

Der Insulinrezeptor in Aktion – wie Insulin seinen Rezeptor aktiviert

Theresia Gutmann^{1,2}

¹Paul-Langerhans-Institut des Helmholtz-Zentrums München am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, Dresden

²Deutsches Zentrum für Diabetesforschung e.V. (DZD), Neuherberg

English Abstract

A fundamental question in signal transduction remains how the insulin receptor transmits signals upon ligand binding across the membrane. The overall architecture of the intact insulin receptor and its mode of activation have been controversially debated. Using a reconstitution approach, we were able to visualize the membrane-embedded full-length insulin receptors by electron microscopy demonstrating its activation mechanism.

Haupttext

Die Regulation von Homöostase und Wachstum hängen im Wesentlichen davon ab, dass Zellen mit ihrer Umwelt kommunizieren. So muss das Peptidhormon Insulin an seinen in der Zellmembran verankerten Rezeptor andocken, um beispielsweise eine effiziente Zuckeraufnahme aus dem Blut zu bewirken. Noch in den 1970er Jahren wurde hitzig debattiert, ob der Insulinrezeptor lediglich als eine Art Trägerprotein dem Transport von Insulin ins Zellinnere dient. Heute wissen wir, dass dieser eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) ist und das Signal selbst aktiv weiterleitet (Abb. 1). Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne (auch: Ektodomäne) führt also zu einer Erhöhung der Tyrosinkinaseaktivität der intrazellulären Domänen und setzt eine Kaskade von Phosphorylierungen und damit die Signaltransduktion in Gang. Wie genau aber das Signal der Ligandenbindung strukturell durch die Zellmembran übermittelt wird und zur Rezeptoraktivierung führt, blieb weitestgehend unverstanden. In einem synthetischen Bottom-up-Ansatz konnten wir erstmalig die Aktivierung von Insulinrezeptoren direkt beobachten und damit wichtige Einblicke in deren Funktionsweise liefern [1].

Transmembran-Signalweiterleitung durch den Insulinrezeptor

Für die meisten RTKs wurden verschiedene Mechanismen basierend auf ligandeninduzierter Dimerisierung beschrieben, welche zu einer Annäherung der Monomere führt, sodass die intrazellulären Kinasen zueinander kommen und sich dann gegenseitig phosphorylieren. Im Gegensatz zu den meisten anderen RTKs ist der Insulinrezeptor jedoch ein kovalentes Dimer, sodass dessen Regulation *per se* nicht auf Dimerisierung beruhen kann. Es drängt sich damit die

Frage auf, wie in einem solchen konstitutiven Dimer eine aberrante Aktivierung in Abwesenheit eines Liganden überhaupt verhindert wird. Insulinbindung an der Ektodomäne muss zu einer Konformationsänderung führen, welche durch die Membran ins Zellinnere übermittelt wird und somit zur Aktivierung bzw. Aufhebung der autoinhibitorischen Konformationen führt. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Konformations- oder allosterischen Kopplung der Domänen (aktuell kritisch diskutiert in [2]). Bemühungen in den 1990er Jahren, einen vollständigen Insulinrezeptor in Detergenz- oder Lipidumgebungen mittels Elektronenmikroskopie (EM) darzustellen, zeigten hochvariable T- und Y-ähnliche Strukturen, welche jedoch keine messbaren Konformationsänderungen nach Insulinzugabe zeigten [3]. Mangels sichtbarer Konformationsänderungen und aufgrund der Inkompatibilität mit späteren Kristallstrukturen der Ektodomäne verschwanden diese EM-Studien aus dem wissenschaftlichen Diskurs [4]. Das Ausmaß und die Art der Konformationsänderung blieb weiterhin umstritten [5].

Probleme der Strukturaufklärung von RTKs

Obwohl in den letzten Jahren bemerkenswerte Fortschritte bei der Erzeugung hochauflösender Strukturen von *Multipass*-Transmembranproteinen mit Röntgenkristallographie und Kryo-EM erzielt wurden, sind solche Strukturen von intakten RTKs bislang noch nicht gelöst [2, 6]. Generell problematisch für die Strukturaufklärung von RTKs ist – abgesehen von der Membraneinbettung an sich – die enorm hohe strukturelle Variabilität dieser Makromoleküle. Die extra- und intrazellulären Module sind über unstrukturierte Linker mit den Transmembrandomänen verbunden, sodass eine hohe Flexibilität entsteht (Abb. 1). Der Insulinrezeptor ist also ein hochdynamisches Protein, welches eine Vielzahl von Konformationen einnehmen kann. Unser heutiger Kenntnisstand beruht daher weitestgehend auf Strukturanalysen der einzelnen Module, wobei die Übertragung auf den intakten membrandurchspannenden Rezeptor mit großen Schwierigkeiten verbunden ist.

