Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: biochemie

Mgr. Emília Kletvíková

Syntéza a charakterizace nových analogů insulinu s cílem objasnit interakci insulinu s jeho receptorem.

Synthesis and characterization of the new insulin analogues with the aim to clarify the interaction of insulin with its receptor.

Disertační práce

Školitel: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 02. 2013

Podpis

Abstract

The objective of this thesis is to characterize insulin analogues modified at the C-terminus of the B-chain with the aim to observe the impact of the inserted modifications on the insulin-insulin receptor (IR) interaction and the ability of the analogues to dimerize.

Therefore, a series of analogues with modifications at B24–B26 positions was prepared. Using the synthetic and semisynthetic methods we inserted coded and non-coded amino acids to this part of B-chain. We studied full-length analogues and analogues truncated by three to four amino acids. Binding affinity of all analogues to the insulin receptor was determined by competition of analogue with radioactive (^{125}I) human insulin. Dissociation constant in the dimer dissociation process of selected analogues (especially of those with *N*-methylation of B23–B24, B24–B25 and B25–B26 peptide bonds) was determined by isothermal titration microcalorimetry. The crystal structures of several analogues were resolved by X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance. The structural results showed the consequences of inserted modifications to the insulin molecule.

We characterized analogues with higher, equipotent and lower binding affinity to the IR. The results suggest that an adequate flexibility of the C-terminus of the B-chain enabling its detachment from the central core of the molecule is important in the interaction with the receptor. This flexibility correlates with the binding affinity and dissociation constant of the studied analogues. Moreover, our results offer clear evidence that the main chain and the specific side chains of insulin analogues also participate in the interaction with IR. Further, we observed that IGF-2 is a more potent mitogen than insulin when binding to the IR-A isoform. One highly potent insulin analogue (D-ProB26-DTIA) was crystallized in the complex with insulin receptor fragment in a collaborating Australian laboratory.

This study of the role of aromatic amino acids B24, B25 and B26 has contributed to the better understanding of the interaction of the C-terminus part of the insulin molecule with its receptor.

Abstrakt

Tato disertační práce je zaměřena na studium insulinových analogů modifikovaných na C-konci B-řetězce s cílem sledovat vliv vložené mutace na dimerizaci insulinu a interakci s insulinovým receptorem (IR).

Připraveny byly analogy s modifikacemi v pozicích B24–B26, kde byly do peptidového řetězce syntetickými a semisyntetickými metodami vloženy kódované i nekódované aminokyseliny. Studovány byly jak analogy plné délky, tak analogy zkrácené o tři až čtyři C-koncové aminokyseliny. Metodou kompetice analogu s radioaktivním (^{125}I) lidským insulinem byla určena vazebná afinita k receptoru. Metodou isotermální titrační mikrokalorimetrie byla určena dimerizační schopnost analogů, a to zejména analogů s *N*-methylovanou peptidovou vazbou v pozicích B23–B24, B24–B25 a B25–B26. Metodou rentgenové krystalografie a metodou nukleární magnetické resonance byly určeny struktury vybraných analogů. Tyto struktury byly konfrontovány s vazebnou afinitou analogů s cílem charakterizovat aktivní konformaci insulinu.

Charakterizovány byly analogy vykazující jak vyšší, tak i ekvipotentní či nižší vazební afinitu k IR. Výsledky krystalových struktur ukazují, že pro vazbu na receptor je důležité zachování určitého stupně flexibility C-konce B-řetězce, která při interakci s receptorem umožní jeho odklon od centrální části molekuly. Důležitou roli ve vzájemné interakci insulinu s receptorem hrají ale i příspěvky peptidového řetězce a postranních řetězců této části insulinu. Dále byly pozorovány vyšší mitogenní účinky růstového faktoru IGF-2 zprostředkované isoformou A insulinového receptoru v porovnání s přirozeným insulinem. Jeden z vysoce potentních analogů připravených v této studii (D-ProB26-DTIA) byl úspěšně použit ve spolupracující australské laboratoři pro určení krystalové struktury insulinu v komplexu s receptorem insulinu.

Studiem aromatických aminokyselin pozic B24, B25 a B26 přispěla tato práce k poznání interakce C-koncové části molekuly insulinu s insulinovým receptorem.

Poděkování

Za výborné vedení mého studia, odborné rady a pomoc při provádění experimentů bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Dále bych ráda poděkovala všem kolegyním a kolegům skupiny RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. za cenné rady a ochotu pomoci při laboratorní či studijní činnosti a také za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Moje poděkování dále patří Dr. T. Krausovi z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za pomoc při provádění ITC experimentů. Za krystalizační analýzu insulinových analogů bych ráda poděkovala Dr. A. M. Brzozowskému z Univerzity v Yorku (Department of Chemistry, University of York, Velká Británie). Dále děkuji Dr. V. Veverkovi z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za provedení NMR analýzy analogů insulinu. Za molekulárně-dynamické výpočty analogů insulinu děkuji Dr. M. Lepšíkovi z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Ráda bych také poděkovala servisním pracovištím Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, a to pracovištím hmotnostní a NMR spektrometrie.

Mé velké poděkování patří mému manželovi a celé mé rodině, kteří mě v průběhu celého studia s láskou podporovali.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem ÚOCHB (AV0Z4055056 a 61388963), výzkumným záměrem GAAV ČR (KJB400550702) a výzkumným záměrem Centrum chemické genetiky MŠMT ČR (LC060777).

OBSAH

Seznam použitých zkratek 9

1. Úvod 10

1.1. Historie výzkumu insulinu 11
1.2. Molekula insulinu 12
1.2.1. Hexamerní struktura insulinu 13
1.2.2. Dimerní struktura insulinu 14
1.2.3. Monomerní struktura insulinu 17
1.2.4. Vazebná místa molekuly insulinu pro IR 18
1.2.5. Molekula insulinu z evolučního hlediska 18
1.3. Koloběh insulinu v těle 19
1.3.1. Biosyntéza insulinu 19
1.3.2. Sekrece a degradace insulinu 21
1.4. Interakce insulinu s receptorem 22
1.4.1. Insulinový receptor 22
1.4.2. Kontakt insulinu s insulinovým receptorem 23
1.4.3. Přenos signálu po navázání ligandu na receptor 26
1.5. Insulinové analogy v praxi 28
1.5.1. Analogy s rychlým nástupem působení 28
1.5.2. Analogy s prodlouženým účinkem působení - basální insuliny 29
1.6. Aktivní forma insulinu 31
1.6.1. Význam C-konce B-řetězce na vazbu k receptoru 31
1.6.1.1. Pozice B24 33
1.6.1.2. Pozice B25 33
1.6.1.3. Pozice B26 34
1.6.1.4. Peptidové vazby B24–B25 a B25–B26 35

2. Cíle práce 36

3. Materiál a metody 37

3.1. Použitý materiál 37
3.2. Syntéza peptidů na pevné fázi 38
3.3. Příprava des(B23–B30)oktapeptid insulinu (DOI) 39
3.3.1. Odstranění zinku z krystalického insulinu 39
3.3.2. Enzymatické štěpení insulinu 39
3.4. Enzymatická semisyntéza 39
3.5. Enzymatická deprotekce Lys(Pac) 40
3.6. Vazebné testy *in vitro* 40
3.6.1. Izolace plasmatických membrán z potkaních tukových buněk 40
3.6.2. Testování vazebné afinity vůči IR z potkaní tukové tkáně 41
3.6.3. Testování vazebné afinity vůči IR v membránách lymfocytů IM-9 41
3.7. Isothermální titrační mikrokalorimetrie (ITC) 42
3.8. Krystalografické studie 43
3.9. NMR spektroskopie 43
3.10. Molekulové modelování 44

4. Výsledky 46

4.1. Studium funkční a strukturní charakterizace B26-analogů s cílem definovat aktivní konformaci insulinu na C-konci B-řetězce. Syntéza a charakterizace zkrácených a nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen nekódovanými aminokyselinami. 46

4.1.1. Příprava peptidů metodou syntézy na pevné fázi 46

4.1.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) 48

4.1.3. Příprava insulinových analogů metodou enzymatické semisyntézy 48

4.1.4. Vazebné afinity připravených analogů 50

4.1.5. Strukturní analýza vybraných analogů pomocí rentgenové krystalografie 53

4.1.6. Krystalová struktura analogu D-ProB26-DTIA v komplexu s extracelulární doménou receptoru insulinu 56

4.2. Syntéza a charakterizace analogů selektivně *N*-methylovaných v pozicích B24, B25 a B26 se specifickým zaměřením na dimerizační vlastnosti připravených analogů. 58

4.2.1. Příprava *N*-methylovaných oktapeptidů metodou syntézy na pevné fázi 58

4.2.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) 59

4.2.3. Enzymatická semisyntéza *N*-methylovaných insulinových analogů 59

4.2.4. Testování vazebných afinit *in vitro* 60

4.2.5. Analýza vybraných *N*-methylovaných insulinových analogů metodou ITC 62

4.2.6. Strukturní analýza vybraných *N*-methylovaných analogů pomocí rentgenové krystalografie 66

4.3. Studium příspěvku TyrB26 v aktivní formě insulinu. Syntéza a charakterizace nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen za kódované aminokyseliny. 69

4.3.1. Příprava peptidů metodou syntézy na pevné fázi 69

4.3.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) 71

4.3.3. Výsledky enzymatické semisyntézy analogů modifikovaných v poloze B26 71

4.3.4. Testování vazebných afinit *in vitro* 73

4.3.5. ITC analýza vybraných insulinových analogů 75

4.3.6. Krystalové struktury analogů 78

4.3.7. Molekulová dynamika vybraných analogů 82

4.4. Syntéza a charakterizace nových analogů insulinu modifikovaných v poloze B24 za účelem studia role PheB24 při tvorbě aktivní formy insulinu. 83

4.4.1. Příprava oktapeptidů 83

4.4.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) 84

4.4.3. Výsledky enzymatické semisyntézy připravených analogů insulinu 84

4.4.4. Vazebné afinity připravených analogů 86

4.4.5. Krystalová struktura L-HisB24-insulinu 88

4.4.6. NMR struktury L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu 89

4.5. Určení vazebných afinit insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu vůči isoformě A insulinového receptoru v rámci studie rozdílů v signalizaci této isoformy (IR-A) po stimulaci insulinem, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinem 92

5. Diskuze 95

5.1. Studium funkční a strukturní charakterizace B26-analogů s cílem definovat aktivní konformaci insulinu na C-konci B-řetězce. Syntéza a charakterizace zkrácených a nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen nekódovanými aminokyselinami. 95

5.1.1. Krystalová struktura analogu D-ProB26-DTIA v komplexu s extracelulární doménou receptoru insulinu 97

5.2. SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE ANALOGŮ SELEKTIVNĚ *N*-METHYLOVANÝCH V POZICÍCH B24, B25 A B26 SE SPECIFICKÝM ZAMĚŘENÍM NA DIMERIZAČNÍ VLASTNOSTI PŘIPRAVENÝCH ANALOGŮ. 99
5.3. STUDIUM PŘÍSPĚVKU TYRB26 V AKTIVNÍ FORMĚ INSULINU. SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE NEZKRÁCENÝCH ANALOGŮ INSULINU SE ZÁMĚNOU V POLOZE B26, KDE BYL PŮVODNÍ TYROSIN NAHRAZEN ZA KÓDOVANÉ AMINOKYSELINY.....103
5.4. SYNTÉZA A CHARAKTERIZACE NOVÝCH ANALOGŮ INSULINU MODIFIKOVANÝCH V POLOZE B24 ZA ÚČELEM STUDIA ROLE PHEB24 PŘI TVORBĚ AKTIVNÍ FORMY INSULINU. 109
5.5. URČENÍ VAZEBNÝCH AFINIT INSULINU, IGF-2 A *N*ME-TYRB26-INSULINU VŮČI ISOFORMĚ A INSULINOVÉHO RECEPTORU V RÁMCI STUDIE ROZDÍLŮ V SIGNALIZACI TÉTO ISOFORMY (IR-A) PO STIMULACI INSULINEM, IGF-2 A *N*ME-TYRB26-INSULINEM.....113

6. Shrnutí.....115

7. Seznam použité literatury 117

Seznam publikací.....129

Přílohy 130

Seznam použitých zkratek

ACN - acetonitril
BSA – hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
DCM - dichlormethan
DIPEA - *N,N*-diisopropylethylamin
DMF - dimethylformamid
DOI - des(B23–B30)oktapeptid-insulin
DQF-COSY – korelační spektroskopie (correlation spectroscopy)
DTI - des(B27–B30)tetrapeptid-insulin
DTIA - des(B27–B30)tetrapeptid-B26-amid-insulin
DTrI - des(B28–B30)tripeptid-insulin
DTrIA - des(B28–B30)tripeptid-B27-amid-insulin
ESI-MS - hmotnostní spektrometrie, ionizace elektrosprejem (electro spray ionization mass spektrometry)
Fmoc - fluorenylmethyloxykarbonyl
GLUT – glukosový transportér
HBTU - 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
IGF-1, IGF-2 – růstové faktory podobné insulinu (insulin-like growth factors)
IR - insulinový receptor
IRS – substrát insulinového receptoru (insulin receptor substrate)
NMP - 1-methyl-2-pyrrolidinon
NMR - nukleární magnetická resonance
NOE/NOESY - nukleární Overhauserův efekt (nuclear Overhauser effect spectroscopy)
Pac - fenylacetylová skupina
PDB – proteinová data banka (protein data bank)
PMSF - fenylmethylsulfonyl fluorid
PyBroP - bromo-tris-pyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfát
RP-HPLC – vysokoúčinná kapalná chromatografie s reverzní fází (reverse phase high-performance liquid chromatography)
RTK – tyrosinová kináza receptoru (receptor tyrosine kinase)
Sar - sarkosin (*N*Me-Gly)
TFA – kyselina trifluoroctová
TIS - triisopropylsilan
TOCSY – totální korelační spektroskopie (total correlation spectroscopy)
Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Úvod

Insulin je klíčový hormon, který kontroluje metabolismus cukrů, proteinů i lipidů. Porušením rovnováhy těchto metabolických dějů vzniká nemoc diabetes mellitus (cukrovka), která se řadí mezi tzv. civilizační onemocnění. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) trpí diabetem na celém světě bezmála 350 mil. lidí (1), prognózy do budoucnosti však nejsou nijak povzbudivé. Předpokládá se, že do roku 2030 dojde ke zdvojnásobení počtu nemocných, přičemž největší nárůst onemocnění se očekává v rozvojových zemích. Pro efektivní prevenci může být vzdělávání a změna životního stylu významné. Nicméně, další poznávání procesů v působení insulinu může přispět k rozvoji efektivnější léčby diabetických pacientů.

Diabetes mellitus (DM) je chronické onemocnění charakterizované zvýšenou hladinou glukosy v krvi (hyperglykémie) provázené poruchami metabolismu sacharidů, tuků a proteinů. Příčinou je nefunkční sekrece a/nebo pozměněný účinek působení insulinu. Rozlišují se dva základní typy diabetu: diabetes mellitus 1. typu a diabetes mellitus 2. typu, kam patří většina diabetických pacientů (90–95 %). DM 1. typu (insulin-dependentní diabetes mellitus) je autoimunitním onemocněním, při kterém autoimunitní protilátky zničí pankreatické β-buňky produkující insulin. Pacienti s tímto typem DM tak mají velmi málo nebo žádný insulin a jsou závislí na exogenním dodání insulinu. Tento typ diabetu je také nazýván juvenilním diabetem, protože se nejčastěji projevuje do 15. roku života. DM 2. typu (non-insulin-dependentní diabetes mellitus) se projevuje pozměněnou sekrecí insulinu a insulinovou resistencí, kdy pankreas produkuje zvýšené množství insulinu, vůči kterému je však tělo odolné (resistentní). Tento typ diabetu je úzce spojen s obezitou, nezdravou stravou a nedostatkem fyzické aktivity. Pacienti jsou léčeni orálními antidiabetiky, v pozdějším stádiu i v kombinaci s insulinem (2,3).

Výzkum složitého působení insulinu je slibnou a nutnou cestou ke kvalitnější léčbě pacientů. Přínosem desítky let trvajícího výzkumu insulinu jsou již běžně používané insulinové analogy, jejichž cílem je co nejlépe imitovat fyziologické působení insulinu, a tím omezit případné hypo či hyperglykemické stavy pacientů.

1.1. Historie výzkumu insulinu

Cesta k objevu insulinu, ke kterému došlo ve dvacátých letech minulého století v kanadském Torontu, začala již roku 1890 v Německu. Joseph von Mering a Oscar Minkowski ukázali, že odstranění slinivky břišní vyvolává příznaky podobné silné cukrovce. Začali tak uvažovat o přítomnosti záhadné pankreatické látky, která je odpovědná za metabolismus cukrů. Krátce potom byla tato látka pojmenována jako i n s u l i n, a to nezávisle dvěma vědci: Belgičanem Jeanem de Meyerem a Britem Edwardem Albertem Schäferem. Úspěšnou izolaci insulinu z pankreatických extraktů psů provedli až Frederick G. Banting, Charles H. Best a James B. Collip v laboratořích Johna J. R. Macleoda na univerzitě v Torontu v roce 1922. Prvotní hypotéza o vlivu insulinu na metabolismus cukrů byla potvrzena okamžitým účinkem extraktů na snížení hladiny glukosy v moči a krvi po podání diabetickému pacientovi. Úspěch byl završen již následující rok, a to udělením Nobelovy ceny pro F. G. Bantinga a J. J. R. Macleoda (4,5).

Účinná a jednoduchá purifikace insulinu srážením při pH jeho isoelektrickcého bodu (pH 5,4) vedla ke zvýšení výtěžků i čistoty insulinu, a zároveň ke snížení vedlejších účinků. To umožnilo produkci dostatečného množství čistého insulinu, který vyráběly firmy Eli Lilly v americkém Indianapolisu a Nordisk v Dánsku. Ve čtyřicátých letech minulého století se pak přidáním bazických proteinů (protamin) nebo zinku k molekule insulinu povedlo účinek hormonu prodloužit. Na trh tak byly uvedeny insulin NPH (*Neutral Protamine Hagedorn*) a insulin PZI (*Protamine Zinc Insulin*) (6).

Objevení insulinu otevřelo dveře výzkumu této malé proteinové molekuly. Již tři roky po udělení Nobelovy ceny za objev insulinu připravil John J. Abel první krystalický insulin. Druhá Nobelova cena ve výzkumu insulinu byla udělena za určení primární struktury, kterou provedl Frederick Sanger v roce 1955 (7). Známá aminokyselinová sekvence umožnila přípravu insulinu totální syntézou, která se povedla hned několika výzkumným skupinám (8-11). Práce Dorothy C. Hodgkinové vyvrcholila koncem šedesátých let určením tří-dimensionální struktury hexamerního insulinu za použití metody rentgenové krystalografie (12,13).

Bohatý výzkum insulinu ve druhé polovině dvacátého století odhalil mnohé další detaily o působení insulinu. Koncem šedesátých let objasnil Donald Steiner mechanismus biosyntézy insulinu v pankreatických β-buňkách vedoucí přes prekurzory insulinu a jeho

následnou sekreci do krevního řečiště (14,15). Za stanovení velmi malého množství insulinu v krvi pomocí radioimunitních metod získali Nobelovu cenu v roce 1977 Rosalyn Yalowová a Solomon Bermon (16). Příprava radioaktivně značeného insulinu (^{125}I-TyrA14) umožnila vývoj metody pro určování vazebné afinity insulinu k receptoru prováděné na buněčných liniích. Tuto metodu v roce 1976 publikoval Pierre De Meyts (17). Vývoj biochemických a zejména molekulárně biologických metod umožnil detekci a objasňování složité signalizační kaskády insulinu vedoucí k různým metabolickým procesům. Nemalým přínosem ve výzkumu insulinu byla příprava rekombinantně získaného insulinu (18), což umožnilo rychlou a poměrně levnou produkci lidského insulinu pro terapeutické účely (19).

Přestože je insulin relativně malá molekula a intenzivní výzkum trvající několik desetiletí odkryl mnohé neznámé, přesný mechanismus vazby insulinu na insulinový receptor není dosud objasněn. Proto studium molekuly insulinu nadále pokračuje. A to za využití mnoha z výše popsaných metod s cílem objasnit interakci insulinu s receptorem, a tím poskytnout nové informace a možnosti pro zlepšení léčby diabetických pacientů.

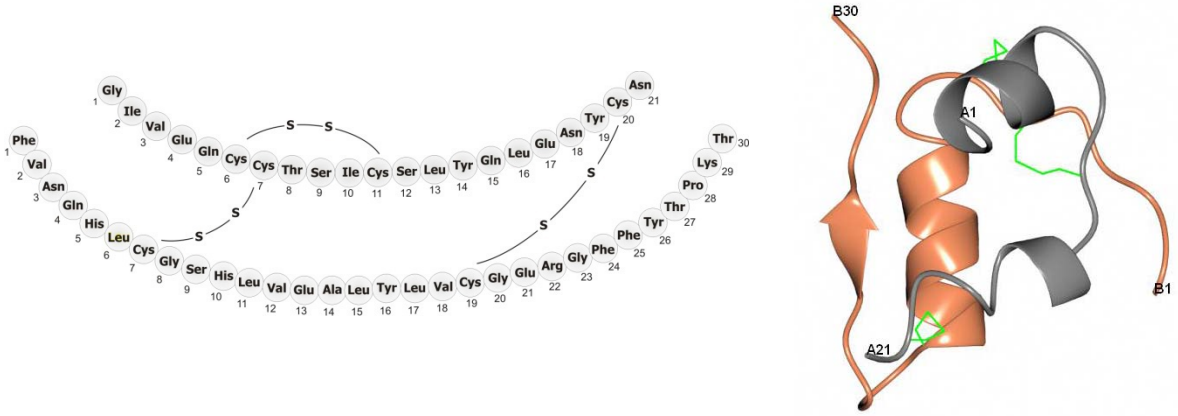
1.2. Molekula insulinu

Insulin je součástí tzv. insulinové rodiny (*insulin superfamily*), kam se řadí i jiné peptidové hormony; a to růstové faktory podobné insulinu IGF-1 a IGF-2 (*insulin-like growth factors*), relaxinové peptidy (relaxin-1, relaxin-2, relaxin-3) a peptidy podobné insulinu (INSL3, INSL4, INSL5 a INSL6). Kromě IGF-1 a IGF-2, které jsou tvořeny jedním řetězcem, se ostatní molekuly skládají ze dvou řetězců. Přesto si všechny tyto molekuly zachovávají stejný centrální strukturní motiv, což je pravděpodobně i důsledek existence společného předka - insulinového genu, z kterého se v průběhu evoluce postupně vyvinuly (20,21).

Insulin se se svou velikostí (5,8 kDa) řadí mezi malé proteiny. Je tvořen 51 aminokyselinami, které jsou uspořádány do dvou řetězců: řetězec A obsahující 21 aminokyselin (A1–A20) a řetězec B obsahující 30 aminokyselin (B1–B30). Tyto dva řetězce jsou spojeny dvěma disulfidickými můstky: CysA7–CysB7 a CysA20–CysB19. Řetězec A navíc obsahuje intramolekulární disulfidickou vazbu mezi CysA6 a CysA11 (viz Obr. 1).

Ze struktury monomeru insulinu v hexameru víme, že A-řetězec je tvořen dvěma antiparalelně uspořádanými α-šroubovicemi v pozicích A1–A8 a A13–A19 spojenými pseudo β-otáčkou v pozicích A9–A12. Delší B-řetězec obsahuje jen jednu centrální α-

šroubovici mezi pozicemi B9–B19. Konformace s neuspořádaným N-koncem (viz Obr. 1) je u insulinu nejobvyklejší a je označována jako T-konformace (*tensed*). Prvních osm aminokyselin N-konce však může být i prodloužením centrální α-šroubovice, kdy molekula insulinu tvoří R-konformaci (*relaxed*). C-konec B-řetězce (B20–B30) je v krystalických strukturách insulinu ve formě β-struktury přimknuté k centrální α-šroubovici.



Obr. 1: Primární a terciární struktura insulinu. Monomerní struktura insulinu je odvozená ze struktury hexameru insulinu v T-konformaci (PBD kód 2A3G) (22). A-řetězec zobrazen šedě, B-řetězec oranžově, disulfidické vazby zeleně.

1.2.1. Hexamerní struktura insulinu

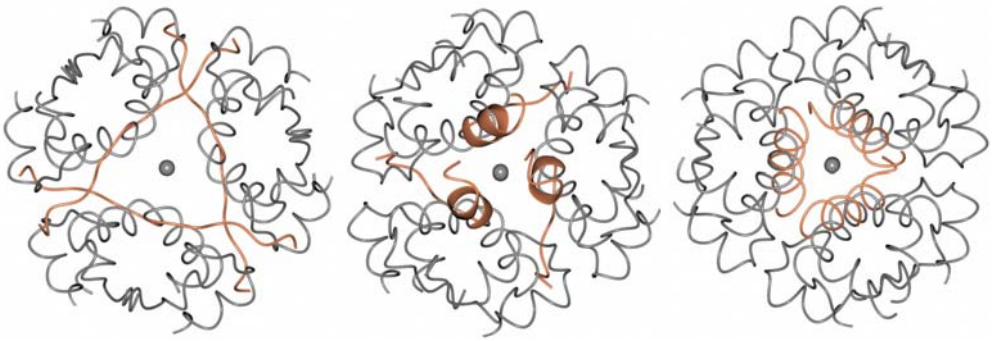
Molekula monomerního insulinu má schopnost agregovat, a tvořit tak různé multimerní formy. Na insulinový receptor se však insulin váže jenom v monomerní formě, a to v subnanomolární koncentraci. Ve vyšších, mikromolárních koncentracích, tvoří insulin dimery, které v přítomnosti zinku tvoří hexamerní strukturu. Tento systém agregace je využíván při biosyntéze a skladování insulinu a má důležitou roli při sekreci insulinu do krevního řečiště.

Hexamery insulinu můžou navíc existovat ve třech různých formách (viz Obr. 2).

Romboedrické krystaly hexameru (2Zn insulin) jsou kolem trojčetné osy tvořeny třemi dimery insulinu, které jsou koordinovány dvěma zinečnatými ionty (příp. jinými dvojmocnými ionty jako Cd, Pb a jiné) prostřednictvím imidazolového kruhu HisB10. Pozitivní náboj atomů zinku je vyrovnáván negativním nábojem karboxylových skupin šesti GluB13, které vytvářejí kruh kolem šesti HisB10. Dimery se navzájem dotýkají přes nepolární aminokyseliny AlaB14, LeuB17, které spolu s LeuA13 a TyrA14 vytvářejí dutinu pro dva

PheB1. To je možné pouze tehdy, když se aminokyseliny B1–B8 nacházejí v T-konformaci a netvoří uspořádanou helikální strukturu. Takto popsaná hexamerní struktura byla nazvána jako T6 hexamer (23,24).

Po přidání chloridových iontů dochází u tří molekul hexameru ke tvorbě prodloužené helikální struktury na N-konci B-řetězce, přičemž tato konformace umožňuje koordinaci HisB5 kolem dalších dvou atomů zinku. Struktura takového hexameru byla popsaná jako 4Zn insulin anebo T3R3 hexamer.



Obr. 2: Hexamerní struktury insulinu - zleva: T6 (PDB kód 1OS4) (25), T3R3 (PheB26-insulin, tato studie) a R6 (PDB kód 1ZNJ) (26). Aminokyseliny B1–B8 jsou znázorněny barevně.

V přítomnosti fenolu či jiných malých cyklických alkoholů, jako jsou kresol a resorcinol, které se ve farmakologii rutinně používají jako antimikrobiální látky, vznikají monoklinické krystaly hexameru, které obsahují jenom molekuly insulinu s prodlouženou B1–B19 helikální strukturou (R-konformace). Molekuly fenolu vytvářejí vodíkové vazby s CysA6(CO) a CysA11(NH), jakož i van der Waalsovy interakce s HisB5 vedlejšího dimeru, čímž strukturu stabilizují. Tyto struktury byly pojmenované jako R6 hexamery (23,24).

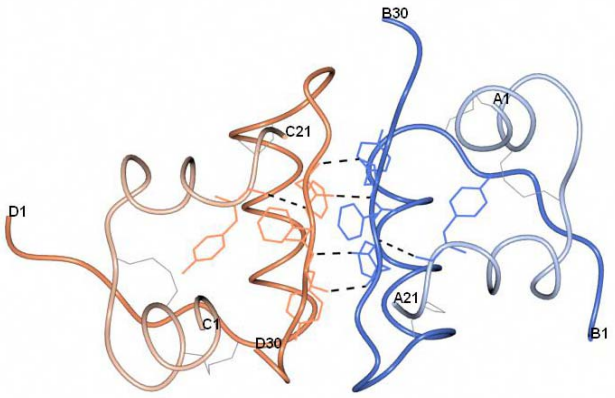
1.2.2. Dimerní struktura insulinu

Struktura insulinového dimeru je známá jak ze struktury hexamerních krystalů, tak i ze struktury krystalů symetrického dimeru tvořeného bez přítomnosti Zn^{2+}. Uspořádání dimerů obou struktur je podobné, ne však identické.

Monomerní jednotka insulinu obsahuje dimerní vazebný povrch (*dimer binding surface*), přes který dochází k antiparalelnímu spojení dvou monomerů. Pro tvorbu dimeru jsou důležité zejména aromatické aminokyseliny C-konce B-řetězce, kde dochází k tvorbě

vodíkové vazby mezi kyslíkem karbonylu TyrB26 (resp. PheB24) jedné molekuly a amidovým vodíkem PheB24 (resp. TyrB26) druhé molekuly. K propojení dvou antiparalelních řetězců tudíž dochází prostřednictvím čtyř vodíkových můstků, jak je zobrazeno na Obr. 3.

Postranní řetězce PheB24 a TyrB26 spolu s tyrosiny B16 tvoří zajímavé uspořádání celkem šesti aromatických kruhů dimerního vazebného povrchu (24). Z krystalové struktury jsou dále patrné i van der Waalsovy interakce ProB28 s aminokyselinami B20–B23 druhého monomeru. Největší podíl na stabilizaci dimerní formy insulinu tak mají interakce nepolárního charakteru posílené daným uspořádáním vodíkových vazeb. Interakce mezi A-řetězci monomerů se na stabilizaci dimeru nepodílejí.



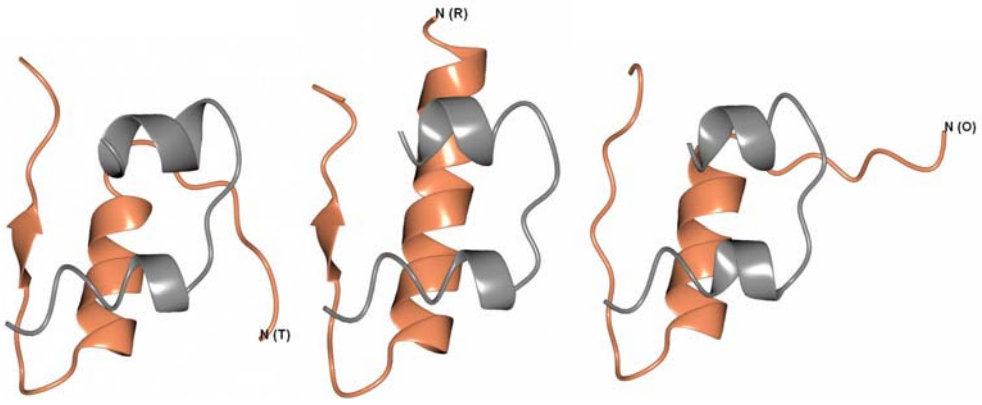
Obr. 3: Dimer insulinu z T6 hexameru (PDB kód 1MSO). Monomer 1 (řetězce AB) je zobrazen modrou barvou, monomer 2 (řetězce CD) oranžovou barvou, disulfidické vazby znázorněny světle šedou barvou. Zvýrazněné jsou vodíkové vazby mezi PheB24(NH) a TyrB26(CO) monomeru 1 a 2 a také vodíkové vazby mezi TyrB26(NH) a PheB24(CO) monomeru 1 a 2; vyznačena je také vodíková vazba mezi PheB25(NH) a TyrA19(CO) jednotlivých monomerů. Znázorněny jsou i postranní řetězce aminokyselin dimerního povrchu, a to TyrA19, PheB24, PheB25 a TyrB26.

Monomerní jednotky dimeru popsaného ve struktuře 2Zn insulinu (T6 hexamer) jsou mírně odlišné, proto byly pojmenované jako molekula 1 a molekula 2. Rozdíl je daný uspořádáním v hexameru, kde rozložením A-řetězců dojde k nevýhodnému přiblížení HisB5 dvou molekul. Důsledkem je potom otočení jednoho z nich do stabilnější konformace. To vyústí k posunu A-řetězce, výsledkem čehož je uvolnění PheB25 molekuly 2, který nově interaguje s PheB25 molekuly 1. Utvořeny jsou také vodíkové vazby Phe25(NH) s

TyrA19(CO). Tyto změny dále způsobí ztrátu solného můstku mezi karboxylem B30 a aminem A1 a dochází k rozvolnění C-konce B-řetězce (B27–B30) (24).

Naproti tomu monomery v krystalu symetrického dimeru (PDB kód 1GUJ) jsou identické a odpovídají spíše struktuře monomeru 1 ze struktury 2Zn hexamerního insulinu. Symetrie není narušena jiným uspořádáním PheB25 ani neuspořádanou konformací na C-konci B-řetězce. Vodíková vazba mezi PheB25(NH) a TyrA19(CO) se ovšem v tomto dimeru netvoří. Tato konformace byla popsaná i u despentapeptid(B26–B30)-insulinu (DPI), jehož vazebná afinita (25–88%) není v případě C-koncového karboxyamidu absencí posledních pěti aminokyselin výrazně pozměněna (27-29). Podobná struktura byla pozorována i u specificky upravených monomerních insulinů v roztoku (použitím metody NMR) (30). Symetrický dimer byl popsán i u analogu GluB9-insulinu (krystalizace v pH 3,8), přičemž uspořádání odpovídá taktéž více monomeru 1 insulinu z 2Zn hexameru popsaného Bakerem (31).

Neméně důležitá je změna konformace na N-konci B-řetězce dimerních struktur insulinu. Pozorovány byly totiž struktury nepatřící ani do T- ani do R-konformace popsané u hexamerních krystalů (viz kapitola 1.2.1.). U T-konformace je β-struktura N-konce B-řetězce orientována antiparalelně k centrální šroubovici B-řetězce, kdežto u konformace popsané jako tzv. O-stav (*open state*), neboli intermediální stav, nabývá spíše orientaci kolmou k této centrální šroubovici (viz Obr. 4). Tato konformace se vyskytuje u DPI krystalů (32), u des(B24–B30)heptapeptid-insulinu (33), u již zmíněného GluB9-insulinu (31), ale i u specificky modifikovaného monomerního insulinu při neutrálním pH (34). V žádné z dimerních ani monomerních struktur insulinu či analogů nebyl nikdy pozorován N-konec B-řetězce v R-konformaci. Ta se vyskytuje pouze u hexamerních struktur.



Obr. 4: Strukturní znaky na N-konci B-řetězce v různých konformačních stavech. Zleva T-konformace (PDB kód 1MSO), R-konformace (PDB kód 1ZNJ) a O-stav (PheB26-insulin, tato studie).

1.2.3. Monomerní struktura insulinu

Vzhledem k nízké rovnovážné konstantě dimerizace insulinu není možné získat krystaly monomerního insulinu. Proto je monomerní struktura insulinu omezena na informace získané ze struktury symetrického dimeru. K poznání monomerní struktury insulinu nemalým dílem ovšem přispěly i výsledky NMR měření specificky upravených monomerních insulinů v roztoku. Základem se stal AspB10-LysB29-ProB30 insulinový analog, tzv. DKP-insulin, s vazebnou afinitou asi 200 %, tj. dvakrát vyšší než u přirozeného insulinu (35). Tento DKP-insulin je monomerní, a tudíž vhodný pro měření NMR metodou, neboť záměny v dimerním i hexamerním vazebném povrchu molekuly eliminují agregační vlastnosti insulinu.

Jak již bylo popsáno, základní uspořádání insulinu obsahuje tři disulfidické vazby a tři α-šroubovice. Jádro molekuly má hydrofobní charakter. C- a N-konce B-řetězce jsou flexibilní části insulinu, naopak A-řetězec je rigidní. Význam konformace na N-konci v biologickém účinku insulinu, tzv. T-/R-/O-konformace, je stále studován. Výsledky studií nicméně ukazují na důležitost GlyB8, který pravděpodobně funguje jako spínač mezi T-/R-/O-konformacemi. T-konformace má velmi pravděpodobně svou úlohu při tvorbě disulfidických můstků a při udržení stability sbalené molekuly. O biologickém významu dalších dvou konformací (R-/O-) se diskutuje (36). B-řetězec tvoří v pozicích B20–B23 β-otáčku, kterou následuje konec B-řetězce ve formě β-struktury. Flexibilita C-konce B-řetězce má pravděpodobně svůj význam při interakci molekuly s receptorem. Z krystalu dále víme, že struktura insulinu je podporována vazbami iontového charakteru (AsnA21 s ArgB22, LysB29 s GluA4) a stabilizujícími vodíkovými můstky mezi AsnA21(NH) a GlyB23(CO) (24).

Je vhodné podotknout, že insulin jako malá molekula využívá stejné části molekuly (např. C-konec B-řetězce) jak pro agregaci, tak pro vazbu na receptor. Dále je nutné zdůraznit, že výše uvedený popis monomeru insulinu vychází z dimerních a hexamerních struktur, či struktur specificky pozměněných insulinů (DKP-insuliny). Charakter přirozeného monomeru v krevním řečišti nebo při vazbě na receptor se může lišit a je předmětem výzkumu.

1.2.4. Vazebná místa molekuly insulinu pro IR

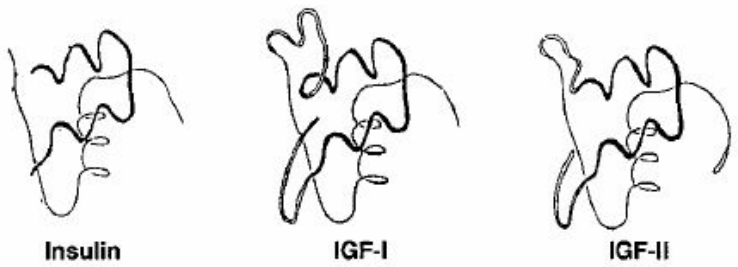
Syntetické (8,11,37) a semisyntetické (38-40) metody daly vznik insulinovým analogům, a tím i intenzivnímu studiu významu jednotlivých aminokyselin. Výsledky různých vědeckých skupin ukázaly, že existuje několik mezidruhově zachovalých aminokyselin důležitých pro vazbu na receptor. Tyto aminokyseliny vytvářejí klasický vazebný povrch (*classical binding surface*), či vazebné místo pro receptor 1, tvořené GlyA1, IleA2, ValA3, GlnA5, ThrA8, TyrA19, AsnA21, ValB12, TyrB16, GlyB23, PheB24, PheB25 a TyrB26 (20). Část aminokyselin této vazebné oblasti se uplatňuje i při tvorbě dimeru, jak bylo pojednáno v kapitole 1.2.2. O významu aminokyselin klasického vazebného povrchu vypovídají mutace pozorované u diabetických pacientů produkujících mutantní insuliny. Tyto mutace mají za následek výrazně sníženou vazbu mutantního insulinu na receptor. Jedná se o insuliny „Los Angeles" (SerB24-insulin), „Chicago" (LeuB25-insulin) a „Wakayama" (LeuA3-insulin) (41). Později připravené analogy s mutací v pozicích LeuA13 a LeuB17 ukázaly na význam i těchto aminokyselin při vazbě na receptor. Obě tyto mutace výrazně snížily vazbu na receptor (42,43). Systematické nahrazování aminokyselin alaninem (*alanine scanning mutagenesis*) odhalilo další pozice důležité pro vazbu na receptor, označované jako hexamerní vazebný povrch, neboli vazebné místo pro receptor 2, tvořené SerA12, LeuA13, GluA17, HisB10, GluB13 a LeuB17 (44).

1.2.5. Molekula insulinu z evolučního hlediska

Určení aminokyselinové sekvence insulinu bylo umožněno hlavně zavedením metody Edmanovy degradace proteinů, rozvojem biochemických metod, které mimo jiné umožnily izolaci čistého insulinu, a rozvojem imunologických či imunohistochemických metod. Již v sedmdesátých letech tak byly určeny primární struktury insulinů reprezentativních druhů obratlovců.

Výzkum insulinových genů obratlovců i bezobratlých ukázal, že insulinové geny se vyvinuly s rozvojem živočichů, což potvrzuje absence insulinových genů v kvasinkách (45). Předpokládá se, že u předchůdců insulinu převažovala více funkce růstových faktorů nad funkcí metabolickou. Následně v průběhu evoluce obratlovců přebraly molekuly insulinu spíše metabolickou funkci.

Na společného předka molekul lidského insulinu, IGF-1 a IGF-2, poukazuje podobnost jejich terciární struktury (viz Obr. 5), velká shoda (až 50%) v primární struktuře těchto hormonů i jejich receptorů, a dokonce i jejich podobný účinek na buněčné úrovni. Proto se předpokládá, že vznikly duplikací a následným odchýlením od původního společného genu (46).



Obr. 5: Podobnost terciární struktury insulinu, IGF-1 a IGF-2 (46).

Porovnáním lidského insulinu a insulinu sliznatky (lat. *Myxine glutinosa,* dosud dochovaný nejstarší obratlovec) se ukázalo, že i přes velký evoluční rozdíl (asi 400 mil. let), jsou si obě molekuly podobné z 61 % (47). To poukazuje na vysokou zachovalost insulinové sekvence v průběhu evoluce.

Jiné porovnávání sekvencí insulinů asi 100 obratlovců bylo zaměřeno hlavně na variabilitu těch částí molekuly, které jsou významné pro vazbu na receptor či pro její vlastní agregaci. Z výzkumu vyplývá, že nejvíce konzervované (invariantní) jsou pozice účastnící se vazby na receptor a pozice stabilizující správnou konformaci molekuly (48). Podle této studie existuje jenom deset aminokyselin (vyjma šesti invariantních cysteinů), které jsou v průběhu evoluce obratlovců v insulinu plně konzervované. Jsou to GlyA1, IleA2, ValA3, TyrA19, LeuB6, GlyB8, LeuB11, ValB12, GlyB23 a PheB24. Výsledky evolučního zkoumání jsou v souladu s výsledky vazebných afinit mutovaných insulinů (49,50).

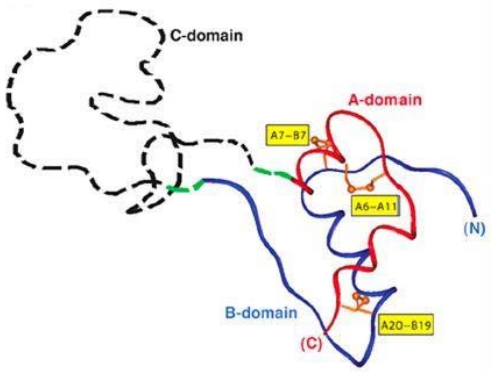
1.3. Koloběh insulinu v těle

1.3.1. Biosyntéza insulinu

Biosyntéza insulinu probíhá v β-buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu. Na drsném endoplasmatickém retikulu vzniká prvotní prekurzor insulinu, 12 kDa velký preproinsulin. Jeho signální sekvence mu umožňuje vstup do lumen endoplasmatického

retikula za vzniku jednořetězcové 9 kDa velké molekuly proinsulinu. Ten je tvořen ze tří řetězců: B-řetězec, který je C-řetězcem (tzv. C-peptidem) spojený s A-řetězcem. Velikost proinsulinu je určena právě velikostí C-peptidu, která se může mezidruhově lišit. Lidský C-peptid obsahuje 86 aminokyselin, jehož složení je oproti konzervovaným A a B řetězcům variabilní (51). Přítomnost C-peptidu je důležitá pro tvorbu správné konformace insulinu, zejména pro bezchybné spojení všech disulfidických můstků (14). Molekula proinsulinu tak obsahuje správně sbalenou část insulinu a část neuspořádaného C-peptidu (viz Obr. 6) (52).

Z endoplasmatického retikula putuje proinsulin přes Golgiho aparát do sekrečních granulí. Zde, v mírně kyselém prostředí, dochází ke konverzi proinsulinu na insulin. Proinsulin, stejně jako insulin, tvoří v přítomnosti zinečnatých iontů hexamery, ne však krystalické ale amorfní. Pro efektivní konverzi na insulin jsou potřebné endoproteázy: PC1/3 specificky štěpící Arg-Arg sekvence a PC2 endoproteáza specificky štěpící Lys-Arg sekvence. Prostřednictvím těchto bazických aminokyselin je právě C-peptid navázán na C-konec B-řetězce a N-konec A-řetězce. Konverze je navíc podporována krystalizací vznikajícího insulinu, které napomáhá kyselé pH granulí (5,0–5,5). Vzniklý insulin je v sekrečních granulích dále skladován. Až po stimulaci glukosou je spolu s vyštěpeným C-peptidem sekretován v ekvimolárním množství do krve. Po přechodu z kyselého pH granulí do pH 7,4 krevního řečiště dochází k oslabení koordinace Zn^{2+} (deprotonace GluB13 stabilizujícího polohu HisB10) a následně k rozpadu krystalů (15,53).



Obr. 6: Molekula proinsulinu obsahující A-řetězec (červeně), B-řetězec (modře) a C-peptid (černě) (52).

Fyziologická koncentrace insulinu v krvi se pohybuje v rozmezí 10^{-9}–10^{-12} M, kdy se insulin jako monomer váže na insulinový receptor. I přes podobné vlastnosti proinsulinu a

insulinu (např. agregace, isoelektrický bod, rozpustnost, reakce s protilátkami) je biologická aktivita proinsulinu nízká, jen asi 3–5 % aktivity insulinu.

1.3.2. Sekrece a degradace insulinu

Sekreci insulinu v β-buňkách Langerhansových ostrůvků ovlivňují různé faktory: příjem potravy, neurotransmitery nebo peptidové hormony. Z příjmu potravy mají na sekreci kromě glukosy vliv i mastné kyseliny, aminokyseliny nebo ketokyseliny. Sekrece insulinu *in vivo* je pulzující právě v důsledku odpovědi na příjem potravy.

Jsou známy dva mechanismy sekrece insulinu. První je K_{ATP} závislý mechanismus. Glukosa z potravy se dostává přes GLUT2 přenašeč do β-buněk, kde se metabolizuje. Výsledkem je pak zvýšená produkce ATP. To následně způsobí uzavření ATP-sensitivního K^+ kanálu, depolarizaci membrány, vstup Ca^{2+} iontů do buňky a nakonec exocytosu insulinových granulí. Druhý je K_{ATP} nezávislý mechanismus. Zde, po příjmu potravy, dochází v gastrointestinálním traktu k vylučování žaludečních sekrečních hormonů: inhibičního polypeptidu GIP (*gastric inhibitory polypeptide*) a peptidu podobného glukagonu GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*), které zvyšují hladinu intracelulárního cAMP a/nebo působí na transkripci insulinového genu. Výsledkem je opět vylučování insulinu (15,54).

Opačně působící hormony, které inhibují sekreci insulinu v důsledku sníženého příjmu potravy, jsou glukagon a ghrelin.

Molekula insulinu má velmi krátkou dobu života, která nepřesahuje 4–6 minut. Musí proto existovat mechanismus hlídající jak správnou funkci sekrece, tak i vychytávání a degradaci insulinu. Výsledky studií potvrdily existenci insulin-degradujícího enzymu IDE (*insulin-degrading enzyme*), metaloproteázy o velikosti 110 kDa vyžadující Zn^{2+}, která štěpí insulin na inaktivní fragmenty. Vazebná afinita IDE pro insulin je vysoká, asi 0,1 μM. IDE rozeznává molekulu insulinu pravděpodobně podle její charakteristické konformace (napomáhá tomu nejspíše přítomnost disulfidických vazeb) a následně ji štěpí na dvou místech A řetězce a na sedmi místech B-řetězce. Štěpení probíhá v uzavřené dutině enzymu, přičemž je zajímavé, že většina štěpených vazeb se nachází uprostřed molekuly insulinu, v jejím jádru (55).

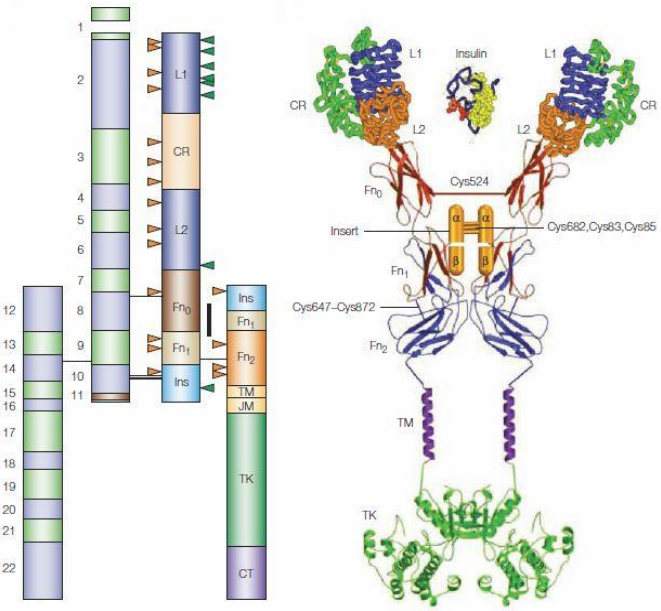
Degradace insulinu, stejně jako jeho sekrece, je regulovaný proces. Změny těchto procesů jsou rovněž spojené s onemocněním, jako je diabetes mellitus 2. typu (55,56).

1.4. Interakce insulinu s receptorem

1.4.1. Insulinový receptor

Insulinový receptor (IR) patří do insulin-receptorové rodiny z početné receptor tyrosin kinázové (RTK) třídy spolu s receptorem růstového faktoru podobného insulinu IGF-1R a s receptorem příbuzným insulinu IRR (*insulin receptor related receptor*). IR i IGF-1R tvoří kovalentně vázaný dimer $(\alpha\beta)_2$, kdežto IRR dimerizuje až po navázání ligandu, podobně jako jiné receptory z velké RTK třídy. Navíc můžou vznikat chimerické neboli hybridní receptory IR/IGF-1R, jejichž fyziologická funkce není zcela objasněna (56,57).

Gen pro IR se skládá z 22 exonů a 21 intronů. Existují dvě isoformy IR, které buď obsahují (IR-B) nebo neobsahují (IR-A) sekvenci 12 aminokyselin (717–729) v důsledku alternativního přepisu exonu 11. Vazbou insulinu se isoformy A a B moc neliší, větší rozdíl je však v afinitě vůči IGF hormonům, zejména IGF-2, jehož afinita vůči IR-A je v tomto případě výrazně větší než afinita vůči IR-B (58). Výskyt isoforem se v určitých tkáních liší. IR-B se vyskytuje především v tkáních, kde převažuje metabolický účinek působení insulinu, a to v jaterní, tukové a svalové tkáni. Naopak IR-A se vyskytuje v orgánech či tkáních, jako jsou embryo, plod, lymfocyty, mozek, slezina, ale i rakovinné buňky (59), kde převažuje mitogenní účinek insulinu (růst buněk, jejich dělení či diferenciace).



Obr. 7: Vlevo model genu IR s rozložením jednotlivých proteinových domén; černé čáry znázorňují disulfidické vazby, kterými jsou podjednotky propojeny. Vpravo schematické znázornění IR

s rozložením proteinových domén. Značení domén: L domény - L1 a L2; doména bohatá na cystein - CR; fibronektinové domény FnIII-1, FnIII-2 a FnIII-3 zde značené jako Fn0, Fn1, Fn2; Ins - insertní doména ID; TM - transmembránová doména; JM - juxtamembránová část; TK - tyrosinkinázová doména; CT - C-konec (*C-tail*). Oranžové šipky znázorňují N-glykosylovaná místa, zelené šipky místa důležitá pro vazbu ligandu (určené specifickou záměnou jednotlivých aminokyselin) (50).

IR je 460 kDa velký transmembránový glykoprotein (homodimer), který obsahuje dvě α a dvě β podjednotky spojené navzájem třemi disulfidickými vazbami (viz Obr. 7). Zatímco α-podjednotky jsou extracelulární částí, β-podjednotky prostupují membránou do intracelulárního prostoru. Extracelulární část α-podjednotky obsahuje dvě L domény (*leucine rich*) - L1 a L2, které jsou oddělené CR doménou (*cysteine rich*). Následují fibronektinové domény FnIII-1, FnIII-2 a FnIII-3, přičemž prostřední (FnIII-2) obsahuje vloženou část o 120 aminokyselinách, tzv. insertní doménu ID (*insert domain*). Ta je tvořena C-koncem α-podjednotky a N-koncem β-podjednotky. Právě C-konec α-podjednotky obsahuje tzv. CT-peptid (16 aminokyselin), který má velký význam při vazbě insulinu na IR, jak je podrobněji pojednáno v následující kapitole. β-podjednotky jsou tvořeny transmembránovou částí, juxtamembránovou částí, tyrosinkinázovou doménou a C-koncem (*C-tail*) (21,50).

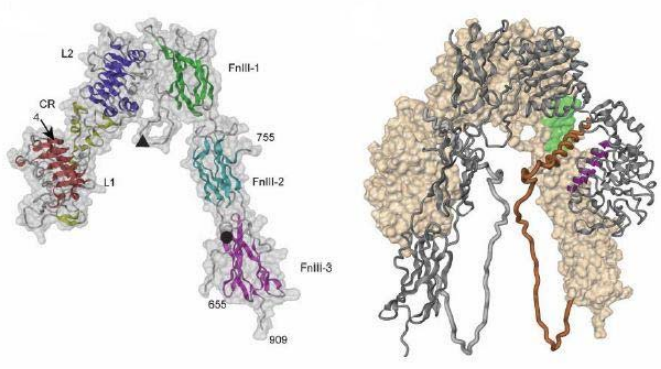
1.4.2. Kontakt insulinu s insulinovým receptorem

Nejpřesnější informace o vazbě insulin-IR by mohla poskytnout data z rentgenové krystalografie. Touto metodou se ale strukturu komplexu insulin-insulinový receptor i přes několik desetiletí výzkumu určit nepovedlo. Avšak k poznání receptorových míst pro vazbu ligandu přispěly výsledky jiných metod.

Vzhledem k tomu, že IR je transmembránová molekula, váže se insulin výhradně na její extracelulární část, na α-podjednotky. Navázání ligandu pak vede k aktivaci tyrosinkinázové části β-podjednotky a následně k přenosu signálu uvnitř buňky.

Přelomové publikování detailní struktury extracelulární ektodomény dimeru IR (viz Obr. 8) (60,61) umožnilo přesněji lokalizovat vazebné části receptoru pro insulin, přičemž byla na receptoru určena dvě vazebná místa: receptorové vazebné místo 1 a receptorové vazebné místo 2 (*site 1*, *site 2*). Již předtím Schäffer navrhnul model, kde insulin spojuje dvě α-podjednotky dimeru IR za vzniku dvou samostatných vazebných míst. Jeho model rovněž

předpokládá navázání dvou molekul insulinu zároveň, přičemž na první vazebné místo se insulin váže s vysokou afinitou, zatímco druhé je schopno vázat insulin jenom s nízkou afinitou (43). De Meyts ve své hypotéze uvádí, že vysoce afinitní stav insulinu nastává při vzájemném kontaktu míst 1 a 2 obou podjednotek (42). Tato hypotéza byla podpořena výsledky za použití metody specifického nahrazování aminokyselin IR alaninem (*alanine scanning mutagenesis*) (62) i matematického modelování (63). Vázat se však může i druhá molekula insulinu, je to tzv. nízko afinitní místo, které navíc může oslabit vazbu první molekuly insulinu.



Obr. 8: Struktura ektodomény insulinového receptoru. Vlevo - monomer ektodomény s uspořádáním jednotlivých domén. Vpravo - homodimer ektodomény a schematické znázornění CT-peptidu (hnědá a šedá barva), přičemž CT-peptid jedné molekuly je umístněný v blízkosti L1 domény druhé molekuly a opačně. Jeden monomer ektodomény je pro přehlednost zobrazen kalotovým modelem (20).

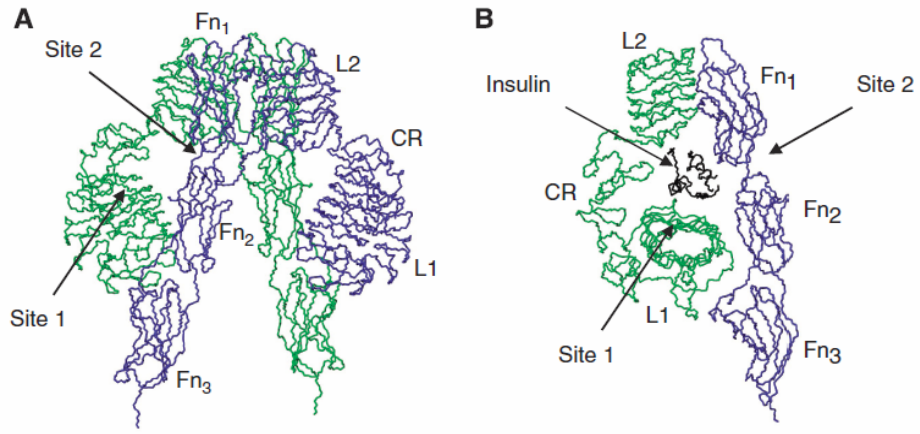
Receptorové vazebné místo 1 (*site 1*) je tvořeno L1 doménou s centrální strukturou skládaného listu, CT-peptidem a CR doménou. Důležitost L1 domény byla potvrzena u insulin-rezistentních pacientů, u kterých byly pozorovány mutace právě v této části IR (64). Insulinové analogy s foto-aktivovatelnými skupinami (jako např. *para*-azido-fenylalanin) v pozicích B12, B16 a B24 poukázaly na význam ValB12, TyrB16 a PheB24 pro vazbu na receptor a zároveň odhalily, že dochází ke kontaktu α-šroubovice B-řetězce insulinu s L1 doménou receptoru (65,66).

Význam CT-peptidu pro vazbu insulinu na receptor potvrzují výsledky hned několika metod. (i) Experimenty s foto-aktivovatelnými analogy insulinu (67-70) poukázaly na kontakt ValA3, ThrA8, PheB25 a ThrB27 pozic s CT-peptidem. (ii) Cíleně specifická mutace sekvence CT-peptidu potvrdila, že pro vazbu insulinu je významná účast Phe714 (71). (iii)

Studie zabývající se interakcí mini-receptorů s ligandem pomocí metody ITC ukázaly, že zatímco fragment L1-CR-L2 sám insulin neváže, přidáním CT-peptidu k vazbě insulinu dochází, a to srovnatelně jako u celé rozpustné ektodomény (K_d = 17 nM) (72). Navíc IR/IGF-1R chimerické receptory, opět s obsahem CT-peptidu, také vykazují vazbu s ligandem (73-75). Je třeba rovněž zmínit, že v krystalové struktuře extracelulární ektodomény není CT-peptid dobře viditelný. Různá pozorování se shodují, že jeho struktuře nejlépe odpovídá trubice s vysokou hustotou elektronů ležící napříč L1 doménou (viz Obr. 8), a podle hypotézy Warda a kol. má CT-peptid helikální strukturu (20).

CR doména, jakožto součást receptorového vazebného místa 1, leží v blízkosti L1 domény (viz Obr. 8). Podle výsledků studia chimerických IR/IGF-1R receptorů, specifické mutageneze nebo studia epitopů monoklonálních protilátek proti IGF-1R receptoru, které inhibují vazbu IGF-1 na IGF-1R, má CR doména význam spíše při vazbě IGF-1 na IGF-1R. V blízkosti L1 domény IR a IGF-1R leží šest cysteinových částí CR domény, které se liší ve velikosti, sekvenci či sekundární struktuře. I to může přispívat k rozdílné afinitě IGF-1 vůči IR (20).

Receptorové vazebné místo 2 (*site 2*) je tvořeno doménami FnIII-1 a FnIII-2. Význam smyček domény FnIII-1 potvrdily analýzy chimerických IR/IGF-1R receptorů, ale také výsledky vazebných studií různě dlouhých ektodomén IR i výsledky foto-aktivovatelných analogů. Předpokládá se, že vysoko-afinitní místo pro molekulu insulinu vznikne po přiklonění L1-CR částí jednoho monomeru k FnIII-1 doméně druhého monomeru (schematicky znázorněno na Obr. 9) (60).



Obr. 9: Dimer insulinového receptoru. A) Struktura ektodomény IR podle McKerna, znázorněny jsou také receptorová vazebná místa 1 a 2 (zde zobrazeno jako site 1 a site 2). B) Detail monomeru s přibližným umístěním insulinu (63).

Studium interakce insulin-IR ukazuje, že část insulinu interagující s receptorovým vazebným místem 1 je tvořena především klasickým vazebným povrchem, zatímco za vazbu na receptorové vazebné místo 2 odpovídá hlavně hexamerní vazebný povrch insulinu (60).

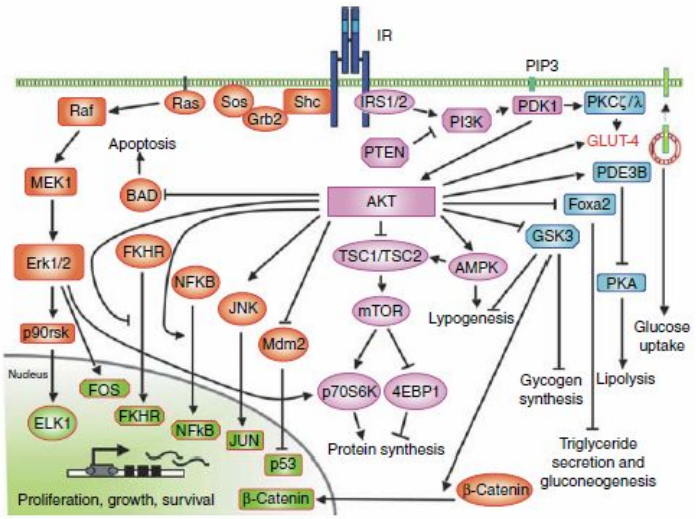
Vazba insulinu na insulinový receptor je popsaná Scatchardovým grafem, který je v tomto případě křivočarý, což poukazuje na přítomnost dvou vazebných míst, jak už bylo dříve nastíněno. Vazebná místa jsou charakterizována negativní kooperativitou, kdy kontakt druhé molekuly insulinu oslabí vazbu první molekuly, a tak usnadní její disociaci. Závislost disociace navázaného insulinu na působení volných molekul insulinu má tvar obráceného zvonu. Tento mechanizmus byl popsán již v sedmdesátých letech Pierrem De Meyts (76).

1.4.3. Přenos signálu po navázání ligandu na receptor

Výsledkem vazby insulinu na extracelulární část IR je konformační změna intracelulární části, kde dochází k přiblížení tyrosinkinázových domén receptoru, což následně vede k autofosforylaci celkem sedmi tyrosinů β-podjednotky. Dva tyrosiny, (Tyr965 a Tyr972) se nacházejí v juxtamembránové doméně, tři tyrosiny (Tyr1158, Tyr1162 a Tyr1163) jsou součástí aktivační smyčky tyrosinkinázové domény a poslední dva tyrosiny (Tyr1328 a Tyr1334) jsou umístěny na C-konci IR. Fosforylace juxtamembránové domény probíhá fosfotransferázovou aktivitou stejné β-podjednotky, mluvíme o *cis*-fosforylaci. Naproti tomu fosforylace tyrosinkinázové domény probíhá *trans*-fosforylací, při které jsou tyrosiny

fosforylovány vedlejší β-podjednotkou. Právě fosforylace tyrosinů je primárně důležitá pro následnou fosforylaci dalších substrátů, jako jsou IRS a Shc. Substráty IRS obsahují fosfotyrosin-vázající doménu PTB a plekstrin-homologní doménu PH. Naproti tomu substráty Shc domény PTB neobsahují. Podle výskytu v různých tkáních jsou známy čtyři IRS susbtráty: IRS-1, IRS-2, IRS-3 a IRS-4 (77,78).

Fosforylací substrátů uvnitř buněk dochází k přenosu signálu, jehož výsledkem je pak metabolická či mitogenní odpověď buňky (viz. Obr. 10). Vazbou fosfatidylinositol-3 kinázy (PI3K) se substrátem IRS-1 jsou aktivovány spíše metabolické cesty. Deaktivace PI3K wortmanninem je spojena s inhibicí transportu glukosy do buněk, inhibována je i syntéza glykogenu, lipidů a proteinů (79). Aktivace fosfatidylinositol-3 kinázy vede k fosforylaci fosfatidylinositolu za vzniku fosfatidylinositolu-trisfosfátu PI(3,4,5)P3 a následně k aktivaci Akt/PKB - protein kinázy B. Jednou z odpovědí substrátu Akt/PKB je translokace glukosového přenašeče GLUT4 k membráně a přenos glukosy do buňky (80).



Obr. 10: Signalizační dráhy insulinu. Po navázání insulinu na IR se signál šíří přes fosforylaci IRS a Shc substrátů dál, přičemž rozlišujeme signalizační cestu metabolickou (přes IRS) a mitogenní (přes Shc) (59).

Buněčný růst a syntéza proteinů je naopak více spojena s aktivací cesty Ras/ERK1/2 fosforylací přes substrát Shc. To vede k fosforylacím substrátů ERK1 a ERK2, které vstupují do jádra buňky, kde fosforylací transkripčních faktorů ovlivňují transkripci genů (77).

Insulinový signální systém je komplexně regulovaný, zahrnující jak degradaci a expresi signálních proteinů, tak i regulaci fosforylace.

1.5. Insulinové analogy v praxi

První insuliny, které se začaly používat jako terapeutikum pro diabetické pacienty, byly živočišné insuliny, nejčastěji vepřový a hovězí. V porovnání s lidským insulinem se liší v jedné, resp. třech aminokyselinách. Mohli bychom říci, že to byly první insulinové analogy, které se v medicínské praxi začaly používat. Opravdovou vlaštovkou v insulinové praxi však byl protaminový insulin (NPH a PZI) s účinkem zhruba dvakrát delším než neupravený insulin (6). NPH a PZI ovšem nejsou analogy v pravém slova smyslu, ale jedná se o lidský insulin s přídavkem bazického peptidu protaminu.

Pro diabetického pacienta je žádoucí, aby insulinová léčba co nejvíce imitovala fyziologickou sekreci insulinu, a to jak bazální, tak i důležitou sekreci po jídle. Poznávání biochemických a fyziologických vlastností insulinu umožnilo modifikovat strukturu insulinu tak, aby se docílilo požadovaných vlastností. Velkou roli zde sehrálo studium interakcí, díky kterým má insulin schopnost agregovat. Protože se insulin váže na receptor jako monomer, narušením interakcí mezi dvěma monomery dimerní formy vznikly insuliny s rychlým nástupem působení. Naopak pozvolné uvolňování monomerního insulinu z jeho hexamerní formy, precipitátů či agregátů se sérovými proteiny, umožnilo vyvinutí insulinů s prodlouženým nástupem působení. Důležité je také zmínit, že všechny analogy insulinu jsou dnes odvozeny od lidského insulinu a jsou rekombinantně vyráběné.

1.5.1. Analogy s rychlým nástupem působení

Záměna předposledních dvou aminokyselin B-řetězce (LysB28 a ProB29), inspirovaná sekvencí IGF-1, snižuje agregaci insulinu, čímž urychluje absorpci a následně i biologický účinek. Vzniklý LysB28-ProB29-insulin (81) byl v roce 1996 úspěšně uveden na trh jako analog *lispro (Humalog®)*.

Druhým rychle působícím analogem se v roce 2000 stal analog *aspart (Novolog®)*. Prolin v pozici B28 je zaměněn za Asp, přičemž opět dochází ke snížení asociačních vlastností molekuly insulinu. Působení tohoto analogu je velmi podobné insulinu lispro (82).

Třetím v sérii analogů s rychlým účinkem je analog *glulisine (Apidra®)* (83), který obsahuje dvě substituce aminokyselin: AsnB3 je zaměněn za Lys a LysB29 za Glu. Biologický účinek analogu (metabolický i mitogenní) je mimo rychlý nástup působení velmi podobný účinkům lidského insulinu (84). Na trh byl uveden v roce 2005.

I když se rychle působící analogy strukturálně liší, jejich farmakokinetické vlastnosti jsou si podobné a všechny se používají pro léčbu diabetu 1. i 2. typu. Analogy injektované před jídlem dokonce napodobují fyziologickou odpověď insulinu lépe než rozpustný lidský insulin, čímž zároveň redukují výskyt pozdní hypoglykémie (85).

1.5.2. Analogy s prodlouženým účinkem působení - basální insuliny

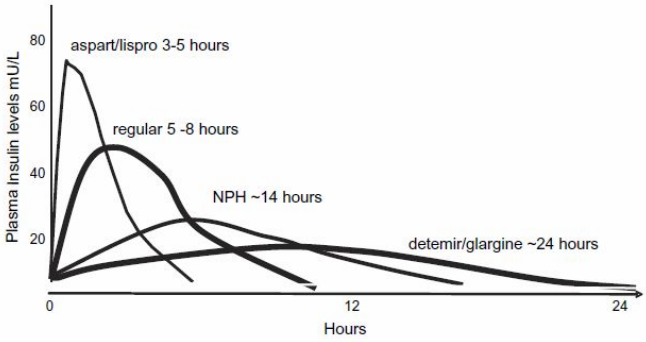
Prodloužit působení insulinu znamená pozměnit jeho vlastnosti tak, aby se absorboval pomaleji. Prvním takto připraveným analogem byl insulin *glargine (Lantus®)*, který má sníženou rozpustnost danou posunem isoelektrického bodu molekuly z pH 5,4 na 6,7. Docíleno toho bylo substitucí AsnA21 za Gly a přidáním dvou Arg na C-konec B-řetězce. Po injektování vytváří precipitát, který se postupně absorbuje. Na trh byl uveden v roce 2003.

Dalším způsobem, jak prodloužit působení insulinu, je připojení mastné kyseliny k molekule. Vyvinutý tak byl analog *detemir (Levemir®)*, který postrádá ThrB30 a LysB29 je acylovaný kyselinou myristovou, prostřednictvím které se pak insulin váže na albumin. Tím se distribuce v krevním řečišti zpomaluje a účinek působení se prodlužuje (85). Schválený a uvedený do praxe byl v roce 2006.

Úplně novým v řadě insulinů s prodlouženým působením je insulin *degludec*, který byl schválený na podzim 2011. Je to desB30-insulin s modifikací v pozici B29, kde je na Lys přes kyselinu glutamovou navázaná hexadekandiová kyselina. Dlouhý účinek Degludecu je daný postupným uvolňováním monomerů z rozpustných multi-hexamerů tvořených po subkutánním podání (86). Pozorováno bylo také snížení výskytu hypoglykemických stavů (87).

Basální insuliny mají za cíl udržovat stálou hladinu insulinu v době mezi jídly a v noci, a zároveň umožnit pacientům co nejmenší počet nutných injekcí během dne.

Doba účinku přirozeného insulinu a jednotlivých analogů je znázorněna na Obr. 11.



Obr. 11: Doba působení lidského insulinu a insulinových analogů. NPH - neutral protamine Hagedorn insulin (85).

Pro aplikaci insulinového analogu je důležité poznání nejenom metabolických účinků insulinu, ale i jeho mitogenní vliv na buňku. Ten může být způsoben zvýšenou afinitou analogu k receptoru podobnému insulinovému receptoru - k IGF-1 receptoru. Ověřování mitogenicity je proto výraznou složkou výzkumu analogů. O to víc, že úpravy C-konce B-řetězce sice snižují agregační vlastnosti insulinu, ale zároveň zvyšují podobnost s hormonem IGF-1 (např. záměna Lys-Pro či přidání bazických aminokyselin Arg-Arg). Pro zvýšené mitogenní účinky pozorované u potkanů byl již z klinických studií stažen AspB10-insulin (88,89).

Zvýšenou afinitu k IGF-1R vykazují i analogy lispro a glargine, avšak ani u jednoho z nich nebyla pozorována signifikantní zvýšená mitogenní aktivita *in vitro* ani *in vivo*. Nicméně je možné, že tyto analogy můžou mít jistý vliv na rozvoj retinopatie (90). Karcinogenním účinkům insulinů s dlouhou dobou působení, zejména insulinu glargine, se věnovalo několik studií ve Velké Británii, Švédsku, Dánsku, Německu či Holandsku (91-93). Sledováni byli většinou pacienti s diabetem 2. typu. Studie se shodují, že používání analogů má dokonce nižší riziko v rozvoji rakoviny v porovnání s používáním lidského insulinu. V neprospěch glarginu je však mírně zvýšené riziko vzniku rakoviny prsu, opět v porovnání s užíváním lidského insulinu (93). Studie také ukazují, že diabetičtí pacienti jsou pravděpodobně rizikovější skupinou, proto by jejich sledování mělo být důležitým kritériem samotné léčby.

1.6. Aktivní forma insulinu

Přesné údaje o struktuře insulinu vázajícího se na IR zůstávají stále nejasné, a to z důvodu již zmíněné prozatím neúspěšné krystalizace a vyřešení struktury komplexu insulin-receptor. Proto se předpokládaná aktivní konformace insulinu - konformace molekuly vázající se na receptor, která je schopna vyvolat správnou biologickou odpověď - odvolává na výsledky studia pozměněných insulinových molekul (insulinových analogů). Nejčastěji jsou to výsledky metod rentgenové krystalografie, NMR metod nebo metod využívajících kovalentní síťování specifických aminokyselin v molekule insulinu s vazebnými místy v IR (*ligand-receptor crosslinking methods).* Informace o významu té které aminokyseliny, její kostry či postranního řetězce odkrývají střípky ve složité mozaice strukturně-funkčního vztahu insulin-receptor. Otázkou ale pořád zůstává, jak moc je konformace insulinu v krystalu nebo roztoku podobná konformaci hormonu vázaného na receptor a jaké konformační změny efektivně ovlivní interakci insulinu s receptorem.

Postranní řetězce aminokyselin i peptidová kostra molekuly insulinu se účastní mnoha interakcí intramolekulárních (uvnitř molekuly) i intermolekulárních (s jinou molekulou, tj. s receptorem anebo vodou jako rozpouštědlem). Tvoří tak bohatou síť interakcí, která může být specificky ovlivněna substitucí, modifikací, vypuštěním či přidáním aminokyselin (přirozených i nepřirozených). Následně se sleduje jejich vliv na správnou biosyntézu molekuly, afinitu k receptoru anebo vyvolání správné biologické odpovědi. Krystalové struktury méně či více aktivních analogů (vždy v porovnání s přirozeným insulinem) odkrývají výhodnější či naopak méně výhodnou konformaci insulinu potřebnou pro správné fungování hormonu. Tzv. racionální design nových insulinových analogů velkou mírou pomáhá v odhalování strukturně-funkčního vztahu insulin-receptor.

Tato práce se zabývá studiem C-konce B-řetězce a jeho vlivem na formování aktivní konformace insulinu. Proto následující přehled literatury bude více zaměřen na tuto část hormonu.

1.6.1. Význam C-konce B-řetězce na vazbu k receptoru

Velmi nízká biologická aktivita des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI), jenom 0,1% v porovnání s přirozeným insulinem, poukázala již před 50 lety na důležitou funkci C-konce

B-řetězce v působení insulinu (94,95). V podstatě od té doby trvající intenzivní výzkum analogů s modifikací na C-konci B-řetězce přinesl velké množství poznatků o vzájemném strukturně-funkčním vztahu této části insulinu. Systematicky se sledoval vliv zejména jednotlivých pozic na afinitu, které jsou součástí klasického vazebného povrchu insulinu. Neméně důležité bylo i sledování asociačních vlastností insulinu, jelikož je tato část molekuly i součástí dimerního povrchu. Disociace insulinu na monomer je totiž nutnou podmínkou pro vazbu na receptor. A jak již bylo zmíněno, oblasti insulinu zodpovědné za dimerizaci a hexamerizaci se do velké míry kryjí s vazebnými místy 1 a 2 pro receptor.

Strukturní podobnost insulinu s molekulou IGF-1 inspirovala aplikaci některých strukturních rysů specifických pro IGF-1 na molekulu insulinu. Tak vznikl spojením pozice A1 amidovou vazbou s pozicí B29 jednořetězcový insulin, který si sice zachovává strukturu přirozeného insulinu, ale postrádá jeho biologickou aktivitu (96,97). Vložením různě dlouhých můstků mezi N-konec A-řetězce a C-konec B-řetězce vznikly tzv. miniproinsuliny, jež už vykazují vyšší vazebnou afinitou v porovnání s 0,1% jednořetězcovým insulinem, a to za stálého zachování insulinové struktury. Toto pozorování poukazuje na význam přístupnosti N-konce A-řetězce i flexibilitu C-konce B-řetězce, které jsou jejich spojením při vazbě na receptor výrazně omezeny (97,98).

Výsledky cíleně specifických substitucí aminokyselin insulinu alaninem ukazují, že nejhorší dopad na vazebnou afinitu k receptoru mají mutace v pozicích LeuB6, GlyB8, GlyB23, PheB24, IleA2, ValA3 a TyrA19 (49). Fakt, že hydrofobní IleA2 a ValA3 jsou ukryté pod C-koncem B-řetězce, znamená, že musí docházet minimálně k částečnému odklopení C-konce B-řetězce. Tento mechanismus byl již dříve navržen i potvrzen různými vědeckými skupinami (97,99,100). Zkrácení C-konce B-řetězce až o pět aminokyselin spolu s amidací pozice B25, des(B26–B30)pentapeptid-B25-amid-insulin (DPI-amid), nemá vliv na vazbu k receptoru a dále stvrzuje hypotézu o potřebném odklopení C-konce při vazbě na receptor (27). O významu výše vypsaných aminokyselin pro vazbu na receptor vypovídají i velmi nízké afinity přirozeně se vyskytujících mutatních insulinů: SerB24 „Los Angeles“ insulin (0,7–16%) (101,102), LeuB25 „Chicago“ insulin (1–5%) (38,103,104) a LeuA3 „Wakayama“ insulin (0,2%) (105).

Velkou pozornost poutá aromatický triplet C-konce B-řetězce tvořený PheB24, PheB25 a TyrB26. Aromaticita je v této oblasti evolučně značně zachovaná, což ukazuje na její význam

ve strukturně-funkčním vztahu insulinu. Zkoumány byly příspěvky každé pozice zvlášť, což dokládají desítky připravených analogů.

1.6.1.1. Pozice B24

Záměna PheB24 za jakoukoliv jinou L-aminokyselinu má na afinitu k receptoru negativní vliv. Potvrzují to nízké vazebné afinity analogů LeuB24-insulinu, AlaB24-insulinu, SerB24-insulinu („Los Angeles" insulin), přičemž nejvyšší vazebnou afinitu vykazuje LeuB24-insulin, a to pouze 10–20 % (106,107). Tolerovaný je v této pozici jenom glycin, příslušný analog GlyB24-insulin se váže s 22–78% afinitou v porovnání s přirozeným insulinem (101,108,109). Opačný vliv ale překvapivě mají analogy s D-aminokyselinou vloženou na místo původního PheB24, které vykazují zvýšenou afinitu k receptoru, 150 % u D-AlaB24-insulinu a 180 % u D-PheB24-insulinu (101).

Analog se záměnou aminokyselin v pozicích B24 a B26, TyrB24-PheB26-insulin s velmi nízkou afinitou k IR (2%), je v protikladu s 163% afinitou D-TyrB24-PheB26-insulinu (110). Naproti tomu ale zkrácené analogy s D-aminokyselinou v pozici B24 vykazují afinitu asi 10x slabší, např. D-PheB24-des(B26-B30)pentapeptid-B25-amid-insulin (111). GlyB24-des(B26-B30)pentapeptid-B25-amid-insulin má jenom 1 % vazebné afinity v porovnání s přirozeným insulinem (112). Postranní řetězec PheB24 směřuje dovnitř molekuly k hydrofobnímu jádru, i proto není zcela jasné, zda je důležitý pro udržení stability struktury molekuly nebo se účastní konformačních změn při vazbě na receptor či zda sám přispívá k vazbě tím, že se přímo váže na receptor. Weiss a kol. ve své studii ukázali, že k vazbě na receptor pravděpodobně dochází, a to na L1 doménu α-podjednotky (113). Dále bylo zjištěno, že neaktivní SerB24-insulin zachovává nativní konformaci insulinu, naopak více aktivní GlyB24-insulin má C-konec B-řetězce vysoce neuspořádaný (99). Flexibilita C-konce B-řetězce má tedy pravděpodobně svůj význam v interakci insulin-IR.

1.6.1.2. Pozice B25

Aromatický postranní řetězec PheB25 je v této pozici podstatný pro silnou afinitu k receptoru. Substituce tyrosinem dává analog s plnou vazebnou afinitou (110), což není tak překvapivé vzhledem k výskytu této mutace u některých druhů obratlovců. Oproti pozici

B24 však D-aminokyseliny nejsou v poloze B25 tolerovány, stejně jako nearomatické aminokyseliny. Dokazují to nízké afinity těchto analogů: D-TyrB25-PheB26-insulin (0,1 %), D-PheB25-insulin (4 %) (114), LeuB25-insulin „Chicago“ (1–2 %) (106), SerB25-insulin (1 %) (101), AspB25-insulin (0,1 %) (28). Tolerován není glycin ani alanin, neboť afinity těchto analogů jsou opět velmi nízké, a to 1,5 % (108) a 7 % (66). Vzdálenost aromatického kruhu od peptidového řetězce se zdá být také důležitým prvkem ve vazebném vztahu s receptorem vzhledem k nízké afinitě analogu s homoPhe v této pozici (95). Postranní řetězec PheB25 je podle výsledků z krystalových struktur orientován ven od povrchu molekuly. I proto bylo navrženo, že je to místo prvního kontaktu molekuly insulinu s receptorem (95). Studie s foto-aktivovatelným *p*-azidoPhe v pozici B25 ukázaly, že dochází k jejímu kontaktu s C-koncem receptorové α-podjednotky, konkrétně s CT-peptidem (67).

1.6.1.3. Pozice B26

Tato pozice je z aromatického tripletu C-konce B-řetězce nejvíc tolerantní k záměnám, přičemž tolerance D-aminokyselin je porovnatelná s tolerancí L-aminokyselin. Připraveny byly desítky analogů méně či více aktivních. Substituce alaninem nemá tak závažný dopad na vazebnou afinitu, která poklesla jenom 2,5krát oproti 20–100násobnému poklesu u analogů se změnou v pozicích B25 a B24 (49). Některé analogy zkrácené o čtyři aminokyseliny a s C-koncovým amidem ovšem vykazují extrémně vysokou afinitu, u D-AlaB26-des(B27-B30)tetrapeptid-B26-amid-insulinu a SarB26-des(B27-B30)tetrapeptid-B26-amid-insulinu dokonce desetinásobnou (115,116). Výsledky naší laboratoře ukazují, že zatímco některé des(B27-B30)tetrapeptid-B26-amid (DTI-amid) zkrácené analogy vykazují silnou afinitu k receptoru, jejich analogy s plnou délkou se vážou k receptoru několikanásobně slaběji než lidský insulin (117). Jak již bylo zmíněno, analog zkrácený až po TyrB26, des(B26-B30)pentapeptid-B25-amid-insulin, zachovává plnou afinitu k receptoru. Také tyrosin v pozici B26 není tak silně evolučně konzervován jako jsou pozice B24 a B25. Studium s foto-aktivovatelnými skupinami potvrdilo interakci TyrB26 s L1 doménou insulinového receptoru (118). Avšak přesná úloha ve strukturně-funkčním vztahu není známá, vyjma účasti při tvorbě dimerů.

1.6.1.4. Peptidové vazby B24–B25 a B25–B26

Kromě příspěvků postranních řetězců jednotlivých pozic byl výzkum zaměřen také na vliv peptidového řetězce (kostry molekuly) na vazebnou afinitu hormonu. Vložení redukované peptidové vazby ψ(CH_2-NH) má u vazeb B24–B25 a B25–B26 fatální důsledky pro vazbu na receptor, podobně jako u des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI). Z výsledků vyplývá, že interakce, kterých se karbonyly příslušných peptidových vazeb účastní, jsou pro vazbu důležité (112). Podobný výsledek byl publikován s insulinem, který měl peptidovou vazbu B24–B25 nahrazenou esterovou: (B24–B25 CO-O)-insulin, tzv. depsi-insulin. NMR metodou bylo zjištěno, že postranní řetězec B25 je v tomto případě orientován dovnitř molekuly, přičemž výsledkem je neaktivní analog (119).

C-konec B-řetězce, zejména jeho aromatické aminokyseliny PheB24, PheB25 a TyrB26, jsou součástí klasického vazebného povrchu molekuly insulinu. Mají tak svůj zásadní význam v interakci s receptorem. Mimo to se tyto aminokyseliny účastní vazeb potřebných pro dimerizaci insulinu. Na insulinový receptor se však insulin váže v monomerní formě. Výsledky dlouholetého bádání ovšem ukazují, že monomerní forma insulinu v hexamerní či dimerní struktuře se odlišuje od té, kterou se insulin váže na receptor a která spouští biologickou odpověď. Hledání aktivní konformace insulinu je tudíž významnou složkou strukturního výzkumu této molekuly, kterou se zabývá i tato práce.

2. Cíle práce

1. Studium funkční a strukturní charakterizace B26-analogů s cílem definovat aktivní konformaci insulinu na C-konci B-řetězce. Syntéza a charakterizace zkrácených a nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen nekódovanými aminokyselinami.

2. Syntéza a charakterizace analogů selektivně *N*-methylovaných v pozicích B24, B25 a B26 se specifickým zaměřením na dimerizační vlastnosti připravených analogů.

3. Studium příspěvku TyrB26 v aktivní formě insulinu. Syntéza a charakterizace nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen za kódované aminokyseliny.

4. Syntéza a charakterizace nových analogů insulinu modifikovaných v poloze B24 za účelem studia role PheB24 při tvorbě aktivní formy insulinu.

5. Určení vazebných afinit insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu vůči isoformě A insulinového receptoru v rámci studie rozdílů v signalizaci této isoformy (IR-A) po stimulaci insulinem, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinem.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál

2-chlortritylová pryskyřice	Novabiochem Merck
Sieber amidová pryskyřice	Novabiochem Merck
N-Fmoc chráněné aminokyseliny	Novabiochem Merck/Sigma-Aldrich
1-methyl-2-pyrrolidinon (NMP)	Sigma-Aldrich
2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorfosforečnan (HBTU)	Novabiochem Merck
Bromo-tris-pyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfát (PyBroP)	Novabiochem Merck
N,*N*-diisopropylethylamin (DIPEA)	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich/Penta
Dichlormethan (DCM)	Penta
Trifluoroctová kyselina	Sigma-Aldrich
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Tosyl fenylalanyl chloromethyl keton trypsin (TPCK trypsin)	Sigma-Aldrich
Penicilin G acyláza	Sigma-Aldrich
Buněčná linie IM-9	ATCC
RPMI-1640 medium	Gibco
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
L-glutamin a Penicilin/Streptomycin	Gibco
Lidský insulin, rekombinantní	Sigma-Aldrich
Mono-^{125}I-TyrA14-lidský insulin	Amersham; Perkin Elmer
Vepřový insulin	Spofa

Ostatní běžné chemikálie čistoty p.a. byly použity od firem Lachema a Sigma-Aldrich.

3.2. Syntéza peptidů na pevné fázi

Tetrapeptidy (B23–B26) insulinu a insulinových analogů byly syntetizovány na Sieber amidové pryskyřici. Oktapeptidy (B23–B30) insulinu a insulinových analogů byly syntetizovány na 2-chlortritylové pryskyřici. Výsledkem syntézy jsou pak tetrapeptidy s C-koncovým amidem či oktapeptidy s C-koncovou kyselinou. Syntéza probíhala dle postupu pro syntézu peptidů na pevné fázi (120). Navázání *N*-Fmoc chráněné aminokyseliny s chráněným postranním řetězcem probíhalo v 1-methyl-2-pyrrolidinonu (NMP) za působení kondenzačního činidla 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorfosforečnanu (HBTU) v přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA). Po *N*-methylované aminokyselině byl jako kondenzační činidlo použit bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (PyBroP). Jednotlivé kondenzační kroky byly kontrolovány Kaiserovým testem (121). Kvantifikace deprotekce skupiny Fmoc piperidinem byla určena absorbancí komplexu piperidin-dibenzofulven při 301 nm. Štěpení peptidu z pryskyřice probíhalo 2 hodiny ve směsi kyselina octová (konc.) : trifluroethanol (TFE) : dichlormethan (DCM) = 2 : 2 : 6 (v/v/v). Po vysušení peptidu ve vakuu byly působením směsi trifluoroctové kyseliny : triisopropylsilanu (Tis) : H_2O : DCM = 50 : 2 : 2 : 46 (v/v/v/v) odštěpeny chránící skupiny postranních skupin aminokyselin. Po dalším vysušení peptidu ve vakuu byl peptid extrahován diethyleterem, sraženina rozpuštěna v 10% kys. octové a purifikována použitím RP-HPLC (kolona Phenomenex Luna C18 250x21,20 mm či kolona Watrex C18 250x21 mm Nucleosil 120-5) gradientem dvou mobilních fází: A - 0,1% TFA, B - 80% ACN s 0,1% TFA. Sledována byla vždy absorbance při 218 nm a 258 nm. Identita peptidu byla ověřena hmotnostní spektrometrií ESI-MS a případně NMR spektrometrií (^{1}H a ^{13}C). Čistota připraveného peptidu byla určena pomocí analytického RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x4 mm, Nucleosil 120-5).

3.3. Příprava des(B23–B30)oktapeptid insulinu (DOI)

3.3.1. Odstranění zinku z krystalického insulinu

Nejprve byl rozpuštěn 1 g vepřového insulinu v 70 ml 0,25M HCl. Přidáním 1 litru vychlazeného acetonu (4°C) došlo k vysrážení insulinu. Peleta byla odstředěna (20 minut, 2000 x g) a po vysušení rozpuštěna v 10% kys. octové (v/v). Vzniklý roztok insulinu bez přítomnosti zinku byl lyofilizován.

3.3.2. Enzymatické štěpení insulinu

Štěpení insulinu bylo provedeno dle již publikovaného protokolu (122). Insulin bez zinku o hmotnosti 500 mg byl rozpuštěn ve 100 ml 0,05M Tris/HCl pufru, pH 9,0–9,2. K danému roztoku bylo přidáno 10 mg trypsinu rozpuštěného v 10 ml 0,1M $CaCl_2$. Reakce probíhala 20 hodin při pokojové teplotě, ukončena byla upravením pH směsi na 5,4, čímž došlo k vysrážení produktů. Po odstředění směsi (20 minut, 2000 x g) byla peleta rozpuštěna v 10% kys. octové (v/v) a zlyofilizována. Vzniklý lyofilizát byl purifikován na chromatografické koloně Sephadex G50 (Medium; 120 x 3,4 cm), kde byla mobilní fázi 10% kys. octová. Identita získaného des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) byla určena hmotnostní spektrometrii ESI-MS a čistota ověřena pomocí analytické RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x4 mm, Nucleosil 120-5).

3.4. Enzymatická semisyntéza

Semisyntéza zkrácených insulinových analogů i analogů plné délky probíhala za katalýzy trypsinem (123). Připravený peptid o koncentraci 150 mM byl spolu s DOI o koncentraci 30 mM rozpuštěn v 200 μl 55% DMF (v/v) a 45% (v/v) 50 mM octanu vápenatého. Přidán byl trypsin v molárním poměru enzym/DOI = 1:50; pH směsi bylo *N*-methylmorfolinem upraveno na hodnotu 7,0. Reakce probíhala při pokojové teplotě po dobu 5–24 hodin, v závislosti na rychlosti tvorby produktu. Průběh reakce byl sledován na analytickém RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x4 mm, Nucleosil 120-5). Reakce byla ukončena přidáním acetonu, vysušením a rozpuštěním precipitátu v 10% kys. octové (v/v). Purifikace produktu probíhala na semipreparativním RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x8 mm, Nucleosil 120-5)

použitím gradientu dvou mobilních fází (A - 0,1% TFA, B - 80% ACN s 0,1% TFA), a to - čas(min)/%B: 0/10, 1/35, 21/45, 34/55, 36/90, 37/90, 37,1/10. Sledována byla vždy absorbance při 218 nm a 258 nm. Identita byla ověřena hmotnostní spektrometrii ESI-MS a čistota pomocí analytického RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x4 mm, Nucleosil 120-5). Výtěžek reakce byl vztažen k limitující složce reakce, a to k počátečnímu množství DOI.

3.5. Enzymatická deprotekce Lys(Pac)

Na syntézu insulinových analogů s plnou délkou byl použit Fmoc-Lys(Pac), kde ε-amino skupina lysinu byla chráněna fenylacetylovou skupinou (Pac) (120). Odstranění fenylacetylové skupiny probíhalo enzymaticky, a to působením penicillin G acylázy (penicillin aminohydroláza či penicillin amidáza, PA) izolované z *Escherichia Coli*. Připravený analog insulinu s Lys(Pac) v pozici B29 (5 mg) byl rozpuštěn v 1 ml 0,05M K-fosfátového pufru pH 7,5 s přídavkem 10 IU enzymu PA. Reakce probíhala při pokojové teplotě (u *N*-methylovaných analogů při 37°C), průběh byl opět sledován na analytickém RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x4 mm, Nucleosil 120-5). Po kvantitativní přeměně chráněného reaktantu na produkt byla reakce zastavena, následně byl produkt purifikován použitím semipreparativní kolony na RP-HPLC (kolona Watrex C18 250x8 mm, Nucleosil 120-5). Sledována byla vždy absorbance při 218 nm a 258 nm. Identita produktu byla ověřena hmotnostní spektrometrii ESI-MS. Čistota produktu byla potvrzena analýzou použitím analytického RP-HPLC.

