

Insulins fleksibilitet og bioaktivitet

Nye undersøgelser kaster lys over de strukturændringer, der ligger til grund for insulinmolekylets receptorbinding og dermed dets funktion

Af forskningsassistent, cand.scient. Danielle Keller, dak@pnga1.ki.ku.dk, og docent, dr.scient. Jens Jørgen Led, led@kiku.dk, Kemisk Institut, Københavns Universitet

Biologiske makromolekyleres struktur præsenteres normalt som et statisk billede. Det er imidlertid velkendt, at molekylerne er fleksible og i konstant indre bevægelse. Frekvensen af disse bevægelser strækker sig fra hurtige vibrationer af de kovalente bindinger på picosekund-skalaen, til langsomme reorienteringer af større dele af molekylet, der forløber over timer eller uger. Det står stadig mere klart, at denne fleksibilitet og bevægelighed af biomakromolekylerne er vigtig for deres funktion. Nyligt publicerede NMR-undersøgelser [1,2] viser således en tydelig korrelation mellem et proteins aktivitet og bevægeligheden af de områder af proteinmolekylet, der er afgørende for dets aktivitet.

Insulinmolekylets struktur og fleksibilitet

Insulin er et 5,8 kDa stort peptidhormon. I krystalfasen har den naturligt forekommende insulin (den native insulin) en struktur som vist i figur 1. I vandig opløsning, hvor det udfører sin funktion, danner insulinmolekylet, afhængigt af de fysiske forhold det befinder sig under, forskellige former for aggregater med varierende grader af fleksibilitet. Også mutationer påvirker strukturen og fleksibiliteten af insulinmolekylet i forskellig grad.

En af de mest stabile og faste former af insulin opnås i nærværelse af Zn^{2+} -ioner og phenol. Her dannes i vandig opløsning en hexamer bestående af seks insulinmolekyler, der alle antager den såkaldte R-form [3], der er vist i figur 2, side 22. I R-formen er den eksisterende B-kædehelix (B9-B19) forlænget til også at omfatte den N-terminale ende af kæden, dvs. aminosyreresterne B1-B8.

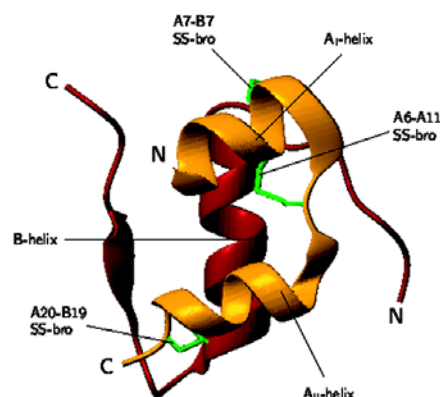
T-formen, der er den normale insulinstruktur (figur 1), danner også en hexamer i nærværelse af Zn^{2+} -ioner. T₆-hexameren er dog væsentligt mindre stabil end R₆-hexameren, og det har ikke været muligt at foretage en nøjagtig bestemmelse af dens struktur i opløsning.

Insulinmutanternes fleksibilitet varierer fra den relativt faste

struktur af den dimere SerB9^{Asp}-mutant [4], hvor Serin i position B9 er udskiftet med Asparaginsyre, og den monomere des-[PheB25]-mutant [5], hvor Phenylalanin i position B25 er fjernet, over delvist udfoldede mutanter som CysA6^{Ser}, CysA11^{Ser}-insulin [6], CysA6^{Ala}, CysA11^{Ala}-insulin [7] og PheB24^{Gly}-insulin [8], til den meget fleksible mutant, ThrB27^{Pro}, ProB28^{Thr}-insulin (PT insulin) [9].

