

RECEPTOR INSULINY I JEGO ZWIĄZEK Z RÓŻNYMI FORMAMI INSULINOOPORNOŚCI*

INSULIN RECEPTOR AND ITS RELATIONSHIP
WITH DIFFERENT FORMS OF INSULIN RESISTANCE.

Aleksandra ROJEK, Marek NIEDZIELA

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
II Katedra Pediatrii, Klinika Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego

Streszczenie: Insulina, wiążąc się do swego receptora, odgrywa niezwykle ważną rolę w utrzymaniu homeostazy całego organizmu. Receptory insuliny obecne są we wszystkich komórkach kręgowców, co odzwierciedla różnorodność procesów regulatorowych, w których hormon ten bierze udział. Na poziom ekspresji receptora insuliny mogą wpływać różne czynniki, w tym sama insulina czy stopień rozwoju organizmu, a mutacje w receptorze prowadzą do rozwoju insulinooporności o różnym stopniu nasilenia, która towarzyszy takim schorzeniom, jak: cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroby sercowo-naczyniowe, niewydolność serca, zespół metaboliczny, a nawet bezpłodność u kobiet. Poznano już ponad 50 mutacji w genie receptora insuliny, które związane są z rzadkimi postaciami insulinooporności, takimi jak: leprechaunizm, insulinooporność typu A czy zespół Rabsona-Mendenhalla. Analizy molekularne genu receptora insuliny przyczynić się mogą do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw różnych form insulinooporności oraz opracowania znacznie lepszych metod leczenia pacjentów.

Słowa kluczowe: receptor insuliny, gen *INSR*, alternatywny splicing, izoformy receptora insuliny, receptory hybrydowe, insulinooporność.

Summary: By binding to its receptor, insulin plays a very important role in maintaining the whole organism's homeostasis. Insulin receptors are present in all cells of vertebrates, reflecting the diversity of regulatory processes in which this hormone is involved. There are many different factors which may influence the level of insulin receptor expression, including the sole insulin or stage of development and mutations in the receptor lead to the development of insulin resistance that differ in the level of severity and is associated with such disorders as *diabetes mellitus*, hypertension, cardiovascular disorders, heart failure, metabolic syndrome and even infertility in women. More than 50 mutations in insulin receptor gene have already been known. These mutations are associated with rare forms of insulin resistance like leprechaunism, insulin resistance type A or Rabson-Mendenhall syndrome. Molecular analysis of insulin receptor gene may lead to better understanding of molecular mechanisms underlying various types of insulin resistance and help to develop much more efficient treatment modalities in patients.

*Praca finansowana w ramach Badań Statutowych Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego, Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu (502-01-01 104118-06037).

Key words: insulin receptor, *INSR* gene, alternative splicing, insulin receptor isoforms, hybrid receptors, insulin resistance.

Wykaz stosowanych skrótów: **RMS** (ang. *Rabson-Mendenhall Syndrome*) – zespół Rabsona-Mendenhalla; **INSR** (ang. *insulin receptor*) – gen kodujący receptor insuliny; **INSR** – transkrypt genu receptora insuliny lub receptor insuliny; **PCOS** (ang. *polycystic ovary syndrome*) – zespół policystycznych jajników; **SNP** (ang. *single nucleotide polymorphism*) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu; **EGFR** (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; **C/EBP β** (ang. *CAAT/enhancer binding protein β*) – białko wiążące się z sekwencją wzmacniającą CAAT; **TBP** (ang. *TATA binding protein*) – białko wiążące się z sekwencją TATA; **TAFs** (ang. *TATA associated factors*) – czynniki TAF oddziałujące z białkiem TBP; **GRE** (ang. *glucocorticoid response element*) – element odpowiedzi na glikokortykoidy; **CAT** (ang. *chloramphenicol acetyltransferase*) – acetylotransferaza chloramfenikolu; **EMSA** (ang. *electromobility shift assay*) – test retardacji żelowej; **IR-DBP** (ang. *insulin receptor DNA binding protein*) – białko wiążące się z DNA genu receptora insuliny; **HMG1-Y** (ang. *high mobility group*) – białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej, strukturalnie niehistonowe białka chromatyny; **HT-FIR** (ang. *hepatocyte-specific transcription factor of the insulin receptor gene*) – specyficzny dla hepatocytów czynnik transkrypcyjny biorący udział w tkankowo-specyficznej ekspresji genu receptora insuliny; **IGF-I**, **IGF-II** (ang. *insulin-like growth factor I, II*) – insulinopodobne czynniki wzrostu; **ISE** (ang. *intronic sequence enhancer*) – intronowa sekwencja wzmacniająca; **ESE** (ang. *exonic sequence enhancer*) – egzonowa sekwencja wzmacniająca; **ISS** (ang. *intronic sequence silencer*) – intronowa sekwencja wyciszająca; **ESS** (ang. *exonic sequence silencer*) – egzonowa sekwencja wyciszająca; **5'**, **3'UTR** (ang. *5'*, *3' untranslated region*) – region nieulegający translacji odpowiednio na końcu 5' i 3' transkryptu; **pre-mRNA** – prekursorowy RNA; **BP** (ang. *branch point*) – miejsce rozgałęzienia w intronie; **U1snRNP** (ang. *U-rich 1 small nuclear ribonucleoprotein particle*) – mała jądrowa rybonukleoproteina 1, bogata w reszty uracylu; **SF2/ASF** (ang. *splicing factor 2/alternative splicing factor*) – czynnik splicingowy 2/alternatywny czynnik splicingowy; **hnRNP-A1, F** (ang. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1, F*) – heterogenna jądrowa rybonukleoproteina A1, F; **IRS** (ang. *insulin receptor substrate*) – białko substratowe receptora insuliny; **APS** (ang. *adaptor protein*) – białko adaptorowe; **PI3K** (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) – kinaza fosfatydylo-3-inozytolu; **PIP2** (ang. *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) – 4,5-bisfosforan fosfatydyloinozytolu; **PIP3** (ang. *phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) – 3,4,5-trifosforan fosfatydyloinozytolu; **GLUT4** (ang. *glucose transporter 4*) – 4 transporter glukozy; **Grb-2** (ang. *growth factor receptor-binding protein 2*) – białko 2 wiążące receptor dla czynnika wzrostu; **ATP** (ang. *adenosinetriphosphate*) – adenozynotrifosforan; **LRR** (ang. *leucine-rich repeat*) – powtórzenie bogate w leucynę; **CR** (ang. *cysteine rich*) – region bogaty w reszty cysteiny; **FU** (ang. *furin-like*) – region zawierający powtórzenia typu furyny; **Fn0**, **Fn1**, **Fn2** (ang. *fibronectin type III*) – domeny fibronektyny typu 3; **TM** (ang. *transmembrane domain*) – domena transbłonowa; **JM** (ang. *juxtamembrane domain*) – domena podbłonowa; **TK** (ang. *tyrosine kinase domain*) – domena o aktywności kinazy tyrozynowej; **CT** (ang. *carboxyterminal tail*) – region karboksyterminalny; **ER** (ang. *endoplasmatic reticulum*) – retikulum endoplazmatyczne; **Grp94** (ang. *glucose-regulated protein*) – białko regulowane glukozą o masie cząsteczkowej 94 kDa; **kDa** – kilodalton; **HSP90** (ang. *heat shock protein 90*) – białko szoku cieplnego o masie cząsteczkowej 90 kDa; **E11⁺** – izoforma transkryptu receptora insuliny zawierająca alternatywny egzon 11 lub kodowane przez ten transkrypt białko; **E11⁻** – izoforma transkryptu receptora insuliny niezawierająca alternatywnego egzonu 11 lub kodowane przez ten transkrypt białko; **IgG** (ang. *immunoglobulin G*) – immuno-globulina G; **Met** – metionina; **VLDL** (ang. *very low density lipoproteins*) – lipoproteiny bardzo małej gęstości; **CGL** (ang. *congenital generalized lipodystrophy*) – wrodzona całkowita lipodystrofia; **FPL** (ang. *familial partial lipodystrophy*) – wrodzona częściowa lipodystrofia; **AGPAT2** (ang. *1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2*) – O-acetylotransferaza 2 1-acyloglicerolo-3-fosforanu; **BSCL2** (ang. *Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy type 2*) – Berardinelli-Seip wrodzona lipodystrofia typu 2; **PPAR γ** (ang. *peroxisome proliferator activated receptor gamma*) – jądrowy receptor typu gamma aktywowany przez proliferatory peroksy-somów; **ZMPSTE24** (ang. *zinc metalloproteinase, STE24 Saccharomyces cerevisiae homologue*) – metaloproteina cynkowa, homolog STE24 drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

WSTĘP

Ścieżka sygnalizacyjna związana z insuliną odgrywa niezwykle ważną rolę w utrzymaniu homeostazy całego organizmu, w tym w regulacji gospodarki węglowoda-

nowej, syntezie glikogenu, metabolizmie lipidów i białek, transporcie jonów i aminokwasów, w kontroli cyklu komórkowego, proliferacji i różnicowania komórek czy transkrypcji genów jak również w syntezie tlenu azotu.

Receptory insuliny obecne są praktycznie we wszystkich komórkach kręgowców, co odzwierciedla różnorodność procesów regulatorowych, w których insulina bierze udział. Mimo tego, u człowieka stwierdzono, że niektóre czynniki mogą wpływać na poziom ekspresji receptora, w tym sama insulina, ale również glikokortykoidy czy stopień rozwoju organizmu. Co więcej, splicing transkryptu receptora insuliny również podlega regulacji w zależności od rozwoju [42,81].

Mutacje w receptorze insuliny prowadzą do rozwoju insulinooporności o różnym stopniu nasilenia. Tego typu objawy obserwuje się w przypadku takich schorzeń, jak: cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroby sercowo-naczyniowe, niewydolność serca, zespół metaboliczny, a nawet bezpłodność u kobiet [152].

Konsekwencje zdrowotne insulinooporności najlepiej obrazuje zespół policystycznych jajników – PCOS (ang. *polycystic ovary syndrome*) czy predyspozycja do zachorowalności na niektóre nowotwory, np. piersi, jelita grubego czy trzustki [1,16,28–30,33,41,44,47,55,56,79,89,90,96,102,103,115,116,121,124,156,163].

W jaki sposób insulinooporność predysponuje do zespołu policystycznych jajników?

Prawie 30 lat temu wykryto, że pacjenci ze skrajną insulinoopornością mają powiększone policystyczne jajniki i hiperandrogenizm pochodzenia jajnikowego [62]. Niedawno stwierdzono, że zasadniczo wszystkie zespołowe postaci insulinooporności mają powiększone jajniki [6,97,98,108]. Dziesięć lat temu dowiedziono, że metformina zwiększa owulację u pacjentów z powszechnymi postaciami zespołu policystycznych jajników (PCOS) i od tamtego czasu bardzo silny nacisk został położony na stosowanie leków uwrażliwiających na działanie insuliny w leczeniu PCOS [29,30,41,47,90,115,156]. Tak więc insulina jest potencjalnym czynnikiem wzrostowym dla jajnika i silnym bezpośrednim stymulatorem jajnikowej produkcji androgenów. Powszechnym czynnikiem w skrajnych zespołach insulinooporności i często występującym PCOS jest więc hiperinsulinizm. Dla kontrastu, gonadotropiny są stymulatorem prawidłowego wzrostu jajnika w czasie dojrzewania i stymulatorem produkcji estrogenów i progesteronu. Jednakże, w żadnych badaniach zespołowej insulinooporności czy w badaniach powszechnych postaci PCOS nie została ustalona unikalna rola insuliny jako stymulatora wzrostu jajnika, wtedy gdy poziomy gonadotropin są niskie. Badania dowiodły, że wzrost jajnikowy i steroidogeneza są stymulowane prawidłowo przez gonadotropiny w czasie dojrzewania, zaś hiperinsulinemia stymuluje patologiczny wzrost jajnika i androgenozę przez wszystkie okresy życia [99]. Insulina stymuluje jajnik niezależnie od gonadotropin [6,22,62,97,98,108,109]. Dodatkowo, u niemowląt i małych dzieci z leprechaunizmem, powiększenie jajników może być bardzo skrajne. U zdrowych niemowląt z krążącymi gonadotropinami należy oczekiwać, że objętość jajników wynosi mniej niż 1 cm³ [2,7,9,59,63,118,157].

U starszych pacjentów z lipodystrofią leczonych leptyną i u pacjentów z autoprzeciwciałami do receptora insuliny, obserwowano poprawę funkcji jajnika (tj.

obniżenie wydzielania androgenów i powrót miesiączkowania) jako wynik poprawy insulinooporności. Jakkolwiek, nie było zmiany wielkości jajników w grupach starszych pacjentów [6,97,98]. Hiperandrogenizm u kobiet z PCOS związany jest z uogólnionym wzrostem w steroidogenezie, szczególnie włączając aktywność cytochromu P450c17 α , kluczowego enzymu w biosyntezie jajnikowych androgenów. Hiperinsulinemia stymuluje bezpośrednio steroidogenezę jajnikową przez wzrost aktywności P450c17 α lub pośrednio przez stymulację uwalniania gonadotropin [28,102,103]. Interesujące, że u młodszych pacjentów dominuje wzrost jajnika a nie wzrost androgenów, podczas gdy u starszych pacjentów oba zjawiska zwykle są obserwowane (wzrost jajników i wzrost wydzielania jajnikowych androgenów) [98].

Insulinooporność a nowotwory

Określenie: zespół metaboliczny opisuje powiązania między otyłością, insulinoopornością a ryzykiem szeregu chorób przewlekłych, w tym raka. Wiele z tych powiązań nadal nie jest wyjaśnionych, jednakże wydaje się, że nocna lipoliza, wtórna do stymulacji współczulnej może nie tylko powodować insulinooporność, ale również może być odpowiedzialna za hiperinsulinemię poprzez stymulację wydzielania i zmniejszenia klirensu insuliny przez wątrobę. Uzyskane w ten sposób zaburzenia – wzrost nocnego stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i insuliny – mogą w synergistyczny sposób zwiększać ryzyko niektórych typów raka [55].

Otyłość i insulinooporność są czynnikami ryzyka rozwoju raka sutka i są związane z późnym stadium choroby oraz złą prognozą. Angiogeneza jest niezwykle istotna w rozwoju i progresji raka sutka i jest prawdopodobne, że wzmożona w otyłości produkcja adipocytokin, takich jak: VEGF, HGF, leptyna, TNF α , HBEGF i IL-6 wzmacnia angiogenezę, podczas gdy stężenie adiponektyny, która hamuje angiogenezę jest zmniejszone w otyłości [116]. Otyłość jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju i progresji raka trzustki i na modelu *in vivo* wykazano, że obniżone stężenie adiponektyny oraz insulinooporność mogą prowadzić bezpośrednio do zmian w mikrośrodowisku guza i nasilać wzrost oraz rozsiew raka trzustki [163].

Do tej pory opisanych zostało ponad 50 mutacji genu kodującego receptor insuliny, które związane są z rzadkimi postaciami insulinooporności jak leprechaunizm, insulinooporność typu A czy zespół Rabsona-Mendenhalla. Dzięki analizom DNA i RNA pochodzącego od pacjentów, u których zdiagnozowano te zespoły chorobowe, możliwe stało się określenie struktury i funkcji receptora w procesie aktywacji białek leżących na dalszych etapach w ścieżce sygnalizacyjnej insuliny. W zależności od efektów mutacji dokonano ich podziału na 4 grupy czy klasy. Grupa 1 obejmuje takie mutacje, których skutkiem jest obniżony poziom transkryptu *INSR*. Do grupy 2 należą mutacje prowadzące do zaburzeń wewnątrzkomórkowego transportu receptora i jego obróbki potranslacyjnej (np. odcięcia peptydu sygnałowego czy glikozylacji). W grupie 3 znajdują się mutacje związane z defektami w procesie wiązania insuliny do receptora, a w klasie 4 skupiają się mutacje powodujące zaburzenia w aktywności katalitycznej domeny kinazy tyrozynowej.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat receptora insuliny i jego związku z różnymi postaciami insulinooporności.

1. GEN KODUJĄCY RECEPTOR INSULINY (*INSR*)

Gen kodujący receptor insuliny *INSR* (Gene ID: 3643) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu 19 chromosomu w locus 19p13.2→p13.3, ma długość ponad 180 kpz (kilopar zasad) i składa się z 22 egzonów przedzielonych klasycznymi intronami typu U2 (ryc. 1).

