sayler' Z. Physiol.Chem., **362**, (6), 629-638.
41. *Kitagawa K., Ogawa H., Burke G.T., Chanley J.D., Katsoyannis P.G.* (1984) Biochemistry, **23**, (19), 4444-4448.
42. *Ohta N., Burke G.T., Katsoyannis P.G.* (1989) Chem. Pharm. Bell., **37**, (3), 670-674.
43. *Chu Y.C., Burke G.T., Ross J.B., Katsoyannis P.G.* (1993) J. Protein Chem., **12**, (4), 499-505.
44. *Ogawa H., Burke G.T., Chanley J.D., Katsoyannis P.G.* (1987) Int. J. Pept. Protein Res., **30**, (4), 460-473.
45. *Nakagawa S.H., Tager H.S.* (1992) Biochemistry, **31**, (12), 3204-3214.
46. *Ohta N., Burke G.T., Katsoyannis P.G.* (1988) J. Protein Chem., **7**, (1), 55-65.
47. *Cockram C.S., Jones R.H., Sonksen P.H.* (1985) Diabet.Med., **2**, (4), 241-244.
48. *Du X., Tang J.G.* (1998) Biochem. Mol. Biol. Int., **45**, (2), 255-260.
49. *Heath W.F., Belagaje R.M., Brooke G.S., Chance R.E., Hoffmann J.A., Long H.B.* (1992) J. Biol. Chem., **267**, 419-425.
50. *Peavy D.E., Brunner M.R., Duckworth W.C., Hooker C.S., Frank B.H.* (1985) J.Biol.Chem., **260**, 13989-13994.
51. *Gliemann J. and Gammeltoft S.* (1974) Diabetologia, **10**, 105-113.
52. *Seung-Gu Chang, Dae-Young Kim, Ki-Doo Choi, Jae-Min Shin and Hang-Cheol Shin* (1998) Biochem. J., **329**, 631-635.
53. *R. Z-T. Luo, D.R. Beniac, A. Fernandes, C.C. Yip, F.P. Ottensmeyer.* (1999) Science, **285**, 1077-1080.
54. *F.P. Ottensmeyer, D.R. Beniac, R.T. Luo and C.C. Yip.* (2000) Biochemistry, **39**, (40), 12103-12112.
55. *Cuatrecasas P.* (1971) Proc.Natl.Acad.Sci., USA., **68**, 1264-1268.
56. *Ullrich A.* (1985) Nature, **313**, 756-761.
57. *M. Bajaj, M.D. Waterfield, J. Schlessinger, W.R. Taylor, T. Blundell.* (1987) Biochim. Biophys. Acta, **56**, 345-354.
58. *Ullrich A. and J. Schlessinger.* (1990) Cell, **61**, 203-212
59. *M.R.White and R.Kahn.* (1994) J.Biol.Chem., **269**, 1-4.
60. *F. Ganals.* (1992) Biochemistry, **31**, 4493-4498.
61. *Boni-Schnetzler M., Scott W., Waugh S.M., DiBella E., Pilch P.F.* (1987) J. Biol. Chem., **262**, (17), 8395-8401.
62. *Boni-Schnetzler M., Rubin J.B., Pilch P.F.* (1986) J. Biol. Chem., **261**, (32), 15281-15287.
63. *Kahn R.C.* (1993) Recent.Prog.Hormone Res., **48**, 291-339.
64. *Harada S., Smith R.M., Smith J.A., Shah N., Jarett L.* (1996) Biochem.J., **306**, 21-28.

65. Harada S., Smith R.M., Hu D.Q., Jarett L. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 154-158.
66. Duckworth W.C., Bennet R.G., Hamel F.G. (1998) *Endocr.Rev.*, **19**, (5), 608-624.
67. Hamel F.G., Bennet R.G., Duckworth W.C. (1998) *Endocrinology*, **139**, (10), 4061-4066.
68. Bennet R.G., Hamel F.G., Duckworth W.C. (1997) *Diabetes*, **46**, (2), 197-203.
69. Duckworth W.C., Bennet R.G., Hamel F.G. (1998) *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, **244**, 390-394.
70. Lee Y.H., Harada S., Smith R.M., Friedman R., Jarett L. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 839-843.
71. Authier F., Danielsen G.M., Kouach M., Briand G., Chauvet G. (2001) *Endocrinology*, **142**, (1), 276-289.
72. Bei B. Zhang and David E.Moller. (2000) *Curr. Opin. in Chem. Biol.*, **4**, 461-467.
73. Schwartz G.P., Burke G.T., Chanley J.D., Katsoyannis P.G. (1983) *Biochemistry*, **22**, (19), 4561-4567.
74. Harada S., Smith R.M., Jarett L. (1999) *Cell. Biochem., Biophys.*, **31**, 307-319.
75. Takahashi N., Kawada T. (2001) *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **117**, 319-327.
76. Girard J. (2001) *Diabetes Metab.*, **27**, 271-278.
77. Steppan C.M. (2001) *Nature*, **409**, 307- 312.

Поступила 05.09.02

STRUCTURALLY FUNCTIONAL FEATURES OF INSULIN AND MECHANISM OF ITS ACTION

V.N. Prozorovskiy, P.G.Lokhov, D.L. Maslov, O.M. Ipatova

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Russia; 119121, Pogodinskaya street, 10, Moscow;
fax (095) 245-0857.

On the basis of analysis of own and literature data on insulin-receptor interaction two centers responsible for receptor binding were identified on 3D-structure of insulin with receptor. Two extracellular domains of insulin receptor interact with these centers on insulin molecule. The comparative analysis of primary structures of the protein disulfide isomerase thioredoxine domains and C-terminal domain of the receptor suggests existence of the thioredoxine domain in the insulin receptor. In this connection the role of the thiol disulfide an exchange reaction is discussed in terms of insulin interaction with receptor followed by subsequent conformational changes in the receptor molecule and activation of the intercellular tyrosine kinase domain.

It is supposed, that besides known mechanism of receptor mediated insulin signal transduction and tyrosine kinase activation, there is other mechanism of insulin intracellular signal transduction realised via cytosolic insulin-binding proteins. Major components of intercellular insulin signal transduction include: protein disulfide isomerase and insulin degrading enzyme. The importance of change of the intracellular insulin degradation rate for insulin signal transduction is discussed.

Key words: insulin, insulin receptor, thioredoxin domen, insulin binding proteins, insulin degrading enzyme.