Rekonstitution in Miniatur-Membranen

Um die Funktionsweise des intakten Insulinrezeptors zu untersuchen, haben wir vollständige Insulinrezeptoren aus humanen embryonalen Nierenzellen aufgereinigt und in sogenannten Nanodiscs rekonstituiert (Abb. 2). Nanodiscs sind scheinchenförmige Lipiddoppelschicht-Fragmente, die von einem „Proteingürtel“, dem Membrane Scaffold Protein (MSP), umschlossen werden. Membranproteine können so in eine synthetische Modellmembran eingebettet werden. Sowohl Lipidzusammensetzung als auch Größe der Nanodisc können relativ präzise definiert werden, was sie zu einem leistungsstarken Werkzeug für die Untersuchung von Membranproteinen macht [7].

Snapshots des Insulinrezeptors

In einer engen Kollaboration mit Thomas Walz (Rockefeller University, NY) gelang es uns, die Aktivierung von intakten Insulinrezeptoren mittels Negativkontrastierung und Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopisch darzustellen (Abb. 2). Unter Einsatz verschiedener Cluster-Algorithmen wurden 2D Ansichten des Insulinrezeptors in bislang

unvergleichbarer Schärfe und Klarheit erzielt. In Abwesenheit von Insulin nahm die Ektodomäne die Gestalt eines umgekehrten „U“ an und bestätigt erstmals kristallographische Vorhersagen der Ektodomänen-Fragmente im Vollängen-Rezeptor [4]. Insulinbindung induzierte dramatische Konformationsänderungen der Ektodomäne zu einer „T“-ähnlichen Struktur (Abb. 3). Die membranproximalen Domänen nähern sich also nach Insulinbindung an, was zur Neuordnung der Transmembrandomänen führt und die Interaktion der Kinasen erleichtert. Der Ektodomäne kommt damit eine autoinhibierende Funktion zu: Unter basalen Bedingungen werden die Transmembrandomänen im inaktiven Rezeptor durch die „U“-Konformation auseinander gehalten. Es ist daher wenig überraschend, dass der überwiegende Teil der Rezeptoren mit beiden Transmembrandomänen in zwei separaten Disc verankert war. Insulinbindung vor Membraneinbettung führte dagegen ausschließlich zur Rekonstitution von Rezeptoren, welche mit beiden Transmembrandomänen in einer einzigen Disc inserierten. Aufgrund der Auflösungsgrenze von ~ 20 Å ließ sich nicht abschließend klären, wo genau und wie viele Moleküle Insulin gebunden haben. Ungeachtet der Auflösungsgrenze haben wir jedoch eine beträchtliche Variabilität der ligandenstabilisierten „T“-ähnlichen Konformationen ausmachen können. Dies lässt sich zum einen auf unterschiedliche Ansichten der selben Konformation zurückführen. Zum anderen deutet es auf diverse „T“-ähnliche Konformationen hin, bedingt etwa durch unterschiedliche Übergangszustände bzw. Stadien der Ligandenbindung. Letzteres ist kompatibel mit den unterschiedlichen kürzlich entstandenen Kryo-EM Strukturen der insulingebundenen Ektodomäne, welche „T“-ähnliche Konformationen bestätigten [8, 9].

Ausblick

Signaltransduktion über die Membran beruht auf abgestimmten Konformationsänderungen in allen Rezeptordomänen. Angesichts der hier beschriebenen Bedeutung der Umlagerungen der Transmembrandomänen während der Insulinrezeptoraktivierung lässt sich spekulieren, ob und wie die Lipidumgebung einen Einfluss auf Regulation von RTKs haben könnte [6, 10]. Auch ist es denkbar, dass unterschiedliche Liganden (IGFs) oder Insulinanaloga diverse Konformationen im Insulinrezeptor induzieren, welche unterschiedliche zelluläre Antworten hervorrufen können. Beide Hypothesen lassen sich tatsächlich direkt mithilfe des Nanodiscs-Rekonstitutions-Systems testen.