3.6. Vazebné testy *in vitro*

3.6.1. Izolace plasmatických membrán z potkaních tukových buněk

Epididymální tuková tkáň byla izolována ze samců potkanů kmene Wistar dle již dříve publikovaného postupu (124). Homogenizace tkáně byla provedena ultra-turraxem v izolačním pufru (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 250 mM sacharosa, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin) a následně centrifugována (15 minut, 3000 x g, 4°C). Supernatant byl opět centrifugován (15 minut, 17 000 x g, 4°C), přičemž peleta obsahující plasmatické membrány byla rozpuštěna v malém množství homogenizačního pufru (50 mM Tris/HCl pH 7,6) a

homogenizována v homogenizátoru (sklo-teflon). Obsah proteinů byl stanoven dle Bradfordové (125).

3.6.2. Testování vazebné afinity vůči IR z potkaní tukové tkáně

Plasmatické membrány obsahující insulinový receptor (50 μg proteinů) byly inkubovány spolu s ^{125}I-insulinem o koncentraci 5.10^{-11} M (57 000 dpm, specifická aktivita 2200 Ci/mmol) a koncentrační řadou (10^{-6}–10^{-13} M) lidského insulinu či insulinového analogu. Reakce probíhala 21 hodin při 4°C ve vazebném pufru (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 2 mM *N*-ethylmaleimid; 13,2 mM $CaCl_2$ a 0,1% BSA (w/v)). Reakce byla zastavena přidáním ledového 120 mM NaCl a membrány následně filtrovány použitím filtračního zařízení firmy Brandel. Navázaný radioaktivní insulin byl změřen na γ-counteru (Perkin-Elmer, USA). Inhibiční koncentrace IC_{50} insulinu či analogů byly určeny v programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese kompeticí o stejné vazebné místo.

3.6.3. Testování vazebné afinity vůči IR v membránách lymfocytů IM-9

Testování vazebné afinity insulinových analogů bylo v laboratoři Dr. Jiráčka prováděno na membránách buněk tukové tkáně potkanů po řadu let. Avšak vzhledem k náročným požadavkům pro udržování speciální laboratoře určené pro chov zvířat, bylo cílem naší laboratoře zavést jiný, nenáročný způsob testování *in vitro*, a to na buněčných liniích. To bylo umožněno ve spolupráci s laboratoří Pierra De Meytse z Hagedorn Research Institute v Kodani, kde autorka této práce absolvovala krátkou stáž s cílem zavést novou metodu v laboratoři Dr. Jiráčka.

Vazebné testy byly úspěšně zavedeny na buněčné linii IM-9, což jsou lidské lymfocyty obsahující insulinový receptor, a to výhradně jako jeho isoformu IR-A. Naproti tomu tukové buňky obsahují více isoformy IR-B (60–80 %) (126,127). Afinita insulinu vůči isoformám je však velmi podobná.

Buněčná linie IM-9 byla pěstována podle pokynů výrobce (ATCC, USA). Buňky rostly v RPMI-1640 mediu obsahujícím 10 % FBS (v/v; *fetal bovine serum*), 100 IU/ml roztok streptomycin-penicillin a 2 mM L-glutamin (vše od firmy Gibco, USA) v inkubátoru s 5 % CO_2 při teplotě 37°C. Buňky byly pasážovány třikrát týdně.

Protokol pro testování vazebné afinity na buňkách IM-9 byl převzat z laboratoře Pierre De Meytse z Hagedorn Research Institute v Dánsku (17). Pro pokus byl vždy připraven roztok buněk o koncentraci 2,0 mil. buněk/ml resuspendovaných ve vazebném pufru (100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA, 10 mM glukosa, 15 mM NaOAc, 1% BSA (w/v), pH 7,6). Buňky byly inkubovány s ^{125}I-insulinem (20 000 cpm, specifická aktivita 2200 Ci/mmol, 0,01 nM) a koncentrační řadou (10^{-6}–10^{-11} M) lidského insulinu či insulinového analogu. Reakce ve vazebném pufru probíhala 2,5 hodiny při 15°C. Po ukončení reakce byly připraveny duplikáty po 200 μl, následně centrifugovány (10 minut, 13 000 x g, 4°C) a supernatant odsát. Pelety obsahující navázaný radioaktivní insulin byly změřeny na γ-counteru (Perkin-Elmer, USA). Disociační konstanta K_d insulinu či analogu byla určena programem vyvinutým v laboratoři Pierra De Meytse (A. V. Groth and R. M. Shymko, Hagedorn Research Institute, Denmark) modelem nelineární regrese pro kompetici do jednoho vazebného místa. Hodnota disociační konstanty mono-^{125}I-TyrA14-lidského insulinu je pro vazbu k IR-A 0,3 nM (stanoveno v laboratoři Pierra De Meytse v Dánsku).

3.7. Isothermální titrační mikrokalorimetrie (ITC)

Dimerizační schopnosti insulinu a insulinových analogů byly měřeny postupem uvedeným Lovattem v roce 1996 (128). Pro měření byly připraveny 1 mM roztoky insulinu (lidský a vepřový), DOI a insulinových analogů v glycinovém pufru (0,1M glycin/HCl pH 2,5), ve výsledném objemu 1 ml. Roztok byl dialyzován v dialyzačních kazetách (Mw 2000, Slide-A-Lyzer, Pierce, USA) proti 600 ml glycinového pufru při 4°C, přičemž roztok byl vyměněn třikrát (po 3, 20 a 26 hodinách). Přesná koncentrace dialyzovaného roztoku byla stanovena spektrofotometricky při 280 nm; insulin: $\varepsilon = 5840\ M^{-1}cm^{-1}$, DOI: $\varepsilon = 4560\ M^{-1}cm^{-1}$. Stanovená koncentrace byla ještě ověřena aminokyselinovou analýzou. Finální roztoky peptidů i dialyzační pufr (poslední, proti kterému se roztok peptidu dialyzoval) byly těsně před měřením odvzdušněny v ultrazvukovém sonikátoru.

Pro kalorimetrické měření byl použit kalorimetr VP-ITC® (MicroCal, USA), který obsahuje reakční celu o objemu 1,417 ml a stříkačku o objemu 277 μl. Přístroj byl ekvilibrován na 25°C. Roztok peptidu byl stříkačkou za stálého míchání (307 rpm) titrován do dialyzačního pufru v cele. Průběh reakce byl zaznamenáván programem MicroCal LLC Origin (verze 7). Každé

měření tvořilo 20 injekcí po 12,5 μl roztoku insulinu (první nástřik byl jenom 2 μl), přičemž časové intervaly mezi nimi byly 300 s.

Výsledkem měření je záznam závislosti změny tepelné kapacity na čase. Integrací tepelných píků byla určena křivka závislosti vazebné entalpie na koncentraci vzorku. Hodnoty ΔH a K_d disociace dimeru insulinu na monomer byly určeny nelineární analýzou použitím disociačního modelu programu MicroCal LLC Origin. Tento program, zejména jeho část pro vyhodnocování disociačních měření, byl aktualizován v laboratoři Dr. Alana Coopera (College of Science and Engineering, Glasgow University, Velká Británie).

3.8. Krystalografické studie

Krystalizace analogů, analýza krystalů rentgenovou difrakcí a vyhodnocení výsledků po rentgenové difrakci vybraných insulinových analogů byly provedeny v laboratoři Dr. A. M. Brzozowského na Univerzitě v Yorku (York Structural Biology Laboratory, University of York, Velká Británie). Z tohoto důvodu bude metodika popsána jen velmi stručně.

Krystalizacím všech insulinových analogů předcházelo rozpuštění v 20 mM HCl (koncentrace 10 mg/ml). Pro krystalizaci byly použity optimalizované podmínky příznivé pro růst insulinových krystalů. Proces krystalizace probíhal metodou visící kapky, přičemž byl použit 1 μl roztoku insulinu a 1 μl mateřského roztoku. Finální koncentrace proteinů byla v rozsahu 2–5 mg/ml. Doba krystalizace se lišila v závislosti na analogu, od několika dní až po několik měsíců. Vzniklé krystaly o velikosti přibližně 100x50x20 μm byly zmraženy v kapalném dusíku; rentgenová difrakce byla měřena při 100 K. Následně byla data integrována a vyhodnocena v programu HKL2000 (129). Refinování bylo provedeno programem Refmac5.6 (130). Modelování struktur bylo provedeno v programech COOT a CCP4MG. Detailní popis krystalizačních podmínek jednotlivých analogů a výsledná strukturní data jsou uvedeny vždy v dodatku příslušných článků v příloze.

3.9. NMR spektroskopie

NMR spektra insulinu a insulinových analogů i jejich následné strukturní analýzy byly provedeny Dr. V. Veverkou z ÚOCHB, AV ČR.

Pro měření NMR spekter byly připraveny 0,1–0,25 mM vzorky (0,35 ml) insulinových analogů v 20% deuterované kys. octové (pH 1,9) nebo v 25 mM Tris/HCl deuterovaném pufru (pH 8,0), v obou případech obsahující 5 % D_2O/95 % H_2O. Měření probíhalo při 25°C na 600 MHz spektrometru (Bruker Avance) s $^{15}N/^{13}C/^{1}H$ kryosondou. Pro přiřazení NMR signálů jednotlivým atomům v molekule byla použita spektra 2D TOCSY, 2D DQF-COSY a také 2D NOESY spektra.

Prvotní struktury byly nejdříve počítané programem Cyana 2.1 (131,132), a to přiřazením strukturních parametrů (meziatomové vzdálenosti NOE; dihedrální úhly Φ a Ψ). Finální úpravy struktur byly provedeny molekulovou dynamikou v programu AMBER (133,134). Celkem 30 finálních struktur bylo analyzováno v programech Molmol (135), Molprobity (136) a PyMol (The Pymol Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4, Schrödinger, LLC).

3.10. Molekulové modelování

Molekulové modelování insulinu a insulinových analogů bylo provedeno Dr. M. Lepšíkem z ÚOCHB, AV ČR.

Základem pro modelování byla dimerní struktura lidského insulinu určená rentgenovou krystalografií (PDB kód 1MSO) (25). Použit byl zvlášť monomer 1 (řetězce AB) a zvlášť monomer 2 (řetězce CD). V případě konformačních změn postranních řetězců byl použit jenom monomer 1. Molekuly vody byly odstraněny kromě vody přemosťující TyrB26 a GlyB8 (označená jako Wat1). Vodíky byly přidány algoritmem Reduce a modulem LEaP v programu AMBER (134,137). Pozice vodíků byly relaxovány za využití krátké vysokoteplotní molekulové dynamiky (2 ps při 2400 K a následné zchlazení na 0 K během 8 ps). Histidiny byly modelovány jako neutrální (protonované na N^{ε}), kromě HisB5 v C-D monomeru, který byl kvůli vodíkovým vazbám protonován na N^{δ}. Aminokyseliny na N- i C-konci a také všechny Asp, Glu, Arg a Lys byly ionizované. Elektronová hustota pro PheB1 nebyla ve struktuře 1MSO lokalizována, proto byla tato pozice domodelována pomocí molekulové dynamiky. Parametry pro aminokyseliny byly použity ze silového pole AMBER (ff99SB) (138). Mutace v pozici B26 byly provedeny odstraněním původního Tyr a následným domodelováním příslušné aminokyseliny (Asn, Gln a Phe) LEaP modulem a molekulovou dynamikou.

Efekt mutace v poloze B26 byl odhadnut pomocí interakčních energií postranních řetězců B26 se zbytkem molekuly dimeru insulinu. Byla použita semiempirická kvantově-chemická metoda s korekcemi pro disperzní interakce a vodíkové vazby (PM6-D2) (139,140). Solvatace byla zahrnuta pomocí implicitního modulu COSMO s $\varepsilon_r = 78{,}4$ (141).

4. Výsledky

4.1. Studium funkční a strukturní charakterizace B26-analogů s cílem definovat aktivní konformaci insulinu na C-konci B-řetězce. Syntéza a charakterizace zkrácených a nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen nekódovanými aminokyselinami.

Výsledky práce byly prezentovány v publikaci: Jiráček, J., Žáková, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G. & Brzozowski, A. M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** *U.S.A.* 107:1966–1970.

4.1.1. Příprava peptidů metodou syntézy na pevné fázi

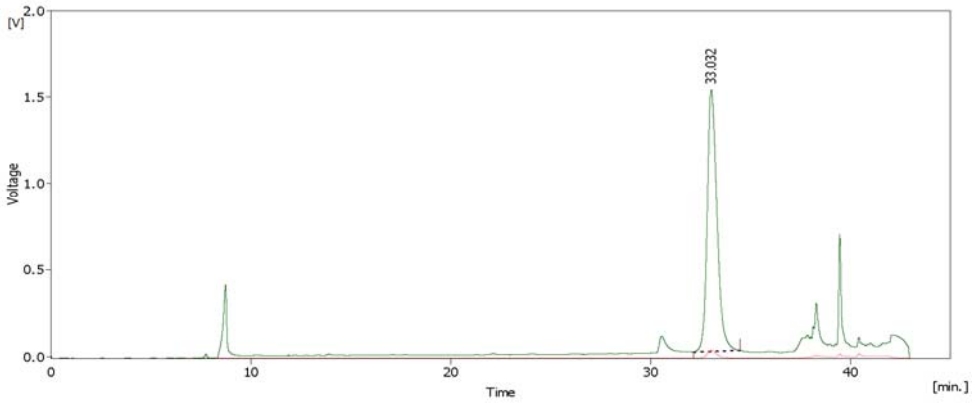
Pro tuto studii byla připravena série insulinových analogů s modifikací v poloze B26. Připraveny byly tetrapeptidy, pentapeptidy a oktapeptidy, vše deriváty C-koncové sekvence B23–B30 B-řetězce lidského insulinu. Tetrapeptidy i pentapeptidy byly připraveny ve formě C-koncových amidů (v Tab. 1 označených $-NH_2$) či volných C-koncových kyselin. Oktapeptidy byly připraveny jenom ve formě volných C-koncových kyselin. Pro přípravu peptidů s C-koncovým amidem byla použita Sieber amidová pryskyřice, v případě volných C-koncových kyselin to byla 2-chlortritylová pryskyřice. Seznam peptidů spolu s výtěžky syntéz je zobrazen v Tab. 1. Oktapeptidy, které obsahují lysin v poloze B29, měly N^{ε}-aminoskupinu chráněnou fenylacetylovou skupinou (Pac). Všechny peptidy vykazovaly čistotu větší než 95 % (RP-HPLC).

Některé peptidy byly připraveny a publikovány již dříve, údaje o jednotlivých peptidech jsou uvedeny v poznámce Tab. 1. Totéž platí pro semisyntetickou přípravu analogů a pro určení jejich vazebných afinit vůči IR (jak bude pojednáno níže). I když byly některé analogy insulinu charakterizovány již dříve, uvedeny jsou zde proto, že byly znova připraveny za účelem krystalografických studií.

Tab. 1: Seznam připravených tetrapeptidů, pentapeptidů a oktapeptidů a výtěžky jejich syntézy. Sekvence jsou psány jednopísmenným kódem s výjimkou substituované aminokyseliny, která je zobrazena třípísmenným kódem v závorce. Údaje o jednotlivých peptidech jsou uvedeny v poznámce. * Peptid syntetizován v laboratoři Dr. J. Ježka (ÚOCHB, AV ČR).

Peptid	*Výtěžek syntézy*	*Poznámka*
tetrapeptidy		
GFF-(*N*Me-Ala)-NH_2	78 %	(142)
GFF-(*N*Me-His)-NH_2	55 %	(142)
GFF-(*N*Me-Phe)-NH_2	64 %	(142)
GFF-(*N*Me-Tyr)-NH_2	84 %	(143)
GFF-(Sar)-NH_2	49 %	tato studie
GFF-(D-Ala)-NH_2	87 %	tato studie
GFF-(Glu)-NH_2	95 %	tato studie
GFF-(*N*Me-Glu)-NH_2	43 %	tato studie
GFF-(Pro)-NH_2	91 %	tato studie
GFF-(D-Pro)-NH_2	83 %	tato studie
GFF-(Pro)	47 %	tato studie
GFF-(Pro)-T	74 %	tato studie
pentapeptidy		
GFF-(Pro)-T-NH_2	73 %	tato studie
GFF-(D-Pro)-T-NH_2	79 %	tato studie
oktapeptidy		
GFF-(*N*Me-Ala)-TP-K(Pac)-T	44 %	(142)
GFF-(*N*Me-Tyr)-TP-K(Pac)-T	*	tato studie

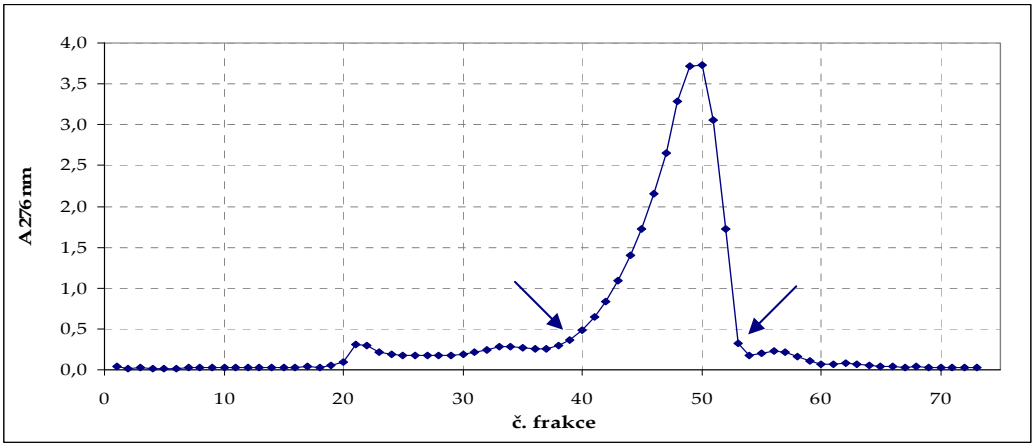
Příklad purifikace tetrapeptidu ukazuje Obr. 12.



Obr. 12: Purifikace surového tetrapeptidu GFF-(D-Pro)-NH_2 s použitím RP-HPLC.

4.1.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI)

Odstranění zinku z krystalického vepřového insulinu bylo provedeno za použití 0,25M HCl a následného vysrážení peptidu acetonem. Výtěžek reakce byl 89 %. Štěpením insulinu trypsinem při pH 9,0–9,2 byl získán des(B23–B30)oktapeptid-insulin (DOI), hepta(B23–B29)peptid a AlaB30. Purifikace asi 790 mg této směsi probíhala na koloně Sephadex G50 (Medium; 120 x 3,4 cm). Získán byl čistý DOI tvořený frakcemi 39–53, které byly spojeny a lyofilizovány (viz chromatogram Obr. 13). Výtěžek tryptického štěpení insulinu a purifikace DOI byl 54 %. Identita produktu byla potvrzena hmotnostní spektrometrií ESI-MS. Čistota produktu byla větší než 95 % (RP-HPLC).



Obr. 13: Chromatogram purifikace des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) na koloně Sephadex G50 v 10% HAc. Šipkami jsou znázorněny frakce 39 až 53 obsahující čistý DOI.

4.1.3. Příprava insulinových analogů metodou enzymatické semisyntézy

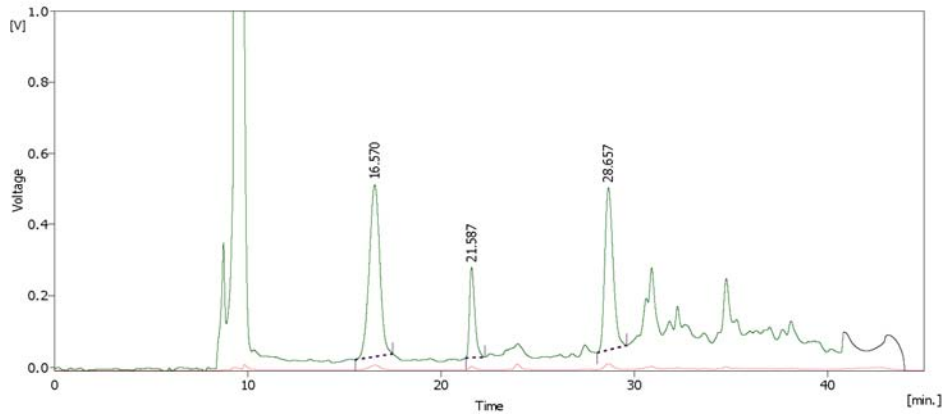
Nové analogy insulinu byly připraveny semisyntézou peptidů (viz. Tab. 1) a des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) působením trypsinu za podmínek popsaných v kapitole 3.4. Obecně probíhá reakce tetrapeptidů rychleji (3–10 hodin) než reakce oktapeptidů (okolo 24 hodin), avšak sekvence peptidů má na délku reakce také značný vliv. Výtěžky semisyntetické reakce jednotlivých analogů jsou uvedeny v Tab. 2. Čistota analogů byla ve všech případech větší než 95 % (RP-HPLC). Semisyntéza byla neúspěšná pouze u peptidu GFF-*N*Me-Glu-NH_2, a tak se analog *N*Me-GluB26-DTIA nepovedlo připravit.

Tab. 2: Seznam připravených insulinových analogů metodou enzymatické semisyntézy. Uvedeny jsou výtěžky semisyntéz, u posledních dvou analogů výtěžky po enzymatické deprotekci.

DTIA - des(B27–B30)tetrapeptid-insulin-B26-amid, DTI - des(B27–B30)tetrapeptid-insulin, DTrI - des(B28–B30)tripeptid-insulin, DTrIA - des(B28–B30)tripeptid-insulin-B27-amid.

Analog	*Výtěžek semisyntézy*
des(B27–B30)tetrapeptid analogy insulinu	
*N*Me-AlaB26-DTIA	18 %
*N*Me-HisB26-DTIA	13 %
*N*Me-PheB26-DTIA	11 %
*N*Me-TyrB26-DTIA	23 %
SarB26-DTIA	23 %
D-AlaB26-DTIA	9 %
GluB26-DTIA	16 %
*N*Me-GluB26-DTIA	0 %
ProB26-DTIA	10 %
D-ProB26-DTIA	18 %
ProB26-DTI	23 %
des(B28–B30)tripeptid analogy insulinu	
ProB26-DTrI	19 %
ProB26-DTrIA	16 %
D-ProB26-DTrIA	16 %
analogy insuliny plné délky	
*N*Me-AlaB26-insulin	21 %
*N*Me-TyrB26-insulin	16 %

Příklad purifikace analogu D-ProB26-DTIA ukazuje Obr. 14. Jednotlivé frakce byly vždy lyofilizovány a jejich identita byla následně potvrzena hmotnostní spektrometrií ESI-MS.



Obr. 14: Purifikace analogu insulinu D-ProB26-DTIA s použitím RP-HPLC. Vyznačené vrcholy odpovídají frakci peptidu GFF-(D-Pro)-NH_2 (R_t = 16,570), frakci DOI (R_t = 21,587) a frakci produktu (R_t = 28,657).

Analogy *N*Me-AlaB26-Lys(Pac)B29-insulin a *N*Me-TyrB26-Lys(Pac)B29-insulin obsahovaly na N^{ε}-aminoskupině lysinu v poloze B29 fenylacetylovou skupinu (Pac), která byla po purifikaci chráněného prekurzoru odštěpena pomocí penicilin G acylázy (viz kapitola 3.5). Výtěžek deprotekce *N*Me-AlaB26-Lys(Pac)B29-insulinu byl po purifikaci 39 % a v případě prekurzoru *N*Me-TyrB26-Lys(Pac)B29-insulinu to bylo 52 %. Čistota výsledných analogů *N*Me-AlaB26-insulinu a *N*Me-TyrB26-insulinu byla větší než 95 % (RP-HPLC).

4.1.4. Vazebné afinity připravených analogů

Pro zjištění vazebných afinit většiny analogů byla použita metoda kompetice analogů s lidským insulinem radioaktivně (^{125}I) značeným v poloze TyrA14 o receptor insulinu v membránách tukových buněk epididymální tkáně potkanů. Převažuje zde isoforma B insulinového receptoru, IR-B. Touto metodou byla určena hodnota IC_{50} analogu a porovnána s toutéž hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,8–1,0 nM (viz kapitola 3.6). V případě některých analogů (*N*Me-GlyB26-DTIA a GluB26-DTIA) byla použita metoda kompetice analogů s lidským insulinem radioaktivně (^{125}I) značeným v poloze TyrA14 o receptor insulinu v membránách lidských lymfocytů IM-9, obsahujících výlučně IR-A isoformu. Touto metodou byla zjištěna hodnota rovnovážné disociační konstanty (K_d) a porovnána se stejnou hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,2–0,4 nM (viz kapitola 3.6).

Výsledky vazebných studií s připravenými analogy jsou uvedeny v Tab. 3 a Tab. 4. Hodnoty IC_{50} a K_d analogů jsou vztaženy k příslušným hodnotám pro lidský insulin a vyjádřeny jako relativní vazebné afinity (v %) podle vztahu: (IC_{50}(K_d) lidského insulinu / IC_{50}(K_d) analogu) x 100. Vazebné křivky analogů testovaných v této studii jsou uvedeny na Obr. 15 a v dodatku publikace (viz Příloha 1).

Tab. 3: Vazebné afinity analogů vůči insulinovému receptoru v plasmatických membránách potkaních tukových buněk. IC_{50} hodnoty lidského insulinu jsou v rozmezí 0,8–1,0 nM. Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM, počet paralelních měření (n) a doplňující údaje o analogu.

Analog	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*		*Poznámka*
lidský insulin	100 ± 5	(8)	tato studie
des(B27–B30)tetrapeptid-insuliny			
*N*Me-AlaB26-DTIA	465 ± 109	(5)	(142)
*N*Me-HisB26-DTIA	214 ± 35	(4)	(142)
*N*Me-PheB26-DTIA	36 ± 5	(3)	(142)
*N*Me-TyrB26-DTIA	72 ± 13	(3)	(143)
SarB26-DTIA	458 ± 3	(2)	tato studie
D-AlaB26-DTIA	482 ± 52	(6)	tato studie
ProB26-DTIA	361 ± 42	(5)	tato studie
D-ProB26-DTIA	356 ± 36	(6)	tato studie
ProB26-DTI	79 ± 13	(4)	tato studie
des(B28–B30)tripeptid-insuliny			
ProB26-DTrI	24 ± 4	(4)	tato studie
ProB26-DTrIA	20 ± 1	(6)	tato studie
D-ProB26-DTrIA	19 ± 1	(4)	tato studie
insuliny plné délky			
*N*Me-AlaB26-insulin	21 ± 3	(4)	(142)
*N*Me-TyrB26-insulin	21 ± 2	(3)	tato studie

Tab. 4: Vazebné afinity analogů vůči insulinovému receptoru v membránách lidských lymfocytů IM-9. K_d hodnoty lidského insulinu jsou v rozmezí 0,2–0,4 nM. Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM a počet paralelních měření (n).

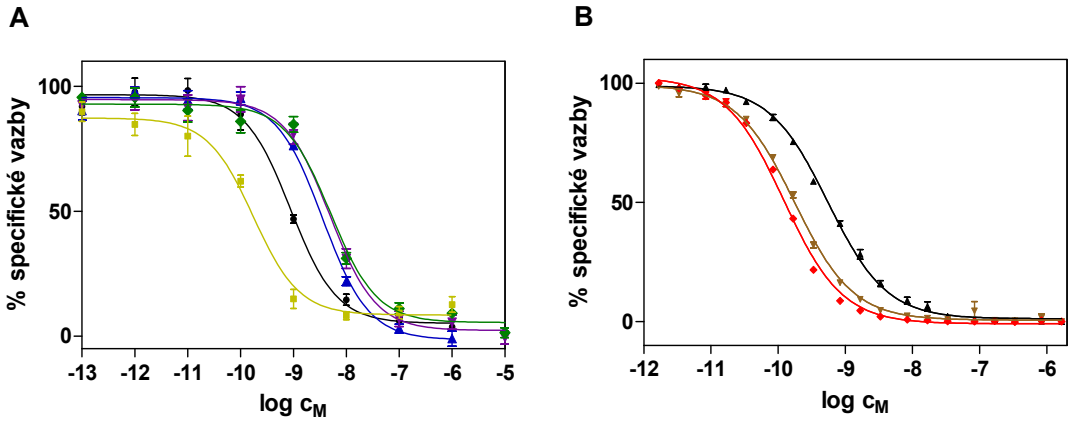
Analog	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*
lidský insulin	100 ± 8 (4)
GluB26-DTIA	315 ± 12 (3)
*N*Me-GluB26-DTIA	netestováno

Tato série analogů obsahuje několik vysoce potentních analogů insulinu. Jsou to des(B27–B30)tetrapeptid zkrácené analogy připravené a charakterizované již dříve (viz poznámka v Tab. 3), ale i nově připravené analogy. Z již publikovaných analogů to jsou *N*Me-AlaB26-DTIA (465 %) a *N*Me-HisB26-DTIA (214 %). Z nově připravené prolinové série analogů vykazují dva analogy afinitu vůči IR až 3,5–3,8krát větší v porovnání s lidským insulinem. Oba jsou to des(B27–B30)tetrapeptid-insuliny s C-koncovým amidem, ProB26-DTIA a D-ProB26-DTIA. Stejný analog, ale s C-koncovou volnou kyselinou (ProB26-DTI), se už na IR váže o něco slaběji (80% afinita). Zkrácení B-řetězce o tři aminokyseliny, des(B28–B30)tripeptid zkrácené analogy ProB26-DTrI, ProB26-DTrIA a D-ProB26-DTrIA, vede k poklesu vazebné afinity na hodnotu až 4–5krát nižší v porovnání s lidským insulinem (afinity 19–25 %).

Výrazně vyšší vazebnou afinitu vykazuje i další des(B27–B30)tetrapeptid zkrácený analog, GluB26-DTIA, a to 315 %. Pro krystalografické účely byly dále připraveny dva zkrácené analogy charakterizované v jiných laboratořích, SarB26-DTIA a D-AlaB26-DTIA, s popsanou vazebnou afinitou přesahující 1000 % (115,116). Reevaluace v naší laboratoři však ukázala, že oba analogy nepřesahují 500% afinitu, tudíž jejich vazebná afinita je na úrovni *N*Me-AlaB26-DTIA.

Zatímco výše popsané zkrácené analogy modifikované v pozici B26 a zároveň obsahující *N*-methylovanou peptidovou vazbu v pozici B25–B26 (*N*Me-AlaB26-DTIA a *N*Me-HisB26-DTIA) vykazují zvýšenou afinitu k IR, analog s přirozeným tyrosinem v pozici B26 (*N*Me-TyrB26-DTIA) se váže o něco slaběji než lidský insulin s relativní vazebnou afinitou 72 %. Záměna v této pozici za fenylalanin (*N*Me-PheB26-DTIA) snižuje vazbu k IR ještě o polovinu, na 36 %. Zajímavým zjištěním je, že prodloužení analogů na plnou délku B-řetězce

vazebnou afinitu dále snižuje. Vzniklý *N*Me-TyrB26-insulin, podobně jako *N*Me-AlaB26-insulin, se váže pětkrát slaběji v porovnání s insulinem.



Obr. 15: Vazebné křivky lidského insulinu a insulinových analogů získané měřením A) na plasmatických membránách potkaních adipocytů (černě - lidský insulin, zeleně - D-ProB26-DTrIA, fialově - ProB26-DTrIA, modře - ProB26-DTrI, žlutě - D-AlaB26-DTIA) a B) na membránách lymfocytů IM-9 (černě - lidský insulin, hnědě - GluB26-DTIA, červeně - SarB26-DTIA).

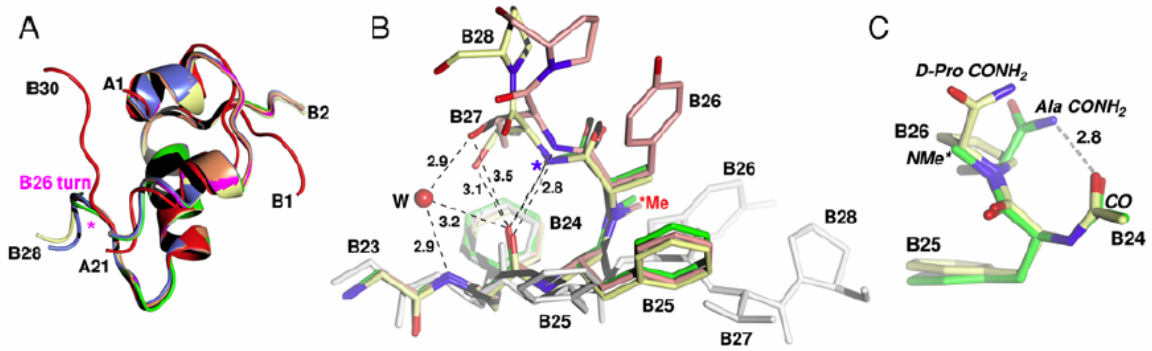
4.1.5. Strukturní analýza vybraných analogů pomocí rentgenové krystalografie

Krystalizace a následná charakterizace krystalů byla provedena u šesti insulinových analogů. Byly to čtyři zkrácené analogy *N*Me-AlaB26-DTIA, *N*Me-HisB26-DTIA, D-ProB26-DTIA a ProB26-DTI, a dva analogy plné délky *N*Me-AlaB26-insulin a *N*Me-TyrB26-insulin. Strukturní analýza (krystalizace, rentgenová difrakce a vyhodnocení struktur) byla vypracována spolupracující laboratoří Dr. Andrzeje Marka Brzozowského z University of York ve Velké Británii.

Celkově se povedlo vykrystalizovat a určit devět struktur těchto šesti analogů. Krystalizace probíhala při pH 3,0, kdy bylo určeno celkem pět monomerních struktur analogů, a dále při pH 7,5, kdy výsledkem byly dvě monomerní a dvě hexamerní struktury.

Úspěšně byl vykrystalizován a charakterizován nejaktivnější analog této studie, zkrácený *N*Me-AlaB26-DTIA, a to pouze jako monomer při pH 3,0. Výsledky rentgenové difrakce ukázaly, že C-konec B-řetězce tvoří výrazně jinou konformaci v pozicích B24–B26. Je to β-otáčka II. typu, pro tuto studii pojmenovaná také jako B26-ohyb, vymezená pozicemi PheB24 až *N*Me-AlaB26 (viz Obr. 16 B). Tato nová konformace peptidového řetězce je spojená s *cis*

konformací peptidové vazby PheB25–*N*MeAla-B26. Karbonylová skupina CO pozice B24 vytváří vodíkovou vazbu (2,8 Å) s NH_2 skupinou karboxyamidu pozice B26 (i+3 aminokyselina). Důsledkem B26-ohybu je odklopení C-konce B-řetězce od původní konformace (viz Obr. 16 A), čímž se N-konec A-řetězce stává volným pro interakci s IR, zejména jeho aminokyseliny A1–A3. Navíc dochází k rotaci postranního řetězce PheB25 dál od N-konce A-řetězce a také k posunu N-konce α-šroubovice A-řetězce. Výsledkem je uvolnění nepolárního povrchu určeného pro vazbu na receptor. Tuto konformaci potvrzují také krystalografické výsledky dalšího aktivního analogu, *N*Me-HisB26-DTIA krystalizovaného jako monomer při pH 7,5.

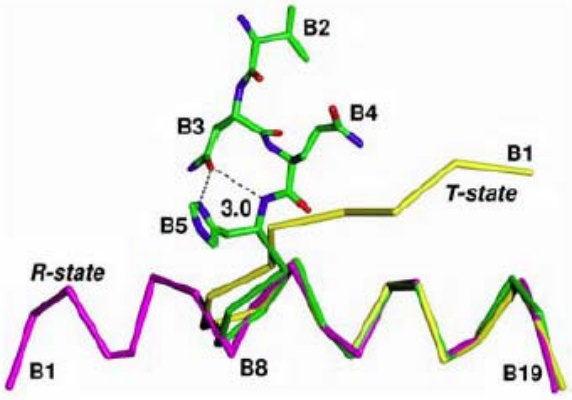


Obr. 16: Struktury analogů určeny rentgenovou difrakcí obsahující novou konformaci na C-konci B-řetězce. A) Překryv struktur několika analogů: červeně - lidský insulin, růžově - *N*Me-AlaB26-DTIA, oranžově - *N*Me-HisB26-DTIA, zeleně - D-ProB26-DTIA, modře - *N*Me-AlaB26-insulin, žlutě - *N*Me-TyrB26-insulin; B26-ohyb znázorněn růžovou hvězdičkou. B) Detailnější pohled na B26-ohyb: bílou - lidský insulin, zeleně - *N*Me-AlaB26-DTIA, žlutě - *N*Me-AlaB26-insulin, růžově - *N*Me-TyrB26-insulin, W - molekula vody, čárkovaně vodíkové vazby. C) Detail B26-ohybu u *N*Me-AlaB26-DTIA a D-ProB26-DTIA.

Strukturní analýza D-ProB26-DTIA analogu odhalila, že C-konec B-řetězce tvoří vložením D-aminokyseliny do pozice B26 konformaci velmi podobnou s konformací popsanou u *N*Me-AlaB26-DTIA (Obr. 16 C). Absence *cis*-peptidové vazby je v tomto případě kompenzovaná D-Pro, přičemž konformace B26-ohybu popsaného výše je zachovaná. Ekvivalentní analog, ProB26-DTIA, vykazující také vysokou vazebnou afinitu k IR, se ale vykrystalizovat nepodařilo. Pouze analog bez C-koncové amidové skupiny, ProB26-DTI, byl schopen tvořit

krystaly, a to monomerní při pH 3,0 a hexamerní při pH 7,5. Pro vysokou neuspořádanost C-konce B-řetězce se však přítomnost konformace B26-ohybu nepovedlo potvrdit ani vyvrátit.

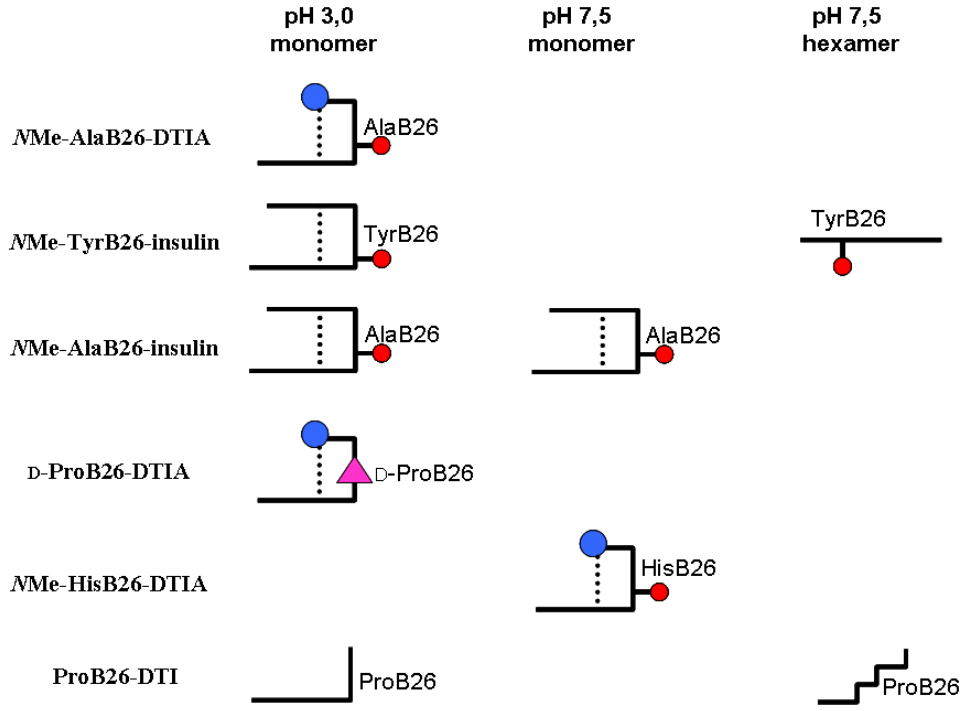
Schopnost tvořit B26-ohyb na C-konci B-řetězce byla potvrzena i u analogů plné délky. Krystalové struktury *N*Me-AlaB26-insulinu a *N*Me-TyrB26-insulinu prokázaly i zde přítomnost nové konformace. B26-ohyb je v tomto případě stabilizován typickou i+3 vodíkovou vazbou mezi PheB24 a ThrB27. NH skupina peptidové vazby B27 nahrazuje NH_2 skupinu karboxyamidu zkrácených analogů. Aminokyseliny ThrB27 a ProB28 následují konformaci B26-ohybu, LysB29 a ThrB30 jsou neuspořádané. Konformace je navíc stabilizovaná vodíkovou vazbou mezi CO-PheB24 a OH postranního řetězce ThrB27 a molekulami vody. Oba analogy byly krystalizovány jak v monomerních, tak hexamerních podmínkách (při pH 3,0 a při pH 7,5). Zatímco i přes *N*-methylaci peptidové vazby B25–B26 je analog *N*Me-TyrB26-insulin schopen tvořit hexamery, analog *N*Me-AlaB26-insulin tvoří i v hexamerních podmínkách pouze monomerní struktury.



Obr. 17: Specifická konformace O-stavu na N-konci B-řetězce, která se vyskytuje u všech zde popsaných krystalových struktur. T- a R-konformace insulinu jsou vyobrazeny žlutě a růžově, zeleně je znázorněn reprezentativní analog *N*Me-AlaB26-DTIA.

Všechny monomerní krystalové struktury popsané v této studii mají jeden společný strukturní rys na N-konci B-řetězce. Dochází ke konformační změně dříve popsané jako O-stav (kapitola 1.2.2), kdy všechny analogy zachovávají konformaci typickou pro T-stav insulinu až po Cα HisB5. Následuje však odklonění od této konformace, vytváří se pseudo β-otáčka II. typu (viz Obr. 17). Tento specifický ohyb je stabilizovaný i+3 vodíkovou vazbou mezi NH skupinou peptidové vazby HisB5 a CO postranního řetězce AsnB3.

Přehledné shrnutí základních znaků všech devíti struktur ukazuje Obr. 18.



Obr. 18: Schematické znázornění devíti struktur určených v této studii. Použité znázornění - U-křivka: B26-ohyb, rovná čára: standardní struktura B-řetězce, tečkovaná čára: B24(CO)-B26/27(NH) vodíková vazba, červená tečka: *N*MeB26, modrá tečka: B26-$CONH_2$, růžový trojúhelník: B26-D-aminokyselina, „schodovitá" křivka: neuspořádaná struktura.

4.1.6. Krystalová struktura analogu D-ProB26-DTIA v komplexu s extracelulární doménou receptoru insulinu

Výsledky této práce byly prezentovány v publikaci: Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., Lawrence, M. C. (2013) How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. ***Nature*** 493, 241-245

V rámci spolupráce s laboratoří Dr. Michaela C. Lawrence z Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research v Parville ve státě Victoria v Austrálii byly analogy *N*Me-AlaB26-DTIA, *N*Me-HisB26-DTIA, D-ProB26-DTIA, *N*Me-AlaB26-insulin a *N*Me-TyrB26-insulin poskytnuty pro krystalografickou studii. Cílem bylo krystalizovat a určit strukturu komplexu jednoho či více analogů s různými formami extracelulární domény (α-

podjednotka) IR. Analogy byly připraveny na našem pracovišti, nicméně všechny další experimenty byly realizovány v Austrálii. Z tohoto důvodu budou výsledky studie, i když se bezesporu jedná o přelom ve výzkumu interakce insulinu s IR, popsány v této práci jen velmi stručně. Detailní informace jsou podány v přiložené publikaci.

Z poskytnutých analogů krystalizoval i difraktoval v komplexu s IR pouze analog D-ProB26-DTIA. IR v tomto případě reprezentoval rozpustný konstrukt IR310.T/83-7/α-CT$^{704-714}$, který je ternárním komplexem skládajícím se z kovalentně spojených domén receptoru L1 a CR (IR-310.T), stabilizujících monoklonálních protilátek specifických pro IR (83-7) a konečně nekovalentně vázaného CT-peptidu reprezentujícího C-koncové aminokyseliny 704-714 α-podjednotky IR. Z rentgenostrukturní analýzy komplexu analogu a IR vyplývá, že analog primárně interaguje s L1 doménou receptoru, a to prostřednictvím centrální α-šroubovice B-řetězce (aminokyseliny GlyB8–GluB21). Dá se říci, že tato část insulinu na L1 podjednotce „leží". Na L1 podjednotce ovšem paralelně se šroubovicí B-řetězce zároveň „leží" i CT-peptid receptoru, který tak vytváří kontakty jak s L1 doménou tak i s centrální šroubovicí B-řetězce insulinu. A-řetězec analogu vytváří kontakty pouze s CT-peptidem. Oba dynamické konce B-řetězce insulinu, N-konec (B1–B7) i C-konec (B22–B30), nejsou v krystalové struktuře komplexu viditelné. Stejný výsledek jako tento komplex našeho analogu s receptorem poskytly i komplexy lidského a hovězího insulinu s podobnými konstrukty IR. Opět je viditelná pouze „statická" část insulinu a způsob interakce molekul s IR je ve všech případech stejný.

4.2. Syntéza a charakterizace analogů selektivně *N*-methylovaných v pozicích B24, B25 a B26 se specifickým zaměřením na dimerizační vlastnosti připravených analogů.

Výsledky práce byly prezentovány v publikaci: Antolíková, E., Žáková, L., Turkenburg, J. P., Watson, C. J., Hančlová, I., Šanda, M., Cooper, A., Kraus, T., Brzozowski, A. M. & Jiráček, J. (2011) Non-equivalent Role of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Insulin Dimer Interface. ***J. Biol. Chem.*** 286: 36968–36977.

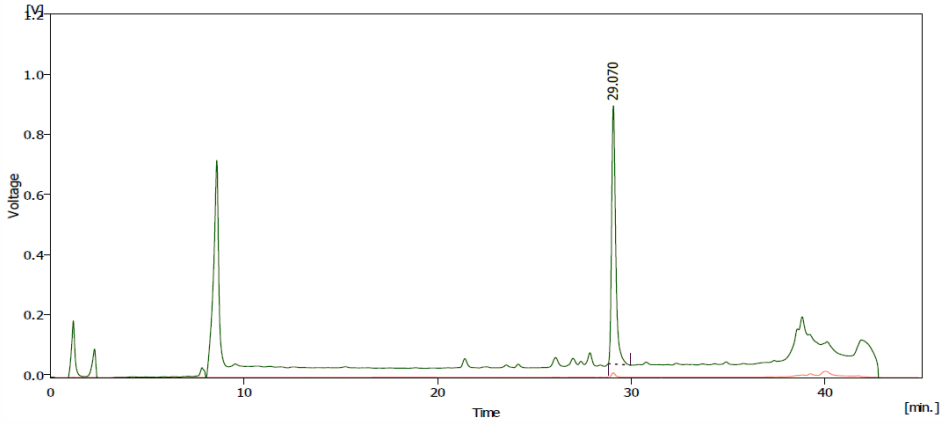
4.2.1. Příprava *N*-methylovaných oktapeptidů metodou syntézy na pevné fázi

Pro účely této studie bylo použito pět oktapeptidů. Tři z nich byly již dříve připraveny v rámci studie Dr. Lenky Žákové (143). Seznam připravených peptidů spolu s výtěžky syntéz pro přehlednost udává Tab. 5.

Tab. 5: Seznam použitých oktapeptidů a výtěžky jejich syntéz. Sekvence jsou psány jednopísmenným kódem s výjimkou substituované aminokyseliny, která je zobrazena třípísmenným kódem v závorce. Údaje o jednotlivých peptidech jsou uvedeny v poznámce.
*Peptidy syntetizovány v laboratoři Dr. J. Ježka (ÚOCHB, AV ČR).

Peptid	*Výtěžek syntézy*	*Poznámka*
G-(*N*Me-Phe)-FYTP-K(Pac)-T	46 %	tato studie
GF-(*N*Me-Phe)-YTP-K(Pac)-T	39 %	tato studie
GFF-(*N*Me-Tyr)-TP-K(Pac)-T	*	(143)
GFF-(*N*Me-Phe)-TP-K(Pac)-T	26 %	(143)
GF-(*N*Me-Phe)-(Phe)-TP-K(Pac)-T	*	(143)

Všechny peptidy této série byly syntetizovány ve formě C-koncové karboxylové kyseliny použitím 2-chlortritylové pryskyřice. Lysin v poloze B29 měl N^{ε}-aminoskupinu chráněnou fenylacetylovou skupinou (Pac). Všechny peptidy vykazovaly čistotu větší než 95 % (RP-HPLC). Příklad purifikace oktapeptidu obsahujícího *N*-methylovanou peptidovou vazbu ukazuje Obr. 19.



Obr. 19: Purifikace surového oktapeptidu G-(*N*Me-Phe)-FYTP-K(Pac)-T s použitím RP-HPLC.

4.2.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI)

Des(B23–B30)oktapeptid-insulin (DOI) byl připraven stejným způsobem pro semisyntetické účely všech insulinových analogů tak, jak to popisuje kapitola 3.3. Výsledek přípravy DOI spolu s výtěžkem je popsán v kapitole 4.1.2.

4.2.3. Enzymatická semisyntéza *N*-methylovaných insulinových analogů

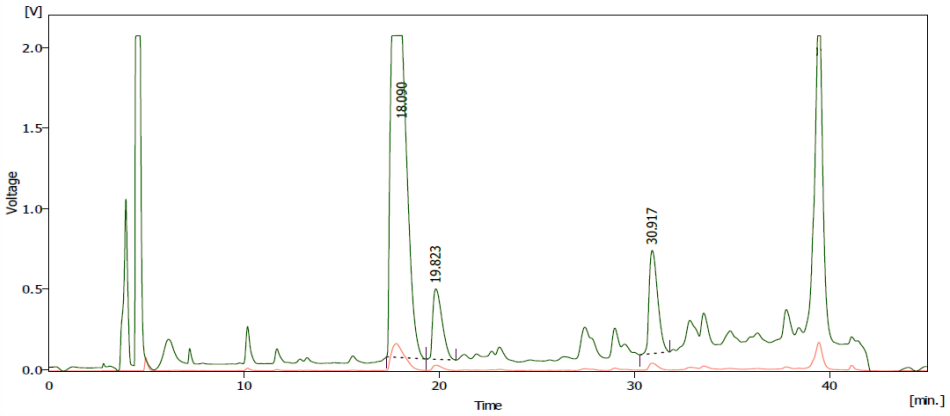
Působením trypsinu za podmínek popsaných v kapitole 3.4 byly z des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) a *N*-methylovaných oktapeptidů (Tab. 5) připraveny *N*-methylované insulinové analogy. Výtěžky semisyntetických reakcí jednotlivých analogů jsou uvedeny v Tab. 6. Čistota připravených analogů byla ve všech případech větší než 95 % (RP-HPLC).

Tab. 6: Seznam připravených *N*-methylovaných insulinových analogů metodou enzymatické semisyntézy. Uvedeny jsou výtěžky semisyntéz (v %).

Analog	*Výtěžek semisyntézy*
*N*Me-PheB24-Lys(Pac)B29-insulin	12 %
*N*Me-PheB25-Lys(Pac)B29-insulin	8 %
*N*Me-TyrB26-Lys(Pac)B29-insulin	16 %
*N*Me-PheB26-Lys(Pac)B29-insulin	17 %
*N*Me-PheB25-PheB26-Lys(Pac)B29-insulin	14 %

Příklad purifikace analogu ukazuje Obr. 20. Jednotlivé frakce byly vždy lyofilizovány a jejich identita byla následně potvrzena hmotnostní spektrometrií ESI-MS.

Pro finální přípravu insulinového analogu bylo potřebné odštěpit fenylacetylovou skupinu (Pac) na N^{ε}-aminoskupině LysB29, a to účinkem penicilin G acylázy (postup uveden v kapitole 3.5). Výtěžky deprotekce *N*-methylovaných insulinových analogů jsou uvedeny v Tab. 7. Čistota výsledných analogů byla větší než 95 % (RP-HPLC).



Obr. 20: Purifikace analogu *N*Me-PheB24-Lys(Pac)B29-insulinu použitím RP-HPLC. Vyznačené vrcholy odpovídají frakci oktapeptidu G-(*N*Me-Phe)-FYTP-Lys(Pac)-T (Rt = 18,090), frakci DOI (Rt = 19,823) a frakci produktu (Rt = 30,917).

Tab. 7: Seznam připravených *N*-methylovaných insulinových analogů. Uvedeny jsou výtěžky deprotekce fenylacetylové skupiny (Pac) na LysB29 (v %).

Analog	*Výtěžek (Pac) deprotekce*
*N*Me-PheB24-insulin	38 %
*N*Me-PheB25-insulin	71 %
*N*Me-TyrB26-insulin	52 %
*N*Me-PheB26-insulin	59 %
*N*Me-PheB25-PheB26-insulin	57 %

4.2.4. Testování vazebných afinit *in vitro*

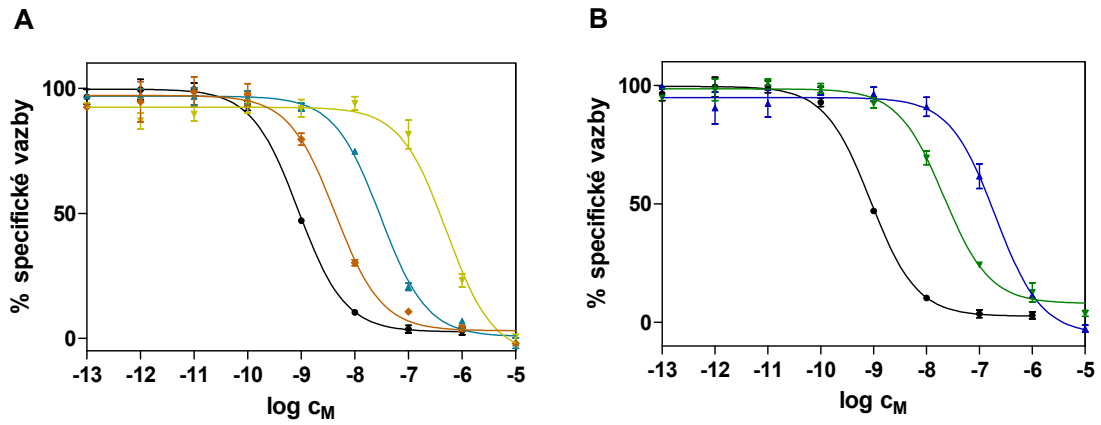
Vazebná afinita analogů byla zjištěna metodou kompetice analogů s lidským radioaktivně značeným (^{125}I-TyrA14) insulinem o insulinový receptor v membránách tukových buněk. Tukové buňky byly získané z potkaní epididymální tkáně. Touto metodou byla určena

hodnota IC_{50} analogu a porovnána s toutéž hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,8–1,0 nM (viz kapitola 3.6). Výsledky vazebných studií jsou uvedeny v Tab. 8. Hodnoty IC_{50} analogů jsou vztaženy k příslušným hodnotám pro lidský insulin a vyjádřeny v procentech jako relativní vazebné afinity podle vztahu: (IC_{50} lidského insulinu/IC_{50} analogu) x 100. Vazebné křivky *N*-methylovaných analogů jsou uvedeny na Obr. 21.

Tab. 8: Vazebné afinity analogů vůči insulinovému receptoru v plasmatických membránách potkaních tukových buněk (IC_{50}; hodnoty lidského insulinu v rozmezí 0,8–1,0 nM). Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM a počet paralelních měření (n).

Analog	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*	
lidský insulin	100 ± 7	(3)
*N*Me-PheB24-insulin	3,0 ± 0,2	(3)
*N*Me-PheB25-insulin	0,17 ± 0,01	(3)
*N*Me-TyrB26-insulin	21 ± 2	(3)
*N*Me-PheB26-insulin	4,2 ± 0,5	(3)
*N*Me-PheB25-PheB26-insulin	0,44 ± 0,09	(3)

N-methylace peptidových vazeb B23–B24, B24–B25 i B25–B26 má na vazebnou afinitu k insulinovému receptoru negativní vliv. Ve všech případech dochází k jejímu výraznému snížení, u analogů *N*Me-PheB25-insulin a *N*Me-PheB25-PheB26-insulin je pokles afinity více než 200násobný. Srovnatelné působení na afinitu k IR má *N*-methylace peptidové vazby B23–B24 (analog *N*Me-PheB24-insulin) a B25–B26 spolu se záměnou tyrosinu v pozici B26 za fenylalanin (analog *N*Me-PheB26-insulin); relativní vazebná afinita těchto analogů nepřesahuje 5 % afinity lidského insulinu. *N*-methylace peptidové vazby B25–B26 bez aminokyselinové záměny snižuje vazbu k receptoru na pětinu v porovnání s lidským insulinem. Analog *N*Me-TyrB26-insulin je tak z této série *N*-methylovaných analogů analogem, jehož vazebná afinita je *N*-methylací peptidové vazby nejméně zasažena.



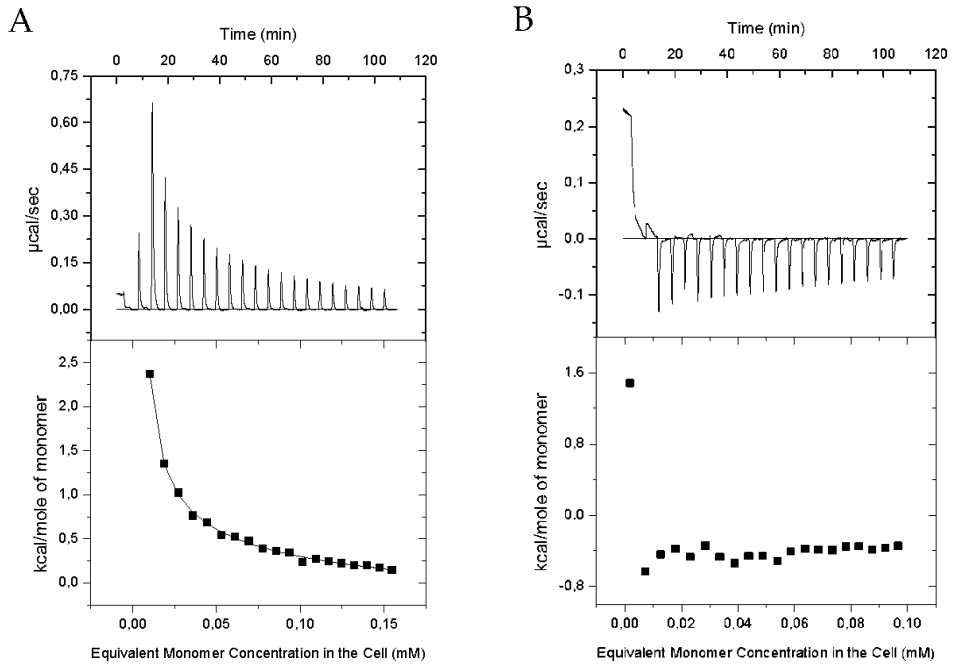
Obr. 21: Vazebné křivky lidského insulinu a *N*-methylovaných insulinových analogů získané měřením na plasmatických membránách potkaních adipocytů. A) Černě - lidský insulin, modře - *N*Me-PheB24-insulin, žlutě - *N*Me-PheB25-insulin, červeně - *N*Me-TyrB26-insulin. B) Černě - lidský insulin, zeleně - *N*Me-PheB26-insulin, modře - *N*Me-PheB25-PheB26-insulin.

4.2.5. Analýza vybraných *N*-methylovaných insulinových analogů metodou ITC

Dimerizační vlastnosti insulinu a insulinových analogů byly studovány metodou isothermální titrační kalorimetrie (ITC), a to na základě změn vazebné entalpie vznikajících při disociaci dimeru insulinu na monomer. Velkou roli zde hrají nekovalentní interakce, které sice mají malé energetické příspěvky, ale jejich velké množství a vzájemné působení má na vazby makromolekul značný vliv. V tomto případě na dimerizaci insulinu. Dimerizační proces je popsán rovnovážným modelem pro systém monomer-dimer: Ins_2 (D) ↔ 2Ins (M), $K_{diss} = [Ins_{tot}]^2/[Ins_2]$, kde M a D značí monomer a dimer insulinu, $[Ins_{tot}]$ je koncentrace monomeru insulinu a $[Ins_2]$ je koncentrace dimeru insulinu.

Interakcí molekul v cele dochází k tepelným rozdílům mezi referenční celou a celou se vzorkem. Termočlánek, který tyto změny detekuje, následně vzniklé změny vyrovnává přísunem elektrické energie. Při exotermické reakci je přísun energie snížen, při endotermické reakci je přísun energie zvýšen. Zaznamenána je tak změna dodané energie na čase, která je navíc také vztažena k okamžité koncentraci složek obsažených v cele. Výsledkem je závislost změny tepelné kapacity na čase. Integrací tepelných signálů a nelineárním proložením křivky lze získat disociační entalpii ΔH_{diss} a disociační konstantu K_{diss} měřené reakce. Volná energie dimerizace insulinu je následně vypočtena ze standardních podmínek: $\Delta G°_{diss} = -RT\ln K_{diss}$ a $\Delta G°_{diss} = \Delta H°_{diss} - T\,\Delta S°_{diss}$.

Dimerizační schopnosti insulinových analogů byly porovnány s lidským a vepřovým insulinem a s des(B23–B30)oktapeptid-insulinem (DOI). Tyto látky posloužily jako mantinely určující obvyklé dimerizační vlastnosti insulinu a vlastnosti nedimerizačního chování v případě (DOI). Charakteristické křivky kalorimetrického měření insulinu a DOI ukazuje Obr. 22.



Obr. 22: Disociační křivky získané metodou ITC reprezentující A) lidský insulin a B) des(B23–B30)oktapeptid-insulin (DOI). Horní část obrázku odpovídá naměřeným tepelným odezvám způsobených rozpadem dimeru insulinu na monomery. Spodní část obrázku zobrazuje závislost vazebné entalpie na koncentraci insulinu v cele.

Výsledkem titračních experimentů je určení disociační konstanty dimerizace lidského insulinu (K_{diss} = 8,8 μM) a vepřového insulinu (K_{diss} = 9,0 μM), což dobře odpovídá již dříve publikované hodnotě měřené za stejných podmínek (128). Naproti tomu výsledkem měření des(B23–B30)oktapeptid-insulinu je křivka s minimální tepelnou odezvou, což dokládá, že DOI nemá schopnost dimerizovat.

Metodou ITC byly dimerizační vlastnosti určeny také u několika *N*-methylovaných insulinových analogů. Šlo o analogy *N*Me-PheB24-insulin, *N*Me-PheB25-insulin, *N*Me-TyrB26-insulin, *N*Me-PheB26-insulin, PheB26-insulin, *N*Me-AlaB26-DTIA a *N*Me-AlaB26-insulin. Výsledky byly publikovány na mezinárodní konferenci (*21st American Peptide*

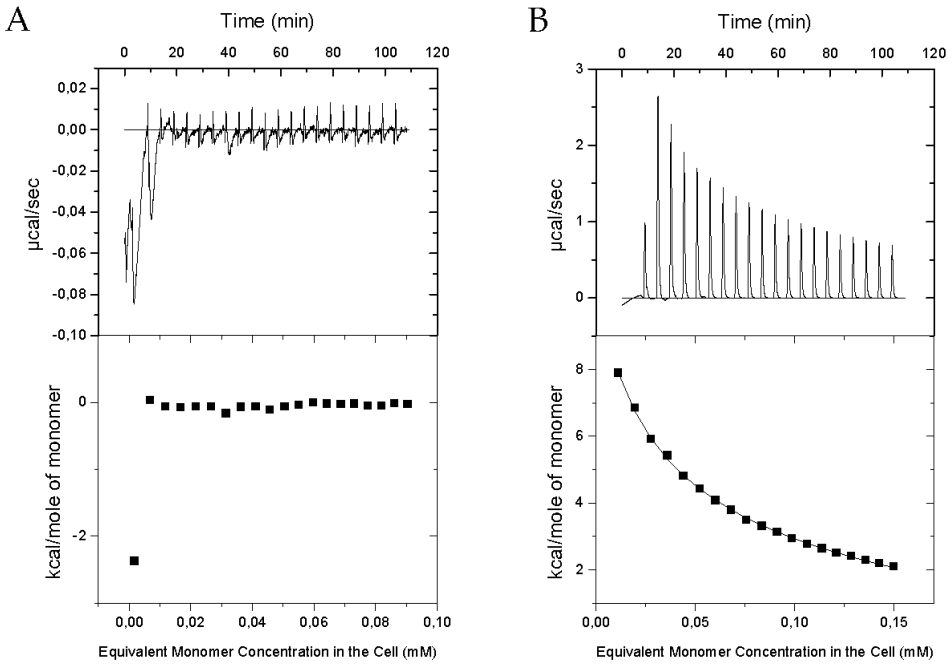
Symposium, Bloomington, USA, 2009) a také ve vědecké publikaci uvedené na začátku kapitoly 4.2 (viz také Příloha 2). ITC experimenty vyžadují pro měření koncentrovaný vzorek (1 mM), což odpovídá několika mg čistého insulinového analogu. Vzhledem k určité limitaci dané výtěžky semisyntetických reakcí *N*-methylovaných analogů byly tyto analogy změřené jenom dvakrát. Výsledky měření ukazuje Tab. 9.

Tab. 9: Dimerizační vlastnosti insulinu a insulinových analogů určené metodou ITC. Získané hodnoty byly určeny měřením několika paralelních měření (n) jako průměr ± SEM. V případě dvou měření je hodnota určena jako průměr ± rozmezí hodnot.

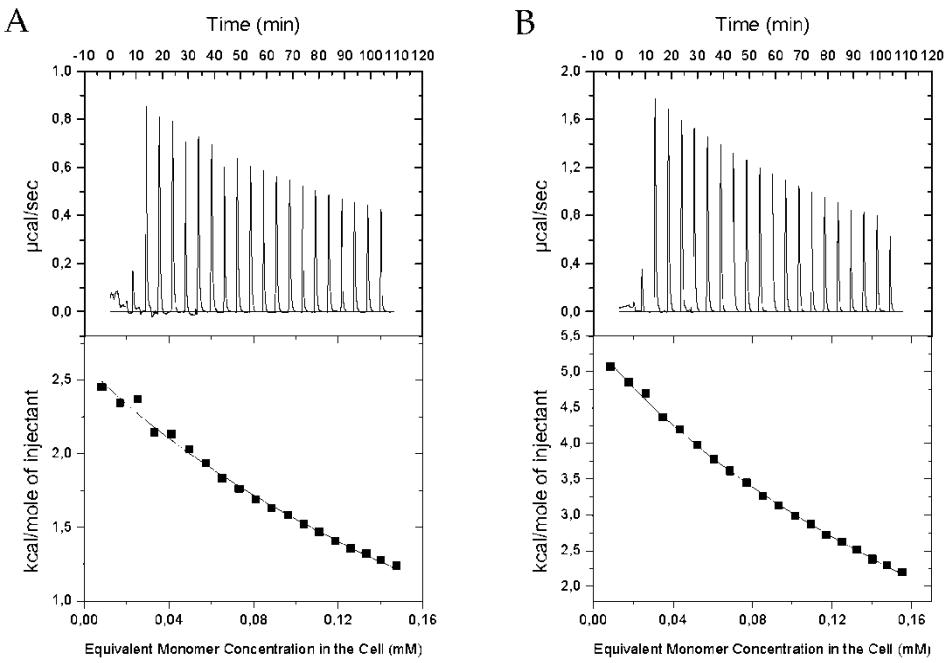
Analog	K_{diss} *[μM]*	$\Delta H°_{diss}$ *[kJ/mol]*	$\Delta G°_{diss}$ *[kJ/mol]*	$\Delta S°_{diss}$ *[J/K.mol]*	*n*
lidský insulin	8,81 ± 1,05	56,93 ± 2,56	28,95 ± 0,28	93,90 ± 8,15	8
vepřový insulin	9,03 ± 0,51	41,96 ± 0,45	28,78 ± 0,14	44,22 ± 1,06	2
DOI	bez tepelné odezvy				2
*N*Me-PheB24-insulin	587 ± 99	10,8 ± 0,5	18,5 ± 0,4	-25,7 ± 2,9	2
*N*Me-PheB25-insulin	bez tepelné odezvy				2
*N*Me-TyrB26-insulin	142 ± 30	70,9 ± 15,5	22,0 ± 0,5	163,9 ± 53,7	2
*N*Me-PheB26-insulin	1240 ± 10	37,8 ± 8,3	16,6 ± 0,0	71,3 ± 28,1	2
*N*Me-AlaB26-insulin	768 ± 543	27,8 ± 0,8	18,6 ± 2,2	30,5 ± 9,8	2
*N*Me-AlaB26-DTIA	804 ± 406	59,5 ± 3,4	18,0 ± 1,4	139,3 ± 15,9	2

Výsledky kalorimetrických měření ukazují, že všechny *N*-methylované analogy mají sníženou schopnost dimerizovat. Nejmenší dopad na tvorbu dimeru má methylace peptidové vazby B25–B26, *N*Me-TyrB26-insulin má K_{diss} přibližně 15x nižší než lidský insulin. Substituce TyrB26 za jemu podobný fenylalanin (analog *N*Me-PheB26-insulin) už ale rapidně snižuje dimerizační vlastnosti; K_{diss} je v porovnání s insulinem 140x nižší. Analogy *N*Me-PheB24-insulin, *N*Me-AlaB26-insulin a *N*Me-AlaB26-DTIA mají porovnatelné dimerizační vlastnosti, hodnota K_{diss} je oproti insulinu snížená 65–90krát. Tvorbu dimerů nejvíc ovlivnila methylace peptidové vazby B24–B25, jejíž výsledkem je snížení dimerizačních vlastností *N*Me-PheB25-insulinu až na úroveň des(B23–B30)oktapeptid-insulinu. Výsledné křivky vykazují v obou případech minimální tepelnou odezvu, čemuž za dané výchozí koncentrace odpovídá nulová schopnost dimerizovat. Výsledné křivky kalorimetrického měření *N*Me-PheB25-insulinu a *N*Me-TyrB26-insulinu ukazuje Obr. 23,

křivky *N*Me-AlaB26-insulinu a *N*Me-AlaB26-DTIA jsou uvedeny na Obr. 24. Křivky ostatních analogů jsou uvedeny v dodatku zmiňované publikace (viz Příloha 2).



Obr. 23: Výsledné disociační křivky insulinových analogů určeny metodou ITC: A) *N*Me-PheB25-insulin, B) *N*Me-TyrB26-insulin.



Obr. 24: Výsledné disociační křivky insulinových analogů určeny metodou ITC: A) *N*Me-AlaB26-insulin, B) *N*Me-AlaB26-DTIA.

4.2.6. Strukturní analýza vybraných *N*-methylovaných analogů pomocí rentgenové krystalografie

Úspěšně bylo krystalizováno a charakterizováno několik *N*-methylovaných analogů. Jde v první řadě o již dříve popsaný analog *N*Me-TyrB26-insulin obsahující B26-ohyb na C-konci B-řetězce, který krystalizoval jak v monomerních (pH 3,0), tak hexamerních podmínkách (pH 7,5) (117). V této části bude popis krystalové struktury zaměřen na dimerní povrch této molekuly. Z analogů charakterizovaných ITC metodou byly dále krystalizačním procesům vystaveny *N*Me-PheB24-insulin a *N*Me-PheB25-insulin. Navzdory použití mnoha monomerních, dimerních i hexamerních podmínek, byly získány R6 hexamerní krystaly jenom v případě *N*Me-PheB25-insulinu. Krystaly *N*Me-PheB24-insulinu se připravit nepovedlo. Popsané budou také struktury dvou analogů již dříve charakterizovaných a publikovaných, TyrB25-*N*Me-PheB26-insulinu a TyrB25-*N*Me-PheB26-LysB28-ProB29-insulinu (117,144). Oba byly krystalizovány také jako R6 hexamery.

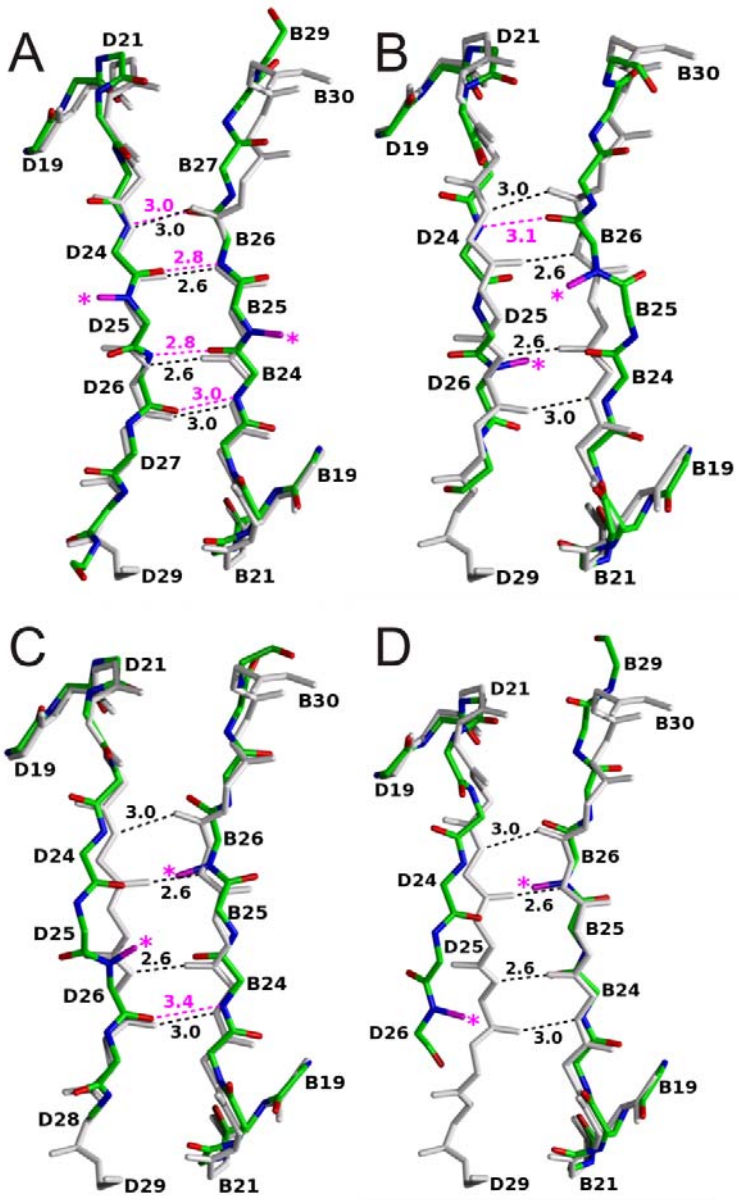
Značení jednotlivých řetězců monomerních jednotek dimerního uspořádání analogů je zde pro přehlednost určeno jako řetězce A a B v případě monomeru 1 a jako řetězce C a D v případě monomeru 2.

R6 hexamer *N*Me-PheB25-insulinu byl určen v přítomnosti Zn^{2+} iontů a fenolu, přičemž celkové strukturní uspořádaní hexameru odpovídá typickému uspořádání R6 hexameru lidského insulinu, jak je popsán ve struktuře s PDB kódem 1ZNJ. Co se týká dimerního povrchu této molekuly, i přes *N*-methylaci peptidové vazby B24–B25 jsou všechny vodíkové vazby zachované (viz Obr. 25 A). Jenom interakce B24(CO)-D26(NH) jsou kratší o 0,2 Å. Toto uspořádání je pravděpodobně dáno orientací *N*-methylované vazby, která směřuje ven z dimerního povrchu do blízkosti aminokyselin A19–A21, a tudíž nenarušuje klasické uspořádání vodíkových vazeb dimerního povrchu. Methylace však způsobuje zvýšenou flexibilitu postranního řetězce PheB25; jenom jeden z postranních řetězců je na elektronové mapě hustot viditelný (i když s malým rozlišením). Viditelné nejsou ani threoniny v pozici B30.

Naproti tomu *N*-methylace peptidové vazby B25–B26 má už na dimerní povrch molekuly analogu *N*Me-TyrB26-insulin výraznější vliv. Protože *N*-methylovaná vazba je orientovaná dovnitř dimerního povrchu, dochází k výraznému narušení typických vodíkových vazeb. Zachovaná je pouze jedna ze čtyř vazeb, a to peptidová vazba B26(CO)-D24(NH) (viz Obr. 25 B). Pozorováno je také jisté vyboulení jednoho řetězce způsobené rozměrnější methylovou skupinou oproti velikosti vodíkového atomu v B26(NH). Důsledkem je posunutí B25(NH) blíže k A19(CO), což vytváří 2,9 Å dlouhou vodíkovou vazbu B25(NH)-A19(CO) netypickou pro R6 uspořádání. Přítomnost této strukturní změny je doprovázena větší mobilitou řetězců, zejména aminokyselin B28–B30, které jsou zcela neuspořádány.

Struktura dalšího analogu TyrB25-*N*Me-PheB26-insulinu je podle výsledků podobná struktuře pozorované u analogů *N*Me-PheB25-insulinu a *N*Me-TyrB26-insulinu, tvořící také R6 hexamery. Uspořádání vodíkových vazeb dimerního povrchu je symetrické s uspořádáním pozorovaném u *N*Me-TyrB26-insulinu. Zachovaná je také jenom jedna vodíková vazba, a to D26(CO)-B24(NH) (viz Obr. 25 C).

Poslední určená struktura ze série *N*-methylovaných analogů je struktura analogu TyrB25-*N*Me-PheB26-LysB28-ProB29-insulinu. Struktura R6 hexameru je opět podobná struktuře výše popsaných analogů. Přidaná záměna LysB28-ProB29 úplně narušuje dimerní povrch molekuly, tudíž žádná vodíková vazba není zachovaná. Dochází také k narušení uspořádání jednoho řetězce, který je od pozice D23 plně neuspořádaný (viz Obr. 25 D).



Obr. 25: Zobrazení peptidových řetězců dimerního povrchu insulinových analogů, AB řetězce patří k molekule 1 dimeru, CD k molekule 2 dimeru. Každý analog je porovnán se strukturou lidského insulinu (PDB kód 1ZNJ) zobrazeného bílou barvou a černými vodíkovými vazbami. Vodíkové vazby analogů jsou zobrazeny růžovou barvou, *N*-methylovaná peptidová vazba růžovou hvězdičkou. Délky vodíkových vazeb jsou v Å. A) *N*Me-PheB25-insulin (PDB kód 3ZQR), B) *N*Me-TyrB26-insulin (PDB kód 2WS6), C) TyrB25-*N*Me-PheB26-insulin (PDB kód 1W8P) a D) TyrB25-*N*Me-PheB26-LysB28-ProB29-insulin (PDB kód 3ZS2).

4.3. Studium příspěvku TyrB26 v aktivní formě insulinu. Syntéza a charakterizace nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen za kódované aminokyseliny.

Publikace je v přípravě.

4.3.1. Příprava peptidů metodou syntézy na pevné fázi

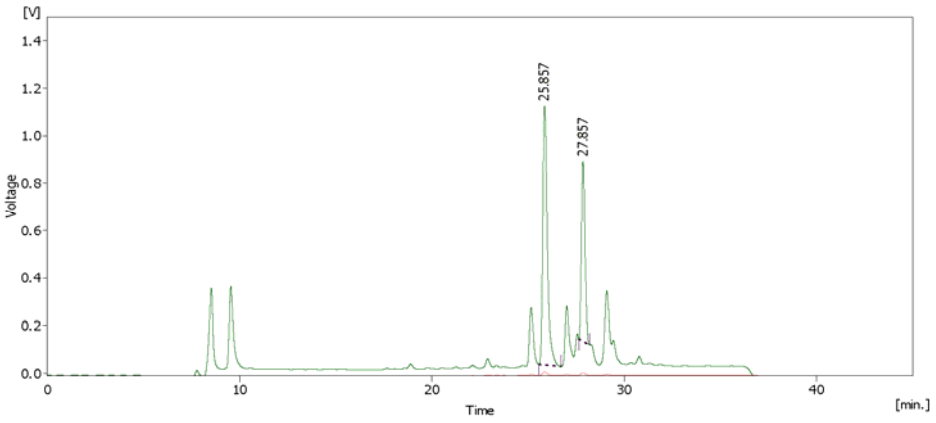
Pro účely této série analogů bylo připraveno celkem devět analogů se záměnou v pozici B26. Tyrosin v této pozici byl kromě přirozených aminokyselin nahrazen také D-aminokyselinou a *N*-methylovanou aminokyselinou. Všechny peptidy byly syntetizovány s C-koncovou kyselinou na 2-chlortritylové pryskyřici. Seznam připravených oktapeptidů spolu s výtěžky syntéz ukazuje Tab. 10. Lysin v poloze B29 měl N^{ε}-aminoskupinu chráněnou fenylacetylovou skupinou (Pac). Všechny peptidy vykazovaly čistotu větší než 95 % (RP-HPLC).

Tab. 10: Seznam syntetizovaných oktapeptidů se záměnou v pozici B26. Zobrazeny jsou výtěžky syntéz (v %). Sekvence jsou psány jednopísmenným kódem s výjimkou substituované aminokyseliny, která je zobrazena třípísmenným kódem v závorce.

Peptid	*Výtěžek syntézy*
GFF-(Asp)-TP-K(Pac)-T	44 %
GFF-(Asn-CO-O) TP-K(Pac)-T	14 %
GFF-(Asn)-TP-K(Pac)-T	21 %
GFF-(Gln)-TP-K(Pac)-T	34 %
GFF-(Phe)-TP-K(Pac)-T	27 %
GFF-(Gly)-TP-K(Pac)-T	27 %
GFF-(Sar)-TP-K(Pac)-T	34 %
GFF-(Pro)-TP-K(Pac)-T	22 %
GFF-(D-Pro)-TP-K(Pac)T	33 %
GFF-(Glu)-T-Lys(Pac)-Pro-T	48 %

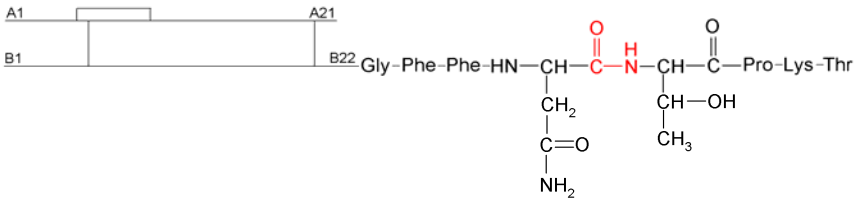
Syntézou oktapeptidu GFF-(Asn)-TP-K(Pac)-T vznikly dva produkty, každý s přibližně 50% zastoupením (viz chromatogram Obr. 26), které byly následně analyzovány. NMR metodou (^{1}H a ^{13}C) bylo určeno, že jako vedlejší produkt syntézy vznikl peptid obsahující esterovou vazbu mezi karbonylem peptidové kostry pozice B26 a hydroxylem

postranního řetězce ThrB27, GFF-(Asn-CO-O)TP-K(Pac)-T. Z izolovaných peptidů tak byly připraveny dva insulinové analogy, AsnB26-insulin a AsnB26-(B26-B27-ester)-insulin. Detail správné peptidové vazby, i té esterové v poloze B26–B27 zobrazuje Obr. 27.

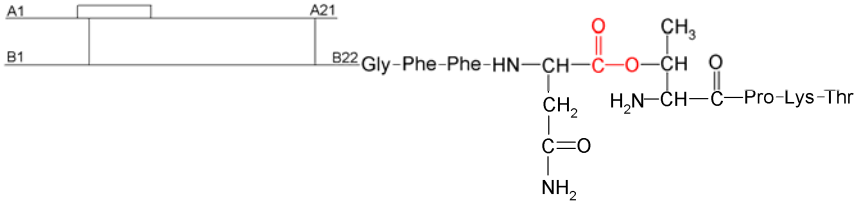


Obr. 26: Produkty syntézy oktapeptidu GFF-(Asn)-TP-K(Pac)-T. Frakce č. 1 (R_t = 25,857) obsahuje vedlejší produkt syntézy - GFF-(Asn-CO-O)TP-K(Pac)-T, frakce č. 2 (R_t = 27,857) obsahuje správný produkt - GFF-(Asn)-TP-K(Pac)-T.

A



B



Obr. 27: Detail peptidové a esterové vazby B26–B27 oktapeptidu syntetizovaného pro přípravu insulinového analogu obsahující Asn v poloze B26. A) GFF-(Asn)-TP-K(Pac)-T, B) GFF-(Asn-CO-O)TP-K(Pac)-T.

4.3.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI)

Des(B23–B30)oktapeptid-insulin (DOI) byl připraven stejným způsobem pro semisyntetické účely všech insulinových analogů tak, jak to popisuje kapitola 3.3. Výsledek přípravy DOI spolu s výtěžkem je popsán v kapitole 4.1.2.

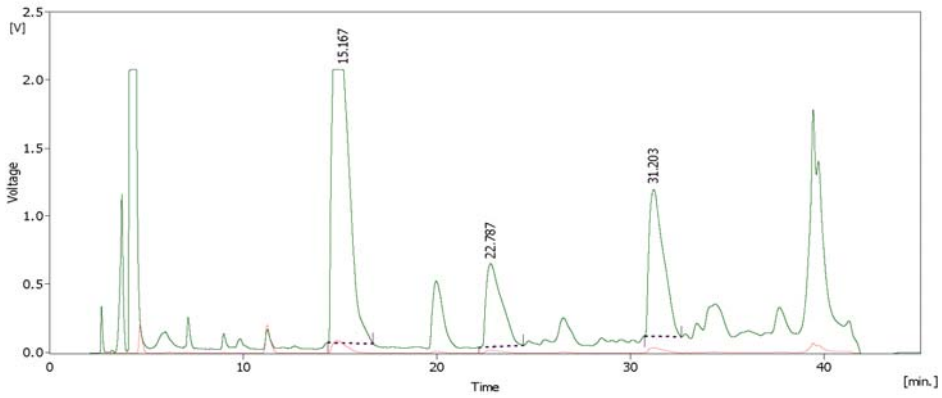
4.3.3. Výsledky enzymatické semisyntézy analogů modifikovaných v poloze B26

Působením trypsinu za podmínek popsaných v kapitole 3.4 byly z des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) a oktapeptidů se substituovanou aminokyselinou v poloze B26 (Tab. 10) připraveny nové insulinové analogy. Výtěžky semisyntetických reakcí jednotlivých analogů jsou uvedeny v Tab. 11. Čistota všech připravených analogů byla větší než 95 % (RP-HPLC).

Tab. 11: Seznam připravených insulinových analogů s modifikací v poloze B26. Uvedeny jsou výtěžky semisyntéz (v %).

Analog insulinu	*Výtěžek semisyntézy*
AspB26-Lys(Pac)B29-insulin	17 %
AsnB26-CO-O-Lys(Pac)B29-insulin	12 %
AsnB26-Lys(Pac)B29-insulin	13 %
GlnB26-Lys(Pac)B29-insulin	11 %
PheB26-Lys(Pac)B29-insulin	15 %
GlyB26-Lys(Pac)B29-insulin	23 %
SarB26-Lys(Pac)B29-insulin	12 %
ProB26-Lys(Pac)B29-insulin	17 %
D-ProB26-Lys(Pac)B29-insulin	30 %
GluB26-Lys(Pac)B28-ProB29-insulin	17 %

Příklad purifikace analogu ukazuje Obr. 28. Jednotlivé frakce byly vždy lyofilizovány a jejich identita byla následně potvrzena hmotnostní spektrometrií ESI-MS.



Obr. 28: Chromatogram semisyntézy analogu AsnB26-Lys(Pac)B29-insulinu. Označené frakce určují: v pořadí zleva oktapeptid, DOI a produkt semisyntetické reakce - analog insulinu.

Pro finální přípravu insulinového analogu bylo potřebné odštěpit fenylacetylovou skupinu (Pac) na N^{ε}-aminoskupině LysB29, a to účinkem penicilin G acylázy (postup uveden v kapitole 3.5). Výtěžky deprotekce insulinových analogů s modifikací v poloze B26 jsou uvedeny v Tab. 12. Čistota výsledných analogů byla větší než 95 % (RP-HPLC).

Tab. 12: Seznam připravených insulinových analogů modifikovaných v poloze B26. Uvedeny jsou výtěžky deprotekce (v %) fenylacetylové skupiny (Pac) na LysB29, a v případě posledního analogu na LysB28.

Analog	*Výtěžek (Pac) deprotekce*
AspB26-insulin	46 %
AsnB26-CO-O-insulin	57 %
AsnB26-insulin	41 %
GlnB26-insulin	60 %
PheB26-insulin	73 %
GlyB26-insulin	46 %
SarB26-insulin	43 %
ProB26-insulin	41 %
D-ProB26-insulin	66 %
GluB26-LysB28-ProB29-insulin	46 %

4.3.4. Testování vazebných afinit *in vitro*

Vazebná afinita analogů byla zjištěna metodou kompetice analogů s lidským radioaktivně značeným (^{125}I-TyrA14) insulinem o insulinový receptor v membránách lidských lymfocytů IM-9. Touto metodou byla zjištěna hodnota rovnovážné disociační konstanty (K_d) a porovnána se stejnou hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,2–0,4 nM (viz kapitola 3.6). Stanovené tak byly vazebné afinity analogů se záměnou TyrB26 za Asn, Asp a Gln. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 13.

V případě ostatních analogů z Tab. 12 byla použita metoda kompetice analogů s lidským radioaktivně značeným (^{125}I-TyrA14) insulinem o insulinový receptor v membránách tukových buněk. Tukové buňky byly získané z potkaní epididymální tkáně. Touto metodou byla určena hodnota IC_{50} analogu a porovnána s hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,8–1,0 nM (viz kapitola 3.6). Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 14.

Hodnoty K_d a IC_{50} analogů jsou vztaženy k příslušným hodnotám pro lidský insulin a vyjádřeny jako relativní vazebné afinity (v %) podle vztahu: (K_d(IC_{50}) lidského insulinu / K_d(IC_{50}) analogu) x 100. Vazebné křivky analogů testovaných v této studii jsou uvedeny na Obr. 29.

Tab. 13: Vazebné afinity analogů vůči insulinovému receptoru v membránách lidských lymfocytů IM-9. K_d hodnoty lidského insulinu se pohybovaly v rozmezí 0,2–0,4 nM. Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM a počet paralelních měření (n).

Analog	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*	
lidský insulin	100 ± 2	(6)
AspB26-insulin	89 ± 2	(4)
AsnB26-(B26-B27-ester)-insulin	91 ± 1	(4)
AsnB26-insulin	83 ± 2	(4)
GlnB26-insulin	76 ± 4	(4)

Tab. 14: Vazebné afinity analogů vůči insulinovému receptoru v plasmatických membránách potkaních tukových buněk. IC_{50} hodnoty lidského insulinu se pohybovaly v rozmezí 0,8–1,0 nM. Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM a počet paralelních měření (n).

Analog	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*	
lidský insulin	100 ± 7	(3)
PheB26-insulin	46 ± 7	(3)
GlyB26-insulin	69 ± 7	(5)
SarB26-insulin	92 ± 6	(5)
ProB26-insulin	8,6 ± 0,8	(4)
D-ProB26-insulin	0,99 ± 0,15	(7)
GluB26-LysB28-ProB29-insulin	194 ± 24	(3)

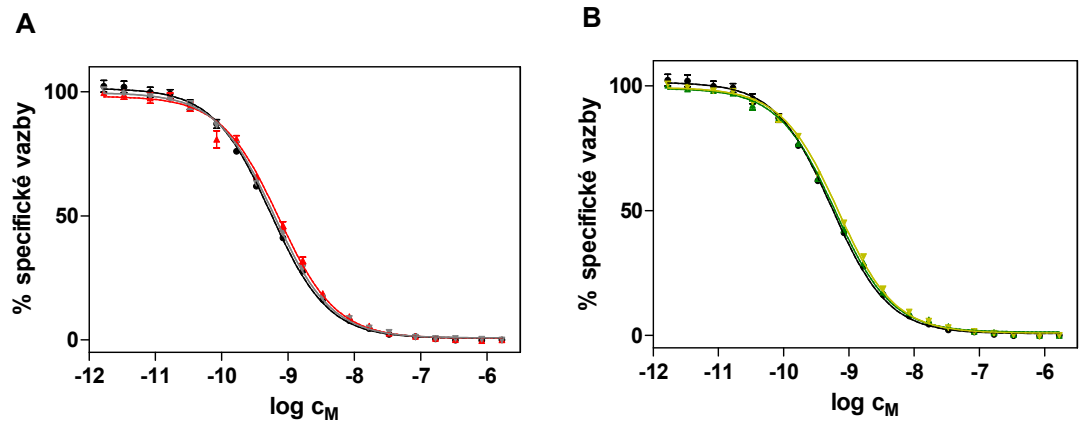
Všechny čtyři analogy uvedené v Tab. 13 vykazují vazebnou afinitu srovnatelnou s lidským insulinem. Substitucí TyrB26 za Asp, Asn a Gln tak vznikly analogy takřka ekvipotentní (76–89 %) lidskému insulinu (100 %). Překvapivě potentní je i analog s dvojitou záměnou, tedy s Asn v poloze B26 a s esterovou vazbou B26–B27 - AsnB26-(B26-B27-ester)-insulin, a to 91%.

Dalším v řadě ekvipotentních analogů je s 92% afinitou k IR SarB26-insulin (Tab. 14), analog s *N*-methylovaným glycinem v pozici B26. Přítomnost samotného glycinu v této pozici snižuje vazebnou afinitu na necelých 70 %. Ztráta hydroxylové skupiny postranního řetězce v případě PheB26-insulinu vede k poklesu afinity až na polovinu, na 46 %. Hodnota námi změřené vazebné afinity tohoto analogu je v souladu s výsledkem laboratoře Pierra De Meytse měřena také na membránách IM-9 lymfocytů (145).