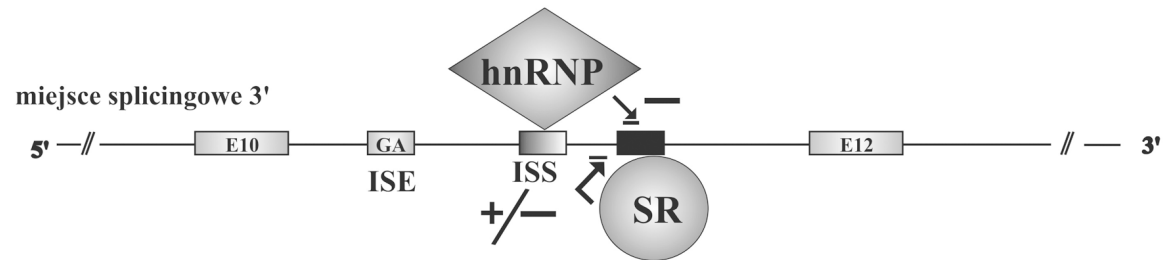
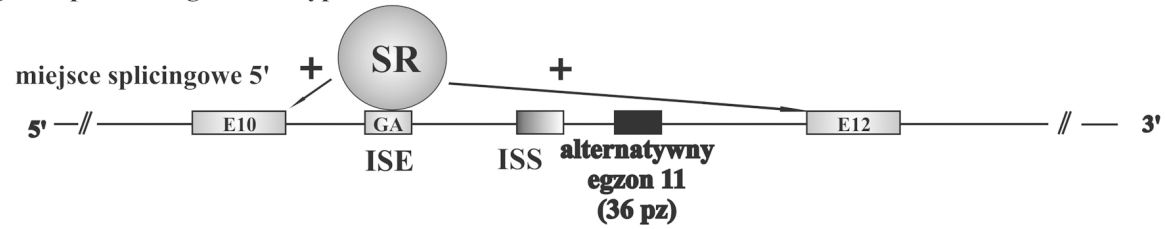
Większość egzonu pierwszego koduje 27-aminokwasowy peptyd sygnałowy kierujący białko do błony komórkowej. Pierwsze 11 egzonów koduje podjednostkę α receptora (ta część genu obejmuje 90 kpz), podczas gdy kolejne 11 – podjednostkę β i rozpościera się na długości około 30 kpz [27,57,131,153]. Już pod koniec lat 80 ubiegłego wieku stwierdzono obecność polimorfizmów pojedynczego nukleotydu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) w pozycjach: 20, 421, 465 oraz 519, odpowiednio: GGA (Gly)-GGG (Gly), ATC (Ile)-ACC (Thr), CAG (Gln)-AAG (Lys), GAT (Asp)-GAC (Asp) [131]. Natomiast obecnie w bazie danych NCBI SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=>; 17.06.2009) zdeponowanych jest w sumie aż 1820 polimorfizmów SNP w ludzkim genie *INSR*, które występują zarówno w regionie promotorowym genu, jak i w regionach kodujących, intronach oraz regionach 5' i 3' UTR. Okazuje się, że cztery z tych polimorfizmów wiążą się klinicznie z różnymi formami insulinooporności.

Przykładowo, Kadowaki i wsp. w 1988 r zidentyfikowali dwa różne allele genu receptora insuliny u pacjenta z niezwykle ciężką postacią insulinooporności – leprechaunizmem. Matczyny allele pacjenta miał mutację zmiany sensu w egzonie 6 (AAG-GAG), której skutkiem była zamiana lizyny na kwas glutaminowy w podjednostce α receptora (Lys460-Glu), podczas gdy w allelu ojcowskim obecna była mutacja wprowadzająca kodon stop translacji w kodonie 672. Białko powstające na matrycy skróconego transkryptu pochodzącego z tego allelu, nie miało więc domeny transbłonowej, jak i całej podjednostki β [60].

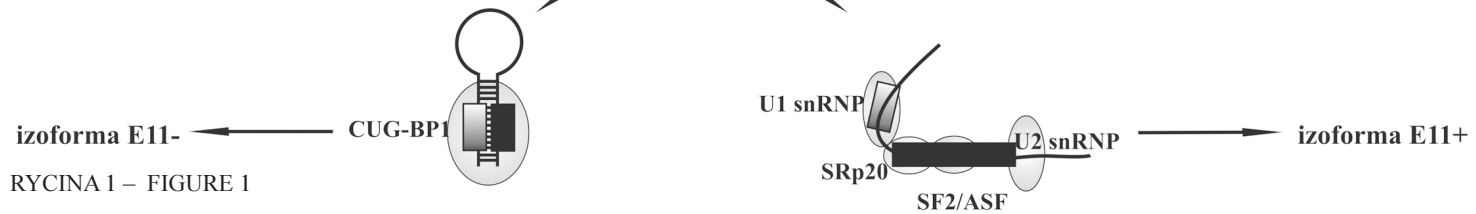
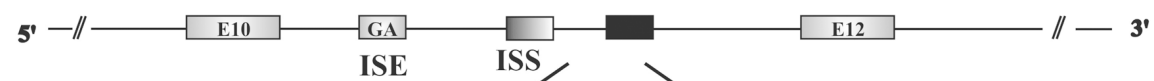
Z kolei obecność polimorfizmu AAT-AGT również w egzonie 6 (Asn462-Ser) stwierdzono u pacjenta, u którego zdiagnozowano insulinooporność oraz *acanthosis nigricans* [60].

W 1990 Moller i wsp. zidentyfikowali polimorfizm w egzonie 19 podczas badania członków rodziny, w której u trzech siostr zdiagnozowano insulinooporność typu A (OMIM ID: 610549), u ojca hiperinsulinemię (i inne nieprawidłowości) bez występowania *acanthosis nigricans*, podczas gdy matka była osobą zdrową. W wyniku przeprowadzenia badań molekularnych stwierdzono, że ojciec wraz z córkami byli nosicielami mutacji GCA-ACA w kodonie 1134 zmieniającej wysoce konserwatywny w domenach kinaz tyrozynowych aminokwas alaninę, na treoninę. Skutkiem tej mutacji, jak wykazały analizy przeprowadzone na transfekowanych komórkach CHO wytwarzających zmutowane receptory insuliny, była obniżona autofosforylacja białka receptorowego po związaniu swojego liganda. Natomiast proces dojrzewania receptora był prawidłowy, podobnie jak jego zdolność wiązania insuliny [92].

fragment pierwotnego transkryptu *INSR*



drugorzędowa struktura RNA



RYCINA 1 – FIGURE 1

Cztery lata później stwierdzono obecność polimorfizmu SNP w układzie heterozygotycznym (CGG-CAG) w egzonie 20 genu *INSR* u 22 niespokrewnionych kobiet, które cierpiały na insulinooporność, *acanthosis nigricans* oraz zespół policystycznych jajników (OMIM ID: 610549). Skutkiem opisywanego polimorfizmu SNP była zamiana aminokwasu argininy w pozycji 1174 na glutaminę (Arg1174-Gln) w domenie kinazy tyrozynowej w wewnątrzkomórkowej części podjednostki β receptora. Obecność tej mutacji stwierdzono u chorej siostry pacjentki, natomiast u matki była ona nieobecna. Prawdopodobnie nosicielkami mutacji były także dwie chore ciotki rodziców, dlatego też polimorfizm SNP CGG-CAG (Arg1174-Gln) uważa się za główną przyczynę dziedziczonej w sposób dominujący insulinooporności [93].

Dzięki poznaniu budowy egzonowo-intronowej genu *INSR* możliwe było określenie funkcjonalnych i strukturalnych regionów kodowanego przez ten gen białka. I tak poszczególne egzony kodują: 1 – peptyd sygnałowy, 2 – miejsce wiązania insuliny, 3 – region bogaty w reszty cysteiny, 4–10 – znaczną część podjednostki α receptora, 11 – stanowi mini egzon podlegający alternatywnemu splicingowi, 12–14 – zewnątrzkomórkową część podjednostki β , 15 – domenę transbłonową (ang. *transmembrane domain*), 16 – region pomiędzy regionem transbłonowym białka a domeną kinazy (tzw. domenę podbłonową; ang. *juxtamembrane domain*), 17–21 wraz z niewielką częścią egzonu 22 – domenę kinazy tyrozynowej, 22 – karboksylową część białka. Region obejmujący egzony 2–5 jest homologiczny do odpowiadającego mu segmentu ludzkiego genu kodującego naskórkowy czynnik wzrostu EGFR (ang. *epidermal growth factor*) [131].

2. CHARAKTERYSTYKA REGIONU PROMOTOROWEGO GENU RECEPTORA INSULINY

Region promotorowy genu kodującego receptor insuliny został określony już w 1987 roku przez grupę Araki [3], a kolejne badania przeprowadziła między innymi grupa Seino [131] (ryc. 2). Rozciąga się on na około 1800 pz powyżej kodonu startu translacji ATG,

RYCINA 1. Gen *INSR* kodujący ludzki receptor insuliny z uwzględnieniem dwóch alternatywnych form splicingowych transkryptu oraz kodowanych przez te transkrypty izoform dojrzałego białka receptora: TSS – miejsce inicjacji transkrypcji (ang. *transcription initiation site*), ATG – start translacji, 5', 3' UTR – region nieulegający translacji na końcu 5' i 3' transkryptu (ang. *untranslated region*), TAA – kodon stop translacji. 1–22 – egzony, L1, L2 – domeny zawierające powtórzenia bogate w leucynę LRR (ang. *leucine-rich repeat*), CR – region bogaty w reszty cysteiny (ang. *cysteine-rich region*), Fn0, Fn1, Fn2 – domeny fibronektyny typu III, Ins – insert w domenie Fn1, TM – domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*), JM – domena podbłonowa (ang. *juxtamembrane domain*), TK – domena kinazy tyrozynowej (ang. *tyrosine kinase domain*), CT – region karboksyterminalny (ang. *carboxyterminal tail*). Czarnymi trójkątami zaznaczono miejsca glikozylacji w białku (wg [25,137], zmieniony)

FIGURE 1. *INSR* gene encoding for human insulin receptor with two alternative isoforms of transcripts together with encoded proteins. TSS – transcription initiation site, ATG – start of translation, 5', 3' UTR – untranslated regions on 5' and 3' end of transcript, TAA – translation stop codon, 1–22 – exons, L1, L2 – domains containing leucine-rich repeats, CR – cysteine-rich region, Fn0, Fn1, Fn2 – fibronectin type III domains, Ins – insert in Fn1 domain, TM – transmembrane domain, JM – juxtamembrane domain, TK – tyrosine kinase domain, CT – carboxyterminal tail. Black triangles stand for glycosylation sites in the protein (according to [25,137], changed)

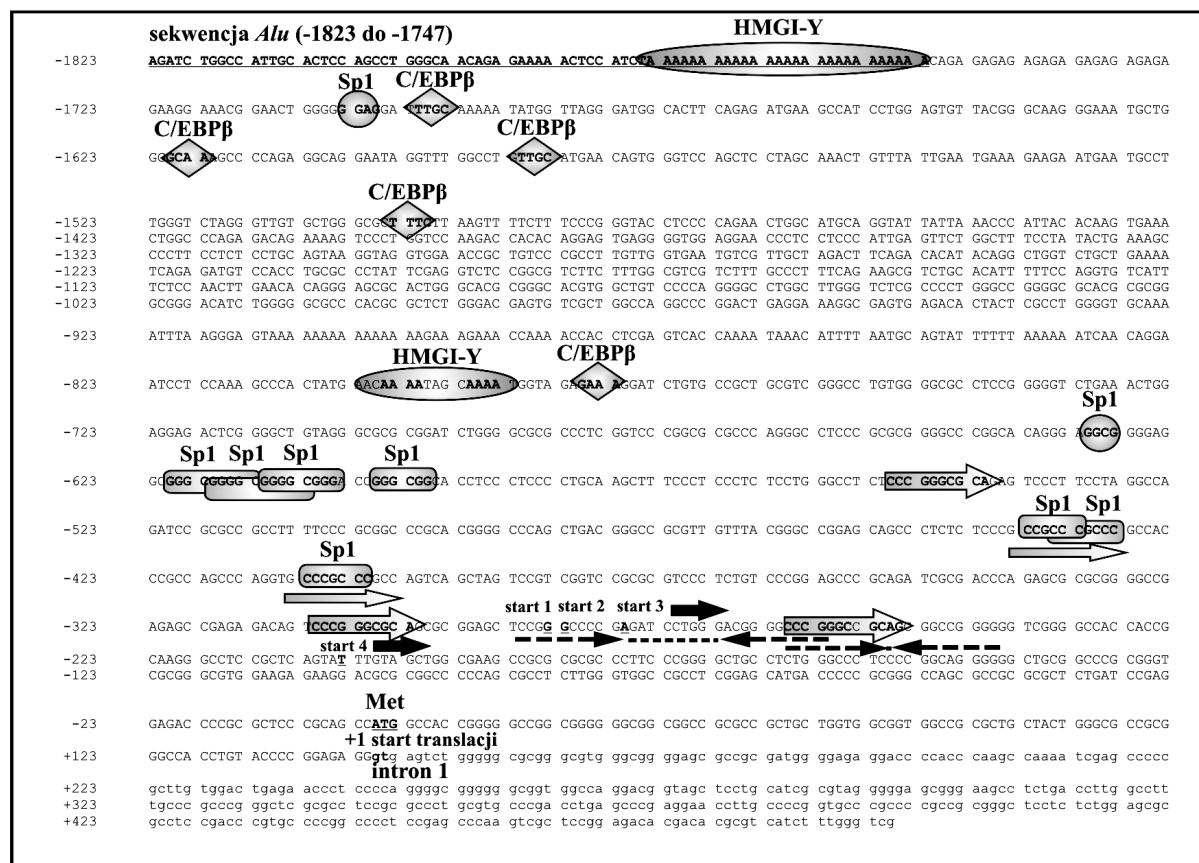


FIGURE 2. The promoter region of the human insulin receptor gene. Due to the presence of several transcription initiation sites nucleotide numbering is relative to the first nucleotide of the translation start codon +1 ATG (encoding for methionine, Met). *Alu* sequence is underlined. 7 Sp1 transcription factor binding sites are also shown [3]. Start 1, start 2, start 3 – transcription initiation sites according to [131], start 4 – transcription initiation site according to [3]. Black arrows stand for transcription direction, grey for direct repeats and broken arrows stand for inverted repeats. HMGI-Y, Sp1 and C/EBPβ transcription factors binding sites contained in E3 and C2 fragment are also shown [37] (according to [3,37,131,150], changed)

RYCINA 2. Region promotorowy ludzkiego genu receptora insuliny. Ze względu na obecność kilku miejsc inicjacji transkrypcji przyjęto numerację względem kodonu start translacji +1 ATG (kodującego metioninę, Met). Podkreślono sekwencję *Alu*. Zaznaczono także 7 miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1 [3]. Start 1, start 2, start 3 – miejsca inicjacji transkrypcji wg [131], start 4 – miejsce inicjacji transkrypcji wg [3]. Czarne strzałki oznaczają kierunek transkrypcji, szare – powtórki wprost (ang. *direct repeats*), a przerywane – odwrotne powtórzenia (ang. *inverted repeats*). Na schemacie zaznaczono także miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych: HMGI-Y, Sp1 oraz C/EBPβ wchodzące w skład fragmentu E3 oraz C2 [37] (wg [3,37,131,150], zmieniony)

aż do sekwencji Alu. Analiza bioinformatyczna sekwencji nukleotydowej tego regionu wykazała, że jest on niezwykle bogaty w reszty GC. Co ciekawe, pozbawiony jest bloku TATA (ang. *TATA-box*), obecnego w większości genów transkrybowanych przez RNA polimerazę II, jak również dystalnego elementu regulatorowego położonego powyżej bloku TATA – bloku CAAT. Cechy te są podobne do cech, jakie wykazują regulatorowe regiony genów metabolizmu podstawowego ulegających ekspresji na stałym poziomie (ang. *housekeeping genes*) jak np. genu kodującego kinazę 3-fosfoglicerynową, receptor naskórkowego czynnika wzrostu, fosforybozylotransferazę hipoksantynową, deaminazę adenozyiny u człowieka, a także genu reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A chomika, czy fosforybozylotransferazy hipoksantynowej myszy [3]. 410–480 pz (par zasad) powyżej kodonu start ATG zidentyfikowany został element wzmacniający (ang. *enhancer element*) ekspresję genu. Co więcej, w genie receptora insuliny stwierdzono obecność kilku dodatkowych potencjalnych elementów wzmacniających wiążących białko C/EBP β (ang. *CAAT/enhancer binding protein β*), w tym dwóch obecnych w regionie promotorowym i jednego w obrębie intronu pierwszego oraz miejsc dla innych białek wiążących się z DNA.