Das umfassende Verständnis der Insulinrezeptorregulation ist hochrelevant für die Grundlagenforschung der Signaltransduktion und darüber hinaus von eminenter medizinischer Bedeutung, da eine Entgleisung des Insulin-Signalwegs mit Pathologien wie Diabetes, Krebs und Alzheimer einhergeht. Die derzeitig rasanten Entwicklungen im Bereich der Elektronenmikroskopie und Moleküldynamiksimulationen lassen auf künftige hochaufgelöste Strukturen intakter Rezeptoren hoffen, um ein umfassendes Verständnis der Funktionsweise zu erlangen.

Abbildungen

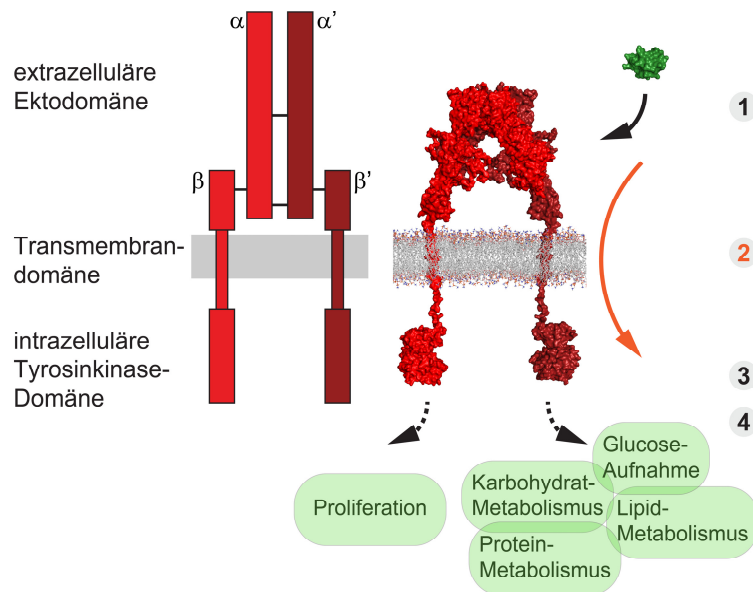


Abb. 1: Topologie und Funktionsweise des Insulinrezeptors. Schematische Darstellung der über Disulfidbrücken verbundenen α - und β -Untereinheiten des Insulinrezeptors (links), und hypothetisches Modell der ligandenfreien Struktur (rechts), basierend auf separaten Kristall- und NMR-Strukturen der einzelnen Domänen (Proteindatenbank-Einträge PDB: 4ZXB, 2MFR, 1IRK). (1) Ligandenbindung an der Ektodomäne des Rezeptors führt zu bislang nicht vollständig verstandenen Konformationsänderungen im Rezeptor, die (2) durch die Membran weitergegeben werden. (3) Die beiden intrazellulär gelegenen Kinasedomänen phosphorylieren sich daraufhin verstärkt gegenseitig an ihren eigenen Tyrosinresten (Autophosphorylierung) sowie andere nachgeschaltete Substratproteine. (4) Diese phosphorylierten Tyrosine stellen nun Bindestellen für Adapter- und Effektorproteine dar, welche wiederum weitere Proteine rekrutieren und Signalkaskaden (vornehmlich via PI3K/Akt und MAP-Kinasen) in Gang setzen. Nachgeschaltete Signalwege regulieren die zelluläre Proliferation und Metabolismus, etwa die Glukoseaufnahme in die Zelle.

