

ANA VLAŠIĆ

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek
Prirodoslovno-matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu

INZULIN – STRUKTURA I FUNKCIJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za Anorgansku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. D. Matković - Čalogović

Zagreb, 2016

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	16. rujna 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	19. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	23. rujna 2016.

Mentor rada: prof. dr. sc. D. Matković - Čalogović

Potpis:

Sadržaj

§ Sažetak	iv
§ 1. Uvod.....	1
§ 2. Prikaz odabrane teme	2
2.1. Općenito o strukturi.....	2
2.2. Struktura monomernog oblika inzulina.....	4
2.3. Struktura heksamernog oblika inzulina.....	6
2.4. T i R konformacija inzulina	9
2.5. Protein-kinaza kao pokretač signalnog puta.....	11
2.6. Vezanje inzulina i aktivacija inzulinskog receptora	12
2.7. Aktivirana kinaza započinje kinaznu kaskadu	13
2.8. Veza strukture, funkcije i bolesti	16
§ 3. Literaturna vrela	19

§ Sažetak

Inzulin je mali protein građen od A i B lanca (51 aminokiselina) međusobno povezana s dva disulfidna mosta. Ukoliko je višak inzulina u krvi pohranjuje se u obliku glikogena ili masti, a funkcija mu je da regulira šećer u krvi. Kao neaktivan heksamerni oblik pohranjen je u β -stanicama gušterače. Nakon što unesemo u organizam određenu količinu hrane, inzulin se izlučuje u krv kao svoj aktivni monomerni oblik. Heksamer je povoljan oblik za skladištenje zbog svog prstenastog oblika u čijem središtu u prirodnoj formi je cink. Međutim može doći i do zamjene cinka određenim prijelaznim metalima koji se nalaze u oksidacijskom stanju +II. Monomer inzulina može imati T ili R konformaciju, a kod heksamera su moguća tri stanja T₆, R₆ i T₃R₃.

Pri signalizaciji inzulinom tri su skupine enzima bitne: protein-tirozin-fosfataze koje uklanjaju fosforilne skupine s tirozinskih ostataka inzulinskog receptora, lipid-fosfataze koje hidroliziraju fosfatilinozitol-3,4,5-trisfosfat na fosfatidilinozitol-3,4-bifosfat i protein-serin fosfataze koje uklanjaju fosforilne skupine s aktivirane protein-kinaze. Zbog poremećene regulacije inzulina u tijelu dolazi do niza problema i bolesti poput šećerne bolesti (dijabetes).

§ 1. Uvod

Hormon inzulin pomaže kontroli razine glukoze u krvi. Inzulin je jedan od najvažnijih hormona koji nosi poruke koje opisuju količinu šećera koji je dostupan u krvi. Inzulin se sintetizira u β -stanicama gušterače te se otpušta nakon jela u krv kada razina šećera u krvi poraste. Ovaj signal se prenosi kroz cijelo tijelo vežući se na inzulinski receptor koji je na površini jetre, mišića i masnih stanica. Inzulin signalizira organima da odstrane glukozu van krvi i skladište je u obliku glikogena ili masti. Inzulin je mali protein koji kroz krv lako „putuje“ i lagano se prenosi receptorima na površine stanice i tako dostavlja samu poruku.¹ Funkcija proteina direktno je povezana s njegovom trodimenzijskom strukturom. Proteini su podložni konformacijskim promjenama tijekom biokemijskih procesa. Djelovanje inzulina kontrolirano je koncentracijom cikličkog AMP-a gdje pad koncentracije cAMP-a i/ili u prisutnosti inzulina uzrokuje aktivaciju fosfoprotein kinaze-1 koja stimulira sintezu glikogena.

Kada dođe do poremećene regulacije inzulina u tijelu razvija se dijabetes ili šećerna bolest (lat. Diabetes melitus). Životinjski (goveđi i svinjski) inzulin je dugo vremena bio jedini inzulin za liječenje. 1950. godine je otkriven sekvencijski redosljed aminokiselina u humanom inzulinu. Prvi sintetski inzulin proizveden je ranih šezdesetih godina, a prvi genetski sintetički humani inzulin je proizveden 1977. godine. Daljim istraživanjima inzulina, tijekom devedesetih godina dvadesetog stoljeća napravljena je nova generacija inzulina tzv. humani inzulinski analozi ili moderni inzulini koji imaju bolje karakteristike od humanih inzulina (brže ili dulje djelovanje, izazivaju rjeđe hipoglikemiju).¹

§ 2. Prikaz odabrane teme

2.1. Općenito o strukturi

Kristalna struktura inzulina je dobro istražena kao i strukturne karakteristike koje dovode do afiniteta vezanja receptora i aktivnosti inzulina. Signalni put inzulina se križa sa signalnim putovima drugih faktora rasta, uključujući IGF1 i IGF2. To pokazuje važnost identifikacije liganda receptora kao potencijalno terapijsko sredstvo za dijabetes. Inzulin pohranjen u β -stanicama pakiran je vrlo gusto u obliku koloidnih čestica koje su sastavljene od netopljivog kristalnog heksamernog inzulina. Koncentracija inzulina u tim česticama otprilike je 40 mM. Heksamerni oblik inzulina sastoji se od 6 molekula inzulinskih peptida raspoređenih po 3 dimera.