Den biologisk aktive form af insulin er monomeren. Det har imidlertid længe været kendt, at den struktur insulinmonomeren har i krystalfasen eller oplagret i organismen (figur 1) ikke er den aktive form [10]. Insulinmolekylet må således undergå konformationelle ændringer for at kunne binde sig til insulinreceptoren og dermed udøve sin blodsukkersænkende effekt. For at opklare hvordan bindingen af insulinmolekylet foregår, har

Figur 1. Strukturen af den native insulinmonomer. Insulinmonomeren består af to kæder: A-kæden på 21 aminosyrer (vist i gul) og B-kæden, der er 30 aminosyrer lang (vist i rød). De to polypeptidkæder er sammenholdt af to disulfidbroer, CysA7-CysB7 og CysA20-CysB19 (angivet med grønt). Desuden er der en intern disulfidbro i A-kæden, CysA6-CysA11 (ligeledes angivet med grønt). A-kædens N- og C-terminale ender (A2-A8 og A13-A20) danner helixstrukturer, der forbindes af et loop. B-kæden indeholder også en helix (B10-B19). De tre helixelementer er angivet med spiralformede bånd. Den C-terminale ende har en udstrakt konformation, og den N-terminale ende er ustruktureret (random coil).



MMM Danmark A/S

- * Autoklaver
- * Opvaskemaskiner
- * Varmeskabe

86 17 61 77

CLAUSDAMM
4916 3388

Udstyr til:

- * steril produktion
- * bioteknologi
- * forskning

www.clausdammm.dk

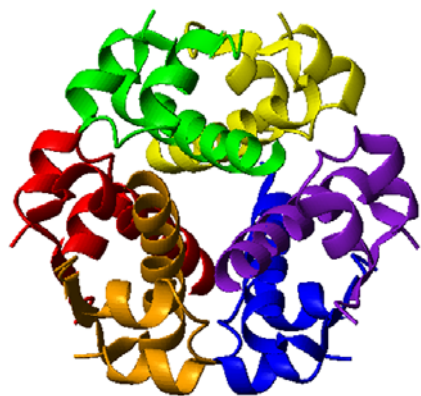
topflo Trykluftdrevne membranpumper - bare bedst!

Komplet sortiment af industrielle trykluftdrevne membranpumper:

- ✓ PE & PTFE pumper
- ✓ Metal pumper
- ✓ Sanitær pumper

Se os på H-2007, stand C2748

Topflo Danmark ApS, Tlf: 38 45 4500, Fax: 38 45 2500, e-mail: info@topflo.dk



Figur 2. Strukturen af R_6 -insulinhexameren. De seks monomerer er angivet med forskellige farver. I R_6 -strukturen er den native insulins B-kædehelix (B9-B19) forlænget og omfatter også den N-terminale ende af B-kæden, dvs. B1-B8. (Reproduceret med tilladelse fra *Biochemistry* 1997 36, 9409-9422).

de seneste års forskning især været fokuseret på bestemte områder af insulinmolekylet. Det er ad denne vej blevet muligt at få indsigt i, hvilke dele af molekylet der deltager i receptorbindingen.

Insulins interaktion med insulinreceptoren

Insulinreceptoren (IR) er et 480 kDa membranprotein, som består af fire polypeptidkæder: 2 α -kæder og 2 β -kæder. Insulin binder sig til α -kæderne i det extracellulære domæne. Strukturen af dette domæne er endnu ukendt, ligesom strukturen af den receptorbundne form af insulin endnu ikke er løst. Selve mekanismen, hvormed bindingen til receptoren foregår, og strukturen af det receptorbindende insulinmolekyle kan derfor indtil videre kun undersøges indirekte ved at studere insulinmutanter med varierende strukturer og sammenholde strukturforskellene med den biologiske aktivitet. Vha. punktmutationer og kemiske modifikationer har det været muligt at bestemme, hvilke af insulinmolekylets aminosyrerester der er nødvendige for bindingen til receptoren. Det er især rester i A_1 -helix og TyrA19 samt i B-helix og i den C-terminale ende af B-kæden, der er vigtige i denne sammenhæng [11-14].