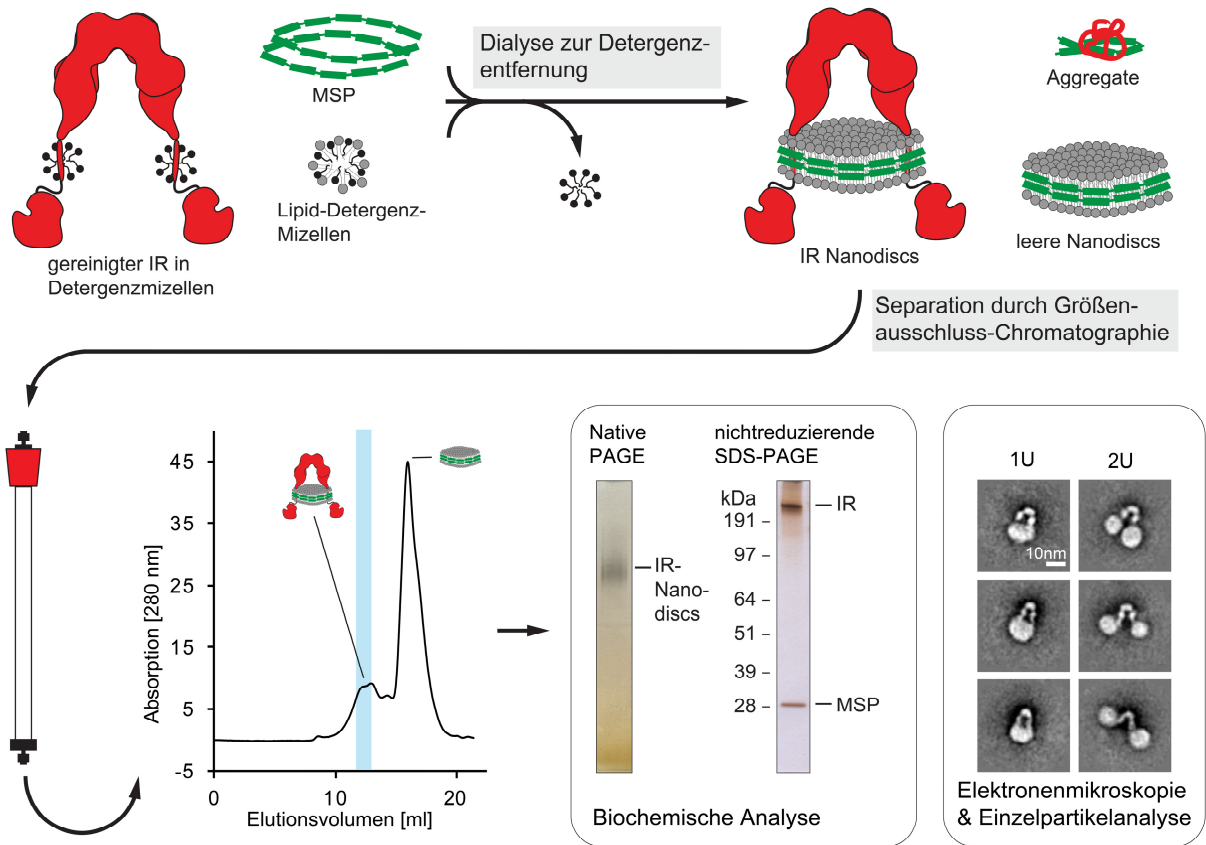


Abb. 2: Rekonstitution und Analyse von Insulinrezeptoren in Nanodiscs. (a) Gereinigte Insulinrezeptoren (IR) und Membrane Scaffold Proteine (MSP) werden in Anwesenheit von Detergenz in einem bestimmten Verhältnis mit Lipiden gemischt. Das Detergenz wird mittels Dialyse entfernt und die so entstandenen IR-Nanodiscs werden von leeren Nanodiscs und Aggregaten durch (b) Größenausschlusschromatographie getrennt und für biochemische und strukturelle Analysen genutzt. (c) Das silbergefärbte Gel nach nativer Polyacrylgelelektrophorese (PAGE) mit gereinigten IR-Nanodiscs zeigt eine einzelne Bande entsprechend intakter Discs, welche in nichtreduzierender SDS-PAGE solubilisiert und somit in zwei Banden für IR und MSP separiert werden. (d) Elektronenmikroskopische 2D-Ansichten nach Einzelpartikelanalyse der IR-Nanodiscs in Abwesenheit von Insulin zeigen IRs, deren Ektodomäne einem umgekehrten “U” ähneln und deren beide Transmembrandomänen in einer gemeinsame Disc (1U) oder in zwei separaten Discs (2U) inserieren. Die Nanodiscs sind als zirkuläre Strukturen erkennbar (Pfeilspitzen). ©2018 Gutmann et al. erschienen in [1].