Dodatkowe cechy promotora genu *INSR* to obecność siedmiu potencjalnych miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego Sp1 (GGGCGG lub CCGCCC) ulokowanych w pozycjach: -199, -226, -230, -391, -401, -406, -411. W regionie promotorowym znajdują się także dwie pary odwróconych powtórek: CCGGGCCCG oraz CCCGGGCCGC (w pozycji -37 do -57 oraz -53 do -83), do których mogą wiązać się czynniki transkrypcyjne biorące udział w regulacji inicjacji transkrypcji, a także pięć powtórek wprost: trzy powtórki CCCGGGCGCAG oraz dwie powtórki CCGCCC [3].

Wiadomo, że czynnik transkrypcyjny Sp1 wzmacnia transkrypcję prowadzoną przez RNA polimerazę II, stąd też już pod koniec lat 80 ubiegłego wieku sugerowano, że transkrypcja genu *INSR* może zachodzić w odpowiedzi na jego działanie [3].

Przeprowadzone w kolejnych latach badania pozwoliły stwierdzić, że cztery regiony bogate w pary GC ulokowane w pozycji -593 do -618 promotora są głównymi elementami regulującymi ekspresję genu *INSR* w komórkach CHO i COS [4] i że to właśnie do nich wiąże się wspomniany czynnik Sp1, poprzez swoje trzy palce cynkowe typu C_2H_2 , obecne na karboksylowym końcu domeny wiążącej się z DNA [54]. Z kolei domena aktywująca ekspresję, znajdująca się na końcu aminowym czynnika Sp1, składa się z dwóch domen A i B bogatych w glutaminę. Domeny te wchodzi w interakcje z czynnikiem transkrypcyjnym RNA polimerazy II – TFIID, składającym się z białka wiążącego się z sekwencją TATA-TBP (ang. *TATA binding protein*) oraz kilkunastu czynników TAFs (ang. *TBP associated factors*). Jak wykazały badania, to właśnie czynnik TAFII-110 bezpośrednio wchodzi w interakcje z białkiem Sp1 [54].

Ponadto stwierdzono, że w regionie promotorowym genu *INSR* znajdują się miejsca wiązania dla czynników IRNF-I oraz IRNF-II (ang. *insulin receptor nuclear factor*) ulokowane w obrębie regionu -530 do -550 oraz -500 do -520. Jak wykazano, mutacje zmieniające miejsca wiązania tych białek, znacznie obniżają ekspresję genu receptora insuliny. Dowodzi to, że oba czynniki są niezbędne dla prawidłowej jego ekspresji [76]. Interesujące, że adenowirusowe białko E1a, przez zdolność wiązania się z regionami wiążącymi czynnik Sp1, również może regulować jego ekspresję [66].

Za pomocą techniki wydłużania startera (ang. *primer extension*) oraz ochrony przed nukleazą (ang. *nuclease S1 mapping/nuclease S1 protection*) określono również istnienie w pozycji 276, 282 oraz 283 pz powyżej kodonu ATG, trzech miejsc inicjacji transkrypcji, przy czym przeważającą część stanowią transkrypty rozpoczynające się w pozycjach 276 i 282 [3]. Podobne do promotora genu *INSR* cechy, takie jak między innymi: brak bloku TATA oraz wiele miejsc inicjacji transkrypcji, wykazują promotory wielu genów metabolizmu podstawowego [58,67,139].

Zaobserwowano, że ekspresja genu *INSR* ulega podwyższeniu pod wpływem działania glikokortykoidów [84]. Sugeruje się, że hormony te mogą wpływać na indukcję transkrypcji *INSR* jednakże, co intrygujące, analiza sekwencji regionu 5' promotora wykazała brak obecności elementów odpowiedzi na glikokortykoidy GRE (ang. *glucocorticoid response element*) [64]. Rubin i wsp., z kolei, w 1980 roku w obrębie 5' końca promotora, zidentyfikowali sekwencję *Alu*, która, jak się uważa, może pełnić funkcję wiążącą białka, a więc może również potencjalnie wpływać na regulację ekspresji genu receptora insuliny [119].

Zidentyfikowano także kilka potencjalnie regulatorowych regionów promotora, które ważne są dla komórkowo-specyficznej ekspresji białka receptorowego [12,14,145]. Dzięki badaniom typu odcisk stopy DNazy I (ang. *DNase I footprinting*) wykazano, że dwa regiony bogate w pary AT, które nazwano fragmentem C2 (-671 do -874) oraz fragmentem E3 (-1661 do -1818) wydają się być kluczowe dla ekspresji genu *INSR* w trakcie różnicowania się miocytów z mioblastów w komórkach mięśniowych BC3H-1 [13]. Do regionów tych, jak stwierdzono, wiązały się jądrowe białka wiążące DNA, co ostatecznie wzmagало transkrypcję genu.

Z kolei doświadczenia z wykorzystaniem genu reporterowego acetylotransferazy chloramfenikolu CAT (ang. *chloramphenicol acetyltransferase reporter gene analysis*) wykazały, że te sekwencje działały raczej jako promotory a nie elementy wzmacniające transkrypcję. Autorzy sugerowali więc, że białka wiążące się z tymi regionami odgrywają decydującą rolę w regulacji ekspresji genu receptora insuliny w różnych tkankach [13]. Przeprowadzone w kolejnych latach eksperymenty wykazały, że, w obrębie tych regionów (C2 i E3) wiążą się białka HMGI-Y (ang. *high mobility group*), aktywując w ten sposób transkrypcję genu *INSR* [15]. Stosując technikę EMSA (ang. *electromobility shift assay*) – analizę interakcji DNA-białko oraz technikę Western z wykorzystaniem białek jądrowych pochodzących z komórek linii ludzkich limfocytów IM-9 zidentyfikowano białko, które nazwano IR-DBP (ang. *insulin receptor DNA binding protein*) i które było wysoce podobne do białek HMGI-Y. Białko to jest odległym członkiem grupy białek HMG, mającym zdolność wiązania się z DNA poprzez regiony bogate w pary AT w obrębie małego rowka dwuniciowej helisy zmieniając w tym miejscu konformację DNA, w ten sposób aktywując transkrypcję wielu genów ssaków przez dodatkowe interakcje z licznymi czynnikami transkrypcyjnymi i ich rekrutację do miejsca inicjacji transkrypcji [20,112]. Zaobserwowano, że inhibicja białka HMGI-Y w komórkach, w których zachodzi ekspresja receptora insuliny na wysokim poziomie, prowadzi do znacznego obniżenia jego ekspresji. Natomiast nadekspresja HMGI-Y w komórkach o niskim poziomie ekspresji *INSR* prowadzi do wzrostu jego ekspresji [15]. Te obserwacje prowadzą do wniosku, że białko HMGI-Y ma pozytywnie regulujący wpływ na poziom ekspresji receptora insuliny, a więc jakikolwiek defekt związany z tym

białkiem może prowadzić do zaburzonej funkcji receptora insuliny i dalej zaburzeń ścieżki sygnalizacyjnej w odpowiedzi na ten hormon.

Stwierdzono także, iż niezwykle istotny dla ekspresji genu receptora w adipocytach HIRIN3 jest również region długości 278 pz na 5' końcu pierwszego intronu tego genu [85].

Natomiast Yoshizato i wsp., w 2001 roku zidentyfikowali element działający w *cis* (-592 do -577) oraz czynnik działający w *trans*, które wpływają na ekspresję genu receptora insuliny w komórkach wątrobiaka (*hepatocarcinoma*) HepG2 i w hepatocytach szczura. Owym czynnikiem okazało się jądrowe białko o masie 35 kDa, które wiązało się do sekwencji 5'-TCCCTCCC-3' (-588 do -581) promotora i które nazwano czynnikiem HT-FIR (ang. *hepatocyte-specific transcription factor of the insulin receptor gene*).

Mimo że aktywność promotora genu receptora insuliny wiąże się z regionem około 579 pz od miejsca inicjacji translacji, to jednak sugeruje się, że cały region promotorowy jest konieczny dla jego maksymalnej aktywności [14].

Aktywność promotora na pewnym podstawowym poziomie obserwuje się we wszystkich komórkach, aczkolwiek znacznie podwyższony poziom ekspresji genu *INSR* stwierdzono w takich tkankach, jak: mięśnie szkieletowe, wątroba, tkanka tłuszczowa czy mózg. Sugeruje to istnienie tkankowo-specyficznych czynników regulujących ekspresję genu *INSR*, natomiast różnice w poziomie ekspresji w różnych tkankach mogą wynikać z obecności lub braku tkankowo-specyficznych czynników transkrypcyjnych. Wiadomo, że promotory wielu genów, ulegających ekspresji tkankowo-specyficznej są bardzo często pod kontrolą różnorodnych czynników, nie tylko specyficznych dla danej tkanki, ale również w powiązaniu z ogólnymi czynnikami inicjacji transkrypcji. Te ostatnie, umożliwiają lub wzmacniają działanie jednego lub kilku czynników transkrypcyjnych specyficznych dla danej tkanki [88].

Grupa Foti w 2003 roku [37] po raz pierwszy wykazała, że regulacja ekspresji receptora insuliny zachodzi dzięki działaniu nukleoproteinowego kompleksu (zwanego enhansosomem), w skład którego poza wspomnianym już wcześniej białkiem HMGI-Y wchodzi także podstawowy czynnik transkrypcyjny Sp1 oraz C/EBP β (białko wiążące się z sekwencją CCAAT) w komórkach HepG2. Kluczowa w tym kompleksie wydaje się być właśnie rola białka HMGI-Y, które jest niezbędne dla utworzenia aktywnego kompleksu inicjującego transkrypcję [37]. Przeprowadzone badania (zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*) wykazały, że czynnik ten oddziałuje z białkiem Sp1 oraz C/EBP β , co znacząco wzmacnia aktywność regionu promotorowego genu *INSR* i aktywuje transkrypcję przez RNA polimerazę II [37].

Jakiegokolwiek defekty związane więc z opisanymi powyżej czynnikami transkrypcyjnymi mogą wpływać na ekspresję genu receptora insuliny i tym samym przyczyniać się do rozwoju insulinooporności, a więc braku odpowiedzi organizmu na insulinę.

3. CHARAKTERYSTYKA TRANSKRYPTU RECEPTORA INSULINY

Receptor insuliny po raz pierwszy zidentyfikowany został w 1971 roku przez grupę Freycheta [39], natomiast sekwencja cDNA odpowiadająca sekwencji transkryptu genu *INSR* poraz pierwszy została określona już w 1985 roku przez grupę Ullricha [153] oraz Ebina [27]. Badacze ci otrzymali sekwencje różniące się swoją długością o 36 nukleotydów, które odpowiadają różnicy 12 aminokwasów w sekwencji aminokwasowej białka. Przeprowadzone analizy bioinformatyczne tych sekwencji

pozwoili zaobserwowa, e transkrypt genu receptora insuliny podlega zjawisku alternatywnego splicingu, podczas ktrego wycity zostaje egzon 11 (kodujacy karboksylowy koniec podjednostki α). Skutkiem tego zdarzenia splicingowego (ang. *exon exclusion/exon skipping*) powstaje skrocona forma transkryptu zwana wariantem krótkim (lub wariantem drugim, E11⁻, A) w odróznieniu od jego dlugiej formy zawierajacej egzon 11 (o dlugosci 36 pz, odpowiadajacy resztom aminokwasowym 717–728) i zwanej wariantem dlugim (lub pierwszym, E11⁺, B). Obie formy koduja wiece roznej dlugosci bialka skladatace sie z 1382 (wariant 1) i 1370 (wariant 2) reszt aminokwasowych [27,153] (ryc. 1). Alternatywny splicing jest procesem tkankowo-specyficznym i jak wykazano, obecność lub brak egzonu 11 zmienia wlasciwosci bialka receptorowego w odniesieniu do powinowactwa receptora do wiazania liganda – insuliny. W wyniku przeprowadzenia niektorych badan na transfekowanych liniach komorkowych stwierdzono istnienie roznic w procesie internalizacji roznych izoform receptorow indukowanym wiazaniem insuliny [48]. Istnieja rowniez doniesienia sugerujace, ze skrocona forma transkryptu ulega ekspresji w leukocytach, a dluzsza forma dominuje w watrobie, adipocytach i miesniach szkieletowych, natomiast w lozysku poziom obu form jest podobny. Zaobserwowano, ze krótsza forma bialka wykazuje dwukrotnie wyzsze powinowactwo do insuliny w porownaniu do bialka dluzszego o te 12 reszt aminokwasowych kodowanych przez alternatywny egzon 11 [91]. Co ciekawe, niektóre badania wykazaly, ze krótsza forma bialka wykazuje wzmozony proces internalizacji po wiazaniu liganda, natomiast dluzsze bialko o obnizonym powinowactwie do insuliny okazalo sie, ze wykazuje wiecej aktywność katalityczna w porownaniu z jego krótsza forma [48]. Stwierdzono takze, ze izoforma pozbawiona czesci kodowanej przez egzon 11 wiaze zarowno insuline, jak i IGF-II z wysokim powinowactwem, podczas gdy izoforma ja zawierajaca wiaze jedynie insuline [91].

Biologiczne znaczenie istnienia obu form splicingowych receptora nie zostalo do tej pory w pelni wyjasnione, aczkolwiek zaburzenia procesu alternatywnego wycinania egzonu 11 i skladania dojrzalego transkryptu INSR, a tym samym zmiana stosunku obu form w danej tkance moze lezec u podstaw bardzo powaznych chorob czlowieka, mimo iz (przynajmniej jak dotad) nie zaobserwowano roznic w poziomie ekspresji obu form mRNA receptora insuliny u pacjentow cierpiacych na rozne postaci insulinoporności w porownaniu do osob zdrowych [130]. Regulacja alternatywnego skladania pre-mRNA receptora insuliny jest czynnikiem niezwykle waznym dla prawidlowego funkcjonowania organizmu. Zaburzenia zwiazane z tym mechanizmem wiaza sie z licznymi stanami chorobowymi u czlowieka: cukrzyca typu 2, dystrofia miotoniczna i nowotworami [65,70,95,104–106,126].

Calkowita dlugosc transkryptu jest rozna nie tylko ze wzgledu na kilka miejsc inicjacji transkrypcji, ale rowniez na rozna liczbe miejsc poliadenylacji, stad tez obserwowano transkrypty o dlugosci od 5400 pz do 9400 pz, z ktorych najliczniejsze mialy dlugosc 6,9 kb oraz 9,4 kb [150]. Interesujace, ze pomimo malych rozmiarow bialka, dlugosc transkryptu jest znacząca i uzalezniona od znacznej dlugosci regionu 3'UTR (4801 pz). Podobne obserwacje dotycza takze transkryptow innych organizmow jak na przyklad szczura [150]. Mozliwe wiece, ze region ten pelnic moze pewne funkcje regulatorowe.

Sugeruje się również, że pewne potranskrypcyjne mechanizmy mogą być także zaangażowane w kontrolę ekspresji mRNA *INSR* oraz samego białka.