Røntgenkristallografiske studier af en B29-A1 peptidbunden insulinmutant viste, at mutanten har samme sekundære og tertiære struktur som nativ insulin [10]. Samtidig blev det fundet at mutanten er inaktiv. Disse resultater viser, at fleksibilitet er altafgørende for insulins evne til at udtrykke sin biologiske aktivitet. NMR-studier af en anden insulinmutant, den aktive PheB24^{Gly}-insulin [8], hvor den C-terminale ende af B-kæden er drejet væk og er helt adskilt fra resten af molekylet, tyder på, at en sådan bevægelse er nødvendig, for at IR kan få kontakt med de aminosyrerester på insulinmolekylet, der interagerer med receptoren i insulin-IR-komplekset. Om den C-terminale ende af B-kæden vipper ud, som for PheB24^{Gly}-insulin, eller den blot ruller til side, som det er foreslået på baggrund af strukturelle studier af TyrB16^{Glu}, PheB24^{Gly}, des-B30-insulin [15], mangler endnu at blive bestemt.

A-kædens betydning

A-kædens betydning for receptorinteraktionen er blevet grundigt undersøgt. Specielt IleA2 og ValA3 er vigtige i den sammenhæng, idet udskiftning af disse rester resulterer i et markant fald i den biologiske aktivitet, især for A3-mutanter. ValA3 ligger delvist gemt i den tredimensionale struktur, og det blev derfor tidligt foreslået, at insulinmolekylet må undergå en strukturændring for at kunne danne en favorabel kontakt mellem ValA3 og insulinreceptoren [16].

I 1998 blev strukturen af de to A-kædemutanter, ValA3^{Gly}-insulin og ThrA8^{His}-insulin, publiceret [17]. Begge er mutanter af en monomer insulin skabt ved udskiftning af fire B-

kæderester med Glutaminsyre og fjernelse af ThrB30 (4E-insulin). ValA3^{Gly}-mutanten, hvis A_1 -helix er helt udfoldet, har 0.1% biologisk aktivitet sammenlignet med 4E-insulin, mens ThrA8^{His}-mutanten har en A_1 -helix, der er mere veldefineret end i 4E-insulin og er 43% mere aktiv end denne. På baggrund af disse resultater blev det foreslået, at der er en sammenhæng mellem α -helix karakteren af den N-terminale del af A-kæden og den biologiske aktivitet. Dvs. at en meget veldefineret helix skaber god kontakt mellem insulinmolekylet og receptoren og deraf følgende højere biologisk aktivitet, mens en dårligt defineret helix eller et ustruktureret A2-A9-segment giver dårlig kontakt med receptoren og resulterer i forringet aktivitet.

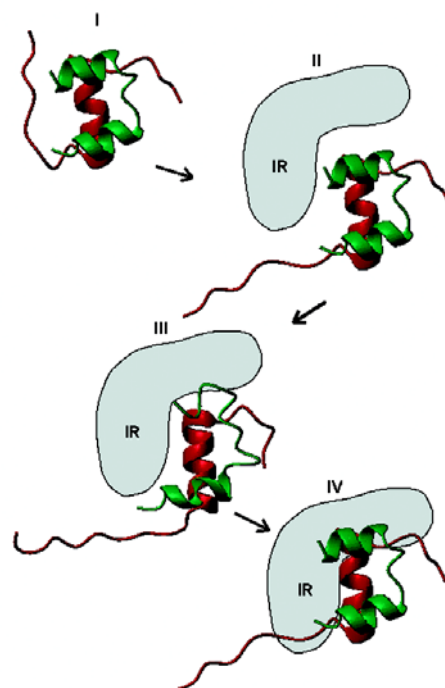
For nyligt er to A-kædemutanter, der begge mangler den interne disulfidbro i A-kæden, blevet undersøgt i vandig opløsning [7]. I den ene mutant er de to Cystein-rester, CysA6 og CysA11, udskiftet med Serin, i den anden er de udskiftet med Alanin. Deres biologiske aktivitet viste sig at være hhv. 0.1% og 5% sammenlignet med nativ insulin. Endvidere er begge ustrukturerede i den N-terminale del af A-kæden, selvom Alanin har stor evne til at danne og stabilisere helixstruktur, mens Serin har en væsentlig mindre evne [18]. Forskellen mellem de to mutanternes biologiske aktivitet sammenholdt med forskellen i evne til at danne og stabilisere helixstruktur tyder på, at det er *tilbøjeligheden* af A2-A9-segmentet til at danne helixstruktur snarere end graden af α -helix i det frie insulinmolekyle, der er afgørende for binding til receptoren og dermed for den biologiske aktivitet.