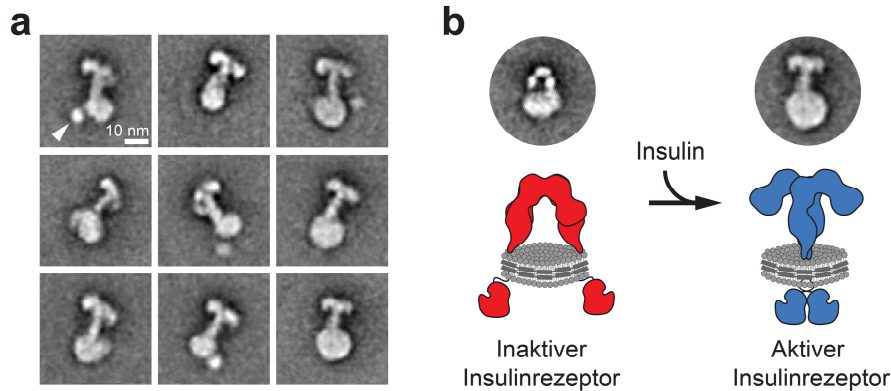


Abb. 3: Mechanismus der Insulinrezeptoraktivierung. (a) Insulinbindung induziert eine Konformationsänderung in der IR-Ektodomäne zu einer „T“-ähnlichen Struktur. Repräsentative elektronenmikroskopische 2D-Ansichten nach Einzelpartikelanalyse von insulingebundenen IR-Nanodiscs zeigen eine signifikante strukturelle Heterogenität, welche auf das Vorliegen diverser Transitionszustände hindeutet. Nach Ligandenbindung sind in einigen 2D Klassen die Kinasedomänen als zusätzlich Dichten erkennbar (Pfeilspitze). (b) Modell der Insulinrezeptoraktivierung: In Abwesenheit von Ligand, nimmt die IR-Ektodomäne die Gestalt eines umgekehrten „U“ an, wodurch die Transmembrandomänen voneinander weggespreizt werden. Insulinbindung hebt diese autoinhibitorische Konformation auf und induziert eine T-ähnliche Struktur, in der die membranproximalen Domänen beider Monomere zueinanderkommen. Dies führt zur Annäherung der beiden Transmembrandomänen, was die Interaktion intrazellulären Kinasedomänen erleichtert und die Autophosphorylierung des Rezeptors erhöht. ©2018 Gutmann et al. erschienen in [1].

Literatur

1. Gutmann T, Kim K H, Grzybek M et al. (2018) Visualization of ligand-induced transmembrane signaling in the full-length human insulin receptor. *J Cell Biol* 217:1643-1649.
2. Diwanji D, Thaker T, Jura N (2019) More than the sum of the parts: Toward full-length receptor tyrosine kinase structures. *IUBMB Life*. DOI: 10.1002/iub.2060 [Epub ahead of print].
3. De Meyts P, Whittaker J (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 1:769-783.
4. Croll T I, Smith B J, Margetts M B et al. (2016) Higher-resolution structure of the human insulin receptor ectodomain: multi-modal inclusion of the insert domain. *Structure* 24:469-476.
5. De Meyts P (2015) Insulin/receptor binding: the last piece of the puzzle? What recent progress on the structure of the insulin/receptor complex tells us (or not) about negative cooperativity and activation. *Bioessays* 37:389-397.
6. Grzybek M, Gutmann T, Coskun Ü (2014) Functional Role of Membrane Lipids in EGF Receptor Dynamics and Regulation. In: *Cell Membrane Nanodomains: From Biochemistry to Nanoscopy*, Cambi A, Lidke D S (Hrsg). CRC Press, Boca Raton, Fla, 41-58.
7. Schuler M A, Denisov I G, Sligar S G (2013) Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions. *Methods Mol Biol* 974:415-433.
8. Scapin G, Dandey V P, Zhang Z et al. (2018) Structure of the insulin receptor-insulin complex by single-particle cryo-EM analysis. *Nature* 556:122-125.

9. Weis F, Menting J G, Margetts M B et al. (2018) The signalling conformation of the insulin receptor ectodomain. Nat Commun 9:4420.
10. Coskun U, Simons K (2011) Cell membranes: the lipid perspective. Structure 19:1543-1548.

Danksagung

Ich danke meinem Mentor und meinen Kollegen der AG Coskun, sowie Kelly Kim und Thomas Walz für die produktive Zusammenarbeit. Unterstützt wurde ich von der DFG (GSC 97, FOR 2682), dem DIGS-BB Graduiertenprogramm, sowie der Christiane-Nüsslein-Volhard-Stiftung. Für die Auszeichnung meiner Arbeit mit dem GBM Innovation Award for Young Scientists 2018 bedanke ich mich bei der GBM und STS.