Trodimenzionalna struktura monomernog inzulina prvi put otkrivena je rendgenskom kristalografijom 1926. godine. Više od 40 godina kasnije, riješena je struktura heksamernog cink-inzulina. 2D NMR studije su također pridonijele znanju o monomernim, dimernim i heksamernim konformacijama inzulina, te o nativnoj strukturi inzulina. Ti su podaci važni za razumijevanje specifičnog vezanja na receptor inzulina. Koncentracija inzulina i okolni pH utječu na konformacijsko stanje inzulina. Monomeri imaju tendenciju stvaranja dimera kako koncentracija inzulina raste, a u prisutnosti cinka i povoljnog pH (10 mM Zn^{2+} , pH ~ 6,0) monomeri se sakupljaju u složenu kvaternu strukturu, odnosno u heksamere. Porast koncentracije inzulina pogoduje stvaranju interakcija između hidrofobnih aminokiselina u strukturi dimera inzulina te agregaciji. Dimer inzulina stabiliziran je pomoću antiparalelnih β -ploča na C-terminalnom kraju B lanca svakog monomera. Ove β -ploče nalaze se na strukturnoj površini dimera. Između dva dimera su nepolarni ostaci koji doprinose hidrofobnoj jezgri. Posljedica nedostatka otapala su interakcije između hidrofobnih ostataka koje dovode do agregacije preferirajući formiranje strukture višeg reda.

Ugljikom bogate aminokiseline poput leucina i izoleucina pretežno su u sredini molekule i čine hidrofobnu jezgru dok je površina prekrivena nabijenim aminokiselinama poput arginina i glutamata koji interreagiraju s vodom koja ih okružuje.²

Nakon što se heksameri izlučuju iz β -stanica i difundiraju u krvi niz koncentracijski gradijent, kombinacija elektrostatskog odbijanja i smanjena koncentracija inzulina pogoduje disocijaciji inzulina u njegovu monomernu formu. Stoga je monomer aktivni oblik inzulina, a heksamer je oblik skladištenja inzulina.³

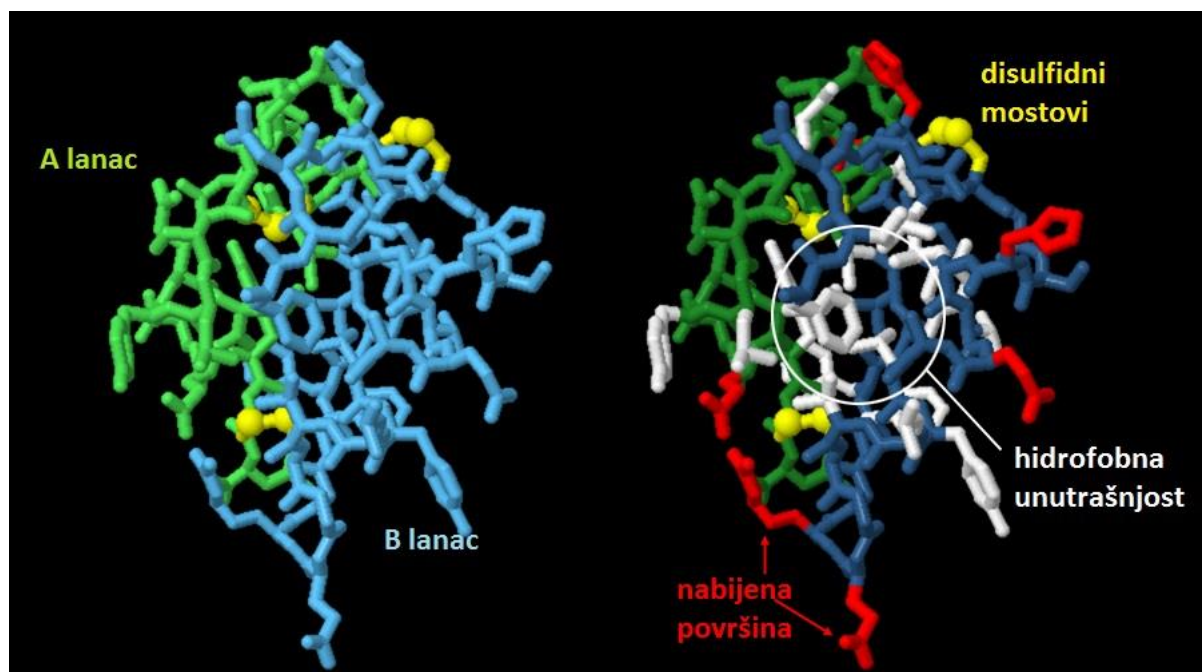
2.2. Struktura monomernog oblika inzulina

Monomer inzulina sastoji se od dva polipeptidna lanca koji su povezani dvjema disulfidnim vezama (Cys A7 i Cys B7, Cys A20 i CysB19) prva se nalazi na površini molekule dok druga pripada hidrofobnoj unutrašnjosti. Lanac A sastoji se od 21 aminokiseline i posjeduje dodatnu disulfidnu vezu (CysA6 – CysA11) i lanac B koji je sastavljen od 30 aminokiselina. Zapravo se monomer sastoji od tri disulfidne veze; dvije veze između lanaca A i B (A7-B7, A20-B19) i jedna unutar lanca (A7-A11), slika1.