Model af bindingsmekanismen

Nylige undersøgelser af den højaktive insulinmutant ThrB27^{Pro}, ProB28^{Thr}-insulin (PT-insulin) [9] bekræfter denne ide og kaster nyt lys over de strukturændringer, der ligger til grund for insulinmolekylets receptorbinding og dermed dets funktion.

PT-insulinmutanten har vist sig at have en meget høj grad af fleksibilitet, samtidig med at den har en forøget evne til at aktivere insulinreceptoren.

Baggrunden for undersøgelserne af PT-insulin er resultaterne af nogle tidligere studier af insulinmutanten des-[PheB25]-insulin [5], hvor Phenylalanin nummer 25 i B-kæden mangler.



Figur 3. Model af interaktionen mellem insulin og insulinreceptoren. I: Det frie insulinmolekyle. Når insulinmolekylet nærmer sig receptoren flyttes den C-terminale ende af B-kæden for at eksponere de aminosyrerester, der normalt er skjult af denne (II). For at kunne navigere ind i receptorbindingssitet må A_1 -helix udfoldes (III). Til sidst foldes den igen for at sikre, at der er optimal interaktion med receptoren (Reproduceret med tilladelse fra *Biochemistry* 2001, 40. In press).

Herved er de fem C-terminale aminosyrerester rykket en plads frem i sekvensen. Specielt interessant er det, at ProB28, som i nativ insulin vender sin hydrofobe sidekæde væk fra selve molekylet og danner dimer-stabiliserende interaktioner med den anden monomer i en dimer, i den nye position i des-[PheB25]-insulin vender sin sidekæde ind mod resten af molekylet og dermed forhindrer stabiliseringen af insulindimeren. Det medfører, at des-[PheB25]-insulin er monomer. I PT-insulin er det forsøgt at skabe den samme effekt ved at bytte om på rækkefølgen af ThrB27 og ProB28. Alle NMR-eksperimenter tyder på at PT-insulin er monomer, men pga. mutantens meget store fleksibilitet har det ikke været muligt at bestemme dens struktur i rent vand. I 35% (v/v) vandig TFE danner PT-insulinmutanten imidlertid en konformation med samme sekundære strukturelementer som i det native insulinmolekyle. PT-mutanten har således en stor *tilbøjelighed* til at danne insulins native foldning.

Denne tilbøjelighed sammenholdt med PT-insulinmutantens høje biologiske aktivitet og dens fleksible struktur antyder, at PT-insulin befinder sig i en konformation, der afspejler en intermediaer tilstand på vejen mellem den frie og den receptorbundne form. Dermed er det nærliggende at foreslå en receptorbindingmekanisme, der involverer en partiel udfoldning af molekylet og specielt af den del af molekylet, der indeholder A₁-helix. Den høje biologiske aktivitet af PT-insulin kunne derfor skyldes, at molekylet i modsætning til nativ insulin allerede har overskredet barrieren mellem den foldede og den delvist udfoldede konformation. Den foreslåede mekanisme for receptorbindingen er vist i figur 3.

Det er i denne forbindelse interessant, at det for langt de fleste insulinmutanter er observeret, at A₁-helix er mindre stabil og veldefineret end de to øvrige helixer i insulin. Det skyldes, at A2-A8-segmentet indeholder en stor procentdel β-forgrenede aminosyrerester, der har en lav tilbøjelighed til at danne α-helix. Den her skitserede mekanisme for receptorbindingen forklarer, hvorfor naturen har valgt at placere disse rester i et segment, der danner en struktur, som grundlæggende er i modstrid med deres natur (læs: tilbøjelighed).