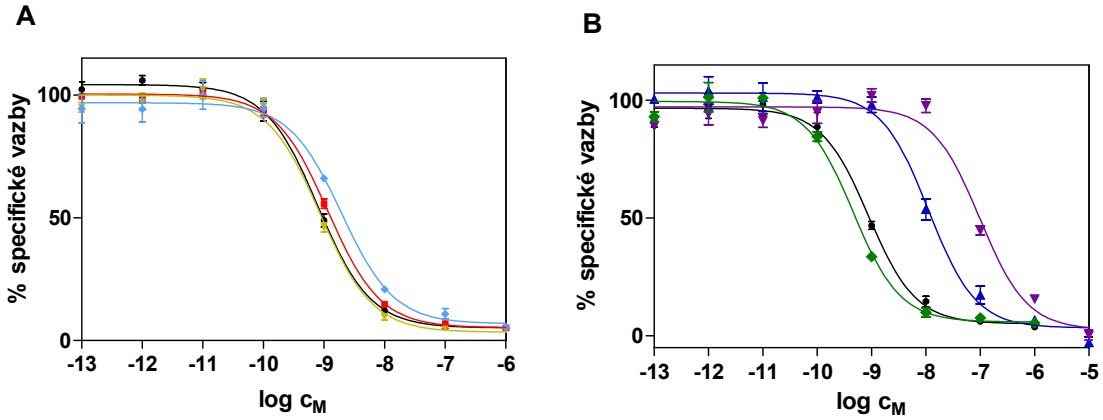
Výrazný pokles vazebné afinity byl pozorován u analogů s prolinem v pozici B26 (Tab. 14). Analog ProB26-insulin se k insulinovému receptoru váže již desetkrát slaběji než lidský insulin (8,6 %). Substituce za D-Pro vede k dalšímu snížení vazby k receptoru; D-ProB26-insulin má 100x nižší afinitu než přirozený insulin.

Koncem 80tých let uvedla práce Brangeho a kol. několik aktivních analogů insulinu. Jedním z nich byl GluB26-insulin se 125% biologickou aktivitou (stanoveno inkorporací ^{3}H-glukosy do lipidů) (146). Spojení této „aktivní“ modifikace spolu se záměnou pozic B28 a B29 (147) vedly k přípravě GluB26-LysB28-ProB29-insulinu. Výsledkem je analog s téměř dvojnásobnou afinitou k receptoru, která činí 194 %.

Vazebné křivky připravených analogů jsou zobrazeny na Obr. 29 a Obr. 30.



Obr. 29: Vazebné křivky lidského insulinu a insulinových analogů se záměnou v pozici B26 získané měřením vůči IR v membránách lymfocytů IM-9. A) černě - lidský insulin, šedě - AspB26-insulin, červeně - GlnB26-insulin. B) černě - lidský insulin, žlutě - AsnB26-insulin, zeleně - AsnB26-(B26–B27)-ester-insulin.



Obr. 30: Vazebné křivky lidského insulinu a insulinových analogů získané měřením na plasmatických membránách potkaních adipocytů. A) černě - lidský insulin, modře - PheB26-insulin, červeně - GlyB26-insulin, žlutě - SarB26-insulin. B) černě - lidský insulin, fialově - D-ProB26-insulin, modře - ProB26-insulin, zeleně - GluB26-LysB28-ProB29-insulin.

4.3.5. ITC analýza vybraných insulinových analogů

Dimerizační vlastnosti byly z výše popsané série určeny u analogů PheB26-insulinu a AsnB26-insulinu. Disociační konstanty dimerizace byly také určeny u dvou komerčních analogů, u insulinu aspart (AspB28-insulin) a glulisin (LysB3-GluB29-insulin).

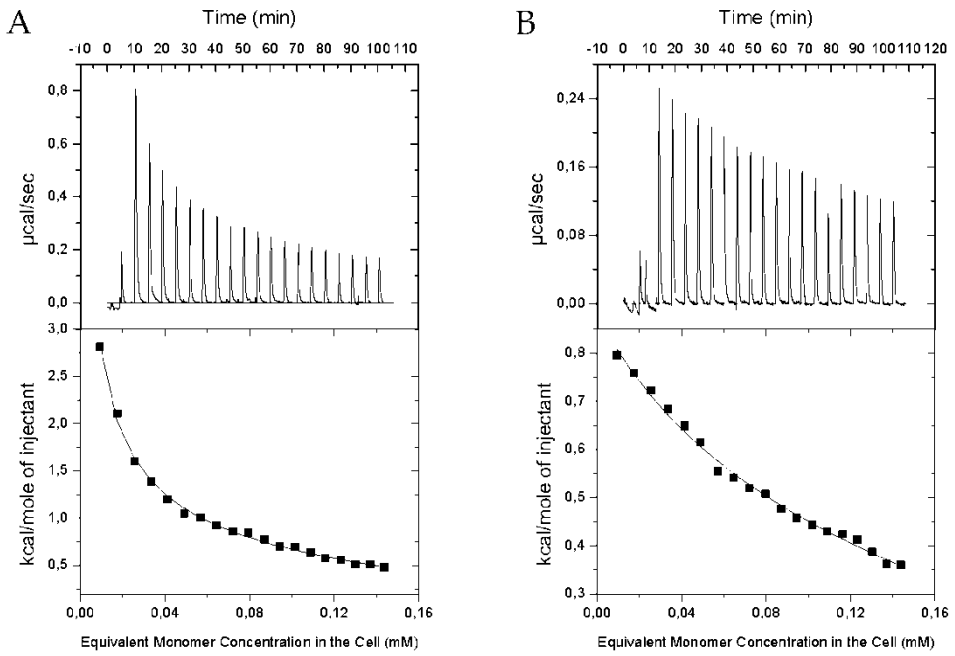
Dimerizační schopnosti insulinových analogů byly opět porovnány s lidským a vepřovým insulinem a s des(B23–B30)oktapeptid-insulinem (DOI), výsledky jsou sepsány v

Tab. 15. Lidský a vepřový insulin charakterizují obvyklé dimerizační vlastnosti insulinu, kdežto DOI vykazuje vlastnosti úplného nedimerizačního chování (viz Obr. 22 v kapitole 4.2.5). Disociační konstanta lidského insulinu je v tomto případě 9,5 μM a vepřového insulinu 9,6 μM. Tyto hodnoty odpovídají dříve změřeným hodnotám popsaným v kapitole 4.2.5 i publikovaným hodnotám změřeným za stejných podmínek (128). Výsledkem měření des(B23–B30)oktapeptid-insulinu je potvrzení nedimerizačních vlastností této látky (křivka tepelných změn se vůbec nemění).

Tab. 15: Dimerizační vlastnosti insulinu a insulinových analogů určené metodou ITC. Získané hodnoty byly určeny měřením několika paralelních měření (n) jako průměr ± SEM. V případě dvou měření je hodnota určena jako průměr ± rozmezí hodnot.

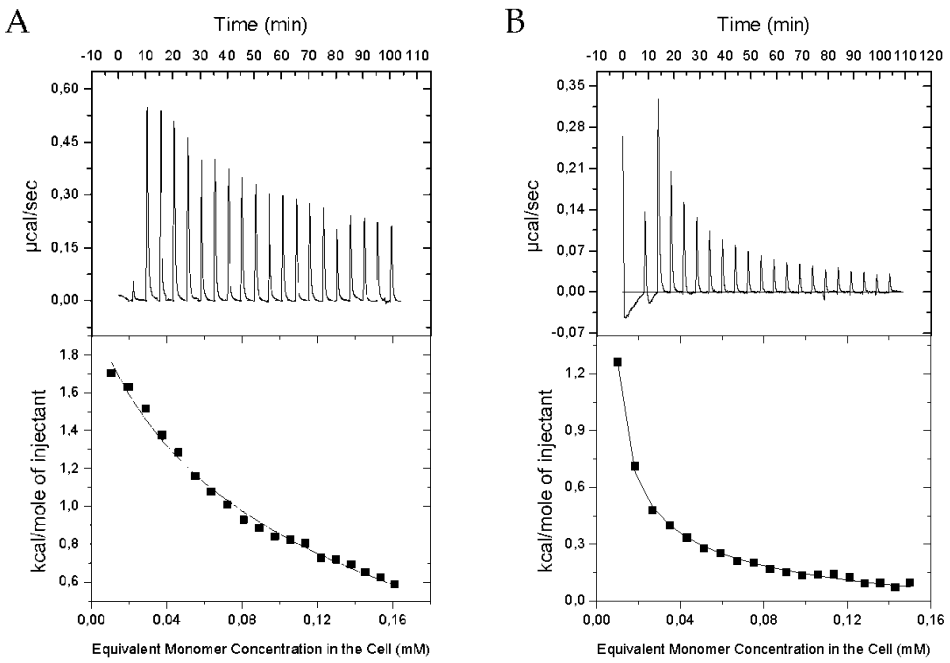
Analog	K_{diss} *[μM]*	$\Delta H°_{diss}$ *[kJ/mol]*	$\Delta G°_{diss}$ *[kJ/mol]*	$\Delta S°_{diss}$ *[J/K.mol]*	*n*
lidský insulin	8,81 ± 1,05	56,93 ± 2,56	28,95 ± 0,28	93,90 ± 8,15	8
vepřový insulin	9,03 ± 0,51	41,96 ± 0,45	28,78 ± 0,14	44,22 ± 1,06	2
DOI	bez tepelné odezvy				2
PheB26-insulin	27,1 ± 5,1	38,3 ± 3,3	26,2 ± 0,5	40,7 ± 10,1	4
AsnB26-insulin	803 ± 155	9,7 ± 0,8	17,9 ± 0,5	-27,4 ± 3,5	6
LysB3-GluB29-insulin	1,84 ± 0,79	62,2 ± 10,3	33,1 ± 1,0	97,6 ± 31,2	3
AspB28-insulin	307 ± 126	18,8 ± 0,0	20,3 ± 1,1	-4,8 ± 3,6	2

Kalorimetrické experimenty ukazují, že analog s fenylalaninem v pozici B26, PheB26-insulin, má zachovanou schopnost tvořit dimery, disociační konstanta je jenom třikrát vyšší (K_{diss} = 27,1 μM) než u lidského insulinu. Naopak záměna tyrosinu za asparagin v pozici B26 snižuje dimerizační schopnost insulinu až 90násobně, s K_{diss} = 803 μM. Výsledné křivky kalorimetrického měření ukazuje Obr. 31.



Obr. 31: Výsledné disociační křivky insulinových analogů určeny metodou ITC. A) PheB26-insulin. B) AsnB26-insulin.

Kromě nově připravených insulinových analogů byly dimerizační vlastnosti určeny i u insulinových analogů běžně používaných v medicinální praxi. Šlo o analogy s rychlým nástupem působení: insulin glulisin (Apidra®, Sanofi-Aventis, USA) a insulin aspart (NovoRapid®, Novonordisk, Dánsko) věnované MUDr. Martinem Haluzíkem z 1. lékařské fakulty UK. Výsledky ukazují, že zatímco AspB28-insulin (aspart) má dimerizační schopnosti snížené přibližně 34krát, LysB3-GluB29-insulin (glulisin) má téměř 5x vyšší schopnost tvořit dimery v porovnání s insulinem. Křivky ITC měření jsou zobrazeny na Obr. 32.

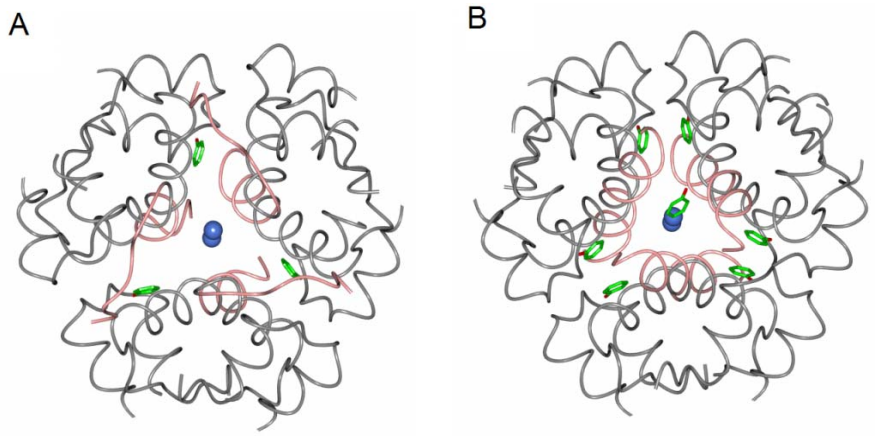


Obr. 32: Výsledné disociační křivky insulinových analogů určeny metodou ITC: A) AspB28-insulin - insulin aspart, B) LysB3-GluB29-insulin - insulin glulisin.

4.3.6. Krystalové struktury analogů

Krystalové struktury byly určeny u čtyř připravených analogů této série, PheB26-insulinu, AsnB26-insulinu, SarB26-insulinu a GlyB26-insulinu. První dva byly vykrystalizovány v podmínkách dimerních (pH 3,0) i hexamerních (pH 7,5–8,2). Naopak, analogy se sarkosinem a glycinem v poloze B26 krystalizovaly jenom jako monomery (pH 3,0).

Struktura analogu PheB26-insulinu byla určená z hexamerních i z dimerních podmínek. V hexamerních podmínkách vytváří tento analog strukturu T3R3 (Obr. 33 A). Konformace T3R3 se nejčastěji tvoří bez přítomnosti fenolu se čtyřmi ionty zinku. Avšak v případě analogu PheB26-insulinu vznikla poměrně málo běžná struktura T3R3 se dvěma ionty zinku a třemi molekulami fenolu, a to ve stejných pozicích jako u hexamerního uspořádání R6 (Obr. 33 B). Toto uspořádání se vyskytuje při krystalizaci insulinu či jeho analogů v přítomnosti nízké koncentrace fenolu v krystalizačním roztoku. Tak tomu bylo i v našem případě.

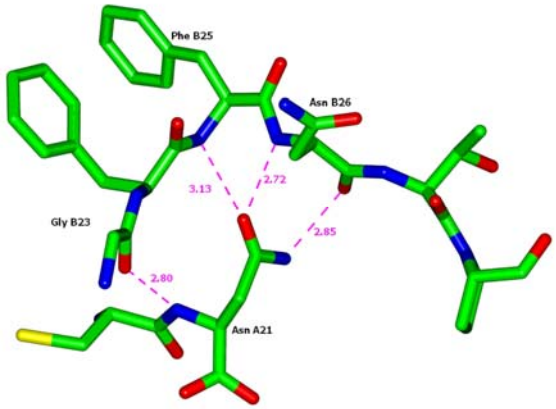


Obr. 33: Hexamerní struktury, A) T3R3 konformace PheB26-insulinu, B) R6 konformace lidského insulinu (PDB kód 1ZNJ). Zobrazeny jsou molekuly fenolu (zeleně) a ionty zinku (modře). Barevně jsou odlišeny pozice B1–B8.

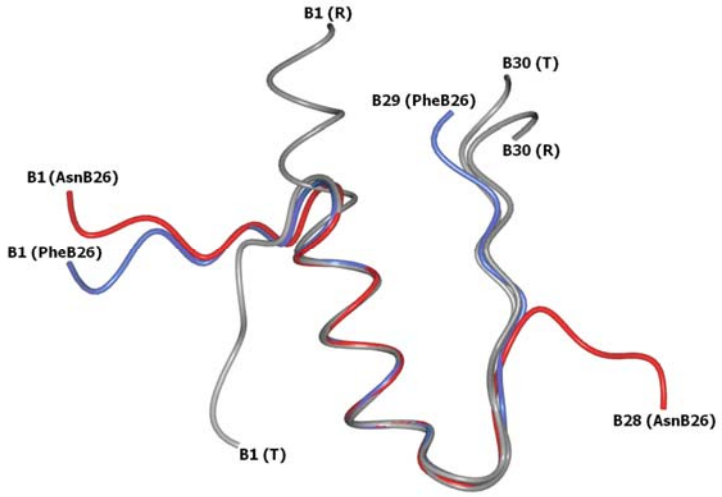
V dimerních podmínkách při pH 3,0 vykrystalizoval analog PheB26-insulin jako klasický dimer insulinu v ortorombické soustavě. V porovnání s tímto dimerem lidského insulinu (PDB kód 1GUJ) je struktura hlavního peptidového řetězce PheB26-insulinu téměř identická. C-konec B-řetězce je přimknutý k centrální α-šroubovici a N-konec B-řetězce analogu vytváří stejně jako jiné dimerní krystalické analogy konformací O-stavu, který se od definovaných T- a R-konformací liší (viz kapitola 1.2.2 a také Obr. 35). Při detailním porovnání lidského dimeru s dimerem analogu PheB26-insulinu je vidět, že fenylalanin v pozici B26 se velmi dobře adaptoval v hydrofobní kapse původně tvořené tyrosinem B26, valiny B3 a B12, prolinem B28, fenylalaninem B24 a tyrosinem B16 z druhého monomeru dimeru. Nepřítomnost hydroxylové skupiny na PheB26 se projevila přerušením vodíkové vazby TyrB26 zprostředkované jednou molekulou vody (Wat 1) s GlyB8.

Analog AsnB26-insulin vykrystalizoval jenom v dimerních podmínkách při pH 3,0, a to pouze jako monomer. Asparagin v poloze B26 vytváří ohyb nového typu, který se odlišuje od B26-ohybu vytvářeného analogy s *N*-methylovanou peptidovou vazbou B25–B26 na C-konci B-řetězce (viz kapitola 4.1.5). Toto uspořádání je stabilizováno vodíkovými vazbami C-koncových aminokyselin s AsnA21, zejména s karbonylovou a amidovou skupinou PheB25 a AsnB26 (viz Obr. 34). Tím se původní interakce mezi GlyB23(CO) a AsnA21(NH) ještě zesiluje. Vzniklé odklopení řetězce od původní konformace je dáno pravděpodobně repulzí polárního asparaginu z jinak hydrofobní kapsy. Zajímavým zjištěním je také absence vodíkové vazby mezi PheB25(NH) a TyrA19(CO) zaznamenaná u obou zmíněných analogů,

PheB26-insulinu i AsnB26-insulinu. Porovnání B-řetězců monomerních struktur analogů PheB26-insulinu, AsnB26-insulinu s lidským insulinem v T- a R-konformaci je vidět na Obr. 35.



Obr. 34: Detail interakce AsnA21 s aminokyselinami na C-konci B-řetězce v nové konformaci popsané u AsnB26-insulinu. Postranní řetězec AsnA21 interaguje s amidem PheB25 a s amidem i karbonylem AsnB26. Tím se vzdálenost mezi karbonylem GlyB23 a amidem AsnA21 sníží z 3,0 Å u lidského insulinu na 2,8 Å. Vodíkové vazby jsou znázorněny růžovou přerušovanou čarou.

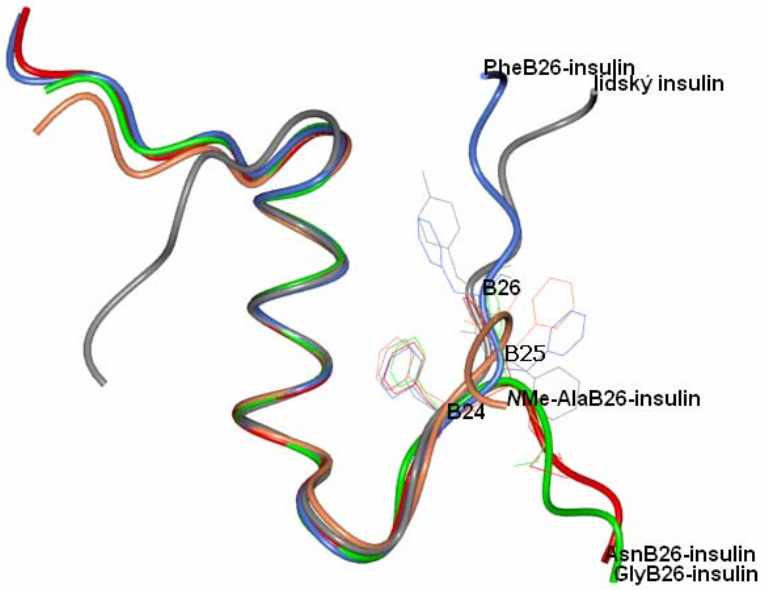


Obr. 35: Struktura B-řetězce analogů AsnB26-insulinu (červeně) a PheB26-insulinu (modře). Zobrazen je překryv struktur s lidským insulinem (šedě) v T- i R-konformaci.

N-konec B-řetězce AsnB26-insulinu opět zaujímá podobnou konformaci jako N-konce B-řetězců dimeru PheB26-insulinu i popsané struktury u *N*MeAlaB26-DTIA analogu v kapitole 4.1.5. Jde o pseudo β-otáčku typu II stabilizovanou i+3 vodíkovou vazbou mezi NH-HisB5 a

karbonylem postranního řetězce AsnB3 nazývanou zde jako O-stav, intermediální konformační stav mezi T- a R-konformací (viz kapitola 1.2.2).

SarB26-insulin krystalizoval jenom v monomerních podmínkách (pH 3,0). Avšak C-konec B-řetězce nelze od pozice GluB21 na mapě elektronových hustot definovat a tudíž celý úsek B22–B30 není vidět. Je to pravděpodobně také důsledek velké flexibility C-koncové části B-řetězce způsobené provedenou substitucí.



Obr. 36: Překryv struktur: lidského insulinu (šedě, PDB kód 1MSO), *N*Me-AlaB26-insulin (oranžově, PDB kód 2WRX), AsnB26-insulin (červeně), PheB26-insulinu (modře) a GlyB26-insulinu (zeleně). Znázorněny jsou postranní řetězce pozic B24, B25 a B26. U AsnB26-insulinu a GlyB26-insulinu je na C-konci B-řetězce pozorována nová konformace, která se odlišuje od dříve popsaného B26-ohybu *N*Me-AlaB26-insulinu. Konformace na N-konci B-řetězce je však u všech analogů shodná, tvořící O-stav. Zde zobrazena pouze T-konformace insulinu.

GlyB26-insulin tvořil krystaly také pouze v monomerních podmínkách (pH 3,0). Glycin v této poloze způsobí jak ztrátu chirality, tak i ztrátu postranního řetězce. Výsledkem je vznik nové otáčky v pozicích B24–B30 odlišující se od B26-ohybu popsaného v kapitole 4.1.5, ale velmi podobná ohybu, který můžeme pozorovat u struktury monomerního AsnB26-insulinu (Obr. 35). Řetězec se zde začíná otáčet již od PheB24 a směřuje ven od zbytku molekuly i od konformace B26-ohybu (porovnání se strukturou *N*Me-AlaB26-insulinu uvádí Obr. 36). Tato nová konformace je stabilizována vodíkovými vazbami mezi karbonylem B26 a amidem postranní skupiny AsnA21 (3,0 Å) a NH peptidové vazby AsnA21 a karbonylem

GlyB23 (2,7 Å), velmi podobně jako u AsnB26-insulinu na Obr. 34. Právě interakce s AsnA21 má pravděpodobně za následek výraznější odchýlení nové konformace od zbytku molekuly. Konformace N-konce B-řetězce je opět v intermediálním O-stavu (viz Obr. 36).

4.3.7. Molekulová dynamika vybraných analogů

Energetické výpočty interakcí ukazují, že mutace v pozici B26 mají vliv na interakční energii mezi postranním řetězcem této pozice a zbytkem molekuly dimeru insulinu. Vypočteny byly změny způsobené substitucí tyrosinu za asparagin, glutamin a fenylalanin. Interakční energie postranního řetězce B26 se zbytkem molekuly insulinu v monomeru 1 (řetězce AB) ukazuje Tab. 16. Energetické změny byly vypočteny metodami molekulové dynamiky, a to jak s přídavkem molekuly vody přemosťující postranní řetězec pozice B26 a GlyB8 (Wat1, viz kapitola 3.9), tak i bez ní. Interakční energie za přítomnosti molekuly vody Wat1 ukazují, že TyrB26 je pevně vázán ke zbytku molekuly, avšak ztráta hydroxylu u PheB26 tuto interakci zeslabuje asi o 14 kJ/mol. GlnB26 se váže ještě o 5 kJ/mol slaběji; AsnB26 se váže ke zbytku molekuly nejslaběji. Za nepřítomnosti Wat1 je situace odlišná a vede k zeslabení interakce Asn, Gln i Tyr. Interakce Phe zůstává na stejné úrovni jako v přítomnosti Wat1, nicméně je slabší než interakce Tyr s Wat1.

Tab. 16: Interakční energie mezi různými postranními řetězci B26 a zbytkem molekuly insulinu (řetězce AB z dimeru insulinu). Výpočet byl proveden jednak s přídavkem molekuly vody (Wat1) zprostředkující vodíkové vazby mezi OH tyrosinu B26 a CO skupinou GlyB8, a také bez přidání této molekuly vody.

Řetězce	*Pozice B26*	*Interakční energie bez Wat1 (kJ/mol)*	*Interakční energie s Wat1 (kJ/mol)*
A, B	Asn	5,9	-16,3
	Gln	-9,6	-31,0
	Phe	-37,7	-36,0
	Tyr	-31,0	-50,2

4.4. Syntéza a charakterizace nových analogů insulinu modifikovaných v poloze B24 za účelem studia role PheB24 při tvorbě aktivní formy insulinu.

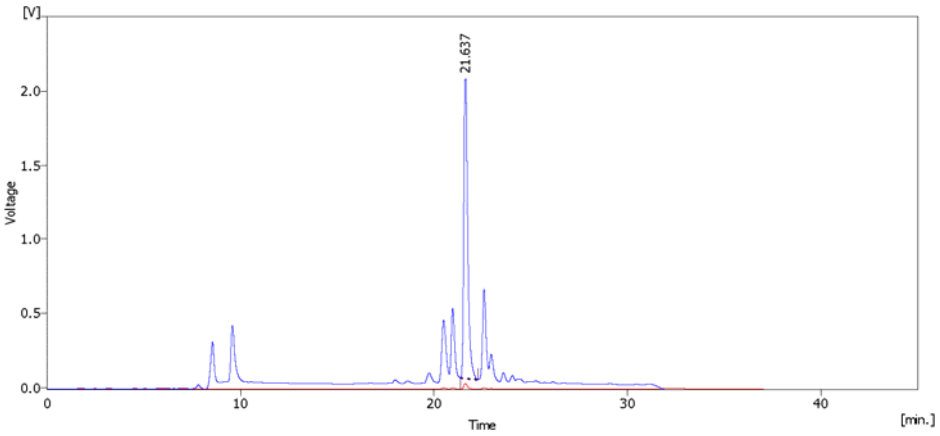
Výsledky této práce jsou prezentovány v tomto manuskriptu: Žáková, L., Kletvíková, E., Veverka, V., Lepšík, M., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., Brzozowski, A. M. (2013) Structural integrity of the B24 site in human insulin is important for hormone functionality. ***J. Biol. Chem.*** Rukopis v recenzním řízení.

4.4.1. Příprava oktapeptidů

Pro tuto sérii insulinových analogů byly připraveny čtyři analogy s modifikací v pozici B24 a dva analogy se záměnou současně v poloze B24 i B26. Syntetizovány tak byly celkem čtyři oktapeptidy se záměnou v pozici B24 a dva oktapeptidy se záměnou v obou pozicích. Všechny peptidy byly připraveny syntézou na pevné fázi ve formě volných C-koncových kyselin podle postupu uvedeného v kapitole 3.2. Spolu s výtěžky syntetických reakcí jsou uvedeny v Tab. 17. Lysin v poloze B29 (resp. B28) měl opět N^{ε}-aminoskupinu chráněnou fenylacetylovou skupinou (Pac). Všechny peptidy vykazovaly čistotu větší než 95 % (RP-HPLC). Příklad purifikace oktapeptidu se záměnou v pozici B26 ukazuje Obr. 37.

Tab. 17: Seznam připravených oktapeptidů a výtěžky jejich syntézy. Sekvence jsou psány jednopísmenným kódem s výjimkou substituované aminokyseliny, která je zobrazena třípísmenným kódem v závorce.

Peptid	*Výtěžek syntézy*
analogy se záměnou v pozici B24	
G-(L-His)-FYTP-K(Pac)-T	41 %
G-(D-His)-FYTP-K(Pac)-T	33 %
G-(Sar)-FYTP-K(Pac)-T	48 %
G-(Pro)-FYTP-K(Pac)-T	31 %
analogy s vícenásobnou záměnou	
G-(D-His)-F-(Glu)-TP-(Pac)-T	36 %
G-(D-His)-F-(Glu)-TK(Pac)-PT	29 %



Obr. 37: Purifikace surového oktapeptidu G-Pro-FYTP-K(Pac)-T s použitím RP-HPLC.

4.4.2. Příprava des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI)

Způsob přípravy des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI) byl zachován stejný pro semisyntetické účely všech insulinových analogů tak, jak to popisuje kapitola 3.3. Výsledek přípravy DOI spolu s výtěžkem je popsán v kapitole 4.1.2.

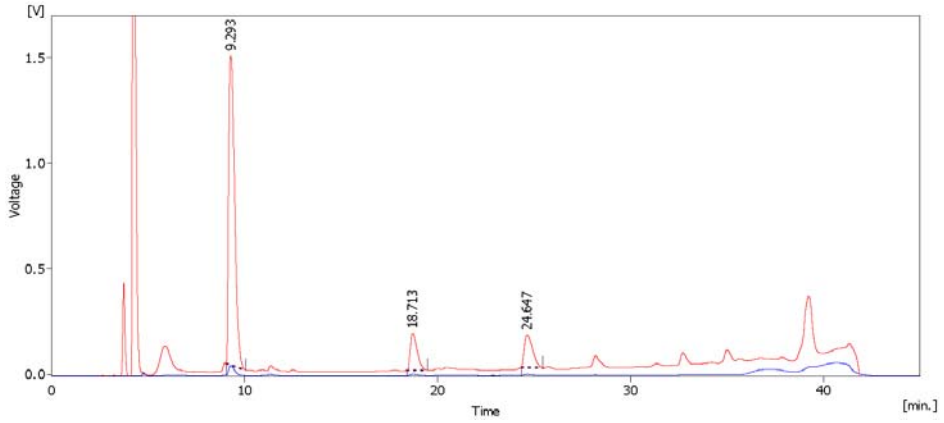
4.4.3. Výsledky enzymatické semisyntézy připravených analogů insulinu

Enzymatickou semisyntézou byly z oktapeptidů vypsaných v Tab. 17 připraveny nové insulinové analogy. Spolu s výtěžky semisyntetických reakcí jsou uvedeny v Tab. 18. Čistota připravených analogů byla větší než 95 % (RP-HPLC).

Tab. 18: Insulinové analogy připravené enzymatickou semisyntézou. Uvedeny jsou také výtěžky jednotlivých semisyntéz (v %).

Analog	*Výtěžek semisyntézy*
analogy se záměnou v pozici B24	
L-HisB24-Lys(Pac)B29-insulin	25 %
D-HisB24-Lys(Pac)B29-insulin	8 %
SarB24-Lys(Pac)B29-insulin	5 %
ProB24-Lys(Pac)B29-insulin	9 %
analogy s vícenásobnou záměnou	
D-HisB24-GluB26-Lys(Pac)B29-insulin	6 %
D-HisB24-GluB26-Lys(Pac)B28-ProB29-insulin	8 %

Příklad purifikace D-HisB24-Lys(Pac)B29-insulinu je zobrazen na Obr. 38.



Obr. 38: Purifikace analogu D-HisB24-Lys(Pac)B29-insulinu s použitím RP-HPLC. Vyznačené vrcholy odpovídají frakci peptidu G-(D-His)-FY-TP-K(Pac)T (Rt = 9,293), frakci DOI (Rt = 18,713) a frakci produktu (Rt = 24,647).

Finálním krokem přípravy nového insulinového analogu je odštěpení fenylacetylové skupiny (Pac) na N^{ε}-aminoskupině LysB29 (resp. LysB28). Deprotekce probíhala působením enzymu penicilin G acylázy, výtěžky reakcí jednotlivých analogů ukazuje Tab. 19. Čistota výsledných analogů byla větší než 95 % (RP-HPLC).

Tab. 19: Seznam připravených analogů insulinu s modifikací v pozici B24 a B26. Uvedeny jsou výtěžky deprotekce fenylacetylové skupiny (Pac) na LysB29 (příp. LysB28).

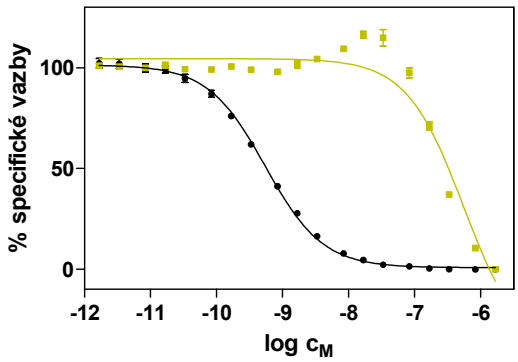
Analog	*Výtěžek deprotekce (Pac)*
analogy se záměnou v pozici B24	
L-HisB24-insulin	43 %
D-HisB24-insulin	74 %
SarB24-insulin	20 %
ProB24-insulin	61 %
analogy s vícenásobnou záměnou	
D-HisB24-GluB26-insulin	59%
D-HisB24-GluB26-LysB28-ProB29-insulin	38 %

4.4.4. Vazebné afinity připravených analogů

Testování vazebných afinit *in vitro* všech připravených analogů kromě ProB24-insulinu bylo provedeno metodou kompetice analogů s lidským radioaktivně značeným (^{125}I-TyrA14) insulinem o insulinový receptor v membránách tukových buněk. Tukové buňky byly získané z potkaní epididymální tkáně. Touto metodou byla určena hodnota IC_{50} analogu a porovnána s toutéž hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,8–1,0 nM (viz kapitola 3.6). V případě ProB24-insulinu byla vazebná afinita stanovena metodou kompetice analogu s lidským radioaktivně značeným (^{125}I-TyrA14) insulinem o insulinový receptor v membránách lidských lymfocytů IM-9 (Tab. 21, Obr. 40). Určena tak byla rovnovážná disociační konstanta K_d a porovnána se stejnou hodnotou pro lidský insulin, která se v jednotlivých měřeních pohybovala v rozmezí 0,2–0,4 nM (viz kapitola 3.6).

Tab. 20: Vazebná afinita ProB24-insulinu vůči insulinovému receptoru v membránách lidských lymfocytů IM-9. Hodnota K_d lidského insulinu byla 0,39 nM. Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM a počet paralelních měření (n).

Analog insulinu	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*	
lidský insulin	100 ± 2	(6)
ProB24-insulin	0,16 ± 0,05	(4)



Obr. 39: Vazebné křivky lidského insulinu (černě) a ProB24-insulinu (žlutě) získané měřením na membránách lymfocytů IM-9.

Výsledné vazebné afinity analogů zobrazuje Tab. 21 a Tab. 20. Hodnoty IC_{50} a K_d analogů jsou vztaženy k příslušným hodnotám pro lidský insulin a vyjádřeny jako relativní vazebné afinity (v %) podle vztahu: (IC_{50} (K_d) lidského insulinu / IC_{50} (K_d) analogu) x 100. Vazebné křivky testovaných analogů jsou uvedeny na Obr. 40 a Obr. 39.

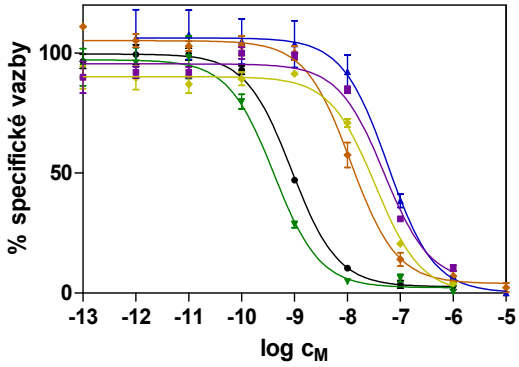
Tab. 21: Vazebné afinity insulinových analogů vůči insulinovému receptoru v plasmatických membránách potkaních tukových buněk. IC_{50} hodnoty lidského insulinu jsou v rozmezí 0,8–1,0 nM. Zobrazeny jsou relativní vazebné afinity v % ± SEM a počet paralelních měření (n).

Analog insulinu	*Rel. vazebná afinita (%) a (n)*	
lidský insulin	100 ± 7	(3)
analogy se záměnou v pozici B24		
L-HisB24-insulin	1,5 ± 0,2	(3)
D-HisB24-insulin	217 ± 20	(3)
SarB24-insulin	6,9 ± 1,3	(5)
analogy s vícenásobnou záměnou		
D-HisB24-GluB26-insulin	2,9 ± 0,3	(4)
D-HisB24-GluB26-LysB28-ProB29-insulin	1,8 ± 0,1	(4)

Výsledky měření vazebných afinit analogů modifikovaných v pozici B24 potvrzují již předešlé poznatky o záměně Phe v této pozici za jakoukoliv L-aminokyselinu (viz kapitola 1.6.1.1). Důsledkem je vždy prudké snížení afinity vůči IR. Tak je tomu i v případě našich analogů, kdy nejmenší dopad na vazebnou afinitu má substituce Phe za Sar (*N*Me-Gly) u SarB24-insulinu, který vykazuje jenom 7 % vazebné afinity insulinu. L-HisB24-insulin vykazuje jenom 1,5 % vazebné afinity insulinu, ProB24-insulin je téměř neaktivní (0,16 %). Opačně je tomu v případě D-His v této pozici. Tato záměna u D-HisB24-insulinu vede podle očekávání ke zvýšení vazebné afinity k IR, a to až na dvojnásobek (217 % vazebné afinity insulinu). Vazebné křivky zobrazuje Obr. 39.

V předešlé kapitole (4.3.4) je uveden analog GluB26-LysB28-ProB29-insulin s téměř dvojnásobnou vazebnou afinitou vůči lidskému insulinu. V této sérii analogů jsme připravili analog, kde jsme spojili dvě modifikace zvyšující afinitu k receptoru, D-His v pozici B24 a Glu v pozici B26. Tato dvojitá záměna však překvapivě vede k dramatickému snížení afinity analogu D-HisB24-GluB26-insulinu až na 3 % afinity insulinu. Podobný výsledek byl

pozorován i u analogu D-HisB24-GluB26-LysB28-ProB29-insulinu, jehož afinita k receptoru nedosahuje ani 2 % afinity insulinu.



Obr. 40: Vazebné křivky lidského insulinu a insulinových analogů získané měřením na plasmatických membránách potkaních adipocytů. Černě - lidský insulin, modře - HisB24-insulin, zeleně - D-HisB24-insulin, oranžově - SarB24-insulin, žlutě - D-HisB24-GluB26-insulin, fialově - D-HisB24-GluB26-LysB28-ProB29-insulin.

4.4.5. Krystalová struktura L-HisB24-insulinu

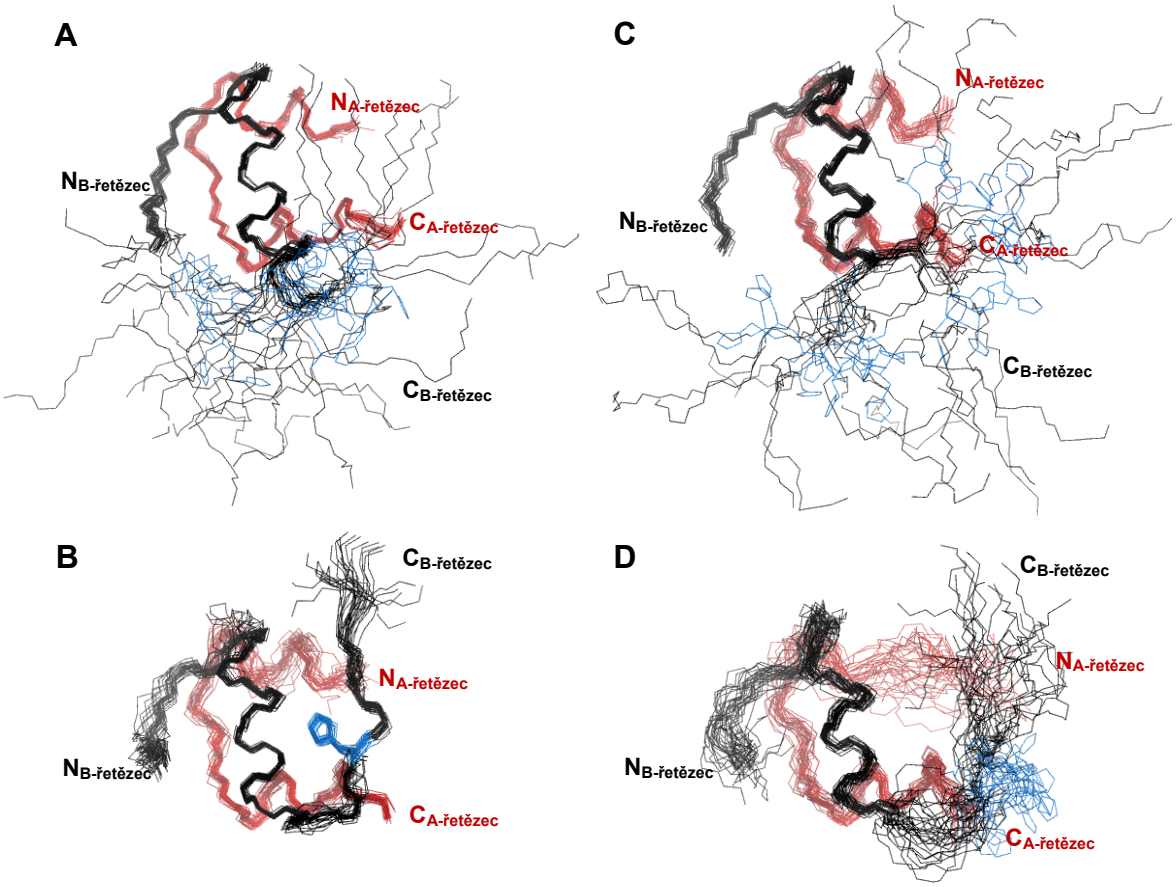
Strukturní analýza byla provedena pouze u analogu L-HisB24-insulinu, neboť ostatní analogy se vykrystalizovat nepodařilo. L-HisB24-insulin vykrystalizoval v monomerních podmínkách (pH 3,0). I přes relativně vysoké rozlišení získané struktury není C-konec B-řetězce dále od GluB21 viditelný. Je to pravděpodobně způsobeno vysokou flexibilitou a neuspořádaností této části molekuly, což ji stabilizaci v krystalu neumožňuje. Vysokou neuspořádanost v kyselém pH C-konce B-řetězce tohoto analogu potvrzují i výsledky NMR struktury, jež bude prezentována v následující kapitole. Z krystalové struktury je nicméně možné získat několik informací. α-šroubovice A-řetězce (A1–A19) je otočena o 38° oproti struktuře lidského insulinu, což je normálně způsobeno absencí interakce B25(NH)–A19(CO). Podobný jev byl pozorován u analogů *N*Me-AlaB26-DTIA či *N*Me-HisB26-DTIA (viz výsledky popsané v kapitole 4.1.5). TyrB16 i ValB12 jsou nakloněny směrem k místu, kde se normálně nachází PheB24. Navíc TyrB16 a ValB12 vytváří mezi sebou van der Waalsovy interakce. N-konec B-řetězce (B1–B6) tvoří strukturu O-stavu, jak to bylo popsáno u všech krystalových struktur monomerních analogů v kapitole 4.1.5.

4.4.6. NMR struktury L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu

NMR spektra analogů L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu byla nejdříve měřena v kyselém pH 1,9 (kys. octová). Výsledná NMR spektra vysoké kvality potvrdila monomerní chování těchto analogů. Výsledky chemického posunu $H^{\varepsilon 1}$ postranních řetězců všech histidinů (B5, B10 a B24) ukazují na jejich protonovaný stav. Protože ale C-konce B-řetězce obou analogů vykazovaly vysokou míru neuspořádanosti (viz Obr. 41 A a C), byly analýzy provedeny i v bazickém pH (Tris/HCl).

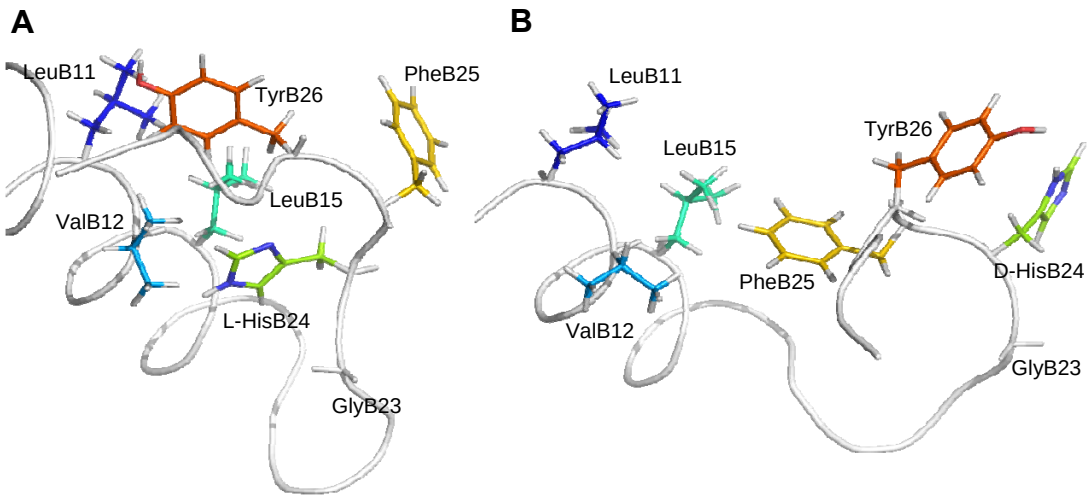
Při pH 7,0 jsou analogy L-HisB24-insulin a D-HisB24-insulin méně rozpustné (a navíc mají větší schopnost agregovat), a proto jejich spektra vykazují nižší kvalitu. Při vyšším pH (8,0) jsou však rozpustné až do koncentrace 0,5 mM a stále monomerní. I přes výraznou část nepřítomných H^N signálů (rychlá výměna s rozpouštědlem v bazickém pH) byly tyto struktury charakterizovány. U L-HisB24-insulinu bylo přiřazeno 91,0 % signálů, v případě D-HisB24-insulinu to bylo 86,5 %. Ze signálu 2D NOESY spekter bylo určeno celkem 30 struktur, které byly získány ze 100 různých počátečních konformací.

Pozoruhodným výsledkem NMR struktur získaných při zásaditém pH je vyšší uspořádanost struktur, zejména struktury L-HisB24-insulinu. Všechny vzdálenosti vazeb uvedených dále jsou použity z první z 30 struktur získaných NMR analýzou. Postranní řetězec histidinu B24 je umístěn v původní B24 kapse. Jeho N^{ε} je protonovaný a vytváří vodíkovou vazbu (2,9 Å) s CO pozice B12. Dusík N^{δ} je naopak deprotonovaný a tvoří vodíkovou vazbu s NH skupinou pozice B26. Postranní řetězec TyrB26 je posunutý a jeho hydroxylová skupina tvoří přímou vodíkovou vazbu (bez účasti vody Wat 1) s GlyB8(CO) (3,8 Å) a/nebo s GlyB8(NH) (3,3 Å). Postranní řetězec ProB28 tvoří hydrofobní interakce s aromatickým kruhem TyrB26. Dimerní vazebný povrch je narušený, L-HisB24-insulin je tudíž monomerní. Výsledkem popsaných změn je velmi stabilní struktura, kde část C-konce B-řetězce pozic B22–B30 je velmi uspořádaná a pevně interaguje se zbytkem molekuly (viz Obr. 41 B). Histidin nacházející se na místě fenylalaninu B24 je zde pravděpodobně vázán pevněji než původní Phe. To následně zvyšuje rigiditu molekuly, čímž se C-konec B-řetězce pravděpodobně hůř odklápí.



Obr. 41: NMR struktury L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu. A-řetězec je zobrazen červeně, B-řetězec černě. A) L-HisB24-insulin při pH 1,9; B) L-HisB24-insulin při pH 8,0; C) D-HisB24-insulin při pH 1,9; D) D-HisB24-insulin při pH 8,0. Postranní řetězce histidinu jsou zobrazeny modře. Označeny jsou také N- a C-konce A- i B-řetězce. C-koncová část B-řetězce (B21–B30) je v případě struktur L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu při pH 1,9 vysoce flexibilní, zatímco při pH 8,0 je tato část molekuly analogů uspořádanější.

NMR struktura D-HisB24-insulinu je také při pH 8,0 uspořádanější oproti struktuře získané při pH 1,9. Avšak v porovnaní se strukturou L-HisB24-insulinu je flexibilnější (viz Obr. 41 D). D-His je v tomto případě orientován ven od zbytku molekuly, opačně než L-His. Hydrofobní B24 kapsu z části vyplňuje PheB25. TyrB26 je podobně jako D-His orientován směrem ven od zbytku molekuly (viz Obr. 42). Další strukturní změnou v porovnání s přirozeným insulinem je více otevřená či rozšířená B21–B23 otáčka, což pravděpodobně opět naruší dimerní vazebný povrch a analog je tak monomerní. Celkově je tedy struktura D-HisB24-insulinu oproti struktuře insulinu či struktuře L-HisB24-insulinu méně uspořádaná.



Obr. 42: Srovnání konformací C-konce B-řetězce L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu při pH 8,0. Zobrazena je jedna z 30 struktur získaných NMR analýzou. A) Struktura L-HisB24-insulinu, kde je L-HisB24 orientován dovnitř molekuly k jejímu hydrofobnímu jádru podobně jako PheB24 u lidského insulinu. Struktura je stabilizována hydrofobními interakcemi s methylovými skupinami ValB12 a LeuB15 a také interakcí postranního řetězce TyrB26 s LeuB11. B) Struktura D-HisB24-insulinu, kde je kontakt s hydrofobním jádrem molekuly nahrazen postranním řetězcem PheB25, přičemž postranní řetězce D-HisB24 a TyrB26 jsou v kontaktu s rozpouštědlem. Vzniká tak specifická konformace, jež je více otevřená a flexibilní v porovnání jak s L-HisB24-insulinem, tak i s lidským insulinem.

A-řetězec obou analogů nabývá charakteristickou konformaci šroubovice-otáčka-šroubovice nezávisle na pH. Pozice A1–A6 nejsou při pH 8,0 přesně lokalizovány, a to z důvodu chybějících NOE signálů amidových vodíků hlavního řetězce, které pomáhají stabilizovat helikální strukturu. U D-HisB24-insulinu je tento efekt markantnější, přičemž tato struktura vykazuje celkově méně NOE signálů. N-konec B-řetězce (B1–B8) vykazuje T-konformaci podobně jako jiné monomerní insuliny v roztoku.

4.5. Určení vazebných afinit insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu vůči isoformě A insulinového receptoru v rámci studie rozdílů v signalizaci této isoformy (IR-A) po stimulaci insulinem, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinem.

Výsledky této práce byly prezentovány v publikaci: Morcavallo, A., Genua, M., Palummo, A., Kletvíková, E., Jiráček, J., Brzozowski, A. M., Iozzo, R. V., Belfiore, A. a Morrione, A. (2012) Insulin and Insulin-like Growth Factor II Differentially Regulate Endocytic Sorting and Stability of Insulin Receptor Isoform A. ***J. Biol. Chem.*** 287: 11422–11436.

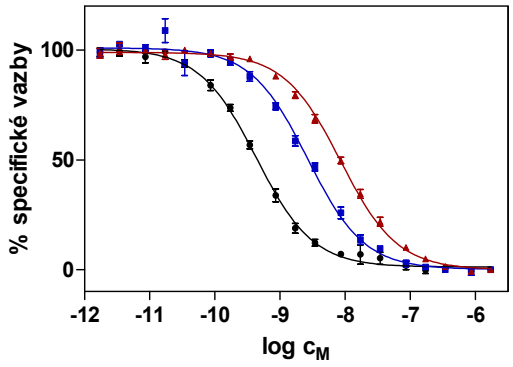
Ve spolupráci s vědeckou skupinou Andrea Morrioneho (Department of Urology and Endocrine Mechanisms and Hormone Action Program, Thomas Jefferson University, Philadeplphia, USA) a Antonina Belfioreho (Department of Health and Endocrinology, University of Catanzaro, Italy) byly po navázání na IR-A studovány rozdíly v signálních drahách hormonů insulinu, IGF-2 a analogu *N*Me-TyrB26-insulinu. Autorka této práce přispěla do této studie určením vazebných afinit insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu k isoformě A insulinového receptoru obsaženého v IM-9 buňkách (viz kapitola 3.6.3). Výsledky signalizačních experimentů provedených ve spolupracujících laboratořích budou zde popsány jen stručně.

Nedávné studie ukázaly, že mezi internalizací IR, jeho ubikvitinací a následnou signální kaskádou vyvolanou po navázání ligandu existuje určitá spojitost (148,149). Tyto procesy byly sledovány na specifické buněčné linii R-/IR-A (myší embryonální fibroblasty obsahující výhradně lidské IR-A receptory), a to po stimulaci insulinem, IGF-2 a analogem *N*Me-TyrB26-insulinem.

Studium internalizace IR-A receptoru z povrchu buněk bylo provedeno ELISA metodou. V porovnání s insulinem dochází působením IGF-2 k signifikantně nižší internalizaci receptoru. Navzdory tomuto zjištění je stupeň ubikvitinace vyvolané insulinem či IGF-2 velice podobný, dokonce mírně zvýšený pro IGF-2. Navíc internalizace stimulovaná analogem *N*Me-TyrB26-insulinem byla také na úrovni internalizace vyvolané IGF-2.

IGF-2 se na IR-A isoformu insulinového receptoru váže s afinitou 3–10krát menší v porovnání s insulinem, a to v závislosti na tkáni. Podobnou vazebnou afinitu vykazuje

analog *N*Me-TyrB26-insulin (21% vůči IR tukových buněk obsahujících 60–80 % IR-B isoformy) (117). Přesná vazebná afinita analogu byla v této studii určena vůči IR-A isoformě na IM-9 buněčné linii. Zde je pozorován mírný pokles afinity *N*Me-TyrB26-insulinu, a to na 16 %. IGF-2 se váže k IR-A jenom se 7% afinitou v porovnání s lidským insulinem, což je v souladu s publikovanými výsledky měřenými na stejné buněčné linii (145). Vazebné křivky ze zmíněných experimentů ukazuje Obr. 43.



Obr. 43: Vazebné křivky lidského insulinu (černě), IGF-2 (červeně) a *N*Me-TyrB26-insulinu (modře) získané měřením na membránách lidských lymfocytů IM-9 obsahující IR-A isoformy insulinového receptoru.

Pro podobnou afinitu IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu k IR-A byla následně testována fosforylace IR-A a signálních molekul Akt a ERK1/2 vyvolaná právě jejich stimulací. Úroveň fosforylace IR-A způsobená účinkem IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu je velmi podobná a zároveň nižší než po stimulaci insulinem. Stejné výsledky byly pozorovány nejen v suprafyziologických koncentracích ligandů (200 nM), ale i při jejich fyziologických množstvích (1 a 5 nM). Zatímco fosforylace signální molekuly Akt je v případě IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu výrazně snížená v porovnání s insulinem, fosforylace ERK1/2 dosahuje úrovně insulinu již po 10 min., avšak insulin si ji při koncentracích 1 a 5 nM zachovává po delší dobu. Při 30 nM koncentraci je aktivace ERK1/2 porovnatelná u všech ligandů.

Sledován byl také účinek insulinu a IGF-2 na stabilitu IR-A. Zjištěno bylo, že prodloužený účinek insulinu způsobí snížení celkového počtu receptorů IR-A již po 8h působení, zatímco působení IGF-2 má na snížení počtu IR-A mírnější účinek. Podobný výsledek byl pozorován v případě signální molekuly IRS-1. Prodloužené působení 5 nM insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu ukázalo, že po stimulaci insulinu dochází k degradaci receptorů IR-A i

substrátu IRS-1, avšak působení IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu nemá na kvantitu IR-A a IRS-1 vliv. Degradace IR-A je podle výsledků z imunoblotů regulovaná jak cestou závislou na klatrinu, tak cestou nezávislou na klatrinu; inhibice obou těchto možných cest snižuje internalizaci IR-A. Sledována byla také fosforylace receptoru a signálních molekul po inhibici internalizace, přičemž ovlivněna je více dlouhodobá než krátkodobá fosforylace substrátů, která probíhá u plasmatické membrány. Cesta závislá na klatrinu aktivuje spíše Akt fosforylaci, naopak na klatrinu nezávislá cesta reguluje víc fosforylaci ERK a serinovou fosforylaci substrátu IRS-1.

Další rozdíly v působení insulinu a IGF-2 byly zaměřeny na fosforylaci Ser^{307} substrátu IRS-1. Serinová fosforylace je důležitým regulačním krokem v degradaci insulinu i molekuly IRS-1. Insulin stimuluje fosforylaci Ser^{307} již po 10 min., zatímco IGF-2 dosáhne úrovně porovnatelné s insulinem až po 60 min.

Imunofluorescenční studie za využití konfokálního mikroskopu vedly k závěru, že po stimulaci insulinem dochází k internalizaci IR-A do lysosomů, kdežto v případě stimulace IGF-2 internalizuje IR-A jenom do endosomů, tudíž receptor je zpátky recyklován na povrch buňky.

Internalizační experimenty spolu s testy stability molekul IR-A a IRS-1 byly provedeny také na buněčné linii NIH3T3/IR-A (obsahující endogenní IGF-1R receptory) a na R+/IR-A buňkách (obsahujících znovu transfektovaný IGF-1R receptor). I tyto výsledky potvrdily poznatky získané z R-/IR-A buněčné linie. V případě buněčného modelu MDA-MB-157 rakovinných buněk stimuluje insulin oproti IGF-2 internalizaci IR-A, avšak degradace IR-A ani IRS-1 nebyla pozorována. To naznačuje odlišné chování agresivních rakovinných buněk.

5. Diskuze

5.1. Studium funkční a strukturní charakterizace B26-analogů s cílem definovat aktivní konformaci insulinu na C-konci B-řetězce. Syntéza a charakterizace zkrácených a nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen nekódovanými aminokyselinami.

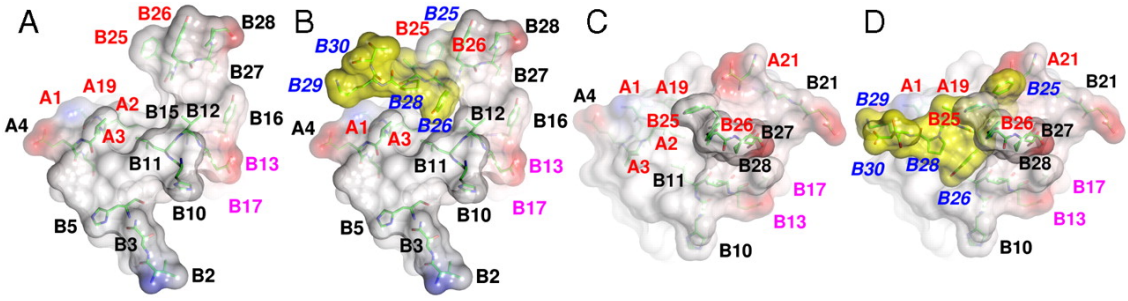
Pro tuto studii bylo připraveno několik analogů insulinu modifikovaných v pozici B26. Zájem o detailní strukturní analýzy vzbudily zejména aktivní analogy s vazebnou afinitou 2–5krát vyšší, než je vazebná afinita insulinu. Šlo zejména o zkrácené analogy *N*Me-AlaB26-DTIA, *N*Me-HisB26-DTIA a D-ProB26-DTIA. Charakterizovány byly rentgenovou krystalografií, podobně jako méně aktivní analogy plné délky, *N*Me-TyrB26-insulin a *N*Me-AlaB26-insulin. Společným rysem všech struktur byly nově pozorované konformace na C-konci i N-konci B-řetězce, které se odlišovaly od známých konformací lidského insulinu.

Pro C-konec B-řetězce zmíněných analogů je charakteristická struktura B26-ohybu, kde dochází k isomerizační změně peptidové vazby PheB25-TyrB26 z *trans* na *cis*. Pro stabilizaci tohoto ohybu je důležitá vodíková vazba PheB24(CO)–ThrB27(NH), jež má pravděpodobně význam i při vazbě přirozeného insulinu na receptor. Její přerušení u analogu, kde je karbonylová skupina pozice B24 selektivně redukovaná (substituce za $\psi(CH_2\text{-}NH)$), vede k úplné ztrátě aktivity tohoto analogu (112). NMR struktury dalšího aktivního analogu, D-AlaB26-DTIA, poukazují na význam flexibility C-konce B-řetězce tohoto analogu (116). Na základě těchto faktů předpokládáme, že konformace B26-ohybu napomáhá důležitému odklopení části B-řetězce od zbytku molekuly během vazby insulinu na insulinový receptor. Tato hypotéza je v souladu s teorií konformačních změn vyvolaných během vazby insulin-IR (20) a také s analýzami *trans*/*cis* izomerizace peptidové vazby (150-152).

Ke konformační změně dochází také na N-konci B-řetězce, kde vzniká v pozicích B3–B5 pseudo β-ohyb. Důsledkem je nová orientace N-konce odlišující se od obvyklých T- i R-konformací insulinu. Fyziologický význam těchto různých konformací však stále není objasněn, a je proto předmětem dalšího výzkumu. Je ovšem možné, že námi pozorovaný B3–

B5 pseudo β-ohyb či intermediální konformace nebo-li již dříve popsaný O-stav je znakem aktivní konformace insulinu. Tato struktura byla pozorována pouze u dimerních a monomerních krystalových struktur insulinu, v případě insulinu v roztoku jenom u specificky modifikovaného monomerního GluB1-GluB10-GluB16-GluB27-desB30-insulinu (34). Není ovšem vůbec vyloučeno, že právě v takové konformaci se N-konec B-řetězce insulinu při vazbě na IR nachází.

Výsledkem konformačních změn na C-konci B-řetězce je zpřístupnění hydrofobní části insulinu, konkrétně aminokyselin GlyA1, IleA2, ValA3 a TyrA19, která tak může přímo interagovat s receptorem. Ve struktuře lidského insulinu je tato část zakrytá právě pozicemi B25–B30 C-konce B-řetězce (viz Obr. 44).



Obr. 44: Molekulární vzhled reprezentativního insulinového analogu *N*Me-TyrB26-insulinu obsahujícího B26-ohyb. A) Hydrofobní dutina vzniklá novým konformačním uspořádáním připomínající tvar ruky: „palec“ je tvořen hydrofobním PheB25 a B26-ohybem, „dlaň“ je tvořena hydrofobními LeuB15, LeuB11, ValB12 a „prsty“ jsou tvořeny hydrofobními TyrA12, GlyA1, IleA2 a ValA3. Touto hydrofobní dutinou se analog „přichytí“ na receptor. Červeně jsou znázorněny pozice klasického vazebného povrchu, růžově pozice hexamerního povrchu. B) Struktura A doplněna o znázornění lidského insulinu odpovídajícího struktuře T6 insulinu (25) (žlutý model s modrým číslováním), kde C-konec B-řetězce zakrývá hydrofobní jádro molekuly insulinu. C) Pohled shora na strukturu A po otočení o 90°. D) Pohled shora na strukturu B po otočení o 90°.

Význam aminokyselin PheB24 a PheB25 pro správný účinek insulinu byl potvrzen již dříve (110,153). V případě zde uváděných krystalových struktur aktivních analogů je konformace postranního řetězce PheB24 zachovaná. Jinak to však je u PheB25, kde dochází k otočení postranního řetězce o 90°. To poukazuje na funkci PheB24 ve stabilizaci neodklopené části C-konce B-řetězce. Naopak Cα atom PheB25 je první, který se B26-ohybem otáčí, a tím tak dynamicky doplňuje úlohu PheB24.

Zkrácené analogy *N*Me-TyrB26-DTIA a *N*Me-PheB26-DTIA vykazují v porovnání s insulinem sníženou vazebnou afinitu (72 a 36%). Vysvětlení, proč tomu tak je, prozatím nemáme. Nahrazením tyrosinu B26 za alanin dochází u analogu AlaB26-insulinu ke snížení afinity na 36 % (49). Vložení poměrně velkého aromatického postranního řetězce může u zkrácených *N*-methylovaných analogů B26-ohyb destabilizovat. Tyto analogy také nekrystalizovaly, což může být odůvodněno zvýšenou flexibilitou. Ta byla rovněž pozorována u dalšího zkráceného analogu, des(B26–30)pentapeptid-insulinu (DPI) (154).

Analogy plné délky (*N*Me-AlaB26-insulin a *N*Me-TyrB26-insulin) zachovávají strukturu B26-ohybu, avšak jejich vazebná afinita je nižší než u lidského insulinu. Důvodem můžou být entropické či stéricky nevýhodné faktory. Stejný trend je pozorovaný i u jiných analogů plné délky, jejichž afinita je v porovnání se zkrácenými analogy často nižší (153). Konkrétních vysvětlení, proč nejsou *N*-methylované analogy plné délky tak aktivní, může být několik, např. že řetězec B27–B30 vyžaduje také příspěvek receptoru, aby zaujal aktivní konformaci nebo B26-ohyb není tou správnou konformací pro pozice B27–B30 anebo B26-ohyb není finální strukturou aktivní konformace insulinu.

5.1.1. Krystalová struktura analogu D-ProB26-DTIA v komplexu s extracelulární doménou receptoru insulinu

Po více než třicet let intenzivního výzkumu interakce insulinu s jeho receptorem odolávala 3D struktura tohoto komplexu pokusům o objasnění. V této práci zmíněné krystalové struktury analogu D-ProB26-DTIA, lidského insulinu a hovězího insulinu s rozpustnými konstrukty receptoru insulinu představují první detailní náhled na interakci těchto dvou důležitých proteinů. Bezesporu se jedná o nový milník ve výzkumu insulinu, a to i navzdory tomu, že jde o poměrně nízké rozlišení struktur (3,9–4,2 Å), že nebyl použit nativní receptor, ale jen části jeho α-podjednotky, a že důležité C- a N-konce B-řetězce insulinu nejsou ve struktuře viditelné. Výsledky této práce tak přinášejí mnoho nových poznatků důležitých pro pochopení mechanismu působení insulinu.

Získaná struktura jasně ukázala základní znaky interakce insulinu s IR a do velké míry potvrdila výsledky vazebných a „cross-link" studií s analogy insulinu. Potvrdilo se, že insulin se váže primárně na povrch L1 podjednotky receptoru. V této interakci je ovšem zásadní i příspěvek CT-peptidu C-konce α-podjednotky receptoru, který je i v nativním

receptoru vysoce flexibilní částí interakce (během vazby insulinu na IR pravděpodobně mění svou pozici na L1 doméně). V tomto popsaném komplexu byl fragment CT-peptidu (704–714) přidáván ke zbytku IR a insulinu zvlášť. Jednalo se tedy o ternární komplex (počítáme-li i protilátky, pak kvarterní).

CT-peptid interaguje s L1 doménou a centrální α-šroubovicí B-řetězce insulinu takovým způsobem (viz Příloha 4), že původní konformace C-konce B-řetězce (přiklopená ke šroubovici, jak je tomu v zásobních strukturách insulinu) je v tomto případě nemožná, neboť by se obě struktury nacházely na stejném místě. Potvrdilo se, že při interakci insulinu s IR musí k odklonu C-konce B-řetězce opravdu docházet. Toto odklopení umožní hydrofobním aminokyselinám centrální části insulinu a N-konce A-řetězce insulinu interagovat s receptorem.

Novým poznatkem je, že A-řetězec insulinu v tomto komplexu interaguje pouze s aminokyselinami CT-peptidu. V komplexu ovšem chybí informace o konformacích C- a N-konců B-řetězce insulinu, neboť tyto struktury nejsou viditelné. To jednak vypovídá o jejich vysoké mobilitě při interakci, a rovněž to potvrzuje nutnost odklonu C-konce B-řetězce od centrální *α*-šroubovice. Struktura komplexu naznačuje, že R-konformace ani T-konformace N-konce B-řetězce nebudou při vazbě přítomné. Je pravděpodobné, že N-konec B-řetězce se v nativním komplexu nachází v jednom ze stavů mezi R-konformací a T-konformací. Není vyloučeno, že může jít o popsaný O-stav. Naše úvahy a výsledky ohledně aktivní formy insulinu tak nebyly vyvráceny a spíše se potvrdily.

Je nutno vzít v úvahu, že konstrukty IR použité v této studii nejsou v nativní formě. V komplexu zcela chybí β-podjednotky receptoru, jeho transmembránová část a dokonce i fibronektinové domény, které jsou důležité pro vazbu druhého vazebného místa insulinu a pravděpodobně i pro přenos vazebné interakce na tyrosinkinázu β-podjednotky. Je pravděpodobné, že v nativním komplexu oba konce B-řetězce insulinu vstupují do interakcí s IR, které jejich výslednou konformaci stabilizují. Zdá se rovněž jisté, že interakce insulinu s receptorem je velmi dynamická. Úspěšné použití našeho analogu pro určení struktury komplexu s IR potvrdily a posílily paralelní výsledky strukturních experimentů s lidským a hovězím insulinem, a výrazně tak přispěly k získání nových zásadních informací o interakci obou molekul.

5.2. Syntéza a charakterizace analogů selektivně *N*-methylovaných v pozicích B24, B25 a B26 se specifickým zaměřením na dimerizační vlastnosti připravených analogů.

V rámci této série insulinových analogů byly připraveny a charakterizovány analogy *N*-methylované v pozicích B24, B25 a B26.

Modifikace peptidových vazeb B23–B24 a B24–B25 (analogy *N*Me-PheB24-insulin a *N*Me-PheB25-insulin) má pro vazbu na receptor velmi nepříznivý vliv. Vazebné afinity klesly na 3 % a 0,17 % afinity insulinu, což zvýrazňuje význam amidů peptidových vazeb pro vazbu na receptor. Již dříve byly publikovány výsledky analogů, jejichž peptidové vazby B24–B25 a B25–B26 byly nahrazené za CH_2-NH skupiny. Ztráta karbonylových kyslíků těchto peptidových vazeb vede také k velmi nízké afinitě vůči IR (109). Podobný výsledek byl popsán Wollmerem u depsi(B24–B25)-insulinu, kde byla peptidová vazba B24–B25 nahrazena esterovou vazbou (107).

Naopak, *N*-methylací peptidové vazby B25–B26 nedochází k tak zřetelnému poklesu vazebné afinity analogu *N*Me-TyrB26-insulinu. K receptoru se tento analog váže s pětkrát nižší afinitou než lidský insulin (21% vazba). Nepřítomnost NH skupiny tedy nemá v tomto případě tak výrazný vliv na vazbu k receptoru. To indikuje, že tato peptidová vazba není pro vazbu k IR tak důležitá jako vazby B23–B24 a B24–B25, anebo má peptidová vazba B25–B26 jinou funkci. Na C-konci B-řetězce tohoto analogu byla identifikována struktura B26-ohybu tak, jak byla popsána v kapitole 4.1.5. Snížená aktivita může být také důsledkem nepříliš optimálního uspořádání koncových aminokyselin B27–B30. Určitý vliv na afinitu k receptoru může mít i absence potenciální vodíkové vazby k IR zprostředkované přes chybějící B26(NH) skupinu.

Analog obsahující kromě *N*-methylace peptidové vazby B25–B26 také záměnu v postranním řetězci, *N*Me-PheB26-insulin, se k receptoru váže s podobně nízkou afinitou jako výše zmíněné analogy *N*Me-PheB24-insulin a *N*Me-PheB25-insulin. Analog s třetí změnou řetězce, *N*Me-PheB25-*N*Me-PheB26-insulin, potvrzuje svou velmi nízkou afinitou kumulativní efekt několika nepříznivých záměn.

Kalorimetrické měření *N*-methylovaných analogů bylo provedeno jenom ve dvou paralelních měřeních, a to z důvodu vysoké koncentrace vzorků potřebné pro provedení

experimentu. To vyžaduje přibližně 8 mg analogů, což je vzhledem k nízkým výtěžkům některých semisyntetických reakcí těžce dosažitelné. Vzhledem k těmto podmínkám jsme přikročili k měření pouze v duplikátech. Navzdory tomuto jsou výsledky měření konzistentní (viz Tab. S1 v dodatku článku Přílohy 2).

Dřívější výsledky ukázaly, že na dimerizační výsledky insulinu má pH experimentu jenom velmi malý vliv (155,156). Proto byly ITC experimenty pro nízkou rozpustnost insulinu při pH 7,0 provedeny při pH 2,5 (128). Disociační konstanta lidského i vepřového insulinu je podle našich výsledků ~9 μM a změna volné Gibbsovy energie disociace je ~29 kJ/mol (viz Tab. 9 v kapitole 4.2.5). Tyto hodnoty se shodují s výsledky britské laboratoře měřenými za stejných podmínek, kdy K_{diss} = 12 μM a $\Delta G°_{diss}$ = 28 kJ/mol (128). Metodou diferenční spektroskopie byla hodnota K_d stanovena na 15 μM při pH 2,0 a 18 μM při pH 7,0 (156). Metodou sedimentační rovnováhy byla hodnota K_d hovězího insulinu stanovena na 4,5 μM (pH 8,0) a vepřového insulinu na 7 μM (pH 7,0) (155). Námi určené disociační konstanty dimerizace insulinu jsou tedy v souladu s hodnotami určenými jinými metodami v různých laboratořích. Výsledky těchto experimentů nám umožnily zhodnotit příspěvky jednotlivých vodíkových vazeb dimerního povrchu insulinu.

Malé rozdíly rovnovážných konstant a termodynamických parametrů dimerizačního procesu insulinu při různých hodnotách pH vedly k závěru, že asociace insulinu je řízená nepolárními interakcemi (155). Na druhou stranu, výsledky další laboratoře ukazují, že dimerizace insulinu je řízená entalpicky; tvorba čtyř vodíkových můstků je zde hlavní hnací silou v asociačním procesu insulinu (156). Výsledky molekulární dynamiky poukazují také na význam nepolárních interakcí pozic B24–B26, přičemž vzniklé vodíkové vazby zabezpečují správnou orientaci řetězců (157). Naše výsledky spíše naznačují entalpicky řízený proces dimerizace insulinu, a tím poukazují na význam příspěvků vodíkových vazeb B24–B26 na stabilitu dimeru.

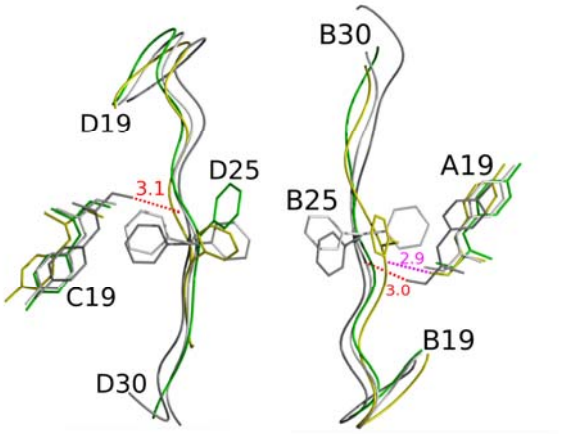
N-methylace amidové skupiny peptidových vazeb B23–B24 a B25–B26 analogů *N*MePheB24-insulinu a *N*MeTyrB26-insulinu zvýšila hodnotu K_{diss} analogů z 9 μM na 587 μM a 142 μM. Ztráta vodíkové vazby B24(NH)-D26(CO) tak naruší dimerní povrch přibližně čtyřikrát více než ztráta vodíkové vazby B26(NH)-D24(CO). Ta se nachází v blízkosti koncových flexibilních aminokyselin B27–B30. Když se poruší vazba B24(NH)-D26(CO), můžou molekuly rozpouštědla nacházející se v blízkosti konce B27–B30 lépe penetrovat také

do dimerního povrchu a narušit tak navíc i vodíkovou vazbu B26(NH)-D24(CO) (158). Větší dimerní stabilita *N*MeTyrB26-insulinu může být ovlivněna i přítomností stabilizující vodíkové vazby B25(NH)-A19(CO) netypické pro R-konformaci, ve které tento analog krystalizoval. Tvoří ji ovšem jenom jeden monomer, a to nemůže úplně kompenzovat ztrátu interakcí B26(NH)-D24(CO) či D26(NH)-B24(CO). Přesto je analog stabilnější a může tvořit monomerní i hexamerní krystalové struktury insulinu, kdežto *N*MePheB24-insulin nekrystalizoval vůbec. Navzdory tomu *N*MeTyrB26-insulin nekrystalizoval v žádných dimerních podmínkách, což koreluje s vyšší dimerizační disociační konstantou v porovnání s insulinem (viz výsledky kapitola 4.1.5).

Velmi zajímavým výsledkem bylo zjištění, že ztráta vodíkové vazby B25(NH)-A19(CO) způsobená *N*-methylací peptidové vazby B24–B25 má na dimerizaci analogu *N*MePheB25-insulinu zásadní vliv. I když jsou všechny vodíkové vazby dimerního povrchu zachované, ztráta intramolekulární vodíkové vazby dokáže posunout dimerizační schopnost tohoto analogu na úroveň des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI). Domníváme se, že změna ve struktuře analogu může způsobit větší flexibilitu C-konce B-řetězce, čímž může analog ztratit schopnost tvořit dimerní formu. Tuto hypotézu by potvrzovala zvýšená mobilita postranního řetězce PheB25, který nejde na elektronové mapě hustot lokalizovat.

Zachovaná schopnost tvorby hexamerních struktur byla pozorována i u monomerního LysB28-ProB29-insulinu. Ten má značně sníženou schopnost dimerizovat (~300krát), přitom však krystalizuje jako T3R3^{f} hexamer (159,160) podobně jako naše analogy.

Další analog *N*Me-PheB26-insulin ztrácí kromě amidového vodíku peptidové vazby B25–B26 také hydroxyl postranního řetězce TyrB26. I když je interakce B24(NH)-D26(CO) zachovaná, interakce B26(NH)-D24(CO) chybí. Disociační konstanta K_{diss} se však už pohybuje v mM rozsahu, konkrétně 1,24 mM. Z toho vyplývá, že vodíkové vazby přes hydroxyl postranního řetězce TyrB26 (např. k TyrD16) nebo různé van der Waalsovy interakce (např. k PheB24, ProB28, IleA2, ValA3, IleB11 či ValB12) jsou pro stabilitu dimerní molekuly rovněž důležité. Navíc nelze jejich příspěvek úplně oddělit od příspěvků vodíkových vazeb B24–B26.



Obr. 45: Dimerní povrch insulinu a analogů se zvýrazněnou pozicí PheB25. Vpravo je zobrazen AB monomer, vlevo CD monomer. V T6 konformaci insulinu (šedá barva, PDB kód 1MSO) je vodíková vazba B25(NH)-A19(CO) pozorována u obou monomerů (vazba znázorněna červeně, délka vazeb v Å), avšak u R6 konformace insulinu (bílá barva, PDB kód 1ZNJ) se tato interakce nevyskytuje. Podobně se tato interakce neobjevuje u analogu *N*Me-PheB25-insulinu (zeleně, PDB kód 3ZQR). V případě analogu *N*Me-TyrB26-insulinu (žlutě, PDB kód 2WS6) existuje jenom v AB monomeru (znázorněno růžovou barvou, délka vazeb v Å).

Je nutno zdůraznit, že charakterizace všech struktur byla provedena z R6 hexamerního uspořádání (dva Zn^{2+} ionty a šest molekul fenolu). ITC experimenty však probíhaly v roztoku v nepřítomnosti zinečnatých iontů i molekul fenolu, kde je pravděpodobnější výskyt T-konformace. Narušení dimerního povrchu však vedlo u všech studovaných a krystalizovaných analogů k nejstabilnějšímu uspořádání hexamerů, a to k R6 konformaci (161,162). Tato konformace s prodlouženou šroubovicí B1–B8 posiluje stabilitu dimeru. Vzniká nová vodíková vazba TyrB16(NH)-HisD5(CO), která vyvažuje ztrátu vodíkové vazby B25(NH)-A19(CO) vyskytující se jenom v T-konformaci. Stejné hexamerní uspořádání *N*-methylovaných analogů je tak v protikladu s odchylkami dimerních povrchů. Dokonce ani úplný odklon C-konce B-řetězce u monomeru TyrB25-*N*MePheB26-LysB28-ProB29-insulinu není pro R6 uspořádání limitující. Podobně jiný analog, ProB26-DTI s úplně narušeným dimerním povrchem (117), je schopen tvořit R6 hexamery. Potvrzuje to také struktura des(B23–B30)oktapeptid-insulinu (DOI), kde byly rovněž pozorovány R6 hexamery (v přítomnosti Zn^{2+} a cyklohexanolu) (29,163). I když byla dynamika přechodu T6→T3R3→R6 již několikrát popsána, konformační změny přechodu monomer→dimer→hexamer jsou méně objasněné. Naše výsledky ukazují, že změny dimerního povrchu jsou asymetrické (viz

Obr. 25 B–D). To podporuje teorii existence strukturních asymetrií předpovězených SMB modelováním (*structural model for negative and positive cooperativity*); tato strukturní asymetrie má svůj význam při alosterickém chování insulinu (164).

Jiná je situace v případě zkráceného a dlouhého analogu s Ala v pozici B26 a *N*-methylací peptidové vazby B25–B26. Ztráta vodíku peptidové vazby spolu se ztrátou postranního řetězce vede u *N*Me-AlaB26-DTIA analogu k vysoké vazebné afinitě k IR (465 %). Vazebná afinita *N*Me-AlaB26-insulinu (21 %) se ovšem shoduje s afinitou *N*Me-TyrB26-insulinu (21 %) (viz Tab. 3). Analogy *N*Me-AlaB26-DTIA a *N*Me-AlaB26-insulin krystalizovaly pouze v monomerních podmínkách, proto nelze určit rozsah zachování či narušení jejich dimerního povrchu. Vysoká disociační konstanta dimerizace, ~90krát vyšší než u insulinu, vypovídá o slabé disociační schopnosti těchto analogů. Dá se důvodně předpokládat, že u těchto analogů dochází β-ohybem k výraznému narušení dimerního povrchu, podobně jako v případě *N*Me-PheB26-insulinu.

Tvorba a disociace multimerů insulinu je pro účinek hormonů velmi důležitá. Vyplavením hexamerů ze sekrečních granulí o pH 5,5 do krve o pH 7,4 dochází ke ztrátě zinku a následně k rozpadu na dimery. Disociace dimeru je závislá na koncentraci (K_{diss} dimerizace insulinu je 9 μM), tudíž rozpad dimerů na monomery je děj, který je v krvi řízen ředěním. Analogy s rychlým nástupem účinku (humalog, LysB28-ProB29-insulin nebo novolog, AspB28-insulin) netvoří dimery, ale také asociují do hexamerů (159). Narušení dimerního povrchu tak může výrazně ovlivnit účinek insulinu v organismu.

5.3. Studium příspěvku TyrB26 v aktivní formě insulinu. Syntéza a charakterizace nezkrácených analogů insulinu se záměnou v poloze B26, kde byl původní tyrosin nahrazen za kódované aminokyseliny.

Tato kapitola disertační práce se zabývá příspěvkem pozice B26 při interakci insulinu s insulinovým receptorem, kdy insulin přechází do aktivní konformace.

S mutací v této pozici bylo připraveno celkem deset analogů (Tab. 10). Převážná většina z nich nese záměnu přirozenou (kódovanou) aminokyselinou. K této sérii byly přidány ještě analogy se Sar a D-Pro v pozici B26, neboť logicky doplňují informace z kapitoly 4.1 zabývající se zkrácenými a nezkrácenými analogy modifikovanými *N*-methylovanými

aminokyselinami a D-aminokyselinami. Inspirací pro přípravu AspB26-insulinu, AsnB26-insulinu a GlnB26-insulinu nám byl dříve publikovaný aktivní analog GluB26-insulin se 125% *in vitro* biologickou aktivitou (sledování inkorporace ^{3}H-glukosy do lipidů) (146). Jeho autoři ovšem neměřili vazebnou afinitu, a proto jsme připravili GluB26-LysB28-ProB29-insulin. Abychom snížili dimerizační schopnost analogu, zaměnili jsme pořadí aminokyselin pozic B28 a B29 (159). Touto záměnou (LysB28-ProB29) se dosáhlo monomerního charakteru analogu, což umožňuje případnou strukturní analýzu pomocí NMR spektrometrie v roztoku. Záměna LysB28-ProB29 by rovněž neměla mít vliv na vazebnou afinitu (159).

Analogy s Asp, Asn a Gln v pozici B26 vykazují vysokou vazebnou afinitu k receptoru (76–89%). Dokonce i vedlejší reakcí vzniklý analog AsnB26-(B26-B27-ester)-insulin si vysokou afinitu k IR zachovává (91%). Ještě vyšší afinitu vykazuje GluB26-LysB28-ProB29-insulin (194%), čímž se potvrdil výsledek Brangeho a kol. o vyšší aktivitě záměny TyrB26 za GluB26 (146). Tento analog a od něj odvozené analogy se záměnou navíc ještě v pozici B24 jsou diskutovány v následující kapitole.

Ze série analogů AspB26-insulin, AsnB26-insulin a GlnB26-insulin byla krystalová struktura určena jenom u AsnB26-insulinu, proto budou získané výsledky diskutovány jenom v případě tohoto analogu. Zde je změna konformace na C-konci B-řetězce dosti výrazná. Dochází ke vzniku nové β-otáčky odlišující se od B26-ohybu popsaného v kapitole 4.1. Odklopení C-konce B-řetězce je u tohoto analogu velmi výrazné a je s velkou pravděpodobností zapříčiněno repulzí postranního řetězce asparaginu z hydrofobního jádra molekuly, což podporují výsledky molekulové dynamiky v kapitole 4.3.7. Vypočtená interakční energie ukazuje, že zatímco Tyr v pozici B26 je pevně vázán ke zbytku molekuly, tak Asn tuto interakci značně oslabuje. Většina interakcí původního tyrosinu je tak repulzí přerušena, dochází k odklonu C-konce B-řetězce a nová konformace je stabilizována interakcemi s AsnA21. Výsledky molekulárního modelování (nízká interakční energie Asn, kapitola 4.3.4) tak jasně korelují s experimentálními výsledky, kdy u AsnB26-insulinu pozorujeme jasný odklon C-konce B-řetězce. Do těchto výsledků velmi dobře zapadají také výsledky z dimerizačních experimentů (ITC), při kterých AsnB26-insulin vykazuje téměř 90násobné snížení dimerizační schopnosti oproti přirozenému insulinu. Přítomný ohyb C-konce B-řetězce tedy výrazně narušuje dimerní povrch insulinu, čímž rapidně omezuje tvorbu dimeru. Můžeme předpokládat, že analogy s Asp a Glu v B26 mohou mít podobnou

3D strukturu (díky vypočtené nízké interakční energii Asp), jejich struktury ovšem v této práci vyřešeny nebyly. Hodnota teoretické interakční energie GlnB26 (za přítomnosti Wat1) je podobná hodnotě v případě PheB26, protože zde však chybí experimentální výsledek případných konformačních změn řetězce, můžeme jenom předpokládat, že vzhledem k hydrofilnímu charakteru postranního řetězce glutaminu může také docházet k určité repulzi z hydrofobního jádra molekuly.

Přítomnost Asn, a pravděpodobně i Asp, Glu a Gln v poloze B26, tedy způsobuje repulzi postranního řetězce v poloze B26 z původní vazebné kapsy a má za následek ohyb C-konce B-řetězce. Tento ohyb má v případě Asn, Asp a Gln jen mírně negativní vliv na afinitu, ale v případě Glu výrazně afinitu posiluje. Můžeme se tedy domnívat, že příčinou rozdílných afinit zde není ohyb řetězce, ale právě přítomnost specifické skupiny postranního řetězce, která je v případě Glu pro interakci s IR výhodnější než původní Tyr. Otázkou je příčina ekvipotentní afinity AsnB26-(B26–B27-ester)-insulinu. Můžeme jenom spekulovat, zda i zde bude struktura analogu podobná. Zajímavé je, že formace esterové vazby B26–B27 má za následek přítomnost volné aminoskupiny v poloze B27 (dříve α-aminoskupina, viz Obr. 26 B), což evidentně nemá na interakci s IR negativní vliv.

Dále byl tyrosin v poloze B26 nahrazen Phe. Ztráta hydroxylové skupiny postranního řetězce v případě PheB26-insulinu způsobí pokles vazebné afinity na polovinu (46%). Lenz a kol. (165) publikovali vazebnou afinitu PheB26-insulinu asi 33 % a biopotenci asi 31 %. Jiná studie dochází také k podobné hodnotě, a to 48% afinitě ve srovnání s insulinem (145), což je v souladu s našimi výsledky. Z krystalové dimerní struktury analogu (Obr. 35) vyplývá, že hydrofobní fenylalanin interaguje velmi dobře s hydrofobním jádrem molekuly, a jak je dále z krystalové struktury patrné, C-konec B-řetězce nabývá konformaci velmi podobnou „neaktivní“ konformaci lidského insulinu, kdy je tato část řetězce přikloněna k jádru molekuly a k N-konci A-řetězce. Podobnost struktur lidského insulinu a PheB26-insulinu napovídá, že příčinou poloviční afinity analogu může být právě jen ztráta OH skupiny postranního řetězce. Tato OH skupina po odklopení C-konce B-řetězce při vazbě na IR může mít přímou úlohu v interakci insulin-receptor.

Podle výsledků molekulární dynamiky (kapitola 4.3.7) provedené za přítomnosti molekuly Wat1 (zprostředkovává vodíkovou vazbu mezi OH tyrosinu a CO či NH GlyB8) způsobí záměna Tyr za Phe v pozici B26 pokles interakční energie, avšak výsledky

strukturní analýzy ukazují, že tato energie stále postačuje k tomu, aby se C-konec B-řetězce relativně pevně interagoval se zbytkem molekuly. Molekulární dynamika provedená za nepřítomnosti molekuly vody Wat1 poskytuje logicky stejnou interakční energii fenylu jako za přítomnosti Wat1, přičemž interakční energie pro tyrosin je v tomto případě nižší. Nicméně insulin se pohybuje vždy ve vodním prostředí, a proto je zřejmé, že navázání fenylalaninu do vazebné kapsy je slabší než u tyrosinu. Kalorimetrické studie (ITC) insulinu a PheB26-insulinu ukázaly, že dimerizační schopnost tohoto analogu je v důsledku mutace v pozici B26 pozměněna a schopnost tvořit dimery je snížena přibližně třikrát (K_d = 27 μM v porovnání s 9 μM přirozeného insulinu). Důležité interakce dimerního povrchu insulinu jsou tvořeny vodíkovými můstky mezi B24(NH) a B26(CO) hlavního řetězce (viz kapitola 5.2), tudíž ztráta hydroxylové skupiny postranního řetězce zde nemá až tak zásadní vliv na dimerizační schopnost analogu PheB26-insulinu. Podobný výsledek publikoval již v roce 1983 Glatter ve své disertační práci, ve které uvádí snížení dimerizační konstanty PheB26-insulinu na 17 % ve srovnání s insulinem (165). Příčinou nižší dimerizační schopnosti PheB26-insulinu tak může být právě ztráta OH skupiny postranního řetězce, což zeslabuje interakci C-konce B-řetězce s centrální částí insulinu, a tím snižuje uspořádanost C-terminální části B-řetězce. To následně znesnadňuje kontakt se stejnou částí druhé molekuly analogu při dimerizaci.

Dále byl tyrosin v poloze B26 nahrazen Gly, Sar (*N*Me-Gly), Pro a D-Pro. Zatímco GlyB26-insulin a SarB26-insulin si uchovávají relativně vysokou vazebnou afinitu (69 a 92 %), záměny Tyr za Pro a D-Pro v této pozici mají již velmi negativní důsledky (8,6% a 1% vazebná afinita). Příčina těchto rozdílných afinit může být ve strukturách analogů.

Avšak krystalové struktury ProB26-insulinu a D-ProB26-insulinu se připravit nepodařilo. Krystalová struktura GlyB26-insulinu (kapitola 4.3.6) ovšem ukázala, že analog tvoří téměř identický typ β-otáčky na C-konci B-řetězce s β-otáčkou pozorovanou u AsnB26-insulinu (Obr 37). I zde je tato nová otáčka stabilizovaná interakcemi s AsnA21. Krystalová struktura SarB26-insulinu je na C-konci B-řetězce zcela neuspořádaná, lze však předpokládat, že i zde dochází k odklonu C-konce B-řetězce od centrální části molekuly. Glycin, prolin i sarkosin jsou aminokyseliny, které mohou indukovat v peptidovém řetězci otáčku (*turn-inducing amino acids*) (150). Kruh prolinu je však v porovnání s glycinem a *N*-methylovaným glycinem rigidnější. Molekulová dynamika analogů s Gly a Sar v poloze B26 nebyla provedena, avšak

výrazně vyšší volnost torzních úhlů těchto aminokyselin oproti prolinům dává B-řetězci celkově větší konformační flexibilitu, což může při ztrátě postranního řetězce v poloze B26 vést k ohybu hlavního řetězce. Naproti tomu jsou torzní úhly u prolinů mnohem více omezeny, což po inkorporaci těchto aminokyselin pravděpodobně vede k větší rigiditě ohybu C-konce B-řetězce. Je možné, že tvar ohybu indukovaný prolinem směřuje aminokyseliny B27–B30 do orientace nevýhodné pro interakci s IR, což je navíc umocněno vyšší rigiditou těchto struktur (a neschopností se přizpůsobit receptoru) ve srovnání se strukturami indukovanými Gly a Sar v B26. Jistá flexibilita C-konce B-řetězce tudíž může být výhodná, ne-li nutná pro potentní interakci s receptorem. Na flexibilitu C-konce B-řetězce poukázala již studie Mirmiry a kol., kde sledovali iodaci (^{125}I) tyrosinových zbytků v molekule insulinu (166). Autoři zjistili, že TyrB26 je v monomeru pro iodaci stejně přístupný jako jiné tyrosiny v molekule, čímž poukázali na rozdíl iodace TyrB26 v dimeru, kde právě převažovala iodace tyrosinů vyskytujících se v A-řetězci (167,168).

