

## НОВЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ И МИШЕНЕЙ ДЕЙСТВИЯ С-ПЕПТИДА ПРОИНСУЛИНА

© А. О. Шпаков

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223,  
и С.-Петербургский государственный университет, 199034;  
электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru*

С-пептид, продукт протеолиза проинсулина, является шапероном для инсулина как при его хранении в транспортных везикулах  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, так и в дальнейшем, после его секреции в кровотоке. Наряду с этим С-пептид функционирует как эндогенный регулятор множества внутриклеточных эффекторных белков, включая фосфолипазу С $\beta$ , фосфатидилинозитол-3-киназу, митогенактивируемые протеинкиназы, нерцепторные тирозинкиназы, контролирует цАМФ- и цГМФ-зависимые каскады. В последние годы идентифицирован специфичный для С-пептида рецептор GPR146, который относится к суперсемейству сопряженных с G-белками рецепторов. Снижение уровня С-пептида и активности его сигнальных каскадов в условиях сахарного диабета приводят к широкому спектру осложнений этого заболевания, включая диабетическую нефропатию, кардиомиопатию, ангиопатию и нейропатию. Изменения функций С-пептида выявлены у пациентов с недиабетической патологией, имеющих заболевания сердечно-сосудистой системы и почечную недостаточность. Настоящий обзор посвящен наиболее значимым событиям, произошедшим в течение последних лет при изучении структурно-функциональной организации молекулы С-пептида и молекулярных механизмов его действия на клетку.

**Ключевые слова:** С-пептид, инсулин, сахарный диабет, рецептор GPR146, фосфолипаза С, ГТФ-связывающий белок.

**Принятые сокращения:** АКО — аминокислотный остаток, АКП — аминокислотная последовательность, ИФР-1 — инсулиноподобный фактор роста-1, СД — сахарный диабет, ТМ — трансмембранный участок, ЦП — цитоплазматическая петля, ФЛС $\beta$  — фосфоинозитид-специфичная фосфолипаза С $\beta$ , GPCR — сопряженный с G-белками рецептор (G protein-coupled receptor).

Длительное время С-пептид, образующийся в результате протеолитического расщепления проинсулина, рассматривали как побочный продукт синтеза инсулина, не наделяя его собственными функциональными свойствами. Такой подход к С-пептиду в значительной степени был связан с тем, что у него не было выявлено гипогликемической активности, которую предполагали обнаружить по аналогии с инсулином. В результате интерес к С-пептиду был ограничен его использованием в диагностических целях как биомаркера инсулинпродуцирующей функции  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. В отличие от инсулина, концентрация которого в крови снижается вдвое уже через 4 мин после секреции из  $\beta$ -клеток, время полужизни для С-пептида составляет 30 мин, а в условиях относительного инсулинового дефицита, характерного для мягких форм сахарного диабета (СД) 1-го типа, существенно больше. Вследствие этого мониторинг концентрации С-пептида позволяет с высокой точностью оценить функциональную активность  $\beta$ -клеток.

Однако в последние годы произошла переоценка физиологической роли С-пептида, открылись широкие возможности для его применения в медицине при лечении широкого спектра осложнений СД 1-го и 2-го типов, таких как кардиомиопатия, ангиопатия, нефропатия, нейропатия и ретинопатия. Наибольшие успехи были достигну-

ты в последние годы, что стало возможным благодаря расшифровке структурной организации молекулы С-пептида, идентификации его рецептора, изучению механизмов взаимодействия С-пептида с инсулином и амилином. Настоящий обзор посвящен наиболее значимым открытиям в области исследования С-пептида, которые были сделаны в последние годы, прошедшие со времени опубликования двух предыдущих обзоров, посвященных физиологическим и биохимическим эффектам С-пептида (Шпаков, Гранстрем, 2013а, 2013б).

### Структурная организация молекулы С-пептида

Протеолитическое расщепление проинсулина, в результате которого образуются инсулин и С-пептид, осуществляется тремя пептидазами в процессе везикулярного транспорта проинсулина из гладкого эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи (Steiner et al., 2006). Основной функцией С-пептида на этапе синтеза биологически активной молекулы инсулина является обеспечение правильной укладки его А- и В-цепей и их сшивки дисульфидными связями, а также стабилизация биологически активной формы инсулина при его хранении в сек-

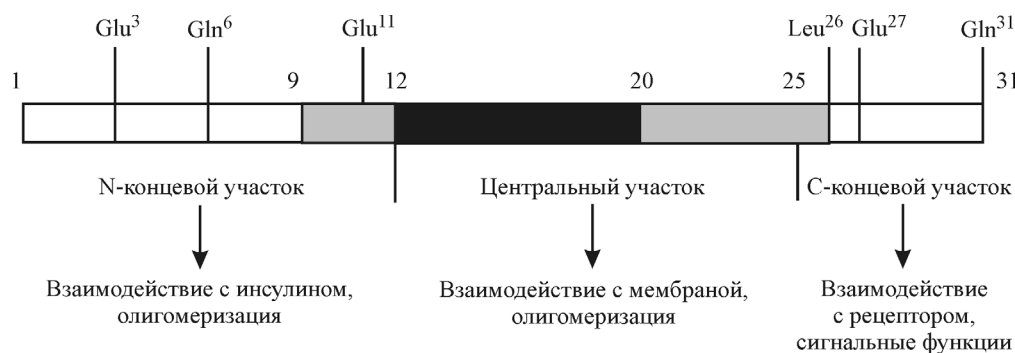


Рис. 1. Структурно-функциональная организация молекул С-пептида млекопитающих, включающих в себя N-концевой (1—12), центральный (13—25) и С-концевой (26—31) участки.

Сплошным черным цветом выделена гибкая петля 13—20, обогащенная остатками глицина и пролина, в то время как склонные к образованию  $\beta$ -складок участки выделены серым цветом. Отмечены функционально важные и наиболее консервативные АКО.

реторных гранулах  $\beta$ -клеток. Повышение уровня глюкозы в крови ведет к секреции эквивалентных количеств инсулина и С-пептида, но поскольку период полужизни С-пептида в кровотоке более продолжительный, его концентрация оказывается существенно выше таковой инсулина.

У большинства позвоночных животных имеется по одной форме проинсулина и соответственно по одной форме С-пептида. Однако у крысы, мыши и некоторых рыб идентифицировано по две формы проинсулина и С-пептида, хотя биологическое значение этого феномена до сих пор не выяснено. Длина С-пептидов варьирует от 28 до 38 аминокислотных остатков (АКО), но у млекопитающих обычно составляет 31 АКО. С-пептиды, выделенные из различных позвоночных животных, варьируются по первичной структуре, что отличает их от инсулинов, которые в этом отношении более консервативны. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей (АКП) С-пептидов млекопитающих показал, что наиболее консервативными являются отрицательно заряженные остатки Glu<sup>3</sup>, Glu<sup>11</sup> и Glu<sup>27</sup> и полярные остатки Gln<sup>6</sup> и Gln<sup>31</sup> (нумерация здесь и далее соответствует С-пептиду человека) (Henriksson et al., 2005; Wang et al., 2012).