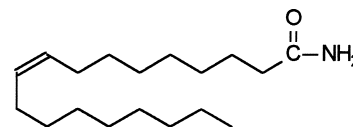
Til slut skal vi nævne, at PT-insulinmutanten blev fremstillet af cand.med., ph.d. Knud Josefsen og cand.scient. Rikke Clausen, Bartholin Institut, Kommunehospitalet, København. Endvidere har vi udført en stor del af de NMR-eksperimenter, der ligger til grund for studierne af PT-insulinmutanten, med anvendelse af 800 MHz NMR-spektrometret ved Dansk Instrument Center for NMR Spektroskopi af Makromolekyler, Carlsberg Forskningscenter. Vi er disse forskere og Centret megen tak skyldig.

Referencer

1. Feher, V.A. & Cavanagh, J. (1999) *Nature* **400**, 289-293.
2. Volkman, B.F., Lipson, D., Vemmer D.E. & Kern, D. (2001) *Science* **291**, 2429-2433.
3. Chang, X., Jørgensen, A.M.M., Bardrum, P., & Led, J.J. (1997) *Biochemistry* **36**, 9409-9422.
4. Jørgensen, A.M.M., Kristensen, S.M., Led, J.J. & Balschmidt, P. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 1146-1163.
5. Jørgensen, A.M.M., Olsen, H.B., Balschmidt, P., & Led, J.J. (1996) *J. Mol. Biol.* **257**, 684-699.
6. Hua, Q.X., Hu, S.Q., Frank, B.H., Jia, W., Chu, Y.Q., Wang, S.H., Burke, G.T., Katsoyannis, P.G. & Weiss, M.A. (1996) *J. Mol. Biol.* **264**, 390-403.
7. Weiss, M.A., Hua, Q.X., Jia, W., Chu, Y.C., Wang, R.Y., & Katsoyannis, P.G. (2000) *Biochemistry* **39**, 15429-15440.
8. Hua, Q.X., Shoelson, S.E., Kochoyan, M. & Weiss, M.A. (1991) *Nature* **354**, 238-241.
9. Keller, D., Clausen, R., Josefsen, K. & Led, J.J. (2001) *Biochemistry* **40**, In press.
10. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Bing, X. & Markussen, J. (1991) *J. Mol. Biol.* **220**, 425-433.
11. Pullen, R.A., Lindsay, D.G., Wood, S.P., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Wollmer, A., Krail, G., Zahn, H., Gliemann, J. & Gammeltoft, S. (1976) *Nature* **259**, 369-373.
12. Gammeltoft, S. (1984) *Physiol. Rev.* **64**, 1321-1378.
13. Brange, J., Owens, D.R., Kang, S. & Vølund, A. (1991) *Diabetes Care* **13**, 923-954.
14. Mirmira, R.G., Nakagawa, S.H., & Tager, H.S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1428-1436.
15. Ludvigsen, S., Olsen, H.B., & Kaarsholm, N.C. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**, 1-7.
16. Nakagawa, S.H. & Tager, H.S. (1992) *Biochemistry* **31**, 3204-3214.
17. Olsen, H.B., Ludvigsen, S., & Kaarsholm, N.C. (1998) *J. Mol. Biol.* **284**, 477-488.
18. Padmanabhan S., Marquese S., Ridgeway T., Laue T.M. & Baldwin R.L. (1990) *Nature* **344**, 268-270.
19. Blaber, M., Zhang, X. & Matthews, B.W. (1993) *Science* **260**, 1637-1640.

Nyt om et simpelt sovemiddel

Ved ekstraktion af rygmarvsvæsken fra katte, som var blevet forhindret i at sove, har man isoleret (Z)-octadec-9-enamid, som indsprøjtet i rotter fik dem til at falde i søvn. Stoffet synes kun at have få bivirkninger.



Carl Th.

Cat napping, *Chemistry in Britain*, September 1995, side 662.