Charakterizací insulinových analogů s mutací v poloze B26 se naše laboratoř zabývá již několik let. Z výsledků jak zde charakterizovaných analogů insulinů s mutací v pozici B26, tak i analogů již dříve publikovaných, vyplývá, že pozice B26 není s ohledem na vazebnou afinitu k IR tak citlivá k záměnám tyrosinu za jinou aminokyselinu, přičemž akceptovány jsou L-, D- i *N*-methylované aminokyseliny. Avšak zkrácené des(B27-30)tetrapeptid-B26-amid analogy vykazují v mnoha případech výrazně vyšší afinitu k receptoru v porovnání se stejnými záměnami u analogů plné délky. Tak je to v případě *N*-methylovaných analogů: *N*Me-HisB26-DTIA (214%) vs. *N*Me-HisB26-insulin (10%) anebo *N*Me-AlaB26-DTIA (465%) vs. *N*Me-AlaB26-insulin (21%) (142), podobně i v případě analogů s prolinem v pozici B26. ProB26-DTIA a D-ProB26-DTIA popsané v kapitole 4.3.1 dosahují více než 300% afinitu k IR oproti ProB26-insulinu s 8,6% afinitou a D-ProB26-insulinu s 1% afinitou k receptoru (kapitola 4.3.4). K podobnému závěru dochází také Mayer v review věnovaném dlouholetému výzkumu insulinových analogů (153).

Jak již bylo zmíněno výše, je možné, že prolinem indukovaný ohyb v pozici B26 směřuje aminokyseliny B27–B30 do pozice nevýhodné pro interakci s IR, což umocňuje vyšší rigidita těchto struktur a neschopnost přizpůsobit se receptoru. Odlišná je situace v případě struktur GlyB26-insulinu a SarB26-insulinu, kde postranní řetězec pozice B26 zcela chybí, přesto však tyto analogy vykazují podobné vazebné afinity jako analogy AsnB26-insulin, AspB26-insulin

a GlnB26-insulin. Jak jsme již zmínili, ohyb indukovaný Gly je velmi podobný, ne-li identický s ohybem indukovaným Asn v B26. Je tedy možné, že vazebné místo v IR pro postranní řetězec insulinu v poloze B26 není podstatné pro sílu celkové interakce insulinu (tzn. chybějící postranní řetězec vazbě nevadí). Naproti tomu optimalizace interakce je evidentně možná, viz pozitivní vliv GluB26. Zde popsané analogy AsnB26-insulin, AspB26-insulin a GlnB26-insulin patří k několika málo připraveným analogům plné délky s mutací v pozici B26 s vazebnou afinitou bezmála rovnou vazebné afinitě insulinu.

Dalším aspektem, který bychom v této kapitole chtěli diskutovat, je pozorovaná tendence analogů modifikovaných v poloze B26 vytvářet ohyb v C-koncové části B-řetězce. Podle našeho názoru není tvorba tohoto ohybu samozřejmostí. Modifikace v poloze B26 by mohla vést pouze k lokálním perturbacím ve struktuře vlákna B23–B30 (jako u PheB26). Naproti tomu repulze postranního řetězce z vazebné kapsy pro B26 (Asn) či chybějící postranní řetězec (Gly a Sar) vedou k výraznému odklonu B-řetězce od centrální α-šroubovice a zároveň k jeho ohybu. V případě Gly a Sar by tento ohyb mohl být vysvětlen tendencí těchto aminokyselin vytvářet v peptidových strukturách ohyb (díky jejich specifickým torzním úhlům). Asn je ovšem standardní aminokyselina se standardními torzními úhly charakteristickými pro L-aminokyseliny. I když je Asn evidentně vytlačen z vazebné kapsy, tato repulze by podle našeho názoru nemusela nutně vést k pozorovanému ohybu řetězce. Pozorovaný ohyb může být zapříčiněn „přirozenou“ tendencí C-terminálního oktapeptidu vytvářet ohyb v pozicích B25–B27, avšak záměny aminokyselin této části můžou tento ohyb usnadnit. Je možné, že při prvním kontaktu této části insulinu s IR (možná prostřednictvím postranního řetězce PheB25) dochází k oslabení interakce postranního řetězce TyrB26 se svým vazebným okolím a k jeho vytržení z vazebného místa, což má za následek ohyb řetězce, tzn. formaci hypotetické aktivní konformace insulinu a efektivní vazbu na IR.

Za povšimnutí stojí také pozorovaná změna konformace na N-konci B-řetězce analogů PheB26-insulinu, AsnB26-insulinu i GlyB26-insulinu, která je totožná s konformací *N*-methylovaných analogů charakterizovaných v kapitole 4.1. Význam této části molekuly insulinu na jeho působení je nadále předmětem studia.

Schopnost dimerizace komerčních analogů LysB3-GluB29-insulinu (glulisin) a AspB28-insulinu (aspart) určena metodou isothermální mikrokalorimetrie (ITC) potvrzuje publikované vlastnosti těchto analogů, a tím následně potvrzuje správnost použité metody.

Prolin se v pozici B28 molekuly insulinu účastní intramolekulárních interakcí a stabilizuje dimerní strukturu hormonu (24). Jeho substituce za Asp vede u aspart-insulinu k oslabení dimerizační schopnosti, jak to potvrzuje hodnota disociační konstanty našich kalorimetrických měření; K_d = 307 μM v porovnání s K_d = 9 μM lidského insulinu. Zatímco ProB28 je součástí dimerního povrchu molekuly insulinu, LysB29 je součástí hexamerního povrchu molekuly (24). Nicméně vzhledem k fyzikálně-chemické stabilitě analogu glulisinu se do farmakologických přípravků nepřidávají zinečnaté ionty, což vede k omezení tvorby hexamerů. Dimerní povrch však narušen není, tudíž analog nadále zachovává vysokou schopnost dimerizace (K_d hodnota pětkrát vyšší než u insulinu). Odstranění fáze uvolňování dimerů z hexamerů v krevním řečišti je i přes vyšší stabilitu dimerů příčinou rychlého nástupu účinku tohoto analogu, čímž se řadí mezi rychle působící analogy. Naše výsledky o dimerizaci analogu tak potvrzují poznatky z literatury (169,170).

5.4. Syntéza a charakterizace nových analogů insulinu modifikovaných v poloze B24 za účelem studia role PheB24 při tvorbě aktivní formy insulinu.

Tato studie se zabývá úlohou PheB24 v působení insulinu, zejména v procesu tzv. aktivace insulinu, kdy s největší pravděpodobností dochází k určitým strukturním změnám potřebným pro správné navázání insulinu na insulinový receptor. Obzvláště zajímavým úkolem je rozřešení paradoxu, kdy analogy s D-aminokyselinou v poloze B24 vykazují zvýšenou vazebnou afinitu k IR oproti L-aminokyselině (jiné než Phe) v této pozici. Připraveny a studovány tak byly analogy s různou modifikací v poloze B24. Rozdílný efekt L- a D-aminokyselin na strukturu insulinu či jeho vazbu k receptoru je zde vysvětlen na strukturních rozdílech L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu. Dále byl v této pozici sledován vliv prolinu a sarkosinu na strukturu hormonu a jeho interakci s receptorem, a to vzhledem k schopnosti těchto aminokyselin výrazně ovlivnit strukturu hlavního řetězce peptidu.

Fenylalanin B24 je v molekule insulinu obratlovců konzervovanou aminokyselinou. Postranní řetězec Phe je orientován dovnitř molekuly, do jejího hydrofobního jádra. Tam, podle 2Zn struktury insulinu (T6 hexamer, PDB kód 4INS), interaguje s postranním řetězcem

ValB12, LeuB15, TyrB16 a CysB19 (24). Výzkum analogů s foto-aktivovatelnými skupinami v pozici B24 potvrdil také přímou účast této pozice ve vazbě k insulinovému receptoru, konkrétně k L1 doméně (66,113).

L-HisB24-insulin se s vazebnou afinitou nepřesahující 2% afinity insulinu řadí mezi neaktivní analogy. Krystalizován byl jako monomer (pH 3,0), avšak C-konec B-řetězce je zcela neuspořádaný. Přesto je pozorovatelné, že TyrB16 a ValB12 směřují k vazebnému místu pro postranní řetězec B24, v němž ovšem L-His není vidět. To by potvrzovalo hypotézu o potřebě neustále obsazeného vazebného místa pro postranní řetězec B24 molekuly insulinu (66,117). Velká neuspořádanost L-HisB24-insulinu byla pozorována i u NMR struktury při pH 1,9 (Obr. 41). Proč tomu tak je, ale neumíme plně odpovědět; je pravděpodobné, že protonace obou dusíků histidinu (N^{δ} i N^{ε}) v nízkém pH může vést k repulzi imidazolu z vazebného místa Phe.

NMR struktura L-HisB24-insulinu je naproti tomu při pH 8,0 vysoce uspořádaná a paradoxně se jeví více rigidní než struktura lidského insulinu. K celkové rigidní struktuře tohoto analogu v zásaditém pH přispívá několik intramolekulárních interakcí. Hydrofobní B24 kapsa je u tohoto analogu vyplněná histidinem, podobně jak to pozorujeme u přirozeného insulinu, kde tuto úlohu zastává PheB24. Pozorována je zde ovšem přímá a silná interakce TyrB26 s GlyB8, tedy již ne přes molekulu vody (Wat1) jako v přirozeném insulinu. Navíc postranní řetězec ProB28 tvoří nekovalentní interakce (tzv. π-π stacking) s postranním řetězcem TyrB26. Důsledkem pak je zřejmě znesnadněné odklápění C-konce B-řetězce, což může korelovat s velmi nízkou vazebnou afinitou tohoto analogu a také s jeho monomerním charakterem.

Na negativní důsledky příliš rigidní struktury insulinu na vazebnou afinitu k receptoru poukazuje již Pittman a kol., a to při charakterizaci analogů TrpB25-insulinu a GlyB24-TrpB25-insulinu (29). Fluorescenční studie obou analogů potvrzují uspořádanost struktury podobně jako u přirozeného insulinu, nicméně C-konec B-řetězce je pevně vázán k jádru molekuly. Vzhledem k nízké vazebné afinitě těchto analogů vyjadřuje Pittman závěr, že určitá volnost C-konce B-řetězce (nazývá ji rozhodující vzdáleností C-konce B-řetězce od centrální α-šroubovice B-řetězce) je pro aktivní konformaci insulinu důležitá.

Změna chirality aminokyseliny v poloze B24 výrazně ovlivňuje afinitu analogu k insulinovému receptoru. Analog D-HisB24-insulin se na receptor váže s dvojnásobnou

afinitou v porovnání s insulinem (217%). Strukturní NMR analýzy byly opět provedeny při pH 1,9 i při pH 8,0. Podobně jako v případě L-HisB24-insulinu je struktura v kyselém pH neuspořádaná, především u C-konce B-řetězce. Svůj podíl na tom má ztráta NOE kontaktů aromatických aminokyselin B24, B25 a B26 se zbytkem molekuly v kyselém pH, jež se však v pH 8,0 znova obnovují, a tím strukturu stabilizují. Oproti struktuře L-HisB24-insulinu je však D-His orientován ven od zbytku molekuly, což je dáno změnou chirality na Cα atomu pozice B24. Volné místo v B24 kapse následně přebírá PheB25 (Obr. 42), čímž je zachovaná pozice Cα atomu původního PheB24. Zachování pozice Cα atomu je základní strukturní rys B26-ohybu charakterizovaného u analogů popsaných v kapitole 4.1.5. Také se potvrzuje teorie o nutnosti obsazenosti vazebného místa postranního řetězce pozice B24 molekuly insulinu (66,117). Toto uspořádání je navíc provázeno konformačními změnami, kdy je otáčka B21–B23 otevřenější a postranní řetězec TyrB26 směřuje ven od zbytku molekuly. Celkově je struktura D-HisB24-insulinu flexibilnější oproti struktuře L-HisB24-insulinu i oproti struktuře lidského insulinu. Právě zvýšená flexibilita molekuly D-HisB24-insulinu může vést ke zvýšené afinitě k receptoru.

Porovnáním konformace C-konce B-řetězce L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu se ukazuje, že určitá flexibilita této části molekuly je výhodnější. To, že D-aminokyseliny v pozici B24 podporují vznik aktivní konformace insulinu, pozoroval již Mirmira a kol. v roce 1989 (108). Určitý stupeň flexibility se zdá být pro insulinovou aktivitu nezbytný. Také se tím potvrzuje hypotéza o potřebném odklonění C-konce B-řetězce při vazbě insulinu na receptor. Není však zcela jasné, jestli se řetězec odklápí od pozic B22–B30, jak to představuje Xu (118), anebo jenom od pozic B25–B30, jak to ukazují výsledky našich analogů popsaných v kapitole 4.1, které obsahují B26-ohyb. Nicméně konformace postranního řetězce pozice B24 zůstává v případě D-HisB24-insulinu zachovaná, podobně jak je zachovaná u zmíněných analogů obsahujících B26-ohyb.

Nižší afinita k IR již zmíněného GlyB24-insulinu (kapitola 1.6.1.1) s výrazně rozvolněným C-koncem B-řetězce může být důsledkem až přílišné flexibility molekuly či nepříliš výhodného uspořádání dihedrálních úhlů GlyB24. Je však nutno dodat, že autoři strukturní charakterizace tohoto analogu prováděli NMR měření v kyselém pH, ve kterém i naše struktury vykazují vysokou neuspořádanost (99). Také je tedy pravděpodobné, že při pH 8,0 je molekula uspořádanější, jak to ukazuje Ludvigsen a kol. na struktuře GluB16-GlyB24-

desB30-insulinu (171). Zároveň však autoři v případě tohoto analogu pozorovali obsazení volného vazebného místa v pozici B24 postranním řetězcem PheB25. Ve světle těchto pozorování se tedy zdá podmínka obsazenosti vazebného místa B24 logickou. Interakce však nesmí být příliš silná, neboť znesnadňuje aktivaci molekuly. Přílišná rozvolněnost struktury ale rovněž vede ke slabé afinitě. Pravděpodobná může být i hypotéza vyvolaného uspořádání molekul (*induced fit*), kdy se konformace molekuly insulinu přizpůsobuje konformaci IR při samotné vazbě ligandu na receptor (20).

Pro přímou vazbu na receptor však pravděpodobně sehrává svou roli i postranní řetězec pozice B24. Potvrzuje to nízká afinita mutantních insulinů jako LeuB24-insulin (106), SerB24-insulin (101) či AlaB24-insulin (108). Významné jsou i příspěvky CO a NH skupiny peptidového řetězce (109), které mají také svou důležitou roli při dimerizaci insulinu (172).

Další připravené analogy této série vykazovaly sníženou afinitu k receptoru. Patří sem SarB24-insulin, ProB24-insulin, D-HisB24-GluB26-insulin a D-HisB24-GluB26-LysB28-ProB29-insulin, všechny s vazebnou afinitou nepřesahující 7 % afinity insulinu. Protože krystalové struktury nebyly určeny, nemůžeme určit, jaké strukturní změny vedly k tak výraznému poklesu vazebné afinity. Sarkosin (*N*Me-Gly), podobně jako prolin, budou spíše indukovat ohyb peptidového řetězce, v případě sarkosinu i větší flexibilitu řetězce. Výrazné změny dihedrálních úhlů těchto aminokyselin (spolu s výraznou záměnou postranního řetězce) však nejsou v pozici B24 přijímány a vedou k nízké afinitě analogů k receptoru.

Analogy s vícenásobnou záměnou, D-HisB24-GluB26-insulin a D-HisB24-GluB26-LysB28-ProB29-insulin, byly připraveny zkombinováním několika mutací zvyšujících afinitu k insulinu. GluB26-insulin je jediný analog se záměnou v pozici B26 vykazující vyšší biologickou účinnost (určenou inkorporací ^{3}H-glukosy do lipidů) než insulin, a to 125 % (146). Náš analog GluB26-LysB28-ProB29-insulin podporuje výsledky Brangeho a kol. a vykazuje téměř 200% vazebnou afinitu k IR. Avšak vložení další pozitivní záměny (D-HisB24) jak do GluB26-insulinu, tak i do GluB26-LysB28-ProB29-insulinu, vede k dramatickému poklesu afinity (2–3 %). Z důvodu absence znalosti struktur těchto analogů nemůžeme s jistotou vysvětlit negativní účinek dvou zmíněných mutací, které samotné zvyšují afinitu k IR. Ze struktury D-HisB24-insulinu však víme, že D-HisB24 i TyrB26 směřují ven od zbytku molekuly. Proto není vyloučeno, že tato konformace dává možnost vzniku

interakce postranních řetězců D-HisB24 a GluB26, která následně výrazně ovlivňuje vazebnou afinitu analogu, v tomto případě negativně.

Z dosud publikovaných studií tak vyplývá, že fenylalanin v poloze B24 přirozeného insulinu je pravděpodobně pro správnou funkci insulinu optimální aminokyselinou. Pravděpodobné je také tvrzení, které nastoluje ve své publikaci Xu a kol. (66), a to že úlohy PheB24 a PheB25 se při vazbě na receptor doplňují, resp. že pro tvorbu aktivní konformace jsou potřebné obě tyto pozice. Podle těchto autorů může být důležitým strukturním rysem aktivace insulinu navázání kontaktu s receptorem prostřednictvím pozice B25 a následné odklopení zbytku C-konce B-řetězce a taktéž uvolnění pozice B24 pro vazbu na receptor.

5.5. Určení vazebných afinit insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu vůči isoformě A insulinového receptoru v rámci studie rozdílů v signalizaci této isoformy (IR-A) po stimulaci insulinem, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinem.

Tato studie se zabývala biologickou odpovědí vyvolanou navázáním insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu na IR-A isoformu insulinového receptoru. Pro tento účel byla použita buněčná linie IM-9 obsahující jenom lidské IR-A bez přítomnosti IGF-1R receptorů. Je to vůbec první studie, která se zabývá internalizací a signální kaskádou výhradně isoformy IR-A.

Zatímco stimulace insulinem vyvolává internalizaci IR-A, stimulace IGF-2 ji vyvolává jen velmi málo. Dřívější studie ukázaly, že ubikvitinace je důležitým regulačním krokem v procesu internalizace a degradace RTK receptorů, jak to bylo popsáno v případě IGF-1R receptoru (173,174). To však neplatí v případě IR-A, kdy je úroveň ubikvitinace receptoru porovnatelná po stimulaci insulinem i IGF-2. Nejnovější biochemické výzkumy ukazují, že RTK receptory můžou být nejen polyubikvitinované (jedním polyubikvitinovaným řetězcem), ale i monoubikvitinované na více místech (tzv. multiubikvitinace). Ubikvitinace tak může různě ovlivňovat internalizaci receptoru i následnou signalizaci (174-176). V případě této studie byla sledována pouze celková ubikvitinace receptoru, proto můžeme jenom spekulovat, jestli insulin a IGF-2 vedou k odlišným formám ubikvitinace, která může poté různě ovlivňovat internalizaci IR-A i signalizační cesty.

Výsledky této studie ukazují také na různou úroveň fosforylace IR-A receptorů působením insulinu, IGF-2 či *N*Me-TyrB26-insulinu, kdy IGF-2 ani *N*Me-TyrB26-insulin nedosahují úrovně insulinu. Podobně byl pozorován rozdíl u fosforylací Akt substrátu, přičemž IGF-2 i *N*Me-TyrB26-insulin vyvolávají opět sníženou úroveň fosforylace. Opačné působení těchto ligandů bylo pozorováno v případě ERK1/2 fosforylace, kdy se časná fosforylace vyrovná úrovni vyvolané insulinem. Navíc fosforylační studie ukazují, že insulin i IGF-2 jsou schopny vyvolat tyrosinovou fosforylaci IRS-1 substrátu, ale liší se v její serinové fosforylaci, kdy IGF-2 oproti insulinu zaostává. Pozorována byla také nižší degradace IRS-1 substrátu po stimulaci IGF-2, což může souviset právě s nedostatečnou serinovou fosforylací.

Tyto výsledky vedou k hypotéze, že internalizace IR-A může být více ovlivněna fosforylací než ubikvitinací receptoru. Tento předpoklad potvrzují i výsledky poukazující na zvýšenou fosfororylaci a internalizaci vyvolanou insulinem u IR-A isoformy v porovnání s IR-B isoformou (177). Stupeň fosforylace, internalizace a signalizace koreluje také s vazebnou afinitou insulinu, IGF-2 a *N*Me-TyrB26-insulinu vůči IR-A. Pravděpodobně však existují i jiné mechanismy ovlivňující biologický účinek ligandu, jako jsou asociační a disociační rychlostní konstanty komplexu ligand-receptor či jeho stabilita v kyselém prostředí endosomů (což může ovlivnit recyklaci receptoru). Dřívější studie poukázala na zvýšenou mitogenicitu analogů s pomalou rychlostí disociace komplexu ligand-receptor (178). Testy mitogenicity však probíhaly na buněčné linii CHO-K1, která obsahuje vyšší počet IGF-1R receptorů, a tudíž může výrazně ovlivnit biologický účinek testovaných insulinových analogů. Pro lepší objasnění biologického působení různých ligandů (resp. vlivu jejich vazebných afinit) na IR-A isoformy probíhají v současné době experimenty s dalšími analogy insulinu.

Závěrem lze říci, že snížená vazebná afinita IGF-2 i *N*Me-TyrB26-insulinu nevyvolává dostatečnou fosforylaci IR-A či signálních molekul (jako je IRS-1). Rovněž také negativně ovlivní regulační mechanismy zpětné vazby, čímž stimuluje mitogenní účinky působení.

6. Shrnutí

V této studii bylo připraveno několik zkrácených i nezkrácených analogů insulinu. Výrazné zvýšení afinity bylo docíleno u zkrácených analogů, a to vložením *N*-methylované aminokyseliny či D-aminokyseliny do pozice B26. Naopak v případě analogů plné délky způsobily tyto modifikace pokles ve vazebné afinitě k receptoru. V obou případech však vedly tyto změny ke specifickému ohybu C-konce B-řetězce, který byl pozorován v krystalových strukturách připravených analogů. Konfrontace krystalových struktur s vazebnými afinitami těchto analogů nás vedla k postulování hypotézy, že námi pozorovaný B26-ohyb či jemu velmi podobná struktura jsou strukturními znaky aktivní konformace insulinu. Dochází zde k odklonu aminokyselin B26–B30 od centrální části molekuly, čímž je následně umožněna interakce s receptorem, zejména interakce dříve ukrytých aminokyselin N-konce A-řetězce a centrální α-šroubovice B-řetězce. Pozorovaná nižší afinita analogů plné délky tvořících stejný typ ohybu byla vysvětlena ne zcela optimální orientací aminokyselin B27–B30 pro interakci s IR.

Výsledky biochemické a strukturní analýzy série analogů modifikovaných kódovanými aminokyselinami v pozici B26 ukázaly, že zde také dochází k ohybu C-konce B-řetězce. Pozorováno to bylo v případě analogu se substitucí TyrB26 za AsnB26. Korelace příslušných krystalových struktur s vazebnými afinitami vedla k závěru, že C-konec B-řetězce má přirozenou schopnost vytvářet v pozici B26 ohyb, přičemž na afinitu k receptoru má vliv nejen tvar ohybu, ale i charakter postranního řetězce pozice B26.

V další části práce jsme se zabývali úlohou fenylalaninu v poloze B24 v interakci insulinu s receptorem. NMR analýzou analogů L-HisB24-insulinu a D-HisB24-insulinu se nám podařilo objasnit paradox nízkých afinit analogů s L-aminokyselinou v pozici B24 a naopak zvýšených afinit analogů s D-aminokyselinou v této pozici. Zdá se, že pokud je postranní řetězec aminokyseliny ve vazebném místě původního fenylalaninu v pozici B24 vázán velmi silně, je molekula insulinu příliš rigidní a neschopná odklonu C-koncové části B-řetězce, a tudíž je neschopná tvořit aktivní konformaci. Rovněž se zdá, že postranní řetězec PheB24 se během vazby na receptor po prvotním uvolnění buď vrací do původního místa, nebo se hýbe jen velmi mírně. Závěrem lze říci, že pro vysokou afinitu insulinu k IR je nezbytná přiměřená ale nepříliš vysoká flexibilita C-konce B-řetězce, která umožní ohyb aminokyselin B26–B30 a vazbu na receptor. Pokud jsou ale interakce C-konce B-řetězce se zbytkem molekuly příliš

silné, nemůže k ohybu dojít a analog je neaktivní. Projevuje se zde tedy i příspěvek postranního řetězce pozice B24.

Dále jsme studovali vliv amidických vodíků peptidových vazeb B24, B25 a B26 na vazebnou aktivitu a dimerizační schopnost insulinu. Zjistili jsme, že amidy v polohách B24 a B25 mají v těchto procesech zásadní význam. *N*-methylace každého z těchto amidů negativně ovlivňuje nejen vazebnou afinitu insulinu, ale i jeho dimerizační vlastnosti. Největší dopad vykazuje methylová skupina vložená do peptidové vazby B24–B25. V dimeru se amid této peptidové vazby neúčastní vodíkových vazeb s druhou molekulou insulinu, zato vytváří intramolekulární vodíkovou vazbu s CO tyrosinu pozice A19. Zdá se, že ztráta právě této vazby vede k oslabení interakce C-konce B-řetězce se zbytkem molekuly, a tím deformuje dimerní povrch insulinu.

V rámci spolupráce s italským a americkým pracovištěm jsme přispěli ke studiu vyšších mitogenních účinků růstového faktoru IGF-2 zprostředkované isoformou A insulinového receptoru v porovnání s přirozeným insulinem.

Jsme velmi potěšeni, že naše analogy byly užitečné při krystalografické studii komplexu insulinu s receptorem realizované na partnerském pracovišti v Austrálii ve spolupráci se špičkovými laboratořemi z Velké Británie a USA. Výsledkem je první krystalová struktura insulinu v komplexu s receptorem. Struktura sice nepodává kompletní informace o konformacích C- a N-konce insulinu při vazbě na receptor, nicméně poskytuje nesmírně cenné informace o kontaktních místech insulinu a jeho receptoru a potvrzuje správnost teorie nutného odklonu C-konce B-řetězce molekuly insulinu při vazbě na receptor.

Domníváme se, že tato práce významnou měrou přispěla k objasnění interakce insulinu s receptorem.

7. Seznam použité literatury

1. (2009) The Challenge of Diabetes by 2030 http://www.who.int/.
2. Skyler, J. S. (2004) Diabetes mellitus: pathogenesis and treatment strategies. *J.Med.Chem.* **47**, 4113-4117
3. Richard I.G. Holt, C. C., Allan Flyvbjerg, and Barry J. Goldstein. (2010) *Textbook of diabetes, 4th edition*, 4th edition ed., Wiley & Blackwell, UK
4. Bliss, M. (1993) The History of Insulin. *Diabetes Care* **16**, 4-7
5. Rosenfeld, L. (2002) Insulin: discovery and controversy. *Clin.Chem.* **48**, 2270-2288
6. Hagedorn, H. C., Jensen, B. N., Krarup, N. B., and Wodstrup, I. (1936) Protamine insulinate. *Acta Medica Scandinavica*, 678-684
7. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., and Kitai, R. (1955) Disulphide Bonds of Insulin. *Biochemical Journal* **60**, 541-556
8. Katsoyannis, P. G., Trakatel, A. C., Zalut, C., Johnson, S., Tometsko, A., Schwartz, G., and Ginos, J. (1967) Studies on Synthesis of Insulin from Natural and Synthetic A and B Chains .3. Synthetic Insulins. *Biochemistry* **6**, 2656-&
9. Du, Y. C., Zhang, Y. S., Lu, Z. X., and Tsou, C. L. (1961) Resynthesis of Insulin from Its Glycyl and Phenylalanyl Chains. *Scientia Sinica* **10**, 84-&
10. Marglin, A., and Merrifie.Rb. (1966) Synthesis of Bovine Insulin by Solid Phase Method. *Journal of the American Chemical Society* **88**, 5051-&
11. Meienhofer, J., Zahn, H., Schnabel, E., Bremer, H., Zabel, R., Sroka, W., Okuda, T., Brinkhof.O, Brandenb.D, and Klosterm.H. (1963) Synthese der Insulinketten und Ihre Kombination zu Insulinaktiven Praparaten. *Zeitschrift fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie und Verwandten Gebiete* **B 18**, 1120-&
12. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B., and Sheat, S. (1969) Structure of Rhombohedral 2 Zinc Insulin Crystals. *Nature* **224**, 491-&
13. Blundell, T. L., Hodgkin, D. C., Mercola, D. A., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., and Dodson, G. G. (1972) 3-Dimensional Atomic Structure of Insulin and Its Relationship to Activity. *Diabetes* **21**, 492-&
14. Steiner, D. F., Cunningh.D, Spigelma.L, and Aten, B. (1967) Insulin Biosynthesis - Evidence for A Precursor. *Science* **157**, 697-&
15. Steiner, D. F. (2011) Adventures with Insulin in the Islets of Langerhans. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 17399-17421
16. Yalow, R. S., and Berson, S. A. (1960) Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *Journal of Clinical Investigation* **39**, 1157-1175
17. De Meyts, P. (1976) Insulin and growth hormone receptors in human cultured lymphocytes and peripheral blood monocytes. in *Methods in Receptor Research* (Melvin, B. ed.), Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. pp
18. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W. J., and Goodman, H. M. (1977) Rat Insulin Genes - Construction of Plasmids Containing Coding Sequences. *Science* **196**, 1313-1319
19. Johnson, I. S. (1983) Human Insulin from Recombinant Dna Technology. *Science* **219**, 632-637

20. Ward, C. W., and Lawrence, M. C. (2009) Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays* **31**, 422-434
21. Shabanpoor, F., Separovic, F., and Wade, J. D. (2009) The Human Insulin Superfamily of Polypeptide Hormones. *Vitamins and Hormones Insulin and Igfs* **80**, 1-31
22. Smith, G. D., Pangborn, W. A., and Blessing, R. H. (2005) The structure of T-6 bovine insulin. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **61**, 1476-1482
23. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Hubbard, R. E., and Korber, F. (1989) Molecular-Structure of Insulin - the Insulin Monomer and Its Assembly. *British Medical Bulletin* **45**, 4-18
24. Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M. C., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., Reynolds, C. D., Sakabe, K., Sakabe, N., and Vijayan, N. M. (1988) The Structure of 2Zn Pig Insulin Crystals at 1.5-A Resolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **319**, 369-&
25. Smith, G. D., Pangborn, W. A., and Blessing, R. H. (2003) The structure of T6 human insulin at 1.0 A resolution. *Acta Crystallographica* **57**, 474-482
26. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Reynolds, C. D., Smith, G. D., Sparks, C., and Swenson, D. (1989) Phenol Stabilizes More Helix in A New Symmetrical Zinc Insulin Hexamer. *Nature* **338**, 594-596
27. Fischer, W. H., Saunders, D., Brandenburg, D., Wollmer, A., and Zahn, H. (1985) A Shortened Insulin with Full Invitro Potency. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **366**, 521-525
28. Kaarsholm, N. C., Norris, K., Jorgensen, R. J., Mikkelsen, J., Ludvigsen, S., Olsen, O. H., Sorensen, A. R., and Havelund, S. (1993) Engineering Stability of the Insulin Monomer Fold with Application to Structure-Activity-Relationships. *Biochemistry* **32**, 10773-10778
29. Pittman, I., Nakagawa, S. H., Tager, H. S., and Steiner, D. F. (1997) Maintenance of the B-Chain beta-turn in [Gly(B24)]insulin mutants: A steady-state fluorescence anisotropy study. *Biochemistry* **36**, 3430-3437
30. Badger, J., Harris, M. R., Reynolds, C. D., Evans, A. C., Dodson, E. J., Dodson, G. G., and North, A. C. T. (1991) Structure of the Pig Insulin Dimer in the Cubic-Crystal. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* **47**, 127-136
31. Yao, Z. P., Zeng, Z. H., Li, H. M., Zhang, Y., Feng, Y. M., and Wang, D. C. (1999) Structure of an insulin dimer in an orthorhombic crystal: the structure analysis of a human insulin mutant (B9 Ser -> Glu). *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **55**, 1524-1532
32. Whittingham, J. L., Youshang, Z., L., Ž., Dodson, E. J., Turkenburg, J. P., Brange, J., and Dodson, G. G. (2006) I222 crystal form of despentapeptide (B26-B30) insulin provides new insights into the properties of monomeric insulin. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **62**, 505-511
33. Bao, S. J., Xie, D. L., Zhang, J. P., Chang, W. R., and Liang, D. C. (1997) Crystal structure of desheptapeptide(B24-B30)insulin at 1.6 angstrom resolution: Implications for receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2975-2980
34. Olsen, H. B., Ludvigsen, S., and Kaarsholm, N. C. (1996) Solution structure of an engineered insulin monomer at neutral pH. *Biochemistry* **35**, 8836-8845

35. Weiss, M. A., Hua, Q. X., Lynch, C. S., Frank, B. H., and Shoelson, S. E. (1991) Heteronuclear 2D Nmr-Studies of An Engineered Insulin Monomer - Assignment and Characterization of the Receptor-Binding Surface by Selective H-2 and C-13 Labeling with Application to Protein Design. *Biochemistry* **30**, 7373-7389
36. Weiss, M. A. (2009) The Structure and Function of Insulin: Decoding the Tr Transition. *Vitamins and Hormones Insulin and Igfs* **80**, 33-+
37. Kung, Y. T., Du, Y. C., Huang, W. T., Chen, C. C., Ke, L. T., Hu, S. C., Jiang, R. Q., Chu, S. Q., Niu, C. I., Hsu, J. Z., Chang, W. C., Cheng, L. L., Li, H. S., Wang, Y., Loh, T. P., Chi, A. H., Li, C. H., Shi, P. T., Yieh, Y. H., Tang, K. L., and Hsing, C. Y. (1965) Total Synthesis of Crystalline Bovine Insulin. *Scientia Sinica* **14**, 1710-&
38. Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kobayashi, M., and Shigeta, Y. (1981) Semisynthesis and properties of some insulin analogs. *Biopolymers* **20**, 1845-1858
39. Riemen, M. W., Pon, L. A., and Carpenter, F. H. (1983) Preparation of Semisynthetic Insulin Analogs from Bis(Tert-Butyloxycarbonyl)-Desoctapeptide-Insulin Phenylhydrazide - Importance of the Aromatic Region B24-B26. *Biochemistry* **22**, 1507-1515
40. Kubiak, T., and Cowburn, D. (1986) Enzymatic semisynthesis of porcine despentapeptide (B26-30) insulin using unprotected desoctapeptide (B23-30) insulin as a substrate. Model studies. *Int.J.Pept.Protein Res.* **27**, 514-521
41. Stoy, J., Steiner, D. F., Park, S. Y., Ye, H. G., Philipson, L. H., and Bell, G. I. (2010) Clinical and molecular genetics of neonatal diabetes due to mutations in the insulin gene. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **11**, 205-215
42. De Meyts, P. (1994) The Structural Basis of Insulin and Insulin-Like Growth-Factor-I Receptor-Binding and Negative Cooperativity, and Its Relevance to Mitogenic Versus Metabolic Signaling. *Diabetologia* **37**, S135-S148
43. Schaffer, L. (1994) A Model for Insulin Binding to the Insulin-Receptor. *European Journal of Biochemistry* **221**, 1127-1132
44. De Meyts, P. (2004) Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* **26**, 1351-1362
45. Chervitz, S. A., Aravind, L., Sherlock, G., Ball, C. A., Koonin, E. V., Dwight, S. S., Harris, M. A., Dolinski, K., Mohr, S., Smith, T., Weng, S., Cherry, J. M., and Botstein, D. (1998) Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: Orthology and divergence. *Science* **282**, 2022-2028
46. Chan, S. J., and Steiner, D. F. (2000) Insulin through the ages: Phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *American Zoologist* **40**, 213-222
47. Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Emdin, S. F., and Reynolds, C. D. (1979) Structure and Biological-Activity of Hagfish Insulin. *Journal of Molecular Biology* **132**, 85-100
48. Conlon, J. M. (2001) Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides* **22**, 1183-1193
49. Kristensen, C., Kjeldsen, T., Wiberg, F. C., Schaffer, L., Hach, M., Havelund, S., Bass, J., Steiner, D. F., and Andersen, A. S. (1997) Alanine scanning mutagenesis of insulin. *J.Biol.Chem.* **272**, 12978-12983
50. De Meyts, P., and Whittaker, J. (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat.Rev.Drug Discov.* **1**, 769-783

51. Steiner, D. F., Docherty, K., and Carroll, R. (1984) Golgi Granule Processing of Peptide-Hormone and Neuropeptide Precursors - A Minireview. *Journal of Cellular Biochemistry* **24**, 121-130
52. Weiss, M. A. (2009) Proinsulin and the Genetics of Diabetes Mellitus. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 19159-19163
53. Žáková, L., and Jiráček, J. (2005) Biosynthesis, secretion and degradation of insulin. *Chemické Listy* **99**, 772-781
54. Torres, N., Noriega, L., and Tovar, A. R. (2009) Nutrient Modulation of Insulin Secretion. *Vitamins and Hormones Insulin and Igfs* **80**, 217-244
55. Duckworth, W. C., Bennett, R. G., and Hamel, F. G. (1998) Insulin degradation: Progress and potential. *Endocrine Reviews* **19**, 608-624
56. Hulse, R. E., Ralat, L. A., and Tang, W. J. (2009) Structure, Function, and Regulation of Insulin-Degrading Enzyme. *Vitamins and Hormones Insulin and Igfs* **80**, 635-648
57. Denley, A., Cosgrove, L. J., Booker, G. W., Wallace, J. C., and Forbes, B. E. (2005) Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **16**, 421-439
58. Frasca, F., Pandini, C., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999) Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 3278-3288
59. Belfiore, A., and Malaguarnera, R. (2011) Insulin receptor and cancer. *Endocrine-Related Cancer* **18**, R125-R147
60. McKern, N. M., Lawrence, M. C., Streltsov, V. A., Lou, M. Z., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Richards, K. M., Bentley, J. D., Pilling, P. A., Hoyne, P. A., Cartledge, K. A., Pham, T. M., Lewis, J. L., Sankovich, S. E., Stoichevska, V., Da, S. E., Robinson, C. P., Frenkel, M. J., Sparrow, L. G., Fernley, R. T., Epa, V. C., and Ward, C. W. (2006) Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* **443**, 218-221
61. Lou, M., Garrett, T. P., McKern, N. M., Hoyne, P. A., Epa, V. C., Bentley, J. D., Lovrecz, G. O., Cosgrove, L. J., Frenkel, M. J., and Ward, C. W. (2006) The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor 1 receptor in the regions governing ligand specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **103**, 12429-12434
62. Whittaker, L., Hao, C. L., Fu, W., and Whittaker, J. (2008) High-Affinity Insulin Binding: Insulin Interacts with Two Receptor Ligand Binding Sites. *Biochemistry* **47**, 12900-12909
63. Kiselyov, V. V., Versteyhe, S., Gauguin, L., and De, M. P. (2009) Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol.Syst.Biol.* **5**, 243
64. Rouard, M., Bass, J., Grigorescu, F., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., Lipkind, G., Jaffiole, C., Steiner, D. F., and Bell, G. I. (1999) Congenital insulin resistance associated with a conformational alteration in a conserved beta-sheet in the insulin receptor L1 domain. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 18487-18491
65. Huang, K., Xu, B., Hu, S. Q., Chu, Y. C., Hua, Q. X., Qu, Y., Li, B., Wang, S., Wang, R. Y., Nakagawa, S. H., Theede, A. M., Whittaker, J., De, M. P., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2004) How insulin binds: the B-chain alpha-helix contacts the L1 beta-helix of the insulin receptor. *J.Mol.Biol.* **341**, 529-550
66. Xu, B., Hu, S. Q., Chu, Y. C., Huang, K., Nakagawa, S. H., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2004) Diabetes-associated mutations in insulin: Consecutive

residues in the B chain contact distinct domains of the insulin receptor. *Biochemistry* **43**, 8356-8372

67. Kurose, T., Pashmforoush, M., Yoshimasa, Y., Carroll, R., Schwartz, G. P., Burke, G. T., Katsoyannis, P. G., and Steiner, D. F. (1994) Cross-Linking of A B25 Azidophenylalanine Insulin Derivative to the Carboxyl-Terminal Region of the Alpha-Subunit of the Insulin-Receptor - Identification of A New Insulin-Binding Domain in the Insulin-Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 29190-29197
68. Wan, Z., Xu, B., Huang, K., Chu, Y. C., Li, B., Nakagawa, S. H., Qu, Y., Hu, S. Q., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2004) Enhancing the activity of insulin at the receptor interface: crystal structure and photo-cross-linking of A8 analogues. *Biochemistry* **43**, 16119-16133
69. Wan, Z. L., Huang, K., Xu, B., Hu, S. Q., Wang, S. H., Chu, Y. C., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2005) Diabetes-associated mutations in human insulin: Crystal structure and photo-cross-linking studies of A-chain variant insulin Wakayama. *Biochemistry* **44**, 5000-5016
70. Huang, K., Chan, S. J., Hua, Q. X., Chu, Y. C., Wang, R. Y., Klaproth, B., Jia, W., Whittaker, J., De, M. P., Nakagawa, S. H., Steiner, D. F., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2007) The A-chain of insulin contacts the insert domain of the insulin receptor. Photo-cross-linking and mutagenesis of a diabetes-related crevice. *J.Biol.Chem.* **282**, 35337-35349
71. Mynarcik, D. C., Yu, G. Q., and Whittaker, J. (1996) Alanine-scanning mutagenesis of a C-terminal ligand binding domain of the insulin receptor alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 2439-2442
72. Menting, J. G., Ward, C. W., Margetts, M. B., and Lawrence, M. C. (2009) A Thermodynamic Study of Ligand Binding to the First Three Domains of the Human Insulin Receptor: Relationship between the Receptor alpha-Chain C-Terminal Peptide and the Site 1 Insulin Mimetic Peptides. *Biochemistry* **48**, 5492-5500
73. Kristensen, C., Wiberg, F. C., Schaffer, L., and Andersen, A. S. (1998) Expression and characterization of a 70-kDa fragment of the insulin receptor that binds insulin - Minimizing ligand binding domain of the insulin receptor. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17780-17786
74. Kristensen, C., Wiberg, F. C., and Andersen, A. S. (1999) Specificity of insulin and insulin-like growth factor I receptors investigated using chimeric mini-receptors - Role of C-teriminal of receptor alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37351-37356
75. Brandt, J., Andersen, A. S., and Kristensen, C. (2001) Dimeric fragment of the insulin receptor alpha-subunit finds insulin with full holoreceptor affinity. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12378-12384
76. De Meyts, P., Roth, J., Neville, D. M., Gavin, J. R., and Lesniak, M. A. (1973) Insulin Interactions with Its Receptors - Experimental Evidence for Negative Cooperativity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **55**, 154-161
77. Jensen, M., and De, M. P. (2009) Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam.Horm.* **80**, 51-75
78. Youngren, J. F. (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 873-891
79. Kido, Y., Nakae, J., and Accili, D. (2001) Clinical review 125 - The insulin receptor and its cellular targets. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 972-979

80. Myers, M. G., and White, M. F. (2002) The Molecular Basis of Insulin Action. in *Insulin Signaling from cultured cells to animal models* (Grunberger, G., and Zick, Y. eds.), Taylor and Francis. pp 55-87
81. Howey, D. C., Bowsher, R. R., Brunelle, R. L., and Woodworth, J. R. (1994) [Lys(B28), Pro(B29)]-Human Insulin - A Rapidly Absorbed Analog of Human Insulin. *Diabetes* **43**, 396-402
82. Mudaliar, S. R., Lindberg, F. A., Joyce, M., Beerdsen, P., Strange, P., Lin, A., and Henry, R. R. (1999) Insulin aspart (B28 asp-insulin): a fast-acting analog of human insulin - absorption kinetics and action profile compared with regular human insulin in healthy nondiabetic subjects. *Diabetes Care* **22**, 1501-1506
83. Garg, S. K., Ellis, S. L., and Ulrich, H. (2005) Insulin glulisine: a new rapid-acting insulin analogue for the treatment of diabetes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **6**, 643-651
84. Ciaraldi, T. P., Phillips, S. A., Carter, L., Aroda, V., Mudaliar, S., and Henry, R. R. (2005) Effects of the rapid-acting insulin analog glulisine on cultured human skeletal muscle cells: Comparisons with insulin and insulin-like growth factor I. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **90**, 5551-5558
85. Sheldon, B., Russell-Jones, D., and Wright, J. (2009) Insulin analogues: an example of applied medical science. *Diabetes Obesity & Metabolism* **11**, 5-19
86. Jonassen, I., Hoeg-Jensen, T., Havelund, S., and Ribel, U. (2010) Ultra-long acting insulin degludec can be combined with rapid-acting insulin aspart in a soluble co-formulation. *Journal of Peptide Science* **16**, 32-32
87. Birkeland, K. I., Home, P. D., Wendisch, U., Ratner, R. E., Johansen, T., Endahl, L. A., Lyby, K., Jendle, J. H., Roberts, A. P., DeVries, J. H., and Meneghini, L. F. (2011) Insulin Degludec in Type 1 Diabetes A randomized controlled trial of a new-generation ultra-long-acting insulin compared with insulin glargine. *Diabetes Care* **34**, 661-665
88. Jorgensen, L. N., Dideriksen, L. H., and Drejer, K. (1992) Carcinogenic Effect of the Human Insulin Analog B10 Asp in Female Rats. *Diabetologia* **35**, A3-A3
89. Milazzo, G., Sciacca, L., Papa, V., Goldfine, I. D., and Vigneri, R. (1997) ASPB(10) insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells: Evidence for enhanced interactions with the insulin-like growth factor-I receptor. *Molecular Carcinogenesis* **18**, 19-25
90. Zib, I., and Raskin, P. (2006) Novel insulin analogues and its mitogenic potential. *Diabetes Obes.Metab* **8**, 611-620
91. Currie, C. J., Poole, C. D., and Gale, E. A. M. (2009) The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia* **52**, 1766-1777
92. Smith, U., and Gale, E. A. M. (2009) Does diabetes therapy influence the risk of cancer? *Diabetologia* **52**, 1699-1708
93. Ruiter, R., Visser, L. E., van Herk-Sukel, M. P. P., Coebergh, J. W. W., Haak, H. R., Geelhoed-Duijvestijn, P. H., Straus, S. M. J. M., Herings, R. M. C., and Stricker, B. H. C. (2012) Risk of cancer in patients on insulin glargine and other insulin analogues in comparison with those on human insulin: results from a large population-based follow-up study. *Diabetologia* **55**, 51-62
94. Young, J. D., and Carpenter, F. H. (1961) Isolation and Characterization of Products Formed by Action of Trypsin on Insulin. *Journal of Biological Chemistry* **236**, 743-&
95. Nakagawa, S. H., and Tager, H. S. (1986) Role of the Phenylalanine-B25 Side-Chain in Directing Insulin Interaction with Its Receptor - Steric and Conformational Effects. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 7332-7341

96. Markussen, J., Jorgensen, K. H., Sorensen, A. R., and Thim, L. (1985) Single Chain Des-(B30) Insulin - Intramolecular Crosslinking of Insulin by Trypsin Catalyzed Transpeptidation. *International Journal of Peptide and Protein Research* **26**, 70-77
97. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Bing, X., and Markussen, J. (1991) X-Ray-Analysis of the Single Chain-B29-A1 Peptide-Linked Insulin Molecule - A Completely Inactive Analog. *Journal of Molecular Biology* **220**, 425-433
98. Kruger, P., Hahnen, J., and Wollmer, A. (1994) Comparative-Studies on the Dynamics of Cross-Linked Insulin. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **23**, 177-187
99. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M., and Weiss, M. A. (1991) Receptor-Binding Redefined by A Structural Switch in A Mutant Human Insulin. *Nature* **354**, 238-241
100. Nakagawa, S. H., and Tager, H. S. (1992) Importance of Aliphatic Side-Chain Structure at Position-2 and Position-3 of the Insulin-A Chain in Insulin-Receptor Interactions. *Biochemistry* **31**, 3204-3214
101. Shoelson, S. E., Lu, Z. X., Parlautan, L., Lynch, C. S., and Weiss, M. A. (1992) Mutations at the Dimer, Hexamer, and Receptor-Binding Surfaces of Insulin Independently Affect Insulin Insulin and Insulin-Receptor Interactions. *Biochemistry* **31**, 1757-1767
102. Shoelson, S., Fickova, M., Haneda, M., Nahum, A., Musso, G., Kaiser, E. T., Rubenstein, A. H., and Tager, H. (1983) Identification of A Mutant Human Insulin Predicted to Contain A Serine-For-Phenylalanine Substitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**, 7390-7394
103. Tager, H., Given, B., Baldwin, D., Mako, M., Markese, J., Rubenstein, A., Olefsky, J., Kobayashi, M., Kolterman, O., and Poucher, R. (1979) Structurally Abnormal Insulin Causing Human Diabetes. *Nature* **281**, 122-125
104. Shoelson, S., Haneda, M., Blix, P., Nanjo, A., Sanke, T., Inouye, K., Steiner, D., Rubenstein, A., and Tager, H. (1983) 3 Mutant Insulins in Man. *Nature* **302**, 540-543
105. Nanjo, K., Sanke, T., Miyano, M., Okai, K., Sowa, R., Kondo, M., Nishimura, S., Iwo, K., Miyamura, K., Given, B. D., Chan, S. J., Tager, H. S., Steiner, D. F., and Rubenstein, A. H. (1986) Diabetes Due to Secretion of A Structurally Abnormal Insulin (Insulin Wakayama) - Clinical and Functional-Characteristics of [Leua3] Insulin. *Journal of Clinical Investigation* **77**, 514-519
106. Keefer, L. M., Piron, M. A., De, M. P., Gattner, H. G., Diaconescu, C., Saunders, D., and Brandenburg, D. (1981) Impaired negative cooperativity of the semisynthetic analogues human [LeuB24]- and [LeuB25]-insulins. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **100**, 1229-1236
107. Wollmer, A., Gilge, G., Brandenburg, D., and Gattner, H. G. (1994) An Insulin with the Native Sequence But Virtually No Activity. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **375**, 219-222
108. Mirmira, R. G., and Tager, H. S. (1989) Role of the Phenylalanine-B24 Side-Chain in Directing Insulin Interaction with Its Receptor - Importance of Main Chain Conformation. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 6349-6354
109. Nakagawa, S. H., and Tager, H. S. (1993) Importance of Main-Chain Flexibility and the Insulin Fold in Insulin-Receptor Interactions. *Biochemistry* **32**, 7237-7243
110. Mirmira, R. G., and Tager, H. S. (1991) Disposition of the Phenylalanine-B25 Side-Chain During Insulin-Receptor and Insulin Insulin Interactions. *Biochemistry* **30**, 8222-8229
111. Casaretto, M., Spoden, M., Diaconescu, C., Gattner, H. G., Zahn, H., Brandenburg, D., and Wollmer, A. (1987) Shortened Insulin with Enhanced Invitro Potency. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **368**, 709-716
112. Nakagawa, S. H., Johansen, N. L., Madsen, K., Schwartz, T. W., and Tager, H. S. (1993) Implications of Replacing Peptide-Bonds in the Cooh-Terminal-B Chain Domain of

Insulin by the Psi(Ch2-Nh) Linker. *International Journal of Peptide and Protein Research* **42**, 578-584

113. Hua, Q. X., Xu, B., Huang, K., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Jia, W. H., Wang, S., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) Enhancing the Activity of a Protein by Stereospecific Unfolding Conformational Life Cycle of Insulin and its Evolutionary Origins. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 14586-14596
114. Kobayashi, M., Ohgaku, S., Iwasaki, M., Maegawa, H., Shigeta, Y., and Inouye, K. (1982) Supernormal Insulin - [D-Pheb24]-Insulin with Increased Affinity for Insulin-Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **107**, 329-336
115. Leyer, S., Gattner, H. G., Leithauser, M., Brandenburg, D., Wollmer, A., and Hocker, H. (1995) The role of the C-terminus of the insulin B-chain in modulating structural and functional properties of the hormone. *Int.J.Pept.Protein Res.* **46**, 397-407
116. Kurapkat, G., Siedentop, M., Gattner, H. G., Hagelstein, M., Brandenburg, D., Grotzinger, J., and Wollmer, A. (1999) The solution structure of a superpotent B-chain-shortened single-replacement insulin analogue. *Protein Sci.* **8**, 499-508
117. Jiráček, J., Žáková, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., and Brzozowski, A. M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 1966-1970
118. Xu, B., Huang, K., Chu, Y. C., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Wang, S. H., Wang, R. Y., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) Decoding the Cryptic Active Conformation of a Protein by Synthetic Photoscanning Insulin Inserts a detachable arm between receptor domains. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 14597-14608
119. Kurapkat, G., DeWolf, E., Grotzinger, J., and Wollmer, A. (1997) Inactive conformation of an insulin despite its wild-type sequence. *Protein Science* **6**, 580-587
120. Žáková, L., Zyka, D., Ježek, J., Hančlová, I., Šanda, M., Brzozowski, A. M., and Jiráček, J. (2007) The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs. *J.Pept.Sci.* **13**, 334-341
121. Kaiser, E., Colescot.Rl, Bossinge.Cd, and Cook, P. I. (1970) Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Analytical Biochemistry* **34**, 595-&
122. Bromer, W. W., and Chance, R. E. (1967) Preparation and characterization of desoctapeptide-insulin. *Biochim.Biophys.Acta* **133**, 219-223
123. Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H. G., Jiráček, J., Velek, J., Bláha, I., Ubik, K., Kašička, V., and Pospíšek, J. (1994) Semisynthetic insulin analogues modified in positions B24, B25 and B29. *Biol.Chem.Hoppe Seyler* **375**, 373-378
124. Zorad, S., Golda, V., Fickova, M., Macho, L., Pinterova, L., and Jurcovicova, J. (2002) Terguride treatment attenuated prolactin release and enhanced insulin receptor affinity and GLUT 4 content in obese spontaneously hypertensive female, but not male rats. *Lipids and Insulin Resistance: the Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning* **967**, 490-499
125. Bradford, M. M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254
126. Seino, S., and Bell, G. I. (1989) Alternative splicing of human insulin-receptor messenger-RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **159**, 312-316

127. Benecke, H., Flier, J. S., and Moller, D. E. (1992) Alternatively spliced variants of the insulin-receptor protein - expression in normal and diabetic human tissues. *Journal of Clinical Investigation* **89**, 2066-2070
128. Lovatt, A., Cooper, A., and Camilleri, P. (1996) Energetics of cyclodextrin-induced dissociation of insulin. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **24**, 354-357
129. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A* **276**, 307-326
130. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **53**, 240-255
131. Guntert, P., and Wuthrich, K. (1991) Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *J.Biomol.NMR* **1**, 447-456
132. Herrmann, T., Guntert, P., and Wuthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *Journal of Molecular Biology* **319**, 209-227
133. Tsui, V., and Case, D. A. (2000) Molecular dynamics simulations of nucleic acids with a generalized born solvation model. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 2489-2498
134. Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R. J. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **26**, 1668-1688
135. Koradi, R., Billeter, M., and Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* **14**, 51-&
136. Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **35**, W375-W383
137. Word, J. M., Lovell, S. C., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1999) Asparagine and glutamine: Using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *Journal of Molecular Biology* **285**, 1735-1747
138. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006) Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **65**, 712-725
139. Rezac, J., Fanfrlik, J., Salahub, D., and Hobza, P. (2009) Semiempirical Quantum Chemical PM6 Method Augmented by Dispersion and H-Bonding Correction Terms Reliably Describes Various Types of Noncovalent Complexes. *Journal of Chemical Theory and Computation* **5**, 1749-1760
140. Korth, M., Pitonak, M., Rezac, J., and Hobza, P. (2010) A Transferable H-Bonding Correction for Semiempirical Quantum-Chemical Methods. *Journal of Chemical Theory and Computation* **6**, 344-352
141. Klamt, A. (2011) The COSMO and COSMO-RS solvation models. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science* **1**, 699-709
142. Žáková, L., Kazdová, L., Hančlová, I., Protivinská, E., Šanda, M., Buděšinský, M., and Jiráček, J. (2008) Insulin analogues with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry* **47**, 5858-5868
143. Žáková, L. (2004) Nové insulinové analogy modifikované v C-koncové části B-řetězce., Přírodovědecká fakulta UK, Ústav organické chemie a biochemie.

144. Žáková, L., Brynda, J., Au-Alvarez, O., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Whittingham, J. L., and Brzozowski, A. M. (2004) Toward the insulin-IGF-I intermediate structures: functional and structural properties of the [TyrB25NMePheB26] insulin mutant. *Biochemistry* **43**, 16293-16300
145. Gauguin, L., Klaproth, B., Sajid, W., Andersen, A. S., McNeil, K. A., Forbes, B. E., and De, M. P. (2008) Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J.Biol.Chem.* **283**, 2604-2613
146. Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., and Snel, L. (1988) Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature* **333**, 679-682
147. Slieker, L. J., Brooke, G. S., Dimarchi, R. D., Flora, D. B., Green, L. K., Hoffmann, J. A., Long, H. B., Fan, L., Shields, J. E., Sundell, K. L., Surface, P. L., and Chance, R. E. (1997) Modifications in the B10 and B26-30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. *Diabetologia* **40**, S54-S61
148. Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (2001) Endocytosis and signaling: An inseparable partnership. *Cell* **106**, 1-4
149. Seto, E. S., Bellen, H. J., and Lloyd, T. E. (2002) When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes & Development* **16**, 1314-1336
150. Pal, D., and Chakrabarti, P. (1999) Cis peptide bonds in proteins: Residues involved, their conformations, interactions and locations. *Journal of Molecular Biology* **294**, 271-288
151. Sýkora, D., Žáková, L., and Buděšinský, M. (2007) High-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance study of linear tetrapeptides and octapeptides containing N-methylated amino acid residues. *J.Chromatogr.A* **1160**, 128-136
152. Fischer, G. (2000) Chemical aspects of peptide bond isomerisation. *Chemical Society Reviews* **29**, 119-127
153. Mayer, J. P., Zhang, F., and Dimarchi, R. D. (2007) Insulin structure and function. *Biopolymers* **88**, 687-713
154. Hua, Q. X., Ladbury, J. E., and Weiss, M. A. (1993) Dynamics of A Monomeric Insulin Analog - Testing the Molten-Globule Hypothesis. *Biochemistry* **32**, 1433-1442
155. Pekar, A. H., and Frank, B. H. (1972) Conformation of Proinsulin - Comparison of Insulin and Proinsulin Self-Association at Neutral Ph. *Biochemistry* **11**, 4013-&
156. Strazza, S., Hunter, R., Walker, E., and Darnall, D. W. (1985) The Thermodynamics of Bovine and Porcine Insulin and Proinsulin Association Determined by Concentration Difference Spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **238**, 30-42
157. Zoete, V., Meuwly, M., and Karplus, M. (2004) A comparison of the dynamic behavior of monomeric and dimeric insulin shows structural rearrangements in the active monomer. *Journal of Molecular Biology* **342**, 913-929
158. Ganim, Z., Jones, K. C., and Tokmakoff, A. (2010) Insulin dimer dissociation and unfolding revealed by amide I two-dimensional infrared spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 3579-3588
159. Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D., and Smith, G. D. (1995) Role of C-Terminal B-Chain Residues in Insulin Assembly - the Structure of Hexameric Lys(B28)Pro(B29)-Human Insulin. *Structure* **3**, 615-622
160. Brems, D. N., Alter, L. A., Beckage, M. J., Chance, R. E., Dimarchi, R. D., Green, L. K., Long, H. B., Pekar, A. H., Shields, J. E., and Frank, B. H. (1992) Altering the Association Properties of Insulin by Amino-Acid Replacement. *Protein Engineering* **5**, 527-533

161. Hassiepen, U., Federwisch, M., Mulders, T., and Wollmer, A. (1999) The lifetime of insulin hexamers. *Biophysical Journal* **77**, 1638-1654
162. Huus, K., Havelund, S., Olsen, H. B., Sigurskjold, B. W., van de Weert, M., and Frokjaer, S. (2006) Ligand binding and thermostability of different allosteric states of the insulin zinc-hexamer. *Biochemistry* **45**, 4014-4024
163. Pittman, I., and Tager, H. S. (1995) A Spectroscopic Investigation of the Conformational Dynamics of Insulin in Solution. *Biochemistry* **34**, 10578-10590
164. Brzovic, P. S., Choi, W. E., Borchardt, D., Kaarsholm, N. C., and Dunn, M. F. (1994) Structural Asymmetry and Half-Site Reactivity in the T to R Allosteric Transition of the Insulin Hexamer. *Biochemistry* **33**, 13057-13069
165. Lenz, V., Gattner, H. G., Sievert, D., Wollmer, A., Engels, M., and Hocker, H. (1991) Semisynthetic des-(B27-B30)-insulins with modified B26-tyrosine. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **372**, 495-504
166. Mirmira, R. G., Nakagawa, S. H., and Tager, H. S. (1991) Importance of the Character and Configuration of Residues-B24, Residues-B25, and Residues-B26 in Insulin-Receptor Interactions. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 1428-1436
167. Massagli.A, Rosa, U., Rialdi, G., and Rossi, C. A. (1969) Iodination of insulin in aqueous and organic solvents. *Biochemical Journal* **115**, 11-&
168. Jorgensen, K. H., and Larsen, U. D. (1980) Homogeneous mono-I-125-labeled insulins - preparation and characterization of mono-I-125-labeled (Tyr A14)-insulin and mono-I-125-labelad (Tyr A19)-insulin. *Diabetologia* **19**, 546-554
169. Becker, R. H. A., and Frick, A. D. (2008) Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glulisine. *Clinical Pharmacokinetics* **47**, 7-20
170. Yamada, S. (2009) Insulin glulisine in the management of diabetes. *Dovepress* **2**, 111-115
171. Ludvigsen, S., Olsen, H. B., and Kaarsholm, N. C. (1998) A structural switch in a mutant insulin exposes key residues for receptor binding. *Journal of Molecular Biology* **279**, 1-7
172. Antolíková, E., Žáková, L., Turkenburg, J. P., Watson, C. J., Hančlová, I., Šanda, M., Cooper, A., Kraus, T., Brzozowski, A. M., and Jiráček, J. (2011) Non-equivalent Role of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Insulin Dimer Interface. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 36968-36977
173. Vecchione, A., Marchese, A., Henry, P., Rotin, D., and Morrione, A. (2003) The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 3363-3372
174. Monami, G., Emiliozzi, V., and Morrione, A. (2008) Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *Journal of Cellular Physiology* **216**, 426-437
175. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature Cell Biology* **5**, 461-466
176. Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., and Yarden, Y. (2003) Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 21323-21326
177. Giudice, J., Leskow, F. C., rndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M., and Jares-Erijman, E. A. (2011) Differential endocytosis and signaling dynamics of insulin receptor variants IR-A and IR-B. *Journal of Cell Science* **124**, 801-811
178. Hansen, B. F., Danielsen, G. M., Drejer, K., Sorensen, A. R., Wiberg, F. C., Klein, H. H., and Lundemose, A. G. (1996) Sustained signalling from the insulin receptor after

stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochemical Journal* **315**, 271-279

Seznam publikací

Jiráček, J., Žáková, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G. & Brzozowski, A. M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** *U.S.A.* 107:1066–1970. IF = 9.681

Antolíková, E., Žáková, L., Turkenburg, J. P., Watson, C. J., Hančlová, I., Šanda, M., Cooper, A., Kraus, T., Brzozowski, A. M. & Jiráček, J., (2011) Non-equivalent Role of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Insulin Dimer Interface. ***J. Biol. Chem.*** 286: 36968–36977. IF = 4,773

Morcavallo, A., Genua, M., Palummo, A., Kletvíkova, E., Jiráček, J., Brzozowski, A. M., Iozzo, R. V., Belfiore, A. a Morrione, A. (2012) Insulin and Insulin-like Growth Factor II Differentially Regulate Endocytic Sorting and Stability of Insulin Receptor Isoform A. ***J. Biol. Chem.*** 287: 11422–11436. IF = 4,773

Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., Lawrence, M. C. (2013) How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. ***Nature*** 493, 241-245. IF = 36,28

Žáková, L., Kletvíková, E., Veverka, V., Lepšík, M., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., Brzozowski, A. M. (2013) Structural integrity of the B24 site in human insulin is important for hormone functionality. ***J. Biol. Chem.***, manuskript v recenzním řízení.

Přílohy

Příloha 1:

Jiráček, J., Žáková, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G. & Brzozowski, A. M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** *U.S.A.* 107:1066–1970.

Příloha 2:

Antolíková, E., Žáková, L., Turkenburg, J. P., Watson, C. J., Hančlová, I., Šanda, M., Cooper, A., Kraus, T., Brzozowski, A. M. & Jiráček, J., (2011) Non-equivalent Role of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Insulin Dimer Interface. ***J. Biol. Chem.*** 286: 36968–36977.

Příloha 3:

Morcavallo, A., Genua, M., Palummo, A., Kletvíkova, E., Jiráček, J., Brzozowski, A. M., Iozzo, R. V., Belfiore, A. a Morrione, A. (2012) Insulin and Insulin-like Growth Factor II Differentially Regulate Endocytic Sorting and Stability of Insulin Receptor Isoform A. ***J. Biol. Chem.*** 287: 11422–11436.

Příloha 4:

Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Žáková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., Lawrence, M. C. (2013) How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. ***Nature*** 493, 241-245.

Příloha 5:

Žáková, L., Kletvíková, E., Veverka, V., Lepšík, M., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., Brzozowski, A. M. (2013) Structural integrity of the B24 site in human insulin is important for hormone functionality. ***J. Biol. Chem.***, manuskript v recenzním řízení.

Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues

Jiří Jiráček[a], Lenka Žáková[a], Emília Antolíková[a], Christopher J. Watson[b], Johan P. Turkenburg[b], Guy G. Dodson[b], and Andrzej M. Brzozowski[b,1]

[a]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic and [b]York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, The University of York, Heslington, York, YO10 5YW, United Kingdom

Edited* by Donald F. Steiner, University of Chicago, and approved December 15, 2009 (received for review October 12, 2009)

Insulin is a key protein hormone that regulates blood glucose levels and, thus, has widespread impact on lipid and protein metabolism. Insulin action is manifested through binding of its monomeric form to the Insulin Receptor (IR). At present, however, our knowledge about the structural behavior of insulin is based upon inactive, multimeric, and storage-like states. The active monomeric structure, when in complex with the receptor, must be different as the residues crucial for the interactions are buried within the multimeric forms. Although the exact nature of the insulin's induced-fit is unknown, there is strong evidence that the *C*-terminal part of the B-chain is a dynamic element in insulin activation and receptor binding. Here, we present the design and analysis of highly active (200–500%) insulin analogues that are truncated at residue 26 of the B-chain (B^{26}). They show a structural convergence in the form of a new β-turn at B^{24}-B^{26}. We propose that the key element in insulin's transition, from an inactive to an active state, may be the formation of the β-turn at B^{24}-B^{26} associated with a *trans* to *cis* isomerisation at the B^{25}-B^{26} peptide bond. Here, this turn is achieved with *N*-methylated L-amino acids adjacent to the *trans* to *cis* switch at the B^{25}-B^{26} peptide bond or by the insertion of certain D-amino acids at B^{26}. The resultant conformational changes unmask previously buried amino acids that are implicated in IR binding and provide structural details for new approaches in rational design of ligands effective in combating diabetes.

β-turn | diabetes | peptide bond isomerisation | protein | structure

The peptide hormone insulin regulates blood glucose levels with a widespread impact on lipid and protein metabolism. It is a molecule of major therapeutic importance in the treatment of diabetes. The mature form of insulin is formed by two chains "A" and "B" with a B chain running from Phe^{B1}-Thr^{B30} and an A chain Gly^{A1}-Asn^{A21}, stabilized by two inter and one intra chain disulphide bonds. Insulin's metabolic actions are expressed through binding as a monomer to the insulin receptor (IR). The structure of insulin, which has been known for four decades (1), has not provided insight into the mode of receptor binding and hormone activation. This is because detailed three-dimensional knowledge of insulin's complex structural behavior is limited to its inactive storage (hexameric, dimeric) states (2–4). The NMR structures of the monomeric form of insulin facilitated by mutations (5), applications of organic co-solvents (6) or truncation of the B-chain (7) merely confirm the conformations known from the inactive forms but also indicate intrinsic mobility of the *N*- and *C* termini of the B-chain. It has also been found that the *N* terminus of insulin can exist in so called T (extended) or R (helical) conformations, however, their role for insulin activation is still ambiguous (3, 4).

It is widely acknowledged that insulin must therefore undergo induced-fit structural changes upon binding to the IR because residues crucial for receptor interactions are hidden in the known structures of the native hormone (8–11). Although the exact nature of the changes that expose these residues to the receptor surface is unknown, there is strong evidence that the *C*-terminal part of the B-chain is a dynamic element in the transition that leads to IR binding (10, 12, 13). The structure of the insulin-IR complex is not known but extensive insulin sequence and mutagenesis studies have identified the likely functional sites responsible for key interactions with the receptor (4, 14–18). The main IR-binding site one consists of Leu^{B11}, Val^{B12}, Leu^{B15}, Gly^{B23}, Phe^{B24}, Phe^{B25}, and Tyr^{B26} on chain B and Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Gln^{A5}, Tyr^{A19}, and Asn^{A21} on chain A (19, 20). The shielding of the A-chain residues in site one by the ~B^{25}-B^{30} residues of B-chain *C* terminus in native insulin structures led to a widely accepted induced-fit hypothesis for insulin-IR binding, requiring this part of the B chain to be displaced (3, 4, 10).

As the lack of structural detail of the active form of insulin bound to the receptor restrains the progress in combating diabetes, we have tried to characterise the structural signatures of the active conformation of this hormone employing partial chemical synthesis/modification of highly-active (i.e., 200–500%) insulins, IR-binding studies and x-ray crystallography. Two types of "semisynthetic" insulins were prepared: one in which the nitrogen atom in the Phe^{B25}-Xaa^{B26} peptide bond was methylated ($N\text{Me}^{B26}$), and others in which the chirality at the B^{26} Cα was changed to the D-enantiomer. The nine insulin crystal structures reported here provide persuasive structural evidence concerning the nature of the induced-fit changes upon receptor binding.

Results

Highly active B^{26}-Shortened/*N*-Methylated Insulins. Chemical changes were systematically introduced in the insulin molecule to achieve high-activity. Semisynthesis (21) of several unique and some previously reported (22, 23) insulin analogues with an *N*-methylated ($N\text{Me}$) Phe^{B25}-Xaa^{B26} peptide bond or with a D-enantiomer at position B^{26} yielded insulins with various binding activities (Table 1, Figs. S1–S3). These modifications indicate a clear pattern that correlates with high binding activity of the hormone: (*i*) shortening of its B-chain by deletion of residues B27-B30, (*ii*) the use of a carboxyamide ($CONH_2$) *C* terminus at position B^{26}, and (*iii*) a concurrent incorporation of $N\text{Me}^{B26}$ (22), D-amino acid (23) or D/L-Pro at position B^{26}. In contrast, an increase of the bulkiness of the B^{26} amino acid in shortened analogues ([$N\text{MePhe}^{B26}$]-DTI-NH_2 (22), [$N\text{MeTyr}^{B26}$]-DTI-NH_2) or similar modifications in the full-length analogues [[$N\text{MeTyr}^{B26}$]-

Author contributions: J.J., L.Ž., and A.M.B. designed research; J.J., L.Ž., E.A., C.J.W., J.P.T., and A.M.B. performed research; J.J., L.Ž., G.G.D., and A.M.B. analyzed data; and J.J., L.Ž., G.G.D., and A.M.B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

[1]To whom correspondence should be addressed. E-mail: marek@ysbl.york.ac.uk

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0911785107/DCSupplemental.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0911785107

Table 1. Comparison of relative receptor binding affinity of some insulin analogues

B-chain position:	24	25	26	27	28	29	30	Affinity, %
Human insulin:	F	F	Y	T	P	K	T	100
[*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2[†]	F	F	**Me A – CONH$_2$**	—	—	—	—	**465** (22)
[D – Pro^{B26}]-DTI-NH_2[†]	F	F	**D – P – CONH$_2$**	—	—	—	—	**359**‡
[*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2[†]	F	F	**Me H – CONH$_2$**	—	—	—	—	**214** (22)
[*N*MeAla^{B26}]-insulin[†]	F	F	**Me A**	T	P	K	T	21 (22)
[*N*MeTyr^{B26}]-insulin[†§]	F	F	**Me** Y	T	P	K	T	21‡
[ProB26]-DTI[†§]	F	F	**P** – COOH	—	—	—	—	81‡
[Pro^{B26}]-DTI-NH_2	F	F	**P – CONH$_2$**	—	—	—	—	**359**‡
[*N*MePhe^{B26}]-DTI-NH_2	F	F	**Me F – CONH$_2$**	—	—	—	—	36 (22)
[*N*MeTyr^{B26}]-DTI-NH_2	F	F	**Me Y – CONH$_2$**	—	—	—	—	72‡
[D – Ala^{B26}]-DTI-NH_2	F	F	**D – A – CONH$_2$**	—	—	—	—	~**400**(**1252**)[¶]

Relative receptor binding affinity is defined as (IC_{50} of human insulin/IC_{50} of analogue) ×100.

[†]Crystal structures presented in this report,

[‡]data presented in this study (the values of IC_{50}s are given in legends for Figs. S1–S3). Changes in B-chain sequence, high activities, and nonstandard chemical groups in bold;

[§]analogue for which both monomer and hexamer crystal structures have been determined, DTI: *des*-tetrapeptide; [*N*MeXaaB^n]: methylation of the peptide bond N-atom preceding Xaa B^n amino acid; -NH_2: *C*-terminal carboxyamide.

[¶]Only one analogue: [D-Ala^{B26}]-DTI-NH_2, 1,252% from ref. 23, was reevaluated here as it showed IR affinity within the range of other analogues semisynthesised and presented in this work.

insulin and [*N*MeAla^{B26}]-insulin (22)] resulted in low or moderate (21–72%) binding activities (Table 1).

B-Chain of the Highly Active Insulins Possess a Unique β-Turn. The apparent correlation between chemical composition and binding activity within the present insulin analogues prompted their crystallographic characterization (Tables S1–S4) in order to identify the underpinning structural features and to get further insight into the structural origins of the active conformation of insulin.

The most active (465%) insulin presented in this study: N^{B26}-methylated and B^{26}-truncated analogue [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2 (22), was crystallized as a monomer with a unique conformation at B^{24}-B^{26}. Its most striking feature is a type II β-turn at Phe^{B24}-*N*MeAla^{B26} referred to here as the B26 turn (Fig. 1, Fig. S4*A*). This turn is associated with a *cis* conformation of the Phe^{B25}-*N*MeAla^{B26} peptide bond. The B^{24} CO group forms a 2.8 Å hydrogen bond with NH_2 of the terminal Ala^{B26} carboxyamide, in which the NH_2 group mimics the peptide NH of the $i+3$ (B^{27}) amino acid.

The most important consequence of the B26 turn is the departure of the B-chain B^{22}-B^{30} β-strand from its typical hexamer/dimer like conformation (Fig. 1). The truncated B-chain *C*-terminal segment now points away from IR site one making the latter accessible for a direct interaction with the IR. Another structural consequence of the B26 turn is a rotation of the Phe^{B25} side chain that now overhangs the A-chain part of site one (~7.7 Å from nearest Ile^{A2}) (Fig. 2, 4). In contrast, Phe^{B24} remains in place. These B-chain changes are complemented by large movements of the A-chain, most notably the *N*-terminal helix is displaced by ~3 Å and rotated by ~40°, whereas Tyr^{A19} shifts 2.9 Å away to form a hydrogen bond with Gln^{A5} extending the non-polar receptor binding surface (Fig. 2). These "high-activity motifs" of the insulin structure were confirmed by the crystal structure of an another highly-active (214%) truncated analogue ([*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2) (22, Fig. S5). These both highly-active insulins possess B26 turns with identical geometries (e.g., the corresponding Cβ atoms of His^{B26} and Ala^{B26} are only *ca.* 0.3 Å from each other) and hydrogen bond networks.

D-Pro^{B26} Mimics β-turn Resulting in High Activity. To explain the structural role of D-amino acid chirality at position B^{26} in achieving highly active (359%) insulin analogue (Table 1), the crystal structure of the truncated [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2 analogue was determined. The change of the chirality at the B^{26} Cα center in this

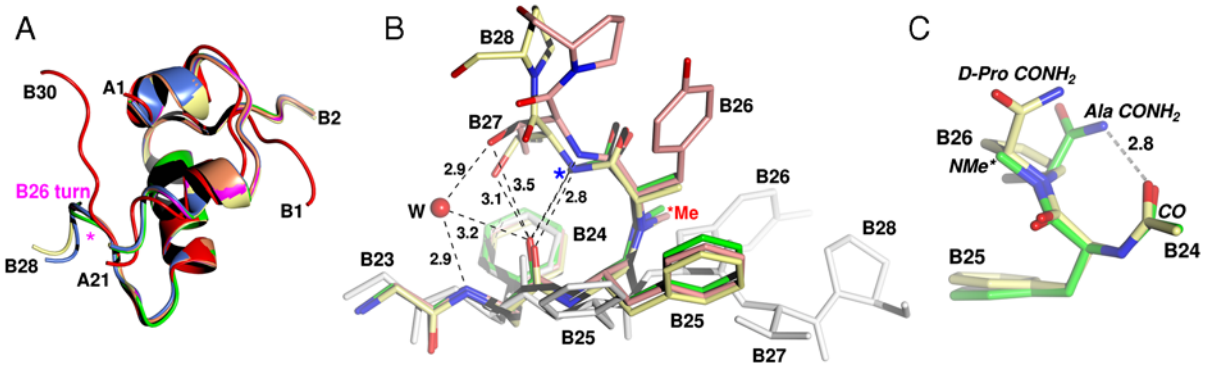


Fig. 1. Structural features of the highly-active insulin analogues. (*A*) An overlay of the general fold of crystal structures of the highly-active and other insulins reported here: *Magenta*: [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2, *Coral*: [*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2, *green*: [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2, *Blue*: [*N*MeAla^{B26}]-insulin, *Yellow*: [*N*MeTyr^{B26}]-insulin (monomer structure), *Red*: wild type human insulin (32); the location of the B26 turn is marked by the *Star* in *Magenta*. (*B*) A close-up view of the B26 turn in the most representative analogues. N, O atoms in *Blue* and *Red*, resp. [except for normal human insulin (32) that is in *White*], C atoms color code: *Green* — [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2, *Yellow* — [*N*MeAla^{B26}]-insulin, *Pink* — [*N*MeTyr^{B26}]-insulin, *W* — water molecule, hydrogen bonds (*Dashed Lines*) lengths in Å. *Me (*Red*) — *N*Me^{B26}, *Blue* * — indicates the three-dimensional convergence of N atoms from the $B^{26}CONH_2$ and $B^{26}NH$ peptide groups. (*C*) Superposition (on B^{23}-B^{25} Cα) of B26 turns in [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2 and [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2 showing a conformational convergence of peptide methylation (*N*Me^{B26}) and D-Pro^{B26} chirality.

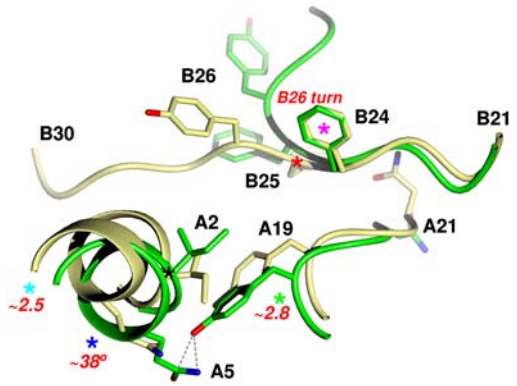


Fig. 2. Main structural changes occurring in insulin during a transition from ground-state to a proposed activated/active form based on the structures of some highly-active analogues; *Yellow* — human insulin (32); *Green* — [*N*MeTyr^{B26}]-insulin (isomorphous with the highly-active truncated [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH$_2$ but with the almost full B-chain structural definition), *Magenta Star* — Phe^{B24} side-chain structural pivot, *Red Star* — Phe^{B25} main chain structural pivot, *Black Star* — Ile^{A2} Cα main chain pivot, *Green Star* — Tyr^{A19} shift and formation of a hydrogen bond (*Dashed Lines*) with Gln^{A5}, *Blue Star* — rotation of the A1 helix (in degrees), *Cyan Star* — translational move of the A1 helix (in Å).

analogue caused by the introduction of D-Pro generates a local structure similar to that seen in the *cis* Phe^{B25}-Xaa^{B26} *N*-methylated peptide bond high-activity insulin analogues. The absence of the *cis*-peptide bond in [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ is compensated by the D-Pro in attaining a conformation similar to the B26 turn (Fig. 1*C*, Fig. S5). Although the $i+3$ β-turn hydrogen bond is not formed here (CO^{i}-NH^{i+3} distance of ~4.0 Å), the D-Pro residue positions the B-chain *C*-terminal CONH$_2$ moiety in a manner similar to that, observed in insulins containing a B26 turn; the NH$_2$-terminal group is only ~1.1 Å from its hydrogen-bonded equivalents in two other highly-active analogues. Hence, the conformations of the B-chain *C*-termini are associated with a β-turn in all three highly-active insulins and are correlated with their similar high affinity receptor binding.

As a very similar high activity (~360%) was also observed with the truncated L-Pro containing analogue with the carboxyamide group at the B-chain *C* terminus ([L-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$, Table 1), the shortened L-Pro analogues were also investigated by x-ray crystallography. However, only the monomeric and hexameric structures of *C* terminus-amide lacking truncated L-Pro homologue ([L-Pro^{B26}]-DTI, 81% affinity) could be crystallized and determined. They show that the B^{20}-B^{26} segments are severely disordered in both crystals forms.

Full-length Insulin Analogues Can Adopt B26 Turn. The capacity of full-length insulin to adopt the B26 turn was investigated further in the crystal structures of monomers of the full-length analogues: [*N*MeTyr^{B26}]-insulin and [*N*MeAla^{B26}]-insulin (22). These variants also possess the B26 turn and all other general structural features characteristic for the most active truncated insulin molecules including the exposure of site one (Fig. 1*A* and *B*, Fig. 2, Fig. S4*B*). The B26 β-turn is stabilized in these analogues by a typical $i+3$ β-turn hydrogen bond between Phe^{B24} and Thr^{B27} (CO^{B24}-NH^{B27} distances of ~2.9–3.3 Å). As expected, the Thr^{B27} peptide bond NH groups of the full-length analogues are spatially equivalent to CONH$_2$ terminus NH$_2$ group of the truncated insulins. The Cα^{i}-Cα^{i+3} distances of ~6 Å are well within the ~7 Å limit typical for a type II β-turn. The section of the *C*-terminal segment that is well defined, Thr^{B27}-Pro^{B28} (Lys^{B29}-Thr^{B30} is disordered) follows the direction enforced by the B26 turn (identical to its conformation found in truncated insulins), and departs further from site one (Fig. 1*A* and *B*, Fig. 2) that is, thus, fully revealed. The B26 β-turn is further stabilized here by additional hydrogen bonds between Phe^{B24} CO with the side-chain OH of Thr^{B27} and water molecules. As the crystallization experiments were carried out in parallel in the monomer- and hexamer-like conditions (pH 3.0 and pH 7.5–8.2 respectively) (Fig. S6), the hexamer crystals of the full-length [*N*MeTyr^{B26}]-insulin have also been obtained. Despite the presence of *N*Me group at position B^{26}, this insulin analogue is still capable of forming a typical hexamer, in which the dimer interface adapts to the *N*Me-induced disruption as described before (24). Interestingly, crystallizations of the full-length [*N*MeAla^{B26}]-insulin, even under typical hexamer conditions, always yield the monomer crystal form. It has to be noted that some crystal structures of analogues described here are unique crystallographic descriptions of the full-length monomeric form of insulin.

New Pseudo β-Turn Conformation of B-Chain *N* Terminus. All monomers of the highly-active insulin analogues reported here also show a structural convergence of their *N* termini that adopts a unique conformation not previously seen. Here, the main chain of B-chain *N* terminus follows the direction typical for the T-state till the Cα atom of the Phe^{B5} at which it deviates from the T-fold forming, instead, a pseudo type II β-turn (Fig. 3). The turn is stabilized by the $i+3$ hydrogen bond (3.0 Å) between main chain NH of the His^{B5} ($i+3$) and the side chain of the Asn^{B3} that mimics the *i*- main chain CO group. This turn is stabilized further by an additional side chain Asn^{B3}- side chain (Nδ2) His^{B5} hydrogen bond (3.0 Å). The Nδ1 atom of the His^{B5} is also close to the main chain CO of the Thr^{A8} (~3.3 Å) reflecting the importance of B^{5} side chain in this unique formation. Only the main chain hydrogen bond: NH B^{6}-CO A^{6} (2.8 Å) remains here from the network of B-chain—A-chain interactions that contribute to the stabilization of a typical T-state B chain *N* terminus.

Discussion

Structural Signatures of the Activated/Active Form of Insulin. The conservation and three-dimensional convergence of specific structural features that lead to the exposure of buried, biologically active residues in chemically modified, highly-active insulin analogues discussed here suggest key structural traits that may be present in insulin's active conformation on the receptor or during its activation process. Although the evidence for the conformational motifs of the activated/active insulin conformation is indirect, the convergence of the structural signatures of highly-active hormone analogues observed here is to our mind quite persuasive.

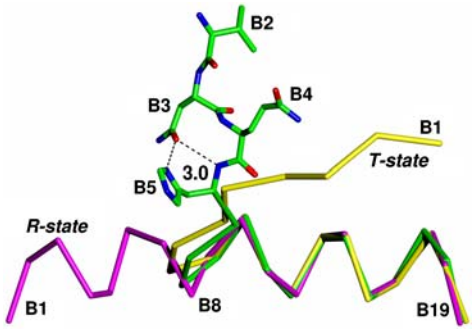


Fig. 3. Unique conformation of B-chain *N* terminus in the highly-active insulin analogues. One representative pseudo β-turn from the [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH$_2$ analogue is given in *Green* (only for the B^{2}-B^{5} residues all atoms are given; Cαs trace for the B^{6}-B^{19} region, hydrogen bonds in *Dash Lines*, distances in Å). Cα trace of the B^{1}-B^{19} region typical for the T-state form of insulin (1 mso.pdb) in *Yellow*; the same region representative for the R-state of the hormone — derived from the hexamer form of the [L-Pro^{B26}]-DTI) — in *Magenta*.

It can be envisaged that the most striking element of the activated/active form of insulin is the formation of B26 turn associated with *trans*-to-*cis* isomerisation of the Phe^{B25}-Tyr^{B26} peptide bond. The Phe^{B24}(CO)-Thr^{B27}(NH) hydrogen bond—crucial for the stabilization of B26 turn—is probably also critical to the productive receptor binding in wild-type insulin because the inhibition of its formation by selective reduction of the B^{24} CO group to $\psi(CH_2\text{-}NH)$ in the native hormone molecule abolishes its activity (25). The B26 turn conformation at B^{26} is found in all three truncated, highly-active insulins described here. Although the structure of the highly-active [L-Pro^{B26}]-DTI-NH_2 insulin is not known the loss of potency in carboxyamide-lacking [L-Pro^{B26}]-DTI correlates well with a loss of B26 turn. Furthermore, the NMR structures of another very potent [D-Ala^{B26}]-DTI-NH_2 insulin (23) (reevaluated here) indicated mobility of the B^{26} region. It is to be expected that there is conformational freedom in this structural element and that the formation of B26 turn can be readily achieved.

Therefore, we propose that these structural changes (formation of B26 turn and *trans-cis* isomerisation of the Phe^{B25}-Tyr^{B26} peptide bond) follow the detachment of the Tyr^{B26}-Thr^{B30} segment from the insulin molecule during, or on, binding to the receptor. These observations are consistent with the induced-fit theory of insulin-IR binding and with *trans*/*cis* peptide bond isomerisation analyses (26–29). The protein environment supplied by IR is important in the unmasking and stabilisation of the active surfaces of insulin. We suggest that the analogues with higher affinity described here have an active surface more representative of the conformation of insulin bound to the receptor than do the structures of the storage forms of the native hormone. The scale and nature of the structural rearrangements leading to highly active analogues underlines a "chaperone-like" role of the IR in insulin activation (30), especially if *trans-cis* peptide isomerisation is one of the key steps.

The restructuring of the B-chain and the concerted changes to the *N*-terminal helix of the A-chain reveal a large hydrophobic area made up of Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, and Tyr^{A19} priming them for direct interactions with the IR (Fig. 2, 4). The importance of Ile^{A2} to receptor binding is indicated by its complete exposure on the IR-binding surface and by the striking spatial invariance of its Cα atom in these transformations. The structural conservation of the A^2 Cα suggests its role as the A-chain main chain pivot in insulin activation. The shift of Tyr^{A19} into hydrogen bond contact with Gln^{A5} further stabilises the A-chain IR-binding surface with the edge of the Tyr^{A19} ring transforming the Gly^{A1}-Ile^{A2}-Val^{A3} hydrophobic surface into a three-rim (Tyr^{A19}, Gly^{A1}-Ile^{A2}, and Val^{A3}) evenly spaced "epitope" (Fig. 4).

The key structural roles of Phe^{B24} and Phe^{B25} in insulin activity, well known from several studies (4, 15), are firmly confirmed by structures of the highly-active insulins described here. The aromatic ring of Phe^{B24} is spatially invariant in native hormone and all other insulin analogues. This is in contrast to the ∼90° rotation of Phe^{B25} side chain that subsequently overhangs (by ∼7 Å) the A-chain part of site one (Tyr^{A19}-Gly^{A1}-Ile^{A2}-Val^{A3}) "epitope" in the highly active insulins. However, in spite of its considerable side-chain movement the position of the Phe^{B25} Cα atom is well conserved in different forms of insulin, confirming further the role of Phe^{B24} in stereo-specific detachment of the B-chain β-strand (10). Therefore, it may be suggested that the Phe^{B24} is a B-chain side-chain pivot during insulin activation (Fig. 2). Phe^{B24} is structurally invariant side chain that, being anchored into the hydrophobic cavity lined up by Leu^{B15}, Val^{B12}, Tyr^{B16} (its side chain collapses on this cavity in the activation process sealing it off) and Cys^{B19}, provides structural stability during rearrangement of the *C*-terminal segment of the B-chain. Phe^{B25} complements the role of Phe^{B24} in this process acting as the B-chain main chain pivot with the B^{25} Cα as the first B-main chain turning point in formation of the B26 turn and, subsequently, initiation of IR binding (Fig. S7).

In addition to the structural convergence of the B^{24}-B^{26} region in the highly active insulin analogues the consistent similarity of the unique B^3-B^5 pseudo β-turn of B-chain *N* termini observed there should be also noted. This turn locates the *N* terminus conformation in-between the T- and R-forms. However, the physiological relevance of this unique state of the hormone (e.g., as a snapshot of the T-R transition or as its more stable high-activity related form) is unclear and requires further studies.

Lower Activity Insulin Analogues Fit the B26 Turn-Related Activation Model. Interestingly, some of the B^{26}-truncated analogues: [*N*MeTyr^{B26}]-DTI-NH_2 and [*N*MePhe^{B26}]-DTI-NH_2 (22), show lower activities, 72% and 36% respectively (Table 1). At present, there is no straightforward structural explanation for this behavior. In the native, full-length insulin the replacement of Tyr^{B26} to Ala (without any *N*-methylation) results in a lowering of its activity to ∼36% (14). However, the presence of a more bulky aromatic side chains (Phe^{B26}/Tyr^{B26}) in the B^{26}-truncated (and *N*-methylated) analogues may result, for example, in a detrimental, entropic effect leading to the destabilization of the short B26 turn. It is interesting that these analogues have not crystallized, suggesting an increased flexibility that has also been observed by NMR for a related truncated insulin analogue (31).

The crystal structures of the full-length analogues result in intriguing observations. Firstly, only the monomer structures of [*N*MeAla^{B26}]-insulin have been obtained under both "monomer" and "hexamer" crystallization conditions whilst both monomer and hexamer crystals of [*N*MeTyr^{B26}]-insulin were grown in the relevant monomer and hexamer crystallization environments. This indicates that the monomer conformation is preferentially stabilized by Ala in the B^{26} position, consistent with the high

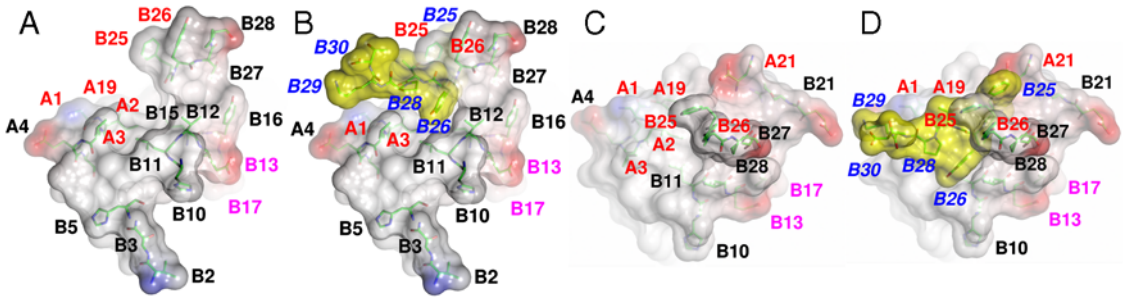


Fig. 4. Molecular shape of a putative active form of insulin based on the electrostatic surface of the [*N*MeTyr^{B26}]-insulin analogue as the representative of B26 turn-containing insulins. (*A*) A "side" view showing the formation of the hydrophobic IR-binding hand-like insulin shape composed of site one residues (*Red Numbering*), and lined by Leu^{B11}, Leu^{B15}; labels for some residues of site two are in *Magenta*. (*B*) As (*A*) but with B^{25}-B^{30} chain of the wild type human insulin modeled in (32) (*Yellow Surface*, *Blue-Italic Numbering*) showing the obstruction of site one prior to the formation of the B26 turn. (*C-D*) "Top" views of insulin surfaces equivalent to the (*A* and *B*) representations after 90° rotation.

potency of the B^{26} truncated insulin. The reduced potencies of [*N*MeTyr^{B26}]-insulin and [*N*MeAla^{B26}]-insulin analogues (~21%, Table 1) confirm the trend that the full-length analogues are generally less active than their truncated homologues (4) and suggest that this may result from several disadvantageous steric and entropic factors originating in the B^{27}-B^{30} region. For example, (*i*) the B^{27}-B^{30} segment may require a significant contribution from the IR to be induced to a fully active conformer of insulin, (*ii*) the structural constrain of the B26 turn may not impose the optimal conformation for the B^{27}-B^{30} residues, and (*iii*) the B26 turn may not represent the final and the most optimum active insulin conformation (Fig. S7).

