

Изучение механизмов активации рецептора инсулина (IR) с использованием мутантных форм рецептора

Гавриленкова А.А.^{1, 2*}, Деев И.Е.², Бочаров Э.В.^{1, 2}, Серова О.В.²

¹ *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия*

² *Институт биорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

* *gavrilenkova.aa@phystech.edu*

Ключевые слова: тирозинкиназа; рецептор инсулина; трансмембранный домен; мутации

Мотивация и цель: Рецепторные тирозинкиназы (РТК) – очень важное звено при передаче сигнального каскада внутрь клетки. Они играют ключевую роль в развитии, дифференцировке, пролиферации и миграции клеток. РТК состоят из трех частей: внеклеточная часть, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранный (ТМ) домен и внутриклеточная часть, которая отвечает за дальнейшее фосфорилирование субстратов [1]. Семейство рецептора инсулина относится к РТК, и на данный момент точные механизмы их конформационных изменений при активации до сих пор выясняются. Предполагается, что в неактивном состоянии SS-связанного димера рецептора инсулина ТМ-домены находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда конформация димера рецептора меняется, внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ [2].

Методы и алгоритмы: Для изучения механизмов активации рецептора инсулина (IR) нами были получены мутантные формы рецептора, содержащие двойные и одиночные замены в ТМ-домене. Клетки НЕК293 трансфицировали плазмидными конструкциями, кодирующими мутантные формы IR с заменами: I951E-F952R, F956E-S957R, I960E-G961R, I951E и F952R. Далее клетки инкубировали в среде F12 с добавлением инсулина. Клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к общей и фосфорилированной форме IR.

Результаты: Мутации F956E-S957R и I960E-G961R не влияли на характер активации рецептора, в то время как замены I951E-F952R, I951E и F952R приводили к фосфорилированию рецептора в отсутствие лиганда, в отличие от рецептора дикого типа, который фосфорилируется только в присутствии инсулина. Мы предполагаем, что данные замены приводят к стабилизации димера рецептора в активном состоянии. Нами было установлено, что автофосфорилирование рецептора IR с заменами I951E-F952R, I951E и F952R в отсутствие инсулина приводит к активации внутриклеточных сигнальных белков IRS-1 и ERK. Это свидетельствует о том, что данные замены в трансмембранном домене IR, вероятно, приводят к образованию функционально активного димера рецептора в отсутствие лиганда.

Выводы: Нами показано, что ТМ-домен играет важную роль в активации рецептора инсулина. Даже точечные замены в его аминокислотной последовательности могут приводить к получению функционально активных

форм рецептора, предположительно, за счет образования водородных связей и солевых мостиков между ТМ-доменами внутри липидного бислоя.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 23-74-00024).

Study of the mechanisms of activation of the insulin receptor (IR) using mutant forms of the receptor

Gavrilenkova A.A.^{1, 2*}, Deyv I.E.², Bocharov E.V.^{1, 2}, Serova O.V.²

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

² *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia*

* *gavrilenkova.aa@phystech.edu*

Key words: tyrosine kinase; insulin receptor; transmembrane domain; mutations

Motivation and Aim: Receptor tyrosine kinases (RTKs) are a very important link in the transduction of the signaling cascade into the cell, they play a key role in the development, differentiation, proliferation and migration of cells. RTKs consist of 3 parts: the extracellular part, which is responsible for ligand binding, the transmembrane (TM) domain, and the intracellular part, which is responsible for further phosphorylation of substrates [1]. The insulin receptor (IR) family belongs to RTKs, and at the moment the exact mechanisms of their conformational changes during activation are still being investigated. It is assumed that in the inactive state of the TM-domains of the SS-bonded IR dimer are in a conformation that prevents the interaction of cytoplasmic parts of the receptor. Upon ligand binding, the conformation of the receptor dimer changes, intracellular tyrosine kinase domains converge and phosphorylate each other, causing a cellular response [2].

Methods and Algorithms: To study the mechanisms of the IR activation, we obtained mutant forms of the receptor containing double and single substitutions in its TM-domain. HEK293 cells were transfected with plasmid constructs encoding mutant forms of IR with the substitutions: I951E-F952R, F956E-S957R, I960E-G961R, I951E and F952R. Next, the cells were incubated in F12 medium with the addition of insulin. The cell lysates were analyzed by the Western blot method with antibodies to the total and phosphorylated forms of IR.

Results: As a result, mutations F956E-S957R and I960E-G961R did not affect the fashion of the receptor activation. Substitutions I951E-F952R, I951E and F952R resulted in phosphorylation of the receptor in the absence of a ligand, unlike the wild-type receptor, which is phosphorylated only in the presence of insulin. We assume that these substitutions lead to stabilization of the receptor dimer in the active state. We found that autophosphorylation of IR with substitutions I951E-F952R, I951E and F952R in the absence of insulin leads to activation of intracellular signaling proteins IRS-1 and ERK. This indicates that these substitutions in the IR TM-domain probably lead to the formation of a functionally active receptor dimer in the absence of a ligand.

Conclusion: We have shown that the TM-domain plays an important role in the activation of IR, and even point substitutions in its amino acid sequence can lead to the production of the functionally active forms of the receptor, presumably due to the formation of hydrogen bonds and salt bridges between the TM-domains within the lipid bilayer.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation grant (No. 23-74-00024)

Список литературы/References

1. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-1134. doi 10.1016/j.cell.2010.06.011
2. Kuznetsov A.S., Zamaletdinov M.F., Bershatsky Y.V., Urban A.S., Bocharova O.V., Bennasroune A., Maurice P., Bocharov E.V., Efremov R.G. Dimeric states of transmembrane domains of insulin and IGF-1R receptors: Structures and possible role in activation. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020;1862(11):183417. doi 10.1016/j.bbamem.2020.183417