Mechanizm alternatywnego splicingu pozostaje pod kontrolą insuliny, jak również innych czynników hormonalnych oraz rozwojowych. Zmiany w tym procesie, jak wykazano, wiązały się ze wzrostem wrażliwości komórek na insulinę, co sugeruje, że regulacja alternatywnego składania mRNA receptora insuliny jest kluczowa dla wrażliwości receptora na ten hormon i prawidłowej na niego odpowiedzi komórki [71]. W wyborze miejsc alternatywnego splicingu zaangażowanych jest wiele różnorodnych białek oraz dodatkowych czynników, takich jak: drugorzędowa struktura RNA [8,32,142,143], wielkość egzonu, a także „siła” alternatywnych miejsc splicingowych [101]. Zmiany w wyborze tych miejsc obserwowane były w przypadku licznych genów podczas różnicowania komórkowego [86], jednakże hormonalna regulacja tego procesu nie jest zbyt powszechna. Przykładowo, zaobserwowano, że glikokortykoidy modulują alternatywny splicing mRNA receptora insuliny w komórkach HepG2, natomiast sama insulina moduluje ten mechanizm w komórkach wątrobiaka FaO [70,132]. Badania przeprowadzone przez Kosaki i wsp. w 1998 roku pozwoliły na identyfikację miejsc ważnych dla alternatywnego składania transkryptu *INSR*. Egzon 11 jest bardzo krótki (36 pz) i otoczony jest długimi intronami (~2,2 kpz i ~7,5 kpz). Okazało się, że intron 10 genu receptora insuliny zawiera wszystkie informacje niezbędne dla prawidłowej selekcji miejsc splicingowych oraz alternatywnego wycięcia egzonu 11. W intronie tym znajdują się dwa miejsca rozgałęzienia – BP (ang. *branch point*), kluczowe dla wyboru miejsc splicingowych. 300 pz powyżej egzonu 11 znajduje się sekwencja *Alu*. W intronie 10, 43 pz powyżej miejsca rozgałęzienia znajduje się tzw. intronowa sekwencja wzmacniająca splicing – ISE (ang. *intronic splicing enhancer sequence*) oraz intronowa sekwencja wyciszająca – ISS (ang. *intronic splicing silencing sequence*), odpowiedzialna za zjawisko *exon skipping* na jego końcu 3'. Sekwencja ISE na 5' końcu intronu 10 zawiera sekwencję o długości 48 pz, bogatą w pary GA, niezbędną dla pozostawienia egzonu 11 w dojrzałej cząsteczce mRNA [72]. Wykazano również, że sam egzon 11 jest kluczowy dla prawidłowego działania alternatywnej maszynery splicingowej [72].

Model wyboru miejsc splicingowych podczas dojrzewania transkryptu receptora insuliny zaproponowany został już w roku 1998 [72]. Zgodnie z nim sekwencja bogata w reszty GA obecna na 5' końcu intronu 10, tzw. intronowa sekwencja wzmacniająca ISE faworyzuje pozostawienie egzonu 11 w dojrzałym transkrypcie prawdopodobnie przez bezpośrednie oddziaływanie na miejsce splicingowe 3'. Możliwe, że ze względu na swoje położenie (ponad 2 kpz powyżej miejsca rozgałęzienia BP), może ona oddziaływać na sąsiadujące miejsce splicingowe 5' (UAG:GUCAGGAC) różniące się znacząco od sekwencji zgodnej (CAG:GUAAGUAU) [72]. W związku z tym, wpływ tego wzmacniacza może polegać na wzmocnieniu siły oddziaływania U1snRNP (ang. *U-rich 1 small nuclear ribonucleoprotein particle*) – jednego ze składników spliceosomu, z miejscem splicingowym 5' [74]. Jednakże nie do końca wiadomo było, jaki wywierałoby to wpływ na alternatywny splicing egzonu położonego poniżej. Dodatkowo, postulowano udział jednego z białek SR (bogatych w serynę i argininę) zaangażowanych w proces dojrzewania transkryptów – białka SF2/ASF przez wiązanie się do sekwencji bogatych w GA podobnych do tej obecnej na 5' końcu intronu 10.

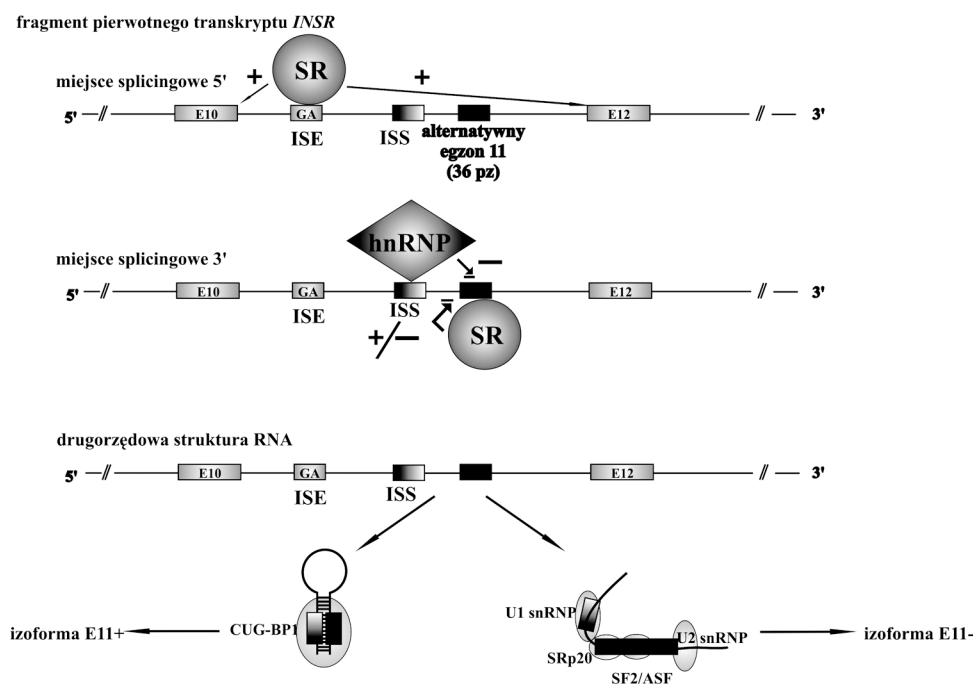
W ten sposób białko SF2/ASF miałyby promować pozostawienie egzonu 11 w dojrzałym transkrypcie *INSR*, podobnie jak w przypadku splicingu transkryptu lekkiego łańcucha B klatryny szczura [21]. Białko SF2/ASF może mieć również zdolność do preferencyjnego wykorzystania proksymalnego miejsca splicingowego 5' lub 3'. Antagonistyczne działanie wykazuje natomiast czynnik splicingowy hnRNP-A1 (wiążący się do sekwencji UAGGGA lub UAGGGU), który promuje wybór dystalnego miejsca splicingowego. Tak więc oba czynniki wykazują działanie antagonistyczne [19]. Na końcu 5' intronu 10 dodatkowo znajduje się sekwencja CTTAGGGACC, zawierająca miejsce wiązania wspomnianego wcześniej czynnika hnRNP-A1 (co podkreślono). Wiadomo już, że ta nukleoproteina wraz z hnRNP-F zaangażowana jest w regulację alternatywnego składania transkryptu *INSR* [148]. Na końcu 3' intronu 10 znajdują się dwa regiony, które również biorą udział w alternatywnym splicingu transkryptu *INSR*. Jedna z nich, ulokowana powyżej miejsca rozgałęzienia promuje eliminację egzonu 11 z mRNA i zwana jest intronową sekwencją wyciszającą splicing (ISS). Interesujące, że region ten, jak wykazała analiza bioinformatyczna, może przybierać drugorzędową strukturę spinki do włosów (ang. *stem-loop structure*), a jak obecnie wiadomo, drugorzędowe struktury RNA biorą udział w alternatywnym dojrzewaniu mRNA. Drugi region regulatorowy ważny dla alternatywnego składania transkryptu *INSR* obecny jest w samym alternatywnym egzonie 11 i wydaje się, że działa on niezależnie w procesie modulacji wyboru miejsca splicingowego 3'. Nie można wykluczyć możliwości, że oba regiony wchodzi w skład większego regionu regulatorowego, który z kolei bierze udział w tworzeniu większej struktury drugorzędowej wokół miejsca splicingowego 3' [72].

Funkcja intronowych i egzonowych sekwencji wzmacniających – ISE, ESE oraz wyciszających – ISS, ESS (ang. *intronic splicing silencer*, *exonic splicing silencer*) w regulacji alternatywnego splicingu polega na wiązaniu odpowiednich czynników działających w *trans*, wpływających z kolei na wybór miejsca splicingowego przez spliceosom [11]. Drugorzędowa struktura pierwotnego transkryptu reguluje jego dostępność dla czynników splicingowych. Dwuniciowe fragmenty RNA spinki do włosów rozpoznawane są przez niektóre z czynników działających w *trans*, a cała utworzona struktura prowadzi do zmiany wzajemnego przestrzennego ułożenia elementów *cis*, prowadząc do zaistnienia dodatkowych możliwości regulatorowych [18,45,53]. Obecnie zdecydowanie więcej wiadomo na temat regulacji alternatywnego splicingu, w której nadrzędną rolę pełnią czynniki regulatorowe działające w *trans* – wspomniane już wcześniej białka SR oraz hnRNP, wykazujące działanie antagonistyczne. Białka SR wiążąc się do sekwencji wzmacniających działają na drodze aktywacji alternatywnego składania mRNA, hnRNPs z kolei wiążąc się do sekwencji wyciszających, hamują ten proces.

Badania nad alternatywnym splicingiem transkryptu receptora insuliny kontynuowane były w kolejnych latach [133,158], dzięki czemu określono istnienie elementów ISE oraz ISS w intronie 10, jak i doprowadziły do lepszego poznania jego mechanizmu. Dzięki przeprowadzonym eksperymentom stwierdzono, że w procesach tych biorą udział białka SRp20 oraz SF2/ASF, które modułują aktywność egzonowych elementów wzmacniających (ESE). Dodatkowo wykazano, że elementy ESS w

egzonie 11 oraz ISS na 3' końcu intronu 10 wymagają związania białka CUG-BP1. Podczas gdy nadekspresja białka CUG-BP1 hamowała pozostawienie egzonu 11 w dojrzałym transkrypcie, nadekspresja białka SRp20 prowadziła do wzmocnienia jego pozostawienia [133]. Autorzy sugerują więc, że oba białka miałyby działać antagonistycznie, a ich wzajemna równowaga jest kluczowa dla regulacji pozostawienia lub eliminacji tego egzonu z transkryptu [133]. Schemat obrazujący proponowany mechanizm alternatywnego splicingu mRNA receptora insuliny przedstawiono na rycinie 3.

Nie jest jeszcze w pełni poznany mechanizm działania białka SRp20 i SF2/ASF, aczkolwiek postuluje się, że prowadzą one do rekrutacji U1 i U2 snRNPs lub zapobiegają wiązaniu się białek CUG-BP1. Możliwe, że aktywność jednego czynnika, może być także regulowana przez obecność drugiego. Proponuje się nadal, że egzon 11 wraz z położonym powyżej traktem polipirymidynowym i sekwencją, zawierającą miejsce rozgałęzienia BP, tworzą dużych rozmiarów strukturę drugorzędową typu spinki, której pojawienie się hamuje wiązanie się U2AF, SF1 i U2 snRNP blokując w ten sposób dostępność miejsca splicingowego 3'. Taka hamująca splicing rola struktury drugorzędowej RNA została wykazana w innych badaniach dotyczących regulacji wycinania alternatywnego egzonu 7 w genie *SMN2* (ang. *survival motor neuron 2*), jednego z genów związanych z zanikiem mięśni szkieletowych [140]. Nakładające się miejsca wiązania dla białka SF2/ASF oraz CUG-BP1 w egzonie



RYCINA 3. Proponowany model alternatywnego splicingu transkryptów ludzkiego receptora insuliny. Opis w tekście (wg [72,133], zmieniony)
FIGURE 3. Proposed model for human insulin receptor transcripts alternative splicing regulation. See text (according to [72,133], changed)

11 zlokalizowane są w strukturze drugorzędowej RNA, powyżej którego znajduje się miejsce wiązania białka SRp20. Przypuszcza się, że związanie białka SRp20 i SF2/ASF, zapobiega utworzeniu się drugorzędowej struktury RNA typu spinki. Z kolei związanie białka CUG-BP1 do swego miejsca wiązania oraz sekwencji wyciszającej położonej powyżej prowadzi do stabilizacji dwuniciowego odcinka spinki i ostatecznie ułatwia wycięcie egzonu 11 z transkryptu [133]. Badania molekularne w celu potwierdzenia tych hipotez trwają obecnie w laboratorium na Uniwersytecie Kalifornijskim.

4. BUDOWA LUDZKIEGO RECEPTORA INSULINY

Dojrzały receptor insuliny jest glikoproteiną i funkcjonuje jako heterotetramer złożony z dwóch dimerów dwóch podjednostek (długości 1370 lub 1382 reszt aminokwasowych każda) połączonych 14 mostkami dwusiarczkowymi. Receptor ten syntetyzowany jest w komórce w postaci niedojrzałego proreceptora o masie cząsteczkowej około 180 kilodaltonów (kDa). Białko podlega następnie proteolitycznemu cięciu w obrębie sekwencji Arg-Lys-Arg-Arg zlokalizowanej na połączeniu podjednostek α i β uwalniając w ten sposób monomery α - β . Połączenie α - β możliwe jest dzięki istnieniu wiązania dwusiarczkowego, utworzonego pomiędzy resztą cysteiny w pozycji 647 podjednostki α a cysteiną 872 w podjednostce β . Dwa monomery α - β powiązane są poprzez wiązania Cys-524 między podjednostkami α [73].

Podjednostki α (długości 731 reszt aminokwasowych i masie cząsteczkowej $M_r=135$ kDa) stanowią całkowicie zewnątrzkomórkowe domeny wiążące insulinę, podczas gdy podjednostki β (o masie 95 kDa i składające się z 620 reszt aminokwasowych) mają region zewnątrzkomórkowy złożony ze 194 aminokwasów, 23-aminokwasowy region transbłonowy oraz 403-aminokwasowy region skierowany do wnętrza komórki o aktywności kinazy tyrozynowej [27,57,131,153]. Zarówno podjednostka α , jak i zewnątrzkomórkowy region podjednostki β zawierają miejsca glikozylacji [131].

Dłuższa forma splicingowa transkryptu zawierająca alternatywny egzon 11 koduje białko dłuższe o 12 reszt aminokwasowych. Te dodatkowe 12 reszt przypada na karboksylową część podjednostki α receptora.

W sekwencji aminokwasowej receptora insuliny wyróżnić można od końca aminowego: peptyd sygnałowy (aminokwasy 1–27) oraz sekwencję białka dojrzałego (reszty 28–1370 lub 1382). Za peptydem sygnałowym znajduje się domena L1 zawierająca dwa powtórzenia bogate w leucynę LRR (ang. *leucine-rich repeat*) (aminokwasy 52–164), stanowiąca miejsce wiązania insuliny, a za nią region bogaty w reszty cysteiny – CR (ang. *cysteine rich*) (reszty 179–340) podobny do furyny (ang. *furin-like*) oraz region FU (reszty 234–281) zawierający powtórzenia typu furyny (ang. *furin-like repeats*). Kolejny region stanowi domena L2 (reszty 359–472), za którą obecne są trzy domeny (Fn0, Fn1, Fn2) fibronektyny typu 3 (ryc. 1). W sekwencji aminokwasowej wyróżnia się także charakterystyczne i kluczowe pozycje, takie jak: 906 i 920 odpowiedzialne za kontakt między domenami, 921–922 oraz 924–925 stanowiące motyw receptora cytokin, za którymi występuje domena katalityczna kinazy tyrozynowej długości 287 reszt (1004–1291). Miejsce wiązania

ATP znajduje się w podjednostce β receptora i utworzone jest przez reszty 1020–1021, 1025, 1043, 1045, 1092, 1094, 1098, 1151–1152, 1154, 1165 (Gly-X-Gly-X-X-Gly) [125]. W podjednostce tej wyróżnić można również kilka miejsc fosforylacji: dwie reszty tyrozyny (Tyr-965 oraz Tyr-972) znajdujące się w domenie podbłonowej JM (ang. *juxtamembrane domain*) podlegają autofosforylacji po związaniu insuliny, w środku domeny wewnątrzkomórkowej (w domenie kinazy tyrozynowej) (Tyr-1158-X-X-X-Tyr-1162-Tyr-1163) oraz na karboksylowym końcu białka (w obrębie domeny CT) (Tyr-1328 oraz Tyr-1334) [125]. Fosforylacja reszty tyrozyny w pozycji 972 prowadzi do utworzenia motywu NPXpX, rozpoznawanego przez domenę PTB białek IRS-1 oraz Shc, jak również ważnego dla internalizacji receptora [160]. Z kolei, jak wykazano, autofosforylacja reszt tyrozyny w regulatorowej domenie kinazy (fosforylacja motywu YXXXY) jest kluczowa dla indukowanej insuliną aktywności katalitycznej receptora oraz jej efektu biologicznego. Dodatkowo, aktywowana domena KRLB (ang. *kinase regulatory loop binding*) niezbędna jest dla interakcji pomiędzy unikalnym regionem IRS-2 obejmującym reszty 591–768 a receptorem insuliny [125]. Natomiast reszty 1034–1037, 1115, 1117, 1157–1158, 1283, 1288 stanowią tzw. niekatalityczne miejsca wiązania PTP1B, a aminokwasy w pozycjach 1151, 1180, 1182–1184, 1186–1187, 1196–1197, 1199, 1230 stanowią miejsce wiązania białka substratowego. Pętla aktywacyjna (ang. *A-loop*) znajduje się w pozycji 1164–1185 białka. Z kolei reszty 1171, 1173–1174, 1176–1177 biorą udział w utworzeniu miejsca interakcji z domenami SH2 białek docelowych.