Molecular Shape of Active Insulin. The structure-function relationships of the highly-active insulin analogues described here not only give an insight into detailed definition of the putative local structural signatures of an active form of insulin, but shed also light on the possible molecular shape of the hormone's active conformer. In the process of insulin activation the Phe^{B25} and the B26 turn form a hydrophobic knob that together with the A-chain "epitope" defines a unique, highly hydrophobic IR-binding cleft, lined by Leu^{B15}, Leu^{B11}, and Val^{B12} side chains [Fig. 4; it should be mentioned that the normal insulin B^{25}-B^{30} substructure modeled in Fig. 4*B* is actually in more intimate contacts with other A- and B-chain residues in the ground-state insulin molecule due to a different relative orientation of these chains in highly-active insulin analogues and its ground form (Fig. 2)]. The shape of this cleft is reminiscent of a macromolecular hand that ensures the grip on the receptor by a hydrophobic thumb (Phe^{B25} and B26 turn), a hydrophobic palm (Leu^{B15}/Leu^{B11}/Val^{B12}), and hydrophobic fingers (Tyr^{A19}, Gly^{A1}-Ile^{A2}, and Val^{A3}).

The molecular features of several highly-active, and related, insulin analogues discussed here provide unique structural elements for the conformational landscape of the hormone. They give considerable insight into the activation of human insulin and should help in development of unique types of hormone analogues for the treatment of diabetes mellitus.

Material and Methods

Semisynthesis of Insulin Analogues and Binding Assays. In general, solid-phase synthesis of peptides, enzymatic semisynthesis of analogues, purification of analogues, preparation of rat adipose membranes, and binding assays were performed as described previously (21, 22) (*SI Text*).

Crystallization, Structure Determination, and Refinement. Crystallization conditions (Table S1) were found initially by an in-house developed screen based on the available insulin crystallization protocols and they were refined individually by the hanging drop method. X-ray data (Tables S2–S4) were processed by HKL2000 (33) and all computational crystallography was performed by the CCP4 suite of programs (34). Structures were determined by molecular replacement with differently truncated 1mso.pdb-derived monomeric insulins as the model (32). Crystallization details, x-ray data, refinement statistics, and model building protocols are provided in *SI Text*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Ivona Hančlová (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry), Stephanie Harding, Emilie Poudegivne, James Holfcroft, and Sam Hart for technical assistance and Jean Wittingham for critical discussions and helpful suggestions. This work was supported by a grant from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Chemical Genetics Consortium Grant LC06077, to J.J.); a grant from the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (KJB400550702, to L.Z.); and a Research Project of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Z40550506, to IOCB). C.J.W.'s studentship is funded by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council.

1. Adams MJ, et al. (1969) Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals. *Nature*, 224:491–495.
2. Derewenda U, et al. (1991) X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. a completely inactive analogue. *J Mol Biol*, 220:425–433.
3. Weiss MA (2009) *Insulin and IGFs*, ed Litwack G (Elsevier Academic, Inc, San Diego), pp 33–49.
4. Mayer JP, Zhang F, DiMarchi RD (2007) Insulin structure and function. *Biopolymers*, 88:687–713.
5. Ludvigsen S, Roy M, Thogersen H, Kaarsholm NC (1994) High-resolution structure of an engineered biologically potent insulin monomer, B16 Tyr – – > His, as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, 33:7998–8006.
6. Bocian W, et al. (2008) Structure of human insulin monomer in water/acetonitrile solution. *J Biomol NMR*, 40:55–64.
7. Hua QX, Weiss MA (1991) Comparative 2D NMR studies of human insulin and des-pentapeptide insulin: Sequential resonance assignment and implications for protein dynamics and receptor recognition. *Biochemistry*, 30:5505–5515.
8. Hua QX, Shoelson SE, Kochoyan M, Weiss MA (1991) Receptor binding redefined by a structural switch in a mutant human insulin. *Nature*, 354:238–241.
9. Ludvigsen S, Olsen HB, Kaarsholm NC (1998) A structural switch in a mutant insulin exposes key residues for receptor binding. *J Mol Biol*, 279:1–7.
10. Xu B, et al. (2009) Decoding the cryptic active conformation of a protein by synthetic photoscanning insulin inserts a detachable arm between receptor domains. *J Biol Chem*, 284:14597–14608.
11. McKern NM, et al. (2006) Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature*, 443:218–221.
12. Zoete V, Meuwly M, Karplus M (2004) A comparison of the dynamic behavior of monomeric and dimeric insulin shows structural rearrangements in the active monomer. *J Mol Biol*, 342:913–929.
13. Pittman I, Tager HS (1995) A spectroscopic investigation of the conformational dynamics of insulin in solution. *Biochemistry*, 34:10578–10590.
14. Kristensen C, et al. (1997) Alanine scanning mutagenesis of insulin. *J Biol Chem*, 272:12978–12983.
15. Mirmira RG, Nakagawa SH, Tager HS (1991) Importance of the character and configuration of residues B24, B25, and B26 in insulin-receptor interactions. *J Biol Chem*, 266:1428–1436.
16. Brange J, Owens DR, Kang S, Volund A (1990) Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. *Diabetes Care*, 13:923–954.
17. Haneda M, Chan SJ, Kwok SC, Rubenstein AH, Steiner DF (1983) Studies on mutant human insulin genes: Identification and sequence analysis of a gene encoding [SerB24]insulin. *P Natl Acad Sci USA*, 80:6366–6370.
18. Xu B, et al. (2002) Chiral mutagenesis of insulin's hidden receptor-binding surface: Structure of an allo-isoleucine(A2) analogue. *J Mol Biol*, 316:435–441.
19. Pullen RA, et al. (1976) Receptor-binding region of insulin. *Nature*, 259:369–373.
20. De Meyts P, Whittaker J (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: Implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov*, 1:769–783.
21. Zakova L, et al. (2007) The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs. *J Pept Sci*, 13:334–341.
22. Zakova L, et al. (2008) Insulin analogues with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry*, 47:5858–5868.
23. Kurapkat G, et al. (1999) The solution structure of a superpotent B-chain-shortened single- replacement insulin analogue. *Protein Sci*, 8:499–508.
24. Zakova L, et al. (2004) Toward the insulin-IGF-I intermediate structures: Functional and structural properties of the [Tyr(B25)NMePhe(B26)] insulin mutant. *Biochemistry*, 43:16293–16300.
25. Nakagawa SH, Johansen NL, Madsen K, Schwartz TW, Tager HS (1993) Implications of replacing peptide bonds in the COOH-terminal B chain domain of insulin by the $\psi(CH_2\text{-}NH)$ linker. *Int J Pept Protein Res*, 42:578–584.
26. Pal D, Chakrabarti P (1999) Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations. *J Mol Biol*, 294:271–288.
27. Sykora D, Zakova L, Budesinsky M (2007) High-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance study of linear tetrapeptides and octapeptides containing *N*-methylated amino acid residues. *J Chromatogr A*, 1160:128–136.
28. Fischer G (2000) Chemical aspects of peptide bond isomerisation. *Chem Soc Rev*, 29:119–127.
29. Harrison RK, Stein RL (1992) Mechanistic studies of enzymatic and nonenzymic prolyl cis-trans isomerization. *J Am Chem Soc*, 114:3464–3471.
30. Ward CW, Lawrence MC (2009) Ligand-induced activation of the insulin receptor: A multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays*, 31:422–434.
31. Hua QX, Ladbury JE, Weiss MA (1993) Dynamics of a monomeric insulin analogue: Testing the molten-globule hypothesis. *Biochemistry*, 32:1433–1442.
32. Smith GD, Pangborn WA, Blessing RH (2003) The structure of T-6 human insulin at 1.0 angstrom resolution. *Acta Crystallogr D*, 59:474–482.
33. Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*, 276A:307–326.
34. Bailey S (1994) Collaborative computational project, number 4. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D*, 50:760–763.

Supporting Information

Jiráček et al. 10.1073/pnas.0911785107

SI Text

Materials and Methods. In general, solid-phase synthesis of peptides, enzymatic semi-synthesis of analogues, purification of analogues, preparation of rat adipose membranes, and binding assays were performed as described in detail previously (1, 2).

Semi-synthesis of insulin analogues. The octapeptides and tetrapeptides were synthesized on 2-chlorotrityl and Sieber amide resins, respectively, using Fmoc-protected amino acids with *t*Bu protection of Thr and Tyr side chains and Trt protection of the His side chain. Coupling was carried out with HBTU/DIPEA reagents or with PyBrop/DIPEA reagents for *N*-methylated amino acids.

The semisyntheses of full-length insulin and DTI-NH_2 analogues were performed as follows. Typically, octapeptide or tetrapeptide (150 mM) and desoctapeptide insulin (DOI, 30 mM) were dissolved in a solution (total volume of 200 μL) containing 55% aqueous dimethylformamide, 20 mM calcium acetate, and 4.7 mg of TPCK-trypsin (enzyme: substrate molar ratio of 1:30). The pH value was adjusted with *N*-methylmorpholine (usually 0.5–6 μL) to 6.9–7.0. The resulting reaction mixture was incubated at RT (20–25 °C). After 7–24 h, the reaction, monitored by analytical RP-HPLC, was stopped by the addition of acetone (4 °C). The sediment was dissolved in 10% acetic acid, and the product was separated from trypsin, DOI, and side products by preparative RP-HPLC using acetonitrile gradient. The identity of the insulin analogues was confirmed with MALDI-TOF mass spectrometer (Reflex IV, Bruker) or FTMS mass spectrometer LTQ-orbitrap XL (Thermo Fisher).

All of our full-length insulin analogues contained Lys(Pac) at the B29 position, and the phenylacetyl (Pac) protecting groups were cleaved using penicillin G acylase (PA). Insulin analogues (5 mg) were dissolved in 1 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), and soluble PA (10 units in 6.6 μL of buffer) was added. The reaction proceeded at RT (20–25 °C), and the progress of the reaction was followed with RP-HPLC. After completion of the deprotection (12-24 h), insulin analogues were purified using RP-HPLC and characterized as described above.

Insulin receptor affinity assays. Plasma membranes were prepared from epididymal adipose tissue of adult male Wistar rats weighing 210–250 g. The adipose tissue (5–6 g) was homogenized using an ultraturrax with 20 mL of buffer, consisting of 10 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 1 mM PMSF, and 1 mM benzamidine (pH 7.4). The mixture was centrifuged at $3,000 \times g$ for 15 min at 4 °C, and then the supernatant was centrifuged again at $17,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The resulting pellet was resuspended in 1 mL of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6), and the protein concentration was determined.

Plasma membranes (50 μg of protein) were incubated in 5 mL tubes with human [^{125}I]monoiodotyrosylA14-insulin at a concentration of 5×10^{-11} M (about 57,000 dpm) and various concentrations ($10^{-13} - 10^{-5}$ M) of insulin or insulin analogues in a buffer composed of 100 mM Tris-HCl, 2 mM *N*-ethylmaleimide, 13.2 mM $CaCl_2$, and 0.1% (w/v) BSA (pH 7.6) in a total volume of 250 μL. The solution was incubated at 4 °C for 21 h, and then the reaction was terminated by the addition of ice-cold 120 mM NaCl, followed by a quick filtration on a Brandel cell harvester (Biochemical Research and Development Laboratories, Gaithersburg, MD). Bound radioactivity was determined by γ-counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin-Elmer, Wellesley, MA). The total binding (the binding in the absence of the competitor) was 8–10% of the total radioactivity.

Competitive binding curves (Figs. S1–S3) were plotted using GraphPad (San Diego, CA) Prism 5, comparing the best fits for single-binding site models. Half-maximal inhibition values of binding of human [^{125}I]monoiodotyrosylA14-insulin to the receptor (IC_{50}) were obtained from nonlinear regression analysis.

Protein crystallization. All insulin analogues were dissolved in 20 mM HCl at 10 mg/mL prior to the crystallizations. The 48-conditions crystallization screen based on the known insulin crystal-growth protocols have been designed and used here.

Proteins were crystallized by hanging-drop techniques with initial 1 + 1 μL drop : reservoir setups and 1 mL well solutions. The protein concentration after optimisation of the trials was in the range 2–5 mg/mL. For conditions in which low salt concentration (e.g., less than 0.1 M) was required the buffer was not used but the pH of the salt stock solution was adjusted directly by an appropriate acid. Details of the crystallization- and cryo-conditions are summarised in Table S1. Crystallisations were very unpredictable, with some crystals, such as of [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2 monomer, growing within days while other analogues (e.g., [*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2) yielded couple of crystals after three-four months. The size of most of the crystals was in the range of approximately $100 \times 50 \times 20$ microns. All crystals were vitrified in liquid N_2 and all x-ray data were collected at 100 K. X-ray data were integrated and scaled by *HKL2000* (3). X-ray data and refinement statistics are provided in Tables S2–S4.

Structure solution and refinement. All structures were determined by molecular replacement in Molrep (4) with B^8–B^{24} truncated insulin (5) as a model. Restrained refinement was performed by maximum likelihood protocols in Refmac 5 (6) implemented in the CCP4 suite (7) with 5% of the datasets selected for the calculations of the R_{free}. Monitoring of the refinement, model building/correction and structure validation was done in Coot (8). The LSQ superpositions of crystal structures were performed on B^9–B^{19} Cα atoms of the B-helix in Coot, with the exception of figure 1*C* where the B^{24}–B^{26} Cα atoms were the targets of the superposition for a direct comparison of the local B26 turn geometry. The high-resolution structures were refined anisotropically with the application of TLS. Water molecules, ligands and Me groups in *N*MeB^{26} peptides were added using Coot. All omit electron density maps unambiguously revealed the methylation of the peptide bond (see Fig. S4) or the presence of the D-amino acid. Fig. S5 represents the superposition of B26 turn in truncated [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2, [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2 and [*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2. As the geometry of the B26 turn in these analogues is very similar [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2 and [*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2 analogues were omitted from Fig. 1*B* in the main text to ensure its clarity. The general structural trends in the crystal structures presented in this report are summarized in Fig. S6.

The molecular features of insulin analogues discussed here presented new structural elements in the conformational landscape of the hormone. They allow consideration of an alternative scheme of insulin activation process (Fig. S7) that may serve as a template for further experimental evaluation and validation.

1. Zakova L et al. (2007) The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs. *J Pept Sci* 13:334–341.
2. Zakova L et al. (2008) Insulin analogues with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry* 47:5858–5868.
3. Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 276A:307–326.
4. Vagin A, Teplyakov A (1997) MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* 30:1022–1025.
5. Smith GD, Pangborn WA, Blessing RH (2003) The structure of T-6 human insulin at 1.0 angstrom resolution. *Acta Cryst D* 59:474–482.
6. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst D* 53:240–255.
7. Bailey S (1994) Collaborative computational project, number 4. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Cryst D* 50:760–763.
8. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D* 60:2126–2132.

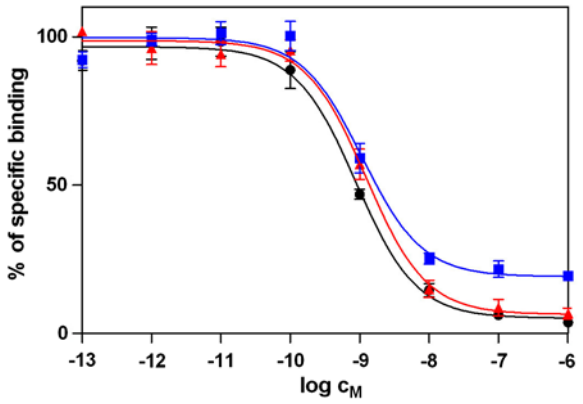


Fig. S1. Inhibition of binding of human ^{125}I-monoiodotyrosylA14-insulin to adipose plasma membranes by human insulin and insulin analogues. Human insulin (●); $IC_{50} = 0.88 \pm 0.05 (n = 5)$, 100%. [*N*MeTyr^{B26}]-DTI-NH$_2$ (▲); $IC_{50} = 1.23 \pm 0.22 (n = 3)$, 72%. [L-Pro^{B26}] -DTI (■); $IC_{50} = 1.08 \pm 0.18 (n = 4)$, 81%.

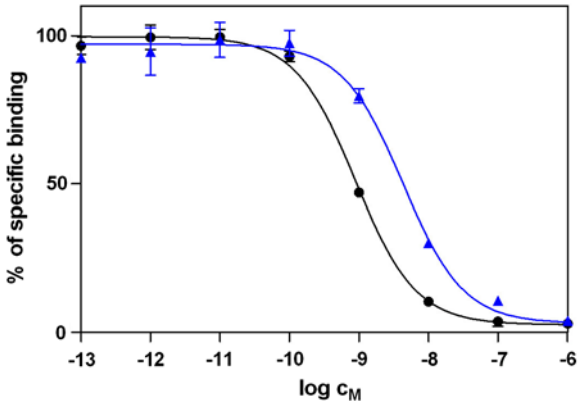


Fig. S2. Inhibition of binding of human ^{125}I-monoiodotyrosylA14-insulin to adipose plasma membranes by human insulin and insulin analogue. Human insulin (●); $IC_{50} = 0.89 \pm 0.06 (n = 3)$, 100%. [*N*MeTyr^{B26}]-insulin (▲); $IC_{50} = 4.3 \pm 0.46 (n = 3)$, 21%.

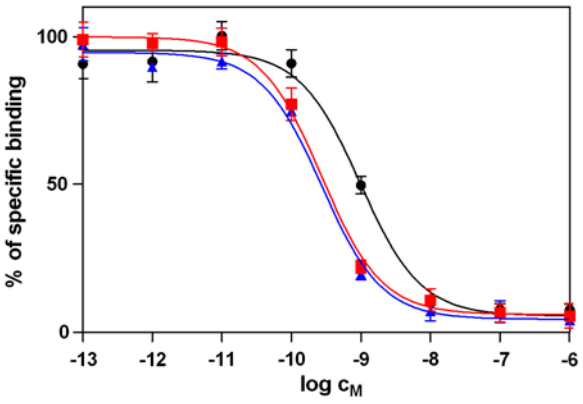


Fig. S3. Inhibition of binding of human ^{125}I-monoiodotyrosylA14-insulin to adipose plasma membranes by human insulin and insulin analogues. Human insulin (●); $IC_{50} = 0.97 \pm 0.04 (n = 6)$, 100%. [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ (▲); $IC_{50} = 0.27 \pm 0.03 (n = 5)$, 359%. [L-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ (■); $IC_{50} = 0.27 \pm 0.03 (n = 5)$, 359%.

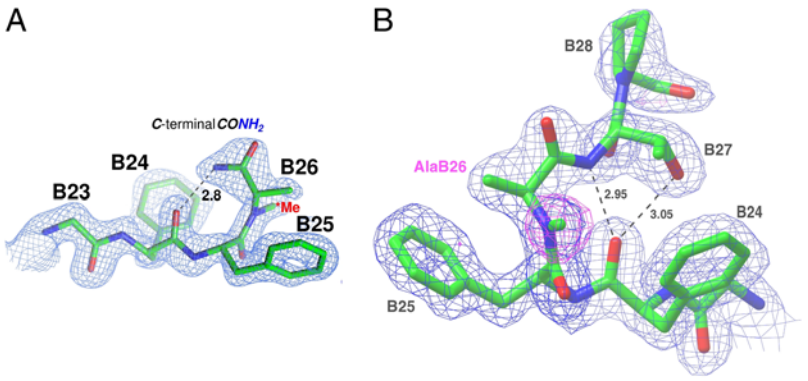


Fig. S4. Examples of electron density definition for B26 turn. (*A*) 2*Fo-Fc* 1σ level electron density (*Blue*) for B26 turn in [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH$_2$ analogue; *Me (*Red*) -*N*Me^{B26} atom; hydrogen bond in dashed lines. (*B*) 2*Fo-Fc* 1σ level electron density (in blue) for B26 turn in [*N*MeAla^{B26}]-insulin; in magenta *Fo-Fc* 3σ level *N*Me omit electron density map, hydrogen bonds in dashed lines — distances in Å.

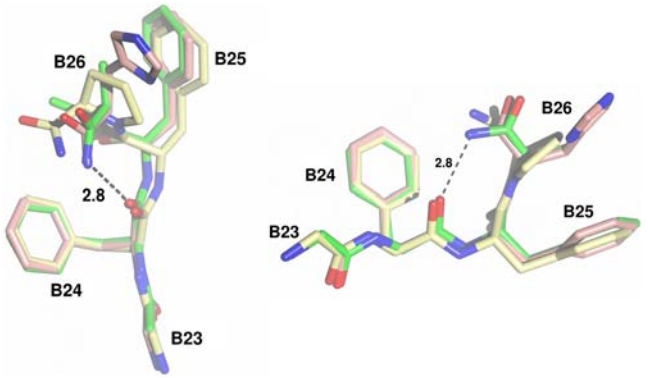


Fig. S5. Superpositions of B^{23}-B^{26} region of [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH$_2$ (C atoms in *Green*), [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ (C atoms in *Yellow*) and [*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH$_2$ (C atoms in *Coral*) (*Left–Upper* and *Right–Side Views*); the B^{24}CO-B^{26}NH$_2$ hydrogen bond in [*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH$_2$ — typical for the B26 turn — is depicted as dashed line with distance in Å.

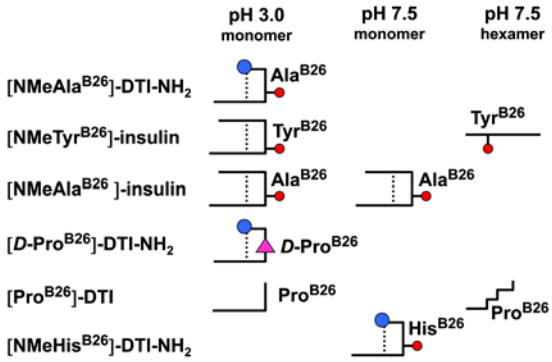


Fig. S6. Schematic representation of the nine structures reported here: (*U-Turn Line*): B26 turn, (*Step Line*): B^{20}-B^{26} disorder, (*Straight Line*): 'typical' B-chain β strand, (*Dashed Line*): B^{24}CO-B$^{26(or\ 27)}$ NH hydrogen bond, (*Red Dot*): *N*MeB^{26}, (*Blue Dot*): B^{26} CONH$_2$ (B-chain C-terminal carboxyamide), (*l*): B^{26} D-amino acid; top line indicates the pH at which crystals were obtained; schemes for hexamer forms represent conformation typical for a single molecule.

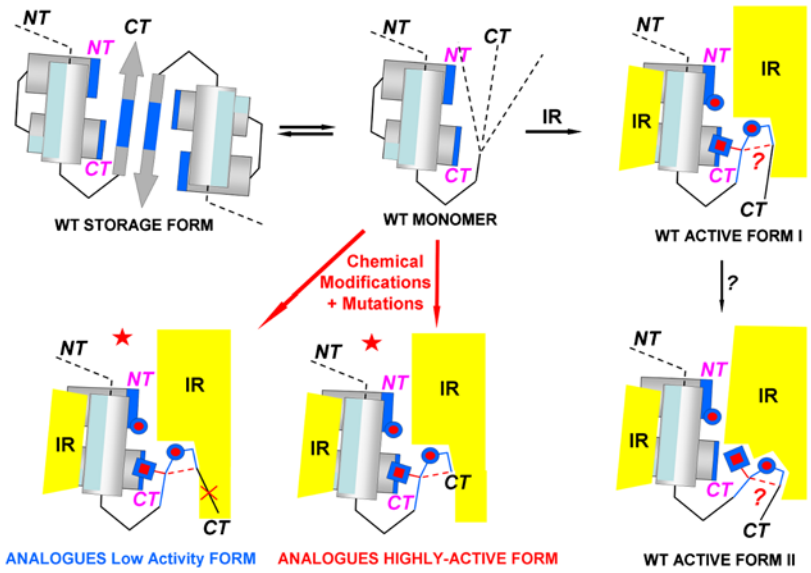


Fig. S7. Putative pathways of insulin activation based on the conformations of hormone analogues reported in this work. (*Upper Left*): insulin storage form (helices as cylinders, B-chain β-strands as arrows; residues crucial for IR binding in site 1 are in dark blue, in site 2 are in light blue; WT-wild type; *NT/CT–N/C*-termini of the B-chain (*Black*) and A-chain (*Magenta*); dashed line represents dynamic B-chain N terminus that may undergo T-R transition). (*Upper Center*): insulin monomer form with dynamic conformations of the C-terminal B-chain in dash lines. (*Upper Right* and *Lower Right*): alternative forms I and II of an active insulin in complex with IR (IR as *Yellow Rectangles*); A^2 and B^{25} main chain pivots (*Red Circles*), B^{24} side chain pivot (*Red Square*); B26 turn B^{24}–B^{27} hydrogen bond (*Red Dashed Line*); (*Red Question Marks*): represent ambiguity of the putative conformation of the B26 turn in the wild type activated insulin [e.g., further modification of the B26 turn (*Upper*) or a more prominent detachment of the B^{24}-B^{30} chain from the core of the hormone (*Lower*)]. Insulin forms based on the crystal structures presented in this work are marked by red stars; possible clash of the B^{27}-B^{30} chain in full length low activity analogues with IR is marked by red x.

Table S1. Summary of the crystallization and cryoprotection protocols

Insulin analogue,its oligomeric form, pH of the crystallization	Crystallisation conditions	Cryo-Protection
[*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2-monomer pH 3.0	0.32 M Na_2SO_4, 0.1 M Na Acetate pH 3.0	Quick scoop through crystallization solution containing 40% (v/v) glycerol
[*N*MeAla^{B26}]-insulin- monomer pH 3.0	0.18 M Li_2SO_4, 0.1 M Na Acetate pH 3.0	Quick transfer from 5% to 40% (v/v) (5% step) glycerol-containing crystallization solution
[*N*MeAla^{B26}]-insulin- monomer pH 7.5	0.75 dilutions in H_2O of 0.1 M Na Citrate, 0.3 M Tris-HCl pH 7.5, 0.6 mM Zn Acetate and 0.06 % (w/v) phenol	Quick transfer from 5% to 45% (v/v) (5% step) glycerol-containing crystallization solution
[*N*MeTyr^{B26}]-insulin- monomer pH 3.0	0.055 M Na_2SO_4 pH 3.0	Quick transfer from 5% to 45% (v/v) (5% step) glycerol-containing crystallization solution.
[*N*MeTyr^{B26}]-insulin- hexamer pH 8.2	6 % (w/v) Tris pH 8.2, 0.1 M Na Citrate, 0.02 % (w/v) Zn Acetate, 0.06 % (w/v) Phenol	Quick transfer from 5% to 30% (v/v) (5% step) glycerol-containing crystallization solution.
[*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2- monomer pH 8.2	0.1 M Na Citrate, 0.3 M Tris pH 8.2, 0.6 mM Zn Acetate and 0.06% (w/v) phenol	Direct flash-cooling in liquid nitrogen
[D-Pro^{B26}]DTI-NH_2 - monomer pH 3.0	0.015 M Cs_2SO_4, pH 3.0	Direct flash-cooling in liquid nitrogen
[Pro^{B26}]-DTI- monomer pH 3.0	0.055 M Na_2SO_4, pH 3.0	Quick transfer from 5% to 40% (v/v) (5% step) glycerol containing crystallization solution
[Pro^{B26}]-DTI- hexamer pH 7.5	0.8–0.85 dilutions in H_2O of 5 mM Zn Acetate , 35 mM Na Citrate 0.7% phenol, 0.7 M NaCl and 0.3 M Tris pH 7.5, 5% (v/v)	Paratone oil

Table S2. Data collection and refinement statistics

	[*N*MeAla^{B26}]-DTI-NH_2	[*N*MeAla^{B26}]-insulin pH 3.0	[*N*MeAla^{B26}]-insulin pH 7.5	[NMeTyr^{B26}]-insulin monomer
PDB code	2wrf	2wrx	2ws0	2ws1
Data collection				
Beamline	ESRF, ID23-1	ESRF, ID14-1	Diamond, I02	ESRF, ID29
Wavelength (Å)	1.071	1.0723	0.9745	0.9762
Space group	$I4_122$	$P4_12_12$	$I4_122$	$I4_122$
Cell dimensions				
a, *b*, *c* (Å)	38.7 38.7 123.1	39.2 39.2 124.9	39.4 39.4 124.7	38.2 38.2 124.0
α, β, γ (°)	90.0 90.0 90.0	90.0 90.0 90.0	90.0 90.0 90.0	90.0 90.0 90.0
Resolution (Å)	50–1.57(1.63–1.57)	30.0–1.50(1.55–1.50)	27.0–2.1(2.14–2.0)	30.0–1.5(1.53–1.50)
R_{sym}	0.057(0.162)	0.063(0.469)	0.063(0.327)	0.051(0.424)
$<I/\sigma(I)>$	23.0(11.0)	9.2(5.5)	16.7(10.0)	19.2(9.5)
Completeness (%)	95.0(61.6)	94.6(60.5)	99.5(100.0)	95.1(52.2)
Redundancy	10.6(2.0)	13.4(1.5)	12.2(8.0)	9.1(5.5)
Refinement				
Resolution (Å)	37.0–1.57	37.4–1.50	25.0–2.1	30–1.6
Number reflections	6339	14801	2931	6145
R_{work}/R_{free}	0.179/0.255	0.180/0.250	0.242/0.337	0.184/0.247
Number atoms	438	862	401	445
Protein	376	760	375	404
Ligand/ion	8	1	-	-
Water	61	101	26	41
B-factors				
Protein	21.1	35.2	14.9	21.5
Ligand/ion	34.7	35.4	-	-
Water	18.8	30.2	12.9	28.3
rms deviations				
Bond lengths (Å)	0.022	0.023	0.20	0.022
Bond angles (°)	1.744	1.980	1.837	1.707
Ramachandran statistics (%)				
Preferred/allowed	97.2/2.8	94.0/4.8	90.9/9.1	100.0/0

Values in parentheses are for highest-resolution shell.

Table S3.

	[*N*MeTyr^{B26}]-insulin hexamer	[*D*-Pro^{B26}]-DTI-NH_2	[*N*MeHis^{B26}]-DTI-NH_2
PDB Code	2ws6	2wrw	2wrv
Data collection			
Beamline	ESRF, ID14-1	ESRF, ID14-2	ESRF, ID14-2
Wavelength (Å)	0.9340	0.9330	0.9330
Space group	$P2_1$	$I4_122$	$I4_122$
Cell dimensions			
a, *b*, *c* (Å)	58.7 61.9 47.3	39.4 39.4 123.9	39.2 39.2 123.6
α, β, γ (°)	90.0 111.9 90.0	90.0 90.0 90.0	90.0 90.0 90.0
Resolution (Å)	40.0–1.50(1.55–1.50)	50.0–2.41(2.45–2.41)	27.0–2.15(2.19–2.15)
R_{sym}	0.048(0.479)	0.055(0.217)	0.067(0.269)
$<I/\sigma(I)>$	11.7(5.0)	14.6(9.2)	14.5(6.8)
Completeness (%)	99.8(99.9)	98.5(98.1)	97.8(97.4)
Redundancy	3.9(3.0)	6.0(5.0)	7.2(7.0)
Refinement			
Resolution (Å)	40.0 - 1.50	25–2.41	37.34–2.15
Number reflections	47779	1977	2686
R_{work}/R_{free}	0.150/0.199	0.236/0.300	0.199/0.277
Number atoms	2775	385	413
Protein	2523	259	367
Ligand/ion	6	—	1
Water	246	26	45
B-factors			
Protein	22.3	23.8	20.6
Ligand/ion	31.9	—	30.0
Water	30.2	22.5	21.1
rms deviations			
Bond lengths (Å)	0.025	0.017	0.021
Bond angles (°)	2.173	1.632	1.677
Ramachandran (%)			
Preferred/allowed	98.6/1.4	95.24/4.76	90.48/9.52

Table S4.

	[Pro^{B26}]-DTI monomer	[Pro^{B26}]-DTI hexamer
Data collection	2ws4	2ws7
Beamline	ESRF, ID14-4	ESRF, ID23-2
Wavelength (Å)	0.976	0.8726
Space group	*I*422	$P2_12_12$
Cell dimensions		
a, *b*, *c* (Å)	57.8 57.8 54.8	62.5 66.5 57.3
α, β, γ (°)	90.0 90.0 90.0	90.0 90.0 90.0
Resolution (Å)	27.0–1.75(1.78–1.75)	50.0–2.60(2.64–2.60)
R_{sym}	0.092(0.704)	0.064(0.148)
$<I/\sigma(I)>$	8.5(3.5)	14.7(10.5)
Completeness (%)	97.5(80.1)	96.6(78.1)
Redundancy	7.8(5.5)	3.3(2.5)
Refinement		
Resolution (Å)	20.0–1.90	50.0–2.60
Number reflections	3704	7224
R_{work}/R_{free}	0.222/0.278	0.209/0.332
Number atoms	390	2049
Protein	366	2002
Ligand/ion	—	45
Water	24	42
B-factors		
Protein	30.75	27.8
Ligand/ion	—	20.3
Water	26.4	17.0
rms deviations		
Bond lengths (Å)	0.024	0.013
Bond angles (°)	2.272	1.475
Ramachandran (%)		
Preferred/allowed/outliers	92.3/5.1/2.5	94.3/4.0/1.7

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2011/08/30/M111.265249.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 42, pp. 36968–36977, October 21, 2011
© 2011 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Non-equivalent Role of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds in the Insulin Dimer Interface*[S]

Received for publication, May 26, 2011, and in revised form, August 3, 2011 Published, JBC Papers in Press, August 31, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.265249

Emília Antolíková[‡], Lenka Žáková[‡], Johan P. Turkenburg[§], Christopher J. Watson[§], Ivona Hančlová[‡], Miloslav Šanda[‡], Alan Cooper[¶], Tomáš Kraus[‡], A. Marek Brzozowski[§1], and Jiří Jiráček[‡2]

From the [‡]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic, the [§]York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, The University of York, Heslington, York YO10 5YW, United Kingdom, and the [¶]School of Chemistry, Glasgow University, College of Science and Engineering, Glasgow G12 8QQ, Scotland, United Kingdom

Apart from its role in insulin receptor (IR) activation, the C terminus of the B-chain of insulin is also responsible for the formation of insulin dimers. The dimerization of insulin plays an important role in the endogenous delivery of the hormone and in the administration of insulin to patients. Here, we investigated insulin analogues with selective *N*-methylations of peptide bond amides at positions B24, B25, or B26 to delineate their structural and functional contribution to the dimer interface. All *N*-methylated analogues showed impaired binding affinities to IR, which suggests a direct IR-interacting role for the respective amide hydrogens. The dimerization capabilities of analogues were investigated by isothermal microcalorimetry. Selective *N*-methylations of B24, B25, or B26 amides resulted in reduced dimerization abilities compared with native insulin (K_d = 8.8 μM). Interestingly, although the *N*-methylation in [*N*MeTyrB26]-insulin or [*N*MePheB24]-insulin resulted in K_d values of 142 and 587 μM, respectively, the [*N*MePheB25]-insulin did not form dimers even at high concentrations. This effect may be attributed to the loss of intramolecular hydrogen bonding between NHB25 and COA19, which connects the B-chain β-strand to the core of the molecule. The release of the B-chain β-strand from this hydrogen bond lock may result in its higher mobility, thereby shifting solution equilibrium toward the monomeric state of the hormone. The study was complemented by analyses of two novel analogue crystal structures. All examined analogues crystallized only in the most stable R_6 form of insulin oligomers (even if the dimer interface was totally disrupted), confirming the role of R_6-specific intra/intermolecular interactions for hexamer stability.

Insulin is an important polypeptide hormone that controls a wide range of cellular processes such as the regulation of blood glucose uptake and has a large impact on protein and lipid metabolism. However, despite decades of intensive research, many questions about the structure of insulin and its mechanism of action remain. The solid state-based structural insight into the insulin molecule is limited to inactive dimeric or hexameric storage forms (1–3), whereas the insulin monomer represents the active form of the hormone when binding to the insulin receptor (IR).[3] It is also widely accepted that insulin undergoes a profound structural change during this process (4–6), a hypothesis supported by a plethora of highly dynamic hormone conformers identified by NMR studies (7–13). Attempts to determine the structure of the insulin-IR complex have been unsuccessful so far. However, the regions of the insulin molecule responsible for the interaction with the IR (3, 14) or for its dimerization and hexamerization (15, 16) have been functionally and structurally identified in a number of insulin analogues.

The insulin molecule consists of two peptide chains, a 21-amino acid A-chain and a 30-amino acid B-chain, interconnected by two interchain and one intrachain disulfide bridges. The C terminus of the B-chain of insulin, particularly residues B24–B26, plays a substantial role in the initial contact with the receptor. It is believed that the C terminus of the B-chain of insulin must be detached away from the central B-chain α-helix of insulin (2, 6). One of the main signatures of this so-called "active form" of insulin should be the exposure of the previously hidden amino acids Gly-A1, Ile-A2, and Val-A3, which are important for the interaction with IR (3). Recently, we described crystal structures of several shortened and full-length insulin analogues with modifications at the B26 position (17). The structural convergence of some of these highly active analogues (200–400%) enabled us to postulate that the active form of human insulin is characterized by a formation of a new type II β-turn at positions B24–B26.

Besides its role in IR activation and IR negative cooperativity (18, 19), the C terminus of the B-chain is also responsible for the formation and stabilization of the insulin dimers that are the building blocks of storage hexamers. In addition, the dimeriza-

* This work was supported by Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic Grant LC060777 (Research Centre for Chemical Genetics, to J. J.), Research Project of the Academy of Sciences of the Czech Republic Grant Z40550506 (to J. J.). This work was also supported by the Diamond Light Source (Didcot, United Kingdom) and European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France).

The atomic coordinates and structure factors (codes 3ZQR and 3ZS2) have been deposited in the Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (http://www.rcsb.org/).

[S] The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Tables S1 and S2 and Fig. S1.

[1] To whom correspondence may be addressed. Tel.: 441904 328265; Fax: 441904-328366; E-mail: marek@ysbl.york.ac.uk.

[2] To whom correspondence may be addressed: Tel.: 420220183441; Fax: 420220183571; E-mail: jiracek@uochb.cas.cz.

[3] The abbreviations used are: IR, insulin receptor; DOI, des(B23–B30)-octapeptide insulin; DTI; des(B27–B30)tetrapeptide insulin; Fmoc, fluorenylmethoxycarbonyl; ITC, isothermal titration microcalorimetry.

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

tion of insulin plays an important role in the endogenous delivery of the hormone from the pancreas to the circulatory system and in the administration of insulin to diabetic patients (3, 20–22). The structures of insulin dimers and hexamers have been determined from several crystal structures (*e.g.* Refs. 15, 23, 24). They revealed that the key interactions between insulin molecules I and II of the dimer are complementary and involve reciprocal hydrogen bonds between the carbonyl oxygen of Tyr-B26 (Phe-B24) of one molecule and the amide hydrogen of Phe-B24 (Tyr-B26) of the complementary second molecule of the dimer. Hence, antiparallel β-strands of the C termini of B-chains are connected by four hydrogen bonds. It has also been found that the amide hydrogen of Phe-B25 of molecule II forms an intramolecular hydrogen bond with the carbonyl of Tyr-A19. The side chains of Phe-B24, Tyr-B26, Tyr-B16, and Pro-B28 reinforce further the stabilization of the dimer by a network of Van der Waals contacts (15).

Our previous studies on the structural and functional relevance of the B26 (17, 25, 26) and B25 (27) positions of insulin focused on modulation of hormone conformation by the incorporation of an *N*-methyl group on the amide nitrogen of the peptide bond in shortened and full-length insulin analogues. Subsequently, we investigated the selective application of this *N*-methylation within the B24–B26 region of insulin by the systematic elimination of the inter/intramolecular hydrogen bonds, which are important for the stability and folding of the insulin monomer, dimer formation, and interaction with IR. Therefore, the approach reported here represents an application of a very specific, chemically controlled molecular tool for the functional assessment of the hydrogen bond network related to the dimer interface.

Here, we present the synthesis and characterization of several novel full-length insulin analogues with the selective *N*-methylation of the peptide bond at position B24, B25, or B26 to delineate the role of each of these particular peptide units in insulin dimer/hexamer assembly. In this process, we correlate the binding affinities of the analogues to IR (determined in rat adipose membranes) using isothermal titration microcalorimetry (ITC) dilution experiments, performed to assess the thermodynamic contributions toward hormone dissociation. The wild-type insulin (capable of dimer formation) and des(B23-B30)octapeptide insulin (DOI, not able to dimerize (28, 29)) were used as references for the dimeric and monomeric forms, respectively. This study is also complemented by the analysis of two novel crystal structures and two previously published analogue crystal structures that have not been hitherto discussed in the context presented here. This approach allowed us to shed light on the contributions of individual peptide bond amides to the dimerization and binding affinity of insulin.

MATERIALS AND METHODS

Materials—2-Chlorotrityl chloride resin, protected amino acids, and reagents for solid phase synthesis of peptides were purchased from Novabiochem Merck (Laufelfingen, Switzerland). Fmoc-Lys(phenylacetyl)-OH was prepared as described previously (30). Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone-treated trypsin was purchased from Sigma, and penicillin G acylase was from Fluka. Human [^{125}I]monoiodotyrosylA14-insulin was purchased from PerkinElmer Life Sciences. Human and porcine insulins were purchased from Sigma. All other chemicals and solvents were obtained from Sigma-Aldrich.

Peptide Synthesis and Enzymatic Semisynthesis—The syntheses of peptides and the semisyntheses of analogues were performed according to Zakova *et al.* (30). The identity of peptides and analogues was confirmed with a Fourier transform mass spectrometer LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher).

Receptor Binding Studies—Receptor binding studies with plasma membranes prepared from epididymal adipose tissue of adult male Wistar rats were performed according to Zakova *et al.* (26).

Isothermal Titration Microcalorimetry—Human and porcine insulin (Sigma) were used without further purification. DOI was prepared in our laboratory from porcine insulin by tryptic cleavage (31). Purification was performed using reverse-phase HPLC, and identification was confirmed with electrospray ionization mass spectrometry. The analogues were prepared as described above.

Peptide solutions (~1 mM) were prepared in 0.1 M glycine/HCl buffer, pH 2.5 (total volume of 1 ml). Peptide solutions were dialyzed in dialysis cassettes (Slide-A-Lyzer cut-off, molecular weight 3,500, Pierce) against 600 ml of the buffer at 4 °C. The buffer was changed three times (after 3, 20, and 26 h). Following dialysis, the concentrations of peptides were determined from UV absorbance at 280 nm (insulin, ϵ = 5,840 M^{-1} cm^{-1}; DOI, ϵ = 4,560 M^{-1} cm^{-1}). Concentrations were confirmed by amino acid analysis (± 10%). The final dialysis buffer and peptide solutions were briefly degassed prior to ITC dilution titration.

Calorimetric experiments were performed using a VP-ITC® apparatus (MicroCal, Inc.) operated in dilution/dissociation mode, with the reaction vessel (1.417 ml) held at 25 °C. The instrument was temperature-equilibrated prior to the start of injection. The sample contents were stirred at a speed of 307 rpm over the duration of the titration. A typical experiment comprised of 20 injections of 12.5 μl (first injection of 2 μl) of insulin solution into the reaction vessel, initially loaded with dialysis buffer. The duration of each injection was 25 s, with a time interval between injections of 300 s.

Integrated heat pulse data were corrected for small injection/mixing effects from controls that were performed separately and analyzed under identical conditions by omitting the first injection and using MicroCal LLC Origin software (version 7). The software employed an updated and corrected (June 2008) version of the dissociation analysis procedure and was validated by comparison with earlier analysis methods (32, 33). For human insulin, the experimental values (± S.E.) were determined from eight parallel experiments. For porcine insulin, DOI, and insulin analogues, the experimental values (± range) were determined from two parallel experiments. The initial concentrations in the injection syringe ranged from 0.208 to 1.220 mM (supplemental Table S1).

X-ray Studies—Crystallization of the analogues ([*N*MePheB24]-insulin, [*N*MePheB25]-insulin, and [TyrB25,*N*MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin) were performed with the in-house insulin crystallization screens covering most of the reported crystal growth parameters of insulin. Crystallization

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

TABLE 1
Values of IC_{50} and relative receptor binding affinities of human insulin and insulin analogues

Peptide	IC_{50} ± S.E.[a]	Potency[b]
	nM (n)	*%*
Human insulin	0.89 ± 0.06 (3)	100[c]
[*N*MePheB24]-insulin	30.1 ± 2.2 (3)	2.96[c]
[*N*MePheB25]-insulin	515 ± 32 (3)	0.17[c]
[*N*MeTyrB26]-insulin	4.30 ± 0.46 (3)	20.7[d]
[PheB26]-insulin	1.94 ± 0.31 (3)	45.9[c]
[*N*MePheB26]-insulin	21.3 ± 2.7 (3)	4.17[c]
[*N*MePheB25,*N*MePheB26]-insulin	201 ± 39 (3)	0.44[c]

[a] IC_{50} values represent concentrations of insulin or the analogue that cause half-maximal inhibition of binding of human [^{125}I]monoiodotyrosylA14-insulin to IR. Each value represents the mean ± S.E. of multiple determinations (*n*).
[b] Relative receptor binding affinity is defined as (IC_{50} of human insulin/IC_{50} of analogue) × 100.
[c] This study.
[d] From Ref. 17.

conditions, data collection, and refinement and model statistics are given in supplemental Table S2. X-ray data were processed by HKL2000 (34), and model building and refinement were performed by the CCP4 suite of programs (35) and COOT (36). Crystal structures were solved by Molrep (37) with B1–B6 and B23–B30-truncated insulin hexamer or monomer as a model (Protein Data Bank code 1MSO) (24) and refined by Refmac5.6 (38). All figures were made by CCP4mg (35). For structural comparisons of the dimer interfaces, the best defined (*i.e.* with the best electron density for typically very mobile Phe-B25 side chain and B28–B30 amino acids) dimers (referred here as chains AB and CD) from the relevant structures were superimposed on the B9–B19 and D9–D19 Cα atoms by the LSQKAB program from the CCP4 suite. Both reported crystal structures contain one full hexamer in the asymmetric unit. As the nature of changes along the dimer interface observed here was virtually identical within each of the three dimers related by hexamer symmetry, only one dimer was selected for comparisons as a fully representative structural entity.

RESULTS

Binding Affinities—Insulin analogues were prepared by trypsin-catalyzed semisynthesis, and their binding affinities to the insulin receptor in membranes from rat adipose tissue were determined (Table 1 and Fig. 1). Four of these analogues are novel molecules, with [PheB26]-insulin having been already reported by Gauguin *et al.* (39). The crystal structure and binding affinity of [*N*MeTyrB26]-insulin was recently reported by us elsewhere (17). The first three analogues differ in the position of *N*-methylation of the peptide bond amide at the B24, B25, or B26 positions of human insulin. Additionally, two insulin analogues were also produced in which Tyr at the B26 position was replaced with either Phe or *N*-MePhe. The last analogue contains two mutations, *i.e.* *N*-MePhe residue in both B25 and B26 positions.

All analogues showed diminished binding affinity compared with human insulin. The most drastic reduction in binding was observed in the case of analogues *N*-methylated at the B25 position (<1%). The *N*-methylation of the B24 amide also had a highly negative effect on the binding affinity of the respective analogue (3%). In contrast, the B26 position was much more tolerant to the modifications, with [PheB26]-insulin displaying

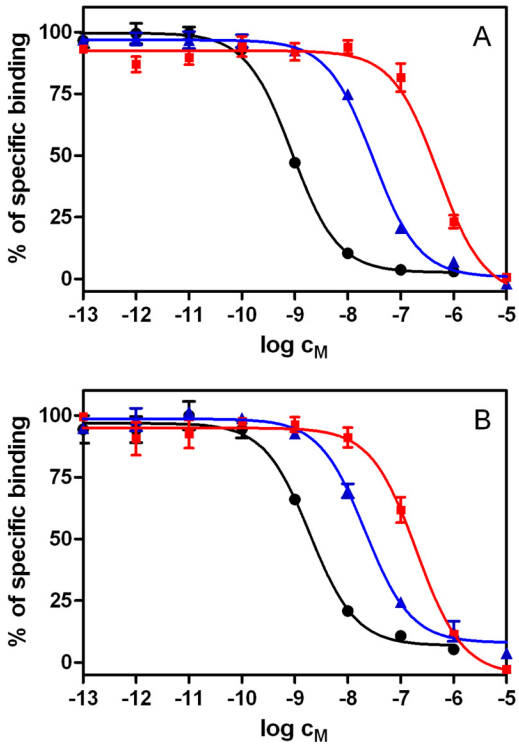


FIGURE 1. **Inhibition of binding of human [^{125}I]-insulin to adipose plasma membranes by insulin and insulin analogues.** *A*, human insulin (*black circles*), [*N*MePheB24]-insulin (*blue triangles*), and [*N*MePheB25]-insulin (*red squares*). *B*, [PheB26]-insulin (*black circles*), [*N*MePheB26]-insulin (*blue triangles*), and [*N*MePheB25,*N*MePheB26]-insulin (*red squares*). Quantitative information is provided in Table 1. See "Materials and Methods" for details.

only moderate reduction of the affinity (45.9%) (very similar to its binding affinity (47.6%), determined using an IM-9 cells binding assay (39)). *N*-Methylation of Tyr-B26 reduces the binding affinity of the analogue to 20.7%, and the combination of both *N*-methylation and the substitution of Phe for Tyr at B26 results in a very weak binding of this insulin analogue (4.2%).

ITC Measurements—The key part of our study was devoted to the investigation of the dimerization ability of insulin analogues by ITC dilution measurements that detect heat energy changes upon the dissociation of insulin dimers. The dimerization properties of the analogues were set against human/porcine insulin and DOI as benchmarks of regular and non-dimerization hormone behavior. The results of titration experiments are summarized in Table 2, and the complete data from all titration experiments used for the calculation of kinetic and thermodynamic parameters are shown in supplemental Table S1. The dilution experiments with human or porcine insulin yielded sequences of endothermic heat pulses characteristic of molecular dissociation as described previously (32). As the insulin concentration in the calorimeter cell increased with successive injections, dissociation decreased, and the magnitude of the heat uptake diminished accordingly, giving heat typical of dilution curves for human insulin, as shown in Fig. 2*A*. The example of the dilution process giving no heat effect is shown in Fig. 2*B* (dilution curve of [*N*MePheB25]-insulin). Dilution curves for porcine insulin, DOI, [*N*MePheB24]-insulin, [*N*MeTyrB26]-insulin, and [*N*MePheB26]-insulin are

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

TABLE 2

ITC analyses of dimerization capabilities of insulin and insulin analogues

The experimental data were analyzed without first injection using LLC ITC Origin 7 software. The experimental values for human insulin are means of eight parallel experiments ± S.E. (n = 8). The experimental values for porcine insulin, DOI, and insulin analogues were determined from two parallel experiments and are provided as means ± range (n = 2) with the exception of DOI and [*N*MePheB25]-insulin, where no heat effect was observed. The ITC experiments were performed at injection syringe concentrations of insulins ranging from 0.213 mM to 1.22 mM. The complete ITC data are shown in supplemental Table S1.

Insulin	K_d	ΔH^o_d	ΔG^o_d	ΔS^o_d
	μM	kJ/mol	kJ/mol	J/K·mol
Porcine insulin (n = 2)	9.03 ± 0.50	41.96 ± 0.45	28.78 ± 0.14	44.22 ± 1.06
Human insulin (n = 8)	8.81 ± 1.05	56.93 ± 2.56	28.95 ± 0.28	93.90 ± 8.15
DOI (n = 2)	No heat effect			
[*N*MePheB24]-insulin (n = 2)	587 ± 99	10.82 ± 0.46	18.47 ± 0.42	−25.68 ± 2.97
[*N*MePheB25]-insulin (n = 2)	No heat effect			
[*N*MeTyrB26]-insulin (n = 2)	142 ± 30	70.85 ± 15.50	22.02 ± 0.53	163.86 ± 53.75
[*N*MePheB26]-insulin (n = 2)	1240 ± 10	37.84 ± 8.34	16.58 ± 0.02	71.34 ± 28.07

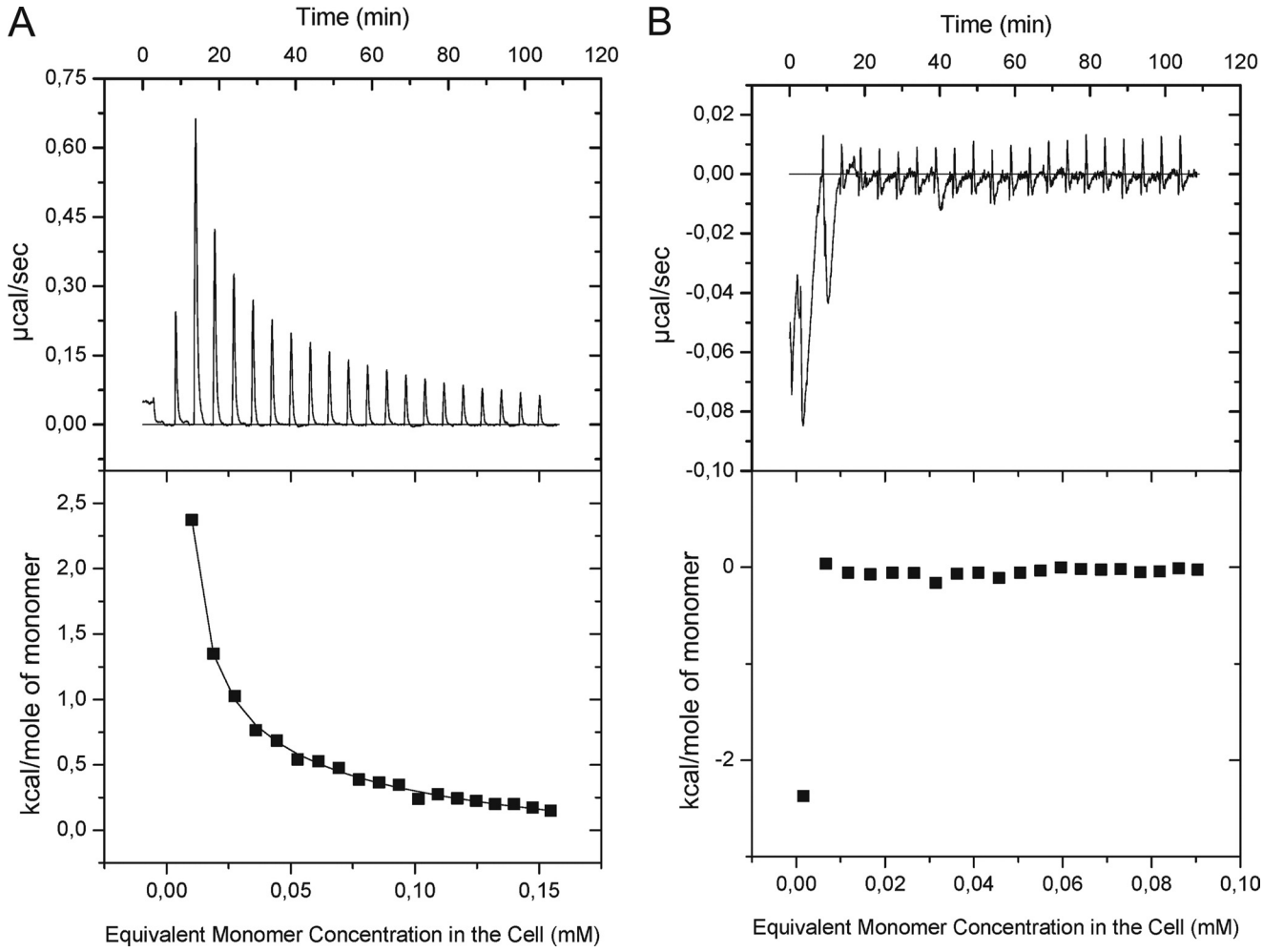


FIGURE 2. **Representative dilution ITC curves for human insulin (*A*) and [*N*MePheB25]-insulin (*B*).**

shown in supplemental Fig. S2. The curves can be fit in terms of a monomer-dimer equilibrium model ($Ins_2 \leftrightarrow 2Ins$; ΔH^o_d; $K_d = [Ins_{tot}]^2/[Ins_2]$, where $[Ins_{tot}]$ represents the total free insulin monomer concentration) yielding the apparent equilibrium constant of insulin dissociation K_d and enthalpy of dissociation ΔH^o_d (per mol of dimer). The values of the thermodynamic parameters ΔG^o_d and ΔS^o_d were calculated from standard expressions: $\Delta G^o_d = -RT\ln K_d$ and $\Delta G^o_d = \Delta H^o_d - T\Delta S^o_d$, respectively.

The titration experiments with human insulin resulted in an apparent dissociation constant K_d of ~8.8 μM. This value is in a very close agreement with K_d of ~9 μM, which we determined for porcine insulin (Table 2) and with the previous determinations of the K_d under similar conditions (32). Human and porcine insulin represent molecules with native and full dimerization potency. In contrast, the dilutions of DOI did not yield any heat effect, indicating that this (B23–B30)-truncated insulin analogue does not form dimers within the range of concentrations tested here.

All investigated analogues showed considerably reduced dimerization capabilities. The *N*-methylation of the B26 position resulted in an analogue ([*N*MeTyrB26]-insulin) with K_d of

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

~142 μM, which was >15-fold higher than the K_d of native insulin. Moreover, the combination of *N*-methylation and substitution of Phe for Tyr at the B26 position ([*N*MePheB26]-insulin) suppresses the dimerization capacity even further to a K_d of ~1.24 mM. The *N*-methylation of B24 amide nitrogen yielded the analogue ([*N*MePheB24]-insulin) with a low dimerization capability (K_d of ~587 μM, which is 65-fold higher than the K_d of native insulin). However, the most drastic effect of the *N*-methylation on insulin dimerization was observed in the case of the modification at the B25 position. The [*N*MePheB25]-insulin analogue, similarly to DOI, gave no heat effect and behaved solely as a monomer, even at millimolar concentrations (Fig. 2*B*).

Structural Characterization of Analogues—The analogues [*N*MePheB24]-insulin and [*N*MePheB25]-insulin were subjected to intensive crystallization screening under a plethora of monomeric, dimeric, and hexameric conditions. Only R_6 hexameric crystals of [*N*MePheB25]-insulin were obtained. The monomeric and hexameric (R_6) crystals of [*N*MeTyrB26]-insulin and hexameric (R_6) of [TyrB25,*N*MePheB26]-insulin, also discussed in this work, were already reported by us (Refs. 17 and 27, respectively). However, their oligomeric organization was not described there in detail, as these studies were focused on the monomeric form of the hormone. In addition, the [TyrB25,*N*MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin analogue, not investigated here by the ITC due to its Lys ↔ Pro sequence swap and, thus, likely monomeric properties, was also crystallized in the hexameric (R_6) form; we reported the synthesis and binding affinity (4%) of this analogue elsewhere (30).

Crystal Structure of [NMePheB25]-Insulin—This analogue yielded crystals only under hexameric conditions in the presence of Zn^{2+} and phenol (see supplemental Table S2). The analogue oligomer adopted a typical R_6 conformation with six phenol ligands at the so-called type I site (located at the dimer interface, with hydrogen bonds to COA6 and NHA11, loose van der Waals contacts (~3.7 Å) with imidazole of His-B5 (40)) and two Zn^{2+} cations and two Cl^- anions as their axial ligands. The overall structure of this hexamer followed general fold and most of the structural details of a typical R_6 hexamer such as that of the insulin structure of Protein Data Bank code 1ZNJ.

In the [*N*MePheB25]-insulin R_6 hexamer, the *N*-methylation of the NHB25 did not result in significant disruption of the dimer interface hydrogen bonds motifs (Fig. 3*A*). All four symmetrical B24–B26 hydrogen bonds were preserved there despite a small weakening of the B24CO-NHD26 interaction by ~0.2 Å. The conservation of these interactions is likely due to an "outward" orientation of the *N*MeB25 groups, which point out away from the dimer interface (Fig. 3*A*) and are thus easily accommodated in the vicinity of the A19–A21 region. However, the introduction of two *N*MeB25 groups resulted in much greater mobility of the Phe-B25 side chains; only one B25 phenyl moiety (with poor definition in the electron density maps) could be located. Both C-terminal threonines B30 are not visible in the structure.

Crystal Structure of [NMeTyrB26]-Insulin Hexamer—Although we already reported this structure elsewhere (17), the nature of the dimer interface and its R_6 hexamer structure was not discussed in that report. Remarkably, it can be crystallized

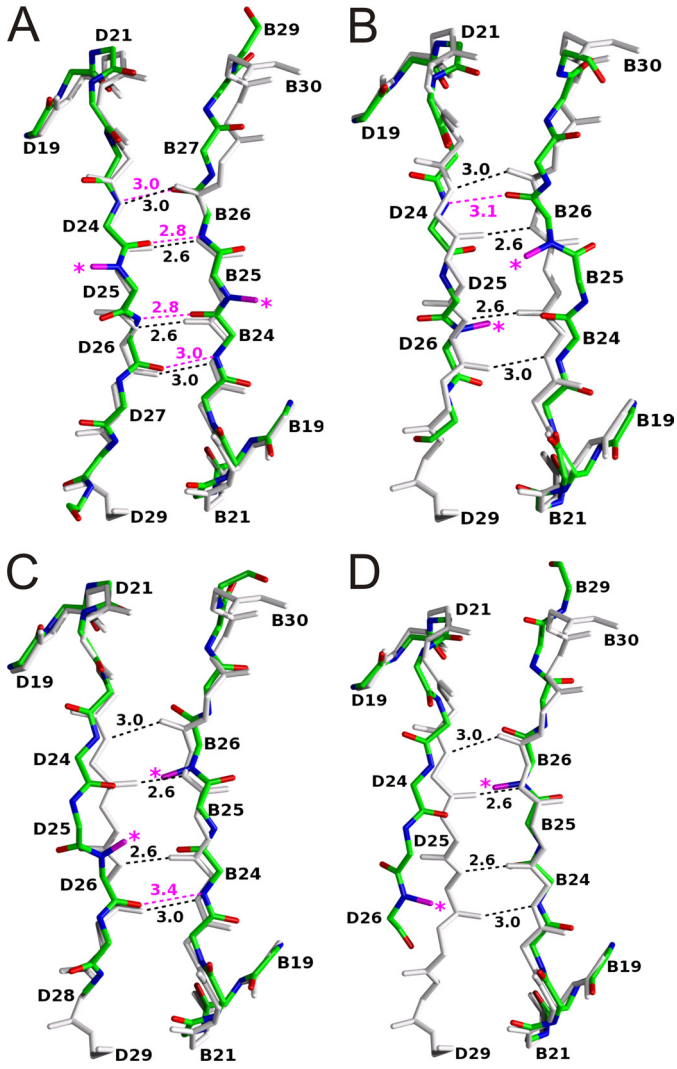


FIGURE 3. **Main chain representation of the dimer (chains AB in molecule I and chains CD in molecule II) interface in [*N*MePheB25]-insulin (Protein Data Bank code 3ZQR) (*A*), [*N*MeTyrB26]-insulin (Protein Data Bank code 2WS6) (*B*), [TyrB25,*N*MePheB26]-insulin (Protein Data Bank code 1W8P) (*C*), and [TyrB25,*N*MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin (Protein Data Bank code 3ZS2) (*D*) analogues.** The reference wild-type insulin (Protein Data Bank code 1ZNJ) is in white with its dimer hydrogen bonds as *black dashed lines*; hydrogen bonds of the analogues are colored *magenta*. The methyl groups at *N*-methylated atoms are indicted by *magenta asterisks*; hydrogen bond distances are in Å.

both as a monomer and R_6 hexamer under appropriate conditions. The hexamer crystallization protocol, similar to conditions for [*N*MePheB25]-insulin (see supplemental Table S2), yielded crystals of the R_6 oligomer very similar to that of [*N*MePheB25]-insulin. However, the methylation of NHB26 resulted in a much more disturbed dimer interface than in the [*N*MePheB25]-insulin structure. As both B26 *N*-methyl groups pointed into the dimer interface, its quartet of the hydrogen bonds was almost lost; only one of them, COB26-NHD24, remained in place (Fig. 3*B*). The disturbance created by *N*-MeB26 groups had a non-symmetrical character. Only one β-strand of the two-strand dimer β-sheet bulged out between B24–B26 to accommodate the more bulky substitutions of the NHB26 hydrogen atoms; the other D21–D27 β-strand followed the typical fold of the wild-type insulin. However, it still exerted

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

some signs of induced structural stress, reflected in its higher mobility, with B28–B30 residues being fully disordered. Interestingly, the β-strand bulge in the B-chain brought the B25NH peptide unit closer to the COA19 group, resulting in the unusual, for the R_6 hexamer, B25NH-COA19 hydrogen (2.9 Å) bond.

Crystal Structure of [TyrB25,NMePheB26]-Insulin—The structure of our already reported (27) analogue with NHB26 *N*-methylation and the Tyr ↔ Phe B25–B26 swap was also analyzed here in more detail. The main focus of the previous discussion of this structure was the impact of the IGF-like swap of B25–B26 side chains, combined with simultaneous modification of the main chain, on insulin and IGF-I structure-function relationships. Here, we tried to extract the relevant structural features in the context of the dimer interface. [TyrB25, *N*MePheB26]-insulin formed an R_6 hexamer that is quite similar to [*N*MeTyrB26]-insulin and [*N*MePheB25]-insulin oligomers. Although the bulging of the B24–B26 chain was "symmetrical" to that observed in the [*N*MeTyrB26]-insulin (Fig. 3*C*), its nature and structural meaning was practically identical to the [*N*MeTyrB26]-insulin change, considering the 32 symmetry of the hexamer and the relativity of its chain nomenclature.

Crystal Structure of [TyrB25,NMePheB26,LysB28,ProB29]-Insulin—The crystal structure of [TyrB25,*N*MePheB26,LysB28, ProB29]-insulin was obtained under hexameric conditions (supplemental Table S2) in the pursuit of a very extensive characterization of the dimer interface hydrogen bond network of the B25–B26 side chains for the stability of this region. The R_6 hexamer was also very similar to all other R_6 oligomers described here. However, the B28–B29 Lys ↔ Pro and B25–B26 Tyr ↔ Phe swaps, combined with *N*-MeB26, fully disrupted the dimer interface, with none of its hydrogen bonds being preserved (Fig. 3*D*). Hence, the remarkable stability of these R_1R_1 dimers depended entirely on the phenol-induced and R-form specific inter- and intramolecular interactions (see "Discussion"). The disruption of the dimer interface was also very asymmetrical, in a fashion similar to that observed in [*N*MeTyrB26]-insulin; one β-strand followed the wild-type conformation, whereas its counterpart systematically departed from the dimer interface from D23 to become fully disordered from D27 onwards.

DISCUSSION

Impact of Modifications on Binding Affinity of Analogues—Analogues *N*-methylated at the B24 position ([*N*MePheB24]-insulin, 3%) or B25 ([*N*MePheB25]-insulin, 0.17%) showed drastically reduced binding potency. To our knowledge, [*N*MePheB24]-insulin represents the first insulin analogue with a backbone modification at the B23–B24 peptide bond.

The low binding activity of [*N*MePheB25]-insulin is in agreement with findings of Wollmer *et al.* (41) for an almost inactive (3–4%) insulin analogue ([depsi(B24–B25)]-insulin) in which the B24–B25 CO-NH peptide bond was replaced by a CO-O ester bond. It seems that the very low binding affinity of [*N*MePheB24]-insulin and [*N*MePheB25]-insulin results from the lack of the respective peptide bond amides that may be crucial for the direct interaction of insulin with IR. These observations are also supported by findings of Nakagawa *et al.* (42) concerning inactive insulin analogues in which peptide bonds at the B24–B25 or B25–B26 positions were replaced by reduced CH_2-NH groups. They attributed the extremely low activity of their analogues to the loss of respective carbonyl oxygens involved in H-bonding with IR. Another possible reason for the low binding affinity of [*N*MePheB24]-insulin and [*N*MePheB25]-insulin, *N*-methylation-induced conformational changes in the structures of their B24–B30 strands, will be discussed below.

Interestingly, the [*N*MeTyrB26]-insulin (17) also displayed lower binding potency toward IR (21%, Table 1) than human insulin, but significantly less reduced than that of analogues *N*-methylated at the B24 and B25 positions (3 and 0.17%, respectively). This may indicate that the NH of B26 is less important for IR binding than its counterparts at the B24 and B25 positions and/or has a different function. Our recent study (17) demonstrated that *N*-methylation of Tyr-B26 induces a new type II of β-turn at positions B24–B26 (B26 turn), which results in the departure of B-chain B22–B30 β-strand from its typical hexamer/dimer conformation. The B26 turn is stabilized by a typical $i+3$ β-turn hydrogen bond between CO of Phe-B24 and NH of Thr-B27. These large conformational changes unmask previously buried amino acids Gly-A1, Ile-A2, and Val-A3, which are implicated in IR binding. We proposed (17) that similar conformational changes may occur in the native insulin molecule upon binding to IR. Hence, it is possible that the reduced binding affinity of [*N*MeTyrB26]-insulin (21%) may be caused by a non-optimal arrangement of residues B27–B30. However, the reduced affinity of this analogue may also result from the loss of NHB26 hydrogen bonding capabilities, required in IR interactions, or by a combination of these factors. The impact of some distinct (*e.g.* long range) *N*-methylation-induced conformational changes in the structures of B24–B30 strands in [*N*MePheB24]-insulin and [*N*MePheB25]-insulin cannot be excluded as well. However, their existence still awaits structural proof as [*N*MePheB24]-insulin eluded all crystallization trials so far, and [*N*MePheB25]-insulin has been crystallized only in the form of a typical R_6 hexamer (see below).

The last three analogues in Table 1 represent molecules with single, double, or multiple modifications compared with native human insulin, respectively. The [PheB26]-insulin analogue was included in this study to examine the importance of the Tyr-B26 hydroxyl group for insulin affinity, as the next analogue studied here, [*N*MePheB26]-insulin, featured two combined modifications: the loss of phenolic character of the B26 side chain with *N*-methylation of the B26NH. The [PheB26]-insulin showed 46% binding affinity that was in full agreement with data (47%) already reported for this analogue (39), clearly indicating that the loss of Tyr-B26 hydroxyl group is responsible for the reduced binding affinity of this analogue. Therefore, an even more drastic (actually to 4%) loss of affinity of the [*N*MePheB26]-insulin was expected, as it results from a double (side and main chain) modification of the hormone at this position. Subsequently, the practically total loss of affinity (0.44%) of the [*N*MePheB25,*N*MePheB26]-insulin analogue is not surprising, as it fosters the cumulative effect of three unfavorable

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

modifications (two *N*-methylations and loss of a phenolic B26 side chain).

ITC Measurements and Dimerization Capabilities of Analogues—ITC measurements of insulin dimer dissociation require relatively high amounts of protein material. Their optimum required concentration should be in the 0.2–1 mM range, but concentrations closer to the high end yield more reliable data (32). Hence, a typical ITC experiment in a 1.4-ml reaction vessel requires ~8 mg of insulin, which presents some experimental challenges due to the relatively low yields of semisynthetic reactions (30). Also, the recovery of analogues from reaction mixtures after ITC experiments is not very efficient. Therefore, we determined the dimerization capabilities of analogues only at two replicates at different protein concentrations. However, the complete ITC data presented in supplemental Table S1 indicate that duplicate measurements performed here produced very consistent and reliable results.

As some reports (43, 44) have shown, pH has a rather small effect on the outcomes of insulin-dimerization experiments; thus, all ITC experiments were performed here also at acidic pH 2.5 to avoid reduced insulin solubility at the physiological pH (32). As expected, our ITC experiments with human and porcine insulin gave almost identical dissociation constants of dimerization (K_d) of ~9 μM, and the changes in Gibbs free energies of dissociation (ΔG^o_d) of ~29 kJ/mol (Table 2). These results are close to the K_d and ΔG^o_d of ~12 μM and 28 kJ/mol, respectively, measured by Lovatt *et al.* (32) for bovine insulin under similar ITC conditions. Strazza *et al.* (43) used concentration difference spectroscopy to determine the monomer-dimer association constants of porcine insulin, finding only minor differences in K_d at pH 2 (15 μM) and at pH 7 (18 μM). Equilibrium sedimentation, an alternative assessment of insulin dimerization, provided K_d of ~4.5 μM for bovine insulin (at pH 8.0) (28), whereas this approach for porcine insulin gave K_d of ~7 μM (at pH 7.0) (44). Altogether, the dimerization dissociation constants for human and porcine insulin determined in this study fall well into the range of K_d values determined experimentally by other groups and different techniques. The reliability of the approach presented here therefore allows a more systematic insight into the evaluation of the roles of individual hydrogen bonds involving B24–B26 peptide units in dimer stability. They are discussed below in the context of structural changes caused by their alternations.

Structure-Function Relationships in Insulin Analogue Dimers—The resultant minor differences in equilibrium constants and thermodynamic parameters of insulin dimerization at different pHs led to the conclusion that insulin association is mainly driven by the nonpolar interactions (44). However, Strazza *et al.* (43) also indicated that insulin dimerization is under enthalpic control and that the formation of four hydrogen bonds in the apolar protein environment is the main driving force in the assembly of insulin dimer. However, molecular dynamics simulations suggested that insulin dimerization results mainly from nonpolar interactions (contributed mostly by residues B24–B26) (45) and that the role of hydrogen bonds between monomers is to provide a correct directional and spatial guidance to prevailing non-polar interactions. Our experimental data do not exclude any of these hypotheses but indicate more clearly the important individual contributions of B24–B26 hydrogen bonds toward the stability of the dimer.

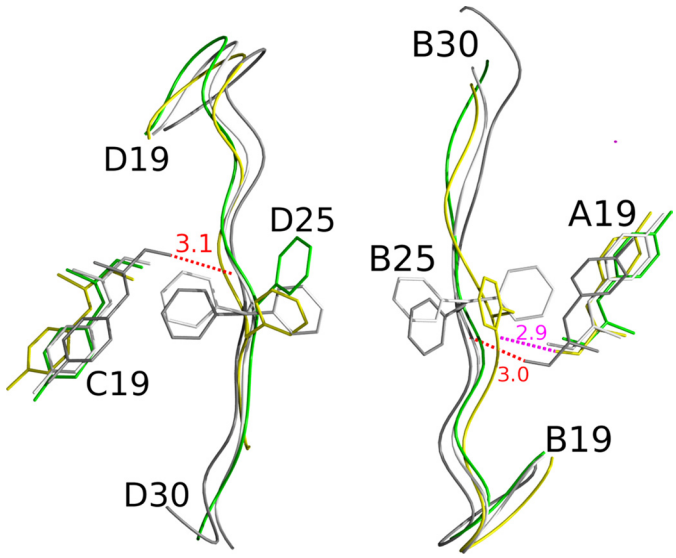


FIGURE 4. **The B-A (*right panel*) and C-D (*left panel*) insulin intrachain coupling effect of the B25NH-COA19 hydrogen bond in the wild-type insulin T_6 dimer (Protein Data Bank code 1MSO) (in *dark gray*), wild-type R_6 dimer (Protein Data Bank code 1ZNJ) (*white*), [*N*MePheB25]-insulin (Protein Data Bank code 3ZQR) (*green*), and [*N*MeTyrB26]-insulin (Protein Data Bank code 2WS6) (*yellow*).** The T state characteristic B25NH-COA19 hydrogen bond in the T_6 dimer is in *red* on both panels (distances in Å); this AB monomer-only hydrogen bond in the [*N*MeTyrB26]-insulin analogue is in *magenta*. Phe-B25 side chains are disordered in [*N*MePheB25]-insulin and are not represented here.

The individual knock-outs of the NHB24 ([*N*MePheB24]-insulin) and NHB26 ([*N*MeTyrB26]-insulin) hydrogen bond donors increased K_d from 9 μM to 587 and 142 μM, respectively (Table 2). As the role of the B24–B26 side chains can, to some extent, be decoupled in this process due to the 2-fold symmetry of these regions, the B24NH–COB26 hydrogen bond can be seen as a more important polar stabilizer of the insulin dimer. Its loss causes a much larger (~4-fold) dimer disruptive effect than abolishing the B26NH-COB24 interaction. This can result from its flanking positions on the dimer interface, closer to the solvent exposed termini of the dimer β-sheet (Fig. 3, *A* and *B*). The lack of B24NH-COB26 interactions, linked with the mobility-prone character of the B27–B30 terminal residues (observed in many insulin crystal and NMR structures; see, for example, Fig. 3, *B–D*), can lead to easier solvent penetration through the dimer interface and to faster unzipping of the β-sheet via solvation/breaking of the remaining central pair of B26NH–COB24 hydrogen bonds (46). The lower K_d of the [*N*MeTyrB26]-insulin analogue, its higher dimeric stability than the [*N*MePheB24]-insulin, can also result from the non-typical (for the R-state) B25NH–COA19 hydrogen bond in one of its monomers. It seems that it is a side effect of the β-strand bulge that brings NHB25 into the proximity of the Tyr-A19 main chain, allowing the formation of an intramolecular hydrogen bond (2.9 Å, Fig. 4), which may be important for insulin dimerization (see "Discussion"). However, as this interaction is not symmetrical (β-strand bulge occurs only in one monomer), it cannot fully compensate for the instability of the interface in this analogue. Therefore, it is possible that the lack of positive crystallization results of the [*N*MePheB24]-insulin analogue

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

(significant but rather indirect evidence) may result from the rapid monomer-dimer kinetics that prevents a stable crystal nucleation process. Moreover, it is interesting that the higher stability of the [*N*MeTyrB26]-insulin dimer is also reflected in its remarkable availability to form monomeric and hexameric crystal structures (17); appropriate physicochemical solution parameters can shift the monomer-oligomer equilibrium toward one of the stable (crystallisable) forms of this analogue, especially if the most stable (>8 h (47)) phenol-induced R-form of the hexamer is assured. Although crystallization trials cannot be considered as an unambiguous experimental proof, the ~15-fold higher K_d of [*N*MeTyrB26]-insulin compared with native insulin (Table 2) also agrees with the lack of its dimer crystals, even under extensive dimer crystallization conditions (17).

Interestingly, the most dramatic/disruptive impact on insulin dimerization properties, evident in the ITC data, is not provided by the knock-out of each of the intermonomer β-sheet hydrogen bonds pairs, but by the *N*-methylation of the B25 amide unit in the [*N*MePheB25]-insulin analogue. Despite the almost wild-type nature of the dimer interface here (Fig. 3*A*) and an easy spatial accommodation of the outward (from the dimer β-sheet interface) pointing B25 *N*-Me groups, the lack of intramolecular hydrogen bond donor properties of B25NH group results in no-heat effects in the ITC measurements of this analogue, in a fashion similar to the monomeric-benchmark DOI insulin. The only direct hydrogen bond-related impact of the loss of the B25NH proton is the lack of the B25NH-COA19 hydrogen bond that connects B-chain β-strand with the core of the molecule in the T-forms (dominant insulin state in the metal/ligand-free ITC experiments) of the hormone (Fig. 4). The release of the C-terminal β-strand residues from this intramolecular hydrogen bond lock may result in its higher mobility shifting solution equilibrium toward the monomeric state. Additionally, increased dynamics of this region can contribute to, or be amplified further by, the Phe-B25 side chain mobility. Indeed, the B25 phenyl ring can be located with difficulty (poor electron density map definition) only for one of the B25 residues. Therefore, it is possible that the monomeric character of [*N*MePheB25]-insulin can be associated with the detachment of Phe-B25 (and surrounding B-chain) from the A-chain.

The β-strand detachment-driven monomeric behavior in the solution and formation of hexameric crystals of [*N*MePheB25]-insulin are somehow reflected in the crystal structure (and solution properties) of the [LysB28,ProB29]-insulin, an analogue also with a very substantially diminished (~300×) dimerization capacity (48). Its monomeric behavior did not also prohibit its crystallization as the $T_3R_3^f$ hexamer in the presence of zinc and phenol (16). The [*N*MePheB26]-insulin was an additional step in probing of the resistance of the dimer interface by prevention of the "central" B26NH-COB24 hydrogen bond of the dimer interface, combined with the loss of B26 phenolic character. It is surprising that, although the "peripheral" dimer-spanning B24NH-COD26 hydrogen bonds are preserved here (like in the [*N*MeTyrB26]-insulin analogue), the loss of the central pair (B26NH-COD24) of these interactions, combined with a simultaneous loss of a Tyr-B26 OH group, cannot prevent the further dramatic increase of the K_d into the mM range (1.240 mM). It seems then that the phenolic indirect hydrogen bonds of the Tyr-B26 side chain (*e.g.* to Tyr-D16) and its multiple van der Waals interactions (*e.g.* Phe-B24, Pro-B28, Ile-A2, Val-A3, Ile-B11, and Val-B12), multiple combined contributions, are rather important for monomer (and dimer) stability. This also indicates that the dimer-stabilizing role of B24–B26 hydrogen bonds cannot be unambiguously decoupled from the individual contributions of the associated individual side chains.

Role of Hexameric Form in Dimer Stability—It has to be stressed that all dimer-related comparisons and correlations of structural information with the solution (ITC) studies presented here are based on different quaternary forms of insulin. Structural data were derived exclusively from the R_6 hexamers (two Zn^{2+}, six phenol ligands), and none of the analogues discussed in this report attained the conformation of T_3R_3 ($T_3R^f_3$) or T_6 hexamers. In contrast, the ITC solution measurements were performed in a metal/ligand-free environment, with the T state being the likely form of the hormones.

Considering the dimer β-sheet disruptive character of the chemical changes in analogues studied here, it is not surprising that the most stable form of the hexamer (R_6) (47, 49, 50) was found to be adopted by all modified insulin. The dominance of the R_6 hexameric form likely originates from the additional reinforcement of dimer stability provided the B1–B6 helical extension. It not only delivers typical phenol site I-generated interactions (40) but also a few new, strong (~2.7 Å) intermolecular dimer-spanning protein-protein hydrogen bonds such as Tyr-B16NH-COHis-D5. It seems that these interactions must also compensate for a loss of the B25NH-COA19 intramolecular hydrogen bond, which occurs only in the T state of insulin. Hence, the changes in dimer interfaces in various analogues are displayed here against virtually the same reference-like core of the R_6 oligomer.

It is interesting that even very disruptive effects on the dimer interface (*i*) resulting from the interference with the B24-B26 intermolecular hydrogen bonds, (*ii*) amplified further by some mutations in this region, and (*iii*) leading, for example, to a full detachment of dimer β-strands (*i.e.* [TyrB25,*N*MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin, Fig. 3*D*), are still compensated and accommodated in a stable R_6 hexamer. Energy-driven superiority of the R_6 oligomer is especially visible in the already reported (17) crystal structure of the truncated [ProB26]-DTI analogue, in which the dimer interface is totally disrupted beyond B/D21–22 residues (Fig. 5). The maintenance of the hexameric form there, despite the lack of the entire dimer β-strand interface, is somehow compatible with the association of DOI into a R_6 hexamer observed in the presence of Zn^{2+} and cyclohexanol (29). Although the $T_6 \rightarrow T_3R_3 \rightarrow R_6$ dynamic transitions are rather well described by the SMB model (51–56), the conformational events on the monomer → dimer → hexamer pathway are much less understood. Our results presented here provide further evidence that the nature of the changes on the insulin dimer interfaces (and associated other parts of the insulin molecule) is quite asymmetrical (Fig. 3, *B–D*); thus, they fit and support well the occurrence of structural asymmetries that are important features of a SMB model for the allosteric behavior of insulin (57).

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

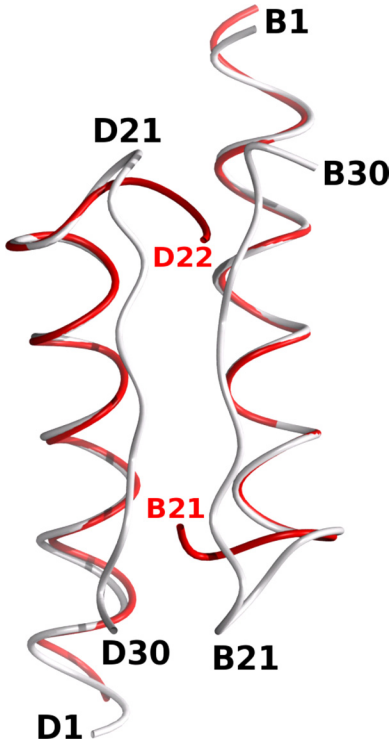


FIGURE 5. **General fold of the B-chain, including the dimer interface, in the [ProB26]-DTI dimer interface-deprived analogue (Protein Data Bank code 2WS7) (in *red*) and in the wild-type insulin (Protein Data Bank code 1ZNJ) (in *white*).**

Undoubtedly, the formation and dissociation of insulin hexamers and dimers into active monomers plays an essential role in the endogenous delivery of the hormone (20, 22). First, the release of insulin hexamers from secretory granules (pH 5.5) into the bloodstream (pH 7.4) results in the loss of zinc (due to the higher pH) and in the dissociation of hexamers to insulin dimers (21). The process of dimer dissociation is likely concentration-driven (K_d of insulin dimerization is ~9 μM). Therefore, the dissociation of insulin dimers into monomers in the bloodstream is a dilution-driven phenomenon. The clinically used and fast acting [LysB28,ProB29]-insulin (Humalog®) (58) or [AspB28]-insulin (Novolog®) (59, 60) are not able to form dimers, but still associate into hexamers (16), providing evidence that the disruption of insulin dimerization has a fundamental impact on the endogenous action of this hormone.

CONCLUSIONS

The C terminus of the B-chain, namely, residues B24–B26 and B28–B29, is a crucial part of insulin for its interaction with IR and for its self-association into dimers. The importance of Phe-B24, Phe-B25, and Tyr-B26 residues in the formation of dimers is well established; however, the contribution of their respective individual amide hydrogens for the stability of this aggregates has not been characterized. Here, we delineated their roles by preparation of a series of insulin analogues with selective *N*-methylations of peptide bond amides at positions B24, B25, or B26. All of these *N*-methylated insulin analogues showed significantly impaired binding affinities to the receptor, confirming also the role of respective amide hydrogens in the direct interaction/involvement with insulin receptor. Systematic, individual *N*-methylations of B24, B25, and B26 peptide bonds in studied analogue amides resulted in a wide spectrum of reduced dimerization abilities of the analogues. Surprisingly, the most dramatic impact on insulin dimerization capability was exerted by the *N*-methylation at the B25 position, likely due to a loss of the intramolecular β-strand-hormone-core connecting NHB25-COA19 hydrogen bond. The subsequent higher mobility of the β-strand in this analogue severely shifts the solution equilibrium toward the monomeric state. All examined analogues were crystallized only as R_6 hexamers, which is the most stable form of insulin oligomers and the only oligomeric form capable to accommodate/withstand disrupted insulin β-strands. This study helped to understand the importance and contribution of the B24NH-COB26, B26NH-COB24, and, especially, B25NH-COA19 hydrogen bonds in the formation and stabilization of insulin dimers. The behavioral, functional, and structural correlations presented here provide much evidence that clearly supports and further validates the SMB model of insulin allostery. A better understanding of the structure-function relationships in the association-dissociation pathways of this hormone is important for the understanding of its physiology but may also facilitate development of better, more controlled insulin for clinical applications.