С помощью ковариационного анализа АКП молекул С-пептида и инсулина было показано, что высококонсервативный остаток Glu<sup>3</sup> С-пептида коэволюционирует с гидрофобными и отрицательно заряженными остатками А- и В-цепей инсулина, в частности с функционально важным остатком Glu<sup>13</sup> В-цепи инсулина. Это определяется участием отрицательно заряженного N-концевого сегмента С-пептида во взаимодействии с положительно заряженной молекулой инсулина (Wang et al., 2012). Однако корреляционный анализ больших массивов АКП молекул С-пептида и инсулина показывает, что эволюционные взаимосвязи между ними не столь выражены, как полагали ранее, а их эволюция в значительной степени проходит независимо, что подтверждает самостоятельную роль С-пептида в организме. На это указывают различия филогенетических деревьев для молекул инсулина и С-пептида, а также данные сравнительного анализа их АКП (Landreh et al., 2014c). Так, хотя АКП инсулинов человека и макаки-резуса идентичны, первичные структуры соответствующих им С-пептидов имеют всего 63 % идентичных АКО. АКП инсулинов дегу *Octodon degus* и морской свинки *Cavia porcellus* при сравнении с инсулином человека имеют 62 и 67 % идентичных АКО. В то же вре-

мя степень идентичности соответствующих им С-пептидов при сравнении с С-пептидом человека существенно выше и составляет 75—79 %. В свою очередь степень идентичности АКП инсулина и С-пептида макаки-крабода *Macaca fascicularis* при сравнении с соответствующими молекулами человека примерно одинакова (97—100 %).

Сравнительно недавно были получены доказательства того, что молекула С-пептида многофункциональна и включает в себя несколько участков, каждый из которых ответствен за определенную биологическую активность (Chen et al., 2002; Shafqat et al., 2006; Jornvall et al., 2010; Keltner et al., 2010; Nerelius et al., 2010). Однако только в последние годы было осуществлено картирование молекулы С-пептида и установлена пространственная структура ее функциональных доменов (Landreh et al., 2014b, 2014c, 2015). В общей сложности в молекуле С-пептида выделяют три домена — N-концевой, центральный и С-концевой, которые различаются по структуре и функциям (рис. 1).

У млекопитающих отрицательно заряженный N-концевой участок 1—12 отвечает за олигомеризацию С-пептида, который, как и инсулин, образует гексамерные комплексы, а также за взаимодействие с молекулой инсулина, причем в обоих случаях основную роль играют отрицательно заряженные остатки Glu<sup>3</sup> и Glu<sup>11</sup> (Nerelius et al., 2010). Взаимодействие N-концевого участка С-пептида с инсулином обеспечивает правильное сворачивание молекулы инсулина и ее сохранение в биологически активной форме в секреторных гранулах  $\beta$ -клеток (Chen et al., 2002; Min et al., 2004; Nerelius et al., 2010). Взаимодействие С-пептида с инсулином приводит к диссоциации олигомерных комплексов инсулина и препятствует агрегации образующихся в результате этого мономерных форм, что является одним из механизмов контроля биологической активности инсулина в процессе его секреции и дальнейшей циркуляции в кровотоке (Shafqat et al., 2006; Nerelius et al., 2010). В этом отношении С-пептид можно рассматривать, как шаперон и ко-активатор молекулы инсулина. Анализ вторичной структуры N-концевого участка показывает, что в нем имеются два структурных модуля — неупорядоченный сегмент 1—8 с отрицательно заряженным мотивом Glu-Ala-Glu-Asp<sup>1-4</sup> и короткая  $\beta$ -складчатая структура 9—12 (Landreh et al., 2014c).

Центральный участок С-пептида, включающий в себя последовательность 13—25, обогащен остатками глицина

и пролина, которые консервативны среди С-пептидов млекопитающих и образуют подвижную петлю, являющуюся спейсером между N- и С-концевыми участками (Landreh et al., 2014c, 2015). Следует отметить, что в С-пептидах других позвоночных животных такая петля отсутствует. В молекуле проинсулина функция центрального участка состоит в формировании такой его пространственной структуры, которая обеспечивает эффективное взаимодействие между полипептидными цепями, соответствующими инсулину и С-пептиду (Yang et al., 2010). В дальнейшем функции этого участка состоят в стабилизации олигомерных комплексов С-пептида и в обеспечении эффективного взаимодействия его N- и С-концевых участков с их мишенями (Jornvall et al., 2010). Показано также, что подвижная петля, локализованная в центральном участке С-пептида, ответственна за его взаимодействие с поверхностью мембраны (Unnerstale, Maler, 2012). При этом повышается доля  $\beta$ -складчатых структур, что может указывать на формирование в условиях ассоциации с липидной поверхностью мембраны шпилькообразной структуры, включающей в себя последовательность 9—26. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что в молекуле С-пептида латимерии *Latimeria menadoensis* шпилькообразная структура присутствует изначально, будучи стабилизирована внутримолекулярной дисульфидной связью Cys<sup>11</sup>-Cys<sup>16</sup> (Landreh et al., 2014c).

Наиболее интересным с точки зрения функциональной активности является С-концевой участок 26—31 С-пептида, который отвечает за взаимодействие со специфическим к С-пептиду рецептором и за регуляцию внутриклеточных сигнальных каскадов (Ohtomo et al., 1998; Nordquist et al., 2007; Nach et al., 2008; Landreh et al., 2014c). Этот участок содержит высококонсервативные остатки Leu<sup>26</sup>, Glu<sup>27</sup> и Gln<sup>31</sup>, образующие LEXXXQ-мотив с высокоупорядоченной структурой (Munte et al., 2005; Landreh et al., 2014c). Важнейшим доказательством того, что С-концевой участок включает в себя молекулярные детерминанты, ответственные за взаимодействие с рецептором, а также за основные физиологические и биохимические эффекты С-пептида, является специфическая биологическая активность, присущая пентапептиду 27—31 и гексапептиду 26—31, в значительной степени совпадающая с таковой полноразмерной молекулы С-пептида (Ohtomo et al., 1998; Nordquist et al., 2007; Nach et al., 2008; Keltner et al., 2010). Показано, что пентапептиды 27—31 крысы (EVARQ) и человека (EGSLQ) по конкурентному механизму ингибируют специфическое связывание полноразмерного С-пептида с мембранными рецепторами, и ключевую роль здесь играет остаток Glu<sup>27</sup>, замена которого блокирует такое связывание (Pramanik et al., 2001).

### Взаимодействие С-пептида с инсулином и амилином

Как отмечалось выше, отрицательно заряженный N-концевой участок С-пептида вовлечен в специфическое взаимодействие с положительно заряженной молекулой инсулина, вызывая дезагрегацию олигомерных комплексов инсулина, что ведет к сдвигу равновесия в сторону его мономерных форм, обладающих гипогликемической активностью (Shafqat et al., 2006; Nerelius et al., 2010). Таким образом, С-пептид регулирует способность инсулина снижать уровень глюкозы в крови.