Sekundarna struktura A lanca sastoji se od dvije antiparalelne α -zavojnice (- IleA2-ThrA8 i LeuA13-TyrA19) koje su povezane kratkim izduženim okretom (SerA9-SerA12). A lanac leži u ravnini u kojoj se N-terminalni i C- terminalni krajevi nalaze na istoj strani, stvarajući van der Waalsovu interakciju između IleA2 i TyrA19. Sekundarna struktura B lanca sadrži i α -zavojnicu i β -ploču.

B lanac sastoji se od dvije izdužene ploče koje su povezane centralnim segmentom (α -zavojnica, SerB9-CysB19). B-lanac može postojati u dvije različite konformacije u kristalnom inzulinu. U T stanju, postoji središnja α -zavojnica od B9 do B19. Glicinski ostaci (B20 i B23) omogućavaju nepravilan "V" oblik lanca u kojem C-terminalni ostaci PheB24 i TyrB26 ostvaruju van der Waalsove interakcije s leucinom na pozicijama LeuB15 i LeuB11. U R stanju, postoji kontinuirana α -zavojnica od B1 do B19. Disulfidne veze između Cys ostataka A7-B7 i A20-B19 doprinose stabilnosti native strukture inzulina. Sekundarna struktura A i B lanaca iznenađujuće je kompleksna za takve male peptide, a te zamršene interakcije bočnog lanca određuju afinitet između inzulina i receptora.

Tercijarna struktura monomera inzulina (A i B lanci povezani disulfidnim vezama) precizno je organizirana i stabilizirana specifičnim interakcijama aminokiselina bočnih lanaca. Ove interakcije utječu na kinetiku vezanja ligand-receptor. Ostaci A6-A11, B1 i B15, Ile-A2, Phe-B24, Val-A3, Ile-A13, Val-B18 i Val-B12 utječu na hidrofobnu jezgru monomerne strukture proteina. Aminokiselinski ostaci na B lancu također stabiliziraju β -zavoj B lanca (B20-B23) čime omogućuju savijanje β -ploča (B23-B30) prema zavojnici i prema hidrofobnim ostacima. Takvi nepolarni aminokiselinski ostaci su sakriveni kada monomeri tvore dimere.³



Slika 1. Prikazani su A i B lanac te nabijena površina, hidrofobna unutrašnjost i disulfidni mostovi.²

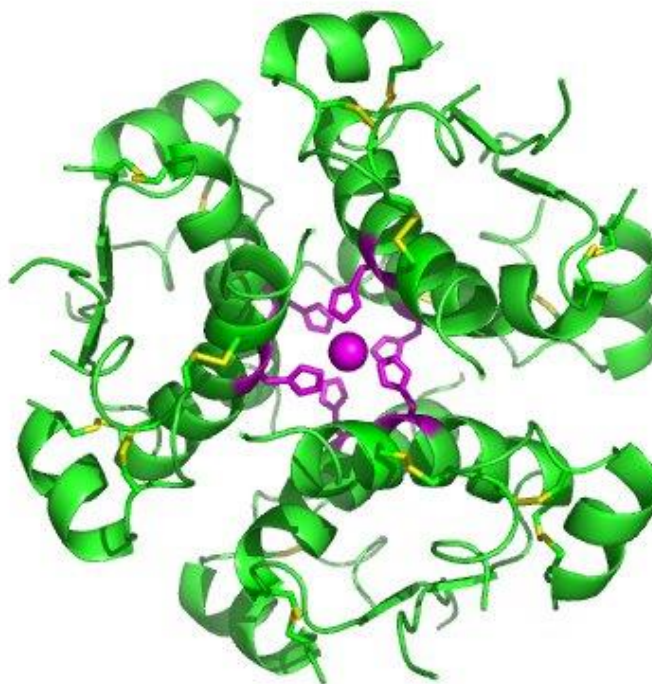
2.3. Struktura heksamernog oblika inzulina

Heksamer inzulina je molekula oblika valjka veličine $35 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$. Šest inzulinskih podjedinica su složene kao trimer koji se sastoji od asimetričnog dimera te sadrže os simetrije trećeg reda (slika 2.). Dva visoko afinitetna mjesta cinka smještena su na osi simetrije trećeg reda međusobno udaljena 15.9 \AA . Svaki ion cinka koordiniran je s tri His(B10) imidazolnih liganada (jedan iz svakog dimera), a oktaedarska koordinacija upotpunjena je molekulama vode.

Postoji i treće afinitetno mjesto za dvovalentni metal koji je vezan u kristalnom heksamernom romboedarskom inzulinu. Inzulin kristalizira u romboedarskoj prostornoj grupi $R\bar{3}$ (kao "2Zn i 4Zn forma" prema sadržaju cinka u inzulinu).

U prirodnoj formi metalni ion je Zn, ali je poznato i da inzulin ima afinitet prema ostalim prijelaznim metalima kao što su Mn, Fe, Co, Ni, Cu i Cd (svi u oksidacijskom stanju +II), no i s jednovalentnim kationima kao što su Tl^+ , Li^+ , Rb^+ . U T_6 formi oba metalna iona su izložena otapalu pa je stoga koordinacijska sfera pojedinog metalnog centra ispunjena molekulama vode od kojih su neke slabo koordinirane te se mogu lako zamijeniti drugim molekulama otapala. Takav T_6 inzulinski sustav pokazao se kao dobar model za proučavanje metalnih centara s labilnim molekulama vode.