REFERENCES

1. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Bing, X., and Markussen, J. (1991) *J. Mol. Biol.* **220,** 425–433
2. Weiss, M. A. (2009) in *Insulin and IGFs* (Litwack, G., Ed.) pp. 33–49, Elsevier Academic Press, Inc., San Diego, CA
3. Mayer, J. P., Zhang, F., and DiMarchi, R. D. (2007) *Biopolymers* **88,** 687–713
4. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M., and Weiss, M. A. (1991) *Nature* **354,** 238–241
5. Ludvigsen, S., Olsen, H. B., and Kaarsholm, N. C. (1998) *J. Mol. Biol.* **279,** 1–7
6. Xu, B., Huang, K., Chu, Y. C., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Wang, S., Wang, R. Y., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 14597–14608
7. Kaarsholm, N. C., and Ludvigsen, S. (1995) *Receptor* **5,** 1–8
8. Keller, D., Clausen, R., Josefsen, K., and Led, J. J. (2001) *Biochemistry* **40,** 10732–10740
9. Ludvigsen, S., Roy, M., Thøgersen, H., and Kaarsholm, N. C. (1994) *Biochemistry* **33,** 7998–8006
10. Olsen, H. B., Ludvigsen, S., and Kaarsholm, N. C. (1996) *Biochemistry* **35,** 8836–8845
11. Hua, Q. X., and Weiss, M. A. (1991) *Biochemistry* **30,** 5505–5515
12. Huang, K., Xu, B., Hu, S. Q., Chu, Y. C., Hua, Q. X., Qu, Y., Li, B., Wang, S., Wang, R. Y., Nakagawa, S. H., Theede, A. M., Whittaker, J., De Meyts, P., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2004) *J. Mol. Biol.* **341,** 529–550
13. Hua, Q. X., Xu, B., Huang, K., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Jia, W., Wang, S., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) *J. Biol. Chem.* **284,** 14586–14596
14. Kristensen, C., Kjeldsen, T., Wiberg, F. C., Schäffer, L., Hach, M., Havelund, S., Bass, J., Steiner, D. F., and Andersen, A. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272,** 12978–12983
15. Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., Reynolds, C. D., Sakabe, K., Sakabe, N., and Vijayan, N. M. (1988) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **319,** 369–456
16. Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D., and Smith, G. D. (1995) *Structure* **3,** 615–622
17. Jirácek, J., Záková, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., and Brzozowski, A. M. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107,** 1966–1970

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

18. De Meyts, P., Van Obberghen, E., and Roth, J. (1978) *Nature* **273,** 504–509
19. Keefer, L. M., Piron, M. A., De Meyts, P., Gattner, H. G., Diaconescu, C., Saunders, D., and Brandenburg, D. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100,** 1229–1236
20. DeFelippis, M. R., Chance, R. E., and Frank, B. H. (2001) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **18,** 201–264
21. Dodson, G., and Steiner, D. (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8,** 189–194
22. Brange, J., Owens, D. R., Kang, S., and Vølund, A. (1990) *Diabetes Care* **13,** 923–954
23. Adams, M. J., Blundell, T. L., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Vijayan, M., Baker, E. N., Harding, M. M., Hodgkin, D. C., Rimmer, B., and Sheat, S. (1969) *Nature* **224,** 491–495
24. Smith, G. D., Pangborn, W. A., and Blessing, R. H. (2003) *Acta Crystallogr. D* **59,** 474–482
25. Záková, L., Barth, T., Jirácek, J., Barthová, J., and Zórad, S. (2004) *Biochemistry* **43,** 2323–2331
26. Záková, L., Kazdová, L., Hanclová, I., Protivínská, E., Sanda, M., Budesínský, M., and Jirácek, J. (2008) *Biochemistry* **47,** 5858–5868
27. Záková, L., Brynda, J., Au-Alvarez, O., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Whittingham, J. L., and Brzozowski, A. M. (2004) *Biochemistry* **43,** 16293–16300
28. Goldman, J., and Carpenter, F. H. (1974) *Biochemistry* **13,** 4566–4574
29. Pittman, I., 4th, and Tager, H. S. (1995) *Biochemistry* **34,** 10578–10590
30. Záková, L., Zyka, D., Jezek, J., Hanclová, I., Sanda, M., Brzozowski, A. M., and Jirácek, J. (2007) *J. Pept. Sci.* **13,** 334–341
31. Bromer, W. W., and Chance, R. E. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **133,** 219–223
32. Lovatt, A., Cooper, A., and Camilleri, P. (1996) *Eur. Biophys. J.* **24,** 354–357
33. McPhail, D., and Cooper, A. (1997) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **93,** 2283–2289
34. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276,** 307–326
35. Bailey, S. (1994) *Acta Crystallogr. D* **50,** 760–763
36. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallogr. D* **60,** 2126–2132
37. Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* **30,** 1022–1025
38. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallogr. D* **53,** 240–255
39. Gauguin, L., Klaproth, B., Sajid, W., Andersen, A. S., McNeil, K. A., Forbes, B. E., and De Meyts, P. (2008) *J. Biol. Chem.* **283,** 2604–2613
40. Whittingham, J. L., Edwards, D. J., Antson, A. A., Clarkson, J. M., and Dodson, G. G. (1998) *Biochemistry* **37,** 11516–11523
41. Wollmer, A., Gilge, G., Brandenburg, D., and Gattner, H. G. (1994) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375,** 219–222
42. Nakagawa, S. H., Johansen, N. L., Madsen, K., Schwartz, T. W., and Tager, H. S. (1993) *Int. J. Pept. Protein Res.* **42,** 578–584
43. Strazza, S., Hunter, R., Walker, E., and Darnall, D. W. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **238,** 30–42
44. Pekar, A. H., and Frank, B. H. (1972) *Biochemistry* **11,** 4013–4016
45. Zoete, V., Meuwly, M., and Karplus, M. (2004) *J. Mol. Biol.* **342,** 913–929
46. Ganim, Z., Jones, K. C., and Tokmakoff, A. (2010) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12,** 3579–3588
47. Hassiepen, U., Federwisch, M., Mülders, T., and Wollmer, A. (1999) *Biophys. J.* **77,** 1638–1654
48. Brems, D. N., Alter, L. A., Beckage, M. J., Chance, R. E., DiMarchi, R. D., Green, L. K., Long, H. B., Pekar, A. H., Shields, J. E., and Frank, B. H. (1992) *Protein Eng.* **5,** 527–533
49. Rahuel-Clermont, S., French, C. A., Kaarsholm, N. C., Dunn, M. F., and Chou, C. I. (1997) *Biochemistry* **36,** 5837–5845
50. Huus, K., Havelund, S., Olsen, H. B., Sigurskjold, B. W., van de Weert, M., and Frokjaer, S. (2006) *Biochemistry* **45,** 4014–4024
51. Seydoux, F., Malhotra, O. P., and Bernhard, S. A. (1974) *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2,** 227–257
52. Roy, M., Brader, M. L., Lee, R. W., Kaarsholm, N. C., Hansen, J. F., and Dunn, M. F. (1989) *J. Biol. Chem.* **264,** 19081–19085
53. Brader, M. L., Kaarsholm, N. C., Lee, R. W., and Dunn, M. F. (1991) *Biochemistry* **30,** 6636–6645
54. Choi, W. E., Brader, M. L., Aguilar, V., Kaarsholm, N. C., and Dunn, M. F. (1993) *Biochemistry* **32,** 11638–11645
55. Bloom, C. R., Choi, W. E., Brzovic, P. S., Ha, J. J., Huang, S. T., Kaarsholm, N. C., and Dunn, M. F. (1995) *J. Mol. Biol.* **245,** 324–330
56. Dunn, M. F. (2005) *Biometals* **18,** 295–303
57. Brzovic, P. S., Choi, W. E., Borchardt, D., Kaarsholm, N. C., and Dunn, M. F. (1994) *Biochemistry* **23,** 13057–13069
58. DiMarchi, R. D., Chance, R. E., Long, H. B., Shields, J. E., and Slieker, L. J. (1994) *Horm. Res.* **41,** 93–96
59. Hedman, C. A., Lindström, T., and Arnqvist, H. J. (2001) *Diabetes Care* **24,** 1120–1121
60. Homko, C., Deluzio, A., Jimenez, C., Kolaczynski, J. W., and Boden, G. (2003) *Diabetes Care* **26,** 2027–2031

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on October 17, 2011

Supplemental Information

for

NON-EQUIVALENT ROLE OF *INTER*- AND *INTRA*-MOLECULAR HYDROGEN BONDS IN THE INSULIN DIMER INTERFACE*[S]

Emília Antolíková[1], Lenka Žáková[2], Johan P. Turkenburg[2], Christopher J. Watson[2], Ivona Hančlová[1], Miloslav Šanda[1], Alan Cooper[3], Tomáš Kraus[1], A. Marek Brzozowski[2,§] and Jiří Jiráček[1,§]

[1]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic
[2]York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, The University of York, Heslington, York, YO10 5YW, UK
[3]School of Chemistry, Glasgow University, College of Science and Engineering, Glasgow G12 8QQ, Scotland, UK
[§]Address correspondence to: Jiří Jiráček, E-mail: jiracek@uochb.cas.cz, Phone: +420200183441, Fax: +420220183441 or A. Marek Brzozowski, E-mail: marek@ysbl.york.ac.uk, Phone: 01904 322511, Fax: 01904 322516

Table of Contents

Table S1. . . . . . **2**

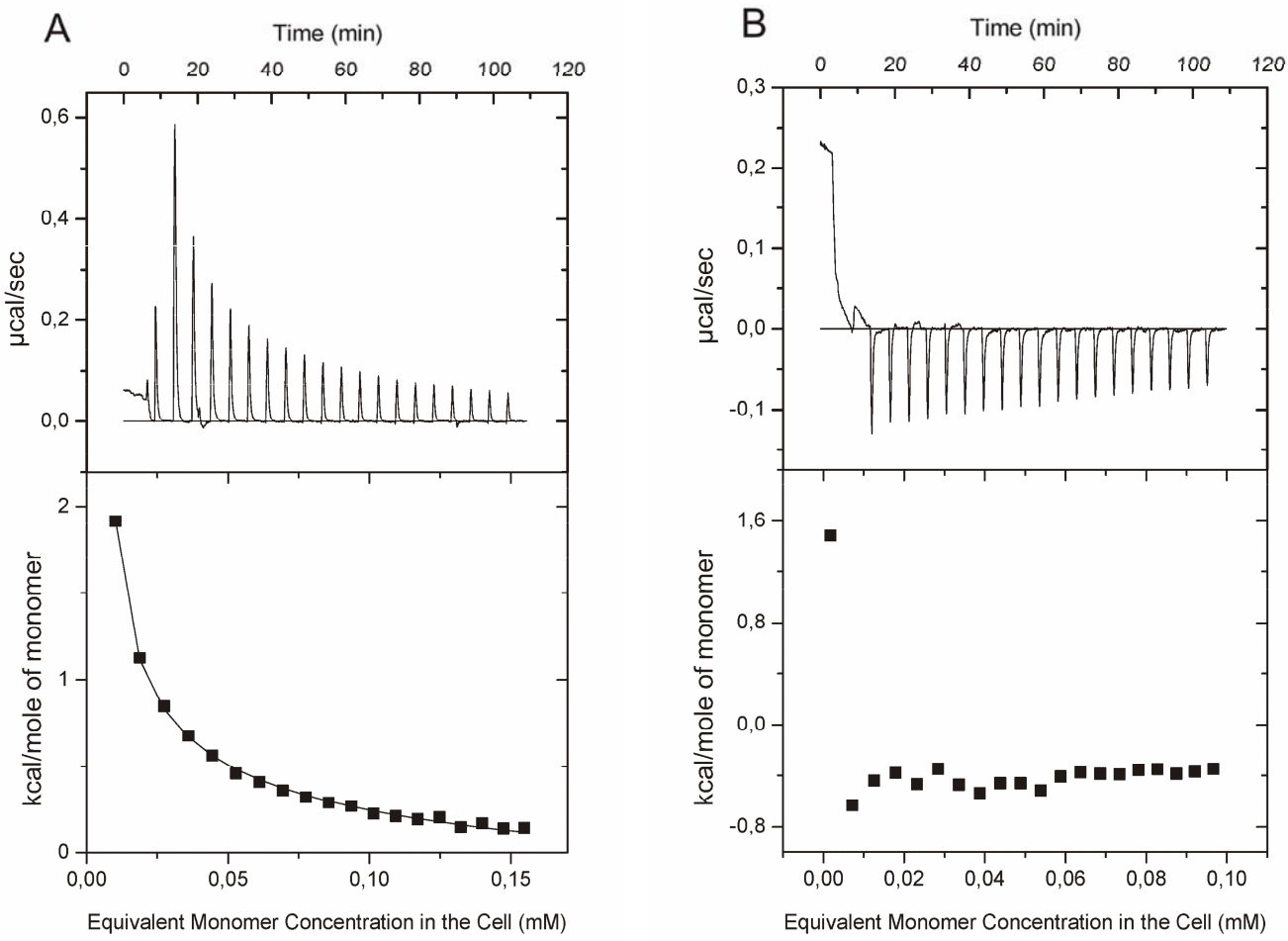
Figure S1. . . . . . **3-4**

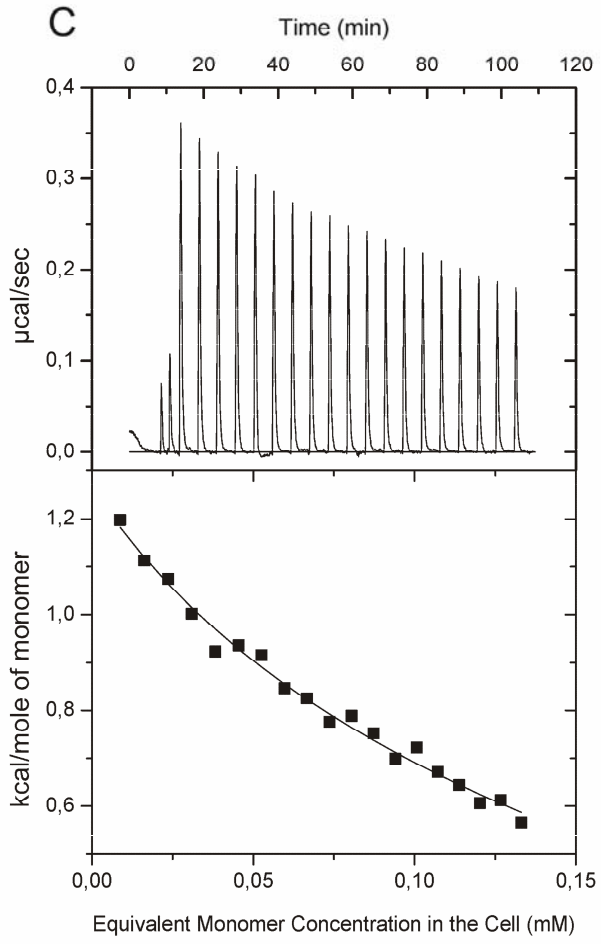
Table S2. . . . . . **5**

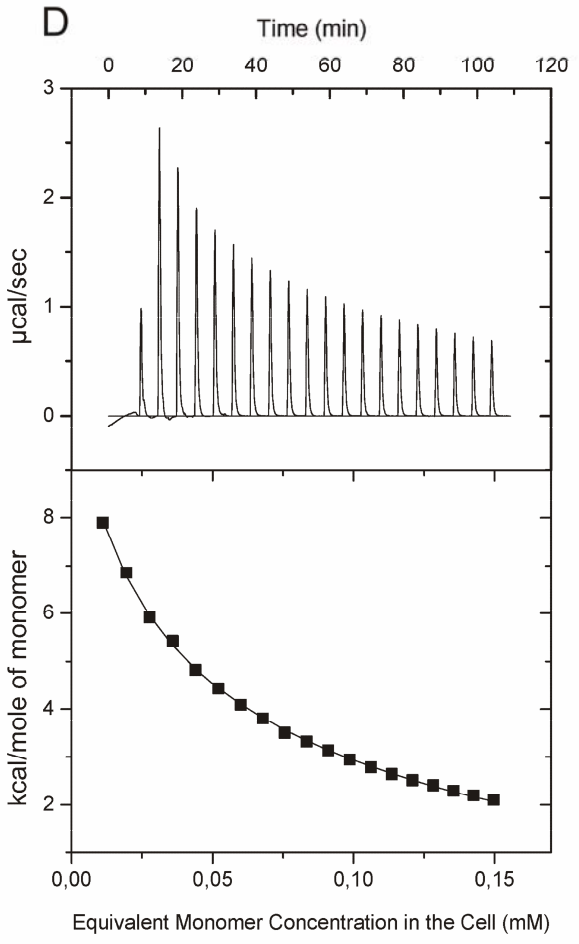
Table S1. The complete experimental data from ITC analyses of insulin and insulin analogues.

Insulin	c [mM]	K_{diss} [μM]	$\Delta H°_{diss}$ [kJ/mol]	$\Delta G°_{diss}$ [kJ/mol]	$\Delta S°_{diss}$ [J/K.mol]
Porcine insulin	1.000	9.53	41.51	28.64	43.16
Porcine insulin	1.000	8.52	42.41	28.92	45.28
Human insulin	1.000	5.49	66.28	30.01	121.71
Human insulin	1.000	6.10	61.09	29.75	105.17
Human insulin	1.020	14.8	50.20	27.55	76.00
Human insulin	1.220	10.0	52.50	28.52	80.47
Human insulin	0.208	7.36	56.11	29.28	90.01
Human insulin	0.213	8.72	46.52	28.86	59.26
Human insulin	0.680	10.4	66.28	28.43	127.02
Human insulin	0.630	7.59	56.48	29.21	91.53
DOI	1.07	No heat effect			
DOI	0.62	No heat effect			
[*N*MePheB24]-insulin	0.860	685	11.28	18.05	- 22.71
[*N*MePheB24]-insulin	0.715	488	10.36	18.89	- 28.64
[*N*MePheB25]-insulin	0.965	No heat effect			
[*N*MePheB25]-insulin	0.580	No heat effect			
[*N*MeTyrB26]-insulin	0.960	171	86.34	21.49	217.60
[*N*MeTyrB26]-insulin	0.523	112	55.35	22.54	110.11
[*N*MePheB26]-insulin	0.760	1230	29.50	16.60	43.28
[*N*MePheB26]-insulin	0.451	1250	46.18	16.56	99.40

Figure S1. Representative dilution ITC curves for porcine insulin (A), DOI (B), [*N*MePheB24]-insulin (C), [*N*MeTyrB26]-insulin (D) [*N*MePheB26]-insulin (E).




C
Time (min)
0 20 40 60 80 100 120
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
µcal/sec
1,2
1,0
0,8
0,6
kcal/mole of monomer
0,00 0,05 0,10 0,15
Equivalent Monomer Concentration in the Cell (mM)


D
Time (min)
0 20 40 60 80 100 120
3
2
1
0
µcal/sec
8
6
4
2
kcal/mole of monomer
0,00 0,05 0,10 0,15
Equivalent Monomer Concentration in the Cell (mM)

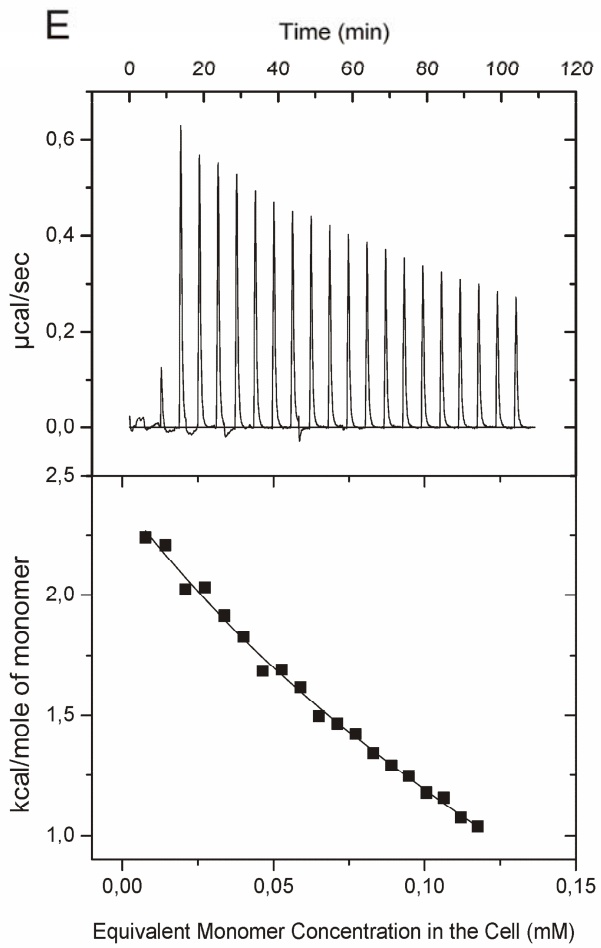

E
Time (min)
0 20 40 60 80 100 120
0,6
0,4
0,2
0,0
µcal/sec
2,5
2,0
1,5
1,0
kcal/mole of monomer
0,00 0,05 0,10 0,15
Equivalent Monomer Concentration in the Cell (mM)

Table S2. Data collection and refinement statistics

	[*N*MePheB25]-insulin	[TyrB25,*N*MePheB26,LysB28,ProB29]-insulin
PDB code	3zqr (structure factors: r3zqrsf)	3zs2 (structure factors: r3zs2sf)
Data collection		
Beamline	In-house MAR345, Rigaku RUH3R	ESRF, ID23-1, ADSC Q315 detector
Wavelength (Å)	1.54178	1.0712
Space group	$P2_1$	$P2_1$
Cell dimensions		
a, *b*, *c* (Å)	46.6 61.8 58.2	46.7 62.2 57.6
α, β, γ (°)	90.0 111.2 90.0	90.0 111.3 90.0
Resolution (Å)	20.0-1.9 (1.93-1.90)	30.0-1.97 (2.04-1.97)
R_{sym}	0.047(0.164)	0.109(0.205)
$\langle I / \sigma(I) \rangle$	16.3(10.0)	13.5(8.5)
Completeness (%)	95.3(74.7)	90.2(61.7)
Redundancy	3.2(2.0)	2.3(1.5)
Wilson B factor (Å^2)	38.09	36.51
N^o. of molecules in AU	1 hexamer	1 hexamer
Refinement		
Resolution (Å)	20.0 - 1.90	50.0 - 2.60
No. reflections	22062	18615
R_{work} / R_{free}	0.223/0.281	0.188/0.240
No. atoms	2460	2440
Protein	2250	2244
Ligand/ion	46	46
Water	164	150
B-factors		
Protein	38.17	36.4
Ligand/ion	29.64	32.1
Water	39.10	46.6
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.022	0.019
Bond angles (°)	1.838	1.72
Ramachandran (%)		
Preferred/Allowed/Outliers	95.6/4.4/0	99.2/0.8/0
Crystallisation condition	0.6 M Na_2SO_4, 0.3 M Tris pH 8.2, 0.6 mM $Zn(Ac)_2$, 0.06% Phenol	0.1 M NaCitrate, 0.3 M Tris pH 8.2, 0.6 mM $Zn(Ac)_2$, 0.06% Phenol
Cryoprotectant	none	none

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

Supplemental Material can be found at:
http://www.jbc.org/content/suppl/2012/02/08/M111.252478.DC1.html

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. 14, pp. 11422–11436, March 30, 2012
© 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Insulin and Insulin-like Growth Factor II Differentially Regulate Endocytic Sorting and Stability of Insulin Receptor Isoform A*[S]

Received for publication, April 18, 2011, and in revised form, February 7, 2012 Published, JBC Papers in Press, February 8, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.252478

Alaide Morcavallo[‡§], Marco Genua[‡], Angela Palummo[§], Emilia Kletvikova[¶], Jiri Jiracek[¶], Andrzej M. Brzozowski[‖], Renato V. Iozzo[**], Antonino Belfiore[§1,2], and Andrea Morrione[‡1,3]

*From the [‡]Department of Urology and Endocrine Mechanisms and Hormone Action Program, and the **Department of Pathology, Anatomy and Cell Biology and Cancer Cell Biology and Signaling Program, Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, Pennsylvania 19107, the [§]Department of Health and Endocrinology, University of Catanzaro, 88100 Catanzaro, Italy, the [¶]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic v.v.i. Flemingovo nam. 2, Praha 6166 10, Czech Republic, and the [‖]Department of Chemistry, York Structural Biology Laboratory, University of York, York YO10 5DD, United Kingdom*

Background: Insulin-like growth factor (IGF) II interacts with IR-A and is a more powerful mitogen than insulin.
Results: IGF-II and insulin differ in regulating insulin receptor (IR)-A trafficking and stability.
Conclusion: Compared with insulin, IGF-II induces lower IR-A and downstream effectors activation but protects IR-A and IRS-1 from down-regulation, thereby evoking a sustained mitogenic stimulus.
Significance: These results further elucidate the mechanisms controlling IR-A biological responses.

The insulin receptor isoform A (IR-A) binds both insulin and insulin-like growth factor (IGF)-II, although the affinity for IGF-II is 3–10-fold lower than insulin depending on a cell and tissue context. Notably, in mouse embryonic fibroblasts lacking the IGF-IR and expressing solely the IR-A (R−/IR-A), IGF-II is a more potent mitogen than insulin. As receptor endocytosis and degradation provide spatial and temporal regulation of signaling events, we hypothesized that insulin and IGF-II could affect IR-A biological responses by differentially regulating IR-A trafficking. Using R−/IR-A cells, we discovered that insulin evoked significant IR-A internalization, a process modestly affected by IGF-II. However, the differential internalization was not due to IR-A ubiquitination. Notably, prolonged stimulation of R−/IR-A cells with insulin, but not with IGF-II, targeted the receptor to a degradative pathway. Similarly, the docking protein insulin receptor substrate 1 (IRS-1) was down-regulated after prolonged insulin but not IGF-II exposure. Similar results were also obtained in experiments using [NMeTyr^{B26}]-insulin, an insulin analog with IR-A binding affinity similar to IGF-II. Finally, we discovered that IR-A was internalized through clathrin-dependent and -independent pathways, which differentially regulated the activation of downstream effectors. Collectively, our results suggest that a lower affinity of IGF-II for the IR-A promotes lower IR-A phosphorylation and activation of early downstream effectors *vis à vis* insulin but may protect IR-A and IRS-1 from down-regulation thereby evoking sustained and robust mitogenic stimuli.

The insulin receptor (IR)[4] is expressed in two isoforms: the IR isoform A (IR-A) and isoform B (IR-B). The IR-A is generated by the skipping of exon 11 of the IR gene, which generates a protein that differs from IR-B in only a short stretch of 12 amino acid residues at the carboxyl terminus of the receptor α-subunit (1–4). The two IR isoforms are usually co-expressed and their relative abundance is regulated by several factors, including developmental stage and tissue-specific factors (5, 6). However, IR-A is predominantly expressed in fetal tissues and cancer cells, whereas the IR-B is preferentially expressed in differentiated insulin-responsive tissues (7, 8). Although the IR-B binds insulin with high affinity, the IR-A not only has high affinity for insulin but it also binds IGF-II, although the affinity is 3–10-fold lower than that of insulin depending on a cell and tissue context (7, 9). IGF-II binds instead to IGF type I receptor (IGF-IR) and to IR-A with similar affinities and shares with the homolog ligand IGF-I mitogenic and anti-apoptotic effects (7, 10).

Several studies have now established that IGF-II is capable to elicit biological effects via activation of the IR-A. For instance, in mouse fibroblasts lacking the IGF-IR and expressing solely the IR-A (R−/IR-A cells), IGF-II is a more potent mitogen than

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant RO1 DK068419 (to A. M.), the Benjamin Perkins Bladder Cancer Fund and the Martin Greitzer Fund (to A. M.), and grants from the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC Grant 10625), AIRC project Calabria 2011 and Fondazione Cassa di Risparmio di Calabria e Lucania, Programmi di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale-Ministero dell' Istruzione, dell' Università e della Ricerca (PRIN-MIUR) Grant 2008BKRFBH_005 (to A. B.), and Research Project of the Academy of Sciences of the Czech Republic Grant Z40550506 (to J. J.).
[S] This article contains supplemental Figs. S1–S4.
[1] Both authors contributed equally to this paper.
[2] To whom correspondence may be addressed: Endocrinology Unit, Dept. of Health, University of Magna Grecia, Campus Universitario, Viale Europa, Germaneto, Catanzaro 88100, Italy. Tel.: 00-39-0961-3697154; E-mail: belfiore@unicz.it.
[3] To whom correspondence may be addressed: Dept. of Urology and Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, 233 South 10th St., BLSB, Rm. 620, Philadelphia, PA 19107. E-mail: andrea.morrione@jefferson.edu.

[4] The abbreviations used are: IR, insulin receptor; IGF-II, insulin-like growth factor 2; IGF-IR, IGF receptor I; RTK, receptor-tyrosine kinase; IRS-1, insulin receptor substrate 1; SFM, serum-free medium; ANOVA, analysis of variance; S6K, S6 kinase.

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

insulin (7, 11). In SKUT-1 human leiomyosarcoma cells, which lack functional IGF-IR and express predominantly IR-A, IGF-II is more potent than insulin in inducing cell motility and chemotaxis (12). Moreover, the global profile of gene expression elicited by IGF-II and insulin in R−/IR-A is different (13), with IGF-II being more potent than insulin in regulating specific gene clusters (13). Recent proteomic approaches demonstrated that insulin and IGF-II differ also in their ability to recruit effector proteins to the IR-A (14). However, the molecular mechanisms that may differentially regulate the intensity of the signal promoted by IGF-II and insulin through the IR-A have not been characterized.

Internalization of ligand-activated receptor-tyrosine-kinases (RTKs) occurs through specialized microdomains on the cell surface known as clathrin-coated pits or caveolae. Recent studies suggest an important connection between receptor ubiquitination, endocytosis, and ligand-mediated receptor signaling (15, 16). As shown for the EGFR, the disruption of RTK internalization and degradation results in their inability to attenuate signaling, leading to constitutive activation, prolonged signaling, and transformation (16).

We have previously demonstrated that the Grb10/Nedd4 complex promotes IGF-IR ubiquitination, which enhances ligand-dependent internalization and targets the receptor for degradation (17, 18) thereby regulating IGF-IR-dependent cell proliferation (19).

Because endocytosis provides spatial and temporal regulation of signaling events, we tested whether insulin and IGF-II could affect biological responses by differentially regulating IR-A trafficking. Taking advantage of the unique model of R−/IR-A cells, which lack the IGF-IR (20) and express solely the IR-A (21), here we show that insulin and IGF-II considerably differ in their ability to regulate IR-A and the downstream effectors trafficking and stability. These results suggest that the lower affinity of IGF-II for the IR-A promotes lower IR-A phosphorylation and reduced activation of early downstream effectors compared with insulin but protects IR-A and IRS-1 from negative feedback mechanisms, thereby evoking a sustained and powerful mitogenic stimulus.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines—R−/IR-A cells are mouse embryo fibroblasts derived from IGF-IR knock-out mice (20) and expressing solely the human IR-A isoform (21). Cells are maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 μg/ml of puromycin. These cells were previously well characterized for their mitogenic response to insulin and IGF-II (7, 11). MDA-MB-157 breast cancer cells were from ATTC. R+/IR-A cells (R+ A10) are mouse embryo fibroblasts derived from R-cells by cotransfecting the pECE expression vector containing the human IGF-IR cDNA and the pSV2 plasmid encoding the hygromycin resistance gene. Cells were then cotransfected with the pNTK2 expression vector containing the human IR-A cDNA and the pPDV6+ plasmid encoding the puromycin resistance gene (12). NIH3T3/IR-A cells were generated by retroviral infection of NIH3T3 mouse embryo fibroblasts with the pBABE-Hygro expression vector expressing the IR-A cDNA.

Internalization and Ubiquitination Assays—IR-A internalization was assessed after stimulation with 200 ng/ml of either insulin or IGF-II by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as previously described in detail (17, 18), using a monoclonal antibody against the IR α-subunit (Novus Biologicals, diluted 1:1000) and goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibody (diluted 1:1000; Sigma). Antibody binding was visualized by adding 0.25 ml of alkaline phosphatase substrate (Bio-Rad). The reaction was stopped by transferring 0.1 ml of the substrate to a 96-well microtiter plate containing 0.1 ml of 0.4 M NaOH. Plates were read at 405 nm in a microplate reader (Dynex Technologies) using Microplate Manager Software.

For ubiquitination, R−/IR-A cells were plated in triplicate at a density of 3×10^5 cells/well in 6-well plates and transiently transfected with 4 μg/well of the 8 HA-tagged ubiquitin construct (17, 18) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 24 h cells were shifted to serum-free medium (SFM) for 24 h and then stimulated for 30 min with 50 ng/ml of either insulin or IGF-II, supplemented with 20 μM of the proteasome inhibitor MG132 (Calbiochem) and 100 μM leupeptin/pepstatin as lysosomal inhibitors (Roche Applied Science) to accumulate the ubiquitinated species. Cell lysates were pooled and 1 mg of proteins were immunoprecipitated in HNTG buffer (20 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.2 mM sodium orthovanadate, protease inhibitor mixture supplemented with MG132 and leupeptin/pepstatin (at the above mentioned concentrations) with anti-IR monoclonal antibodies. Filters were immunoblotted with anti-ubiquitin and anti-HA monoclonal antibodies (Covance) to detect ubiquitinated proteins. Membranes were then reprobed with anti-phosphotyrosine monoclonal antibodies (BD Transduction Laboratories) to evaluate IR-A activation. The IR was detected using polyclonal antibodies from Santa Cruz Biotechnology.

Insulin Analogs and Cell Growth Experiments—The B26 peptide *N*-methylated (NMe) [NMeTyr^{B26}]-insulin analog was previously described (22). The binding affinity for the IR-A was performed according to Gauguin *at al.* (23) using IM-9 lymphocytes (ATCC), which are rich in IR-A expression. The IM-9 cell line was cultured in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum. For the assay, 2.0×10^6/ml cells were incubated with increasing concentrations of insulin/analog and human [^{125}I]monoiodotyrosyl-A14-insulin (PerkinElmer Life Sciences, 2200 Ci/mmol, 20,000 cpm, about 0.01 nM) for 2.5 h at 15 °C in HEPES binding buffer (100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM $MgSO_4$, 1 mM EDTA, 10 mM glucose, 15 mM NaOAc, 1% BSA (w/v), pH 7.6) (500 μl). After incubation, $2 \times$ 200 μl were centrifuged at 13,000 $\times$ *g* for 10 min. Radioactive pellets were counted using a Wizard 1470 Automatic γ Counter (PerkinElmer Life Sciences). Binding data were analyzed by Excel software using a one-site fitting program developed in the laboratory of Dr. Pierre De Meyts (A. V. Groth and R. M. Shymko, Hagedorn Research Institute, Denmark, a kind gift of Pierre De Meyts) and GraphPad Prism 5, and the dissociation constant was determined. The dissociation constant of human ^{125}I-insulin was set up to 0.3 nM. Receptor binding assays were performed under conditions excluding the depletion of free

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

ligand. The software used for the analysis of binding data developed in the laboratory of Dr. Pierre De Meyts takes the potential ligand depletion into account using equations developed by Swillens (24).

Cell proliferation of R−/IR-A cells in the presence of 1, 5, 10, and 30 nM insulin, IGF-II, or [NMeTyr^{B26}]-insulin was determined as previously described from our laboratories (7, 11, 19). Cells were counted at 48 h in Boyden chambers and values are expressed as % increase over SFM.

Analysis of IR, IRS-1, IRS-2, and Shc Levels—Cells were serum-starved for 24 h, and then stimulated with 50 ng/ml of either insulin or IGF-II or 5 nM insulin, IGF-II, or [NMeTyr^{B26}]-insulin for 8 and 24 h. Cells were lysed in RIPA buffer and the level of IR, IRS-1, IRS-2, and Shc was determined by immunoblotting with polyclonal antibodies against the β subunit of either the IR or IGF-IR (Santa Cruz Biotechnology), against IRS-1 or IRS-2 (UBI Millipore) or Shc (Santa Cruz Biotechnology). Normalization of proteins was done by probing the same filter with anti-β-actin polyclonal antibodies (Sigma). Inhibitors of the proteasome (MG132) or the lysosomal pathway (leupeptin/pepstatin) were added at the time of stimulation with growth factors at the concentrations mentioned above.

Targeting of Clathrin and Caveolin-1 by siRNA—Gene silencing of mouse clathrin and caveolin-1 was obtained by RNA interference using small interfering RNA (siRNA). R−/IR-A cells were transfected with vehicle (diethyl pyrocarbonate-treated water), control siRNA (scrambled), or siRNA directed against clathrin heavy chain or caveolin-1 (200 pmol) using the TransIT-siTKO reagents (Mirus Corporation). siRNA oligos specific for mouse clathrin heavy chain, caveolin-1, and controls were siGenome Smart pools, from Thermo Scientific Dharmacon. Twenty-four h after transfection, R−/IR-A cells were starved in SFM for 48 h, then stimulated with either IGF-II or insulin and evaluated for IR internalization by ELISA. The expression of clathrin and caveolin-1 proteins was detected by immunoblot using anti-clathrin (BD Biosciences) or anti-caveolin-1 polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Confocal Microscopy—R−/IR-A cells were plated onto coverslips, serum-starved for 24 h, and then stimulated with 200 ng/ml of insulin or IGF-II at various time points at 37 °C. Coverslips were processed for immunofluorescence and confocal analysis, as previously described (18, 25). Antibodies used were: anti-IR polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology), anti-EEA1 monoclonal antibodies, and anti-LAMP1 monoclonal antibodies (BD Pharmingen). Secondary antibodies were Alexa Fluor 488 (green) and Alexa Fluor 594 (red) (Molecular Probes). Coverslips were analyzed and photographed on a Leica TCS-SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with a ×63 Apo PLA oil immersion objective (NA 1.4) and 60-μm aperture using the LEICA Scan TCS-SP2 software (Leica Microsystems).

Endocytosis Inhibitors—The broad-range endocytosis inhibitor methyl-β-cyclodextrin was used at 10 mM. The clathrin-dependent pathway inhibitor chlorpromazine was used at 15 μM, whereas the clathrin-independent endocytosis inhibitor filipin was used at 1 μg/ml. Serum-starved cells were preincubated for 60 min with methyl-β-cyclodextrin or filipin, for 20 min with chlorpromazine, and then tested for IR-A internalization and signaling.

Detection of Activated Signaling Pathways—Serum-starved R−/IR-A cells were stimulated with insulin, IGF-II, or [NMeTyr^{B26}]-insulin (50 ng/ml) at various time points in the absence or presence of endocytosis inhibitors. The activation of Akt, ERK1/2, and S6 ribosomal protein was analyzed by Western immunoblot using the PathScan Multiplex Western Mixture I (Cell Signaling Technology), which provides a mixture of phospho-specific antibodies for different activated proteins and for ElF4E protein to monitor the loading of the samples (26, 27). The kit also includes phosphoantibodies to p90 RSK, which was undetectable in our experiments. Phosphorylation of the IR-A was detected using anti-phospho-IGF-IRβ (Tyr^{1135}/Tyr^{1136})/IRβ (Tyr^{1150}/Tyr^{1151}) antibodies (Cell Signaling Technology), whereas IRS-1 phosphorylation was assessed using either anti-phospho-IRS-1 (Tyr^{612}) or phospho-IRS-1 (Ser^{307}) from Upstate Biotechnology.

Densitometric and Statistical Analysis—Densitometric analysis was performed using a Molecular Dynamics densitometer. Data were analyzed using the ImageQuant program at the Kimmel Cancer Center Nucleic Acid Facility. Values are expressed as arbitrary units. For statistical analysis, all experiments were carried out in triplicate and repeated at least three times. Results are expressed as mean ± S.D. All statistical analyses were carried out with SigmaStat for Windows version 3.10 (Systat Software, Inc., Port Richmond, CA). Results were compared using the two-sided Student's t test or two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

IGF-II and Insulin Differ in Their Ability to Regulate Cell Surface Levels of IR-A—We initially assessed ligand-induced IR-A internalization from the cell surface by ELISA, as described in previous work from our laboratories (17, 18). Insulin stimulation of R−/IR-A cells induced a clear reduction in the level of cell surface IR-A proteins with a maximum effect after 60 min. In contrast, IGF-II promoted only a modest but statistically significant internalization of the IR-A (Fig. 1*A*). To account for the differences in molecular weight between insulin and IGF-II we repeated internalization assays using equimolar concentrations (30 nM) of the two ligands. We found a similar rate of receptor internalization (supplemental Fig. S1), thus corroborating the data presented above.

We have recently shown that ubiquitination of the IGF-IR regulates ligand-dependent receptor internalization (17, 18). Thus, we performed ubiquitination assays in R−/IR-A cells (17, 18) to test whether the different rates of IR-A internalization induced by IGF-II and insulin was due to a different ability of the two ligands to promote IR-A ubiquitination. After transiently transfecting a HA-ubiquitin construct into R−/IR-A cells, we immunoprecipitated the IR-A and assessed receptor ubiquitination by immunoblot with either an anti-ubiquitin or an anti-HA antibody. Some IR-A ubiquitination was detectable in unstimulated cells but was enhanced after ligand stimulation (Fig. 1*B*). Significantly, IGF-II stimulation of R−/IR-A cells

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

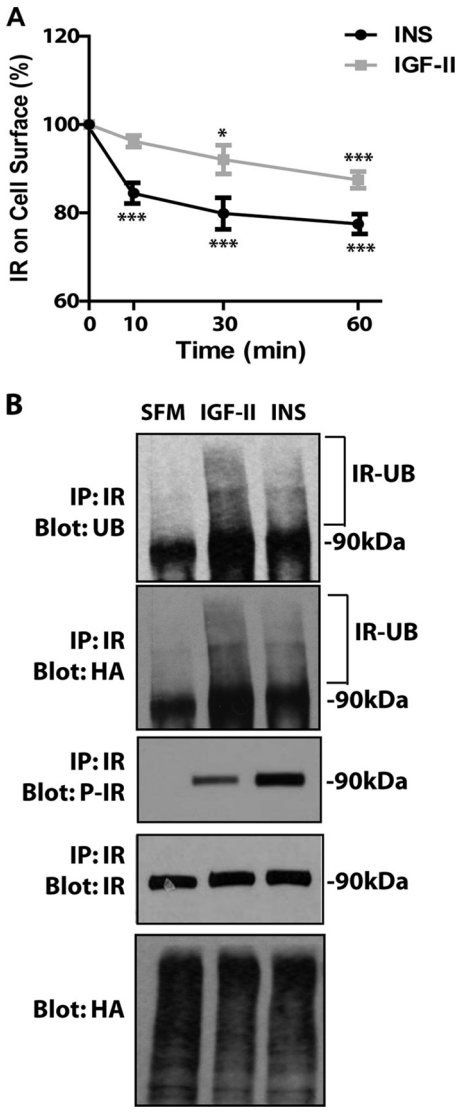


FIGURE 1. **Insulin and IGF-II differentially affect IR-A internalization despite promoting similar levels of IR-A ubiquitination.** *A,* the level of IR-A internalization in R−/IR-A cells was determined by ELISA at different time points after insulin (*INS*) and IGF-II stimulation, as described under "Experimental Procedures." Ligands were used at 200 ng/ml to ensure saturating concentrations. Data are the average ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using Student's *t* test for repeated measures, *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.01$ (INS or IGF-II *versus* SFM) and using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, $p < 0.01$ (INS *versus* IGF-II). *B*, ligand-dependent ubiquitination of the IR-A in R−/IRA cells was assessed as described under "Experimental Procedures" and in previous work from our laboratories (17, 18). The experiment shown is representative of three independent experiments.

induced ubiquitination of the IR-A (17, 18) that was even slightly greater than the ubiquitination induced by insulin, as assessed by both anti-ubiquitin antibodies (which detect endogenous and exogenously transfected ubiquitin) and anti-HA antibodies (which detect exogenously transfected ubiquitin). This difference was not due to either a difference in receptor activation, which, as we have previously reported (7, 11) was phosphorylated at higher levels by insulin (Fig. 1*B*, *P-IR*), or to differences in transfection efficiency of the HA-ubiquitin plasmid, which was comparable in all conditions (Fig. 1*B*, *Blot*: *HA*).

These results demonstrate that IGF-II and insulin clearly differ in their ability to induce IR-A internalization despite inducing similar levels of receptor ubiquitination. Thus, additional mechanisms (including IR-A phosphorylation) are likely more critical in the regulation of IR-A trafficking.

Affinity of Ligand for IR-A Is Important in Regulating IR-A Phosphorylation, Signaling, Proliferation, and Internalization—Next, we tested in R−/IR-A cells several biological read-outs comparing insulin, IGF-II, and the insulin analog [NMeTyr^{B26}]-insulin, which has been previously described (22). This analog has an IR binding affinity 4-fold lower than insulin and comparable with the affinity of IGF-II (22). Because the affinity of [NMeTyr^{B26}]-insulin for the IR was previously determined in rat adipocytes, which prevalently express the IR-B (22, 28), we first assessed the binding affinity of this insulin analog to the IR-A by performing binding assays in IM-9 cells, which have high IR-A expression (23).

The affinity of [NMeTyr^{B26}]-insulin for the IR-A was about 16% (supplemental Fig. S2*A*), which is slightly lower than the 21% we previously determined in rat adipocytes (22). The affinity of IGF-II was instead about 7% of human insulin (supplemental Fig. S2*A*), which is less that 20% expected but in perfect agreement with binding studies recently performed by Gauguin *et al.* (23) in the same IM-9 lymphocytes. These experiments therefore clearly confirm that IGF-II and the insulin analog [NMeTyr^{B26}]-insulin have similar affinity for the IR-A.

We then tested IR-A phosphorylation in R−/IR-A cells after insulin, IGF-II, and [NMeTyr^{B26}]-insulin stimulation. Insulin at 30 nM (~200 ng/ml) induced strong IR-A phosphorylation, which was instead reduced after IGF-II stimulation (supplemental Fig. S2*B*). Importantly, the [NMeTyr^{B26}]-insulin analog induced IR-A phosphorylation at levels similar to IGF-II (supplemental Fig. S2*B*). To exclude the possibility that the differences in IR-A phosphorylation and therefore internalization between insulin and IGF-II were affected by the concentration of ligands in the supraphysiological range, we also tested IR-A phosphorylation at 1 and 5 nM concentration of ligands, which are in the physiological range for insulin. The phosphorylation of IR-A induced by insulin, IGF-II, and [NMeTyr^{B26}]-insulin in R−/IR-A cells showed a similar pattern at 1 and 5 nM (supplemental Fig. S2*B*), confirming the validity of our results at 200 ng/ml.

To characterize further the biological properties of [NMeTyr^{B26}]-insulin in comparison with insulin and IGF-II we first determined by immunoblot the activation of Akt and ERK1/2, the two major downstream effectors of IR-A signaling, which are critical for IR-A-dependent proliferation (7, 11).

In agreement with previously published data (7, 11), insulin promoted prolonged Akt activation, which was less pronounced ($p < 0.05$) after stimulation by both IGF-II and [NMeTyr^{B26}]-insulin at all concentrations tested (supplemental Fig. S2*C*). On the other end, ERK1/2 activation by all growth factors peaked at 10 min of ligand stimulation (supplemental Fig. S2*C*) but remained more sustained after insulin stimulation compared with IGF-II and [NMeTyr^{B26}]-insulin at 1 and 5 nM concentrations but was similar (NS) with all three ligands at 30 nM (supplemental Fig. S2*C*).

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

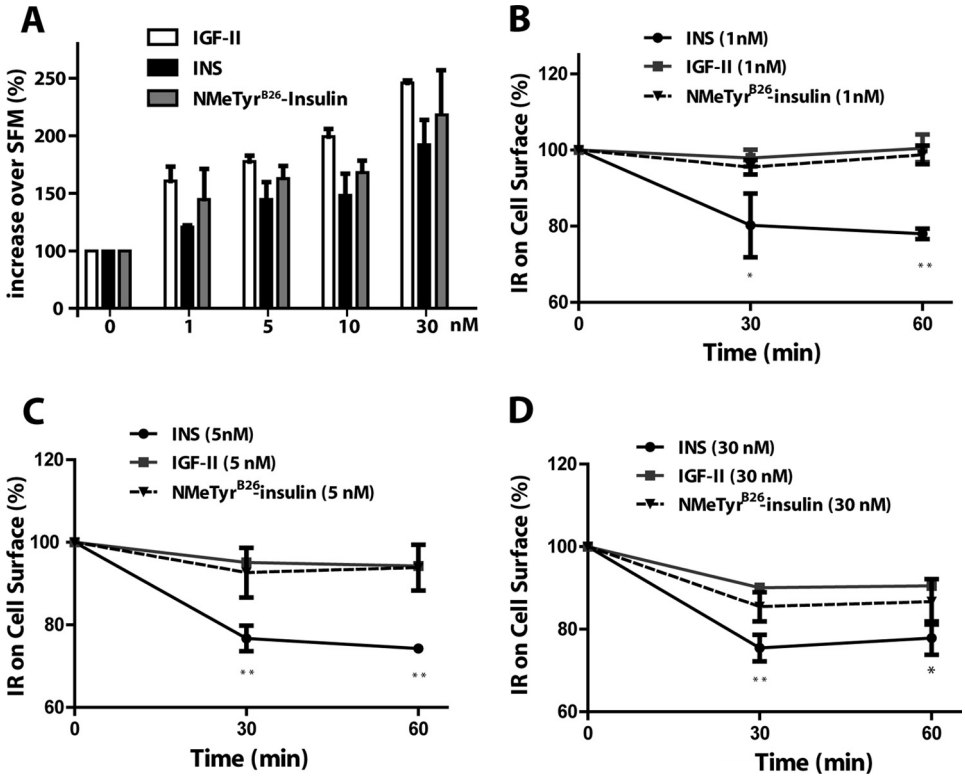


FIGURE 2. **Ligand affinity for the IR-A modulates cell growth and internalization.** *A*, growth curve experiments were performed as previously described from our laboratories (7, 11, 19). Cells were counted in Boyden chambers after 48 h and values are expressed as % increase over SFM. Data are the averages ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using two-way ANOVA: $p < 0.02$, insulin *versus* IGF-II stimulation curve; $p < 0.05$, insulin *versus* [NMeTyr^{B26}]-insulin stimulation curve. *B–D*, the level of IR-A internalization in R−/IR-A cells was determined by ELISA at different time points after insulin (*INS*), IGF-II, or [NMeTyr^{B26}]-insulin stimulation, as described under "Experimental Procedures." Data are the averages ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using Student's *t* test for repeated measures, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (INS, IGF-II or [NMeTyr^{B26}]-insulin *versus* SFM) and using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (INS *versus* IGF-II or [NMeTyr^{B26}]-insulin).

As IGF-II is a more potent mitogen than insulin despite its lower affinity for the IR-A and the reduced ability to promote IR-A phosphorylation (7, 11), it is reasonable to assume that the [NMeTyr^{B26}]-insulin analog, which has an affinity in the range of IGF-II, could be as well a more potent mitogen than insulin. Indeed, at all equimolar concentrations tested, [NMeTyr^{B26}]-insulin induced cell growth at significantly higher levels than insulin with values very similar to IGF-II, as determined by growth curves assays in R−/IR-A cells (Fig. 2*A*). Moreover, the [NMeTyr^{B26}]-insulin analog also induced low levels of IR-A internalization (at all ligand concentrations) in comparison to insulin, with a rate very similar to IGF-II (Fig. 2, *B–D*).

Collectively, these results support the hypothesis that different affinities of the various hormone/ligands could play an important role in modulating receptor phosphorylation, internalization from the cell membrane, and signaling, thereby modulating IR-A downstream biological responses. In addition, these results confirm that the concentration used for the internalization assays (and in subsequent experiments in the manuscript) perfectly recapitulates the results obtained at physiological concentrations.

Insulin but Not IGF-II Induces IR-A and IRS-1 Down-regulation—Next, we determined in R−/IR-A cells whether prolonged stimulation with IGF-II or insulin differentially affected IR-A stability. Total IR-A levels were decreased by 8 h of insulin stimulation and further decreased by 24 h (Fig. 3*A*). In contrast, IGF-II exerted only a modest effect on IR-A levels, which were reduced by only ~15% after 24 h. Concurrently, insulin markedly reduced the levels of the docking protein IRS-1 (Fig. 3*A*), one of the major downstream effectors of IR signaling that leads to cell proliferation and transformation (29, 30). In contrast, IGF-II stimulation had no effect on IRS-1 levels (Fig. 3*A*). Interestingly, prolonged insulin or IGF-II stimulation of R−/IR-A cells had no effect in regulating the levels of either Shc or IRS-2 (Fig. 3*A*), two other components of the IR-A downstream signaling pathway (31–33).

Because insulin and IGF-I-dependent IRS-1 degradation is regulated by PI3K-dependent serine phosphorylation of IRS-1 (34, 35), we utilized phospho-specific antibody for IRS-1 Ser^{307}. Insulin stimulation of R−/IR-A cells induced a significant phosphorylation of Ser^{307} at 10 min and this was sustained for up to 1 h (Fig. 3*B*). On the contrary, IGF-II promoted phosphorylation of IRS-1 Ser^{307} with significantly slower kinetics insofar as it reached levels comparable with insulin only after 60 min of IGF-II stimulation (Fig. 3*B*). These results suggest that the inability of IGF-II to promote IRS-1 degradation correlate to a reduced capacity of IGF-II to promote IR-A-dependent serine phosphorylation of IRS-1.

It has been shown (36) that in HeLa/IR cells insulin-induced IR degradation was inhibited by proteosomal inhibitors. However, it was not established whether IR stability was sensitive to inhibitors of the lysosomal pathway, which is the major route of degradation of RTKs (15, 37). To investigate the pathway(s) responsible for ligand-dependent degradation of the IR-A in

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

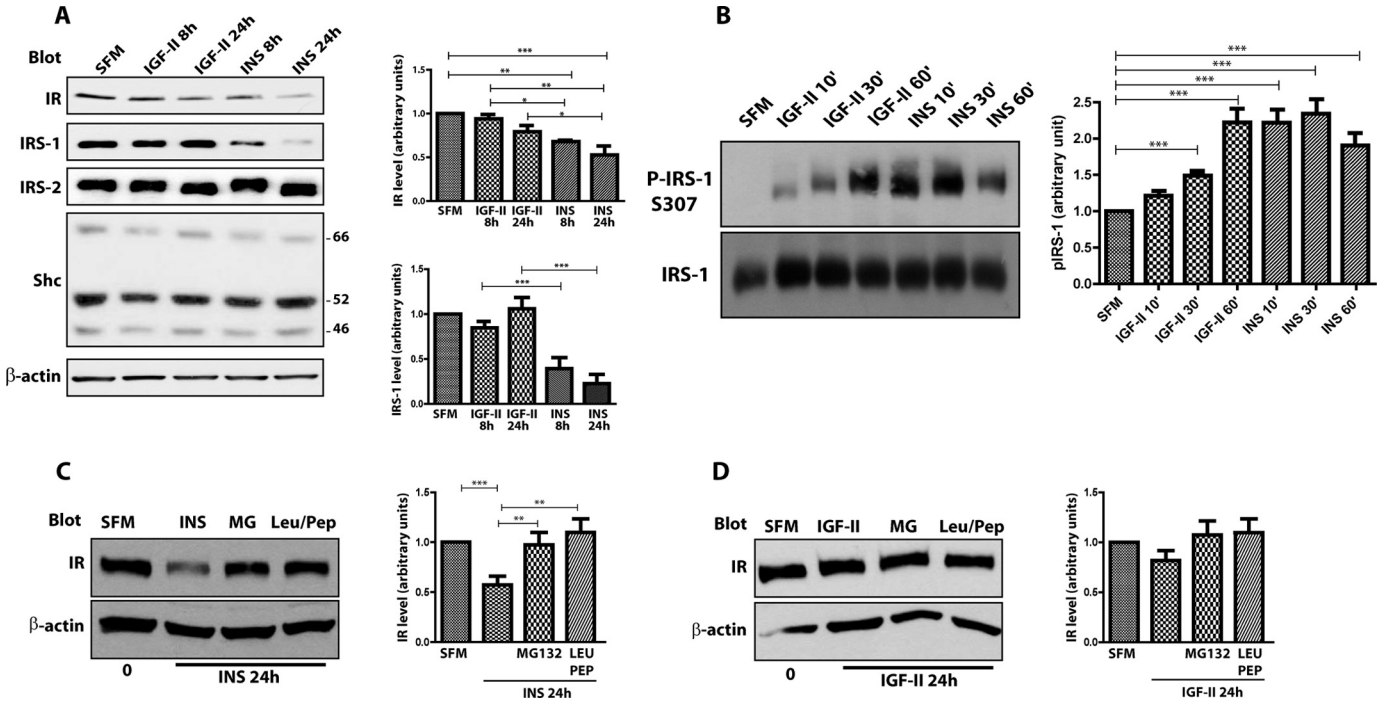


FIGURE 3. **Insulin and IGF-II differ in their ability to regulate IR-A and IRS-1 stability.** *A*, R−/IR-A cells were serum starved for 24 h and then stimulated with 50 ng/ml of insulin (*INS*) or IGF-II for the indicated time points. Proteins levels were determined by immunoblot analysis with specific polyclonal antibodies, as described under "Experimental Procedures." *B,* serum-starved R−/IR-A cells were stimulated at the different time points with insulin and IGF-II (50 ng/ml). Serine phosphorylation of IRS-1 was determined by immunoblot using phospho-specific antibodies for Ser^{307}. Total IRS-1 was assessed using anti-IRS-1 polyclonal antibodies. Densitometric analysis is expressed as arbitrary units. *B*, serine phosphorylation of IRS-1 was assessed by immunoblot using phospho-specific antibodies for serine 307. Blots are representative of three independent experiments. *C* and *D,* to assess the stability of the IR-A in the presence of specific inhibitors for either the proteasomal or lysosomal pathway, serum-starved R−/IR-A cells were stimulated for 24 h with 50 ng/ml of insulin (*INS*) (*C*) or IGF-II (*D*) alone or supplemented with 20 μM MG132 (*MG*) or 100 μM leupeptin/pepstatin (*Leu/Pep*). IR levels were assessed by immunoblot. The total amount of protein loaded on the gel was monitored using anti-β-actin polyclonal antibodies (*A*–*E*). Quantification was performed by densitometry using NIH ImageJ software. The data are presented as mean ± S.D. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

R−/IR-A cells, we assessed IR-A levels by immunoblot after 24 h stimulation of insulin or IGF-II alone or in the presence of either the proteosomal inhibitor MG132 (20 μM) or the lysosomal inhibitor pepstatin/leupeptin mixture (100 μM). Treatment with leupeptin/pepstatin was as effective as MG132 in stabilizing the IR-A protein upon prolonged insulin stimulation (Fig. 3*C*), whereas the difference after IGF-II stimulation was not statistically significant due to the very limited effect of IGF-II on IR-A degradation (Fig. 3*D*). These results indicate that, in addition to the proteosomal pathway, the lysosomal pathway also plays an important role in down-regulation of the IR-A in R−/IR-A cells.

To confirm the results of the experiments of IR-A and IRS-1 stability at equimolar and physiological concentrations of insulin, we determined IR-A and IRS-1 levels after prolonged stimulation of R−/IR-A cells with 5 nM insulin and IGF-II. We also exposed the cells to the same concentration of [$NMeTyr^{B26}$]-insulin as an additional control. Although prolonged insulin stimulation induced IR-A degradation, both IGF-II and [$NMeTyr^{B26}$]-insulin did not affect IR-A levels in R−/IR-A cells (supplemental Fig. S3). Concurrently, 5 nM insulin reduced IRS-1 levels, which were not affected by an equimolar concentration of IGF-II (supplemental Fig. S3). [$NMeTyr^{B26}$]-Insulin was more effective than IGF-II in promoting IRS-1 degradation although at lower levels than insulin (supplemental Fig. S3). These results strongly support the data obtained at 200 ng/ml (30 nM), and further strengthen the hypothesis that the different abilities of insulin and IGF-II to regulate IR-A and IRS-1 stability contributes to the difference in mitogenic responses between insulin and IGF-II.

We should point out that in the experiments presented in Figs. 1–3 we used mouse embryo fibroblasts null for the *IGF-IR* and overexpressing solely IR-A. It is important to point out that the results of these experiments may not be equally clear in other cellular models that would coexpress the IGF-IR, which, by binding the IGF-II, could obscure IGF-II action on the IR-A. However, it can be argued that R−/IR-A cells do not exactly represent a physiological or pathological model where the IR-A is expressed in conjunction with the IGF-IR. To address this issue, we performed IGF-II and insulin-mediated internalization assays in NIH3T3/IR-A cells, which express physiological levels of IR-A and endogenous IGF-IR (supplemental Fig. S4*A*) and in R+/IR-A cells, which are R−/IR-A cells in which the IGF-IR has been reintroduced (supplemental Fig. S4*B*). In both cell lines insulin promoted IR-A internalization, whereas IGF-II was ineffective (supplemental Fig. S4, *A* and *B*). As demonstrated in R−/IR-A cells, also in R+/IR-A, prolonged stimulation with insulin, but not with IGF-II, affected IR-A and IRS-1 stability.

Parallel experiments were also performed in a pathological cell model using MDA-MB-157 breast cancer cells, which coexpress the IGF-IR together with high levels of endogenous IR-A

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

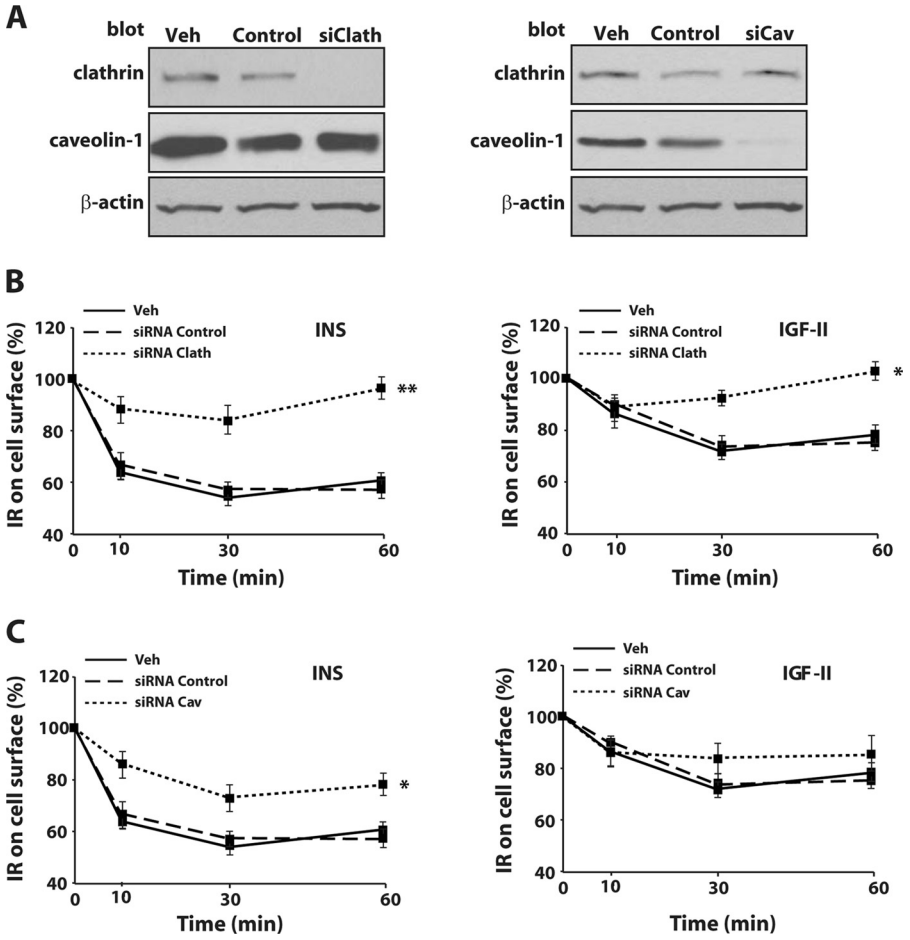


FIGURE 4. **Depletion of endogenous clathrin and caveolin-1 inhibits ligand-dependent internalization of the IR-A.** *A,* gene knockdown for clathrin and caveolin-1 in R−/IR-A cells was achieved by siRNA. Level of clathrin and caveolin-1 in vehicle (*Veh*), control oligo (*Control*), and siRNA-treated (*siClath* or *siCav*) cells were assessed by immunoblot using anti-clathrin- and anti-caveolin-1-specific polyclonal antibodies. Total protein load was assessed using anti-β-actin polyclonal antibodies. Blots are representative of three independent experiments. Insulin and IGF-II-mediated internalization of the IR-A in R-IR-A cells depleted of endogenous clathrin (*B*) or caveolin-1 (*C*) was assessed by ELISA 72 h post-transfection. The data are presented as mean ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ (siRNAs *versus* oligo-control-treated cells).

(supplemental Fig. S4*C*). Here, insulin, but not IGF-II, induced IR-A internalization (supplemental Fig. S4*C*). However, similarly to previously published data (38, 39), we did not detect degradation of either IR-A or IRS-1 after prolonged insulin stimulation (data not shown) suggesting that aggressive breast cancer cells may escape IR-A degradation and the negative feedback loop regulating IRS-1 stability. These data confirm the results obtained in R−/IR-A cells and indicate that IGF-II and insulin differ in their ability to regulate IR-A internalization even in additional physiological or pathological cell models expressing IR-A in conjunction with IGF-IR.

IR-A Is Internalized through Clathrin-dependent and -independent Pathways—Because the pathways that mediate IR-A internalization are not yet characterized, we assessed ligand-evoked internalization of the IR-A in R−/IR-A cells. Concurrently, we employed small interference RNA (siRNA) strategies to target endogenous expression of clathrin or caveolin-1, two critical components of the clathrin-dependent and -independent pathways, respectively (40–42). Our approach yielded a substantial suppression of endogenous clathrin protein expression (Fig. 4*A*) and a concurrent significant inhibition of insulin and IGF-II-mediated IR-A internalization (Fig. 4*B*). Suppression of endogenous caveolin-1 expression (Fig. 4*A*) was as effective as clathrin depletion but it resulted only in a modest although statistically significant reduction in the level of insulin-dependent internalization of the IR-A (Fig. 4*C*), whereas the difference in IGF-II-induced internalization was not statistically significant (Fig. 4*C*). These results suggest that insulin and IGF-II stimulation lead to clathrin-dependent and -independent IR-A internalization, although clathrin-dependent endocytosis may play a prevalent role in the process.

IR-A Is Preferentially Degraded via Clathrin-dependent Endocytosis—To determine the contribution of clathrin-dependent and -independent pathways to the regulation of IR-A stability, we utilized clathrin and caveolin-1-specific siRNA, and monitored IR-A levels by immunoblotting analysis. We found that IR-A degradation induced by prolonged insulin stimulation of R−/IR-A cells was significantly inhibited by depletion of clathrin (Fig. 5*A*). On the contrary, depletion of endogenous caveolin-1 was ineffective in stabilizing IR-A protein levels, whose difference was statistically significant only

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

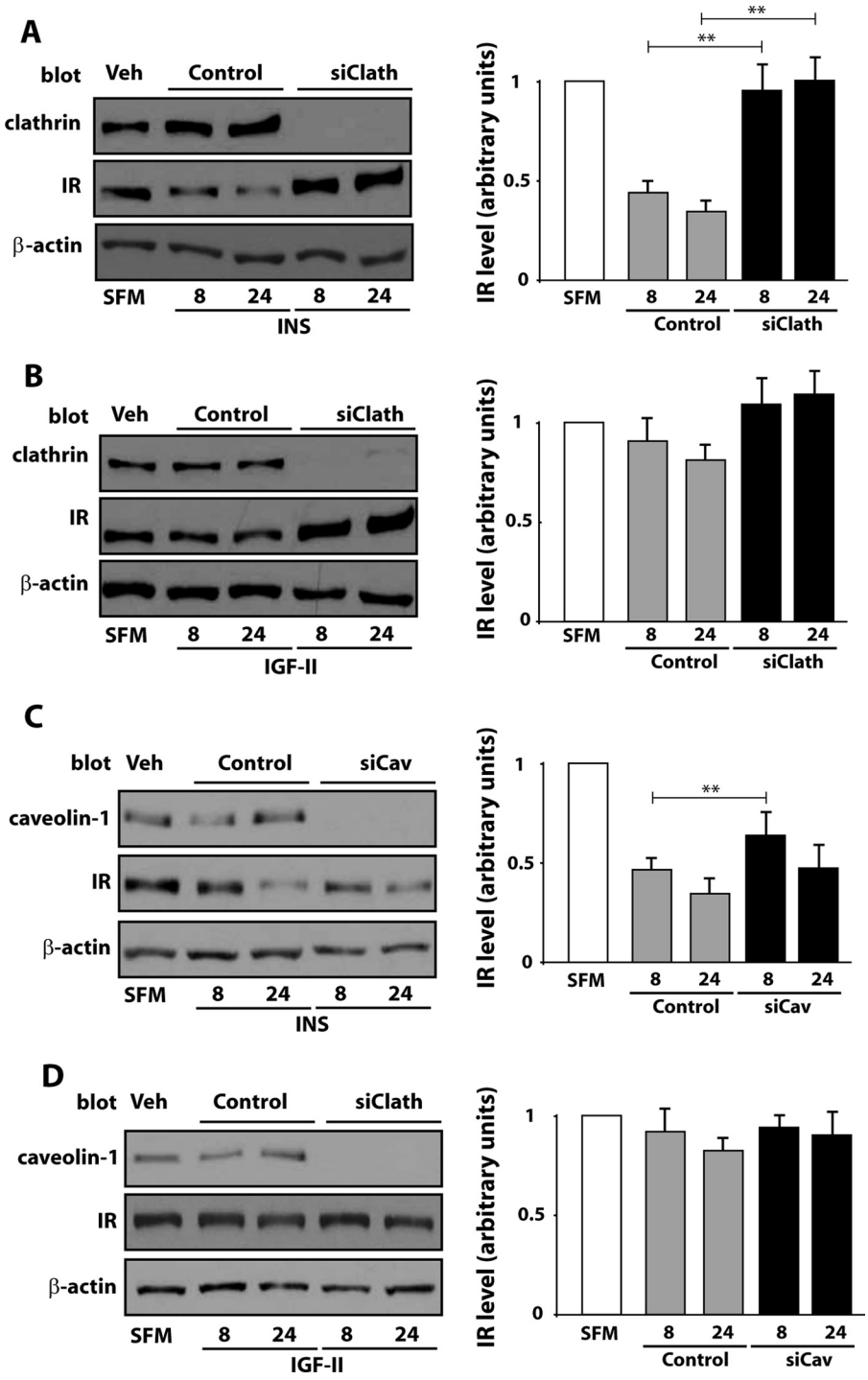


FIGURE 5. **Clathrin-dependent endocytosis is required for insulin-induced IR-A degradation.** Gene knockdown for clathrin and caveolin-1 in R−/IR-A cells was achieved by siRNAs. IR-A levels were determined in clathrin-depleted (*A* and *B*) or caveolin-1-depleted (*C* and *D*) R−/IR-A cells by immunoblot after stimulation with insulin or IGF-II for 8 and 24 h. IR-A, clathrin, and caveolin-1 expression was assessed using anti-IR (*A–D*), anti-clathrin (*A*), and anti-caveolin-1 (*B*) polyclonal antibodies. Protein load was assessed using anti-β-actin polyclonal antibodies. Results are expressed as average ± S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. **, $p < 0.01$.

after 8 h of insulin stimulation (Fig. 5*C*). The same results were obtained after IGF-II stimulation, although the differences in the level of IR-A protein between clathrin-depleted (Fig. 5*B*), caveolin-depleted (Fig. 5*D*), and control-transfected R−/IR-A cells were not statistically significant due to a low level of IR-A degradation induced by IGF-II in these cells. Collectively, these results indicate that insulin-evoked degradation of the IR-A is preferentially regulated by the clathrin-dependent endocytosis pathway.

Insulin and IGF-II Differentially Regulate Sorting of IR-A—To investigate further insulin- and IGF-II-induced sorting of the IR-A, we employed confocal microscopy analysis to test whether the IR-A colocalized with EEA1, a marker of early endosomes, or with LAMP-1, a marker of lysosomes (40). In

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

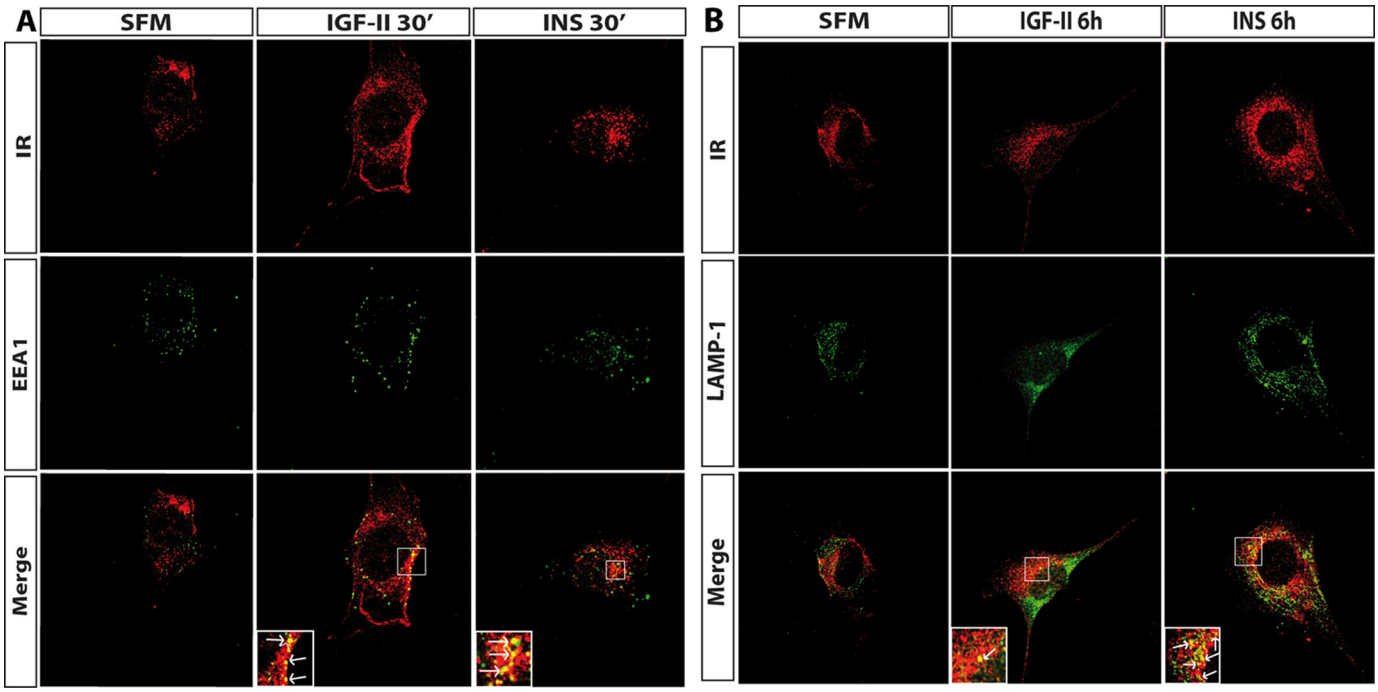


FIGURE 6. **Insulin and IGF-II induce different sorting of the IR-A.** R−/IR cells were plated onto coverslips and serum starved for 24 h. Cells were then stimulated with 200 ng/ml of either insulin or IGF-II for the indicated time points. Co-localization of the IR-A with either EEA1 (*A*) or LAMP-1 (*B*) was assessed by confocal microscopy, as described under "Experimental Procedures." *Insets* represent enlarged views (×3) of the *boxed regions*. *Insets* include *arrows* that point to *single isolated dots* where colocalization between the IR-A and either EEA1 or LAMP-1 is evident. Images were collected on a Leica TCS-SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) with a ×63 Apo PLA oil immersion objective (NA 1.4) and 60-μm aperture using LEICA Scan TCS-SP2 software (Leica Microsystems). Images were merged using Photoshop 6. Pictures are representative of at least 10 independent fields from three independent experiments. Fields were selected for the presence of cells with the following criteria: well defined limits, clear identification of nucleus, and absence of intersection with neighboring cells. An average of 300 cells was examined for each condition. Data are representative of ~90% of the total number of cells examined.

unchallenged R−/IR-A cells, there was no colocalization of IR-A with EEA1 (Fig. 6*A*). After IGF-II or insulin stimulation, the IR-A colocalized in EEA1-positive endosomes (Fig. 6*A*). In contrast, whereas insulin stimulation of R−/IR-A cells induced a significant colocalization of IR-A with LAMP-1, which increased between 2 and 6 h of insulin stimulation (Fig. 6*B*), we did not detect significant colocalization between the IR-A and LAMP-1 after IGF-II stimulation (Fig. 6*B*).

Collectively, these results indicate that insulin and IGF-II significantly differ in their ability to regulate IR-A sorting. Upon insulin stimulation the IR-A is significantly internalized from the cell surface and sorted from early endosomes into the lysosomal/degradative compartment, whereas IGF-II activation of the IR-A promotes less efficient internalization of the receptor, which is sorted initially into early endosomes but does not reach the late endosome/lysosomal compartment, thereby being likely recycled to the cell surface.

Pharmacological Inhibition of IR-A Endocytosis Affects Downstream Signaling—Next, we determined insulin and IGF-II-evoked activation of the Akt and MAPK pathways in R−/IR-A cells, as a read-out of IR-A-induced signaling (7, 11). Concurrently, we utilized well characterized pharmacological inhibitors of the endocytic pathway. Initially, we tested a general inhibitor of endocytosis methyl-β-cyclodextrin, which extracts cholesterol from membranes and affects both clathrin-dependent and -independent pathways (41–43). As control, we tested by ELISA the effect of methyl-β-cyclodextrin on IR-A internalization. Methyl-β-cyclodextrin inhibited both insulin and IGF-II-induced IR-A internalization (Fig. 7*A*), although the effect after IGF-II stimulation was less evident due to low level of receptor internalization.

To investigate the impact of endocytosis on IR-A signaling we determined the activation of IRS-1, Akt, ERK1/2, and p70 S6K after insulin or IGF-II stimulation by immunoblot analysis using phosphospecific antibodies. We also assessed IR-A phosphorylation as control to rule out that the inhibitor may affect internalization by interfering with ligand-mediated activation of the IR-A.

Activation of the IR-A by either insulin or IGF-II was not affected by methyl-β-cyclodextrin, even though the inhibitor had some effects on the kinetics of receptor activation (Fig. 7*B*). Methyl-β-cyclodextrin exposure increased early IR-A phosphorylation (up to 10 min) and slightly decreased the sustained activation of the receptor (30 and 60 min). A similar effect was detectable with IRS-1 tyrosine phosphorylation, which was only affected after prolonged insulin or IGF-II stimulation (Fig. 8*B*). Significantly, methyl-β-cyclodextrin had instead a major effect on serine phosphorylation of IRS-1 and downstream signaling molecules, abolishing Akt and ERKs activation but only slightly reducing p70 S6K phosphorylation mediated by both insulin and IGF-II.

The effect of methyl-β-cyclodextrin on endocytosis and signaling was also assessed in R−/IR-A cells stimulated with equimolar concentrations of the insulin analog [NMeTyr^{B26}]-insulin. Although methyl-β-cyclodextrin was less effective in inhibiting the prolonged IR-A phosphorylation induced by the analog compared with insulin and IGF-II (Fig. 7, *A* and *B*), the inhibitory effect on internalization of IRS-1, Akt, ERK1/2, and

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

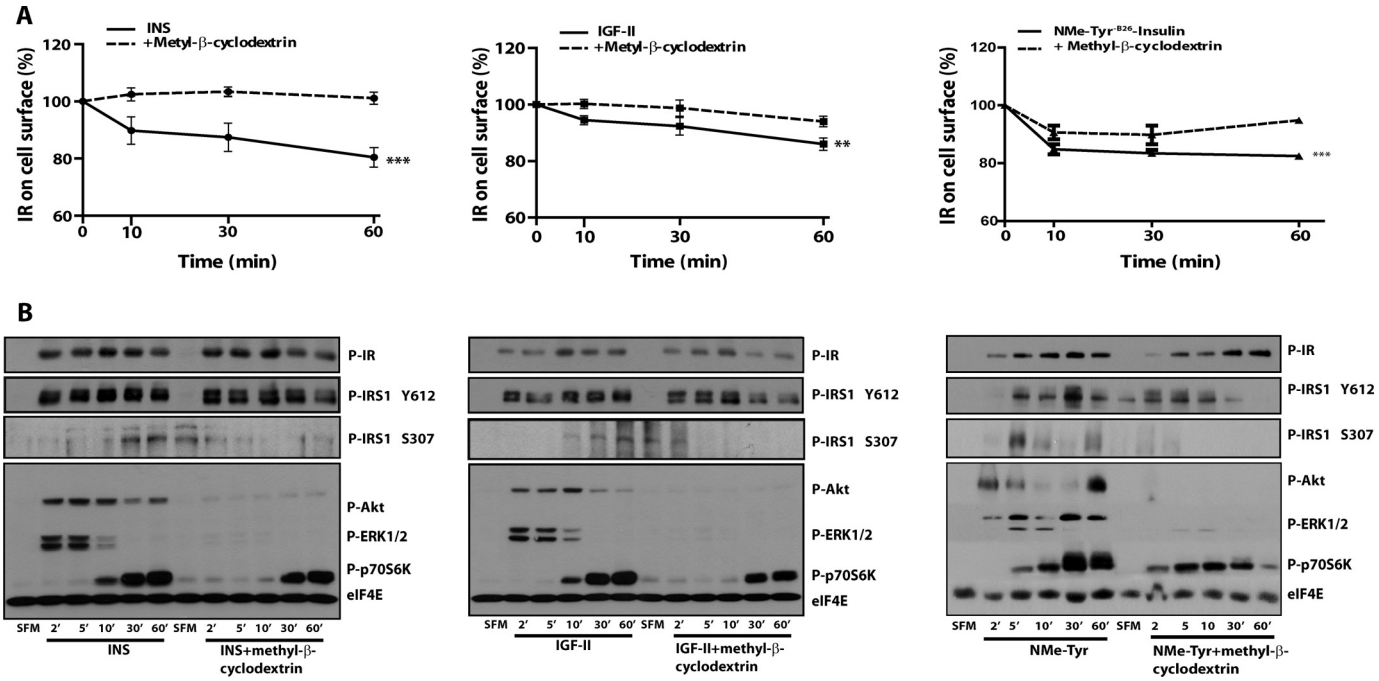


FIGURE 7. **Pharmacological inhibition of clathrin-dependent and -independent endocytosis pathways blocks IR-A internalization and regulates IR-A signaling.** *A*, the level of IR-A internalization in R−/IR cells was determined by ELISA. Cells were serum starved for 24 h, pre-treated with 10 mM of methyl-β-cyclodextrin for 1 h, and then stimulated with 200 ng/ml of insulin (*INS*), IGF-II, or [NMeTyr^{B26}]-insulin alone or supplemented with methyl-β-cyclodextrin. Data are the average ± S.D. of three independent experiments carried out in quadruplicate. Statistical significance was determined using two-way ANOVA, ***, $p <$ 0.0001 (INS *versus* INS + methyl-β-cyclodextrin and [NMeTyr^{B26}]-insulin *versus* [NMeTyr^{B26}]-insulin + methyl-β-cyclodextrin); **, $p < 0.005$ (IGF-II *versus* IGF-II + methyl-β-cyclodextrin). *B*, cells were serum starved for 24 h, pre-treated in SFM alone, or supplemented with 10 mM methyl-β-cyclodextrin for 1 h and then stimulated with 50 ng/ml of insulin (*INS*), IGF-II, or [NMeTyr^{B26}]-insulin alone or supplemented with methyl-β-cyclodextrin for the indicated time points. Effect of methyl-β-cyclodextrin on insulin and IGF-II-dependent IR-A, IRS-1, Akt, ERK1/2, and p70 S6K phosphorylation was assessed by immunoblot using phospho-specific antibodies as described under "Experimental Procedures." Blots are representative of three independent experiments.

p70 S6K phosphorylation perfectly recapitulated the one obtained in the presence of insulin and IGF-II (Fig. 7, *A* and *B*).

To gain further insight into the role that IR-A internalization plays in regulating IR-A signaling, we assessed whether clathrin-dependent and -independent endocytosis may have different effects in regulating insulin- and IGF-II-evoked activation of IR-A downstream signaling. To this end, we selectively targeted clathrin-dependent and -independent pathways by using inhibitors that specifically inhibit either endocytic pathway. We used the cationic amphiphilic drug chlorpromazine, which specifically inhibits clathrin-dependent endocytosis by affecting the membrane localization of AP2, another essential component of clathrin-coated vesicles (44, 45). To target clathrin-independent endocytosis, we used filipin, a polyene antibiotic that acts as a cholesterol chelator without extracting sterols from membranes (41, 42). ELISAs performed in R−/IR-A cells confirmed that both chlorpromazine and filipin inhibited IR-A internalization from the cell surface after insulin and IGF-II stimulation (Fig. 8*A*). We then tested by immunoblot analysis the effect of the inhibitors on IR-A activation and downstream signaling. Notably, both chlorpromazine (Fig. 8*B*) and filipin (Fig. 8*C*) had no significant effects on IR-A or IRS-1 tyrosine phosphorylation levels at early time points, but they diminished the sustained tyrosine phosphorylation of IRS-1 induced by insulin and IGF-II (after 30 and 60 min). Chlorpromazine increased basal and ligand-induced serine phosphorylation of IRS-1 at early time points but reduced the prolonged phosphorylation particularly after 60 min of ligand stimulation (Fig. 8*B*). Significantly, chlorpromazine strongly inhibited Akt activation induced by both insulin and IGF-II (Fig. 8*B*), whereas it promoted a higher basal and a more prolonged activation of ERK proteins. In contrast, filipin severely affected serine phosphorylation of IRS-1 and ERKs activation by both insulin and IGF-II (Fig. 8*C*), whereas the reduction of Akt activation was more pronounced in IGF-II-stimulated cells than after insulin stimulation, which was affected mostly after 30 and 60 min (Fig. 8*C*). Both inhibitors slightly increased basal and early activation of p70 S6K induced by both insulin and IGF-II. It is noteworthy that these experiments (and the experiments presented in Fig. 7) were designed to assess the differences in downstream signaling between ligands in the presence or absence of endocytosis inhibitors and that insulin, IGF-II, and [NMeTyr^{B26}]-insulin-stimulated (Fig. 7) samples were run on separate gels. One should be cautious, therefore, in comparing insulin and IGF-II signaling from different blots. This differential signaling was, however, addressed in detail in previous work from our laboratories (7, 11) and as described above.

Altogether, these results clearly indicate that endocytosis does not play a major role in regulating IR-A or IRS-1 early tyrosine phosphorylation, which occurs at the plasma membrane, but it plays a role in sustaining a prolonged receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation. In contrast, serine phosphorylation of IRS-1 seems to be severely regulated by clathrin-independent endocytosis. Moreover, our data suggest that upon insulin and IGF-II stimulation, clathrin-dependent endocytosis is critical for IR-A-dependent activation of Akt, whereas clathrin-independent endocytosis

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

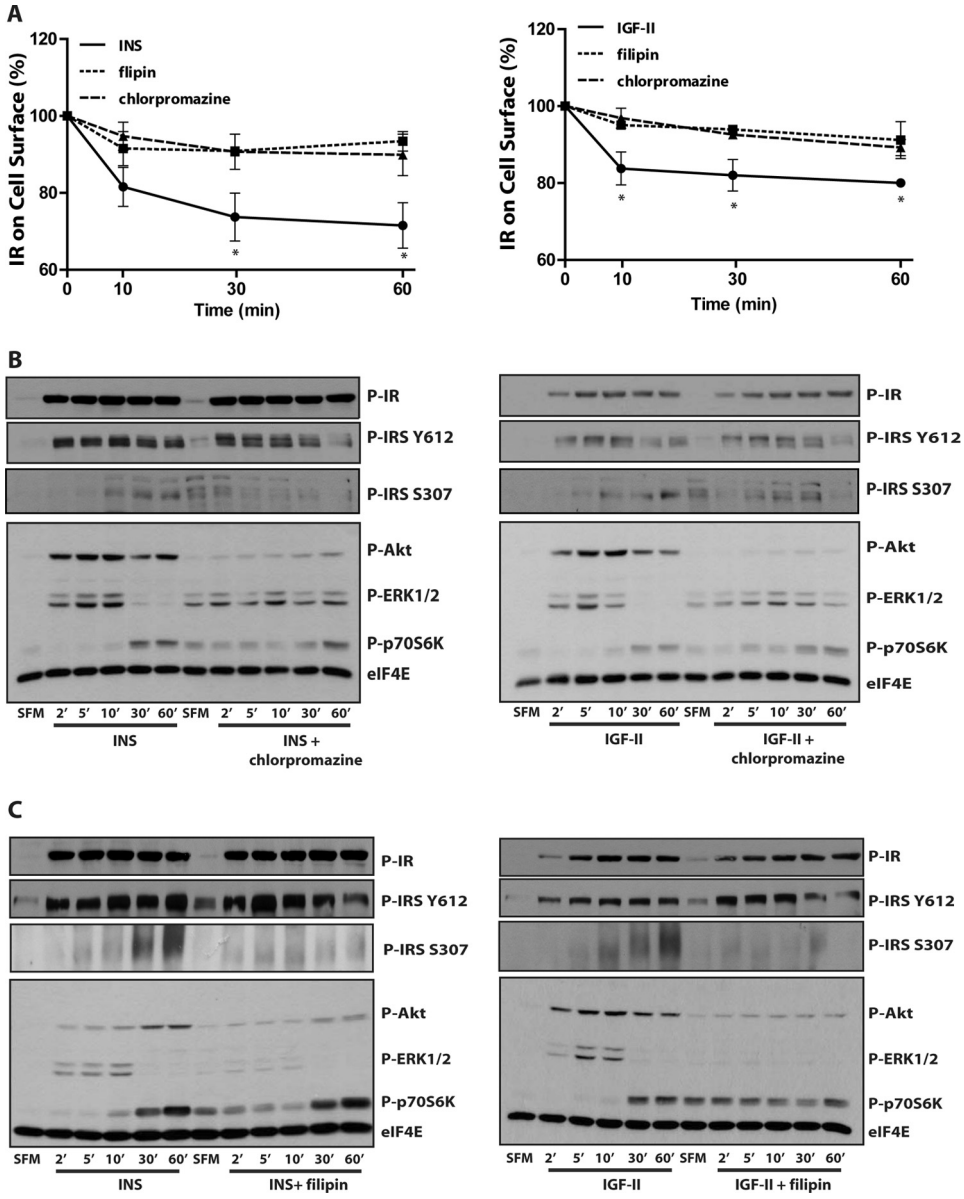


FIGURE 8. **Pharmacological inhibition of either clathrin-dependent or -independent endocytosis blocks IR-A internalization and specifically affects IR-A signaling.** *A*, R−/IR-A cells were serum starved for 24 h, pre-treated for 1 h with either 1 μg/ml of filipin or 15 μM chlorpromazine, and then stimulated with 200 ng/ml of insulin (*INS*) or IGF-II alone or in the presence of the specific inhibitors. IR-A internalization was determined by ELISA. Data are the average ± S.D. of three independent experiments carried out in quadruplicates. Statistical significance was determined using Student's *t* test for repeated measures, *, $p < 0.05$ (INS *versus* INS + filipin; INS *versus* INS + chlorpromazine); *, $p < 0.05$ (IGF-II *versus* IGF-II + filipin; IGF-II *versus* IGF-II + chlorpromazine). *B* and *C*, cells were serum-starved for 24 h, pretreated for 1 h in SFM alone, or supplemented with either 1 μg/ml of filipin or 15 μM chlorpromazine and then stimulated with 200 ng/ml of insulin (*INS*) or IGF-II alone or in the presence of the specific inhibitors. *B*, effect of chlorpromazine, and *C*, filipin on insulin and IGF-II-dependent IR-A, IRS-1, Akt, ERK1/2, and p70 S6K phosphorylation was assessed by immunoblot using phosphospecific antibodies. Blots are representative of three independent experiments.

may prevalently regulate IR-A-dependent activation of ERKs and to a lesser extent Akt activation. Interestingly, p70 S6K activation was slightly affected and may be even increased by IR-A internalization inhibition. The relative independence of p70 S6K activation by IR-A internalization is in close agreement with our previous findings demonstrating that, although IGF-II is clearly less potent than insulin in promoting IR-A and Akt phosphorylation, it is approximately as effective as insulin in activating p70 S6K (46).

DISCUSSION

In the present study we tested the hypothesis that insulin and IGF-II could affect IR-A biological responses by differentially regulating IR-A trafficking and stability. For these experiments we used a unique model of mouse embryo fibroblasts lacking the IGF-IR and overexpressing solely the IR-A (11). Our main results can be summarized as follows. (i) Insulin stimulation of R−/IR-A cells promotes IR-A internalization, which is instead only modestly induced by IGF-II stimulation. (ii) The difference in internalization is not due to IR-A ubiquitination, which is comparable in IGF-II and insulin-stimulated R−/IR-A cells. (iii) The insulin analog [NMeTyr^{B26}]-insulin, which has lower affinity than insulin for IR-A, promotes IR-A phosphorylation, internalization, and proliferation at levels comparable with IGF-II. (iv) Prolonged stimulation of R−/IR-A cells with insu-

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

lin, but not with IGF-II or [NMeTyr^{B26}]-insulin, targets the IR-A for degradation through both proteosomal and lysosomal pathways. (v) The different rates of receptor internalization mediated by insulin and IGF-II are conserved in three additional non-transformed and transformed cell lines where the IR-A is coexpressed at different levels with the IGF-IR. (vi) IRS-1 is down-regulated as well after prolonged insulin exposure but not after IGF-II exposure. (vii) Upon insulin or IGF-II stimulation, the IR-A is internalized through clathrin-dependent and -independent pathways, but only the clathrin-dependent internalization is required for IR-A degradation. (viii) Clathrin-dependent and -independent endocytosis differentially regulates the activation of IR-A downstream effectors.

Previously published work (47) has established that the IR, similarly to other RTKs, is internalized from the cell surface upon ligand stimulation. The majority of work has been concentrated on endocytosis of the IR through clathrin-coated vesicle-mediated internalization (47, 48), but reports have also suggested that additional pathways may be important for IR internalization (49). More recent data have in fact pointed out a role of caveolae in mediating rapid insulin-dependent internalization of the IR (45, 50). The majority of these experiments were performed in adipocytes, which preferentially express the IR-B isoform (7, 8) and exclusively upon insulin stimulation. Our study provides the first characterization of IR-A internalization in the presence of both insulin and IGF-II and provides strong evidence that contributes to elucidate the differences in downstream biological effects mediated by insulin and IGF-II through the IR-A.

Ligand-mediated ubiquitination of RTKs is a critical step in promoting receptor endocytosis (51), and recent data from our laboratories has demonstrated that IGF-I-mediated ubiquitination of the IGF-IR regulates receptor internalization and degradation (17, 18). Compared with insulin, IGF-II stimulation of the IR-A induces only a modest internalization of the receptor, which cannot be explained by a difference in the level of IR-A ubiquitination, as in fact IGF-II induced a slightly higher level of IR-A ubiquitination compared with insulin. These results therefore suggest that IR-A ubiquitination is not essential in promoting receptor internalization and that additional mechanisms may be more critical in the regulation of early events of IR-A endocytosis.

Recent biochemical evidence from several laboratories including ours suggests that RTKs may not be exclusively polyubiquitinated (addition of a polyubiquitin chain to a single lysine residue) but also monoubiquitinated at multiple sites (multiubiquitinated) with different effects on receptor endocytosis, down-regulation, or signaling (18, 52, 53). In the present work, the ubiquitination experiments only compared the total levels of IR-A ubiquitination induced by either insulin or IGF-II but did not address qualitatively the type of ubiquitin modifications on IR-A. We can therefore speculate that insulin and IGF-II may promote different type of ubiquitin modifications on the IR-A (polyubiquitination *versus* multiubiquitination), which differentially regulate internalization and sorting of the IR-A. Moreover, insulin and IGF-II may induce different kinetics of IR-A ubiquitination/deubiquitination, an additional biological mechanism that may potentially affect receptor internalization and sorting.

Previous work from our laboratories (7, 11) and the present article (*cf.* Fig. 1 and supplemental Fig. S2) demonstrate that in R−/IR-A cells insulin is more potent than IGF-II in inducing phosphorylation of the IR-A. Collectively, these results suggest that IR-A phosphorylation levels may play a more critical role than ubiquitin in regulating receptor internalization and sorting of the IR-A en route to degradation. This hypothesis is also supported by recent data demonstrating that insulin promotes higher levels of IR-A phosphorylation and internalization compared with the IR-B (54). In addition, the insulin analog [NMeTyr^{B26}]-insulin, which induces IR-A phosphorylation at levels comparable with those evoked by IGF-II, promotes IR-A internalization at very low levels compared with insulin with a rate similar to IGF-II-induced internalization.

The differences in IR-A phosphorylation, internalization, and signaling induced by insulin and IGF-II correlate with the differences in affinity for the IR-A. The experiments performed with the insulin analog [NMeTyr^{B26}]-insulin with an affinity for the IR-A similar to IGF-II support the hypothesis that the affinity of the different ligands for the IR-A may play an important role in determining receptor fate, signaling, and downstream biological responses. However, it is important to point out that additional mechanisms may contribute to this process, including differences of occupancy time and stability of the ligand-receptor complex in the acidifying endosomal compartments, which may affect the recycling process (55). Previous studies from Hansen *et al.* (56) have reported increased mitogenicity of insulin analogs with slow ligand dissociation rate. For several reasons these studies are not readily comparable with our data. These authors measured k_{diss} (dissociation rate constant), which does not exactly represent the ligand binding affinity, which is best expressed by K_d (as measured in this study). Moreover, more recent data have demonstrated that one of the highly mitogenic analogs used in the Hansen paper ([B-Asp^{10}]-insulin/X10) binds not only the IR but also the IGF-IR and induces cell proliferation and transformation by activating both IGF-IR and IR (57, 58). Because Hansen *et al.* (56) tested mitogenesis in CHO-K1 cells and demonstrated that these cells actually express higher levels of IGF-IR (50,000 binding sites) compared with IR (3,000 binding sites), it is likely that the high mitogenic properties of some of these analogs could be prevalently or partially mediated through the IGF-IR, instead of the IR, clearly overestimating the mitogenic potential of these analogs through the IR.

However, because the insulin analog used here has not been rigorously characterized in previous and our current experiments, further studies are required in support of our model. Experiments with different insulin analogs with a wider range of affinities for the IR-A are currently underway to more accurately characterize the contribution that the relative affinity of the various ligands/analogs may play in regulating IR-A phosphorylation, endocytosis, and mitogenic responses.

The confocal analysis demonstrated that IGF-II-activated IR-A follows the same fate of insulin-activated IR-A up to the early endosomal compartment, where the IR-A colocalizes with EEA1 following exposure to either insulin or IGF-II. However,

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

after prolonged insulin stimulation, a significant fraction of the IR-A is then sorted into the lysosomal compartment and targeted for degradation, whereas the majority of IGF-II-activated IR-A does not co-localize with the lysosomal marker LAMP-1. These results suggest that upon IGF-II stimulation, the IR-A may be sorted from early endosomes into a recycling compartment where it is routed back to the plasma membrane. The nature of this recycling compartment and whether the internalized IR-A can recycle back to the cell membrane from early endosomes in a RAB4-dependent fashion (rapid recycling route), or through RAB11-positive endosomes (slow recycling route) (59) remain to be elucidated.