Способность С-пептида специфично взаимодействовать с инсулином также играет ключевую роль в процессе хранения гормона в гранулах  $\beta$ -клеток и в сохранении биологической активности инсулина в процессе его секреции в кровотоки. Установлено, что при значениях pH около 5, несколько ниже изоэлектрической точки инсулина, заряд молекулы инсулина составляет +2, в то время как заряд молекулы С-пептида в этом случае равен -4. Такие значения pH характерны для инсулинсодержащих секреторных гранул. В таких условиях взаимодействие одной молекулы С-пептида с двумя молекулами инсулина вызывает нейтрализацию их заряда и приводит к преципитации образующихся тройных комплексов (Landreh et al., 2012, 2013). Со стороны инсулина в этом взаимодействии участвуют локализованные в В-цепи остатки Arg<sup>22</sup> и Lys<sup>29</sup>, в то время как в С-пептиде в него вовлечены высококонсервативные отрицательно заряженные АКО, в первую очередь Glu<sup>3</sup>, Glu<sup>11</sup> и Glu<sup>27</sup>. Следует отметить, что в секреторных гранулах были также обнаружены копреципитаты инсулина и С-пептида в соотношении 7 : 1, что, как можно полагать, является следствием взаимодействия одной молекулы С-пептида с мономерной и гексамерной формами инсулина. Хорошо известно, что другим механизмом, обеспечивающим преципитацию инсулина в гранулах  $\beta$ -клеток, является образование гексамерных инсулиновых комплексов, стабилизированных катионами цинка (Dunn, 2005). Однако эти комплексы образуются при значениях pH, превышающих изоэлектрическую точку инсулина, которые также регистрируются в секреторных гранулах. На основании этого было высказано предположение о том, что взаимодействие инсулина с С-пептидом и комплексообразование с катионами цинка — это два молекулярных механизма, которые обеспечивают тонкое равновесие между преципитатами и растворимыми формами инсулина при колебаниях значений pH в секреторных гранулах вблизи изоэлектрической точки инсулина, а также в условиях изменения кислотности среды в процессе секреции инсулина в кровотоки (Landreh et al., 2012). В отсутствие С-пептида и катионов цинка синтезированный *de novo* инсулин быстро агрегирует с образованием амилоидоподобных фибрилл, чему способствуют высокая концентрация гормона в гранулах и низкие значения pH, близкие его изоэлектрической точке, что в конечном итоге приводит к снижению или полной потере активности инсулина (Brange et al., 1997; Huang et al., 2005).

В процессе секреции происходит переход инсулина в растворимую форму, но комплекс с С-пептидом при этом сохраняется, хотя в значительной степени реорганизуется. С-пептид продолжает выполнять функцию шаперона, препятствуя агрегации инсулина в кровотоке и поддерживая концентрацию биологически активного гормона на необходимом уровне. Этим объясняется тот факт, что совместное подкожное ведение крысам С-пептида и инсулина значительно повышает скорость утилизации глюкозы, а также усиливает некоторые регуляторные эффекты инсулина на внутриклеточные мишени в печени. Так, в сравнении с инъекцией только одного инсулина при его совместном введении с С-пептидом стимулирующий эффект гормона на активность Акт-киназы, основной мишени действия инсулина, повышался на 35 %, а степень фосфорилирования нижележащего фермента, киназы-3 гликогенсинтетазы, возрастала на 50 % (Kubota et al., 2014). Эти данные указывают на то, что совместное использование С-пептида с инъекционными формами инсу-

лина может существенно повысить эффективность инсулиновой терапии, а также снизить дозы инсулина, необходимые для адекватного гликемического контроля, избегая, таким образом, крайне неблагоприятных для здоровья пациентов гипогликемических кризов.

Несмотря на то что N-концевые участки С-пептида у птиц, рептилий и земноводных структурно близки таковым у млекопитающих, их отрицательный заряд и консервативность АКП существенно ниже, что должно приводить к ослаблению взаимодействия с инсулином. Возможно, это связано с тем, что у представителей этих таксонов функция инсулина как регулятора глюкозного гомеостаза выражена в меньшей степени, чем у млекопитающих. В пользу этого свидетельствуют данные о более низкой чувствительности тканей птиц и земноводных к инсулину (Dupont et al., 2009; Petersen, Gleeson, 2011). В еще большей степени N-концевые участки С-пептида изменены у рыб, что связано как с вариативностью наиболее консервативного положения 3, в котором с одинаковой частотой встречаются остатки Glu и Asp, так и с отсутствием отрицательно заряженного остатка в положении 11. Такие структурные изменения должны неизбежно вести к ослаблению или отсутствию взаимодействия С-пептида рыб с молекулой инсулина, ослабляя способность последнего влиять на глюкозный гомеостаз. С этим согласуется тот факт, что инсулин у рыб сравнительно слабо влияет на уровень глюкозы, а функции регулятора гликемии в значительной степени выполняет инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), структурный гомолог проинсулина (Drakenberg et al., 1997; Polakof et al., 2010). Следует также отметить, что у рыб эволюция инсулинов и С-пептидов протекает независимо, что принципиально отличает эти полипептиды от таковых у млекопитающих, где имеются тесные ко-эволюционные взаимосвязи между N-концевым участком С-пептида и В-цепью молекулы инсулина (Wang et al., 2012; Landreh et al., 2014c).

Другим партнером С-пептида является островковый амилоидный полипептид (амилин), который секретируется  $\beta$ -клетками в соотношении 100 : 1 с инсулином и С-пептидом. Будучи синтезирован в  $\beta$ -клетках, амилин в секреторных гранулах взаимодействует с инсулином и образует с ним гетеродимерные комплексы, что было показано с помощью физико-химических методов, включая масс-спектрометрию. В том случае, когда взаимодействие с инсулином по каким-то причинам нарушается, молекулы амилина взаимодействуют между собой с образованием высокомолекулярных олигомерных комплексов и амилоид-подобных структур, что в конечном итоге приводит к гибели  $\beta$ -клеток и развитию СД 2-го типа (Nedumpully-Govindan, Ding, 2015). Следует отметить, что амилин не только циркулирует в периферическом кровотоке, но и проникает в мозг, структурно сходен с  $\beta$ -амилоидным пептидом и способен образовывать с ним гетеродимерные комплексы (Yan et al., 2014).

В 2014 г. было показано, что положительно заряженный амилин способен образовывать димерный комплекс с С-пептидом (Landreh et al., 2014a). Этот комплекс менее прочный, чем между амилином и инсулином, и легче диссоциирует. Различия в устойчивости комплексов связаны с различиями в механизмах их формирования. Ключевую роль в стабилизации комплекса амилина с С-пептидом играют сравнительно слабые гидрофобные взаимодействия, в то время как более сильные ионные взаимодействия в этом процессе не участвуют. Более того, замены высококонсервативных отрицательно заряженных остатков

глутаминовой кислоты на нейтральные аланины, снижающие отрицательный заряд С-пептида, парадоксальным образом повышали стабильность его комплекса с амилином (Landreh et al., 2014a). Показано также, что в системе инсулин—С-пептид—амилин могут образовываться гетеротримерные комплексы, включающие в себя все эти пептидные молекулы. Причина этого состоит в том, что молекулярные детерминанты, ответственные за формирование комплексов С-пептида и амилина с инсулином и комплекса между С-пептидом и амилином, различаются. Однако с учетом того, что равновесие сильно смещено в сторону комплексов С-пептид-инсулин и амилин-инсулин, доля таких гетеротримерных комплексов крайне низка и большого физиологического значения они, вероятно, не имеют.