U prisutstvu kloridnih ionainzulin kristalizira u romboedarskoj prostornoj grupi koja također posjeduje heksamere. Za razliku od "2Zn forme" u kojoj dva neovisna monomera imaju gotovo jednaku konformaciju, prvih osam ogranaka B lanca podliježe konformacijskoj promjeni iz izduženog oblika u α -zavojnicu. Ova promjena uzrokuje pomak N-terminalnih krajeva B lanca za više od 30 \AA proizvodeći kontinuiranu α -zavojnicu (PheB1-CysB19). Kao rezultat pomaka N-terminalnih krajeva u blizini HisB5 stvara se šupljina eliptičnog oblika. U ranijim kristalografskim istraživanjima nađeno je da su ove šupljine popunjene (s potpuno ili djelomično) okupiranim Zn ionima koji su koordinirani s HisB5, drugačije orijentiranim HisB10 i dvije molekule vode. Ovakva kristalna forma naziva se "4Zn forma" i u stanju je T_3R_3 .^{4,5}

Slika 2. Struktura heksamernog oblika inzulina ⁶

Kada inzulin ne sadrži dvovalentni metalni ion u otopini on postoji u ravnoteži kao monomer, dimer, tetramer, heksamer i kao koloidne nakupine. Poznato je da sekretorne vezikule koje skladište inzulin sadrže visoku koncentraciju Cu^{2+} i Zn^{2+} iona te postoji dokaz da je Ca^{2+} preuzet iz romboedarskih kristala inzulina cinka *in vivo*. Zbog toga je jasno da su važne Ca^{2+} interakcije sa Zn-proinzulinom i Zn-inzulinom te da je forma unutar skladišta vezikula kristalna. Ca^{2+} se veže u centar heksamernog kaveza koji je formiran od 6 GluB13 karboksilata. Kalcijev ion veže se na to mjesto i to tako da se jedan Ca^{2+} veže na jedan heksamer. Cd^{2+} i Ca^{2+} ioni vežu se kompetitivno i s istom stehiometrijom na B13 karboksilate što ukazuje na istu koordinacijsku geometriju za ta dva iona. U heksameru os simetrije trećeg reda prolazi kroz šupljinu promjera 10 Å te kroz oba iona cinka. U heksamernoj kristalnoj strukturi pri pH 6.2 šest GluB13 karboksilata međusobno su povezani vodikovim vezama pa se pretpostavlja da polovica GluB13 ima protoniranu formu karboksilne kiseline. Karboksilni ostaci Glu ili Asn na završetku B13 očuvani su u svima osim kod jednog vezanog Zn-inzulina koji je sekvenciran. Jedina je iznimka inzulin ribe sljepulje u kojem je B13 završetak Asn i taj je inzulin neobičan po tome što ne tvori heksamer.⁵

U kristalnoj strukturi inzulina kristaliziranog s niklovim solima nađeno je da su heksamerni poprimili T_6 konformaciju koja je analogna T_6 Zn-inzulin strukturi. Struktura se sastoji od dva Ni^{2+} iona izložena otapalu. Niklovi atomi su heksakoordinirani i koordinacijska sfera sastoji se od 3 ekvivalentna imidazolna N atoma i O atoma od tri ekvivalentne molekule vode. Udaljenost između Ni i O atoma molekule vode je 2.12 Å odnosno 2.23 Å u drugom heksameru.⁴

Heksamerni Cu-inzulin ima T_6 konformaciju u svim poznatim kristalnim strukturama. Cu^{2+} koordiniran je s tri HisB10 ostatka i tri molekule vode udaljenosti 2,25Å. Kod drugog Cu^{2+} iona koordinacija je tetraedarska te je povezan s tri HisB10 i jednom molekulom vode koja je udaljena 2,67 Å od metalnog iona. Ostatak elektronske gustoće ukazuje da je koordinacijska sfera nesređena te da uz tetraedarsku posjeduje i oktaedarsku koordinaciju (tri His i tri molekule vode umjesto jedne). Cu-inzulin jako je osjetljiv na fotoredukciju i radijacijsko zračenje. Koordinacija Cu određena rentgenskim zrakama različitih energija zapravo ovisi o dozi radijacije.⁴