Związanie insuliny z podjednostką α najprawdopodobniej zbliża obie podjednostki do siebie. To zdarzenie z kolei, umożliwia związanie ATP przez podjednostkę β oraz wyzwała następnie autofosforylację reszt tyrozyny w autokatalitycznych podjednostkach β , po czym dochodzi do kaskady fosforylacji i aktywacji białek docelowych, które biorą udział w regulacji interakcji białko-białko oraz aktywności enzymatycznych. W ten sposób fosforylacja i aktywacja substratowych białek IRS (ang. *insulin receptor substrate*) IRS-1 oraz IRS-2 prowadzi do związania i aktywacji innych białek zawierających domeny SH2 (ang. *Src homology 2*), takich jak: białko Shc oraz białko adaptorowe APS (ang. *adaptor protein*) [149]. Aktywacja tych białek wyzwała następnie kaskadę sygnalizacji komórkowej, która prowadzi do akumulacji efektorów komórkowych i transdukcji sygnału insulinowego w komórce.

Regulacja transportu glukozy do komórek oraz większość innych efektów metabolicznych działania insuliny odbywa się za pośrednictwem kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K) wskutek związania jej regulatorowej podjednostki p85 do ufosforylowanych reszt tyrozyny białka IRS-1, co prowadzi z kolei do zmiany konformacyjnej i aktywacji jej podjednostki katalitycznej p110, a następnie przemieszczenia całego enzymu do błony komórkowej. Kinaza PI3K katalizuje fosforylację 4,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP2) do 3,4,5-trifosforanu inozytolu (PIP3), który uczestniczy w procesie aktywacji kinazy białkowej B (PKB) zwanej również kinazą AKT. Bezpośrednia interakcja cząsteczki PIP3 z domeną PH kinazy AKT prowadzi do przemieszczenia się enzymu do błony komórkowej, gdzie ulega aktywacji przez kinazę fosfatydyloinozytoli PDK-1. Kinaza AKT z kolei, odpowiedzialna jest za fosforylację różnorodnych białek komórkowych zaangażowanych w różne ścieżki

metaboliczne i regulujących wzrost i proliferację komórki [1,33]. Enzym ten, poprzez inhibicję kinazy GSK-3 wzmacnia syntezę glikogenu, a wpływając na kinazę mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*), indukuje z kolei syntezę różnorodnych białek komórkowych. Kinaza AKT odpowiedzialna jest również za „przeżycie” komórki dzięki blokowaniu kilku czynników proapoptycznych, takich jak np. czynnik Bad czy czynniki transkrypcyjne z rodziny Forkhead. Ścieżka sygnałowa związana z kinazą PI3K/AKT również obejmuje translokację błonowego transportera glukozy GLUT4, który przemieszcza cząsteczki glukozy do wnętrza komórek. Efekty mitogenne działania insuliny wiążą się natomiast z aktywacją nie tylko ścieżki kinazy AKT, ale również kinaz Ras/MAPK [43,159].

Ufosforylowane i aktywowane wspomniane już wcześniej białko Shc wiąże się do kompleksu białka Grb2/SOCS (ang. *growth factor receptor-binding protein 2*), a przemieszczenie białka SOCS do błony komórkowej umożliwia jego interakcję z zakotwiczoną w błonie kinazą Raf i jej aktywację. Następnie aktywne białko Ras aktywuje kinazę Raf, po czym dochodzi do dalszej aktywacji kaskady fosforylacji kinaz MAP oraz ERK [44,69,127,155]. W kolejnym etapie szlaku sygnałowego kinazy ERK ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych, takich jak: c-jun, c-fos, c-myc oraz c-fos. Odpowiedzią komórki na sygnał insulinowy jest więc również indukcja ekspresji genów związanych z procesami proliferacji [46,69,146].

Następnym etapem jest internalizacja receptorów, z których część z powrotem kierowana jest do błony komórkowej w pęcherzykach okrytych klatryną, podczas gdy inne ulegają degradacji w lizosomach [3,122].

Tkankowo-specyficzny alternatywny splicing transkryptu receptora insuliny prowadzi do powstania dwóch w pełni funkcjonalnych form receptora, a w różnych tkankach różny jest stosunek jednej formy do drugiej.

Aminowy koniec białka (kodowany przez egzony 1–2) oraz domeny bogate w reszty cysteiny (kodowane przez egzony 3–5) wraz z karboksylowym końcem przypadającym na reszty 704–719 są odpowiedzialne za wiązanie insuliny z wysokim powinowactwem [73], a obecność 12-aminokwasowej sekwencji kodowanej przez alternatywny egzon 11 moduluje siłę wiązania liganda.

Dojrzewanie prekursorowego białka receptorowego zachodzi kotranslacyjnie na terenie retikulum endoplazmatycznego ER (glikozylacja, tworzenie i rearanżacja wiązań dwusiarczkowych oraz homodimeryzacja). Prekursor jest następnie proteolitycznie cięty na terenie sieci *trans* aparatu Golgiego do postaci dojrzałej, która transportowana jest do powierzchni komórki [122]. Rosnący łańcuch polipeptydowy receptora insuliny wnika do światła retikulum przez translokon Sec61 [5]; w tym czasie oligosacharydowy rdzeń Glc3Man9GlcNAc2, jest kotranslacyjnie dodawany do białka w drodze N-glikozylacji przez transferazę oligosacharydową. Rdzeń ten ulega następnie skróceniu dzięki aktywności glikozydazy I oraz II [31,52,120]. Następnie, w dojrzewaniu receptora biorą udział dwa białka światła ER – kalneksyna oraz kalretikulina, stanowiące tzw. system kontroli jakości prawidłowego lub nieprawidłowego fałdowania białka. Dodawanie kolejnych jednostek cukrowych oraz skracanie oligosacharydu następuje właśnie z udziałem tych enzymów. Nieprawidłowo zwinięte glikoproteiny są kierowane transportem retrogradowym ze światła

retikulum z powrotem do cytoplazmy, gdzie podlegają w następnej kolejności ubikwitynozoależnej degradacji proteolitycznej przez proteasom 26S [5]. W prawidłowym dojrzewaniu białka uczestniczy również cytoplazmatyczne białko HSP90 oraz białko regulowane glukozą Grp94 o masie cząsteczkowej 94 kDa – Grp94 (ang. *glucose-regulated protein*), będące homologiem HSP90 rezydującym na terenie światła ER. Białko to zapewnia prawidłowe dojrzewanie innych białek oraz translokację cząsteczek sygnałowych, np. hormonów steroidowych, receptorów czynników wzrostu i innych [17].

5. IZOFORMY RECEPTORA INSULINY ORAZ RECEPTORY HYBRYDOWE INSR/IGF-1R

Jak wspomniano wcześniej istnieją dwie izoformy receptora insuliny, które różnią się brakiem ($E11^-$) lub obecnością ($E11^+$) 12-aminokwasowego odcinka na karboksylowym końcu podjednostki α , kodowanego przez alternatywny egzon 11 [27,153]. Obie izoformy są więc kodowane przez dwa różne rodzaje transkryptów, które powstają za pomocą mechanizmu alternatywnego splicingu.

Uważa się, że te dwie różne formy receptora insuliny są zróżnicowane zarówno pod kątem immunologicznym, jak i funkcjonalnym [83,94,123,134–136,154,161,162]. W 1988 roku Sakata i wsp. zasugerowali, że karboksyterminalna domena podjednostki α izoformy $E11^+$, odpowiadająca resztom 705–731 jest głównym miejscem autoantygenowym [123]. Z kolei grupa Sesti wykazała, że frakcja IgG, izolowana u pacjentów cierpiących na autoimmunologiczną hipoglikemię (autoprzeciwciała skierowane przeciwko receptorowi insuliny) hamowała wiązanie insuliny przez receptory ulegające ekspresji w komórkach transfekowanych formą $E11^-$, ale nie miała wpływu na wiązanie insuliny przez komórki transfekowane formą $E11^+$ [134]. Dwa lata później zaobserwowano, że przeciwciała skierowane przeciw aminowemu regionowi kodowanemu przez egzon 11 było zdolne do hamowania wiązania insuliny przez formę $E11^+$ bez wpływu na wiązanie przez formę $E11^-$ [135]. Również badania przeprowadzone przez trzy kolejne grupy badaczy, z wykorzystaniem transfekowanych komórek ssaczych, w których osobno zachodziła ekspresja dwóch form receptora insuliny wykazały, że ich powinowactwo do liganda jest różne. Stwierdzono, że forma $E11^-$ wiąże około dwa razy silniej insulinę niż białko kodowane przez izoformę transkryptu z egzonem 11 [94,161,162]. Ta różnica w powinowactwie receptora do swego liganda odpowiada zmianom działania metabolicznego i mitogenowego insuliny [83]. Co więcej, izoforma $E11^-$ wydaje się, że cechuje się większym stopniem internalizacji i recykliczacji w komórce [154,161]. W niektórych przypadkach, badania wykorzystujące transfekowane komórki ssaków, w których zachodziła ekspresja osobno dwóch różnych form receptora, wykazały obniżony poziom ekspresji formy $E11^-$, indukowany insuliną [162]. Z kolei Frasca i wsp. [38] wykazali, że izoforma $E11^-$ może wiązać insulinopodobny czynnik wzrostu II (IGF-2). Stwierdzono, że IGF-2 wiąże się do receptora $E11^-$ z dość wysokim powinowactwem (ok. 40% wartości obserwowanych dla insuliny), ale nie ma zdolności wiązania się z receptorem $E11^+$. Co więcej, związanie IGF-2 z receptorem insuliny wywołuje w komórce raczej skutki mitogenne niż metaboliczne [38].

Jak wspomniano wcześniej, ekspresja dwóch form mRNA kodujących dwie izoformy receptora insuliny jest komórkowo-, tkankowo- i rozwojowo-specyficzna [38,91,130,135,136]. Skrócona izoforma receptora powstaje w komórkach hematopoetycznych oraz nerwowych, z kolei w łożysku, nerkach, tkance tłuszczowej oraz w mięśniach szkieletowych ekspresji ulegają obie formy białka, natomiast w wątrobie dominuje izoforma E11⁺ [91,130,135,136]. Co więcej, skrócona forma receptora ulega ekspresji głównie w tkankach płodu, takich jak: nerki, mięśnie szkieletowe, wątroba oraz fibroblasty [38].

Różnicowanie komórek również ma wpływ na ekspresję określonej formy mRNA kodującego receptor insuliny u człowieka. Przykładowo, w przypadku nowotworu okrężnicy czy piersi, przeważa forma E11⁻, przez co wzrasta możliwość regulowania wzrostu komórkowego przez IGF-2 [38,128].

Badania *in vivo* [104] oraz *in vitro* [105] przeprowadzone przez grupę Norgrena w 1994 roku wykazały, że zjawisko alternatywnego splicingu transkryptu receptora insuliny może podlegać regulacji hormonalnej oraz metabolicznej.

Krótką 12-aminokwasową sekwencję białka kodowaną przez egzon 11, moduluje więc powinowactwo receptora insuliny do swego liganda prawdopodobnie wspólnie z innymi regionami receptora, tworząc odpowiednią trójwymiarową strukturę jego miejsca wiązania. Niewykluczone, że obecność tego regionu może wpływać na inne funkcje tego niezwykle ważnego białka w komórce.

Podczas gdy receptor insuliny występuje w dwóch alternatywnych formach splicingowych E11⁺ i E11⁻, receptor dla IGF-1 występuje tylko w formie E11⁻.

Zarówno receptor insuliny INSR, jak i receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 IGF-1R należą do podklasy II kinaz tyrozynowych, które cechują się wysoką homologią sekwencji i funkcji [27,153]. W przeciwieństwie jednak do innych kinaz tyrozynowych, których dimeryzacja aktywowana jest przez związanie odpowiedniego liganda, oba receptory INSR i IGF-1R obecne w błonie stanowią już dimery w postaci β - α - β . Dimeryzacja proreceptorów zachodzi potranslacyjnie na terenie retikulum endoplazmatycznego, gdzie wprowadzane są mostki dwusiarczkowe stabilizujące strukturę białka receptorowego, przed proteolitycznym cięciem na podjednostki α i β [107].

Zewnątrzkomórkowe części receptora insuliny oraz IGF-1 zawierają 6 strukturalnych domen. W aminowej części domeny α wyróżnia się domeny L1, L2, otaczające region bogaty w reszty cysteiny, natomiast w części karboksylowej znajdują się 3 domeny fibronektyny typu 3. Ta część białka stanowi miejsce rozcięcia podjednostek α i β . Pomimo swojej symetrycznej budowy, receptor insuliny wiąże tylko jedną cząsteczkę liganda [82,87].

Insulina bierze udział w regulacji stężenia glukozy, metabolizmie lipidów w mięśniach, wątrobie i tkance tłuszczowej, natomiast IGF-1 pełni funkcje kontrolujące wzrost większości komórek. Badania typu *cross-reaction* wykazały, że oba receptory mają niskie powinowactwo do homologicznego hormonu, stąd też sugeruje się, że w warunkach fizjologicznych receptory powinny odpowiadać jedynie na obecność swojego własnego liganda. Mimo to, w pewnych warunkach, insulina może pełnić funkcje regulatora wzrostu, a IGF-1 może wywoływać efekty metaboliczne podobne do działania insuliny. Oba receptory cechuje wysoka homologia sekwencji aminokwasowej; co więcej, pozycje większości mostków dwusiarczkowych biorących udział w interakcji dwóch

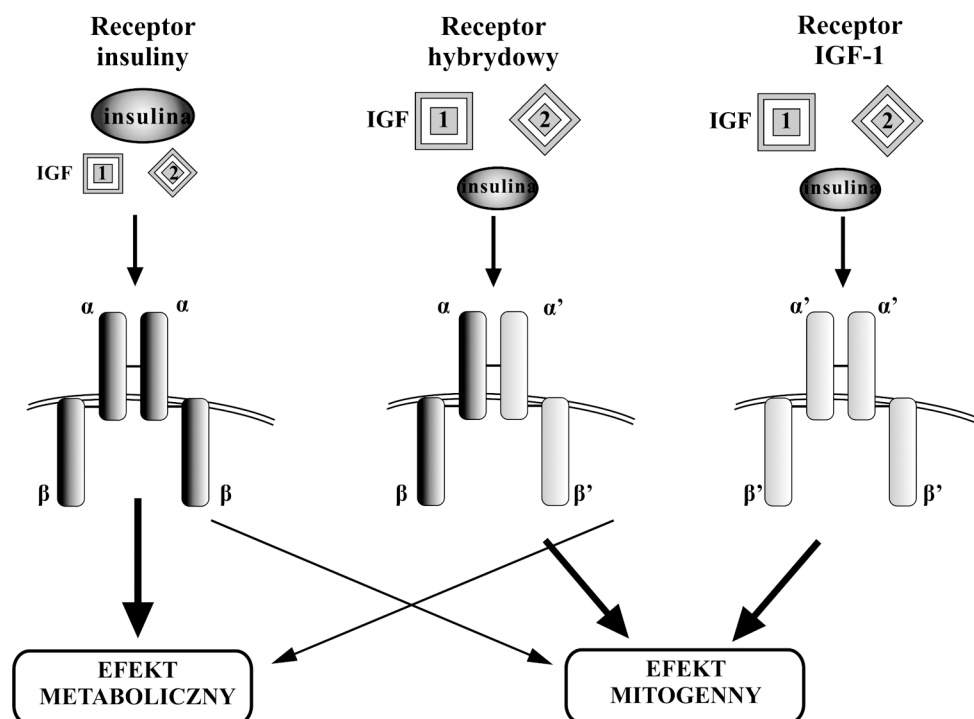
podjednostek α obu białek również są konserwatywne. Stąd też sugerowano, że mogą powstawać hybrydowe formy receptorów INSR/IGF-1R złożone z heterodimerów α/β receptora insuliny oraz heterodimeru α/β receptora IGF-1R w komórkach i tkankach, w których ulegają ekspresji obie formy receptorów (ryc. 4) [10].