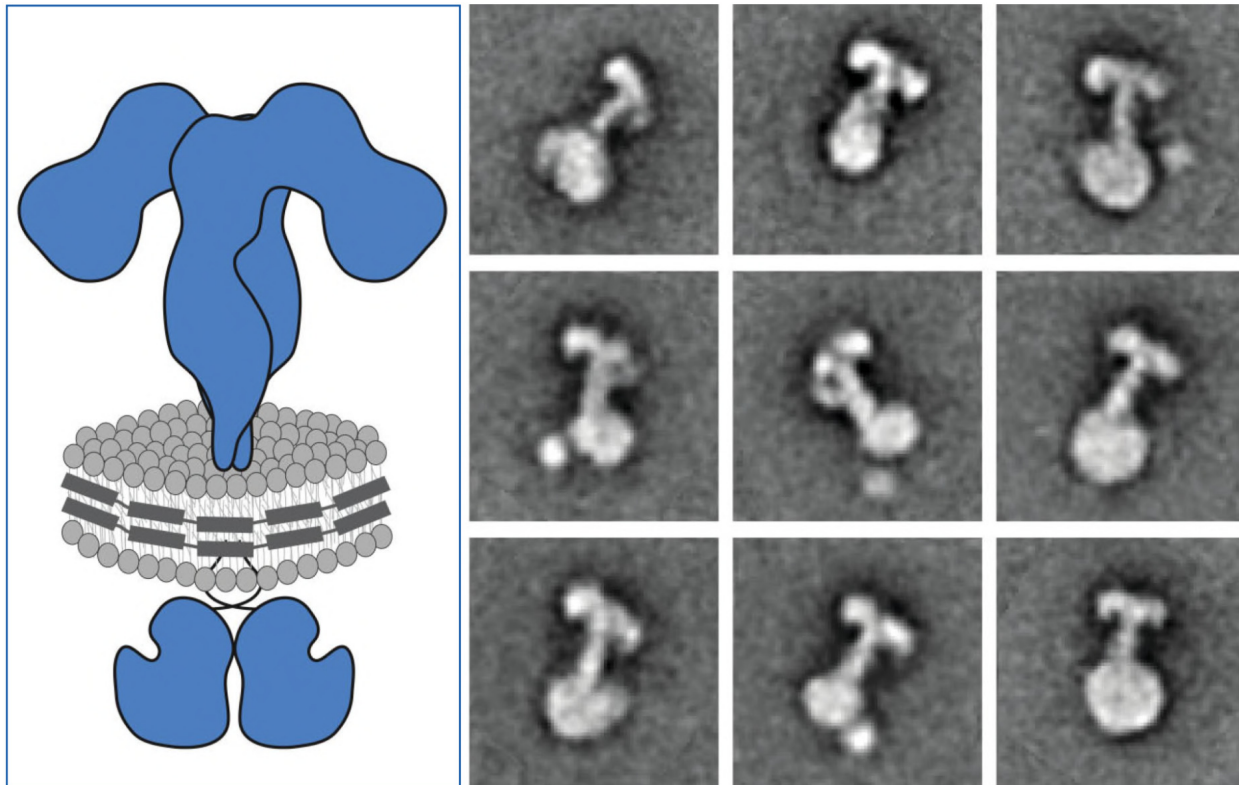
Kurzvita



Dr. Theresia Gutmann

Biologiestudium an der Humboldt-Universität zu Berlin mit Forschungsaufenthalten an der ETH Zürich, Schweiz, und der Universität Helsinki, Finnland. **2012-2018** Promotion in Biologie an der Technischen Universität Dresden in der AG Dr. Ünal Coskun. Seit **2018** Postdoc am Paul-Langerhans-Institut Dresden des Helmholtz-Zentrums München.

Zum Titelbild



Elektronenmikroskopische 2D Ansichten von vollständigen membraneingebetteten Insulinrezeptoren nach Insulinbindung (links) und deren schematische Darstellung (rechts). Humane Volllängen-Insulinrezeptoren wurden gereinigt und in sogenannte Nanodiscs, das sind nanoskalige Membranfragmente, rekonstituiert, sodass diese mittels Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse strukturell charakterisiert werden konnten. Die Konformation des Rezeptors konnte so vor und nach Insulinzugabe direkt visualisiert und ein Modell zur Insulinrezeptoraktivierung formuliert werden. Die Abbildung enthält Aufnahmen aus Gutmann T, Kim KH et al., *J Cell Biol* (2018) 217:1643-1649. Mehr zu diesem Thema erfahren Sie auf Seite XXX im Beitrag von Theresia Gutmann.