2.4. T i R konformacija inzulina

Monomer inzulina može imati T ili R konformaciju u ovisnosti o tome da li je prvih osam ostataka B lanca produženo ili u konformaciji α -zavojnice. Moguća su tri stanja heksamera: T_6 kada su svi monomeri u T konformaciji; R_6 kada su svi monomeri u R konformaciji; T_3R_3 kada su tri monomera u R stanju odnosno T stanju. Ako su prisutni kloridni ili tiocijanatni anioni u prvih osam ostataka B lanca dolazi do prijelaza iz produžene konformacije u α -zavojnici. Nativna kristalna struktura $2Zn^{2+}$ inzulina u odsutnosti kloridnih ili fenolnih derivata poprima T_6 konformaciju. Dokazano je da broj vezanih metalnih iona na inzulin kontrolira ili utječe na samu konformaciju. Korelacija između konformacija i sposobnost otpuštanja metala može biti određena kao $T_6 > T_3R_3 > R_6$ što se izravno reflektira na funkciju inzulina. $2 Sr^{2+}$, $2 Ni^{2+}$, $2 Cu^{2+}$ kompleksi ljudskog inzulina poprimili su T_6 konformaciju poput nativnog ljudskog $2Zn^{2+}$ inzulina. Varijacije u koordinaciji oko metalnih iona, broj ključnih vodikovih veza, torzijski kut u disulfidnim mostovima te orijentacija PheB25 korištene su u određivanju strukturnih promjena uzrokovanih metalnim ionima. U Sr^{2+} kompleksu koordinacija metalnog iona koordiniranog s HisB10 sadrži četiri molekule vode i koordinacijska geometrija može biti interpretirana kao oktaedarska ili tetraedarska. Koordinacija oko HisB10 Ni^{2+} i Cu^{2+} tetraedarska je temeljni ioni leže na osi simetrije trećeg reda, sadrži i jednu molekulu vode. Udaljenost dva metalna iona u Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} kompleksima je 16,31 Å, 16,20 Å i 16,56 Å što je vrlo slično Zn-Zn udaljenosti koja iznosi 16,42 Å za T_6 stanje u nativnom Zn inzulinu. Ukupan broj intermolekulskih vodikovih veza koje su odgovorne za stabilnost inzulina nastale su vezanjem donorskog N-atoma i akceptorskog O-atoma između B4-D4 i B6-D6 u dimeru inzulina. Torzijski kut u disulfidnom mostu A6-A11 i A7-B7 su blizu 100° u T i -90° u R konformaciji nativne strukture inzulina. Struktura ljudskog inzulina sadrži samo dva metalna iona na B10/D10 His, dok modificirana struktura Arg inzulina sadrži dva ili četiri metalna iona ovisno o različitosti uvjeta kristalizacije.⁷

Iako se svaki monomer u dimeru sastoji od iste peptidne sekvence ipak postoje neke razlike u prostornoj konformaciji bočnog lanca. Jedan primjer je PheB25 koji je usmjeren prema hidrofobnoj jezgri peptida na jednoj strani dimera i njegov utjecaj je prekriveniz peptida na drugoj strani dimera. Heksamer inzulina koordinira dva Zn atoma sa imidazolnom skupinom od tri HisB10 i s tri molekule vode. U "2Zn" kristalnoj

strukturi, svih šest monomera su u T konformaciji. U prisutnosti visokih koncentracija klorida u β -stanicama, formiraju se 4Zn heksamerne strukture, pri čemu tri monomera postoje u R konformaciji, a ostala tri u T konformaciji. R konformacija prevladava u kristalima koji sadrže fenole. Ovo su važna saznanja jer fenol služi kao antimikrobno sredstvo, a klorid kao izotonično sredstvo u postupku pripreve inzulinskih pripravaka. Interakcije između dimera u heksameru slabije su od interakcija unutar samih dimera s većim Van der Waalsovima udaljenostima među dimerima u heksameru u usporedbi sa udaljenostima među monomerima u dimeru. Stoga je konfiguracija heksamera manje stabilna i podložna disocijaciji kada se koncentracija inzulina mijenja (npr. pri izlučivanju inzulina u krvotok).

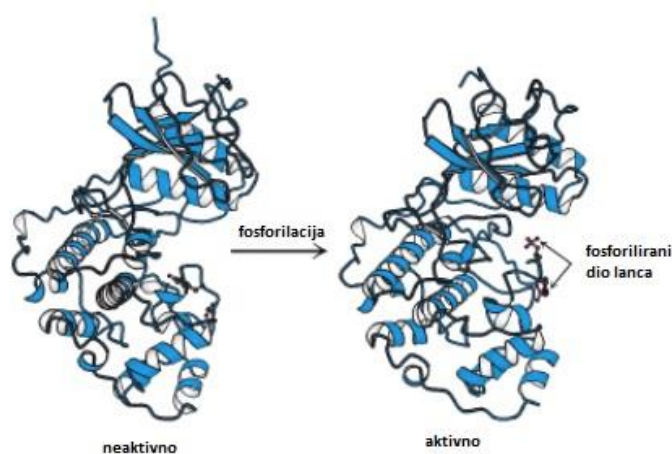
2.5. Protein-kinaza kao pokretač signalnog puta

Signalni put provođenja započinje receptorima koji posjeduju ugrađene protein-kinaze. Aktivacijom tih protein-kinaza pokreće se slijed događaja koji onda dovode do promjena izvršnih sudionika tih putova. Inzulin je hormon koji se izlučuje odmah nakon uzimanja obroka hrane. Sam put provođenja je vrlo kompleksan. Dovodi do mobilizacije i usmjeravanja prijenosnika glukoze na staničnu površinu. Takvi prijenosnici omogućuju stanici unošenje glukoze čija se razina u krvi povisi nakon uzimanja dobrog obroka hrane.

Inzulinski receptor po svojoj je građi dimer sastavljen od dviju jednakih jedinica. Svaka jedinica se sastoji od jednog α -lanca koji se nalazi izvan stanice i β -lanca koji se nalaze unutar stanice te prolaze kroz staničnu membranu. Dvije α -podjedinice zajedno oblikuju vezno mjesto za jednu molekulu inzulina. Na taj način dvije različite inzulinske molekule dolaze u interakciju s dvama jednakim lancima inzulinskog receptora. Signalni put započinje tako da se međusobno primiču dimerne receptorske jedinice u nazočnosti molekule inzulina. Zatvaranje oligomernog receptora ili oligomerizacija monomernih receptora oko vezanog liganda rabi se kod mnogih receptora koji sadržavaju protein-kinazu kao mehanizam koji započinje signalni put. Svaka se β -podjedinica sastoji od protein-kinazne domene. Tirozin-kinazni receptor katalizira prijenos fosforilne skupine s ATP-a na hidroksilnu skupinu tirozina. Kinaza inzulinskog receptora nalazi se u neaktivnoj konformaciji kada domena nije kovalentno promijenjena. Kinazu inaktivira položaj nestrukturirane petlje - aktivacijske petlja koja leži u središtu same strukture.⁸