The differential effects of IGF-II and insulin on IR-A internalization and sorting are reminiscent of the EGFR, where different EGFR ligands, such as amphiregulin, TGF-α, HB-EGF, or epiregulin, have diverse effects on the regulation of receptor endocytosis, sorting, and degradation (60–62). Sustained IGF-II stimulation of R−/IR-A cells fails to appreciably modulate IR-A levels and fails to induce degradation of IRS-1, a critical regulator of IR-A-induced mitogenesis (29, 30). Insulin and IGF-I-dependent IRS-1 degradation are regulated by PI3K-dependent phosphorylation of IRS-1 on serine residues, which is a negative feedback regulatory mechanism to control the activity of the IR and IRS-1 after prolonged ligand stimulation (34, 35). Our data clearly show that both insulin and IGF-II evoke tyrosine phosphorylation of IRS-1 but they differ in the ability to promote serine phosphorylation of IRS-1, which may regulate IRS-1 degradation. Thus, these results support the hypothesis that the inability of IGF-II to promote IRS-1 degradation may depend on the reduced capacity of IGF-II to promote IR-A-dependent serine phosphorylation of IRS-1. We cannot exclude that additional mechanisms may also contribute to determine IRS-1 escape from the negative feedback loop that targets it for degradation.

The pathways that regulate endocytosis of the EGFR are well characterized, as are many proteins that play a critical role in the regulation of receptor internalization and sorting (15, 16, 37, 51). However, proteins that regulate IR-A internalization and sorting have not been so far identified. We have previously established that the adapter protein Grb10 binds the ubiquitin ligase Nedd4 (63) and promotes IGF-IR ubiquitination and internalization through clathrin-dependent and -independent pathways (17, 18). Grb10 binds the IR in an insulin-dependent fashion (64–67) and Grb10 depletion by shRNA in HeLa cells inhibits insulin-dependent IR ubiquitination and degradation (36). However, whether insulin and IGF-II may differentially affect Grb10 binding to the IR-A isoform and whether Grb10 may regulate IR-A internalization and sorting remains to be established. Because IGF-II induces lower levels of IR-A phosphorylation compared with insulin, we can hypothesize that the stronger mitogenic activity induced by IGF-II over insulin may not only be attributed to a reduced ability to promote receptor internalization and degradation (*cf.* Figs. 1–3) but also to a decreased ability of negative regulators of IR signaling, such as Grb10, to bind the IR-A after IGF-II stimulation. Clathrin-dependent and -independent routes of EGFR internalization have significantly different effects on receptor fate and signaling abilities (41). Clathrin-mediated endocytosis plays no major role on EGFR degradation but rather induces receptor recycling and sustained signaling, whereas the clathrin-independent pathway promotes EGFR degradation (41). Our results suggest instead that insulin-dependent IR-A degradation requires clathrin-dependent endocytosis, whereas both clathrin-dependent and -independent pathways may contribute to the regulation of IR-A downstream signaling induced by both insulin and IGF-II.

Endocytosis does not play a major role in regulating IR-A or IRS-1 early tyrosine phosphorylation, which occurs at the plasma membrane, but it may play a role in regulating the prolonged tyrosine phosphorylation, which may require IR-A and IRS-1 internalization into early endosomes. In contrast, serine phosphorylation of IRS-1 requires IR-A endocytosis through a clathrin-independent pathway, as it is severely reduced after exposure to filipin. Clathrin-dependent endocytosis is critical instead for IR-A-dependent activation of Akt, whereas clathrin-independent endocytosis may prevalently regulate IR-A-dependent activation of ERKs and provides a minor contribution to Akt activation.

In summary, our results suggest that the lower affinity of IGF-II for the IR-A may on one hand promote lower IR-A phosphorylation and activation of early downstream effectors compared with insulin but may also protect IR-A and IRS-1 from negative feedback down-regulation mechanisms, thereby evoking a more potent mitogenic stimulus. In addition, the reduced IR-A activation promoted by IGF-II may protect the receptor from the action of negative regulators, such as Grb10, which bind the IR in a ligand-dependent manner.

Acknowledgment—We thank Dr. Renato Baserga for the kind gift of R−/IR-A cells and helpful discussion.

REFERENCES

1. Seino, S., and Bell, G. I. (1989) Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159,** 312–316
2. Mosthaf, L., Grako, K., Dull, T. J., Coussens, L., Ullrich, A., and McClain, D. A. (1990) Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J.* **9,** 2409–2413
3. Papa, V., Gliozzo, B., Clark, G. M., McGuire, W. L., Moore, D., Fujita-Yamaguchi, Y., Vigneri, R., Goldfine, I. D., and Pezzino, V. (1993) Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res.* **53,** 3736–3740
4. Yamaguchi, Y., Flier, J. S., Benecke, H., Ransil, B. J., and Moller, D. E. (1993) Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* **132,** 1132–1138
5. Kosaki, A., and Webster, N. J. (1993) Effect of dexamethasone on the alternative splicing of the insulin receptor mRNA and insulin action in HepG2 hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* **268,** 21990–21996
6. Webster, N. J., Kong, Y., Sharma, P., Haas, M., Sukumar, S., and Seely, B. L. (1997) Differential effects of Wilms tumor WT1 splice variants on the insulin receptor promoter. *Biochem. Mol. Med.* **62,** 139–150
7. Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999) Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **19,** 3278–3288
8. Belfiore, A. (2007) The role of insulin receptor isoforms and hybrid insulin/IGF-I receptors in human cancer. *Curr. Pharm. Des.* **13,** 671–686
9. Belfiore, A., and Malaguarnera, R. (2011) Insulin receptor and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **18,** R125–147
10. Krywicki, R. F., and Yee, D. (1992) The insulin-like growth factor family of ligands, receptors, and binding proteins. *Breast Cancer Res. Treat.* **22,**

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

7–19
11. Morrione, A., Valentinis, B., Xu, S. Q., Yumet, G., Louvi, A., Efstratiadis, A., and Baserga, R. (1997) Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94,** 3777–3782
12. Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2002) Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J. Biol. Chem.* **277,** 39684–39695
13. Frasca, F., Pandini, G., Vigneri, R., and Goldfine, I. D. (2003) Insulin and hybrid insulin/IGF receptors are major regulators of breast cancer cells. *Breast Dis.* **17,** 73–89
14. Morcavallo, A., Gaspari, M., Pandini, G., Palummo, A., Cuda, G., Larsen, M. R., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2011) Research resource. New and diverse substrates for the insulin receptor isoform A revealed by quantitative proteomics after stimulation with IGF-II or insulin. *Mol. Endocrinol.* **25,** 1456–1468
15. Di Fiore, P. P., and De Camilli, P. (2001) Endocytosis and signaling. An inseparable partnership. *Cell* **106,** 1–4
16. Seto, E. S., Bellen, H. J., and Lloyd, T. E. (2002) When cell biology meets development. Endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev.* **16,** 1314–1336
17. Vecchione, A., Marchese, A., Henry, P., Rotin, D., and Morrione, A. (2003) The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol. Cell Biol.* **23,** 3363–3372
18. Monami, G., Emiliozzi, V., and Morrione, A. (2008) Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *J. Cell Physiol.* **216,** 426–437
19. Morrione, A., Valentinis, B., Resnicoff, M., Xu, S., and Baserga, R. (1997) The role of mGrb10α in insulin-like growth factor I-mediated growth. *J. Biol. Chem.* **272,** 26382–26387
20. Sell, C., Dumenil, G., Deveaud, C., Miura, M., Coppola, D., DeAngelis, T., Rubin, R., Efstratiadis, A., and Baserga, R. (1994) Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **14,** 3604–3612
21. Miura, M., Surmacz, E., Burgaud, J. L., and Baserga, R. (1995) Different effects on mitogenesis and transformation of a mutation at tyrosine 1251 of the insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.* **270,** 22639–22644
22. Jirácek, J., Záková, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., and Brzozowski, A. M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107,** 1966–1970
23. Gauguin, L., Klaproth, B., Sajid, W., Andersen, A. S., McNeil, K. A., Forbes, B. E., and De Meyts, P. (2008) Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **283,** 2604–2613
24. Swillens, S. (1995) Interpretation of binding curves obtained with high receptor concentrations. Practical aid for computer analysis. *Mol. Pharmacol.* **47,** 1197–1203
25. Monami, G., Gonzalez, E. M., Hellman, M., Gomella, L. G., Baffa, R., Iozzo, R. V., and Morrione, A. (2006) Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. *Cancer Res.* **66,** 7103–7110
26. Lovat, F., Bitto, A., Xu, S. Q., Fassan, M., Goldoni, S., Metalli, D., Wubah, V., McCue, P., Serrero, G., Gomella, L. G., Baffa, R., Iozzo, R. V., and Morrione, A. (2009) Proepithelin is an autocrine growth factor for bladder cancer. *Carcinogenesis* **30,** 861–868
27. Metalli, D., Lovat, F., Tripodi, F., Genua, M., Xu, S. Q., Spinelli, M., Alberghina, L., Vanoni, M., Baffa, R., Gomella, L. G., Iozzo, R. V., and Morrione, A. (2010) The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *Am. J. Pathol.* **176,** 2997–3006
28. Záková, L., Kazdová, L., Hanclová, I., Protivínská, E., Sanda, M., Budesínský, M., and Jirácek, J. (2008) Insulin analogs with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry* **47,** 5858–5868
29. Sun, X. J., Crimmins, D. L., Myers, M. G., Jr., Miralpeix, M., and White, M. F. (1993) Pleiotropic insulin signals are engaged by multisite phosphorylation of IRS-1. *Mol. Cell. Biol.* **13,** 7418–7428
30. Rose, D. W., Saltiel, A. R., Majumdar, M., Decker, S. J., and Olefsky, J. M. (1994) Insulin receptor substrate 1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91,** 797–801
31. Sasaoka, T., Rose, D. W., Jhun, B. H., Saltiel, A. R., Draznin, B., and Olefsky, J. M. (1994) Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **269,** 13689–13694
32. White, M. F. (1998) The IRS-signaling system. A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* **182,** 3–11
33. White, M. F. (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physio.l. Endocrinol. Metab.* **283,** E413–422
34. Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P. M., Olefsky, J. M., and Kobayashi, M. (2000) A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol. Endocrinol.* **14,** 783–794
35. Lee, A. V., Gooch, J. L., Oesterreich, S., Guler, R. L., and Yee, D. (2000) Insulin-like growth factor I-induced degradation of insulin receptor substrate 1 is mediated by the 26 S proteasome and blocked by phosphatidylinositol 3′-kinase inhibition. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 1489–1496
36. Ramos, F. J., Langlais, P. R., Hu, D., Dong, L. Q., and Liu, F. (2006) Grb10 mediates insulin-stimulated degradation of the insulin receptor. A mechanism of negative regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290,** E1262–1266
37. Polo, S., Pece, S., and Di Fiore, P. P. (2004) Endocytosis and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16,** 156–161
38. Hwang, D. L., Papoian, T., Barseghian, G., Josefsberg, Z., and Lev-Ran, A. (1985) Absence of down-regulation of insulin receptors in human breast cancer cells (MCF-7) cultured in serum-free medium. Comparison with epidermal growth factor. *J. Recept. Res.* **5,** 27–43
39. Mountjoy, K. G., Finlay, G. J., and Holdaway, I. M. (1987) Abnormal insulin-receptor down-regulation and dissociation of down-regulation from insulin biological action in cultured human tumor cells. *Cancer Res.* **47,** 6500–6504
40. Le Roy, C., and Wrana, J. L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6,** 112–126
41. Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell* **15,** 209–219
42. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102,** 2760–2765
43. Chen, C. L., Hou, W. H., Liu, I. H., Hsiao, G., Huang, S. S., and Huang, J. S. (2009) Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGFβ signaling and responses. *J. Cell Sci.* **122,** 1863–1871
44. Yao, D., Ehrlich, M., Henis, Y. I., and Leof, E. B. (2002) Transforming growth factor-β receptors interact with AP2 by direct binding to β2 subunit. *Mol. Biol. Cell* **13,** 4001–4012
45. Fagerholm, S., Ortegren, U., Karlsson, M., Ruishalme, I., and Strålfors, P. (2009) Rapid insulin-dependent endocytosis of the insulin receptor by caveolae in primary adipocytes. *PLoS One* **4,** e5985
46. Sacco, A., Morcavallo, A., Pandini, G., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2009) Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology* **150,** 3594–3602
47. Fan, J. Y., Carpentier, J. L., Gorden, P., Van Obberghen, E., Blackett, N. M., Grunfeld, C., and Orci, L. (1982) Receptor-mediated endocytosis of insulin. Role of microvilli, coated pits, and coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79,** 7788–7791
48. Paccaud, J. P., Siddle, K., and Carpentier, J. L. (1992) Internalization of the human insulin receptor. The insulin-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **267,** 13101–13106
49. McClain, D. A., and Olefsky, J. M. (1988) Evidence for two independent pathways of insulin-receptor internalization in hepatocytes and hepatoma cells. *Diabetes* **37,** 806–815

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

50. Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K. H., Magnusson, K. E., and Strålfors, P. (1999) Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J.* **13,** 1961–1971
51. Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009) Ubiquitin in trafficking. The network at work. *Exp. Cell Res.* **315,** 1610–1618
52. Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat. Cell Biol.* **5,** 461–466
53. Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., and Yarden, Y. (2003) Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J. Biol. Chem.* **278,** 21323–21326
54. Giudice, J., Leskow, F. C., Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M., and Jares-Erijman, E. A. (2011) Differential endocytosis and signaling dynamics of insulin receptor variants IR-A and IR-B. *J. Cell Sci.* **124,** 801–811
55. Zapf, A., Hsu, D., and Olefsky, J. M. (1994) Comparison of the intracellular itineraries of insulin-like growth factor-I and insulin and their receptors in Rat-1 fibroblasts. *Endocrinology* **134,** 2445–2452
56. Hansen, B. F., Danielsen, G. M., Drejer, K., Sørensen, A. R., Wiberg, F. C., Klein, H. H., and Lundemose, A. G. (1996) Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogs exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem. J.* **315,** 271–279
57. Milazzo, G., Sciacca, L., Papa, V., Goldfine, I. D., and Vigneri, R. (1997) ASPB10 insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells. Evidence for enhanced interactions with the insulin-like growth factor-I receptor. *Mol. Carcinog.* **18,** 19–25
58. Hansen, B. F., Kurtzhals, P., Jensen, A. B., Dejgaard, A., and Russell-Jones, D. (2011) Insulin X10 revisited. A super-mitogenic insulin analog. *Diabetologia* **54,** 2226–2231
59. Grant, B. D., and Donaldson, J. G. (2009) Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 597–608
60. Baldys, A., Göoz, M., Morinelli, T. A., Lee, M. H., Raymond, J. R., Jr., Luttrell, L. M., and Raymond, J. R., Sr. (2009) Essential role of c-Cbl in amphiregulin-induced recycling and signaling of the endogenous epidermal growth factor receptor. *Biochemistry.* **48,** 1462–1473
61. Stern, K. A., Place, T. L., and Lill, N. L. (2008) EGF and amphiregulin differentially regulate Cbl recruitment to endosomes and EGF receptor fate. *Biochem. J.* **410,** 585–594
62. Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L., Lerdrup, M., Grøvdal, L., Willumsen, B. M., and van Deurs, B. (2009) Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic* **10,** 1115–1127
63. Morrione, A., Plant, P., Valentinis, B., Staub, O., Kumar, S., Rotin, D., and Baserga, R. (1999) mGrb10 interacts with Nedd4. *J. Biol. Chem.* **274,** 24094–24099
64. Laviola, L., Giorgino, F., Chow, J. C., Baquero, J. A., Hansen, H., Ooi, J., Zhu, J., Riedel, H., and Smith, R. J. (1997) The adapter protein Grb10 associates preferentially with the insulin receptor as compared with the IGF-I receptor in mouse fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **99,** 830–837
65. Liu, F., and Roth, R. A. (1995) Grb-IR, a SH2-domain-containing protein that binds to the insulin receptor and inhibits its function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92,** 10287–10291
66. Dong, L. Q., Du, H., Porter, S. G., Kolakowski, L. F., Jr., Lee, A. V., Mandarino, L. J., Fan, J., Yee, D., Liu, F., and Mandarino, J. (1997) Cloning, chromosome localization, expression, and characterization of an Src homology 2 and pleckstrin homology domain-containing insulin receptor binding protein hGrb10γ. *J. Biol. Chem.* **272,** 29104–29112
67. Hansen, H., Svensson, U., Zhu, J., Laviola, L., Giorgino, F., Wolf, G., Smith, R. J., and Riedel, H. (1996) Interaction between the Grb10 SH2 domain and the insulin receptor carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* **271,** 8882–8886

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

ONLINE SUPPLEMENTAL MATERIAL

Legends to Supplemental Figures

FIG. S1. **Insulin and IGF-II at equimolar concentration differ in their ability to promote IR-A internalization.** The level of IR-A internalization in R-/IR-A cells was determined by ELISA at different time points after insulin (INS) and IGF-II stimulation, as described in Experimental Procedures. Ligands were used at 30 nM. Data are the averages ± SD of three independent experiments. Statistical significance was determined using Student's t test for repeated measures, **p* <0.05; ****p* <0.01 (INS or IGF-II vs SFM) and using ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test, *p* <0.01; (INS vs IGF-II).

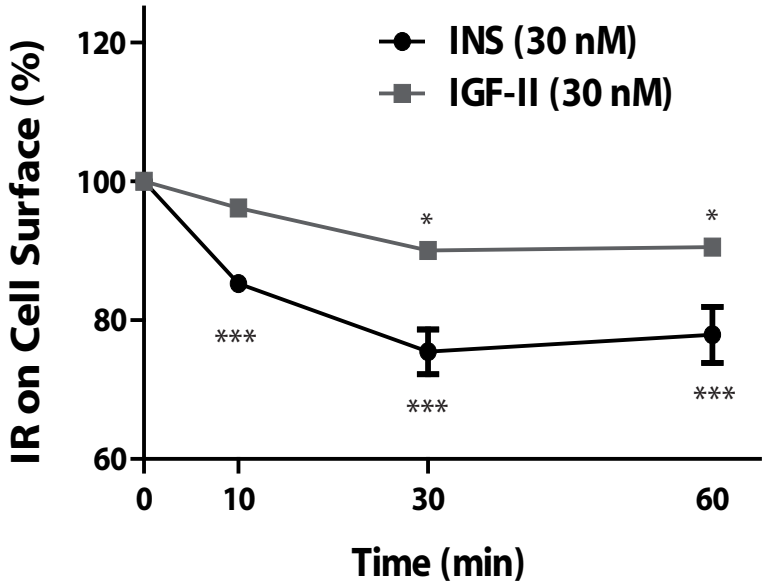
FIG. S2. **An insulin analog with lower affinity than insulin for the IR-A induces lower levels of IR-A phosphorylation and signaling**. The insulin analog NMeTyr^{B26}-insulin has been previously described (22). (A) Inhibition of binding of human ^{125}I-insulin to the insulin receptor (IR-A isoform) in the membranes of IM-9 lymphocytes by human insulin (●), NMeTyr^{B26}-insulin analog (▲) and human IGF-II (■). Binding was performed as described by Gauguin at al. (23). [a]K_d represents dissociation constant of binding of insulin and insulin analog to the IR. Each value represents the mean ± the SD of the mean of multiple determinations (n). [b]Relative binding affinity (Rel K_d) defined as (K_d of human insulin/Kd of analog) x 100. (B) Serum-starved R-/IR-A cells were stimulated with either insulin, IGF-II or NMeTyr^{B26}-insulin at 1, 5 and 30 nM for the indicated time points. IR-A tyrosine-phosphorylation was determined by immunoblot as described in Experimental Procedures. The experiment shown is representative of two independent experiments. (C) Akt and ERK1/2 activation was assessed by immunoblot with anti-phosphospecific antibodies at different time points of ligand stimulation as described above. Blots are representative of two independent experiments.

FIG. S3. **Effect of physiological concentration of ligands on IR-A and IRS-1 stability**. IR-A and IRS-1 levels in R-/IR-A cells were determined by immunoblot after stimulation with 5 nM of either insulin, IGF-II or NMeTyr^{B26}-insulin. The total amount of protein loaded on the gel was monitored using anti-β-actin polyclonal antibodies. Quantification was performed by densitometry using NIH ImageJ software. The data are presented as means ± SD. Statistical significance was determined using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple-comparison test. ****p* <0.001; ***p* <0.01; **p* <0.05.

FIG. S4**. Insulin and IGF-II differentially affect IR-A internalization of NIH3T3/IR-A, R+A10 and MDA-MB-157 breast cancer cells**. (A, B, C) Protein levels for the IR-A and IGF-IR were determined by immunoblot analysis with specific polyclonal antibodies, as described in Experimental Procedures. (A, B, C) The level of cell surface IR-A in the various cell lines was determined by ELISA at different time points of insulin (INS) and IGF-II stimulation, as described in Experimental Procedures. Data are the averages ± SD of three independent experiments. Statistical significance was determined using Student's t test for repeated measures, **p* <0.05 (INS vs IGF-II). (A, B) IR and IRS-1 levels were assessed as described in Experimental Procedures. Blots are representative of three independent experiments.

Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

Figure S1, Morcavallo et al.

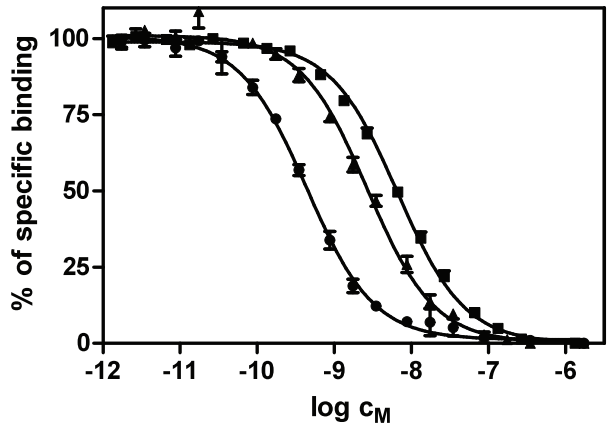


Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

Figure S2, Morcavallo et al.

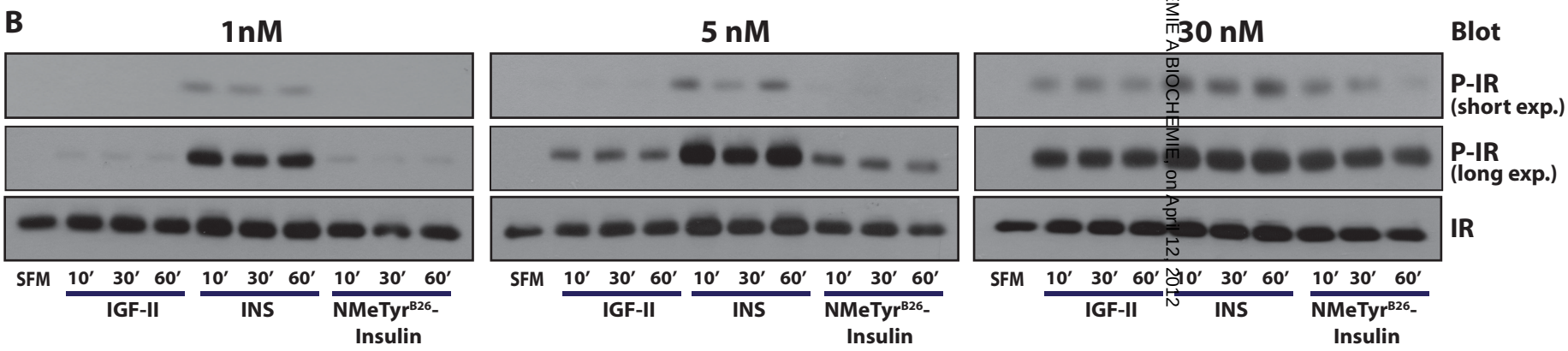
Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

A

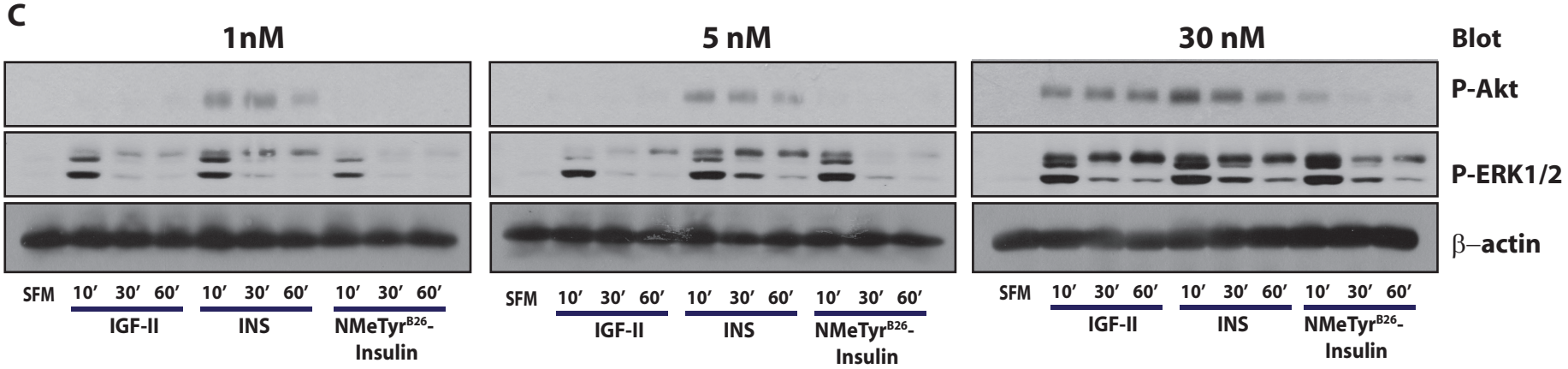


	K_d ± S.D. (nM)	Rel K_d (%) ± S.D.
Human insulin	0.27 ± 0.04	100
NMeTyrB^{26}-insulin	1.68 ± 0.27	16.1 ± 2.6
IGF-II	3.96 ± 0.56	6.8 ± 1.0

B

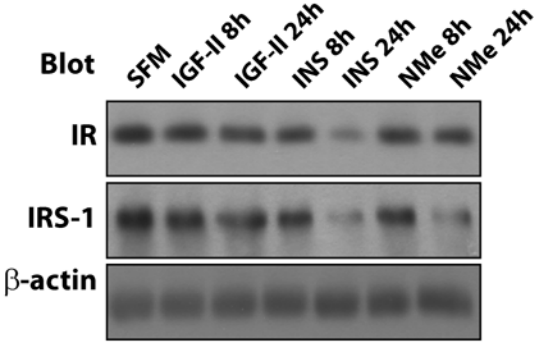


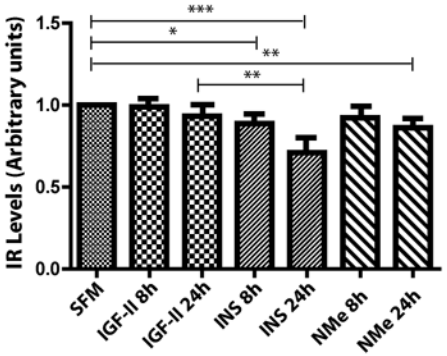
C



Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGAN CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

Figure S3, Morcavallo et al.





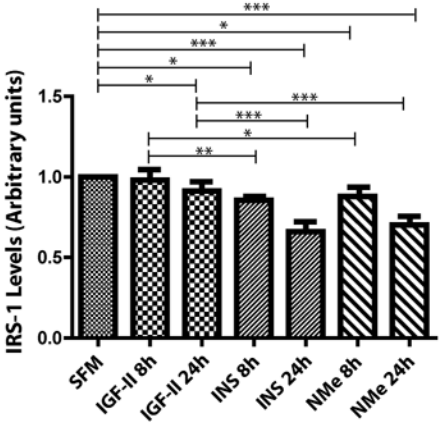
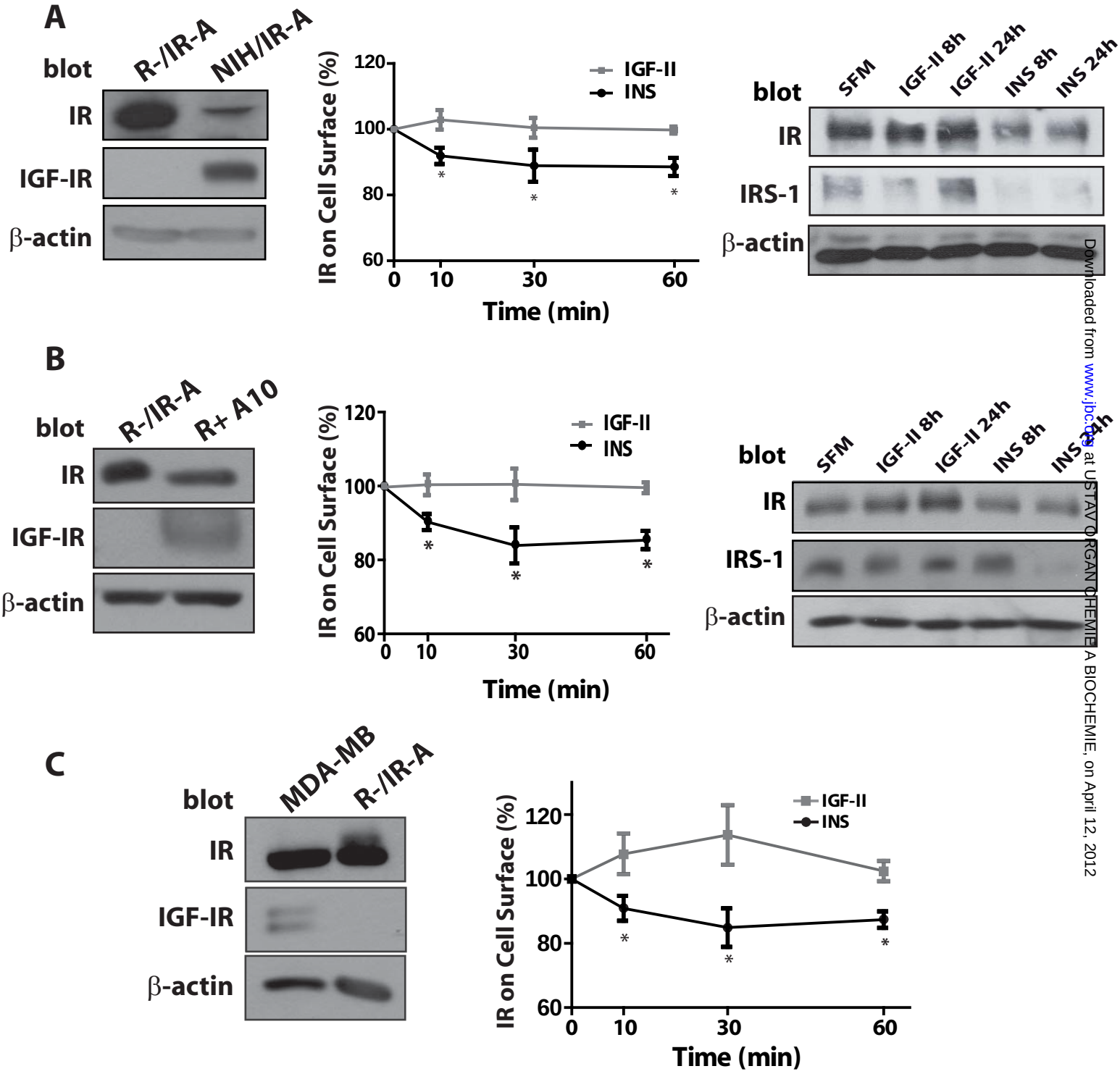


Figure S4, Morcavallo et al.



Downloaded from www.jbc.org at USTAV ORGANICKE CHEMIE A BIOCHEMIE, on April 12, 2012

LETTER

doi:10.1038/nature11781

How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor

John G. Menting[1]*, Jonathan Whittaker[2]*, Mai B. Margetts[1], Linda J. Whittaker[2], Geoffrey K.-W. Kong[1], Brian J. Smith[1,3], Christopher J. Watson[4], Lenka Žáková[5], Emília Kletvíková[5], Jiří Jiráček[5], Shu Jin Chan[6], Donald F. Steiner[6], Guy G. Dodson[4]‡, Andrzej M. Brzozowski[4], Michael A. Weiss[2], Colin W. Ward[1] & Michael C. Lawrence[1,7]

Insulin receptor signalling has a central role in mammalian biology, regulating cellular metabolism, growth, division, differentiation and survival[1,2]. Insulin resistance contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and the onset of Alzheimer's disease[3]; aberrant signalling occurs in diverse cancers, exacerbated by cross-talk with the homologous type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R)[4]. Despite more than three decades of investigation, the three-dimensional structure of the insulin–insulin receptor complex has proved elusive, confounded by the complexity of producing the receptor protein. Here we present the first view, to our knowledge, of the interaction of insulin with its primary binding site on the insulin receptor, on the basis of four crystal structures of insulin bound to truncated insulin receptor constructs. The direct interaction of insulin with the first leucine-rich-repeat domain (L1) of insulin receptor is seen to be sparse, the hormone instead engaging the insulin receptor carboxy-terminal α-chain (αCT) segment, which is itself remodelled on the face of L1 upon insulin binding. Contact between insulin and L1 is restricted to insulin B-chain residues. The αCT segment displaces the B-chain C-terminal β-strand away from the hormone core, revealing the mechanism of a long-proposed conformational switch in insulin upon receptor engagement. This mode of hormone–receptor recognition is novel within the broader family of receptor tyrosine kinases[5]. We support these findings by photo-crosslinking data that place the suggested interactions into the context of the holoreceptor and by isothermal titration calorimetry data that dissect the hormone–insulin receptor interface. Together, our findings provide an explanation for a wealth of biochemical data from the insulin receptor and IGF1R systems relevant to the design of therapeutic insulin analogues.

Insulin comprises two chains (A and B) containing three α-helices (residues A1–A8, A12–A18 and B9–B19) constrained by one intra- and two interchain disulphide bonds[6] (Fig. 1a). The insulin receptor is a disulphide-linked $(\alpha\beta)_2$ homodimer; the extracellular portion of each αβ protomer contains six domains (L1, CR, L2, FnIII-1, FnIII-2 and FnIII-3) and an insert domain (ID) within FnIII-2[7] (Fig. 1b). The α-chain component of the ID is terminated by a segment termed αCT, spanning residues 704–719 (using the numbering of the insulin receptor exon 11− isoform[8]). Two surfaces of insulin are understood to interact with the insulin receptor[9,10]. The first consists predominantly of hormone-dimerizing residues and contacts the primary binding site on the receptor (site 1; dissociation constant (K_d) ~6.4 nM) comprising the αCT segment from one insulin receptor α-chain and the central β-sheet of L1 (L1–β_2) of the other α-chain within the insulin receptor dimer[11–14] (Supplementary Fig. 1a). The second consists predominantly of hormone-hexamerizing residues and is proposed to interact with a secondary insulin receptor site (site 2; K_d ~400 nM) at the junction of FnIII-1 and FnIII-2 of the insulin receptor α-chain opposite to that contributing L1 to site 1 (Supplementary Fig. 1a)[7,9–11,13–15]. Structural study of the insulin receptor and IGF1R ectodomains is difficult; their large size, flexible multidomain morphology and extensive glycosylation and disulphide bonding posing challenges in production and crystallization. Only three ectodomain structures exist: those of the *apo*-insulin receptor[7,12] and the L1–CR–L2 fragments of insulin receptor[16] and IGF1R[17] (3.7 Å, 2.3 Å and 2.6 Å resolution, respectively); none is in complex with ligand.

We present here the first view of the insulin–site 1 interaction on the basis of four crystal structures (complexes A, B, C and D) varyingly using the L1–CR construct IR310.T (Fig. 1c) and the L1–CR–L2–(FnIII-1)–αCT(704–719) homodimeric construct IR593.αCT (Fig. 1d), which has αCT(704–719) linked to FnIII-1. Complex A (3.9 Å resolution) contains human-insulin-bound IR310.T in complex with a Fab fragment from monoclonal antibody 83-7 (ref. 7) and exogenous αCT(704–719) peptide. Complex B (4.3 Å resolution) is the same as complex A but uses the high-affinity, truncated insulin analogue [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2[18]. Complex C (4.4 Å resolution) is the same as complex B but uses the longer peptide αCT(697–719). Complex D (4.4 Å resolution) contains bovine insulin bound to IR593.αCT in complex with a Fab fragment from monoclonal antibody 83-14 (ref. 7).

The limited diffraction of these crystals necessitated the use of the following: (1) weak data at the diffraction limit (a process validated by the half-data set Pearson correlation coefficient $CC_{1/2}$ criterion[19,20] and ultimately by the evident quality (see below) of the resultant electron-density difference maps (EDDMs)); (2) B-factor-sharpened EDDMs in model building[21]; and (3) dynamic 'reference-structure' and 'jelly-body' restraints during individual atomic-coordinate refinement whereby we exploited the known higher-resolution structures of the underlying fragments[22,23]. Molecular replacement located the insulin receptor and Fab domains and generated a clear solution for the insulin three-helix 'core' structure within each complex, positioning the core identically on the respective L1–β_2 surfaces. The strongest feature in the resultant EDDMs was a common, helical-like structure lying adjacent to the insulin B-helix on the L1–β_2 surface that, upon B-factor sharpening, exhibited side-chain density of distinctive sizes and at spacing consistent with an α-helix. In complex D, this feature was connected to the C-terminal strand of FnIII-1, allowing its unambiguous interpretation as αCT and restricting its prima facie sequence register to an ambiguity of at most one residue unit, with one alternative strongly favoured. We confirmed our register assignment objectively by devising a broad-window analysis of sequence fit both to the higher-resolution EDDM of complex A and to the profiled residue environments within that complex. Crystallographic processing and refinement statistics are provided in Table 1 and Supplementary Table 1, with further detail in Methods.

[1]Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, 1G Royal Parade, Parkville, Victoria 3052, Australia. [2]Department of Biochemistry, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio 44106, USA. [3]Department of Chemistry, La Trobe Institute for Molecular Science, La Trobe University, Melbourne, Victoria 3086, Australia. [4]York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, University of York, York YO10 5DD, UK. [5]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., 16610 Prague, Czech Republic. [6]Department of Medicine, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637, USA. [7]Department of Medical Biology, University of Melbourne, Royal Parade, Parkville, Victoria 3010, Australia.
*These authors contributed equally to this work.
‡Deceased.

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

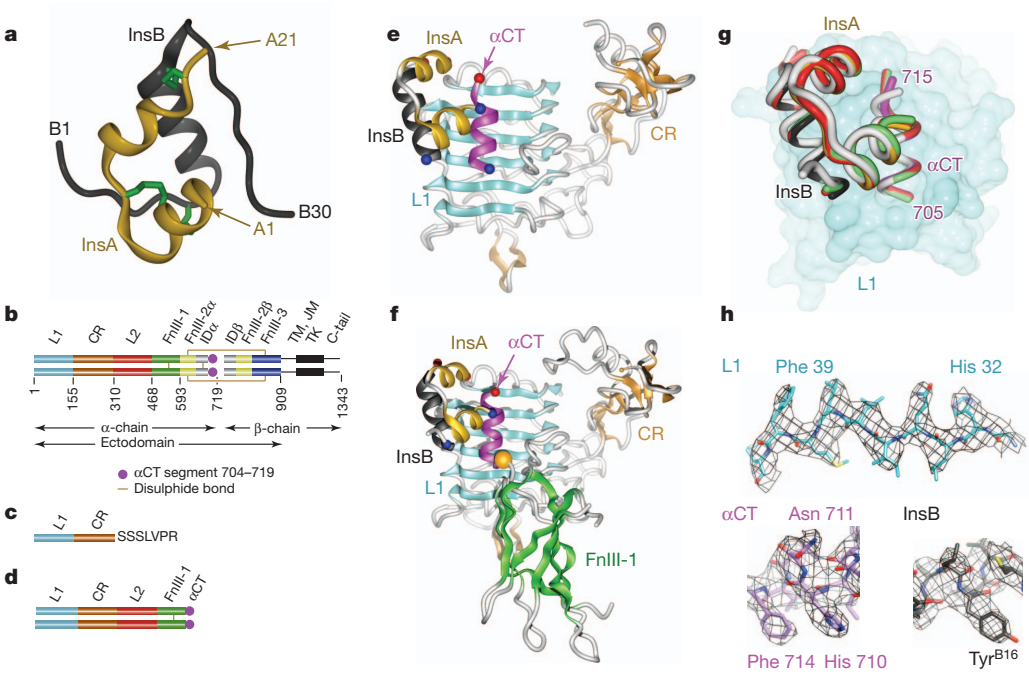


Figure 1 | Structure of insulin, insulin receptor and the site 1 complexes. **a**, Insulin. InsA, A chain; InsB, B chain. **b**, Insulin receptor. CR, Cys-rich domain; FnIII-1, FnIII-2, FnIII-3, first, second and third fibronectin type III domains; ID, insert domain; L1, L2, first and second leucine-rich-repeat domains; TK, tyrosine kinase; TM, JM, transmembrane and juxtamembrane segments. **c**, **d**, IR310.T and IR593.αCT domain structure, respectively. **e**, **f**, Insulin-bound site 1 in complexes A and D, respectively. Blue, red spheres, observed chain termini; orange sphere, FnIII-1–αCT junction. **g**, Overlay of insulin-bound site 1 in complexes A (coloured as in **e**), B (red), C (green) and D (white). **h**, Sample $2F_{obs} - F_{calc}$ map volumes ($B_{sharp} = -160$ Å^2; contours = 1.1–1.5σ) for complex A.

The structures of the insulin-bound site 1 assembly within complexes A and D are shown in Fig. 1e, f, respectively; those within complexes B and C are effectively isomorphous with complex A (Fig. 1g). The Fab-complexed forms of the IR310.T and IR593.αCT monomers are shown in Supplementary Fig. 2a, b, respectively. As prepared and crystallized, complex D contains a dimer of IR593.αCT homodimers crosslinked by four insulins; further description of this assembly is provided in Supplementary Fig. 2c–e. Despite the non-native connection of αCT to FnIII-1 in IR593.αCT (Fig. 1d), the insulin-bound site 1 assembly within complex D is also superimposable on that of complex A (Fig. 1g). Refinement of these complexes provided EDDMs that revealed side-chain bulk for all components within the observed site 1 interface (Fig. 1h). The mode of insulin–site 1 interaction emerging from these structures is as follows. The insulin B-helix (B7–B21) engages the C-terminal end of the L1–β_2 strands; the insulin A-chain has no interaction with L1 (Fig. 1e, f). Both chains interact extensively with αCT. Notably, the αCT helix is, with respect to its *apo*-insulin receptor counterpart, both displaced on the L1–β_2 surface and C-terminally extended to include residues 711–715 (see Fig. 2a and further discussion below). Residues B22–B30 are not resolved in these structures, but, critically, the αCT helix occupies volume that would otherwise contain insulin residues B26–B30 if the latter retained their receptor-free conformation (see Fig. 2b and Supplementary Fig. 3a). Displacement of residues B26–B30 from the insulin core confirms a long-speculated[24] induced fit upon insulin receptor binding (Supplementary Fig. 1b). In contrast, the helical core of insulin seems, as far as can be discerned at the described resolution, closely similar to that of uncomplexed hormone (Supplementary Fig. 3b). The models suggest that the two most critical hormone-engaging residues in αCT are (1) His 710, which inserts into a pocket formed by invariant[10] insulin residues Val^{A3}, Gly^{B8}, Ser^{B9} and Val^{B12}; and (2) Phe 714, which occupies a hydrophobic crevice formed by invariant insulin residues

Table 1 | X-ray diffraction data collection statistics

	Complex A, data set 1	Complex A, data set 2	Complex B	Complex C	Complex D
	Human insulin + IR310.T–83-7 + αCT(704–719)	Human insulin + IR310.T–83-7 + αCT(704–719)	[D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ + IR310.T–83-7 + αCT(704–719)	[D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ + IR310.T–83-7 + αCT(697–719)	Bovine insulin + IR593.αCT/83-14
Space group	*P*23	*P*23	*P*23	*P*23	*I*2
Cell dimensions					
a, *b*, *c* (Å)	168.15, 168.15, 168.15	168.91, 168.91, 168.91	169.49, 169.49, 169.49	169.23, 169.23, 169.23	118.15, 140.10, 190.02
α, *β*, *γ* (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 95.04, 90
Completeness (%)	99.8 (99.8)*	98.3 (99.5)	99.7 (100.0)	98.5 (98.1)	87.7 (84.9)†
Resolution (Å)	59.5–4.0 (4.1–4.0)	46.8–3.9 (4.0–3.9)	29.6–4.3 (4.53–4.3)	29.5–4.30 (4.54–4.3)	56.3–4.4 (4.5–4.4)
R_{merge}	0.156 (2.36)	0.089 (1.57)	0.188 (2.69)	0.101 (1.09)	0.206 (1.31)
‡R_{pim}	0.039 (0.57)	0.048 (0.83)	0.067 (0.97)	0.053 (0.59)	0.143 (0.89)
$I/\sigma I$	11.5 (1.6)	9.0 (1.0)	7.8 (1.0)	8.2 (1.4)	2.8 (0.8)
Redundancy	17.3 (17.4)	4.1 (4.2)	8.8 (8.8)	4.4 (4.3)	2.9 (2.8)
§$CC_{1/2}$	0.998 (0.580)	0.998 (0.342)	0.996 (0.330)	0.997 (0.438)	0.980 (0.232)

Each data set was collected from a single crystal.
* Highest-resolution shell statistics are shown in parentheses.
† Data completeness was compromised by radiation damage.
‡ R_{pim}, precision indicating merging *R*-factor[30].
§ $CC_{1/2}$, Pearson correlation coefficient between independently merged halves of the data set[19]. Highest-resolution shell $CC_{1/2}$ values are significant at at least $P = 0.001$.

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

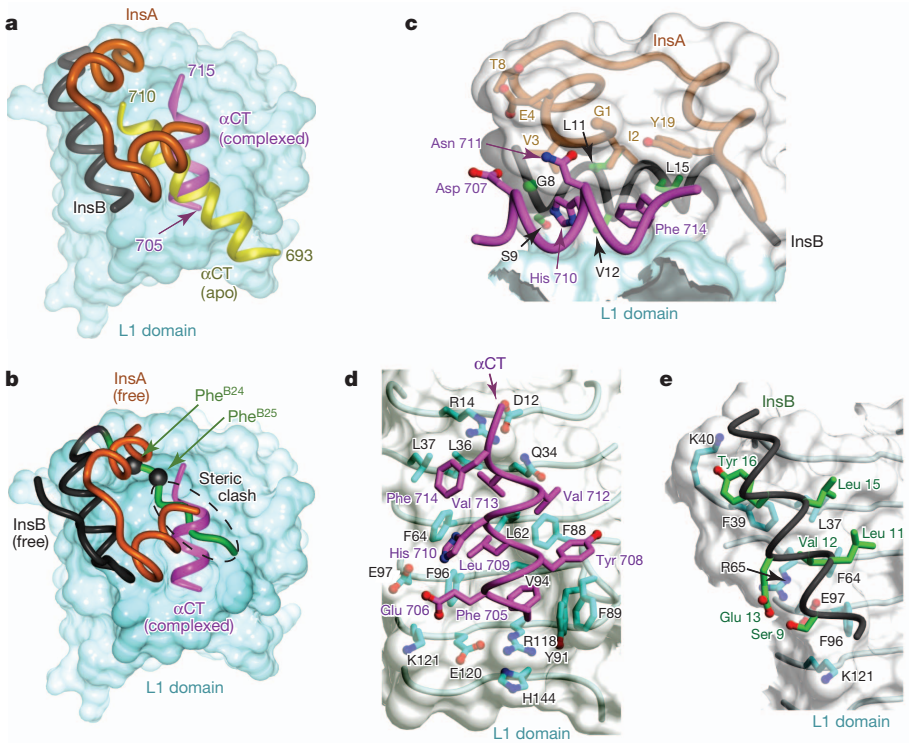


Figure 2 | The insulin–site 1 interaction. **a**, Altered disposition of αCT with respect to that in *apo*-insulin receptor[12]. **b**, Superposition (via the A- and B-chain helices) of receptor-free insulin onto the insulin–site 1 complex, indicating steric clash of the B-chain C-terminal segment (green) with αCT. See also Supplementary Fig. 3a. **c**, Interaction (at the bulk side-chain level of detail) between αCT(704–719) and insulin. View direction is parallel to L1–β2 surface (cyan); white shading shows insulin surface. **d**, **e**, Interaction (at the bulk side-chain level of detail) between L1 and αCT and between L1 and insulin B-chain helix, respectively. Panels based on complex A.

Gly^{A1}, Ile^{A2}, Tyr^{A19}, Leu^{B11}, Val^{B12} and Leu^{B15} (Fig. 2c). Asn 711 is directed towards Gly^{A1}, Val^{A3} and Glu^{A4}. The hydrophobic face of αCT comprising Phe 705, Tyr 708, Leu 709, Val 712 and Val 713 engages a non-polar groove on L1-β_2 formed by Leu 36, Leu 37, Leu 62, Phe 64, Phe 88, Phe 89, Val 94 and Phe 96 (Fig. 2d). Direct interaction between the insulin B-chain B9–B19 helix and L1 seems to be limited: Val^{B12} is positioned between Phe 39, Phe 64 and Arg 65, whereas Tyr^{B16} adjoins Phe 39 (Fig. 2e). Detailed rotameric and atomic level detail of the above interactions is precluded by the limited diffraction.

Relocation of αCT upon hormone binding is supported by recent studies indicating that residues buried beneath αCT in the *apo*-ectodomain may directly contact insulin[25], and that peptide substitutions in the αCT segment upstream of Phe 705 that increase the affinity of the segment for L1 concomitantly impair insulin binding[12]. To investigate further, we used complex C to test whether the relocation observed in complexes A, B and D is a consequence of αCT truncation, as in the *apo*-insulin receptor the visible interaction of αCT with L1-β_2 begins at Glu 697. It is not—the relocation persists in complex C (Fig. 1g) with no detectable ordering of residues 697–704.

We validated our interpretation of the αCT engagement with L1–β_2 and insulin further by isothermal titration calorimetry (ITC). First, Ala-substituted αCT(704–719) peptides were titrated against the L1–CR–L2 construct IR485 (ref. 16). Second, insulin was titrated against IR485 pre-saturated with Ala-substituted αCT(704–719) (Supplementary Tables 2 and 3 and Supplementary Fig. 4). Individual F705A and L709A substitutions significantly impaired αCT binding to IR485, supporting their modelled engagement with L1–β_2. In contrast, individual H710A, N711A and F714A substitutions significantly impaired insulin binding, supporting their modelled engagement with insulin. These data are summarized schematically in Fig. 3a. An apparent exception is V713A, which affects insulin but not αCT affinity, despite Val 713 being modelled as engaged with L1–β_2. However, this

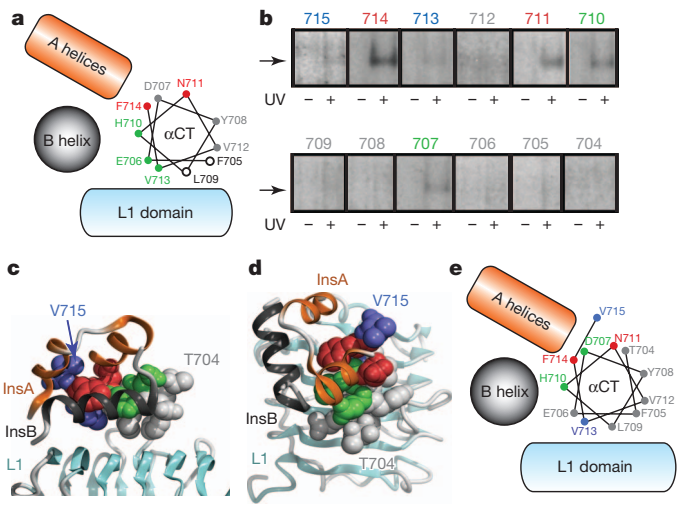


Figure 3 | Insulin interactions in L1–CR–L2 mini-insulin receptor and *holo*-insulin receptor. **a**, Helical wheel representation of ITC-derived insulin affinities for IR485 in the presence of Ala-substituted αCT(704–719) (red, >100× reduction upon Ala substitution; green, >10× reduction; grey, <10× reduction; open circle, not determined). **b**, Reducing gel autoradiograms obtained from *holo*-insulin receptor after photo-crosslinking of αCT helix to bound ^{125}I-[Tyr^{A14}]-insulin. Arrowed band indicates crosslinked insulin receptor α-chain–insulin A chain. Colours indicate crosslinking efficiency (red, strong; green, medium; blue, weak; grey, none). **c**, **d**, Qualitative crosslinking efficiency from **b** mapped onto αCT segment within the site 1 complexes. **e**, Helical wheel representation of crosslinking data presented in **b**–**d**.

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

observation aligns with the disorder of Val 713 in the *apo*-insulin receptor ectodomain structure[12]; the interaction of Val 713 with L1–β_2 may thus instead be required to stabilize the critical[11] insulin-engaging residue Phe 714 at the terminus of the αCT helix.

The insulin–site 1 interactions described here are further supported by a 'photo-scan' of the *holo*-insulin receptor αCT segment, wherein individual αCT residues were successively substituted by the photo-activatable residue *para*-azido-Phe (Pap) and then exposed to ultra-violet light to probe covalent interaction with [^{125}I]-Tyr^{A14} insulin[25]. Strong crosslinking was observed for photo-probes at sites 711 and 714, medium at sites 707 and 710, and weak at sites 713 and 715; no crosslinking was observed at sites 705, 706, 708, 709 or 712 (Fig. 3b). This photo-crosslinking efficiency pattern in *holo*-insulin receptor exhibits a marked correlation with and supports the insulin–site 1 juxtaposition described above (Fig. 3c–e).

Complexes B and C probed whether the stable β-turn at B24–B26 in receptor-free [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$[18] might result in ordering of residues B22–B26 upon binding site 1—it did not, as these residues remained unresolved. We investigated the insulin B-chain C-terminal strand further by seeking to photo-crosslink individual Pap probes at B24 and B25 to the truncated L1–CR–L2 construct IR468[26] in the presence of an αCT peptide. In both *holo*- and ectodomain insulin receptor complexes, these probes respectively crosslink to L1 and αCT[27,28]. We observed photo-crosslinking for Pap^{A3}, Pap^{A8} and Pap^{B16} (as in *holo*-insulin receptor[27]) but not for Pap^{B24} or Pap^{B25} (Supplementary Fig. 5). We thus propose that full stabilization of B22–B30 upon detachment from the hormone core requires the presence of the FnIII domains.

Superposition of the site 1 complexed assembly onto the L1 domain in the *apo*-insulin receptor ectodomain structure (Supplementary Fig. 6) shows that the insulin surface proposed[10] to bind site 2 overlays the FnIII-1–FnIII-2 junction of the alternative αβ protomer, that is, the proposed site 2 itself. However, significant steric clash is present, indicating that insulin bridging of sites 1 and 2 requires relative displacement of the FnIII-1 and FnIII-2 domains away from the L1–CR module. Such change would alter the relative location of the membrane-proximal FnIII-3 domains, potentially initiating signal transduction[13].

Concordance of our structures with the extensive biochemical literature of this system is presented in Supplementary Discussion. Briefly, the structures are consistent with alanine scanning mutagenesis of the insulin receptor L1 domain, revealing now that of the 'hot-spot' residues, the set Gln 34, Leu 36, Leu 37, Phe 64, Phe 88, Phe 89 and Glu 120 contact the αCT segment whereas only Phe 39 contacts insulin. The structural engagement of insulin receptor residues His 710 and Phe 714 with insulin concords with (1) alanine scanning mutagenesis of the insulin receptor ectodomain; (2) hydrogen/deuterium exchange studies of the closely related type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R); and (3) the lack of hormone binding by insulin receptor chimaeras and IGF1R chimaeras containing the αCT segment from the insulin-receptor-related receptor, which has threonine at the residue equivalent to insulin receptor Phe 714 (IGF1R Phe 701). Our structures are also consistent with mutational analysis of insulin, showing now that the hotspot residues Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}, Gly^{B8} and Leu^{B11} make contact with the key αCT residues His 710 and Phe 714 (Fig. 2c). Although residues Gly^{B23}, Phe^{B24} and Phe^{B25} are unresolved here, evidence is presented for the likely repositioning of the B-chain C terminus into the volume between the αCT segment, the L1–β_2 surface and the adjacent CR domain; such repositioning rationalizes the enhanced affinity of analogues containing D-amino-acid substitutions at B24.

Our structural and biochemical findings provide groundbreaking insight into the primary insulin–insulin receptor interaction. Particularly important in binding is the αCT segment, which is without known counterpart in other mammalian receptor tyrosine kinases[5], although it is conserved among metazoan insulin receptor and IGF1R. The concomitant structural re-arrangements of hormone and receptor in our model rationalize long-standing anomalies in clinical insulin variants associated with diabetes[29] and define new structural targets for novel therapeutics targeting these receptors.

METHODS SUMMARY

IR310.T was produced by proteolysis of an engineered mini-receptor precursor cIR485 expressed from a stable Chinese hamster ovary Lec8 cell line and purified by ion-exchange and size-exclusion chromatography (SEC), followed by combination with 83-7, re-purification by SEC and finally combination with excess αCT peptide and insulin (or analogue). Crystallization conditions for IR310.T-derived complexes A, B and C were 0.9–1.1 M tri-sodium citrate, 0.1 M imidazole-HCl (pH 8.0) + 0.02% sodium azide (NaN_3). IR593.αCT was expressed from a stable Chinese hamster ovary Lec8 cell line followed by insulin affinity chromatography and then SEC of the resultant bovine insulin complex. Samples were combined with 83-14 and re-purified by SEC. The crystallization condition for the IR593.αCT-derived complex D was 9% polyethylene glycol 3350, 200 mM proline, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.5). Diffraction data were collected at the Australian Synchrotron (beamline MX2) and Diamond Light Source (DLS; beamline I24). Structures were solved by molecular replacement. Introduction of Pap residues into the αCT segment used orthogonal tRNA/amber suppression technology. Mutant holoreceptors were expressed transiently using co-transfected 293PEAK rapid cells in Pap-containing medium. Cell detergent lysates were then subjected to wheat-germ agglutinin chromatography; eluates containing the receptor were concentrated before photo-crosslinking to ^{125}I-[Tyr^{A14}] insulin. Photo-crosslinked products were resolved by gel electrophoresis and auto-radiographed. IR468 was produced by transient expression in HEK293 cells. ^{125}I-photo-activatable insulin analogues were incubated with IR468 in the presence of 10^{-5} M αCT(703–719)–Myc and then photo-crosslinked. Samples were resolved by gel electrophoresis and auto-radiographed. For ITC, Ala-substituted αCT peptides (80 μM concentration) were titrated into a sample cell containing IR485 (10 μM concentration); and zinc-free porcine insulin (32–48 μM concentration) was titrated into a sample cell containing IR485 (4–6 μM concentration) pre-incubated with Ala-substituted αCT peptide (10× molar concentration). All samples were in Tris-buffered saline (pH 8.0) plus azide (TBSA).

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Received 25 July; accepted 12 November 2012.

1. Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. & Kahn, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7,** 85–96 (2006).
2. Cohen, P. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7,** 867–873 (2006).
3. Talbot, K. *et al.* Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* **122,** 1316–1338 (2012).
4. Pollak, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nature Rev. Cancer* **12,** 159–169 (2012).
5. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141,** 1117–1134 (2010).
6. Adams, M. J. *et al.* Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals. *Nature* **224,** 491–495 (1969).
7. McKern, N. M. *et al.* Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* **443,** 218–221 (2006).
8. Seino, S. & Bell, G. I. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159,** 312–316 (1989).
9. Schäffer, L. A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur. J. Biochem.* **221,** 1127–1132 (1994).
10. De Meyts, P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* **26,** 1351–1362 (2004).
11. Ward, C. W. & Lawrence, M. C. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays* **31,** 422–434 (2009).
12. Smith, B. J. *et al.* Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107,** 6771–6776 (2010).
13. Ward, C. W. & Lawrence, M. C. Similar but different: ligand-induced activation of the insulin and epidermal growth factor receptor families. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22,** 360–366 (2012).
14. Kiselyov, V. V., Versteyhe, S., Gauguin, L. & De Meyts, P. Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol. Syst. Biol.* **5,** 243 (2009).
15. Whittaker, L., Hao, C., Fu, W. & Whittaker, J. High-affinity insulin binding: insulin interacts with two receptor ligand binding sites. *Biochemistry* **47,** 12900–12909 (2008).

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

16. Lou, M. *et al.* The first three domains of the insulin receptor differ structurally from the insulin-like growth factor 1 receptor in the regions governing ligand specificity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103,** 12429–12434 (2006).
17. Garrett, T. P. *et al.* Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* **394,** 395–399 (1998).
18. Jiráček, J. *et al.* Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107,** 1966–1970 (2010).
19. Karplus, P. A. & Diederichs, K. Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336,** 1030–1033 (2012).
20. Evans, P. Resolving some old problems in protein crystallography. *Science* **336,** 986–987 (2012).
21. Brünger, A. T., DeLaBarre, B., Davies, J. M. & Weis, W. I. X-ray structure determination at low resolution. *Acta Crystallogr. D* **65,** 128–133 (2009).
22. Smart, O. S. *et al.* Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. D* **68,** 368–380 (2012).
23. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D* **67,** 355–367 (2011).
24. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M. & Weiss, M. A. Receptor binding redefined by a structural switch in a mutant human insulin. *Nature* **354,** 238–241 (1991).
25. Whittaker, J. *et al.* α-Helical element at the hormone-binding surface of the insulin receptor functions as a signaling element to activate its tyrosine kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109,** 11166–11171 (2012).
26. Kristensen, C., Wiberg, F. C. & Andersen, A. S. Specificity of insulin and insulin-like growth factor I receptors investigated using chimeric mini-receptors. Role of C-terminal of receptor α subunit. *J. Biol. Chem.* **274,** 37351–37356 (1999).
27. Xu, B. *et al.* Diabetes-associated mutations in insulin: consecutive residues in the B chain contact distinct domains of the insulin receptor. *Biochemistry* **43,** 8356–8372 (2004).
28. Xu, B. *et al.* Decoding the cryptic active conformation of a protein by synthetic photo-scanning. Insulin inserts a detachable arm between receptor domains. *J. Biol. Chem.* **284,** 14597–14608 (2009).
29. Xu, B. *et al.* Diabetes-associated mutations in insulin identify invariant receptor contacts. *Diabetes* **53,** 1599–1602 (2004).
30. Weiss, M. S. Global indicators of X-ray data quality. *J. Appl. Cryst.* **34,** 130–135 (2001).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements This Letter is dedicated to our co-author, the late Guy Dodson, in recognition of his lifetime contribution to the study of the structure of insulin. This work was supported by Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) Project grants 516729, 575539 and 1005896 and the Hazel and Pip Appel Fund (to M.C.L.), NHMRC Independent Research Institutes Infrastructure Support Scheme Grant 361646 and Victorian State Government Operational Infrastructure Support Grant (to the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research), NIH grant no. DK40949 (to M.A.W. and J.W.) and American Diabetes Association grant no. 1-11INI-31 (to J.W.), Grant Agency of the Czech Republic grant P207/11/P430 (to L.Z.), Research Project of the Academy of Sciences of the Czech Republic RVO:61388963 (to the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry), NIH grants DK13914 and DK20595 (to D.F.S.), a BBSRC PhD studentship (to C.J.W.) and the UoY Research Priming Fund (to the York Structural Biology Laboratory). Part of this research was undertaken on the MX2 beamline at the Australian Synchrotron (AS), Victoria, Australia. We thank the DLS for access to beamline I24 and the Australian International Synchrotron Access Program for travel funds. We thank P. Colman and J. Gulbis, our colleagues at CSIRO and the AS beam line staff for their support; J. Turkenburg for assistance in collecting data at DLS; K. Huang for assistance with midi-receptor photo-crosslinking; Q.-X. Hua and Y. Yang for discussion of NMR studies of insulin; S.-Q. Hu, S. H. Nakagawa, N. F. Phillips and S. Wang for assistance with insulin analogue synthesis; P. G. Katsoyannis for advice about the synthesis of photo-reactive insulin analogues and for providing an initial set of Pap analogues; K. Siddle for supplying the 83-7 and 83-14 hybridomas; L. Lu and the fermentation group CSIRO Materials Science and Engineering for large-scale cell culture.

Author Contributions J.G.M. and J.W. contributed equally to the paper. J.G.M. purified and crystallized samples, collected data and performed the ITC study; J.W. and L.J.W. performed receptor photo-crosslinking experiments; M.B.M. performed molecular biology, cell culture and crystallization experiments; S.J.C. performed insulin photo-crosslinking experiments; G.K.-W.K. and C.J.W. performed crystallography experiments; B.J.S. performed calculations; E.K., L.Z. and J.J. prepared insulin analogues; C.W.W., M.A.W., J.W., D.F.S., S.J.C., J.G.M. and M.C.L. designed the experiments and analysed data. C.W.W., M.A.W., A.M.B., G.G.D. and M.C.L. wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Author Information Atomic coordinates and structure factors for complexes A, B, C and D have been deposited with the Protein Data Bank under accession codes 3W11, 3W12, 3W13 and 3W14, respectively. Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare competing financial interests: details are available in the online version of the paper. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.C.L. (lawrence@wehi.edu.au) or M.A.W. (michael.weiss@case.edu).

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

METHODS

Cloning, production and purification of IR310.T. High yield and correct folding of IR310.T was achieved by design of a thrombin-cleavable version of IR485[16] (termed cIR485) for use as precursor, followed by production and purification protocols for cIR485 similar to those described for IR485[16]. A 1,741-nucleotide base fragment of insulin receptor was synthesized (DNA2.0) and inserted into the HindIII–XbaI sites of the vector pEE14 (Lonza). The fragment encoded a protein cIR485 ('cleavable' IR485) which consists, in order, of (1) the 27-residue insulin receptor native signal sequence; (2) residues 1–310 of the insulin receptor α-chain (the L1–CR module); (3) a thrombin cleavage site SSSLVPRGSSS; (4) residues 311–485 of the insulin receptor α-chain (the L2 domain); (5) an enterokinase cleavage site DDDDK; and (6) a c-Myc purification tag EQKLISEEDLN[31] (see Supplementary Fig. 7). A 106-nucleotide-base non-coding fragment 5′-GTCG ACGGTACCCCGGGGAATTAATTCCGGGGGCCGCCTCGGAGCATGACC CCCGCGGGCCAGCGCCGCGCGCTCTGATCCGAGGAGACCCCGCGCTC CCGCAGCC-3′ was included between the HindIII site and the region expressing the signal peptide; bases 29–106 of this fragment correspond to those immediately upstream of the human insulin receptor coding region. CHO Lec8 cells (CRL-1737; ATCC)[32] were transfected with the cIR485-containing expression vector using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Selection was undertaken in the presence of methionine sulphoximine (MSX), with cIR485 production monitored via western blot with monoclonal antibodies 83-7[33] and 9E10[34]. Production scale-up, performed under contract by CSIRO, was in spinner flasks (New Brunswick Scientific) containing DMEM/F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies) plus 25 μM MSX. The medium was supplemented with 0.8 mM butyric acid (Sigma-Aldrich) during the last week of the production phase. A total of 50 l of culture supernatant was collected; harvests were filtered (0.2 μm cutoff) and then concentrated 10-fold (30 kDa cutoff) after addition of 0.1 mM phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF; Sigma-Aldrich) and 0.02% sodium azide (NaN_3). Accumulated supernatant harvests were adjusted to pH 8 by addition of 3 M Tris-HCl (pH 8.5). Initial purification of cIR485 was by 9E10 antibody affinity chromatography and size-exclusion chromatography (SEC) using procedures effectively identical to those described for purification of IR485[16]. Purified cIR485 in Tris-buffered saline (24.8 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) plus 0.02% NaN_3 (TBSA) was then incubated overnight at 37 °C with 0.25 units human thrombin (Roche) per mg of cIR485 in the presence of 10 mM $CaCl_2$. Completion of proteolysis was assessed by SDS–PAGE, which revealed bands corresponding to the estimated molecular mass of the IR310.T fragment and the insulin receptor L2 domain (51 kDa and 30 kDa, respectively; Supplementary Fig. 8a). Western blotting with monoclonal antibody 83-7 confirmed that the CR domain was contained in the upper band alone. The sample was diluted 8-fold in buffer A (10 mM ethanolamine-HCl, pH 9.6 + 0.02% NaN_3), centrifuged for 5 min at 17,000*g* to remove particulates and then loaded onto a Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare). The sample was eluted with a 60 column-volume gradient of buffer A to buffer B (10 mM ethanolamine-HCl, 400 mM NaCl, pH 9.6 + 0.02% NaN_3; Supplementary Fig. 8b) and the fractions assessed by SDS–PAGE. Fractions containing IR310.T were pooled, concentrated and re-run in TBSA on a Superdex 200 10/300 column (GE Healthcare). The chromatogram exhibited three overlapping peaks, probably arising from multimerization (Supplementary Fig. 8c). SDS–PAGE of fractions revealed the presence of three closely spaced bands, which we attributed to varying glycosylation (Supplementary Fig. 8d). The final yield of IR301.T was ~0.5 mg ml^{-1} of cell culture.

Large-scale production and purification of Fab 83-7. A hybridomal cell line expressing monoclonal antibody 83-7[33] was a gift from K. Siddle. Large-scale production and purification of monoclonal antibody 83-7 and preparation of Fab 83-7 from monoclonal antibody 83-7 were based on protocols described previously[7]. In particular, monoclonal antibody 83-7 was proteolysed with dithiothreitol-activated papain (Sigma-Aldrich) at 37 °C. Proteolysis was stopped by adding iodoacetamide (IAA; Sigma-Aldrich) and the reaction mixture then passed down a Superdex 200 26/60 column (GE Healthcare). Fractions containing 83-7 F(ab′)$_2$ were isolated and reduced with mercaptoethylamine (Sigma-Aldrich) and then alkylated with IAA, followed by further SEC and cation-exchange chromatography on Mono S (GE Healthcare).

Production of Fab 83-7-complexed IR310.T. IR310.T was mixed with a slight molar excess of Fab 83-7 and the complex purified by SEC using a Superdex S200 10/300 column (GE Healthcare) in TBSA buffer. Fractions containing the complex of IR310.T/Fab 83-7 were then pooled, concentrated and exchanged into 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) + 0.02% NaN_3 for crystallization screens.

Cloning, production and purification of IR593.αCT. CHO Lec8 cells stably expressing IR593.αCT were obtained from CSIRO. These cells were derived by co-transfection with both the linearized expression plasmid pEE14 (Lonza) and a pEF puromycin plasmid (Springer Labs). The pEE14 expression plasmid contained, inserted between its HindIII–XbaI sites, a fragment encoding (in order) the 27-amino-acid residue insulin receptor signal sequence, insulin receptor residues 1–593 and insulin receptor residues 704–719 (see Supplementary Fig. 9). The 106-nucleotide-base non-coding fragment described above was also included here between the HindIII site and the start codon. Selection was undertaken in the presence of puromycin, with IR593.αCT production monitored via europium-labelled insulin binding assays[35]. Production scale-up, performed under contract by CSIRO, was in spinner flasks (New Brunswick Scientific) containing DMEM/F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS plus 10 μg ml^{-1} puromycin. Accumulated supernatant batches were adjusted to pH 8 by addition of 3 M Tris-HCl (pH 8.5). PMSF was added to 0.1 mM concentration and NaN_3 to 0.02%. The culture supernatant was filtered (0.2 μm cutoff), concentrated 10-fold (10 kDa cutoff) and pumped through a Sephacryl S100 column (GE Healthcare) onto an in-house manufactured *bis*-Boc-insulin MiniLeak medium resin column (Kem-En-Tec)[36]. The latter was eluted with bovine insulin in TBSA. PMSF was again added to 0.1 mM concentration and the eluates concentrated for Superdex S200 26/60 or S200 10/300 (GE Healthcare) SEC. The SEC profiles showed a single major peak corresponding to the insulin-complexed IR593.αCT homodimer and a further peak corresponding to excess bovine insulin (Supplementary Fig. 8g). At higher concentrations, an additional peak appeared corresponding to a dimer of IR593.αCT homodimers (Supplementary Fig. 8h). Contents of fractions were analysed by SDS–PAGE (data not shown). The final yield of IR593.αCT was ~0.4 mg l^{-1} of cell culture supernatant.

Large-scale production and purification of Fab 83-14. A hybridomal cell line expressing Mab 83-14[33] was a gift from K. Siddle. Cells were grown in 950 cm^2 roller bottles at 37 °C in 5% CO_2 (balanced with air) at 10 r.p.m., using approximately 300 ml H-SFM medium supplemented with 5% fetal calf serum (FCS). Typically, 2–3 l of cell culture at a viable cell density of 2–3 × 10^6 cells ml^{-1} was achieved. Cells were then pelleted (5 min, 350*g*) and re-suspended in serum-free medium. The culture was collected when cell viability dropped below 30% (after 5–7 days). Monoclonal antibody 83-14 from collected supernatant was captured using a ProSep-vA column (Millipore). Monoclonal antibody 83-14 was proteolysed with dithiothreitol-activated papain (Sigma-Aldrich) at 37 °C. Proteolysis was stopped by adding IAA and the reaction mixture containing Fab 83-14 was then passed down a Superdex 200 26/60 column. Final purification of Fab 83-14 was by cation-exchange chromatography on a MonoS column (GE Healthcare).

Purification of the IR593.αCT + Fab 83-14 + insulin complex. The IR593.αCT protein was combined with an excess of bovine insulin and Fab 83-14 and then re-subjected to SEC. The SEC profiles (Supplementary Fig. 8i) showed a major peak with a molecular mass corresponding to that of a dimer of Fab-complexed IR593.αCT homodimers and a shoulder of molecular weight corresponding to that of an Fab-complexed IR593.αCT homodimer, as well as peaks corresponding to excess Fab 83-14 and insulin. Fractions corresponding to the higher molecular mass component of the major peak were pooled and then concentrated in a 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) + 0.02% NaN_3 buffer for crystallization.

Production of IR468-containing media. A DNA fragment encoding the signal peptide plus residues 1–468 of human insulin receptor was inserted into the HindIII–XbaI sites of the vector pcDNA3.1zeo(+) (Life Technologies) and then transiently transfected into HEK293 cells. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies) supplemented with 10% FCS for 72 h after transfection; media containing IR468 were then collected and stored at −20 °C until used.

Crystallization and diffraction data collection of complexes A to D. Complexes A, B, C and D are as defined in Table 1. Complexes A, B and C were prepared for crystallization by combining the Fab 83-7 bound IR310.T (final concentration 3.5 mg ml^{-1}) with a 1.5× molar ratio of αCT peptide (Genscript) and 3× molar ratio of human insulin (Sigma-Aldrich) or [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ in 10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) + 0.02% sodium azide (NaN_3). [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ was prepared as described previously[37]. A single crystallization condition for complex A was detected using a sparse-matrix 792-condition screen (CSIRO Collaborative Crystallization Centre) and optimized manually to 0.9–1.1 M tri-sodium citrate, 0.1 M imidazole-HCl (pH 8.0) + 0.02% NaN_3 for all complexes A, B and C. An initial crystallization condition for complex D at 2.0 mg ml^{-1} was detected in a similar 792-condition screen and optimized manually to 9% PEG3350, 200 mM proline, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7.5). For data collection, the complex A and B crystals were cryo-protected by transfer to paraffin oil HR403 (Hampton Research), the complex C crystal by progressive increase of the precipitant concentration to saturated tri-sodium citrate, and complex D crystal by addition of 20% glycerol to the crystallant solution. All crystals were cryo-cooled by plunging into liquid nitrogen and maintained at ~100 K during data collection. Data set 1 for the complex A crystal and the data set for the complex D crystal were collected at beamline MX2 at the Australian Synchrotron[38] (λ = 0.95369 Å). The remaining data sets were collected at beamline I24 at the

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Diamond Light Source ($\lambda = 0.96860$ Å). Diffraction data were processed with XDS[39] and CCP4[40]. Resolution limits were assessed on the basis of the significance of $CC_{1/2}$ at the $P = 0.001$ level[19]. Data processing statistics are provided in Table 1.

Structure solution and refinement of complex A. PHASER[41] located within the asymmetric unit a single copy each of the L1–CR module and the variable module of 83-7 (using data set 1). The 83-7 constant module was not located and ultimately presumed disordered. TLS parameters and individual restrained isotropic B-factors were then refined using autoBUSTER[42], followed by atomic coordinate-only refinement, yielding $R^{xpct}_{work}/R^{xpct}_{free} = 0.368/0.363$ (where R^{xpct} is the crystallographic R-factor reported by autoBUSTER, computed using the expectation value of F_{calc} instead of the value itself)[43]. The difference density maps contained four helix-like features encompassing the first, third, fourth, fifth and seventh highest peaks in the map (the second highest peak being glycan conjugated to Asn 111; Supplementary Fig. 10a). These features lay adjacent to the L1–β_2 surface, and PHASER then positioned the three insulin helices as a rigid entity onto three of these (TFZ = 11.4). Correctness of this solution was verified by exhaustive six-dimensional real-space search using ESSENS[44] (Supplementary Fig. 10b). The structure was then refined further, yielding $R^{xpct}_{work}/R^{xpct}_{free} = 0.320/0.339$. The remaining helix-like feature in the above difference map (the first and fifth highest peaks) revealed clear side-chain protrusions upon negative B-factor map sharpening[21], spaced consistent with an underlying α-helix (Supplementary Fig. 10c). We concluded that it arose from the αCT peptide as there were no further sources of peptide in the crystallization sample. A ten-residue poly-alanine α-helix was then docked into this feature using ESSENS; the best fit was adequately discriminated from lower-scoring fits and visual inspection confirmed the direction of the helix as judged by protruding side-chain density (Supplementary Fig. 10c). A procedure was then devised to assign, in an objective fashion, the sequence register to this 10-residue segment, based on compatibility of individual residue side chains both with sharpened difference electron density and with their surrounding protein environment. (1) Fit to difference density used a method designed not only to assess the fit of atoms within the density, but also to penalize the existence of volumes of positive difference density into which no atoms had been placed. Briefly, voxels corresponding to the αCT feature were excised from the B-factor-sharpened[21] map using CHIMERA[45] (cutoff level = 0.16 $e^- Å^{-3}$) and placed within a rectangular grid volume large enough to allow a >8 Å buffer zone around the feature. All grid points outside of the feature were set to 0 $e^- Å^{-3}$, with the resultant map being termed M_{obs}. Coordinates for residues 1, 2 and 10 of the fitted poly-alanine helix were then deleted from the model, as the density associated with them displayed poorer α-helical geometry. Ten alternatives, corresponding to all possible alignments of sub-sequences of αCT(704–719) with the heptameric poly-alanine structure, were then assessed. Rotamers for each residue within each of these ten models were then assigned manually using COOT[46] based on visual inspection of the fit of the trial rotamer to the density at the corresponding site in M_{obs}. The ten individual models were then 'real-space-refined' within COOT to achieve optimal fit to M_{obs}, maintaining tight helical restraints. An electron density map M_{calc}, on the same grid as M_{obs}, was then generated (using SFALL within CCP4) for each heptamer model in isolation, with the B-factors of all main-chain atoms being set to 10 $Å^2$ and of all side-chain atoms set to 20 $Å^2$ to allow for subsequent comparison with a sharpened map. All grid points within M_{calc} with $\rho < 0.45\, e^- Å^{-3}$ were set to 0 $e^- Å^{-3}$. Correlation coefficients $CC = (<xy> - <x><y>)/\sqrt{[(<x^2> - <x>^2)(<y^2> - <y>^2)]}$ between M_{obs} and each M_{calc} were then calculated using MAPMAN[47]. Each CC was then 'normalized' by dividing its value by the CC value calculated for the underlying poly-alanine heptamer, and the quotient termed the trial sequence's 'density score'. The heptamer with trial register 705–711 was seen to have the highest density score (Supplementary Table 4). (2) Compatibility of residue side-chain environment within the L1–αCT–insulin interface was assessed as follows. For each of the ten trial heptamer (real-space refined) models described above, an 'environment score' was generated using VERIFY3D[48] to assess compatibility with the surrounding L1–β_2 and insulin surfaces. Trial register 705–711 again scored highest (Supplementary Table 4). A 'combined score' was then computed as the product (density score) × (environment score) to assist assessment of lower-ranked trial registers (Supplementary Table 4). The next highest combined score was for trial register 709–715, which is related to trial register 705–711 by a one-turn translation along the helix, effectively maintaining hydrophobic-to-hydrophobic docking with the L1 surface. However, register 709–715 was judged to be most unlikely, as it would bring Pro 716 and Pro 718 into the remaining C-terminal region of the helix. We concluded that register assignment 705–711 was correct, given that it ranked highest on all criteria. The assignment aligned with that assessed directly from the EDDMs for complex D, wherein the αCT segment is directly attached to the C-terminus of FnIII-1 and the ambiguity of assignment strictly limited. Nine sugar residues were also included at N-linked sites 16, 25, 111, 225 and 255[16,49]. Final refinement was against data set 2, using local structural similarity restraints (LSSRs)[22] against Protein Data Bank (PDB) structures 2HR7-A (L1-CR), 1IL1-B (83-7 light chain) and 1FNS-H (83-7 heavy chain), yielding $R^{xpct}_{work}/R^{xpct}_{free} = 0.264/0.292$ (see Supplementary Table 1). Ramachandran statistics are: favoured region 91%, acceptable region 5% and disallowed region 4%.

Structure solution and refinement of complexes B and C. These structures were solved independently. MOLREP[50] was used to locate the L1–CR/83-7 fragment and the structure then refined with REFMAC5[23]. [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2 (PDB entry 2WRW) was then located using MOLREP, its position being effectively identical to that in the native insulin complex (complex A). The αCT segment from the wild-type insulin complex was fitted in the final electron density maps using COOT. Final refinement gave $R_{work}/R_{free} = 0.289/0.349$ and $R_{work}/R_{free} = 0.289/0.335$, respectively (Supplementary Table 1). Ramachandran statistics for both complexes are: favoured region 89%, acceptable region 7% and disallowed region 4%.

Structure solution and refinement of complex D. Molecular replacement with PHASER located sequentially two copies each of a module consisting of Fab 83-14 in complex with the FnIII-1 domain, an L1–CR module and an L2 domain, using search models derived from PDB entry 3LOH[12]. The assembly was subject to rigid-body and TLS refinement using autoBUSTER, followed by individual restrained isotropic B-factor and coordinate refinement, subject both to LSSRs to PDB entries 2HR7-A (L1-CR-L2), 3LOH-E (FnIII-1), 1PLG-H (83-14 heavy chain) and 2VXU-M (83-14 light chain) and to non-crystallographic symmetry (NCS) restraints, yielding $R^{xpct}_{work}/R^{xpct}_{free} = 0.308/0.299$. Difference electron density analysis revealed: (1) two helix-like features of electron density, each connected to a respective insulin receptor residue Thr 593 and lying on the L1–β_2 surface of an adjacent monomer, thus identifiable as the αCT segment of IR593.αCT; and (2) two clusters of three helix-like features, each cluster lying adjacent to a respective one of the above αCT segments and putatively identifiable as insulin. Insulin was then docked into each of the above putative insulin–αCT clusters of features by means of an exhaustive six-dimensional ESSENS search. The highest scoring solution in each instance overlaid insulin accurately onto the respective three-helix cluster (Supplementary Fig. 10d) and was well discriminated from lower scoring solutions; the pose of insulin and αCT with respect to L1–β_2 was effectively identical at the two NCS related sites. The two insulins were then included in the model followed by further refinement. COOT was then used to position poly-alanine α-helices into the respective density features corresponding to the αCT segment (sharpened by the application of a negative B-factor), followed by mutation of the sequence to that of αCT residues 704–715. Assignment of the αCT register presented no more than a single residue prima facie ambiguity (depending on the way in which residues at the FnIII-1–αCT peptide junction were built). One alternative was strongly favoured, aligning independently with that determined for complexes A, B and C above. Residues B5–B7 of each insulin could be built into electron density following a path similar to that seen in certain high-affinity insulin analogues[18]. Further crystallographic refinement was then undertaken with autoBUSTER, yielding final $R^{xpct}_{work}/R^{xpct}_{free} = 0.244/0.260$ (Supplementary Table 1). Ramachandran statistics are favoured region 88%, acceptable region 7% and disallowed region 5%.

Holoreceptor photo-crosslinking. Production and photo-crosslinking of derivatized holoreceptors were performed as described previously[25].

Photo-crosslinking of Pap-derivatized insulins to IR468. Photo-activatable insulin derivatives Pap^{A3}-Ins, Pap^{A8}-DKP-Ins, Pap^{B16}-DKP-Ins, Pap^{B24}-DKP-Ins, [Pap-^{B25}]-DP-Ins were synthesized as described[28,51] and iodinated using the chloramine-T oxidation method. αCT(703–719)-Myc peptide was synthesized in-house. ^{125}I-photo-activatable insulin analogues were incubated overnight at 4 °C with IR468 and 10^{-5} M αCT(703–719)-Myc in 100 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.05% bovine serum albumin, 0.025% Triton X-100. One aliquot was exposed to short-wavelength ultraviolet light (Mineralight UVG-54) for 30 s at 1 cm and a second aliquot treated with 0.2 mM disuccinimidyl suberate (DSS; Pierce). Samples were diluted with Laemmli sample buffer, resolved on 10% Tricine SDS-PAGE and auto-radiographed.

Isothermal titration calorimetry (ITC). ITC analysis of insulin binding to IR310.T and its Fab 83-7 complex followed protocols identical to those described previously[52]. The affinity of zinc-free human insulin for IR310.T in the presence of a 10× molar ratio of αCT(704–719) was determined to be $K_d = 30$ nM (Supplementary Fig. 8e) and the affinity of zinc-free human insulin for IR310.T–Fab 83-7 in the presence of a 10× molar ratio of αCT(704–719) to be $K_d = 48$ nM (Supplementary Fig. 8f). ITC analysis of mutant αCT peptides binding to IR485 and of insulin binding to IR485 in complex with mutant αCT peptide were also performed as described previously[52], with samples prepared in TBSA (25 mM Tris-HCl, 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, pH 8.0 + 0.02% NaN_3).

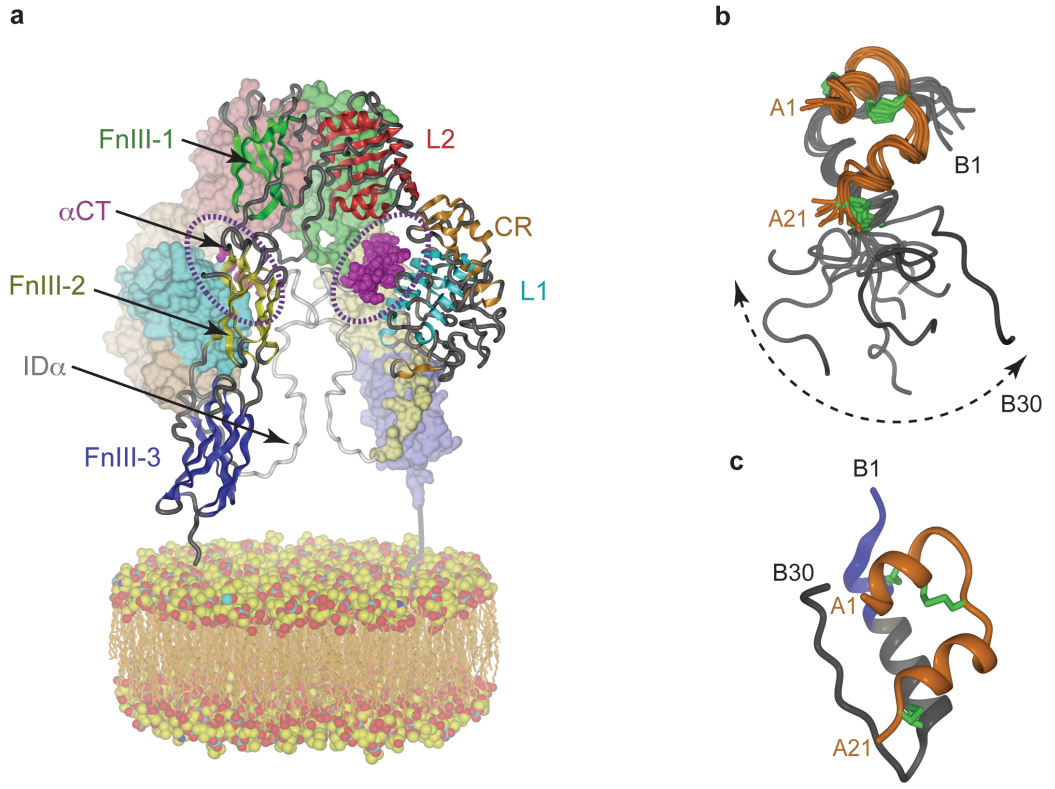
31. Hoogenboom, H. R. *et al.* Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res.* **19,** 4133–4137 (1991).

©2013 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

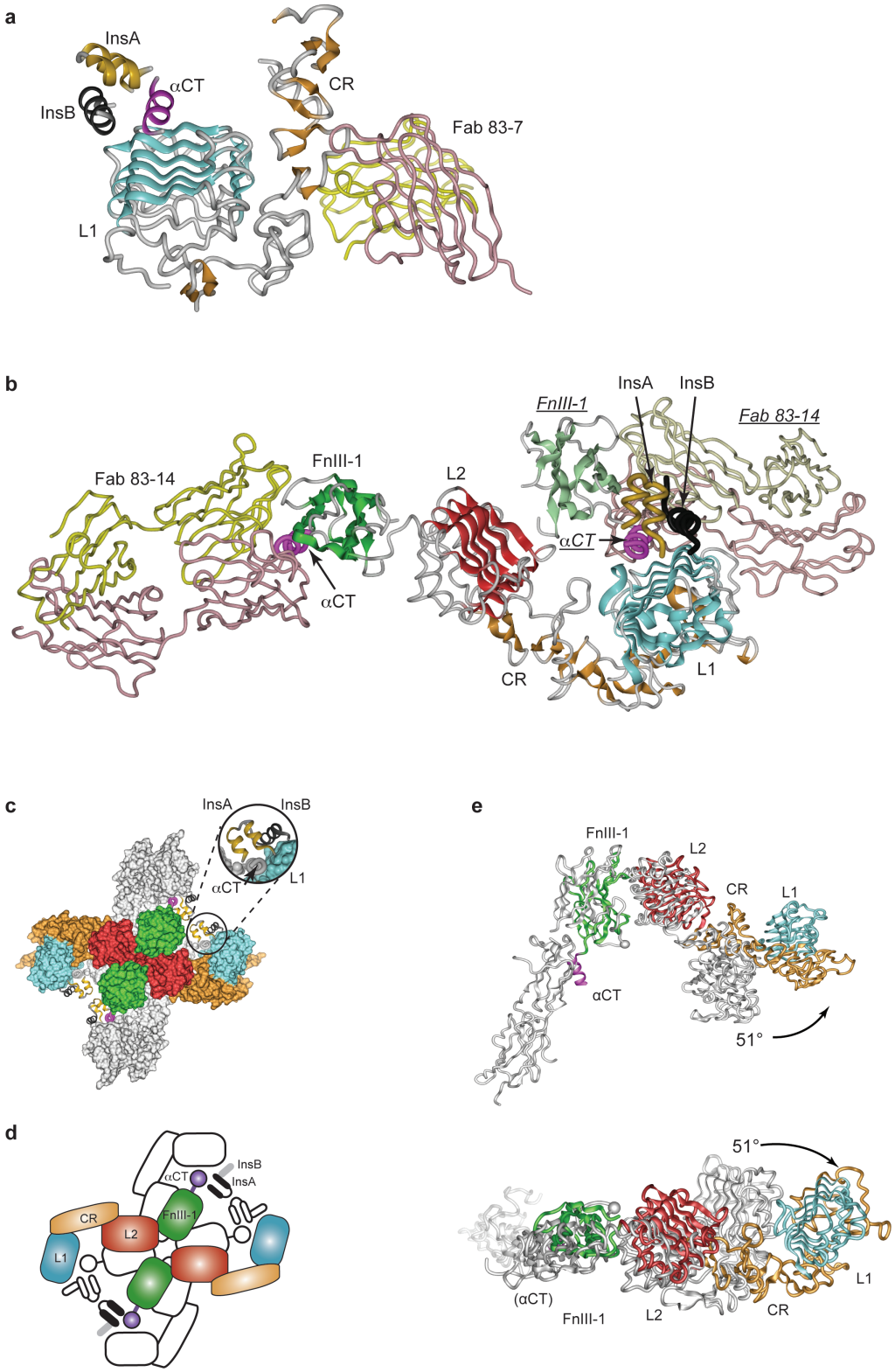
32. Stanley, P. Chinese hamster ovary cell mutants with multiple glycosylation defects for production of glycoproteins with minimal carbohydrate heterogeneity. *Mol. Cell. Biol.* **9,** 377–383 (1989).
33. Soos, M. A. *et al.* Monoclonal antibodies reacting with multiple epitopes on the human insulin receptor. *Biochem. J.* **235,** 199–208 (1986).
34. Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. & Bishop, J. M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5,** 3610–3616 (1985).
35. Denley, A. *et al.* Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol. Endocrinol.* **18,** 2502–2512 (2004).
36. Markussen, J., Halstrom, J., Wiberg, F. C. & Schäffer, L. Immobilized insulin for high capacity affinity chromatography of insulin receptors. *J. Biol. Chem.* **266,** 18814–18818 (1991).
37. Žáková, L. *et al.* Insulin analogues with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry* **47,** 5858–5868 (2008).
38. McPhillips, T. M. *et al.* Blu-ice and the distributed control system: software for data acquisition and instrument control at macromolecular crystallography beamlines. *J. Synchrotron Radiat.* **9,** 401–406 (2002).
39. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D* **66,** 133–144 (2010).
40. Collaborative Computing Project, No The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50,** 760–763 (1994).
41. McCoy, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr. D* **63,** 32–41 (2007).
42. Bricogne, G. *et al.* BUSTER version 2.10 (Global Phasing Ltd, 2011).
43. Blanc, E. *et al.* Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr. D* **60,** 2210–2221 (2004).
44. Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. Template convolution to enhance or detect structural features in macromolecular electron-density maps. *Acta Crystallogr. D* **53,** 179–185 (1997).
45. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comp. Chem.* **25,** 1605–1612 (2004).
46. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **60,** 2126–2132 (2004).
47. Jones, T. A. & Thirup, S. Using known substructures in protein model building and crystallography. *EMBO J.* **5,** 819–822 (1986).
48. Lüthy, R., Bowie, J. U. & Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356,** 83–85 (1992).
49. Sparrow, L. G. *et al.* N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **71,** 426–439 (2008).
50. Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. D* **66,** 22–25 (2010).
51. Hua, Q. X. *et al.* Enhancing the activity of a protein by stereospecific unfolding. The conformational life cycle of insulin and its evolutionary origins. *J. Biol. Chem.* **248,** 14586–14596 (2009).
52. Menting, J. G., Ward, C. W., Margetts, M. B. & Lawrence, M. C. A thermodynamic study of ligand binding to the first three domains of the human insulin receptor: relationship between the receptor α-chain C-terminal peptide and the site 1 insulin mimetic peptides. *Biochemistry* **48,** 5492–5500 (2009).