Нельзя исключить, что С-пептид способен к образованию комплекса с  $\beta$ -амилоидным пептидом, поскольку последний взаимодействует с амилином и инсулином (Gladysz et al., 2015). Как известно, агрегация молекул  $\beta$ -амилоидного пептида ведет к формированию амилоидоподобных фибрилл в ЦНС, что является одной из первопричин болезни Альцгеймера. В этом отношении следует отметить, что лечение С-пептидом экспериментальных животных с СД 1-го типа, имеющих дефицит инсулина и С-пептида, приводит к улучшению у них когнитивных функций и предупреждает развитие нейродегенеративных заболеваний (Sima et al., 2001, 2009). Возможно, это обусловлено восполнением дефицита С-пептида и образованием его комплексов с  $\beta$ -амилоидным пептидом, что предотвращает образование амилоидных бляшек и препятствует развитию нейродегенеративных процессов в мозге.

### Идентификация рецептора С-пептида

Длительное время одним из наиболее острых вопросов в изучении молекулярных механизмов действия С-пептида была идентификация его рецептора. Высказывались предположения о том, что этот рецептор относится к суперсемейству сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR, G protein-coupled receptor), 7 раз пронизывающих плазматическую мембрану. Предполагалось также, что этот рецептор функционально сопряжен с G-белками ингибирующего типа ( $G_{i/o}$ -белками). Это предположение базировалось на том, что обработка коклюшным токсином (КТ), который инактивирует  $G_{i/o}$ -белки, подавляла стимулирующие эффекты полноразмерного С-пептида и его С-концевого пентапептида на активность  $Na^+/K^+$ -АТФазы, эндотелиальной NO-синтазы и митогенактивируемых протеинкиназ ERK1/2, являющихся мишенями их действия (Kitamura et al., 2001, 2003; Tsimaratos et al., 2003; Wallerath et al., 2003). Наряду с этим было показано, что С-пептид стимулирует активность фосфоинозитид-специфичной фосфолипазы  $C\beta$  (ФЛС $\beta$ ), повышает внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  и запускает кальцийзависимые сигнальные каскады (Wahren et al., 2012). Как известно, ФЛС $\beta$  стимулируется либо  $\beta\gamma$ -димером, который генерируется в основном из  $G_{i/o}$ -белков, либо  $\alpha_{q/11}$ -субъединицами G-белков q/11-семейства (Waldo et al., 2010). Поскольку  $G_{q/11}$ -белки нечувствительны к КТ, основными кандидатами для взаимодействия с рецептором С-пептида являются  $G_{i/o}$ -белки. Необходимо, однако, отметить, что С-пептид не влияет на активность фермента аденилатциклазы, которая ингибируется через



посредство сопряженных с  $G_{i/o}$ -белками рецепторов и является их основным внутриклеточным эффектором (Kitamura et al., 2002).

В середине 2013 г. с помощью нового подхода, основанного на использовании дедуктивного метода оценки соответствия молекул лиганда и рецептора (Deductive Ligand-Receptor Matching), удалось идентифицировать рецептор GPR146, который вовлечен в реализацию регуляторных эффектов С-пептида и относится к суперсемейству GPCR (Yosten et al., 2013). Получены доказательства того, что рецептор GPR146 с высокой вероятностью может рассматриваться как специфичный рецептор для С-пептида. Во-первых, он экспрессируется во всех известных типах и линиях клеток, которые чувствительны к С-пептиду, в том числе в культуре клеток КАТОШ. Во-вторых, выключение в клетках КАТОШ гена, кодирующего GPR146, полностью блокирует активацию С-пептидом экспрессии транскрипционного фактора *c-Fos*, являющегося одной из мишеней действия С-пептида. В-третьих, при действии С-пептида на клетки КАТОШ выявлены точечная колокализация GPR146 с С-пептидом в плазматической мембране, а также вызываемая С-пептидом интернализация молекул рецептора внутрь клетки (Yosten et al., 2013). Важно отметить, что все эти эффекты являются специфичными для С-пептида и не воспроизводятся при действии других гормональных агентов, включая инсулин и ИФР-1.

Рецептор GPR146 человека состоит из 333 АКО. Проведенный нами анализ первичной структуры GPR146 с помощью программы BLASTp ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) выявил умеренную его гомологию с хемокиновыми рецепторами CCR4, CCR6, CCR7, CXCR1 и CXCR4, рецепторами интерлейкина-8, бомбезина, тахикинина, соматостатина, ангиотензина-II, нейрокинина-2 и ряда других пептидных гормонов (степень идентичности от 20 до 24 %). Следует отметить, что большинство этих рецепторов функционально взаимодействует с  $G_{i/o}$ - и с  $G_{q/11}$ -белками.

Еще большее сходство было выявлено между рецептором GPR146 и эстрогеновым рецептором GPR30. При сравнении их первичных структур было обнаружено 26 % идентичных и 44 % эквивалентных АКО. Рецептор GPR30 локализован в плазматической мембране и специфично связывается с  $17\beta$ -эстрадиолом и его синтетическими аналогами. Парадоксально, но многие внутриклеточные мишени и физиологические эффекты С-пептида совпадают с таковыми рецептора GPR30. Так, связывание GPR30 с агонистом приводит к повышению внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , активации нерецепторной Src-тирозинкиназы, стимуляции Akt-киназы и каскада митогенактивируемых протеинкиназ (Langer et al., 2010). Этот рецептор вовлечен в реализацию кардиопротекторного и нейропротекторного эффектов эстрогенов, в процессы регуляции артериального давления вследствие стимуляции вазодилатации, а также в обеспечение глюкозного гомеостаза вследствие контроля секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы (Lindsey, Charpell, 2011).

Степень идентичности АКП рецептора GPR146 человека при его сравнении с соответствующими рецепторами макаки, суслика, крысы, кошки, утконоса и лягушки составляет 96, 77, 75, 74, 67 и 61 % (рис. 2). Эти значения близки таковым, полученным при сравнении молекул С-пептида, выделенных из тех же организмов, что может свидетельствовать в пользу коэволюции молекул С-пеп-

тида и GPR146. Наиболее высокая степень гомологии наблюдается в области третьего и четвертого ТМ и соединяющей их второй цитоплазматической петли (ЦП) рецептора. Так, во второй ЦП исследованных GPR146 идентичными являются 13 АКО из 20. В то же время в N-концевом сегменте второй ЦП отсутствует DRY-мотив, который высококонсервативен в большинстве GPCR и отвечает за агонистиндуцированную активацию G-белков. Во второй и третьей ЦП также отсутствуют BBXXB-мотивы, где В — положительно заряженный АКО (Arg, Lys или His). Такие мотивы вовлечены во взаимодействие GPCR с G-белками (Шпаков, 2002; Shpakov, 2010). Несмотря на это, как и в большинстве других GPCR, цитоплазматические участки GPR146 обогащены положительно заряженными АКО. Во второй и третьей ЦП локализовано 12 таких остатков, 9 из которых — остатки аргинина, каждый с зарядом +1.8. В проксимальном к мембране участке С-концевого домена (15 АКО) расположены четыре положительно заряженных АКО. Следует, однако, отметить, что положительный заряд второй и третьей ЦП частично нейтрализован расположенными в них семью отрицательно заряженными АКО. Анализ распределения заряженных АКО в ЦП рецептора GPR146 указывает на низкую вероятность его сопряжения с  $G_s$ -белками, поскольку в С-концевом сегменте третьей ЦП отсутствует типичный для  $G_s$ -сопряженных рецепторов BBXXB-мотив (Шпаков, 2003). Значительно большее сходство в распределении положительно и отрицательно заряженных АКО наблюдается при сравнении с  $G_{q/11}$ - и  $G_{i/o}$ -сопряженными рецепторами, что согласуется с данными о возможном участии  $G_{q/11}$ - и  $G_{i/o}$ -белков в регуляторных эффектах С-пептида.