2.6. Vežanje inzulina i aktivacija inzulinskog receptora

Dok se dvije α -podjedinice približe kako bi obuhvatile inzulinsku molekulu dolazi do istodobnog približavanja unutarstaničnih dijelova receptora koji sadržavaju protein-kinazne domene. Pri tom približavanju savitljiva aktivacijska petlja jedne kinazne podjedinice umetne se u aktivno mjesto druge kinazne podjedinice u sklopu dimera. Spajanjem dviju β -podjedinica kinazne domene kataliziraju dodavanje fosforilnih skupina iz ATP-a na tirozinske ostatke aktivacijskih petlji. Fosforilacija ovih tirozinskih ostataka dovodi do izrazite konformacijske promjene.



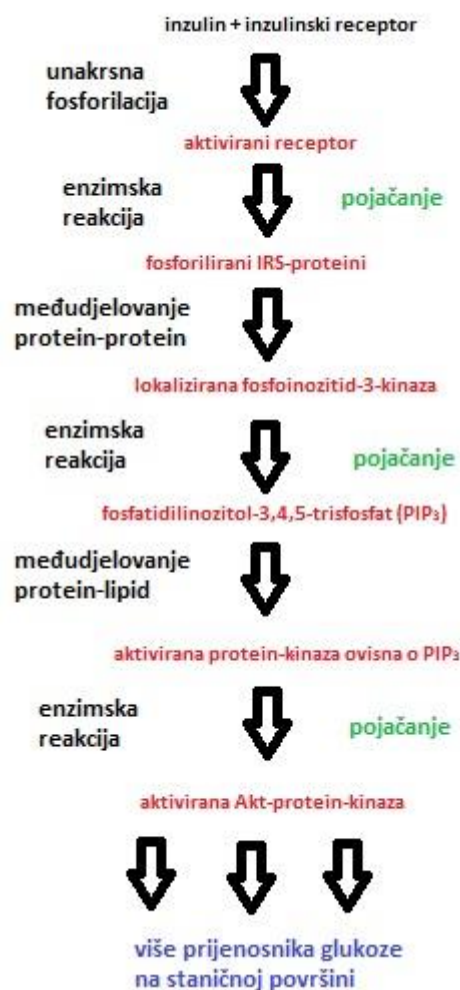
Slika 3. Aktivacija inzulinskog receptora fosforilacijom⁸

Promjena oblika aktivacijske petlje prevodi kinazu u aktivnu konformaciju. Na taj način vežanje inzulina na vanjskoj površini stanice dovodi do poticaja kinaze vezane uz membranu u unutrašnjost stanice.⁸

2.7. Aktivirana kinaza započinje kinaznu kaskadu

Fosforilacija dovodi do aktivacije tirozin-kinaznog inzulinskog receptora. Budući da se dvije receptorske jedinice nalaze u međusobnoj neposrednoj blizini, dolazi do fosforilacije dodatnih mjesta unutar receptora. Ta fosforilirana mjesta postaju vezna mjesta za druge spojeve u koje spada i skupina molekula - supstrati inzulinskog receptora (insuline-receptor substrates IRS). Od proteina IRS signal se prevodi preko niza molekula usidrenih u membrani do proteina-kinaze koja se na kraju odvaja od same membrane. IRS-1 i IRS-2 su dva homologna proteina slične građe. Područje na amino-kraju sadržava plekstrinsku homolognu domenu koja veže fosfoinozimid i domenu koja veže fosfotirozin. Te domene sudjeluju u procesu sidrenja proteina IRS za inzulinski receptor i pridruženu membranu. U svakom IRS proteinu postoje četiri slijeda tipa Tyr-X-X-Met. Receptorska tirozin kinaza odabire takve sljedove. Tako aktivirana kinaza inzulinskih receptora fosforilira te tirozinske ostatke.

U fosforiliranom obliku molekule IRS djeluju kao adapterski proteini- one ne dovode do same aktivacije sljedećeg sudionika puta, lipid-kinaze, već vežu lipid-kinazu i dovode je do membrane kako bi mogla djelovati na svoj supstrat (a to je lipid koji je gradivni element stanične membrane). Fosfotirozinske ostatke proteina IRS prepoznaju drugi proteini koji sadržavaju vrstu domene nazvana Src- homolognom (SH2). Te se domene vežu za područja polipeptida koje sadržavaju fosfotirozinske ostatke. Svaka specifična SH2 domena preferentno prepoznaje i veže fosfotirozin u nekom drugačijem sekvencijskom kontekstu. Lipid-kinaza sadrži SH2 koja dodaje fosforilnu skupinu na položaj 3 inozitola u fosfatidilinozitol-4,5-bifosfatu. Ti enzimi su heterooligomeri i sastoje se od 110kDa katalitičke podjedinice i 85kDa regulacijske podjedinice. Oni se preko SH2 domena regulacijskih podjedinica vežu na proteine IRS, što ih dovodi u dodir s membranom, gdje mogu fosforilirati PIP2 prevodeći ga tako u fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3). Taj lipidni proizvod potiče protein-kinazu (PDK1) putem plekstrinske homologne domene specifične za IP3 koja postoji u toj kinazi. Aktivirana protein-kinaza PDK1 fosforilira i aktivira Akt, iduću protein-kinazu. Akt nije vezana za membranu i kreće se unutar stanice fosforilirajući ciljne molekule koje nadziru putovanje prijenosnika za GLUT4 prema staničnoj površini, a također enzime koji potiču izgradnju glikogena. Kaskada koja pokreće vezanje inzulina za inzulinski receptor prikazana je na slici broj 4.⁸