Wykazano, że tego typu hybrydowe formy receptorów wiążą IGF-2 z powinowactwem podobnym do receptorów dla IGF-2, natomiast powinowactwo takich form receptorów do insuliny jest mniejsze niż w przypadku receptora insuliny [75,144]. Ponadto, mieszane receptory zachowują się bardziej jak receptory IGF-2 niż jak receptory insuliny w kontekście autofosforylacji białka, jego internalizacji i degradacji [129]. Rozmieszczenie hybrydowych receptorów jest różne w zależności od tkanki; przykładowo znaczny ich procent obserwowano w ludzkich tkankach, takich jak: łożysko, mięśnie szkieletowe, tkanka tłuszczowa, erytrocyty, leukocyty oraz fibroblasty [34]. Jak do tej pory nie zostały zdefiniowane jeszcze czynniki, które regulują powstawanie takich mieszanych receptorów *in vivo*. Proponuje się, że tworzą się one w sposób przypadkowy z taką samą wydajnością i w proporcjach zdeterminowanych przez stężenia molarne poszczególnych form. Ze względu na to, że insulina, jak i IGF-1 regulują ekspresję genów własnych receptorów, zmiany wynikające ze zmian w liczbie receptorów insuliny i/lub IGF-1 indukowane przez hormony mogą modyfikować liczbę mieszanych form receptorów. Zaobserwowano, że w mięśniach szkieletowych osób, u których występował guz trzustki (*insulinoma*) i stwierdzono hiperinsulinemię, liczba receptorów hybrydowych była podwyższona, co korelowało z wyraźnie podwyższonym poziomem insuliny we krwi oraz spadkiem liczby receptorów insuliny [35]. Inne badania z kolei wykazały podwyższony poziom receptorów hybrydowych w mięśniach szkieletowych osób otyłych o wysokim poziomie insuliny na czczo i obniżonym stężeniu IGF-1 we krwi. Stosunek mieszanych form korelował ze spadkiem liczby receptorów insuliny i ze wzrostem receptorów dla IGF-1 [36]. Powyższe obserwacje sugerują, że zmiany w poziomie insuliny wpływają na obniżony poziom ekspresji receptorów insuliny, wzrost poziomu ekspresji receptorów dla IGF-1 oraz wzrost liczby receptorów hybrydowych. Receptory mieszane wiążą IGF-1 z wysokim powinowactwem, a więc mogą być one w warunkach fizjologicznych aktywowane raczej przez IGF-1 niż przez insulinę, wywołując w ten sposób efekt raczej mitogeny niż metaboliczny (ryc. 4).

Obie izoformy receptora insuliny wiążą z podobną wydajnością insulinę (izoforma E11⁻ około 2 razy silniej niż izoforma E11⁺), natomiast forma E11⁻ wiąże około 10 razy silniej IGF-1 i IGF-2 w porównaniu z formą E11⁺ [161]. Oba rodzaje receptorów wiążą jedną cząsteczkę liganda z wysokim powinowactwem i drugą z niskim, natomiast stopień dysocjacji liganda od receptora zależy od jego stężenia [23,24].

6. DEFECT RECEPTORA INSULINY JAKO PRZYCZYNA RZADKICH ZESPOŁÓW CHOROBYCH

Insulinooporność jest jednym z najczęściej spotykanych zaburzeń gospodarki hormonalnej oraz główną przyczyną hiperglikemii u pacjentów z cukrzycą typu 2.



RYCINA 4. Receptor insuliny, IGF-1 oraz receptor hybrydowy INSR/IGF-1R z uwzględnieniem przyłączanych cząsteczek sygnałowych oraz wywołanego efektu metabolicznego lub mitogennego w komórce (wg [137], zmieniony)

FIGURE 4. Insulin receptor, IGF-1 receptor and hybrid receptor INSR/IGF-1R together with binded ligands and metabolic or mitogenic effects caused inside the cell (according to [137], changed)

Najczęściej jest ona związana z defektem działania insuliny na dalszych etapach ścieżki transdukcji sygnału hormonalnego [100]. Nieliczne przypadki insulinooporności związane są natomiast z defektem działania receptora insuliny (tab. 1).

Jednym z takich zespołów jest **zespół Rabsona-Mendenhalla** – RMS (ang. *Rabson-Mendenhall Syndrome*), po raz pierwszy opisany w 1956 roku [113,114]. Jak dotąd, nie zdołano w pełni określić podłoża genetycznego tej niezwykle rzadkiej, dziedziczonej w sposób autosomalny recesywny choroby, poza mutacjami w genie kodującym receptor insuliny. Do dnia dzisiejszego opisano jedynie kilkanaście przypadków pacjentów z tym zespołem, do którego charakterystycznych objawów należy między innymi ciężka insulinooporność rozwijająca się już we wczesnym wieku dziecięcym, wynikająca z niej cukrzyca, a także rogowacenie ciemne skóry (*acanthosis nigricans*), u pacjentów płci żeńskiej torbielowatość jajników oraz wirylizacja. Inne objawy to leprechaunizm [78], zmiany w uzębieniu (dysplazja), zaburzenia rozwoju fizycznego, przyspieszone dojrzewanie płciowe, hiperplazja szyszynki oraz zmiany w wydzielaniu przez nią melatoniny [22,49,68]. Ponadto objawom tym towarzyszy opóźnione wzrastanie, trudności w czynnościach motorycznych oraz mowie, zaburzenia słuchu, szybki wzrost paznokci, nadmierne owłosienie ciała i inne [50,80]. Często obserwuje się również nieprawidłowości w rozwoju nerek [50]. W wyniku niezwykle ciężkiej insulinooporności i w następstwie kwasicy ketonowej pacjenci umierają w młodym wieku, w pierwszej lub drugiej dekadzie życia [152].

Znane są liczne homozygotyczne i heterozygotyczne mutacje w genie *INSR* zidentyfikowane u pacjentów z zespołem Rabsona-Mendenhalla, powodujące utratę funkcji receptora w obrębie zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej ligand oraz w domenie wewnątrzkomórkowej o aktywności kinazy tyrozynowej. W pierwszym przypadku dochodzi do spadku lub całkowitego braku wiązania insuliny przez białko receptorowe, w drugim natomiast – do zaburzeń w transdukcji sygnału insulinowego w komórce.

Poza zespołem Rabsona-Mendenhalla, z mutacjami w obrębie genu *INSR* wiążą się również inne postaci insulinooporności o różnym stopniu nasilenia (tab. 1).

W przypadku **insulinooporności typu A**, obserwowanej u kobiet, cukrzyca może rozwinąć się jako rezultat obniżonej ekspresji genu kodującego receptor insuliny lub zaburzenia w jego funkcjonowaniu [150]. Do charakterystycznych, poza cukrzycą, dodatkowych objawów tej choroby należą: cechy hiperandrogenizmu, wirylizacja, hirsutyzm, zaburzenia cyklu miesiączkowego i płodności [62,97].

Z kolei za **insulinooporność typu B** odpowiedzialne są przeciwciała skierowane przeciw receptorowi insuliny. Ta postać insulinooporności może współwystępować z innymi chorobami jak toczeń rumieniowaty układowy [6,117].

Innym przykładem najcięższej postaci insulinooporności związanej z brakiem wiązania insuliny do swego receptora jest **leprechaunizm** (choroba Donohue, krasnoludkowatość), który, podobnie jak RMS, dziedziczy się autosomalnie recesywnie [2,7,26,59,78]. Charakterystyczne objawy tego zespołu to: zaburzenia homeostazy węglowodanowej, cukrzyca, opóźnienie wzrastania, upośledzenie umysłowe, dysmorficzne cechy twarzy, przedwczesne dojrzewanie płciowe, policystyczne jajniki u kobiet, nadmierne owłosienie ciała (hipertrychoza), zanik tkanki tłuszczowej oraz rogowacenie ciemne. Dzieci cierpiące na leprechaunizm umierają w pierwszych kilku latach swego życia, najczęściej jednak nie przeżywając pierwszego roku.

Związki patogenetyczne zespołów lipodystrofii z insulinoopornością

Wrodzone lipodystrofie są rzadkimi autosomalnymi recesywnymi i dominującymi zaburzeniami charakteryzującymi się selektywną, ale w różnym stopniu nasiloną utratą tkanki tłuszczowej. Znacząca hipertriglicerydemia jest powszechną cechą tych zaburzeń i wyznacza rolę tkanki tłuszczowej w homeostazie lipidowej. Hipertriglicerydemia jest konsekwencją wzrostu syntezy lipoprotein bardzo małej gęstości VLDL (ang. *Very Low Density Lipoproteins*) w wątrobie, w związku z czym diety niskotłuszczowe są korzystne dla pacjentów z wrodzoną lipodystrofią [138].

Lipodystrofii często towarzyszyć może także ciężka insulinooporność, cukrzyca oraz stłuszczenie wątroby. Lipodystrofia może być wrodzona lub nabyta. Intensywnie prowadzone badania, doprowadziły w ostatnich latach do określenia podłoża genetycznego niektórych zespołów lipodystrofii [40]. Wyróżnia się dwa typy lipodystrofii dziedzicznych: wrodzona całkowita lipodystrofia (lipoatrofia) – CGL (ang. *congenital generalized lipodystrophy*) oraz wrodzona częściowa lipodystrofia – FPL (ang. *familial partial lipodystrophy*). Analizy genetyczne umożliwiły identyfikację trzech *loci* odpowiedzialnych za wrodzone całkowite lipodystrofie w tym genu *AGPAT2* kodującego O-acetyltransferazę 2 1-acyloglicerolo-3-fosforanu (ang. *1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2*) oraz *BSCL2* [40].

TABELA 1. Ogólna charakterystyka genetycznie uwarunkowanych zespołów chorobowych związanych z ciężką postacią insulinooporności, w tym z mutacjami w genie kodującym receptor insuliny [2,6,7,22,26,40,49,51,59,61,62,68,78,80,97,110,111,113,114,117,138,141,147,152]
 TABLE 1. Characteristic features of genetic disorders connected with severe forms of insulin resistance including mutations in insulin receptor gene [2,6,7,22,26,40,49,51,59,61,62,68,78,-80,97,110,111,113,114,117,138,141,147,152]

ZESPÓŁ CHOROBOWY	WYKŁADNIKI KLINICZNE	MECHANIZM MOLEKULARNY
Insulinooporność typu A	Dotyczy młodszych kobiet, hiperandrogenizm jajnikowy wraz z wirylizacją, hirsutyzm, zaburzenia cyklu miesięczkowego oraz płodności, rogowacenie ciemne skóry (<i>acanthosis nigricans</i>), ciężka insulinooporność, cukrzyca	Mutacje w genie receptora insuliny lub zaburzenia w jej działaniu na komórki docelowe
Insulinooporność typu B	Dotyczy kobiet starszych, może towarzyszyć innym chorobom autoimmunologicznym	Podłoże autoimmunologiczne – obecność przeciwciał kierowanych przeciw receptorowi insuliny
Zespół Rabsona-Mendenhalla	Objawy podobne do insulinooporności typu A, zmiany w uzębieniu (dysplazja), przerost przysadki, zaburzenia rozwoju fizycznego, cukrzyca, przyspieszone dojrzewanie płciowe, opóźnione wzrastanie, nieprawidłowości w budowie i funkcjonowaniu nerek, śmierć w pierwszej lub drugiej dekadzie życia ze względu na kwasicę ketonową	Mutacje w genie receptora insuliny (dziedziczenie autosomalne recesywne) lub zaburzenia w jej działaniu na komórki docelowe; niewykluczone także inne zaburzenia
Zespół Donohue (leprechaunizm, krasnoludkowatość)	Najcięższa postać insulinooporności, zaburzenia rozwoju wewnątrzmacicznego, rysy twarzy przypominające elfa, nadmierne owłosienie ciała, zanik tkanki tłuszczowej, powiększone męskie narządy płciowe, cukrzyca w następstwie hiperinsulinemii, przerost mięśnia sercowego, wątroby, śledziony, jajników, hiperglikemia, upośledzenie umysłowe, brak kwasicy ketonowej, śmierć w pierwszych latach życia w okresie niemowlęcym i wczesnym dzieciństwie	Mutacje w genie receptora insuliny (dziedziczenie autosomalne recesywne), prawdopodobne mutacje w innych genach kodujących receptory dla czynników wzrostu lub białka biorące udział w transdukcji sygnałów wspólnych szlaków metabolicznych, w których uczestniczą czynniki wzrostowe
Wrodzona całkowita lipodystrofia (lipoatrofia)	Całkowity zanik tkanki tłuszczowej, możliwe objawy insulinooporności typu A, powiększenie wątroby i śledziony, kardiomiopatie, cechy akromegalii, upośledzenie umysłowe, hipertriglicydemia, perandrogenizm, kardiomiopatia przerostowa, torbiele kostne	Mutacje w genie <i>AGPAT2</i> oraz seipiny, ze względu na brak mutacji w tych genach niektórych pacjentów – prawdopodobne także mutacje w innych genach
Wrodzona częściowa lipodystrofia	Zmiany w rozkładzie tkanki tłuszczowej związane z hipoatrofią lub lipohipertrofią, możliwe cechy insulinooporności typu A, powiększenie wątroby i śledziony, kardiomiopatie, dystrofia mięśniowa, zaburzenia przewodnictwa, cechy akromegalii lub hipertriglicydemii	Mutacje w genie kodującym białko blaszki jądrowej – laminę A i C (<i>LMNA</i>) (dziedziczenie autosomalne dominujące), w genie metaloproteiny cynkowej (<i>ZMPSTE24</i>) lub w genie kodującym jądrowy receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów <i>PPARγ</i>

Najcięższą postacią jest Berardinelli-Seip wrodzona lipodystrofia typu 2 – BSCL2 (ang. *Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy type 2*). Jest to recesywne zaburzenie, w którym występuje prawie całkowity brak tkanki tłuszczowej w wyniku mutacji genu *BSCL2* kodującego białko seipinę [147]. Dowiedziono, że gen *BSCL2* jest szczególnym autonomicznym-komórkowo regulatorem adipogenezy [111]. Z kolei cztery inne *loci* zostały powiązane z wrodzonymi częściowymi lipodystrofiami w tym gen *LMNA* (kodujący białko blaszki jądrowej – laminę A i C), *PPARG* (*PPARγ*) (kodujący jądrowy receptor typu gamma aktywowany przez proliferatory peroksy-somów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) czy gen *ZMPSTE24* kodujący metaloproteinazę cynkową [40].

U pacjentów z lipodystrofią wrodzoną częściową będącej efektem mutacji R482Q w genie *LMNA* [*Dunnigan-type Familial Partial Lipodystrophy* (FPLD; OMIM ID: 151660)] i związanej z tym hiperinsulinemii obserwuje się zaburzenia osoczowych lipidów (podwyższone stężenie osoczowych triglicerydów, obniżone stężenie HDL cholesterolu i brak zmian w stężeniu całkowitego cholesterolu i LDL cholesterolu), które wyprzedzają pojawiające się później nieprawidłowości glukozy w osoczu [51].