### Внутриклеточные сигнальные каскады, регулируемые С-пептидом

Последние достижения в области изучения внутриклеточных сигнальных каскадов, регулируемых С-пептидом, особенно на фоне значительного прогресса в установлении структурно-функциональной организации молекулы С-пептида и идентификации его рецептора, являются более скромными, но несколько исследований здесь необходимо отметить. Они связаны с изучением регуляторных эффектов С-пептида на цАМФ-зависимые сигнальные каскады клетки, а также с расшифровкой механизмов действия С-пептида на продукцию АТФ эритроцитами в условиях снижения уровня кислорода (Ghorbani et al., 2013; Richards et al., 2014a, 2014b; Xu et al., 2015).

Показано, что обработка С-пептидом приводит к повышению активности протеинкиназы А в почечных клубочках крыс линии Goto-Kakizaki с СД 2-го типа, снижает в них синтез фибронектина и предотвращает развитие гломерулосклероза и структурных нарушений подоцитов — эпителиальных клеток, покрывающих капилляры клубочков (Xu et al., 2015). Следует отметить, что у диабетических крыс снижен уровень С-пептида в крови, причем степень этого снижения положительно коррелирует с тяжестью диабетической нефропатии. С использованием культуры мезангиальных клеток, изолированных из почек диабетических животных, было показано, что ингибирующее влияние С-пептида на синтез фибронектина предотвращается добавлением Н-89, специфического ингибитора протеинкиназы А, что указывает на вовлечен-

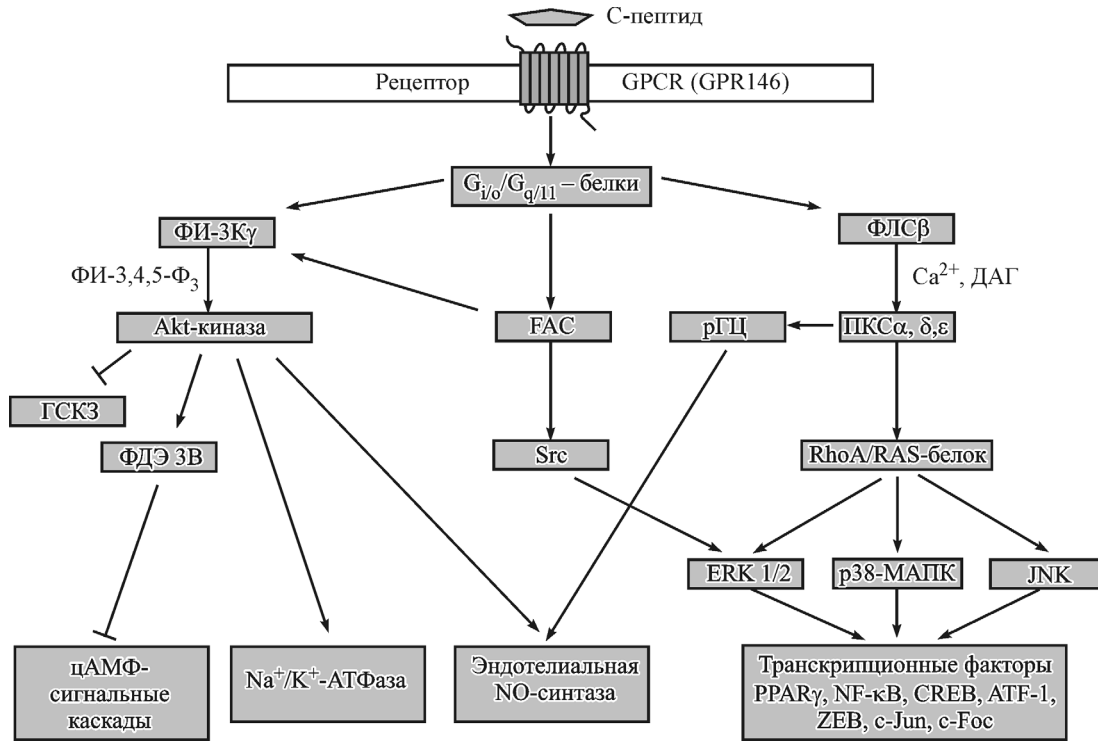


Рис. 3. Внутриклеточные сигнальные каскады, регулируемые С-пептидом.

ФИ-3-К $\gamma$  — фосфатидилинозитол-3-киназа- $\gamma$ , ФИ-3,4,5-Ф $_3$  — фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, ГСК3 — киназа-3 гликогенсинтазы ФДЭ 3В — фосфодиэстераза 3В, FAK — киназа фокальных контактов (focal adhesion kinase), Src — нерецепторная тирозинкиназа, PLC $\beta$  — фосфолипаза С $\beta$ , DAG — диацилглицерин, PKC $\alpha, \delta, \epsilon$  —  $\alpha$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -изоформы протеинкиназы С, рГЦ — растворимая гуанилатциклаза. RhoA — малый G-белок, гомологичный Ras-белкам ERK1/2 — киназа, регулируемая внеклеточным сигналом, p38-МАПК — митогенактивируемая протеинкиназа p38, JNK — c-Jun-NH $_2$ -концевая протеинкиназа.

ность этого фермента в нефропротекторный эффект С-пептида (Xu et al., 2015).

Другие исследователи показали, что С-пептид подавляет липолиз, вызванный изопротеренолом, агонистом  $\beta$ -адренергических рецепторов, в культуре адипоцитов, выделенных из жировой клетчатки крыс с СД 1-го типа, причем эффект С-пептида усиливался в присутствии инсулина (Ghorbani et al., 2013). При изучении молекулярных механизмов антилиполитического действия С-пептида было установлено, что в его основе лежит стимулирующее влияние С-пептида на активность цГМФ-ингибируемой цАМФ-фосфодиэстеразы 3В, что приводит к снижению уровня цАМФ, повышенного после обработки адипоцитов изопротеренолом. Преинкубация клеток с цилостамидом, ингибитором фосфодиэстеразы 3В, полностью подавляла антилиполитический эффект С-пептида. Полученные данные указывают на то, что С-пептид может быть включен в список гормональных агентов, которые обладают антилиполитическим действием, регулируя уровень цАМФ в адипоцитах, и контролируют, таким образом, липидный обмен (Ghorbani, Shafiee-Nick, 2015).

Большой интерес представляет цикл работ по установлению молекулярных механизмов действия С-пептида на эритроциты. Ранее было установлено, что в условиях СД 1-го типа С-пептид способствует физиологическим изменениям формы эритроцитов и повышает вазодилатацию, активируя NO-синтазные сигнальные пути в эндотелиальных клетках сосудов, что лежит в основе восстановления микроциркуляции крови и предупреждает развитие нефропатии, нейропатии и других осложнений СД (Luppi

et al., 2013; Wahren, Larsson, 2015). При этом С-пептид действует на эритроциты и на клетки эндотелия сосудов только в условиях его дефицита, в то время как в условиях нормального и повышенного уровня С-пептида его вазодилаторный эффект выражен слабо или вовсе отсутствует. Предполагается, что в физиологических и в более высоких концентрациях С-пептид полностью насыщает специфичные к нему рецепторы на поверхности эритроцитов, и добавление экзогенного С-пептида уже не способно вызвать их дополнительную активацию. В этой связи необходимо отметить, что в 2014 г. в эритроцитах были идентифицированы рецепторы GPCR146, которые, как отмечалось выше, специфичны для С-пептида (Richards et al., 2014b).