Slika 4. Put signalizacije inzulinom

Kod nekih koraka na tom putu signalnog provođenja dolazi do pojaćanja signala. Budući da je aktivirani inzulinski receptor sam po sebi protein-kinaza svaki aktivirani receptor može fosforilirati mnoge molekule IRS. Aktivirani enzimi dalje pojaćavaju signal tijekom idućih dvaju koraka. Na taj način mali porast u koncentraciji cirkulirajućeg inzulina uzrokuje snažni unutarstanični odgovor. Aktivirani G-protein potiče vlastitu inaktivaciju otpuštanjem fosforilne skupine iz GTP-a. Proteini koji su fosforilirani na serinskim, treoninskim ili tirozinskim ostatcima ne prolaze spontanu hidrolizu nego posjeduju kinetičku stabilnost. Za hidroliziranje takvih aktiviranih proteina nužni su specifični enzimi koji ih vraćaju u početno stanje u kojem su se nalazili prije pokretanja samog signalizacijskog procesa. Lipid-fosfataze nužne su za uklanjanje fosforilnih skupina s inozitolnih lipida koji su bili fosforilirani u sklopu svojih signalnih kaskada. Mnoge se od

tih fosfataza aktiviraju u sklopu signalnog odgovora na inzulin pa tako početni signal sam stvara preduvjete za konačni završetak odgovora.⁸

2.8. Veza strukture, funkcije i bolesti

Rješavanje 3D strukture inzulina omogućilo je predviđanje važnih dijelova aktivnosti inzulina. Za tako mali protein sekundarna i tercijarna struktura je kompleksna. Ostaci koji su evolucijski sačuvani i važni za konformacijsku fleksibilnost vjerojatno su oni koji su ključni u određivanju afiniteta vezanja inzulina za receptor. Postoji nekoliko dijelova monomera inzulina koji su važni za olakšano vezanje na receptor. Istraživanja su otkrila nekoliko evolucijski sačuvanih aminokiselina u blizini površine monomera inzulina. Neke od njih nalaze se na N-terminalnom kraju A lanca (GlyA1, IleA2, ValA3, GluA4), na C-terminalnom kraju lanca A (TyrA19, CysA20, AsnA21) te na C-terminalnom kraju lanca B (GlyB23, PheB24, PheB25, TyrB26). Neki od ovih ostataka (A21, B23, B24 i B25) kroz negativnu kooperativnost definiraju kooperativno mjesto strukture inzulina. IleA2 i ValA3 nisu izloženi površini native strukture inzulina, ali pri premještanju C-terminalnog kraja B lanca za vrijeme vezanja na receptor prelaze na površinu inzulina. Nekoliko mutacija identificirano na ovim mjestima uzrokuju smanjenje afiniteta receptora za inzulin. Uključene su mutacije promjene aminokiseline: LeuB25→PheB25, SerB24→PheB24, LeuA3→ValA3. Osobe koje imaju takve mutacije pokazuju netoleranciju glukoze i hiperinzuliraju.

Lanac sadrži nekoliko područja koja su važna za vezanje na receptor. Kada je amino završetak N-acetiliran on pokazuje smanjeno vezivanje na receptor za 30% što ukazuje da je slobodni pozitivno nabijeni amino kraj odgovoran za vezanje na receptor. Izrezivanje Gly1 smanjuje aktivnost za 15% što ukazuje da je formiranje solnog mosta između Gly1 i C-kraja B lanca značajno za ispravno pozicioniranje peptida. Također je i C-kraj lanca A (naročito TyrA19, CysA20 i AsnA21) važan za afinitet vezanja za receptor inzulina.

B lanac najviše je proučavan u kontekstu odnosa strukture i aktivnosti pogotovo C-terminalni kraj. Prva četiri ostatka B lanca (N-terminalnog kraja) mogu se ukloniti što dovodi do minimalnog smanjenja aktivnosti veznog receptora (otprilike 70% aktivnosti je zadržano) dok uklanjanje HisB5 dovodi do velikog smanjenja aktivnosti (15% aktivnosti je zadržano). Nadalje, LeuB6 je odgovoran za aktivnost vezanja stoga njegovo uklanjanje dovodi do mutacije s manje od 1% afinitetom vezanja. CysB7 ima veliku važnost u održavanju disulfidnih veza između A i B lanaca. HisB10 je ključan za maksimalnu aktivnosti inzulina koji kada se zamijeni za AspB10 proinzulin neće prijeći u

aktivni inzulin i samim time dovodi do povećanja cirkulacije proinzulina. Zanimljivo je da takav sintetički inzulin koji sadrži AspB10 zamijenu, pokazuje porast od 500% u afinitetu vezanja u usporedbi s "divljim tipom" sintetičkog inzulina. C-terminalni kraj lanaca B sadrži evolucijski sačuvane ostatke koji su važni za vezanje na receptor uključujući GlyB23, PheB24, PheB25 i TyrB26. PheB24 stvara vodikove veze koje su bitne za nastanak dimera, a PheB25 pokazuje različite konformacije na dvije molekule koje obuhvaćaju dimer, što dokazuje da je to važno za konformaciju nativne strukture inzulina.