PODSUMOWANIE

Podsumowując, różne jednostki chorobowe człowieka w tym najcięższe i niezwykle rzadkie postaci insulinooporności takie jak zespół Rabsona-Mendenhalla czy zespół Donohue, mogą być wynikiem mutacji w genie kodującym niezmiernie ważne dla utrzymania prawidłowej homeostazy całego organizmu białka – receptora insuliny. Efektem tych zmian, na poziomie molekularnym, może być: 1) obniżona zdolność wiązania insuliny przez receptor, 2) zmiany w aktywności kinazy tyrozynowej podjednostki β , z czym wiążą się z kolei zaburzenia w procesie transdukcji sygnału insulinowego do wnętrza komórki, 3) zaburzenia dojrzewania i fałdowania białka receptorowego, 4) nieprawidłowe rozmieszczenie receptorów lub ich zmniejszona liczba w błonie komórkowej [151], 5) zaburzenia w procesie internalizacji receptorów i/lub przyspieszona ich degradacja.

Badania molekularne obejmujące analizę genetyczną genu receptora insuliny oraz jego transkryptu z pewnością stanowią potężne narzędzie w diagnostyce prenatalnej oraz w planowaniu ciąży (badania pod kątem nosicielstwa mutacji). Możliwe, że dodatkowe analizy białek biorących udział w odpowiedzi organizmu na insulinę oraz analiza czynników regulujących ekspresję genu receptora insuliny, jak również tych biorących udział w dojrzewaniu transkryptu receptora (w tym być może mikroRNA) przyczynią się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów leżących u podstaw różnych form insulinooporności, jak również opracowania lepszych niż dotychczas metod leczenia.

LITERATURA

- [1] ADJEI AA, HIDALGO M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 5386–5403.

- [2] AL-GAZALI LI, KHALIL M, DEVADAS K. A syndrome of insulin resistance resembling leprechaunism in five sibs of consanguineous parents. *J Med Genet* 1993; **30**: 470–475.
- [3] ARAKI E, SHIMADA F, UZAWA H, MORI M, EBINA Y. Characterization of the promoter region of the human insulin receptor gene. Evidence for promoter activity. *J Biol Chem* 1987; **262**(33): 16186–16191.
- [4] ARAKI E, MURAKAMI T, SHIOTANI T, KANAI F, SHINOHARA Y, SHIMADA F, MORI M, SHICHI-RI M, EBINA Y. A cluster of four Sp1 binding sites required for efficient expression of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem* 1991; **266**: 3944–3948.
- [5] ARIDOR M, BALCH WE. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med* 1999; **5**: 745–751.
- [6] ARIOGLU E, ANDEWELT A, DIABO C, BELL M, TAYLOR SI, GORDEN P. Clinical course of the syndrome of autoantibodies to the insulin receptor (type B insulin resistance): a 28-year perspective. *Medicine (Baltimore)* 2002; **81**: 87–100.
- [7] BACKELJAUW PF, ALVES C, EIDSON M, CLEVELAND W, UNDERWOOD LE, DAVENPORT ML. Effect of intravenous insulin-like growth factor I in two patients with leprechaunism. *Pediatr Res* 1994; **36**: 749–754.
- [8] BALVAY L, LIBRI D, FISZMAN MY. Pre-mRNA secondary structure and the regulation of splicing. *BioEssays* 1993; **15**: 165–169.
- [9] BARBETTI F, GEJMAN PV, TAYLOR SI, RABEN N, CAMA A, BONORA E, PIZZO P, MOGHETTI P, MUGGIO M, ROTH J. Detection of mutations in insulin receptor gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Diabetes* 1992; **41**: 408–415.
- [10] BENYOUCF S, SURINYA KH, HADASCHIK D, SIDDLE K. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem J* 2007; **403**: 603–613.
- [11] BLACK DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003; **72**: 291–336.
- [12] BRUNETTI A, MADDUX BA, WONG KY, GOLDFINE ID. Muscle differentiation is associated with increased insulin receptor biosynthesis and messenger RNA levels. *J Clin Invest* 1989; **83**: 192–198.
- [13] BRUNETTI A, GOLDFINE ID. Differential effects of fibroblast growth factor on insulin receptor and muscle specific protein gene expression in BC3H-1 myocytes. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 880–885.
- [14] BRUNETTI A, FOTI D, GOLDFINE ID. Identification of unique nuclear regulatory proteins for the insulin receptor gene which appear during myocyte and adipocyte differentiation. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1288–1295.
- [15] BRUNETTI A, MANFIOLETTI G, CHIEFARI E, GOLDFINE ID, FOTI D. Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI-Y. *FASEB J* 2001; **15**: 492–500.
- [16] BRUNING PF, BONFRER JM, VAN NOORD PA, et al. Insulin resistance and breast-cancer risk. *Int J Cancer* 1992; **52**: 511–516.
- [17] BUCHNER J. Hsp90 & Co. – a holding for holding. *Trends Biochem Sci* 1999; **24**: 136–141.
- [18] BURATTI E, BARALLE M, BARALLE FE. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 3494–3510.
- [19] BURD CG, DREYFUSS G. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *EMBO J* 1994; **13**: 1197–1204.
- [20] BUSTIN M, REEVES R. High-mobility-group proteins: architectural components that facilitates chromatin function. *Prog Nucleic Acids Res* 1996; **54**: 35–100.
- [21] CÁCERES JF, STAMM S, Helfman DM, KRAINER AR. Regulation of alternative splicing *in vivo* by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 1994; **265**: 1706–1709.
- [22] COCHRAN E, YOUNG JR, SEBRING N, DE PAOLLI A. Efficacy of recombinant methionyl human leptin therapy for the extreme insulin resistance of the Rabson-Mendenhall Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(4): 1548–1554.
- [23] DE MEYTS P, ROTH J, NEVILLE DM JR, GAVIN JR III, LESNIAK MA. Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; **55**(1): 154–161.
- [24] DE MEYTS P, BAINCO AR, ROTH J. Site-site interactions among insulin receptors. Characterization of the negative cooperativity. *J Biol Chem* 1976; **251**(7): 1877–1888.
- [25] DE MEYTS P, WHITTAKER J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002; **1**: 769–783.
- [26] DONOHUE WL, UCHIDA I. Leprechaunism: an euphemism for a rare familial disorder. *J Pediatr* 1954; **45**: 505–519.

- [27] EBINA Y, ELLIS L, YARNAGIN K, EDERY M, GRAF L, CLAUSER E, OU JH, MASIARZ F, KAN YW, GOLDFINE ID, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 1975; **40**: 747–758.
- [28] EHRMANN DA, BARNES RB, ROSENFELD RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* 1995; **16**: 322–353.
- [29] EHRMANN DA, CAVAGHAN MK, IMPERIAL J, STURIS J, ROSENFELD RL, POLONSKY KS. Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 524–530.
- [30] EHRMANN DA, SCHNEIDER DJ, SOBEL BE, CAVAGHAN MK, IMPERIAL J, ROSENFELD RL, POLONSKY KS. Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 2108–2116.
- [31] ELLGAARD L, HELENIUS A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 431–437.
- [32] EPERON LP, GRAHAM IR, GRIFFITHS AD, EPERON IC. Effects of RNA secondary structure on alternative splicing of pre-mRNA: is folding limited to a region behind the transcribing RNA polymerase? *Cell* 1988; **54**(3): 393–401.
- [33] FAIVRE S, DJELLOUL S, RAYMOND E. New paradigms in anticancer therapy: Targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Semin Oncol* 2006; **33**: 407–420.
- [34] FEDERICI M, PORZIO O, ZUCARO L, et al. Distribution of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 1997; **129**: 121–126.
- [35] FEDERICI M, LAURO D, D'ADAMO M, et al. Expression of insulin/IGF-I hybrid receptors is increased in skeletal muscle of patients with chronic primary hyperinsulinemia. *Diabetes* 1998; **47**: 87–92.
- [36] FEDERICI M, PORZIO O, LAURO D, et al. Increased abundance of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in skeletal muscle of obese subjects is correlated with in vivo insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2911–2915.
- [37] FOTI D, JULIANO R, CHIEFARI E, BRUNETTI A. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP β , and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol* 2003; **23**(8): 2720–2732.
- [38] FRASCA F, PANDINI G, SCIACCA L, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 3278–3288.
- [39] FREYCHET P, ROTH J, NEVILLE Jr DM. Insulin receptors in the liver: specific binding of [¹²⁵I]insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**(8): 1833–1837.
- [40] GARG A, AGARWAL AK. Lipodystrophies: Disorders of adipose tissue biology. *Biochim Biophys Acta* 2009; **91**(6): 507–513.
- [41] GHAZEERI G, KUTTEH WH, BRYER-ASH M, HAAS D, KE RW. Effect of rosiglitazone on spontaneous and clomiphene citrate-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; **79**: 562–566.
- [42] GIDDINGS SJ, CARNAGHI LR. Insulin receptor gene expression during development: developmental regulation of insulin receptor mRNA abundance in embryonic rat liver and yolk sac, developmental regulation of insulin gene splicing, and comparison to abundance of insulin-like growth factor I receptor mRNA. *Mol Endocrinol* 1992; **6**(10): 1665–1672.
- [43] GIOVANNONE B, SCALDAFERRI ML, FEDERICI M, et al. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; **16**: 434–441.
- [44] GOLLOB JA, SCOTT W, CARTER C, KELLEY SL. Role of Raf kinase in cancer: Therapeutic potential of targeting the Raf/Mek/Erk signal transduction pathway. *Semin Oncol* 2006; **33**: 392–406.
- [45] GRAVELEY BR. Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures. *Cell* 2005; **123**: 65–73.
- [46] GUAN KL. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal* 1994; **6**: 581–589.
- [47] HAAS DA, CARR BR, ATTIA GR. Effects of metformin on body mass index, menstrual cyclicity, and ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003; **79**: 469–481.
- [48] HANSEN T, BJØRBAEK C, VESTERGAARD H, GRØNSKOV K. Expression of insulin receptor spliced variants and their functional correlates in muscle from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**(6): 1500–1505.

- [49] HARDAWAY CA, GIBBS NF. What Syndrome Is This? *Pediatr Dermatol* 2002; **19**(3): 267–270.
- [50] HARRIS AM, HALL B, KRISS VM, FOWLKES JL, KIESSLING SG. Rabson-Mendenhall syndrome: medullary sponge kidney, a new component. *Pediatr Nephrol* 2007; **22**: 2141–2144.
- [51] HEGELE RA, ANDERSON CM, WANG J, JONES DC, CAO H. Association between nuclear lamin A/C R482Q mutation and partial lipodystrophy with hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension, and diabetes. *Genome Res* 2000; **10**(5): 652–658.
- [52] HELENIUS A, TROMBETTA ES, HEBERT DN, SIMONS JF. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol* 1997; **7**: 193–200.
- [53] HILLER M, ZHANG Z, BACKOFEN R, STAMM S. Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition. *PLoS Genet* 2007; **3**: c204.
- [54] HOEY T, WEINZIERL RO, GILL G, CHEN JL, DYNLACHT BD, TJIAN R. Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 1993; **72**(2): 247–260.
- [55] HSU IR, KIM SP, KABIR M, BERGMAN RN. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and cancer. *Am J Clin Nutr* 2007; **86**(3): Suppl. 867–871.
- [56] HU FB, MANSON JE, LIU S, et al. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 542–547.
- [57] Insulin receptor no. 147670: defect in insulin receptor, with insulin resistant diabetes mellitus, acanthosis nigricans, and Type A. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Johns Hopkins University. Victor A. McKusick. 6/2/1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=147670>.
- [58] ISHII S, XU Y-H, STRATTON RH, ROE BA, MERLINO GT, PASTAN I. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *PNAS* 1985; **82**(15): 4920–4924.
- [59] JOSPE N, ZHU J, LIU R, LIVINGSTON JN, FURLANETTO RW. Deletion of 3 basepairs resulting in the loss of lysine-121 in the insulin receptor alpha-subunit in a patient with leprechaunism: binding, phosphorylation, and biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; **79**: 1294–1302.
- [60] KADOWAKI T, BEVINS CL, CAMAA, OJAMAA K, MARCUS-SAMUELS B, KADOWAKI H, BEITZ L, MCKEON C, TAYLOR SI. Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. *Science* 1988; **240**: 787–790.
- [61] KADOWAKI T, KADOWAKI H, RECHLER MM, SERRANO-RIOS M, ROTH J, GORDEN P, et al. Five mutant alleles of the insulin receptor gene in patients with genetic forms of insulin resistance. *J Clin Invest* 1990; **86**: 254–264.
- [62] KAHN CR, FLIER JS, BAR RS, ARCHER JA, GORDEN P, MARTIN MM, ROTH J. The syndromes of insulin resistance and *acanthosis nigricans*. Insulin-receptor disorders in man. *N Engl J Med* 1976; **294**: 739–745.
- [63] KALLO A, LAKATOS I, SZIJARTO L. Leprechaunism (Donohue's syndrome). *J Pediatr* 1965; **66**: 372–379.
- [64] KARIN M, HASLINGER A, HOLTGREVE H, RICHARDS RI, KRAUTER P, WESTPHAL HM, BEATO M. Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 1984; **308**(5959): 513–519.
- [65] KELLERER M, SESTI G, SEFFER B, OBERMAIER-KUSSER DE, PONGRATZ L, MOSTHAF L, HARING HU. Altered pattern of insulin receptor isotypes in skeletal muscle membranes of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* 1993; **36**: 628–632.
- [66] KIM HS, LEE JK, TSAI SY. E1a activation of insulin receptor gene expression is mediated by Sp1-binding sites. *Mol Endocrinol* 1994; **9**: 178–186.
- [67] KIM SH, MOORES JC, DAVID D, RESPESS JG, JOLLY DJ, FRIEDMANN T. The organization of the human *HPRT* gene. *Nucleic Acids Res* 1986; **14**(7): 3130–3118.
- [68] KIRBY E, BEALS D. Fibroepithelial papillomatosis („skin tags”) in Rabson-Mendenhall syndrome. *J Pediatr Surg* 2008; **43**: E21–E26.
- [69] KOLCH W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/Mek/Erk pathway by protein interaction. *Biochem J* 2000; **351**: 289–305.
- [70] KOSAKI A, WEBSTER NJ. Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem* 1993; **268**(29): 21990–21996.
- [71] KOSAKI A, PILLAY TS, XU L, WEBSTER NJG. The B isoform of the insulin receptor signals more efficiently than the A isoform in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1995; **35**(1): 20816–20823.
- [72] KOSAKI A, NELSON J, WEBSTER NJG. Identification of intron and exon sequences involved in alternative splicing of insulin receptor pre-mRNA. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10331–10337.