Проведенные недавно исследования показали, что действие С-пептида на эритроциты не ограничивается контролем их формы вследствие активации эритроцитарной Na $^+$ /K $^+$ -АТФазы. Обнаружено, что С-пептид усиливает секрецию АТФ эритроцитами в ответ на снижение уровня кислорода в крови, что ведет к активации аденозиновых рецепторов на эндотелиальных клетках, вызывает локальную вазодилатацию и усиливает проникновение эритроцитов в микрососуды скелетных мышц и других тканей, предотвращая, таким образом, их гипоксию (Richards et al., 2013, 2014b). Этот эффект был продемонстрирован на эритроцитах, выделенных из крови пациентов с СД 2-го типа, характерной особенностью которых является резкое снижение способности продуцировать АТФ при недостатке кислорода (Richards et al., 2013). Наиболее эффективным оказалось совместное применение физиологических концентраций С-пептида и инсулина в со-

отношении 1 : 1. Важно отметить, что при СД 2-го типа, как и в случае СД 1-го типа, наблюдается дефицит функционально активного С-пептида, что снижает насыщенность его рецепторов на эритроцитах. С этим согласуется тот факт, что у здоровых людей С-пептид и инсулин существенно не влияют на продукцию АТФ эритроцитами в условиях снижения уровня кислорода (Richards et al., 2014b). Свое влияние на продукцию АТФ эритроцитами С-пептид оказывает через сигнальный каскад, включающий в себя протеинкиназу С и цитозольные формы гуанилатциклазы, которые катализируют образование цГМФ. В этой связи необходимо отметить, что ингибиторы цГМФ-зависимой фосфодиэстеразы 5-го типа усиливали стимулирующее действие С-пептида на эритроциты, а в отсутствие С-пептида частично мимикрировали его эффект. На основании полученных данных авторами был сделан вывод о том, что применение С-пептида при СД является одним из многообещающих путей для улучшения микроциркуляции и предотвращения развития гипоксии в тканях (Richards et al., 2014a).

В связи с вышесказанным схема сигнальных каскадов, регулируемых С-пептидом, в последние годы претерпела существенные изменения (рис. 3). В ней появились специфичный для С-пептида рецептор GPR146, а также цАМФ- и цГМФ-зависимые сигнальные каскады. Среди других сигнальных каскадов, контролируемых С-пептидом, необходимо отметить: 1) 3-фосфоинозитидный путь, который включает в себя фосфатидилинозитол-3-киназу, катализирующую синтез фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата, протеинкиназу В (Акт-киназу) и нижележащие ферменты и транскрипционные факторы; 2) фосфолипазный путь, включающий в себя ФЛС Сβ, активация которой приводит к продукции диацилглицерина и повышению концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, что в свою очередь вызывает стимуляцию различных изоформ протеинкиназы С, митогенактивируемых протеинкиназ, эндотелиальной NO-синтазы и Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы; 3) тирозинкиназный путь, который включает в себя последовательную активацию киназы фокальных контактов FAK, нерецепторной тирозинкиназы Src и митогенактивируемых протеинкиназ ERK1/2 (рис. 3).

## Заключение

Недавние открытия в области изучения молекулярных механизмов действия С-пептида и структурно-функциональной организации его молекулы позволили приоткрыть завесу таинственности над этим важнейшим эндогенным регулятором биохимических и физиологических функций. Результатом этих открытий, а также установление новых взаимосвязей — как структурных, так и функциональных — между С-пептидом и инсулином дали реальные шансы вплотную подойти к разработке эффективных лекарственных препаратов на основе С-пептида. Такие препараты могут быть применены для лечения многих осложнений СД, поскольку дефицит С-инсулина и нарушение его сигнальных каскадов в условиях этого заболевания приводят к широкому спектру дисфункций, охватывающих выделительную, сердечно-сосудистую, нервную, эндокринную и другие системы организма (Bhatt et al., 2014; Yosten et al., 2014; Wahren, Larsson, 2015). При этом изменения функций С-пептида выявлены и у пациентов с недиабетической патологией, у которых диагностированы атеросклеротические изменения в

сосудах, сердечно-сосудистые заболевания и нефропатия (Shaw et al., 2014; Cabrera de León et al., 2015; Li et al., 2015). Учитывая высокую стоимость С-пептида и его сравнительно быструю деградацию в кровяном русле, большие ожидания связывают с разработкой коротких пептидов, соответствующих его С-концевому сегменту, а также низкомолекулярных агонистов рецептора С-пептида непептидной природы. Однако для этого необходимы дальнейшие исследования структурно-функциональной организации рецепторов, с которыми специфично связывается С-пептид, в первую очередь недавно открытого рецептора GPR146.

Работа поддержана грантом С.-Петербургского государственного университета № 12.38.220.2015.

## Список литературы

- Шпаков А. О. 2002. Молекулярные детерминанты в рецепторах серпантинного типа, ответственные за их функциональное сопряжение с гетеротримерными G-белками. Цитология. 44 (3) : 242—258. (Shpakov A. O. 2012. The molecular determinants in the serpentine type receptors, responsible for its functional coupling with the heterotrimeric G-protein. Tsitologiya. 44 (3) : 242—258.)
- Шпаков А. О. 2003. Участие заряженных аминокислотных остатков цитоплазматических петель рецепторов серпантинного типа в процессе передачи гормонального сигнала. Журн. эволюц. биохим. физиол. 39 (3) : 205—217. (Shpakov A. O. 2003. Participation of charged amino acid residues of cytoplasmic loops of serpentine type receptors in the process of transmission of hormonal signal. J. Evol. Biochem. Physiol. 39 (3) : 266—280.)
- Шпаков А. О., Гранстрем О. К. 2013a. С-пептид: структура, функции и молекулярные механизмы действия. Цитология. 55 (1) : 16—27. (Shpakov A. O., Granstrem O. K. 2013. C-peptide structure, functions and molecular mechanisms of action. Tsitologiya. 55 (1) : 16—27.)
- Шпаков А. О., Гранстрем О. К. 2013b. Физиологические эффекты С-пептида. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 99 (2) : 196—211. (Shpakov A. O., Granstrem O. K. 2013. C-peptide physiological effects. Ross. Fiziol. Zh. Im. I. M. Sechenova. 99 (2) : 196—211.)
- Bhatt M. P., Lim Y. C., Ha K. S. 2014. C-peptide replacement therapy as an emerging strategy for preventing diabetic vasculopathy. Cardiovasc. Res. 104 : 234—244.
- Brange J., Andersen L., Laursen E. D., Meyn G., Rasmussen E. 1997. Toward understanding insulin fibrillation. J. Pharm. Sci. 86 : 517—525.
- Cabrera de León A., Oliva Garcia J. G., Marcelino Rodríguez I., Almeida González D., Alemán Sánchez J. J., Brito Díaz B., Dominguez Coello S., Bertomeu Martínez V., Aguirre Jaime A., Rodríguez Pérez M. D. 2015. C-peptide as a risk factor of coronary artery disease in the general population. Diab. Vasc. Dis. Res. pii: 1479164114564900.
- Chen L. M., Yang X. W., Tang J. G. 2002. Acidic residues on the N-terminus of proinsulin C-peptide are important for the folding of insulin precursor. J. Biochem. 131 : 855—859.
- Drakenberg K., Carey G., Mather P., Anderson A., Sara V. R. 1997. Characterization of an insulin-like growth factor (IGF) receptor and the insulin-like effects of IGF-1 in the bony fish, *Lates calcarifer*. Regul. Pept. 69 : 41—45.
- Dunn M. F. 2005. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer — a review. Biometals. 18 : 295—303.
- Dupont J., Tesseraud S., Simon J. 2009. Insulin signaling in chicken liver and muscle. Gen. Comp. Endocrinol. 163 : 52—57.
- Ghorbani A., Omrani G. R., Hadjzadeh M. A., Varedi M. 2013. Proinsulin C-peptide inhibits lipolysis in diabetic rat adipose tissue