Dok su brojni aminokiselinski ostaci važni za vezanje inzulina na receptor (većinom ostaci N-terminalnog kraja A lanaca i ostaci C-terminalnog kraja B lanaca) postoji velika vjerojatnost da konformacijske promjene inzulina sekundarne i tercijarne strukture diktiraju samu stabilnost proteina i afinitet vezanja inzulina na receptor. Točan mehanizam kojim se inzulin veže na receptor, još uvijek nije objašnjen u potpunosti. Dakle, detaljnija struktura kompleksa inzulin-receptor u kombinaciji s funkcionalnim ispitivanjima treba dovesti do boljeg razumijevanja čimbenika koji određuju afinitet vezanja receptor-ligand i samu specifičnost vezanja.³

Do poremećaja funkcije inzulina dolazi zbog poremećaja u gušterači ili zbog posljedica starenja. Razina glukoze u krvi se opasno povećava što dovodi do bolesti dijabetesa. Za osobe s potpunom deficijencijom inzulina, kao što su djeca koja obole od dijabetesa u ranoj dobi, to može biti izrazito opasno. Velike količine glukoze dovode do dehidracije jer se tijelo pokušava riješiti viška glukoze kroz urin, također tijelo za prijenos energije koristi druge kiseliye molekule zbog čega dolazi do promjene pH krvi koja je opasna po život. Dijabetes ima teške dugotrajne efekte. Jedna je od većih kroničnih bolesti u industrijskom svijetu. Snižene razine inzulina do kojih dolazi kao posljedica starenja uzrokuju povišenu razinu šećera u krvi kroz duže vremenske periode. Molekule šećera se vežu za proteine u tijelu te ugrožavaju njihovu funkciju, a šećeri koji potječu iz glukoze se skupljaju te deformiraju i začepuju stanice.²

Primjećeno je da odrasla ženska osoba s dijabetesom tip I ima relativno smanjenu masu kostiju (osteoporoza) i povećani rizik prijeloma. Absorpcija, koncentracija i izlučivanje stroncija u ljudskom tijelu slična je onoj za kalcij. Ca i Sr adsorbirani su u probavnom traktu, koncentrirani u kostima i izlučuju se prvenstveno urinom. Zbog tih sličnosti niska koncentracija stroncija se trenutno koristi pri liječenju bolesti kostiju u

obliku stroncijevih soli za liječenje osteoporoze koja povećava postotak gustoće kosti i njihovo formiranje. Iako nema direktnih dokaza koji povezuju dijabetes s nedostatkom nikla primjećeno je da pri niskim koncentracijama glukoze u krvi te u uvjetima abnormalnog rasta javlja mali nedostatak nikla. Inzulinski kompleksi Sr, Ni i Cu u T6 konformaciji slično otpuštaju inzulin kao nativni Zn inzulin. Ti metalni ioni koji su prisutni u kompleksu mogu se koristiti u terapijske svrhe jer svaki od tih metalnih iona ima biološku važnost.⁷

U čistom obliku inzulin počinje djelovati relativno brzo unutar pola sata. Međutim, najčešće je potrebno imati inzulin koji će brzo djelovati, ali da se to djelovanje zadrži dugo. Obzirom na brzinu, intenzitet i trajanje inzulina dijelimo u tri skupine: inzuline kratkog, srednjeg i dugog djelovanja. Nakon početka masovne uporabe inzulinskih pripravaka utvrđeno je da pacijentima nije dovoljna samo jedna vrsta inzulina, već su se inzulini kratkog djelovanja miješali s inzulinima srednje dugog djelovanja. Zbog toga su se pojavili takozvani predmiješani inzulini koji sadrže točno određene količine oba inzulina. Najčešće broj u imenu formulacije inzulina označava koncentraciju brzo djelujućeg inzulina (europske zemlje). U predmiješanim inzulinima nalaze se humani inzulini ili humani inzulinski analozi kratkog djelovanja te humani inzulin srednje dugog djelovanja.⁹

§ 3. Literaturna vrela

¹ <https://hr.wikipedia.org/wiki/Inzulin> (preuzeto 16.9.2016.)

² <http://pdb101.rcsb.org/motm/14> (preuzeto 16.9.2016.)

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934755/> (preuzeto 16.9.2016.)

⁴ C.Grundahl Frankaer, Susanne Mosiin, Kenny Stahl and Pernille Harris, *Bio. Cryst.* **70** (2013) 110

⁵ Cristopher P. Hill, Zbigniew Dauter, Eleanor J. Dodson, Michael F. Dunn, *Biochem.* **30** (1991) 917

⁶ <https://hr.wikipedia.org/wiki/Inzulin#/media/File:InsulinHexamer.jpg> (preuzeto 16.9.2016.)

⁷ N. R. S. Krishna, V. Pattabhi, S.S. Rajan, *Protein & Peptide Letters* **18** (2011) 457

⁸ L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman &Co., New York, 2013, pp. 392-396

⁹ <https://hr.wikipedia.org/wiki/Inzulin> (preuzeto 16.9.2016.)