- [73] KRISTENSEN C, WIBERG FC, SCHAFFER L, ANDERSEN AS. Expression and characterization of a 70-kDa fragment of the insulin receptor that binds insulin. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17780–17786.
- [74] KUO H-C, NASIM FH, GRABOWSKI PJ. Control of alternative splicing by the differential binding of U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Science* 1991; **252**: 1045–1050.
- [75] LANGLOIS WJ, SASAOKA T, YIP CC, OLEFSKY JM. Functional characterization of hybrid receptors composed of a truncated insulin receptor and wild type insulin-like growth factor 1 or insulin receptor. *Endocrinology* 1995; **136**: 1978–1986.
- [76] LEE JK, TAM JW, TSAI MJ, TSAI SY. Identification of cis- and trans-acting factors regulating the expression of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem* 1992; **267**(7): 4638–4645.
- [77] LEITNER JW, KLINE T, CAREL K, et al. Hyperinsulinemia potentiates activation of p21Ras by growth factors. *Endocrinology* 1997; **138**: 2211–2214.
- [78] Leprechaunism no. 246200: defect in insulin receptor, with Donohue syndrome. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Johns Hopkins University. Victor A. McKusick: 6/3/1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=246200>.
- [79] LIU K, STAMLER J, MOSS D, et al. Dietary cholesterol, fat, and fibre, and colon-cancer mortality. An analysis of international data. *Lancet* 1979; **2**: 782–785.
- [80] LONGO N, WANG Y, SMITH SA, LANGLEY SD, DIMEGLIO LA, GIANELLA-NETO D. Genotype-phenotype correlation in inherited severe insulin resistance. *Hum Mol Genet* 2002; **11**(12): 1465–1475.
- [81] MAMULA PW, MC DONALD AR, BRUNETTI A, OKABAYASHI Y, WONG KY, MADDUX BA, LOGSDON C, GOLDFINE ID. Regulating insulin-receptor-gene expression by differentiation and hormones. *Diabetes Care* 1990; **13**(3): 288–301.
- [82] MARINO-BUSLJE C, MARTIN-MARTINEZ M, MIZUGUCHI K, SIDDLE K, BLUNDELL TL. The insulin receptor: from protein sequence to structure. *Biochem Soc Trans* 1999; **27**: 715–726.
- [83] MC CLAIN DA. Different ligand affinities of the two insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol Endocrinol* 1991; **5**: 734–739.
- [84] MC DONALD AR, MADDUX BA, OKABAYASHI Y, WONG KY, HAWLEY DM, LOGSDON CD, GOLDFINE ID. Regulation of insulin-receptor mRNA levels by glucocorticoids. *Diabetes* 1987; **36**(6): 779–781.
- [85] MC KEON C, ACCILI D, CHEN H, PHAM T, WALKER GE. A conserved region in the first intron of the insulin receptor gene binds nuclear proteins during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**: 701–706.
- [86] MC KEOWN M. Alternative mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 133–155.
- [87] MC KERN NM, LAWRENCE MC, STRELTSOV VA, LOU MZ, ADAMS TE, LOVRECH GO, ELLERMAN TC, RICHARDS KM, BENTLEY JD, PILLING PA, et al. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 2006; **443**: 218–221.
- [88] MILOS PM, ZARET KS. A ubiquitous factor is required for C/EBP-related proteins to form stable transcription complexes on an albumin promoter segment *in vitro*. *Genes Dev* 1992; **6**: 991–1004.
- [89] MINK PJ, SHAHAR E, ROSAMOND WD, et al. Serum insulin and glucose levels and breast cancer incidence: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Am J Epidemiol* 2002; **156**: 349–352.
- [90] MOGHETTI P, CASTELLO R, NEGRI C, TOSI F, PERRONE F, CAPUTO M, ZANOLIN E, MUGGIO M. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; **85**: 139/0146.
- [91] MOLLER DE, YOKOTA A, CARO JF, FLIER JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1263–1269.
- [92] MOLLER DE, YOKOTA A, PAZIANOS A, FLIER JS. A missense mutation in one allele of the tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is associated with dominantly inherited insulin resistance. (Abstract) *Clin Res* 1990; **38**: 435A.
- [93] MOLLER DE, COHEN O, YAMAGUCHI Y, ASSIZ R, GRIGORESCU F, EBERLE A, MORROW LA, MOSES AC, FLIER JS. Prevalence of mutations in the insulin receptor gene in subjects with features of the type A syndrome of insulin resistance. *Diabetes* 1994; **43**: 247–255.
- [94] MOSTHAF L, GRAKOD, DULL TJ, COUSSENS L, ULLRICH A, MC CLAIN DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J* 1990; **9**: 2409–2413.
- [95] MOSTHAF L, VOGT H, HARING U, ULLRICH A. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4728–4730.

- [96] MURPHY TK, CALLE EE, RODRIGUEZ C, et al. Body mass index and colon cancer mortality in a large prospective study. *Am J Epidemiol* 2000; **152**: 847–854.
- [97] MUSSO C, COCHRAN E, MORAN SA, SKARULIS MC, ORAL EA, TAYLOR SI, GORDEN P. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30 years prospective. *Medicine (Baltimore)* 2004; **83**: 209–222.
- [98] MUSSO C, COCHRAN E, JAVORE E, YOUNG J, DEPAOLI AM, GORDEN P. The long-term effect of recombinant methionyl human leptin therapy on hyperandrogenism and menstrual function in female and pituitary function in male and female hypoleptinemic lipodystrophic patients. *Metabolism* 2005; **54**: 255–263.
- [99] MUSSO C, SHAWKER T, COCHRAN E, JAVORE E, YOUNG J, GORDEN P. Clinical evidence that hyperinsulinaemia independent of gonadotropins stimulates ovarian growth. *Clin Endocrinol* 2005; **63**: 73–78.
- [100] MÜLLER-WIELAND D, VAN DER VORMER, STREICHER R, KRONE W, SEEMANOVA E, DREYER M, RÜDIGER HW, ROSIPAL SR, MAASSEN JA. An in-frame insertion in exon 3 and a nonsense mutation in exon 2 of the insulin receptor gene associated with severe insulin resistance in a patient with Rabson-Mendenhall syndrome. *Diabetologia* 1993; **36**: 1168–1174.
- [101] NELSON KK, GREEN MR. Mechanism for cryptic splice site activation during pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad USA* 1990; **87**: 6253–6255.
- [102] NELSON VL, QIN KN, ROSENFELD RL, WOOD JR, PENNING TM, LEGRO RS, STRAUSS JF, MC ALLISTER JM. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 5925–5933.
- [103] NESTLER JE. Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; **15**: 111–122.
- [104] NORGREN S, ZIERATH J, WEDELL A, WALLEBERG-HENRIKSSON H, LUTHMAN H. Regulation of human insulin receptor RNA splicing *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 1465–1469.
- [105] NORGREN S, LILS, LUTHMAN H. Regulation of human insulin receptor RNA splicing in HepG2 cells: effects of glucocorticoid and low glucose concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **199**: 277–284.
- [106] NORGREN S, ZIERATH J, GALUSKA D, WALLBERG-HENRIKSSON H, LUTHMAN H. Differences in the ratio of RNA encoding two isoforms of the insulin receptor between control and NIDDM patients. The RNA variant without Exon 11 predominates in both groups. *Diabetes* 1993; **42**: 675–681.
- [107] OLSON TS, BAMBERGER MJ, LANE MD. Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin proreceptor: correlation with acquisition of function. *J Biol Chem* 1998; **263**: 7342–7351.
- [108] ORAL EA, SIMHA V, RUIZ E, ANDEWELT A, PREMKUMAR A, SNELL P, WAGNER AJ, DEPAOLI AM, REITMAN ML, TAYLOR SI, GORDEN P, GARG A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 2002; **346**: 570–578.
- [109] ORAL EA, RUIZ E, ANDEWELT A, SEBRING N, WAGNER AJ, DE PAOLI AM, GORDEN P. Effect of leptin replacement on pituitary hormone regulation in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**: 3110–3117.
- [110] OŚWIECIMSKA J, ZIORA K, DYDUCH A. Lipodystrofia nabyta i wrodzona. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* 2006; **2**(1): 22–29.
- [111] PAYNE VA, GRIMSEY N, TUTHILL A, VIRTUE S, GRAY SL, DALLA NORA E, SEMPLE RK, O'RAHILLY S, ROCHFORD JJ. The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. *Diabetes* 2008; **57**(8): 2055–2060.
- [112] PELLECANIA A, CHIN M T, WIESEL P, IBANEZ M, PATEL A, YET S-F, HSIEH C-M, PAULASKIS JD, REEVES R, LEE M-E, PERRELLA MA. Induction of high mobility group-I(Y) protein by endotoxin and interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 1525–1532.
- [113] RABSON SM, MENDENHALL EN. Familial hypertrophy of pineal body, hyperplasia of adrenal cortex and diabetes mellitus; report of 3 cases. *Am J Clin Pathol* 1956; **26**: 283–290.
- [114] Rabson-Mendenhall syndrome. 262190: Pineal hyperplasia, insulin-resistant diabetes mellitus, and somatic abnormalities. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Johns Hopkins University. Creation date - Victor A. McKusick: 6/4/1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=262190>.
- [115] ROMUALDI D, GUIDO M, CIAMPELLI M, GIULIANI M, LEONI F, PERRI C, LANZONE A. Selective effects of pioglitazone on insulin and androgen abnormalities in normo- and hyperinsulinaemic obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003; **18**: 1210–1218.
- [116] ROSE DP, KOMNINO D, STEPHENSON GD. Obesity, adipocytokines, and insulin resistance in breast cancer. *Obes Rev* 2004; **5**(3): 153–165.
- [117] ROSENSTEIN ED, ADVANI S, REITZ RE, KRAMER N. The prevalence of insulin receptor antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and related conditions. *J Clin Rheumatol* 2001; **7**: 371–373.

- [118] ROTH SI, SCHEDEWIE HK, HERZBERG VK, OLEFSKY J, ELDERS MJ, RUBENSTEIN A. Cutaneous manifestations of leprechaunism. *Arch Dermatol* 1981; **117**: 531–535.
- [119] RUBIN CM, HOUCK CM, DENINIGER PL, FRIEDMANN T, SCHMID CW. Partial nucleotide sequence of the 300-nucleotide interspersed repeated human DNA sequences. *Nature* 1980; **284**: 372–374.
- [120] RUDDON RW, BEDOWS E. Assisted protein folding. *J Biol Chem* 1997; **272**: 3125–3128.
- [121] RUDMAN D, FELLER AG, NAGRAJ HS, et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N Engl J Med* 1990; **323**: 1–6.
- [122] SAITOH T, YANAGITA T, SHIRAISHI S, YOKOO H, KOBAYASHI H, MINAMI S-I, ONITSUKA T, WADA A. Down-regulation of cell surface insulin receptor and insulin receptor substrate-1 phosphorylation by inhibitor of 90-kDa Heat-Shock Protein family: endoplasmic reticulum retention of monomeric insulin receptor precursor with calnexin in adrenal chromaffin cells. *Mol Pharmacol* 2002; **62**(4): 847–855.
- [123] SAKATA S, KOBAYASHI M, MIURA K, ATASSI MZ. Molecular recognition of human insulin receptor by autoantibodies in a human serum. *Immunol Invest* 1988; **17**: 237–242.
- [124] SALMERON J, ASCHERIO A, RIMM E. Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* 1997; **20**: 545.
- [125] SAWKA-VERHELLE D, TARTARE-DECKERT S, WHITE MF, VAN OBBERGHEN E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acid. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5980–5983.
- [126] SAVKUR RS, PHILIPS AV, COOPER TA. Abberant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 2001; **29**: 40–47.
- [127] SCHLESSINGER J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 2002; **110**: 669–672.
- [128] SCIACCA L, COSTANTINO A, PANDINI G, et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancer: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 1999; **18**: 2471–2479.
- [129] SEELY BL, REICHART DR, TAKATA Y, YIP CC, OLEFSKY JM. A functional assessment of insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors. *Endocrinology* 1995; **136**: 1635–1641.
- [130] SEINO S, BELL GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **159**: 312–316.
- [131] SEINO S, SEINO M, NISHI S, BELL GI. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 114–118.
- [132] SELL SM, REESE D, OSSOWSKI VM. Insulin-inducible changes in insulin receptor mRNA splice variants. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30769–30772.
- [133] SEN S, TALUKDAR I, WEBSTER NJG, SRp20 and CUG-BP1 modulate insulin receptor exon 11 alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2009; **29**(3): 871–880.
- [134] SESTI G, MARINI MA, MONTEMURRO A, et al. Evidence that two naturally occurring human insulin receptor alpha-subunit variants are immunologically distinct. *Diabetes* 1992; **41**: 6–11.
- [135] SESTI G, TULLIO AN, MARINI MA, et al. Role of the exon 11 of the insulin receptor gene on insulin binding identified by antipeptide antibodies. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **101**: 121–127.
- [136] SESTI G, TULLIO AN, D'ALFONSO R, et al. Tissue-specific expression of two alternatively spliced isoforms of the human insulin receptor protein. *Acta Diabetologica* 1994; **31**: 59–65.
- [137] SESTI G, FEDERICI M, LAURO D, SBRACCIAP, LAURO R. Molecular mechanism of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: role of the insulin receptor variant forms. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; **17**: 363–373.
- [138] SIMHA V, GARGA A. Inherited lipodystrophies and hypertriglyceridemia. *Curr Opin Lipidol* 2009; **20**(4): 300–308.
- [139] SINGER-SAM J, KEITH DH, TANI K, SIMMER RL, SHIVELY L, LINDSAY S, YOSHIDA A, RIGGS AD. Sequence of the promoter region of the gene for human X-linked 3-phosphoglycerate kinase. *Gene* 1984; **32**: 409–417.
- [140] SINGH NN, SINGH RN, ANDROPHY EJ. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**(2): 371–389.
- [141] SKUPIEŃ J, MAŁECKI MT. Rozbudowywanie podziału cukrzycy – nowe podtypy i możliwości lecznicze. *Diabetologia Praktyczna* 2007; **8**(1): 1–12.
- [142] SOLNICK D. Alternative splicing caused by RNA secondary structure. *Cell* 1985; **43**: 667–676.
- [143] SOLNICK D, LEE SI. Amount of RNA secondary structure required to induce an alternative splice. *Moll Cell Biol* 1987; **7**: 3194–3198.
- [144] SOOS MA, FIELD CE, SIDDLE K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-line growth factor-I but not insulin, with high affinity. *Biochem J* 1993; **290**: 419–426.

- [145] STANDAERT ML, SCHIMMEL SD, POLLET RJ. The development of insulin receptors and responses in the differentiating non-fusing muscle cell line BC3H-1. *J Biol Chem* 1984; **259**: 2337–2345.
- [146] STEFANOVSKY VY, PELLETIER G, HANNAN R, GAGNON-KUGLER T, ROTHBLUM LI, MOSS T. An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 2001; **8**: 1063–1073.
- [147] SZYMANSKI KM, BINNS D, BARTZ R, GRISHIN NV, LI WP, AGARWALAK, GARGA, ANDERSON RG, GOODMAN JM. The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(52): 20890–20895.
- [148] TALUKDAR I, SEN S, WEBSTER N. SRp20, hnRNP A1 and F regulate alternative splicing of insulin receptor via binding to the intronic regulatory elements. *FASEB J* 2008; **22**: 601.1.
- [149] TANIGUCHI CM, EMANUELLI B, KHAN CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; **7**: 85–96.
- [150] TEWARI DS, COOK DM, TAUB R. Characterization of the promoter region and 3' end of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem* 1989; **264**(27): 16238–16245.
- [151] THIEL CT, KNEBEL B, KNERR I, STICHT H, MÜLLER-WIELAND D, ZENKER M, REIS A, DÖRR H-G, RAUCHA. Two novel mutations in the insulin binding subunit of the insulin receptor gene without insulin binding impairment in a patient with Rabson-Mendenhall syndrome. *Mol Genet Metab* 2008; **94**: 356–362.
- [152] TUTHILLA, SEMPLE RK, DAY R, SOOS M, SWEENEY E, SEYMOUR PJ, DIDI M, O'RAHILLY S. Functional characterization of a novel insulin receptor mutation contributing to Rabson-Mendenhall syndrome. *Clin Endocrinol* 2007; **66**: 21–26.
- [153] ULLRICH A, BELL JR, CHEN EY, HERRERA R, PETRUZZELLI LM, DULL TJ, GRAY A, COUSSENS L, LIAO YC, TSUBOKAWA M, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985; **313**: 756–761.
- [154] VOGT B, CARRASCOSA JM, ERMEL B, ULLRICH A, HARING HU. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **177**: 1013–1018.
- [155] VOJTEK AB, DER CJ. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1998; **273**: 19925–19928.
- [156] VELAZQUEZ EM, MENDOZA S, HAMER T, SOSA F, GLUECK CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994; **43**: 647–654.
- [157] WALDHAUSER F, WEISSENBACHER G, FRISCH H, POLLAK A. Pulsatile secretion of gonadotropins in early infancy. *Eur J Pediatr* 1981; **137**: 71–74.
- [158] WEBSTER NJG, EVANS L-G, CAPLES M, ERKER L, CHEW SL. Assembly of splicing complexes on exon 11 of the human insulin receptor gene does not correlate with splicing efficiency *in-vitro*. *BMC Mol Biol* 2004; **5**(7).
- [159] WHITE MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 1997; **40**: Suppl. 2–17.
- [160] WHITE MF, KAHN CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1–4.
- [161] YAMAGUCHI Y, FLIER JS, YOKOTA A, BENECKE H, BACKER JM, MOLLER DE. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 2058–2066.
- [162] YAMAGUCHI Y, FLIER JS, BENECKE H, RANSIL BJ, MOLLER DE. Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* 1993; **132**: 1132–1138.
- [163] ZYROMSKI NJ, MATHUR A, PITT HA, WADE TE, WANG S, NAKSHATRI P, SWARTZ-BASILE DA, NAKSHATRI H. Obesity potentiates the growth and dissemination of pancreatic cancer. *Surgery* 2009; **146**(2): 258–263.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 02.07 2009 r.

Przyjęto: 25.08. 2009 r.

*Dr n. biol. Aleksandra Rojek Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Szpitalna 27/33 60-572 Poznań
e-mail: aleksandra.rojek@gmail.com*