- through phosphodiesterase-3B enzyme. *Horm. Metab. Res.* 45 : 221—225.
- Ghorbani A., Shafiqe-Nick R. 2015. Pathological consequences of C-peptide deficiency in insulin-dependent diabetes mellitus. *World J. Diabetes.* 6 : 145—150.
- Gladysz A., Lugovoy E., Charvat A., Häupl T., Siefermann K. R., Abel B. 2015. Intermediates caught in the act: tracing insulin amyloid fibril formation in time by combined optical spectroscopy, light scattering, mass spectrometry and microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 : 918—927.
- Hach T., Forst T., Kunt T., Ekberg K., Pfützner A., Wahren J. 2008. C-peptide and its C-terminal fragments improve erythrocyte deformability in type 1 diabetes patients. *Exp. Diabetes Res.* 2008 : 730594.
- Henriksson M., Nordling E., Melles E., Shafiqat J., Ståhlberg M., Ekberg K., Persson B., Bergman T., Wahren J., Johansson J., Jörnvall H. 2005. Separate functional features of proinsulin C-peptide. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 : 1772—1778.
- Huang K., Dong J., Phillips N. B., Carey P. R., Weiss M. A. 2005. Proinsulin is refractory to protein fibrillation: topological protection of a precursor protein from cross-beta assembly. *J. Biol. Chem.* 280 : 42 345—42 355.
- Jornvall H., Lindahl E., Astorga-Wells J., Lind J., Holmlund A., Melles E., Alvelius G., Nerelius C., Mäler L., Johansson J. 2010. Oligomerization and insulin interactions of proinsulin C-peptide: threefold relationships to properties of insulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 : 1561—1566.
- Keltner Z., Meyer J. A., Johnson E. M., Palumbo A. M., Spence D. M., Reid G. E. 2010. Mass spectrometric characterization and activity of zinc-activated proinsulin C-peptide and C-peptide mutants. *Analyst.* 135 : 278—288.
- Kitamura T., Kimura K., Jung B. D., Makondo K., Okamoto S., Cañas X., Sakane N., Yoshida T., Saito M. 2001. Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein. *Biochem. J.* 355 : 123—129.
- Kitamura T., Kimura K., Jung B. D., Makondo K., Sakane N., Yoshida T., Saito M. 2002. Proinsulin C-peptide activates cAMP response element-binding proteins through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in mouse lung capillary endothelial cells. *Biochem. J.* 366 : 737—744.
- Kitamura T., Kimura K., Makondo K., Furuya D. T., Suzuki M., Yoshida T., Saito M. 2003. Proinsulin C-peptide increases nitric oxide production by enhancing mitogen-activated protein-kinase-dependent transcription of endothelial nitric oxide synthase in aortic endothelial cells of Wistar rats. *Diabetologia.* 46 : 1698—1705.
- Kubota M., Sato Y., Khookhor O., Ekberg K., Chibalin A. V., Wahren J. 2014. Enhanced insulin action following subcutaneous co-administration of insulin and C-peptide in rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 30 : 124—131.
- Landreh M., Alvelius G., Johansson J., Jörnvall H. 2014a. Insulin, islet amyloid polypeptide and C-peptide interactions evaluated by mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 : 178—184.
- Landreh M., Alvelius G., Willander H., Stukenborg J. B., Söder O., Johansson J., Jörnvall H. 2012. Insulin solubility transitions by pH-dependent interactions with proinsulin C-peptide. *FEBS J.* 279 : 4589—4597.
- Landreh M., Johansson J., Jörnvall H. 2013. C-peptide: a molecule balancing insulin states in secretion and diabetes-associated depository conditions. *Horm. Metab. Res.* 45 : 769—773.
- Landreh M., Johansson J., Wahren J., Jörnvall H. 2014b. The structure, molecular interactions and bioactivities of proinsulin C-peptide correlate with a tripartite molecule. *Biomol. Concepts.* 5 : 109—118.
- Landreh M., Jörnvall H. 2015. C-peptide evolution: generation from few structural restrictions of bioactivities not necessarily functional. *FEBS Lett.* 589 : 415—418.
- Landreh M., Ostberg L. J., Jörnvall H. 2014c. A subdivided molecular architecture with separate features and stepwise emergence among proinsulin C-peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450 : 1433—1438.
- Langer G., Bader B., Meoli L., Isensee J., Delbeck M., Noppinger P. R., Otto C. 2010. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids.* 75 : 603—610.
- Li Y., Li Y., Meng L., Zheng L. 2015. Association between serum C-peptide as a risk factor for cardiovascular disease and high-density lipoprotein cholesterol levels in nondiabetic individuals. *PLoS ONE.* 10 : e112281.
- Lindsey S. H., Chappell M. C. 2011. Evidence that the G protein-coupled membrane receptor GPR30 contributes to the cardiovascular actions of estrogen. *Gend. Med.* 8 : 343—354.
- Luppi P., Kallas Å., Wahren J. 2013. Can C-peptide mediated anti-inflammatory effects retard the development of microvascular complications of type 1 diabetes? *Diabetes Metab. Res. Rev.* 29 : 357—362.
- Min C. Y., Qiao Z. S., Feng Y. M. 2004. Unfolding of human proinsulin. Intermediates and possible role of its C-peptide in folding/unfolding. *Eur. J. Biochem.* 271 : 1737—1747.
- Munte C. E., Vilela L., Kalbitzer H. R., Garratt R. C. 2005. Solution structure of human proinsulin C-peptide. *FEBS J.* 272 : 4284—4293.
- Nedumpully-Govindan P., Ding F. 2015. Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration. *Sci. Rep.* 5 : 8240.
- Nerelius C., Alvelius G., Jörnvall H. 2010. N-terminal segment of proinsulin C-peptide active in insulin interaction/desaggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403 : 462—467.
- Nordquist L., Moe E., Sjöquist M. 2007. The C-peptide fragment EVARQ reduces glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 23 : 400—405.
- Ohtomo Y., Bergman T., Johansson B. L., Jörnvall H., Wahren J. 1998. Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity of renal tubule segments. *Diabetologia.* 41 : 287—291.
- Petersen A. M., Gleeson T. T. 2011. Acclimation temperature affects the metabolic response of amphibian skeletal muscle to insulin. *Comp. Biochem. Physiol.* 160 : 72—80.
- Polakof S., Skiba-Cassy S., Choubert G., Panserat S. 2010. Insulin-induced hypoglycaemia is co-ordinately regulated by liver and muscle during acute and chronic insulin stimulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 213 : 1443—1452.
- Pramanik A., Ekberg K., Zhong Z., Shafiqat J., Henriksson M., Jansson O., Tibell A., Tally M., Wahren J., Jörnvall H., Rigler R., Johansson J. 2001. C-peptide binding to human cell membranes: importance of Glu<sup>27</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 : 94—98.
- Richards J. P., Bowles E. A., Gordon W. R., Ellsworth M. L., Stephenson A. H., Sprague R. S. 2014a. Mechanisms of C-peptide-mediated rescue of low O<sub>2</sub>-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes. *Amer. J. Physiol. ajpregu.00420.2014.* doi: 10.1152/ajpregu.00420.2014.
- Richards J. P., Stephenson A. H., Ellsworth M. L., Sprague R. S. 2013. Synergistic effects of C-peptide and insulin on low O<sub>2</sub>-induced ATP release from human erythrocytes. *Amer. J. Physiol.* 305 : R1331—R1336.
- Richards J. P., Yosten G. L., Kolar G. R., Jones C. W., Stephenson A. H., Ellsworth M. L., Sprague R. S. 2014b. Low O<sub>2</sub>-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes is restored by physiological ratios of C-peptide and insulin. *Amer. J. Physiol.* 307 : R862—R868.
- Shafiqat J., Melles E., Sigmundsson K., Johansson B. L., Ekberg K., Alvelius G., Henriksson M., Johansson J., Wahren J., Jörnvall H. 2006. Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 : 1805—1811.
- Shaw J., Shetty P., Burns K., Knoll G. 2014. The therapeutic potential of C-peptide in kidney disease: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *Syst. Rev.* 3 : 43. doi: 10.1186/2046-4053-3-43.
- Shpakov A. O. 2010. Natural and synthetic cationic peptides as regulators of hormone-sensitive signaling systems and molecular

mechanisms of their action. *Curr. Top. Pept. Protein Res.* 11 : 1—30.

Sima A. A., Zhang W., Kreipke C. W., Rafols J. A., Hofman W. H. 2009. Inflammation in diabetic encephalopathy is prevented by C-peptide. *Rev. Diabet. Stud.* 6 : 37—42.

Sima A. A., Zhang W., Sugimoto K., Henry D., Li Z., Wahren J., Grunberger G. 2001. C-peptide prevents and improves chronic Type I diabetic polyneuropathy in the BB/Wor rat. *Diabetologia.* 44 : 889—897.

Steiner D. F., Bell G. I., Rubenstein A. H. 2006. Chemistry and biosynthesis of the islet hormones. In: *Endocrinology* (eds DeGroot L., Jameson J. L.). Philadelphia: Elsevier. 925—960.

Tsimaratos M., Roger F., Chabardès D., Mordasini D., Hasler U., Doucet A., Martin P. Y., Féraïlle E. 2003. C-peptide stimulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity via PKC $\alpha$  in rat medullary thick ascending limb. *Diabetologia.* 46 : 124—131.

Unnerstale S., Mäler L. 2012. pH-dependent interaction between C-peptide and phospholipid bicelles. *J. Biophys.* 2012 : 185907.

Wahren J., Kallas A., Sima A. A. 2012. The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes.* 61 : 761—772.

Wahren J., Larsson C. 2015. C-peptide: new findings and therapeutic possibilities. *Diabetes Res. Clin. Pract.* pii: S0168-8227-(15)00024-8.

Waldo G. L., Ricks T. K., Hicks S. N., Cheever M. L., Kawano T., Tsuboi K., Wang X., Montell C., Kozasa T., Sondek J., Harden T. K. 2010. Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C- $\beta$  and G<sub>q</sub> signaling complex. *Science.* 330 : 974—980.

Wallerath T., Kunt T., Forst T., Closs E. I., Lehmann R., Flohr T., Gabriel M., Schäfer D., Göpfert A., Pfützner A., Beyer J., Förstermann U. 2003. Stimulation of endothelial nitric oxide synthase by proinsulin C-peptide. *Nitric Oxide.* 9 : 95—102.

Wang S., Wei W., Zheng Y., Hou J., Dou Y., Zhang S., Luo X., Cai X. 2012. The role of insulin C-peptide in the coevolution analyses of the insulin signaling pathway: a hint for its functions. *PLoS ONE.* 7 : e52847.

Xu S., Jiang Y., Wang H., Wang Z., Liu H., Peng L., Fang Q., Deng T., You J., Zhou X., Zhang W., Lou J. 2015. C-peptide ameliorates renal injury in type 2 diabetic rats through protein kinase A-mediated inhibition of fibronectin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* pii: S0006-291X(15)00239-9.

Yan L. M., Velkova A., Kapurniotu A. 2014. Molecular characterization of the hetero-assembly of  $\beta$ -amyloid peptide with islet amyloid polypeptide. *Curr. Pharm. Des.* 20 : 1182—1191.

Yang Y., Hua Q. X., Liu J., Shimizu E. H., Choquette M. H., Mackin R. B., Weiss M. A. 2010. Solution structure of proinsulin: connecting domain flexibility and prohormone processing. *J. Biol. Chem.* 285 : 7847—7851.

Yosten G. L., Kolar G. R., Redlinger L. J., Samson W. K. 2013. Evidence for an interaction between proinsulin C-peptide and GPR146. *J. Endocrinol.* 218 : B1—B8.

Yosten G. L., Maric-Bilkan C., Luppi P., Wahren J. 2014. Physiological effects and therapeutic potential of proinsulin C-peptide. *Amer. J. Physiol.* 307 : E955—E968.

Поступила 17 III 2015

#### NEW ACHIEVEMENTS IN THE STUDY OF THE MECHANISMS AND TARGETS OF ACTION OF PROINSULIN C-PEPTIDE

A. O. Shpakov

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223,  
and St. Petersburg State University, 199034;  
E-mail: alex\_shpakov@list.ru

The C-peptide, product of proinsulin proteolysis, is a chaperone for insulin during its storage in the transport vesicles of pancreatic  $\beta$ -cells and further after its secretion into the bloodstream. Along with this, C-peptide functions as endogenous regulator of a number of the intracellular effector proteins, including phospholipase C $\beta$ , phosphatidylinositol 3-kinase, mitogen-activated protein kinases, non-receptor tyrosine kinases, and controls cAMP- and cGMP-dependent cascades. Recently, the specific receptor GPR146 for C-peptide, which belongs to the superfamily of G protein-coupled receptors, has been identified. The decrease in the C-peptide level and the activity of its signaling cascades in diabetes mellitus lead to a wide range of complications of this disease including diabetic nephropathy, cardiomyopathy, angiopathy, and neuropathy. The changes in C-peptide functions has been found in non-diabetic patients with cardiovascular system disorders and renal failure. This review is devoted to the most significant events in the exploration of structural and functional organization of the C-peptide molecule, the identification of its receptor, the study of the molecular mechanisms of its action on cells that have taken place over the last few years. This review focuses on the most significant events recent years in the study of structural-functional organization of C-peptide and the molecular mechanisms of its action on the cell.

**Key words:** C-peptide, insulin, diabetes mellitus, receptor GPR146, phospholipase C, GTP-binding protein.