©2013 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved**

doi:10.1038/nature11781



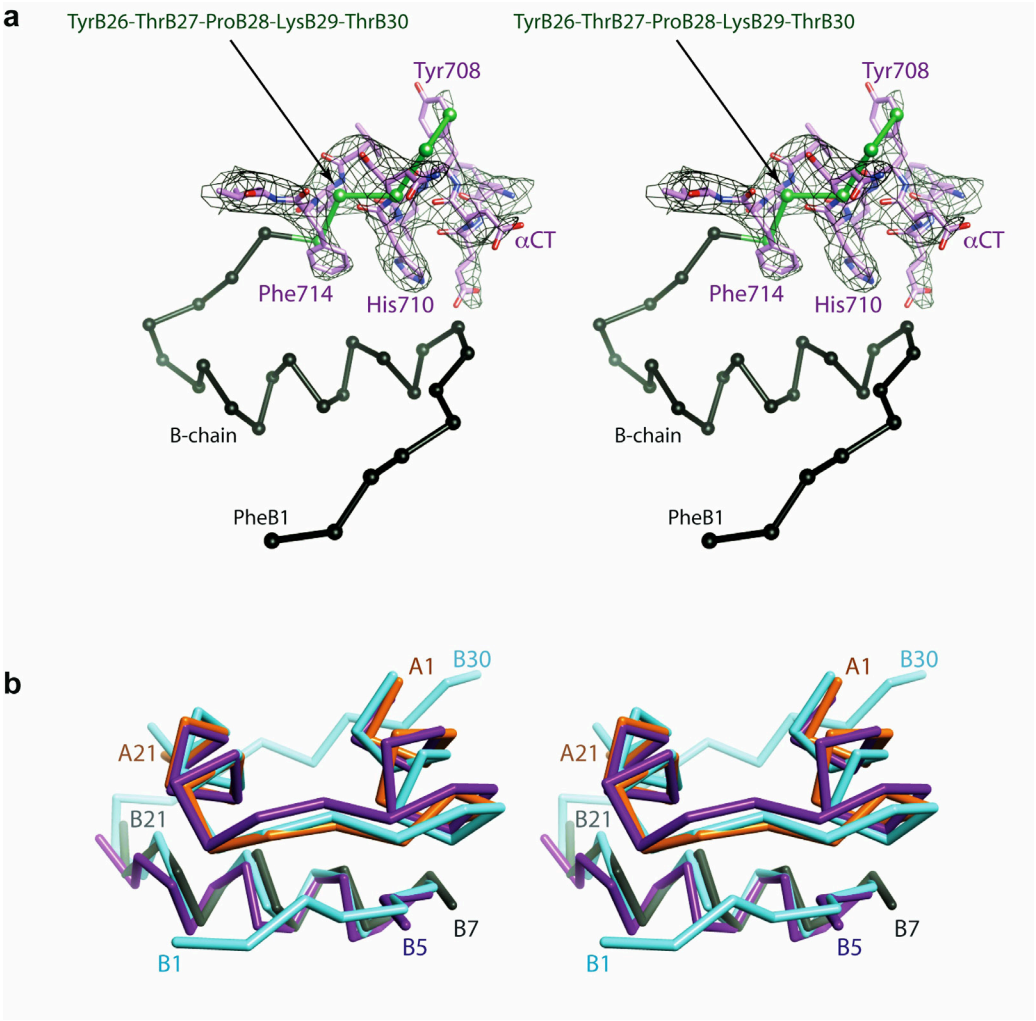
Supplementary Fig. 1: Structural biology of the insulin receptor system.
a, Three-dimensional structure of the insulin receptor ectodomain, with the foreground monomer in schematic secondary structure representation and the other in molecular surface or atomic sphere representation. The ectodomain homodimer has a two-fold symmetric inverted "V" conformation, with the L1-CR-L2 module of one insulin receptor monomer packed against the FnIII-1,-2,-3 module of the alternate insulin receptor monomer. In particular, the αCT segment of one insulin receptor monomer packs against the central β-sheet (L1-β_2) of the L1 domain of the alternate insulin receptor monomer[7,11,12] This tandem L1-β_2 / αCT element forms site 1, the primary insulin-binding site (dashed ellipse). Site 2, the secondary insulin-binding site[7,10,15], is formed by residues at the junction of the FnIII-1 and FnIII-2 domains of the opposite α-chain to that contributing the L1 domain to site 1. **b,** Proposed detachment of the C-terminal B-chain residues B20-B30 from the helical core of insulin upon receptor binding[24]. **c**, Proposed extension of the B-chain helix to include residues B1-B8 (blue) – the so-called T- to R-state transition[53-55]. In the absence of three-dimensional structural data on the hormone receptor complex, the structural transitions proposed in **b** and **c** have remained speculative.



Supplementary Fig. 2: Quaternary structures of Complexes A and D. *(caption overleaf)*

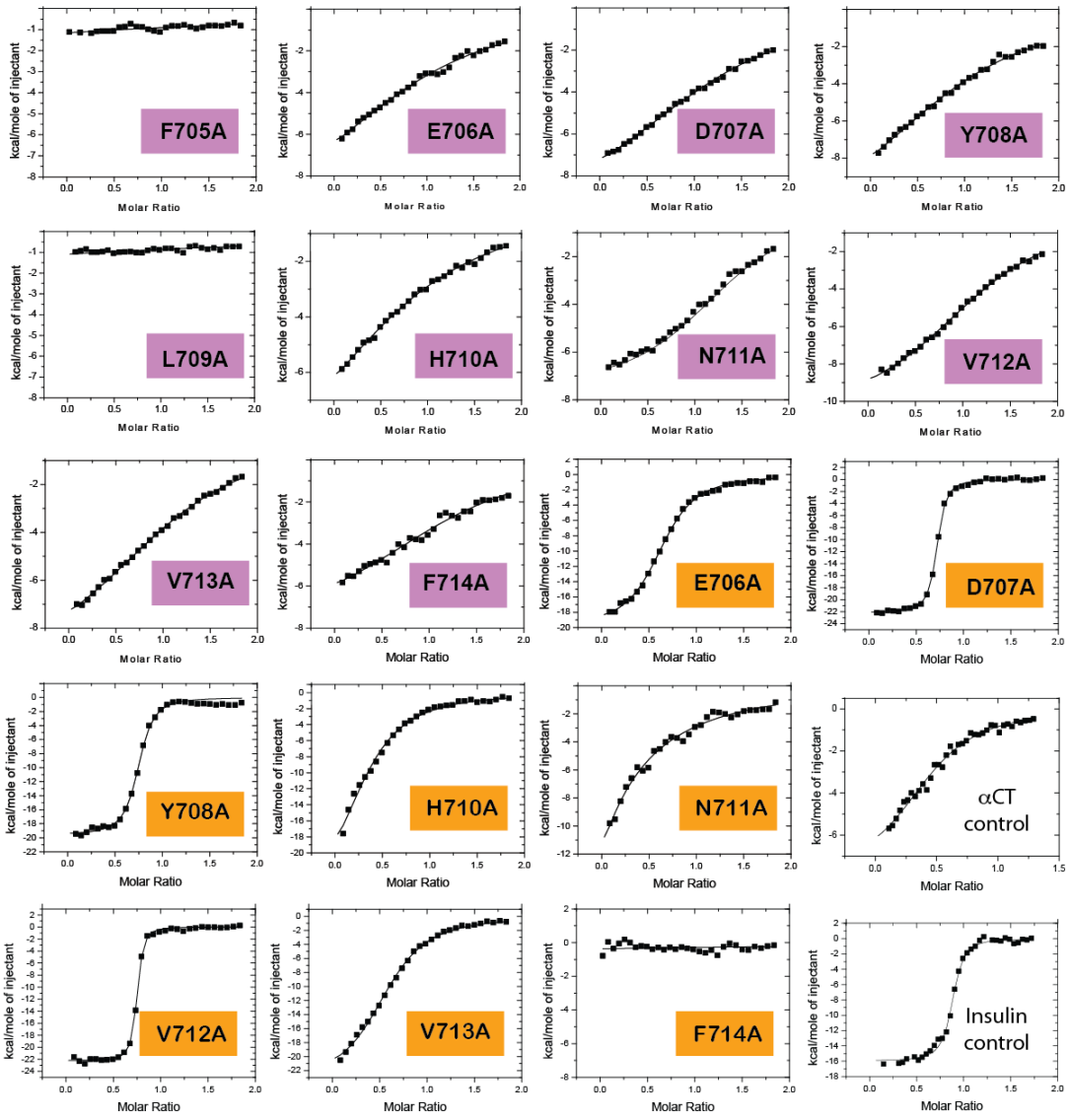
Caption for Supplementary Fig. 2:

a, Schematic illustration of the three-dimensional structure of Complex A inclusive of 83-7. **b**, Schematic illustration of the three-dimensional structure of the IR593.αCT–83-14 monomer (darker shades) as observed within Complex D. An 83-14-bound FnIII-1 domain (in lighter shades with underlined domain labels; top right) from a neighbouring monomer contributes its attached αCT segment to the L1 domain of the foreground IR593.αCT–83-14 monomer. In **a** and **b**, the mode of Fab attachment is isomorphous to that in the crystal structure of the (83-7,83-14)-complexed insulin receptor ectodomain[7,12]. **c,** Assembly of Complex D, the bovine insulin-complexed IR593.αCT dimer of homodimers, viewed down a dyad axis and with the 83-14 domains omitted for clarity. One homodimer is coloured to match **b**, the other is shown in light grey. Expanded view shows insulin bound at a Site 1 tandem element. **d**, Schematic key to **c**. Within the tetrameric assembly of Complex D, the respective αCT peptides from one IR593.αCT homodimer (mauve spheres in **d**) dock onto the respective L1-β_2 faces of the second IR593.αCT homodimer to form a total of four tandem site 1 elements. Each of these tandem site 1 elements is then crosslinked by a single bovine insulin molecule. Such inter-homodimer crosslinking by insulin is presumably more energetically favoured than intra-homodimer crosslinking. The observed dimerization of the insulin IR593.αCT homodimer is compatible with the molecular weight of the component selected for crystallization (see Methods). **e,** Orthogonal views of an IR593.αCT and an insulin receptor ectodomain monomer[7] (in coloured and light grey representation, respectively) overlaid on the basis of the (L2–FnIII-1)$_2$ modules within their respective homodimers. The major re-arrangement in IR593.αCT is the rotation outwards of the L1-CR domain of IR593.αCT with respect to its counterpart in the insulin receptor ectodomain, with the hinge point being close to the CR domain–L2 domain junction. Flexibility at this junction has already been observed in structures of the isolated L1-CR-L2 construct IR485[16]. Lesser re-arrangement is seen within the L2–FnIII-1 module. In the lower panel, the αCT segment is obscured. In case of Complex D (**b-e)**, we stress that the observed dimerization of IR593.αCT should not be interpreted to imply dimerization of *holo*-insulin receptor upon insulin binding, as the domain-minimized nature of the construct is non-physiological.



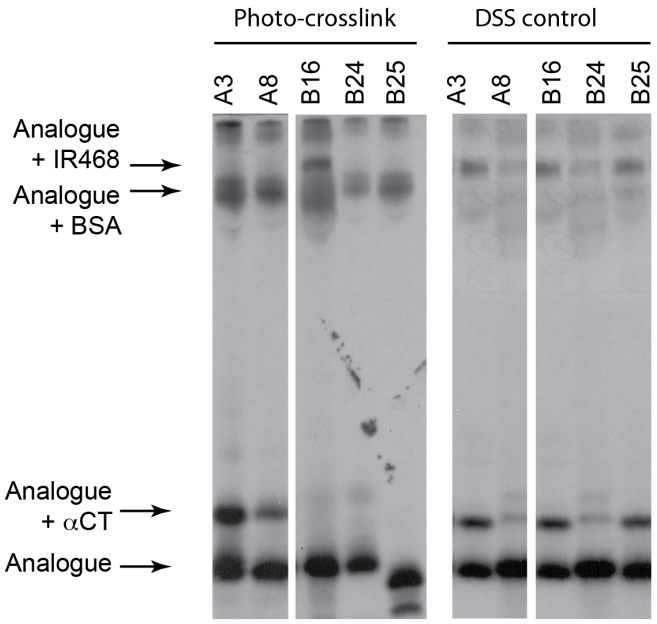
Supplementary Fig. 3: Conformational change within insulin suggested by Complexes A, B, C and D

a, Wall-eye stereo image showing the intersection of the insulin residues B26-B30 in their receptor-free conformation with weighted $2F_{obs}$-F_{calc} electron density difference (B_{sharp} = -160 Å^2) in the vicinity of αCT in Complex A. In this image, the receptor-free insulin molecule has been overlaid onto the insulin molecule seen bound adjacent to the αCT segment in the structures presented here, with the latter insulin molecule not shown in this panel. We postulate that the αCT segment is thus responsible for the displacement of the B-chain C-terminal strand away from the insulin helical core. **b,** Wall-eye stereo view of overlaid receptor-free and receptor-bound conformations of insulin. Orange and black traces: A- and B-chains of insulin as observed in Complex A; mauve trace: bovine insulin as observed in Complex D; cyan: receptor-free human insulin monomer (PDB entry 4INS).



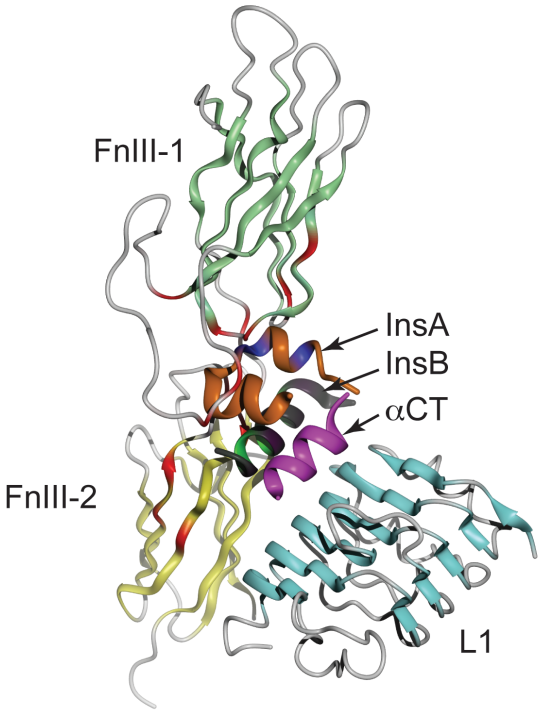
Supplementary Fig. 4: ITC curves measuring binding of mutant αCT peptides to IR485 and insulin to IR485 pre-complexed with mutant αCT peptide

The first ten ITC curves (mauve labels) correspond to the injection of the respective Ala-substituted αCT(704-719) peptide into a cell containing the mini-receptor IR485, the remaining eight (orange labels) correspond to the injection of zinc-free porcine insulin into a cell containing IR485 pre-saturated with a 10× molar concentration of the respective Ala-substituted αCT(704-719) peptide. Control titrations (lower right) employed the native αCT(704-719) peptide and are reprinted with permission from: Menting, J. G., Ward, C. W., Margetts, M. B. & Lawrence, M. C (2009). A thermodynamic study of ligand binding to the first three domains of the human insulin receptor: relationship between the receptor α-chain C-terminal peptide and the Site 1 insulin mimetic peptides. Biochemistry **48**, 5492-500. Copyright 2009, American Chemical Society.

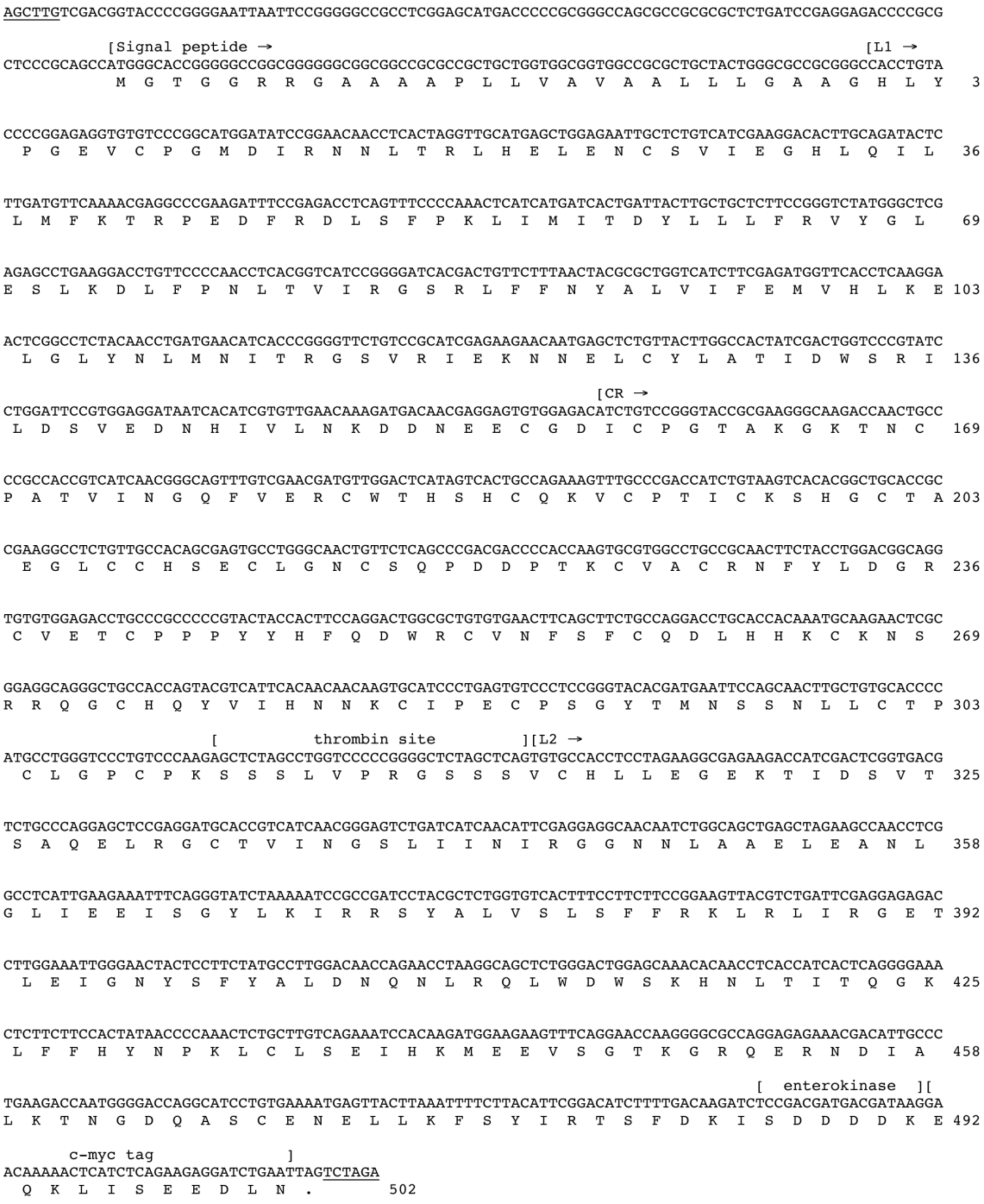


Supplementary Fig. 5: Auto-radiographed gel showing UV photo-crosslinking of insulin analogues to IR468

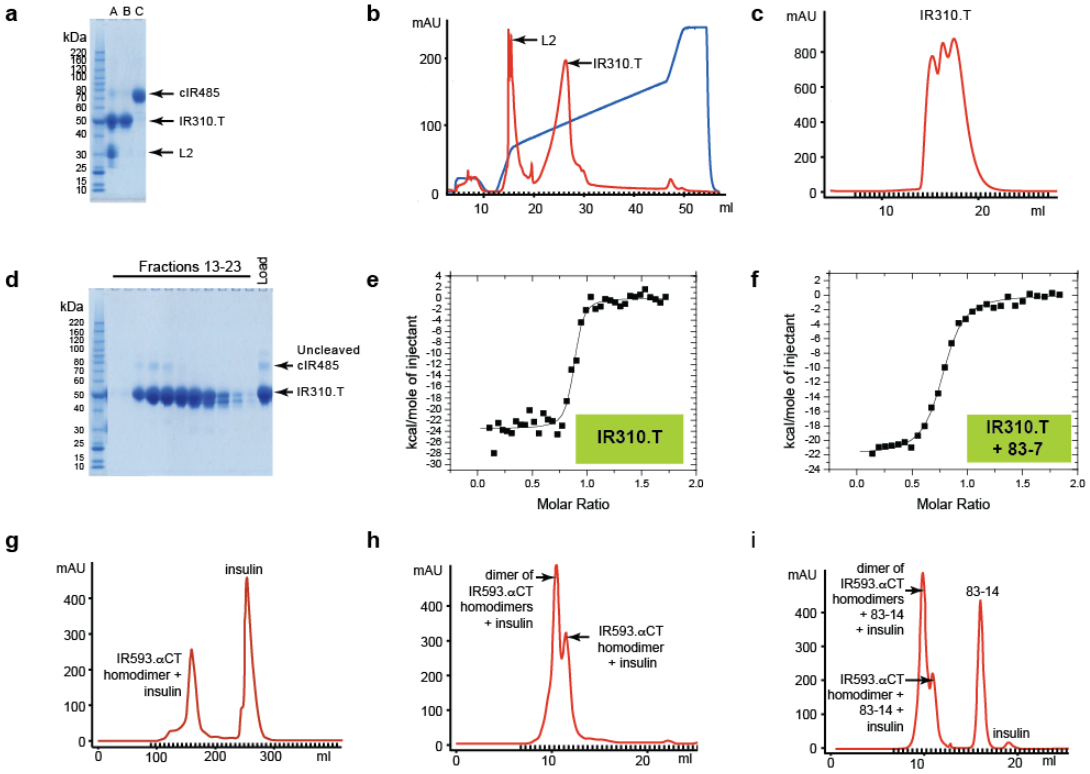
The left-hand lanes show UV photo-crosslinking of [^{125}I]-Pap-insulin analogues to IR468+αCT(703-719)-Myc. BSA: bovine serum albumin (from cell culture medium). Photo-crosslinking to either αCT or IR468 is apparent for analogues Pap^{A3}, Pap^{A8} and Pap^{B16}, but not for analogues Pap^{B24} and Pap^{B25}. The right-hand lanes show DSS-mediated crosslinking of [^{125}I]-Pap-insulin analogues to IR468+αCT(703-719)-Myc to confirm insulin binding as control. Faint bands correspond to photo-crosslinked Pap^{B25} analogue dimer (seen in control reactions) and to DSS-crosslinked analogue dimers or trimers.



Supplementary Fig. 6: Overlay of insulin bound site 1 onto the three-dimensional structure of the *apo*-insulin receptor ectodomain
Red highlights: residues within FnIII-1 and FnIII-2 contributing to site 2 (ref. 15); dark green highlights: insulin B-chain residues involved in site 2 binding[10]; blue highlights: insulin A-chain residues involved in site 2 binding[10]. FnIII-1, FnIII-2 and αCT are contributed by the alternate insulin receptor monomer to that contributing L1.



Supplementary Fig. 7: Sequence of the cDNA encoding cIR485
Domain junctions are indicated above the DNA sequence. Restriction enzymes sites are underlined.

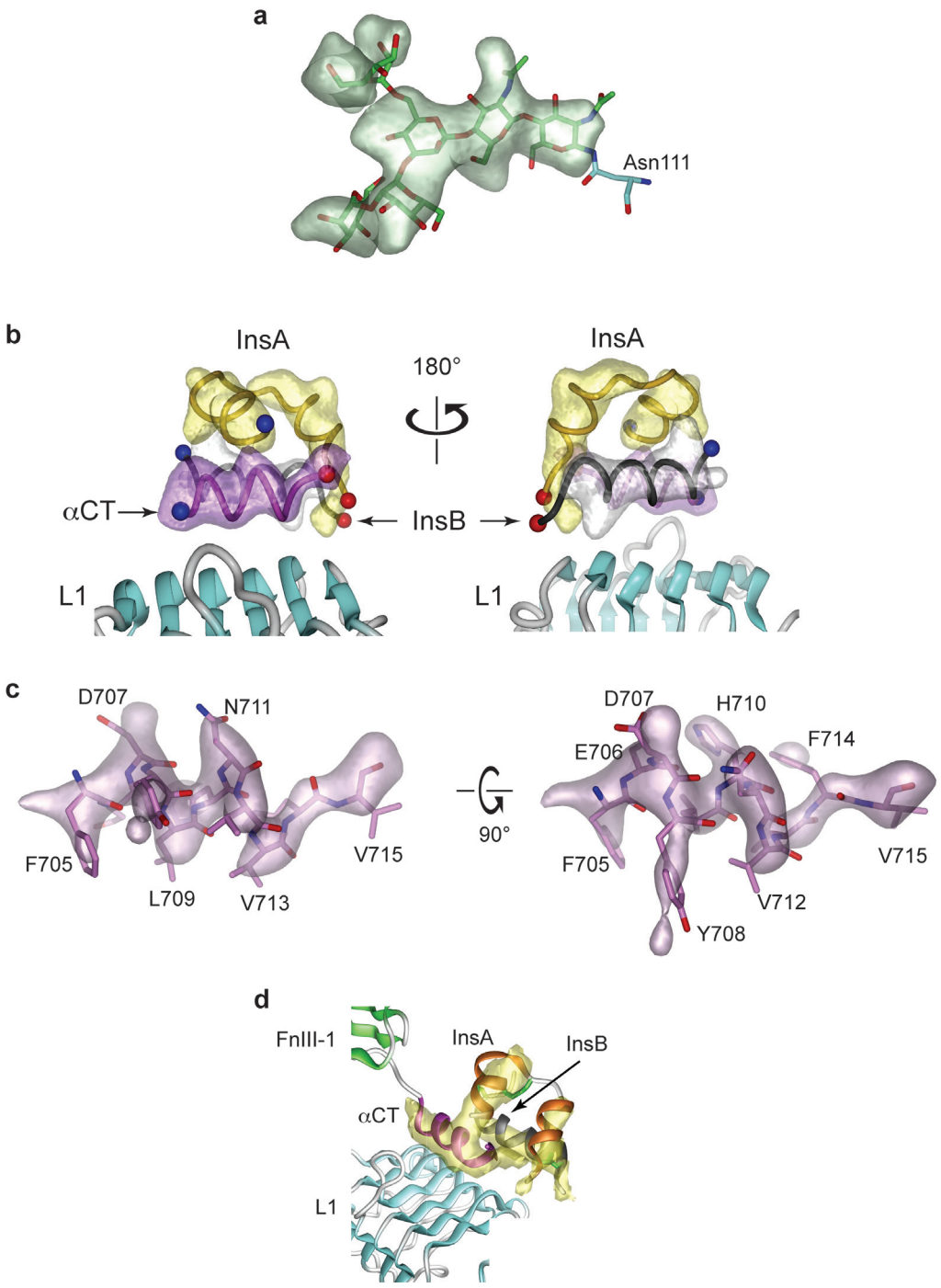


Supplementary Fig. 8: Preparation of the truncated insulin receptor constructs IR310.T and IR593.αCT

a, SDS-PAGE analysis of thrombin-digested cIR485. Lane A: digestion product; Lane B: IR310.T-containing fraction obtained by ion-exchange (IEX) chromatography in **b**; Lane C: starting material (cIR485). **b**, IEX profile of cIR485 post thrombin digestion. **c**. Size-exclusion chromatography (SEC) profile of pooled IR310.T-containing fractions from **a**. **d**, SDS-PAGE analysis of individual fractions of **c**. **e,** ITC curve corresponding to the titration of zinc-free porcine insulin into a cell containing mini-receptor IR310.T pre-saturated with a 10× molar concentration of peptide αCT(704-719). **f,** ITC curve corresponding to the titration of zinc-free porcine insulin into a cell containing mini-receptor IR310.T–Fab83-7 complex pre-saturated with a 10× molar concentration of peptide aCT(704-719). **g,** Typical Superdex S200 26/60 SEC profile of IR593.αCT obtained post insulin-affinity chromatography. The presence of insulin in the IR593.αCT-containing peak as well as the disulphide-linked homodimeric nature of the construct was confirmed by SDS-PAGE (data not shown). **h,** Typical Superdex S200 10/300 SEC profile of pooled and concentrated fractions from the IR593.αCT–insulin peak fraction from **g**. The major peak appeared split between the insulin-complexed IR593.αCT homodimer and a dimeric form of this complex. **i,** Superdex S200 10/300 SEC profile obtained upon combining the IR593.αCT–insulin homodimer peak fraction from **b** with an excess of both Fab 83-14 and bovine insulin. The dimer of insulin-complexed IR593.αCT homodimers indicated in **g** and its Fab-complexed counterpart in **h** were stable upon re-run on SEC.

```
AAGCTTGTCGACGGTACCCCGGGGAATTAATTCCGGGGGCCGCCTCGGAGCATGACCCCCGCGGGCCAGCGCCGCGCGCTCTGATCCGAGGAGACCCCGC

            [Signal peptide →                                                                  [L1 →
GCTCCCGCAGCCATGGGCACCGGGGGCCGGCGGGGGGCGGCGGCCGCGCCGCTGCTGGTGGCGGTGGCCGCGCTGCTACTGGGCGCCGCGGGCCACCTGT
             M  G  T  G  G  R  R  G  A  A  A  A  P  L  L  V  A  V  A  A  L  L  L  G  A  A  G  H  L    2

ACCCCGGAGAGGTGTGTCCCGGCATGGATATCCGGAACAACCTCACTAGGTTGCATGAGCTGGAGAATTGCTCTGTCATCGAAGGACACTTGCAGATACT
Y  P  G  E  V  C  P  G  M  D  I  R  N  N  L  T  R  L  H  E  L  E  N  C  S  V  I  E  G  H  L  Q  I  L 34

CTTGATGTTCAAAACGAGGCCCGAAGATTTCCGAGACCTCAGTTTCCCCAAACTCATCATGATCACTGATTACTTGCTGCTCTTCCGGGTCTATGGGCTC
  L  M  F  K  T  R  P  E  D  F  R  D  L  S  F  P  K  L  I  M  I  T  D  Y  L  L  L  F  R  V  Y  G  L  69

GAGAGCCTGAAGGACCTGTTCCCCAACCTCACGGTCATCCGGGGATCACGACTGTTCTTTAACTACGCGCTGGTCATCTTCGAGATGGTTCACCTCAAGG
 E  S  L  K  D  L  F  P  N  L  T  V  I  R  G  S  R  L  F  F  N  Y  A  L  V  I  F  E  M  V  H  L  K   102

AACTCGGCCTCTACAACCTGATGAACATCACCCGGGGTTCTGTCCGCATCGAGAAGAACAATGAGCTCTGTTACTTGGCCACTATCGACTGGTCCCGTAT
E  L  G  L  Y  N  L  M  N  I  T  R  G  S  V  R  I  E  K  N  N  E  L  C  Y  L  A  T  I  D  W  S  R  I 136

                                                                  [CR →
CCTGGATTCCGTGGAGGATAATCACATCGTGTTGAACAAAGATGACAACGAGGAGTGTGGAGACATCTGTCCGGGTACCGCGAAGGGCAAGACCAACTGC
  L  D  S  V  E  D  N  H  I  V  L  N  K  D  D  N  E  E  C  G  D  I  C  P  G  T  A  K  G  K  T  N  C  169

CCCGCCACCGTCATCAACGGGCAGTTTGTCGAACGATGTTGGACTCATAGTCACTGCCAGAAAGTTTGCCCGACCATCTGTAAGTCACACGGCTGCACCG
 P  A  T  V  I  N  G  Q  F  V  E  R  C  W  T  H  S  H  C  Q  K  V  C  P  T  I  C  K  S  H  G  C  T   202

CCGAAGGCCTCTGTTGCCACAGCGAGTGCCTGGGCAACTGTTCTCAGCCCGACGACCCCACCAAGTGCGTGGCCTGCCGCAACTTCTACCTGGACGGCAG
A  E  G  L  C  C  H  S  E  C  L  G  N  C  S  Q  P  D  D  P  T  K  C  V  A  C  R  N  F  Y  L  D  G  R 236

GTGTGTGGAGACCTGCCCGCCCCCGTACTACCACTTCCAGGACTGGCGCTGTGTGAACTTCAGCTTCTGCCAGGACCTGCACCACAAATGCAAGAACTCG
  C  V  E  T  C  P  P  P  Y  Y  H  F  Q  D  W  R  C  V  N  F  S  F  C  Q  D  L  H  H  K  C  K  N  S  269

CGGAGGCAGGGCTGCCACCAGTACGTCATTCACAACAACAAGTGCATCCCTGAGTGTCCCTCCGGGTACACGATGAATTCCAGCAACTTGCTGTGCACCC
 R  R  Q  G  C  H  Q  Y  V  I  H  N  N  K  C  I  P  E  C  P  S  G  Y  T  M  N  S  S  N  L  L  C  T   302

                [L2 →
CATGCCTGGGTCCCTGTCCCAAGGTGTGCCACCTCCTAGAAGGCGAGAAGACCATCGACTCGGTGACGTCTGCCCAGGAGCTCCGAGGATGCACCGTCAT
P  C  L  G  P  C  P  K  V  C  H  L  L  E  G  E  K  T  I  D  S  V  T  S  A  Q  E  L  R  G  C  T  V  I 336

CAACGGGAGTCTGATCATCAACATTCGAGGAGGCAACAATCTGGCAGCTGAGCTAGAAGCCAACCTCGGCCTCATTGAAGAAATTTCAGGGTATCTAAAA
  N  G  S  L  I  I  N  I  R  G  G  N  N  L  A  A  E  L  E  A  N  L  G  L  I  E  E  I  S  G  Y  L  K  369

ATCCGCCGATCCTACGCTCTGGTGTCACTTTCCTTCTTCCGGAAGTTACGTCTGATTCGAGGAGAGACCTTGGAAATTGGGAACTACTCCTTCTATGCCT
 I  R  R  S  Y  A  L  V  S  L  S  F  F  R  K  L  R  L  I  R  G  E  T  L  E  I  G  N  Y  S  F  Y  A   402

TGGACAACCAGAACCTAAGGCAGCTCTGGGACTGGAGCAAACACAACCTCACCATCACTCAGGGGAAACTCTTCTTCCACTATAACCCCAAACTCTGCTT
L  D  N  Q  N  L  R  Q  L  W  D  W  S  K  H  N  L  T  I  T  Q  G  K  L  F  F  H  Y  N  P  K  L  C  L 436

GTCAGAAATCCACAAGATGGAAGAAGTTTCAGGAACCAAGGGGCGCCAGGAGAGAAACGACATTGCCCTGAAGACCAATGGGGACCAGGCATCCTGTGAA
  S  E  I  H  K  M  E  E  V  S  G  T  K  G  R  Q  E  R  N  D  I  A  L  K  T  N  G  D  Q  A  S  C  E  469

              [FnIII-1 →
AATGAGTTACTTAAATTTTCTTACATTCGGACATCTTTTGACAAGATCTTGCTGAGATGGGAGCCGTACTGGCCCCCCGACTTCCGAGACCTCTTGGGGT
 N  E  L  L  K  F  S  Y  I  R  T  S  F  D  K  I  L  L  R  W  E  P  Y  W  P  P  D  F  R  D  L  L  G   502

TCATGCTGTTCTACAAAGAGGCCCCTTATCAGAATGTGACGGAGTTCGATGGGCAGGATGCGTGTGGTTCCAACAGTTGGACGGTGGTAGACATTGACCC
F  M  L  F  Y  K  E  A  P  Y  Q  N  V  T  E  F  D  G  Q  D  A  C  G  S  N  S  W  T  V  V  D  I  D  P 536

ACCCCTGAGGTCCAACGACCCCAAATCACAGAACCACCCAGGGTGGCTGATGCGGGGTCTCAAGCCCTGGACCCAGTATGCCATCTTTGTGAAGACCCTG
  P  L  R  S  N  D  P  K  S  Q  N  H  P  G  W  L  M  R  G  L  K  P  W  T  Q  Y  A  I  F  V  K  T  L  569

                                                                                  [αCT →
GTCACCTTTTCGGATGAACGCCGGACCTATGGGGCCAAGAGTGACATCATTTATGTCCAGACAGATGCCACCACGTTTGAGGATTACCTGCACAACGTGG
 V  T  F  S  D  E  R  R  T  Y  G  A  K  S  D  I  I  Y  V  Q  T  D  A  T  T  F  E  D  Y  L  H  N  V   712

TTTTCGTCCCCAGGCCATCTTAATCTAGA
V  F  V  P  R  P  S          719
```

Supplementary Fig. 9: Sequence of the cDNA encoding IR593.αCT
Domain junctions are indicated above the DNA sequence. Restriction enzymes sites are underlined.



Supplementary Fig. 10: Crystallography of Complexes A and D

a, Weighted F_{obs}-F_{calc} electron density difference map (B_{sharp} = -160 Å^2; contour = 1.4 σ) in the vicinity of Asn111 in Complex A, overlaid with glycan in the conformation and disposition observed in the structure of IR485[16]. **b,** Helix-like features visible in a weighted F_{obs}-F_{calc} electron density difference map (unsharpened; contour = 3.8 σ) in the vicinity of the L1-β_2 surface in Complex A, overlaid with the backbone trace of human insulin and αCT. The rotated views reveal alternately the αCT peptide and the B-chain helix. Blue and red

(caption continued overleaf)

Supplementary Fig. 10: *(caption continued)*

spheres denote N- and C-termini (respectively) of individual chains. **c**, Weighted F_{obs}-F_{calc} electron density difference map (B_{sharp} = -160 Å^2; contour = 2.4 σ) overlaid with the refined atomic model of the αCT(704-719) segment in Complex A. **d**, Tubular, helix-like features visible in weighted F_{obs}-F_{calc} electron density difference map in the vicinity of the L1-β_2 surface within Complex D, overlaid with both the insulin helical core (as positioned by the ESSENS search) and the αCT(704-719) peptide, connected to an adjacent FnIII-1 domain. The map is averaged across the two NCS-related sites (unsharpened; contour = 1.7 σ).

Supplementary Table 1.
X-ray refinement statistics*

	Complex A Human insulin + IR310.T–83-7 + αCT(704-719)	Complex B [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ + IR310.T–83-7 + αCT(704-719)	Complex C [D-Pro^{B26}]-DTI-NH$_2$ + IR310.T–83-7 + αCT(697-719)	Complex D Bovine insulin + IR593.αCT–83-14
Resolution (Å)	46.8 – 3.9	29.6 – 4.3	29.5 – 4.3	56.3 - 4.4
†R_{work} / R_{free}	0.264 / 0.292	0.289 / 0.349	0.289 / 0.335	0.245 / 0.262
Number of atoms				
protein	4466	4454	4454	16158
glycan	131	117	117	-
B-factors				
protein (Å^2)	228.	238.	226.	230.
glycan (Å^2)	271.	271.	256.	-
R.m.s. deviations				
bond lengths (Å)	0.01	0.01	0.01	0.01
bond angles (°)	1.4	1.6	1.6	1.4

*Complexes A and D were refined with autoBUSTER, Complex B and C with REFMAC5.
†autoBUSTER reports R-factors as $R = <|F_{\mathbf{h}}^{xpct} - F_{\mathbf{h}}^{obs}|> / <| F_{\mathbf{h}}^{obs} |>$, where $F_{\mathbf{h}}^{xpct}$ is the expectation value of the model structure amplitude[43], REFMAC5 reports the conventional $R = <|F_{\mathbf{h}}^{calc} - F_{\mathbf{h}}^{obs}|> / <| F_{\mathbf{h}}^{obs} |>$.

Supplementary Table 2.
Thermodynamic parameters for interaction of Ala-substituted αCT with IR485.

αCT (704-719)	K_d (μM)*	ΔH (kJ / mol)	$T\Delta S$ (kJ / mol)
Native†	3.3 ± 1.1	-46 ± 9	-15 ± 10
F705A	> 1000	n.d.‡	n.d.
E706A	7.9 ± 0.7	-47 ± 5	-18 ± 6
D707A	4.4 ± 0.8	-37 ± 3	-7 ± 4
Y708A	7.1 ± 0.9	-55 ± 5	-26 ± 5
L709A	> 1000	n.d.‡	n.d.
H710A	5.1 ± 1.6	-35 ± 7	-5 ± 7
N711A	2.9 ± 0.9	-28 ± 3	4 ± 2
V712A	2.3 ± 0.4	-44 ± 1	-12 ± 1
V713A	3.5 ± 0.5	-38 ± 2	-7 ± 3
F714A	5.5 ± 1.1	-36 ± 2	-5 ± 2

Supplementary Table 3.
Thermodynamic parameters for interaction of insulin with (IR485 + Ala-substituted αCT).

αCT(704-719)	K_d (nM)	ΔH (kJ / mol)	$T\Delta S$ (kJ / mol)
Native†	17 ± 4	-67 ± 1	-22 ± 2
F705A	n.d.§	n.d.	n.d.
E706A	325 ± 31	-86 ± 2	-49 ± 2
D707A	15 ± 2	-92 ± 1	-47 ± 1
Y708A	35 ± 6	-79 ± 2	-36 ± 2
L709A	n.d.§	n.d.	n.d.
H710A	852 ± 112	-88 ± 20	-53 ± 20
N711A	4790 ± 900	n.d.	n.d.
V712A	6.5 ± 0.5	-93 ± 1	-46 ± 1
V713A	440 ± 40	-95 ± 7	-57 ± 7
F714A	> 5000	n.d.	n.d.

Combined footnotes to the Supplementary Tables 2 & 3:

* K_d, ΔH and $T\Delta S$ values are the mean of three measurements ± standard error of the mean. n.d.: not determined.

† From ref. 52, with ΔH and TΔS for the native αCT interaction in Supplementary Table 2 determined afresh.

‡ ΔH and TΔS values for F705A and H710A peptides binding to IR485 and for insulin binding to IR485 plus N711A peptide were not determined due to the inaccuracy of curve fitting under conditions of weak affinity.

§ Thermodynamic parameters for insulin binding to the IR485 construct in complex with the F705A and L709A peptides were not determined as their weak binding to IR485 precludes pre-saturation of the construct.

Supplementary Table 4.
Density, environment and combined scores for various trial insulin receptor αCT heptamers.

Insulin receptor αCT heptamer	Density score*	Environment score†	Combined score‡
704-710	1.13	11.3	12.8
705-711	**1.15**	**18.5**	**21.3**
706-712	1.11	13.4	14.9
707-713	1.13	13.8	15.6
708-714	1.03	15.4	15.9
709-715	1.13	16.9	19.0
710-716	1.06	14.4	15.2
711-717	1.06	14.4	15.2
712-718	1.04	12.0	12.5
713-719	1.04	8.19	8.5

[1] Density score = (Correlation of the computed electron density for the trial insulin receptor αCT heptamer with the difference electron density feature shown in Supplementary Fig. 10c) / (Correlation of the computed electron density for the initial poly-alanine heptamer with the difference electron density feature shown in Supplementary Fig. 10c).
† Computed using VERIFY3D[48].
‡ Combined score = (density score) × (environment score). Bold, underlined scores are the highest within each score type.

SUPPLEMENTARY DISCUSSION

Concordance with biochemical studies

Our structures provide convergent, independently-derived views of the mode of insulin binding to its primary site on the receptor surface. Changes in the conformation of insulin and its binding site are evident and we envisage that these initiate signaling. A key event is the exposure of the hydrophobic core of insulin upon displacement of the B-chain C-terminal strand, which rationalizes the enhanced affinities of non-standard insulin analogues containing either disruptive D-amino acid substitutions at B24[37] or engineered turns at B26[18], all of which would increase the accessibility of residues A1-A3 and B24-B26.

Insulin receptor residues His 710 and Phe 714 are now seen to play a critical structural role in insulin binding (Fig. 2c), consistent with alanine scanning mutagenesis of the insulin receptor ectodomain wherein a H710A mutation results in no detectable hormone binding while a F714A mutation confers a ~140× decrease in hormone affinity[56]. The restriction of the major αCT–insulin interaction to these residues is also consistent with the observation that the residues structurally equivalent to insulin receptor 709-714 in the closely-related type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) are significantly more protected from hydrogen–deuterium exchange upon growth factor binding than are residues upstream or downstream of this segment[57]. The critical role for Phe 714 in ligand binding is consistent with observations that insulin receptor–IGF1R chimeras containing the αCT segment from the insulin-receptor-related receptor (IRR) in place of their cognate αCT(704-719) segment are devoid of hormone-binding ability – replacement of insulin receptor Phe 714 (= IGF1R Phe 701) by threonine in IRR is the salient difference between respective αCT segments[58].

Within our model, Val 712 and Val 715 are the only residues within αCT that achieve little or no interaction with either insulin or L1. Exclusion of these residues from these interfaces rationalizes why these are the only residues within the 704-715 segment that are not highly conserved across species and across insulin receptor and IGF1R[58]. Disorder of αCT beyond Val 715 is consistent with observations that individual substitution by Ala at sites 716-719 in the insulin receptor ectodomain causes minimal reduction in insulin affinity[56] and with the fact that insulin receptor tolerates a 12-residue insertion between residues 717 and 718, encoded by alternatively-spliced exon 11 (ref. 8).

Interpretation of alanine scanning mutagenesis of the insulin receptor L1 domain is enriched by current structures. Residues in the insulin receptor L1 domain that lead to reduced insulin affinity upon Ala substitution have previously been partitioned into two classes[12]. The first class (including Gln 34, Leu 36, Leu 37, Phe 64, Phe 88, Phe 89 and Glu 120) contains side

chains in significant contact with the αCT segment in the *apo*-insulin receptor ectodomain structure and with the αCT segment in the insulin–Site 1 complex model described here (Fig. 2d). This supports our view[12] that Ala substitution within this class reduces receptor affinity for insulin via destabilization of the αCT helix–L1 domain interaction. The second class (Asp 12, Arg 14, Phe 39, Asn 90, Tyr 91 and Lys 121) comprises residues that are not in significant contact with αCT in *apo*-insulin receptor and were proposed to be in direct contact with insulin[12]. Surprisingly, of this second class, only Phe 39 appears in direct contact with insulin in the present structures (Fig. 2d). The remaining effects of substitution are likely indirect and beyond interpretation at the current resolution.

Systematic mutational analysis shows that Ala substitution at Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}, Leu^{B6}, Gly^{B8}, Leu^{B11} and Gly^{B23} and the diabetes-associated clinical mutations Phe^{B24}Ser and Phe^{B25}Leu cause a >10-fold reduction in insulin receptor affinity, with smaller perturbations observed on Ala substitution elsewhere[59]. Of the former "hot-spots", Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}, Gly^{B8} and Leu^{B11} are modelled to be in contact with the key αCT residues His 710 and Phe 714 (Fig. 2c). Reasons for the effect of mutations at Gly^{B23}, Phe^{B24} and Phe^{B25} are less obvious, as these residues are disordered in our structures, including those utilizing [D-Pro^{B26}]-DTI-NH_2, whose free structure contains an ordered turn at B24-B26 (ref. 18). The latter features were surprising, given previous observations that in the intact insulin receptor photo-probes at positions B24 and B26 efficiently crosslink to the L1 domain whereas photo-probes at B25 and B27 efficiently crosslink to αCT[27]. These data suggest that, in the *holo*-insulin receptor, these residues are in proximity to L1 or αCT, respectively. We note that in *holo*-insulin receptor complexes, photo-probes attached to the side chain of Lys^{B29} can crosslink either CR[60] or L1[61]. These data, taken together with our structures, suggest that the final location of the B-chain C-terminal segment is most likely the volume between the αCT segment, the L1-β_2 surface and the adjacent CR domain, as must be the case for pro-insulin binding insulin receptor and for the (single-chain) insulin-like growth factors binding IGF1R or insulin receptor. A common mode of ligand binding is expected since (a) both receptors bind all three ligands (insulin, IGF-I and IGF-II) and (b) the residues discerned here in the insulin–site 1 interface are conserved in the IGF–IGF1R system[62], the one exception being insulin Ser^{B9} (Ala in IGFs) – a site at which interaction with L1 is likely sparse (Fig. 2e). A common mode implies that the IGF C-domain must dock between the αCT segment and the CR domain, the latter known to contain IGF specificity elements[35,63,64].

SUPPLEMENTARY REFERENCES

53 Bentley, G., Dodson, E., Dodson, G., Hodgkin, D. & Mercola, D. Structure of insulin in 4-zinc insulin. *Nature* **261**, 166-168, (1976).

54 Derewenda, U. *et al.* Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature* **338**, 594-596, (1989).

55 Weiss, M. A. The structure and function of insulin decoding the TR transition. *Vitam. Horm.* **80**, 33-49, (2009).

56 Mynarcik, D. C., Yu, G. Q. & Whittaker, J. Alanine-scanning mutagenesis of a C-terminal ligand binding domain of the insulin receptor α subunit. *J. Biol. Chem.* **271**, 2439-2442, (1996).

57 Houde, D. & Demarest, S. J. Fine Details of IGF-1R Activation, Inhibition, and Asymmetry Determined by Associated Hydrogen / Deuterium-Exchange and Peptide Mass Mapping. *Structure* **19**, 890-900, (2011).

58 Rentería, M. E., Gandhi, N. S., Vinuesa, P., Helmerhorst, E. & Mancera, R. L. A comparative structural bioinformatics analysis of the insulin receptor family ectodomain based on phylogenetic information. *PLoS ONE* **3**, e3667, (2008).

59 Kristensen, C. *et al.* Alanine scanning mutagenesis of insulin. *J. Biol. Chem.* **272**, 12978-12983, (1997).

60 Yip, C. C. *et al.* Localization of the insulin-binding site to the cysteine-rich region of the insulin receptor alpha-subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 321-329, (1988).

61 Wedekind, F. *et al.* Hormone binding site of the insulin receptor: analysis using photoaffinity-mediated avidin complexing. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* **370**, 251-258, (1989).

62 Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. & Ward, C. W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1050-1093, (2000).

63 Gustafson, T. A. & Rutter, W. J. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. Evidence from receptor chimeras. *J. Biol. Chem.* **265**, 18663-18667, (1990).

64 Hoyne, P. A., Elleman, T. C., Adams, T. E., Richards, K. M. & Ward, C. W. Properties of an insulin receptor with an IGF-1 receptor loop exchange in the cysteine-rich region. *FEBS Lett.* **469**, 57-60, (2000).

Structural Integrity of the B24 Site in Human Insulin is Important for Hormone Functionality*©

Lenka Žáková[‡], Emília Kletvíková[‡], Václav Veverka[‡], Martin Lepšík[‡], Christopher J. Watson[§], Johan P. Turkenburg[§], Jiří Jiráček[‡1], and Andrzej M. Brzozowski[§2]

From the [‡]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic, the [§]York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, The University of York, Heslington, York, YO10 5DD, United Kingdom

*Running title: *Structural integrity of the B24 site in insulin*

[1]To whom correspondence may be addressed: Tel.: 420220183441; Fax: 420220183571; E-mail: jiracek@uochb.cas.cz. [2]To whom correspondence may be addressed: Tel.: 441904328265; Fax: 441904328366; E-mail: marek.brzozowski@york.ac.uk.

Keywords: insulin receptor; NMR structure; crystal structure; insulin analogue, molecular dynamics

Capsule

Background: The structure of the C-terminus B21-B30 chain of insulin bound to the insulin receptor remains undetermined.

Results: The structures of B24-modified insulins were determined.

Conclusion: The integrity of PheB24 but flexibility of B25-B30 insulin residues are important for receptor binding.

Significance: The knowledge of the receptor-bound structure of insulin is important for the design of new insulin receptor agonists.

SUMMARY

Despite the recent first insight into the insulin-insulin receptor complex, the structural role of the C-terminus of the B-chain of insulin in this assembly remains unresolved. Previous studies have suggested that this part of insulin must rearrange to reveal amino acids crucial for interaction with the receptor. The role of the invariant PheB24, one of the key residues of the hormone, in this process remains unclear. For example, the B24 site functionally tolerates substitutions to D-amino acids but not to L-amino acids. Here, we prepared and characterized a series of B24-modified insulin analogues, determining also the structures of [D-HisB24]-insulin and [HisB24]-insulin. The inactive [HisB24]-insulin molecule is remarkably rigid due to a tight accommodation of the L-His side chain in the B24-binding pocket that results in the stronger tethering of B25-B28 residues to the protein core. In contrast, the highly active [D-HisB24]-insulin is more flexible, and the reverse chirality of the B24C$^{\alpha}$ atom swayed the D-HisB24 side chain into the solvent. Furthermore, the pocket vacated by PheB24 is filled by PheB25, which mimics the PheB24 side and main chains. The B25➔B24 downshift results in a subsequent downshift of TyrB26 into the B25 site and the departure of B26-B30 residues away from the insulin core. Our data indicate the importance of the aromatic L-amino acid at the B24 site and the structural invariance/integrity of this position for an effective binding of insulin to its receptor. Moreover, they also suggest limited, B25-B30 only, unfolding of the C-terminus of the B-chain upon insulin activation.

Human insulin is a 51-amino acid hormone that regulates blood glucose levels and affects lipid/protein metabolism and, to some extent, the life span. Insulin exerts its actions through binding as a monomer to the $(\alpha\beta)_2$-homodimeric, tyrosine kinase-type insulin receptor (IR[3]) (1).

Insulin is the final product of an extensive processing from single-chain preproinsulin (2) and consists of an A-chain (GlyA1-AsnA21) and B-chain (PheB1-ThrB30) that are linked by two interchain disulfide bridges (CysA7-CysB7 and CysA20-CysB19). In addition, the A-chain includes an intra-chain CysA6-CysA11 disulfide bond. Insulin is capable of dimerization at low micromolar concentrations (3), and the presence of

divalent metal ions leads to the formation of insulin hexamers that represent the storage form of this hormone (2). There is overwhelming evidence that monomeric insulin, which dissociates from its storage forms, must undergo structural changes upon binding to IR. Mainly, the C-terminal ~B22-B30 part of the B-chain has to rearrange to reveal amino acids that are crucial for the effective formation of the hormone-receptor interface (LeuB11, ValB12, LeuB15 on the B chain and GlyA1, IleA2, ValA3, GlnA5 on the A chain) (4, 5) and that are obstructed by C-terminal β-strand in the dimeric and hexameric forms of the hormone (6, 7). The importance of the B-chain C-terminal residues in IR binding has also been demonstrated by their critical role in negative cooperativity (8). The changes at the C-terminus are likely accompanied by the reorganization of the N-terminus of the B-chain (B1-B8), which adopts one of the conformations ranging from the so-called T-state (extended) to the R-state (α-helical) folds (9). The current understanding of the 3-D insulin structure upon binding to the IR is based mostly on inactive storage (hexamers, dimers) states of the hormone (9-11). Our recent structural and functional study of the insulin-IR complex (5) provided the first insight into the mode of insulin binding to its receptor, although the structural features of the B21-B30 residues (and the B-chain N-terminus) have not been determined. Nevertheless, the obtained structural data suggest that the ~B25-B30 chain in the IR-complex must acquire a different conformation from that regularly found in a receptor-free state.

The NMR structures of the monomeric form of insulin, facilitated by mutations (12-14) or truncations of the B-chain (15, 16), have confirmed both the conformations known from the inactive forms of the hormone and the intrinsic mobility of the N- and C-termini of the B-chain. Systematic photo-crosslinking mapping of the photo-activated surface of insulins in complexes with the IR have provided further insight into the role of the individual hormone side chains for stability of the insulin-IR interface (17, 18). These experiments indicated direct contacts of B24/B26 and A1-A8 side chains with the IR, suggesting the *detachment model* of insulin activation (18). This model postulates a radical departure of the ~B22-B30 chain from the core of the hormone and its insertion between the IR domains.

However, our recent studies on highly active (~200-450%) insulin analogues led to the identification of their structural and functional signatures, which suggest that less dramatic rearrangements of the B25-B30 residues may be required for an 'active' (i.e., as in IR complex) form of the hormone (19). The main feature of these high-affinity analogues is a so-called 'B26-turn,' which is stabilized by a formation of the B24CO-NHB27 hydrogen bond and *trans-cis* isomerization of the B25-B26 peptide bond. Contrary to the *detachment model,* in which the whole B22-B30 chain is fully separated from the insulin's core, the PheB24 side chain in the *B26-turn-activation model* is invariantly anchored in the hydrophobic cavity (as in the wild-type insulin) lined up by ValB12, LeuB15 and CysB19, with only B26-B30 residues departing from an 'inactive,' i.e., β-strand-like, conformation.

The invariant PheB24 is one of the key residues in the insulin molecule. Its peculiar role in the 'activation process' of the hormone is further supported by lack of tolerance at this site for any L-amino acid substitutions, whose introduction leads usually to a complete or very significant loss of the binding affinity (20). Only SerB24 (7-15%) (21, 22) and LeuB24 (~10-50%) (23-29) insulin analogues retained some activity. Interestingly, such intolerance for L-amino acid mutations is even more striking as incorporation of D-amino acid at the B24 site (except D-Pro (30), and, to a lesser extent, D-Phe(p-ethyl) (31)) results in an increase of insulin affinity to the IR (30). Moreover, the loss of chirality at the B24 C^{α} atom, resulting from 'racemic'-like mutations by an achiral side chain-containing amino acid (α-aminoisobutyric acid, Aib), also diminishes insulin's activity (30). However, a complete loss of the B24 side chain, combined with the lack of B24C^{α} chirality, is relatively well tolerated in GlyB24 analogue (~22-78% affinity) (21, 30, 32). Interestingly, whereas D-Phe at the B24 site in full-length insulin enhances the affinity (140%-180%) (21, 30), the same substitution in the truncated analogue *des*-pentapeptide(B26-B30)-insulin-B25-amide (itself equipotent with human insulin) significantly reduces binding affinity (8%) (33). Similarly, a distinct negative effect (1% binding affinity) was found for GlyB24 in *des*-pentapeptide(B26-B30)-insulin-B25-amide (32).

The insulin molecule can be considered the result of complex functional and evolutionary development. The small size of this hormone, the proximity of its key side chains, and the compactness of the long-range (allosteric) intra-molecular interactions, combined with the t complex behavior of this protein (challenging bio-synthesis, processing, storage, activation of the monomer, 'induced fit' etc.), gives each of its amino acids a multi-faceted and convoluted function. Therefore, the role of the invariant PheB24 should be considered in a wider context of its molecular contributions, for example, toward conformational switching during hormone activation, facilitation of proper disulfide pairing, and hormone self-assembly (17).

Here, we provide an explanation of the role for the PheB24 site in the context of insulin structure and function by studying the effects of its substitutions by a combination of functional, structural (NMR, X-ray), and computational molecular dynamics (MD) approaches. Systematic substitutions of chiral (L/D-) amino acids and structural main chain constraints inducing (Pro and Sar) amino acids resulted in four novel B24-substituted analogues, whose functional and structural relationships have been established. Furthermore, the possible cooperative character of B24 and B26 sites in insulin-IR interactions and their impact on insulin affinity was investigated in three double (D-HisB24, GluB26) insulin mutants.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials–2-Chlorotrityl chloride resin, protected amino acids, and reagents for solid-phase synthesis of peptides were purchased from Novabiochem Merck (Laufelfingen, Switzerland). Fmoc-Lys(Pac)-OH was prepared as described previously (34). TPCK-treated trypsin was purchased from Sigma and penicillin G acylase from Fluka. Human ^{125}I-monoiodotyrosylA14-insulin was purchased from Perkin-Elmer Life Sciences. Human insulin was purchased from Sigma. All other chemicals and solvents were obtained from Sigma-Aldrich-Fluka.

Peptide Synthesis and Enzymatic Semisynthesis–The syntheses of peptides and the semisyntheses of analogues were performed according to Zakova et al. (34). The identity of the peptides and analogues was confirmed with an FTMS mass spectrometer LTQ-orbitrap XL (Thermo Fisher).

Receptor Binding Studies–Receptor binding studies with plasma membranes prepared from epididymal adipose tissue of adult male Wistar rats were performed according to Zakova et al. (35). Competitive binding curves were plotted using GraphPad (San Diego, CA) Prism 5, comparing the best fits for single-binding site models. The half-maximal inhibition values of binding of [^{125}I]insulin to the receptor (IC_{50}) were obtained from nonlinear regression analysis. The only exception was [ProB24]-insulin, which was tested for binding to the insulin receptor in membranes in IM-9 lymphocytes according to the procedure that we described recently in Morcavallo et al. (36). The binding data for [ProB24]-insulin were analyzed with Excel software using a one-site fitting program developed in the laboratory of Dr. Pierre De Meyts (A. V. Groth and R. M. Shymko, Hagedorn Research Institute, Denmark, a kind gift of Pierre De Meyts) and GraphPad Prism 5, and the dissociation constant was determined. The dissociation constant of human ^{125}I-insulin was set up to 0.3 nM. Receptor binding assays were performed under conditions excluding the depletion of free ligand.

X-Ray Studies–Crystallization of [HisB24]-insulin was performed using in-house insulin crystallization screens covering most of the reported crystal insulin growth parameters. Crystallization conditions, data collections and refinement and models statistics are given in Table S1 in the Supplemental Information. X-ray data were processed by HKL2000 (37) and XDS, model building and refinement were performed using the CCP4 suite of programs (38) and COOT (39). Crystal structures were solved using Molrep (40) with B1-B6 and B23-B30 truncated insulin hexamer or hexamer-derived monomer as a model (pdb code 1mso) (41) and refined by Refmac 5.6 (42). The figures were made using CCP4mg (38). For structural comparisons of the dimer interfaces, the best defined dimers (referred here as monomers A-B and C-D) from the relevant structures were superimposed on the B9-B19 and D9-D19 C^{α} atoms using the LSQKAB program from the CCP4 suite.

NMR spectroscopy and structure calculations–NMR spectra were acquired from 0.35 mL samples of 0.2 - 0.5 mM insulin

analogues in a 20% d_3-acetic acid (pH 1.9) or 25 mM deuterated-Tris buffer (pH 8.0), containing 5% D_2O/95% H_2O. All the NMR data were collected at 25°C on a 600 MHz Bruker Avance spectrometer equipped with a triple-resonance ($^{15}N/^{13}C/^{1}H$) cryoprobe. A series of homonuclear spectra were recorded to determine the sequence-specific resonance assignments for [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin. In particular, 2-D TOCSY spectra with 55-ms mixing time, 2-D DQF-COSY spectra and 2-D NOESY spectra, which were acquired with an NOE mixing time of 200 ms.

The family of converged structures for [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin was initially calculated using Cyana 2.1 (43). The combined automated NOE assignment and structure determination protocol was used to automatically assign the NOE cross-peaks identified in 2-D NOESY spectra and to produce preliminary structures. Subsequently, five cycles of simulated annealing combined with redundant dihedral angle constraints (Redac) (44) were used to produce the sets of converged structures with no significant restraint violations (distance and van der Waals violations < 0.2 Å), which were further refined with two cycles of restrained molecular dynamics simulated annealing using AMBER (45). Initial energy minimization (2,000 steps) was followed by 15 ps of simulated annealing in vacuum and 20 ps of simulated annealing using a generalized Born solvent model (46). The 30 structures with the lowest AMBER energy and with no distance constraint violation greater than 0.2 Å were selected. Analysis of the family of structures obtained was carried out using the programs Molmol (47) and PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4, Schrödinger, LLC).

Molecular Dynamics Simulations–Two starting structures (A-B and C-D monomers) of the wild-type human insulin for simulation runs were derived from the high-resolution 1mso crystal structure (41). The molecular dynamics (MD) simulations of [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin analogues were based on pH 8.0 NMR structures of the analogues obtained in this work. Details of the structure preparation prior to MD simulation runs are shown in the Supplemental Information. The insulin monomers were solvated in a box of TIP3P water molecules (48) extending 11 Å from the protein. Two Na^+ counterions were added to neutralize the charge. The systems were relaxed in several steps prior to MD (for details, see the Supplemental Information). The MD was run in periodic boundary conditions using AMBER (45) and comprised three stages: warming, equilibration and production runs. In the first stage, the temperature was raised gradually from 10 to 300 K over 25 ps. The equilibration stage was run for 200 ps, and a production of 50 ns length ensued at 300 K and 1 atm. Three trajectories for each case were simulated using different starting conditions (random number generator seed for assigning the initial velocities) and only the most structurally stable ones according to the root-mean-square deviations (RMSD) were chosen for further analyses. All the bond lengths were constrained using the SHAKE algorithm (49), which allowed a time step of 2 fs. The frames were saved every 5 ps. The analyses of the MD trajectories included measurements of the positional fluctuations of insulin residues, selected inter-atomic distances, and of backbone RMSD with respect to the starting structure.

RESULTS

Binding affinities of analogues–Seven new insulin analogues have been prepared by enzymatic semisynthesis. Their binding affinities, presented here in two groups for *single-B24* and *double-B24/B26-substituted analogues*, are shown in Table 1, with the corresponding binding curves provided in the supplemental Fig. S1. We consider here the [D-HisB24,GluB26,LysB28,ProB29]-insulin as a 'double-mutant' as the LysB28↔ProB29 swap does not have any impact on binding affinity (50). This swap was introduced into this analogue to promote its monomeric behavior (51) for solution NMR studies.

In the group of B24-single substituted analogues, [D-HisB24]-insulin displays the highest binding affinity of approximately 212% compared to wild-type insulin. In contrast, its L-amino acid analogue, [HisB24]-insulin, has an only very low IR affinity of 1.5%. Mutations with an expected impact on conformation of the main chain yielded a [SarB24]-insulin analogue with highly reduced affinity (6.3%), while [ProB24]-insulin was inactive (0.16%).

In the second group of analogues, two 'positive' hormone mutations (D-HisB24 and

GluB26, each individually with higher IR affinity) were combined to elucidate their simultaneous effect on binding affinity. The high biological activity of the [GluB26]-insulin was already reported (52), but the actual binding affinity data were not available. Therefore, the [GluB26,LysB28,ProB29]-insulin was prepared as a reference molecule, and it confirmed the high affinity (193%) of this analogue. Surprisingly, the simultaneous combination of the 'positive' mutations of the B24 and B26 sites, D-HisB24 and GluB26 respectively, abolished the individual affinity gains, having a detrimental effect on the affinities of both 'double' analogues ([D-HisB24,GluB26]-insulin with 2.8% affinity and [D-HisB24,GluB26,LysB28,ProB29]-insulin with 1.8% binding affinity).

X-ray structure of [HisB24]-insulin–This analogue gave crystals only under monomeric conditions (pH 3.0, see Table S1 in the Supplemental Information) with one molecule in the asymmetric unit. Despite relatively high-resolution data, the monomer of this analogue displayed a high degree of disorder (supplemental Fig. S2). Only the ValB2-GluB21 part of the B-chain was defined in the electron density maps with the GluB21-side chain being fully disordered. The position of the A-chain C-terminal AsnA21 also could not be allocated. The B2-B6 B-chain N-terminus adopts a T-R 'intermediate' conformation observed in other monomeric X-ray structures of insulin analogues (19) and some of its dimeric forms (53) as well. The total disorder of B22-B30 chain (hence the lack of B25NH-COA19 hydrogen bond) results in the conformation of the A-chain observed in some other monomeric analogues (19, 54) (movement from the wild-type insulin T-state conformation, i.e., away from the B24-B30 chain, and ~38^{o} rotation of the A1-A9 helix around A2C$^{\alpha}$ axis). In addition, the lack of the B23CO-NHA21 hydrogen bond did not allow clear localization of the A-chain C-terminal A21Asn, which is also missing in the model. The TyrB16 is flipped towards the 'empty' B24 site and is stabilized by a close (~3.55 Å) van der Waals contact with the ValB12 side chain. The remains of the B19-B22 turn (B19-B21 main chain) adopt a conformation not observed in other insulins (close towards TyrB16 side chain). However, it may represent one of the few alternative directions of the B20-B30 chain that cannot be traced and refined in this analogue.

NMR structures of [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin analogues–NMR spectra for both HisB24 and D-HisB24 analogues were acquired at pH 1.9 and pH 8.0 to address the issues related to the pK_a of insulin's side chains and potential disruptive influence of the buffering systems (55).

Both analogues provided good quality NMR spectra under acidic conditions (20% d_3-acetic acid, pH 1.9), which is indicative of a monomeric behavior for the modified insulin molecules. The essentially complete sequence-specific assignment of ^{1}H NMR resonances was obtained for [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin using a combination of 2-D homonuclear experiments. The detailed resonance assignments are in supplemental Tables S2 and S3. The chemical shift values for H$^{\varepsilon 2}$ from the side chains of three histidines (at positions B5, B10 and B24) in the acidic pH were indicative of their double-protonated (charged) state (56). In addition, a significant line-broadening of the ^{1}H^N NMR signals of several residues (ThrA8, SerA9, CysA11, LeuB6, and GlyB8) was observed, suggesting the presence of chemical exchange due to the isomerization of the adjacent disulfide bonds in the NMR time-scale.

Due to limited solubility and susceptibility to aggregation, it was not possible to obtain reasonable quality NMR data for L-and D-HisB24 analogues in aqueous solution at pH 7.

However, the analogues were fully soluble and predominantly monomeric at pH 8.0 up to a concentration of 0.5 mM. Nevertheless, a significant proportion of the H^N signals were not present in the NMR spectra due to a rapid exchange of the amide hydrogens with the solvent at basic pH. Consequently, the number of assigned resonances for both analogues was significantly lower at this pH. In particular, 91.0% (95.1% excluding H^N) resonances could be assigned for [HisB24]-insulin and 86.5% (93.0% excluding H^N) resonances for [D-HisB24]-insulin. The assignments obtained for analogues at pH 8.0 are in the supplemental Tables S4 and S5. Due to the extensive overlaps of the NMR signals in certain spectral regions, the number of resonances that could not be unambiguously assigned was higher in the [D-HisB24]-insulin analogue. The chemical shift values of the B24 histidine side chains for

both analogues suggest their mono-protonated (neutral) state under basic conditions.

The ^{1}H resonance assignments obtained for [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin under acidic and basic conditions allowed automated assignment of the NOEs identified in 2-D NOESY spectra using protocols described in Methods. The numbers of observed NOE peaks, distance constraints and structural statistics for obtained structures are in supplemental Table S6.

The ^{1}H chemical shifts values for both analogues display a high degree of similarity for the parts of the molecule further from the introduced modification at the position B24, as illustrated by the calculated chemical shift differences for H^{N} and H^{α} at pH 1.9 and 8.0 shown in supplemental Table S7. The significant differences were found for the H^{N} chemical shift values from residues at positions B20-B26 at pH 1.9 and B23-B27 at pH 8.0. Interestingly, only a very limited number of the NOE contacts between the side chains of aromatic residues (HisB24, PheB25, TyrB26) from the C-terminal part of the B-chain and hydrophobic core of insulin were observed in the NOESY spectra acquired at pH 1.9. However, an extensive network of these contacts re-emerged in the NOESY spectra obtained at pH 8 (Fig. 1).

The solution structures calculated from the NMR data for [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin at pH 1.9 and pH 8.0 are shown in Fig. 2. Detailed analysis revealed that A-chain of both analogues adopts a characteristic helix-turn-helix conformation independently of the pH. As expected, the N-terminal α-helix of A-chain (A1-A6) is not very well defined at pH 8.0 due to an insufficient number of NOE contacts involving backbone amide hydrogens, which are key for stabilization of the local helical conformation in proteins. The effect is more evident for [D-HisB24]-insulin (Fig. 2D). In addition, the overall appearance of the [D-HisB24]-insulin structure was affected by a significantly lower number of NOE peaks observed in the NOESY spectrum, which resulted in a reduced number of the non-redundant distance constraints (supplemental Table S7).

Under acidic conditions (pH 1.9), the C-terminal parts of the B-chain (B21-B30) were found disordered in both analogues despite a well-defined central α-helix (B9-B20). Hence, medium to long-range NOE contacts were not identified between residues B21-B30 and the rest of the molecule (Fig. 2A and 2C).

At pH 8.0, the NOE pattern indicating the reestablishment of the contacts between the core hydrophobic residues and the C-terminal loop of the B-chain was identified in the NOESY spectra of both analogues (Fig. 1) prior to the structure calculation. However, the overall organization of the pH 8.0 NMR structures (Fig. 2B and 2D) of these analogues revealed significant differences in the conformations of their respective B-chains (Fig. 3).

The overall feature of the [HisB24]-insulin pH 8.0 NMR structure is its well-ordered and defined character. Detailed analysis of the [HisB24]-insulin structure revealed that the histidine side chain is very well accommodated and stabilized in the B24 pocket not only by typical, wild-type-like nonpolar interactions (with ValB12 and LeuB15) but by new hydrogen bonds as well (Fig. 3A). The protonated B24 imidazole $N^{\varepsilon 2}$ atom forms a strong (2.9 - 3.2 Å) hydrogen bond (calculated between heteroatoms) with ValB12 CO, whereas the deprotonated imidazole $N^{\delta 1}$ atom forms a weaker and transient hydrogen bond (3.4 - 3.9 Å) with TyrB26 NH. Subsequently, the TyrB26 side chain is shifted closer to the core of the molecule compared to its position in human insulin, and subsequently its OH group is engaged in hydrogen bonds with GlyB8 CO and/or GlyB8 NH (3.8 - 8.8 Å and 3.3 - 9.9 Å, respectively). However, the observed ranges suggest that these hydrogen bonds may be transient or mediated by water molecules, as observed in human insulin (57). The shift of TyrB26 side chain also enables its C-H π-like stacking contact with ProB28 side chain. All new interactions that involve B24-B28 residues result in a very firm stabilization of the B21-B30 β-strand, its tethering into the analogue core, and the increased overall compactness of this protein.

In contrast to the ordered and compacted structure of the [His]-insulin analogue, parts of the [D-His]-insulin structure at pH 8.0 are not fully defined. This is despite similar and clear reestablishment of contacts between the insulin hydrophobic core and the C-terminal loop of B-chain at pH 8.0, which were also undefined in this analogue at pH 1.9. The incorporation of the D-form of the His residue at the B24 site had a profound impact on the organization of the main

chain and side chains in this region (Fig. 3B). This substitution changed the local B24-backbone topology, where the D-chirality of the B24C$^{\alpha}$ swayed the D-HisB24 away from the insulin core. The uprooting of the His side chain from the 'PheB24' pocket had, in turn, profound consequences on the B24 down- and up-stream parts of the B-chain. Most remarkably, the cavity of the His-depleted 'PheB24' hydrophobic pocket was filled again by the PheB25, which mimics 'he 'missing' D-His side chain. This retractile change of the 'register' along the B23-B30 strand results in subsequent structural downshift of the TyrB26 into the B25 site. Here, the TyrB26 follows the PheB25-typical outward conformation. In addition, in contrast to the [HisB24]-analogue pH 8.0 structure, the B27-B30 residues depart from the insulin molecule core revealing previously fully buried ValB12 and LeuB15 (supplemental Fig. S3).

The N-terminal arms of the B-chains (B1-B6) were found in the T-like states in both analogues, as in solution structures of monomeric insulins (7).

Molecular dynamics (MD) of the wild-type insulin and [HisB24]- and [D-HisB24]-insulin analogues

Overall structural stability–The 50-ns MD trajectories of the A-B and C-D insulin monomers derived from the 1mso dimer of human insulin (41) became stable after 20 ns with RMSD oscillation approximately 2.5 or 3 Å from the starting X-ray structure (Fig. 4A).

The backbone RMSD of the [HisB24]-insulin 50-ns trajectory was more stable with RMSD oscillating approximately 2 Å from the first NMR structure. The hydrogen bond pattern of [HisB24]-insulin observed in NMR structure of this analogue ($N^{\varepsilon 2}$-ValB12 CO of 2.9 - 3.2 Å and $N^{\delta 1}$-TyrB26 HN of 3.4 - 3.9 Å) was fully preserved throughout the whole simulation run. In contrast, the [D-HisB24]-insulin trajectory departed very significantly from the starting NMR structure (up to RMSD of ~5 - 6 Å) and appeared stable only after 40 ns at a higher plateau of 2.6 Å (Fig. 4B).

Segment movements–To understand the movements of the C-terminus of the B-chain (residues B24-B28) in relation to the insulin rigid core (B7-B19 central α-helix), five representative distances (B24C$^{\alpha}$-B15C$^{\alpha}$, B25C$^{\alpha}$-B15C$^{\alpha}$, B26C$^{\alpha}$-B12C$^{\alpha}$, B27C$^{\alpha}$-B11C$^{\alpha}$ and B28C$^{\alpha}$-B8C$^{\alpha}$) between these structural elements were measured in [HisB24]-insulin, [D-HisB24]-insulin and in A-B and C-D monomers of human insulin in the course of the MD production runs. The C$^{\alpha}$ atoms of residues B26-B28 in the wild-type A-B insulin monomer (Fig. S4A) displayed significant movements; however, the B24 and B25 C$^{\alpha}$ atoms remained relatively stable. Smaller shifts in the initial part of the simulation were observed in the case of wild-type C-D monomers (Fig. S4B); however, they tend to converge to the A-B-like RMSD after 20 ns. All selected distances in the [D-HisB24]-analogue displayed relatively high flexibility in the course of MD runs (Fig. 5B). In contrast, the B24-B28 chain in [HisB24]-insulin was very rigid (Fig. 5A) without any significant movements (cf. Fig. 4B).

Residue flexibility - Positional fluctuations of the wild-type insulin and analogue residues over the 50-ns MD simulation runs are shown in supplemental Fig. S5. The largest flexibility (>500) is concentrated on the N- and C-termini of the B-chain in both the A-B and C-D monomers of human insulin. The [HisB24]-insulin yielded the most stable structures (Fig. S5A). This trend, increased residue flexibility of the human insulin and [D-His]-insulin (Fig. S5B) and lower flexibility of [His]-insulin, was observed throughout the entirety of the insulin molecule.

DISCUSSION

The three aromatic amino acids PheB24, PheB25 and TyrB26 from the C-terminal part of the B-chain are some of the key residues identified in human insulin. These residues are important for both formation of the dimer interface of the hormone (3) and its interactions with IR (18, 20). Considering the prolonged absence of structural description of the B22-B30-chain-IR interface (5), we focused here on a more systematic probing of the role of PheB24 aromatic side chain and chirality of its C$^{\alpha}$ atom for the structure and function of the hormone. Extensive and complex data emerging from other studies on the B24 site are summarized in supplemental Table S8.

Focusing on the B24 site, we have tested its functional and structural response to (i) an alternative polar aromatic side chain (His), (ii) inverse C$^{\alpha}$ chirality (D-His), and (iii) structural main chain restrains (Pro, Sar) on hormone structure and function. The histidine side chain was selected for its partially aromatic character,

similar size to phenylalanine side chain, and its imidazole hydrogen-bond formation potential. The possible functional cooperativity between B24 and B26 sites in insulin-IR interactions was further investigated in a double [D-HisB24,GluB26]-insulin mutant and its variant ([D-HisB24,GluB26,LysB28,ProB29]-insulin) (Table 1).

The replacement of PheB24 by any L-amino acid disrupts insulin's biological activity and affinity (supplemental Table S8 and the references therein). The binding affinities of 'non-aromatic' LeuB24, SerB24 and AlaB24 insulin analogues do not exceed 20% in most cases. Interestingly, the simultaneous loss of the side chain and chirality at the B24 position (i.e., GlyB24]-insulin) is relatively well tolerated, yielding affinities in the range of 22 - 78%. In contrast, the replacement of PheB24 by D-amino acids enhances binding affinity in most of the analogues (i.e., [D-AlaB24]-insulin - 150%, [D-PheB24]-insulin 140 - 180%), with an exception for D-ProB24 analogue. Double B24/B26 mutants followed this trend as the [D-TyrB24,PheB26]-insulin possesses 163% affinity ([PheB26]-insulin itself displays 45% binding affinity (3, 58)), while its L-amino acid variant [TyrB24,PheB26]-insulin is inactive (2%). Interestingly, the incorporation of an achiral amino acid derivative with a pair of methyl groups attached to the C^{α} carbon atom, α-aminoisobutyric acid (Aib), at the B24 site results in an [AibB24]-insulin analogue with no potency (0.3 %).

Therefore, the high affinity (212%) of the [D-HisB24]-insulin and weak binding of [HisB24]-insulin (1.5% affinity) obtained here were in an agreement with trends observed in available data. However, they did not provide immediate explanation of the binding pattern observed in B24-site insulin mutants. Therefore, a comprehensive structural characterization of [HisB24]- and [D-HisB24]-insulins was undertaken in this study. NMR structures were determined in parallel at acidic and basic pH values (i.e., pH ~1.9 *vs.* pH 8.0) to avoid possible bias resulting from the pH and buffer effects on insulin conformation (55). Additional insights were obtained from theoretical MD simulations.

Indeed, the crystal and NMR structures of [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin analogues obtained here provide rational explanation of the importance of an aromatic invariance of the B24 site and underline the conservation of the structural integrity of the PheB24 and its pocket for an effective hormone functionality.

The striking feature of both the crystal and NMR structures of [HisB24]- and [D-HisB24]-insulins is the widespread disorder of B20-B30 chains at pH 1.9 compared with their well- and reasonably ordered conformations at pH 8.0 (Fig. 2). A similar disorder of the B20-B30 part of insulin has been observed in acidic pH NMR structures of other B24 mutants such as [GlyB24]-insulin (7, 59), [GlyB24,GluB16,*des*B30]-insulin (55), and in [D-AlaB24]-insulin (17). Hence, it is possible that this phenomenon arises from structurally deleterious effects of low pH and/or acetic acid on some insulin analogues (55). However, it cannot be excluded that disorder of [His-B24]-insulin and [D-HisB24]-insulin analogues at pH 1.9 arise from the repulsive effect of the doubly protonated HisB24 that cannot be accommodated in the 'B24' hydrophobic cavity. Therefore, we focused here on analysis of more physiological pH 8.0-derived insulin structures and their defined conformations.

The NMR spectra at pH 8.0 yielded a well-ordered and compact structure of [HisB24]-insulin (Fig. 2B). Its main feature is a stable accommodation of the $N^{\varepsilon 2}$-monoprotonated imidazole ring inserted in the B24 hydrophobic cavity. Interestingly, the histidine side chain is accommodated there even more firmly than the phenyl moiety of PheB24 as it thrusts into the cavity ~1.2 Å deeper than the PheB24 phenyl ring of the wild-type insulin. This HisB24-related compactness of the structure is a likely result of the combination of the combined effects of still-present aromatic character of the B24 imidazole with its hydrogen bond forming capability. In addition to close van der Waals imidazoleB24-LeuB15 contacts, the side chain of HisB24 is anchored firmly by strong B24$N^{\varepsilon 2}$-COValB12 and weaker B24$N^{\delta 1}$-NHTyrB26 hydrogen bonds (Figure 3A). This tight engagement of HisB24 within B24-cavity has a precipitous effect on the remaining part of the B25-B30 chain, which is also pulled back close to the core of the hormone. This insulin-wrapping conformation of the B-chain is further stabilized by GlyB8CO/NH-OHTyrB26 direct hydrogen bonds and wedging of the TyrB26 phenyl ring between ProB28 and IleA2. This

'immobilization' and tethering of the B24-B30 chain into [HisB24]-insulin's core at pH 8.0 are likely reasons for the low affinity of this analogue and of its monomeric behavior.

The 'over-conservation' of the B24-B30 fold observed in [HisB24]-insulin is in contrast with the radical rearrangement of the B20-B30 chain in the [D-HisB24]-insulin at the same, high pH 8.0 (Fig. 2D). Such rearrangement is a result of the pull out of the histidine side chain from the Phe B24-pocket by the inverse chirality of the D-HisB24 C^{α} atom and subsequent/simultaneous filling up of the emerging empty cavity by another available aromatic side chain that is provided here by PheB25. The locations of PheB24 and PheB25 aromatic rings in the wild-type and [D-HisB24]-insulins, respectively, are very similar, with a remarkable conservation of the position of the C^{α} atoms that differ by only ~0.55 Å in both analogues (Fig. 3B).

The compensatory capability of the PheB25 to act as PheB24 structural substitute has also been observed in pH 8.0 NMR structure of [GlyB24,GluB16,*des*B30]-insulin in which both the side chain of the B24 residue and the chirality of its C^{α} atom have been removed (55). In contrast, the NMR structure of [D-AlaB24]-insulin (17) indicated disorder of the B20-B30 part of the molecule. However, due to a lack of some NMR experimental detail there (e.g., pH at which the NMR spectra were measured), we suppose that the significant mobility of this chain in [D-AlaB24]-insulin arise from the use of low pH (deuterioacetic acid) in these NMR experiments (17). The 'down-register' shift of the B24-B30 chain in [D-HisB24]-insulin is structurally propagated there on both sides of the B24 site. For example, the B19-B22 β-turn is lost in a favor of a larger bulge, TyrB26 occupies PheB25 position, and B26-B30 chain departs from the insulin core. Importantly, these large-scale structural rearrangements are correlated with the high affinity of this analogue. Furthermore, it is not excluded that the B26→B25 downshift observed in [D-HisB24]-insulin contributes also to the high affinity of this analogue because Glendorf et al. (60) reported [TyrB25]-insulin with a high-binding affinity (285%).

The NMR/X-ray experimental structural evidence about [HisB24]- and [D-HisB24]-insulins was confirmed by MD simulations. First, it was established that the overall mobility and dynamics of the wild-type insulin does not depend on slightly different starting models (i.e., A-B vs. C-D monomers derived from the human insulin dimer, pdb code 1mso) (41). Although the C-terminus of the B-chain detached sooner from the insulin's core in the A-B monomer compared with the C-D one (cf., the overall RMSD in Fig. 4A), both simulations converged to stable plateaus of similar RMSD after ca. 20 ns long run. The reason for this delayed detachment in the C-D monomer is possibly due to the salt bridge between the GlyA1 N and ThrB30 O atoms present in the X-ray structure only in this monomer and persisting in the MD up to four ns. In addition, our simulations agreed with previous insulin MD studies (61, 62); all of the simulations indicate the same range of insulin mobility and partial, approximately B25-B30, detachment of the B-chain from the hormone core. Secondly, the MD simulations also fully agreed with the distinct NMR conformational stabilities of [HisB24]- and [D-HisB24]-insulins. The RMSD for [HisB24]-insulin are strikingly invariant and steady, being in contrast with the higher RMSD of [D-HisB24]-insulin that indicate its increased mobility that exceeding the dynamics of the wild-type insulin (Fig. 4B). Thirdly, the analysis of selected distances between the key regions of the hormone indicates the detachment of the B25-B30 B-chain in the wild-type and [D-HisB24]-insulin but conservation of the B24 C^{α} region (Fig. 5).

Direct correlation of the affinities of [HisB24]- and [D-HisB24]-insulin with their contrasting structural features observed here, i.e., 'gluing' of the B24-B30 chain to insulin core *vs*. 'liberation' of the B25-B30 chain, respectively, confirm the established consensus about the detachment of the B-chain needed for insulin activation upon its binding to the IR. However, the scale of the detachment of the B20-B30 chain in this process is still not determined. It is debatable whether a full unfolding of the approximately B22-B30 chain is needed for insulin activation (18) or whether the effective engagement of the hormone with IR can be achieved by a more modest reshaping of the B25-B30 residues, in a form similar to that observed in B26-turn containing high-affinity analogues (19). The high-affinity of the [D-HisB24]-insulin, and its structural persistence for conservation and occupation of the PheB24-cavity

by an aromatic moiety, suggest that the PheB24 side chain may remain in place upon insulin activation. The maintenance of the B24-'aromatic'-cavity in a very mobile and reshaped, but still highly active, analogue is in concordance with the strict preservation of the B24 side chain in high-affinity analogues in which it was considered as one of the crucial invariant side chain pivots (19). In addition, it appears that [D-HisB24]-insulin, with its less rigid and more flexible structure, is better primed than native insulin for the detachment and activation of the approximately B25-B30 C-terminal β-strand upon binding to the IR.

The need for the structural invariance of the B24 C^{α} atoms is supported further by the low affinities of [ProB24]-insulin and [SarB24]-insulin analogues (Table 1 and Table S8) that contain the main chain constraining amino acids (63). The ProB24 and SarB24 substitutions not only result in the absence of aromatic side chains, but their specific dihedral angles impose restrictions on moderate flexibility at the B24 site, excluding likely any B25→B24-like compensatory structural downshift observed in highly active [D-HisB24]-insulin. In contrast, the dihedral φ/ϕ angles of glycine and D-amino acids at the B24 site allow for a rearrangement of insulin molecule that leads to an effective IR binding. The structural vulnerability of the main chain at the B24 site and the sensitivity of its C^{α} chirality are, therefore, expressed in both aromatic pull-down (B25→B24) structural rearrangements and maintenance of the position of this atom. These underline the need for an overall conservation of the phenylalanine-like character of this site. However, it cannot be excluded that the low affinities of [ProB24]-insulin and [SarB24]-insulin analogues may result from the loss of B24 amide hydrogens, which may be important for IR binding (3).

Despite the progress in understanding the roles of individual substitutions at the B24 site, the negative-cooperative effects of double B24/B26 mutations in [D-HisB24,GluB26]- and [D-HisB24,GluB26,LysB28,ProB29]- insulins, which abolish affinity gains of single site replacements at the B24/B26 sites, are less obvious. The only one available NMR structure of [D-HisB24,GluB26,LysB28,ProB29]-insulin determined at pH 1.9 that shows large-scale disorder of the B-chain (data not shown) observed in 'acidic' structures of [HisB24]- and [D-HisB24]-insulins, and the structural effect of double [D-HisB24,GluB26] mutation remains unclear. However, the low affinity of the [D-HisB24,GluB26]-mutants may result from the unfavorable replacement of PheB25 aromatic ring by glutamic acid side chain if the B25→B24 downshift takes place in this analogue as well as in [D-HisB24]-insulin. If such rearrangement does occur there, the GluB26-side chain should occupy the position of the B25 phenyl ring in wild-type insulin, hence mimicking the B25Phe→B25Glu mutation, which is most likely fully detrimental as observed in the case of similar B25Phe→B25Asp substitution (64). In contrast, the B25→B24 downshift in high-affinity [D-HisB24]-insulin is compensated by the move of another aromatic TyrB26 side chain into the B25 position. It is also possible that GluB26 side chain follows the TyrB26 solvent-pointing conformation observed in [D-HisB24]-insulin and therefore is capable of forming hydrogen bonds to also solvent-exposed D-HisB24 and neighboring AsnA21 or ThrB30. These interactions altogether can have a negative effect on IR binding due to the over-stabilization of this region.

In summary, our data rationalize the positive effects of D-amino acid substitutions at the B24 site. They indicate the importance of the aromatic character of the B24 side chain for insulin activity, which is demonstrated by the B25→B24 'rescue' downshift of B25Phe into the B24 site. They also underline the invariance of the position of the B24C^{α} atom for effective IR binding. Moreover, they also provide supporting evidence for a limited, B25-onwards, unfolding of the C-terminus of the B-chain during hormone activation in disfavor of its full (B22-B30) detachment. However, the actual nature of PheB24 engagement with IR requires further insulin-IR complex studies.

REFERENCES

1. Ward, C. W. and Lawrence, M. C. (2009) Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays* **31**, 422-434
2. Steiner, D. F. (2011) Adventures with Insulin in the Islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* **286**, 17399-17421
3. Antolikova, E., Zakova, L., Turkenburg, J. P., Watson, C. J., Hanclova, I., Sanda, M., Cooper, A., Kraus, T., Brzozowski, A. M., and Jiracek, J. (2011) Non-equivalent role of inter- and intramolecular hydrogen bonds in the insulin dimer interface. *J. Biol. Chem.* **286**, 36968-36977
4. Pullen, R. A., Lindsay, D. G., Wood, S. P., Tickle, I. J., Blundell, T. L., Wollmer, A., Krail, G., Brandenburg, D., Zahn, H., Gliemann, J., and Gammeltoft, S. (1976) Receptor-binding region of insulin. *Nature* **259**, 369-373
5. Menting, J. G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K. W., Smith, B. J., Watson, C. J., Zakova, L., Kletvikova, E., Jiracek, J., Chan, S. J., Steiner, D. F., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., Weiss, M. A., Ward, C. W., and Lawrence, M. C. (2012) How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature* **493**, 241-245
6. Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hubbard, R. E., and Reynolds, C. D. (1983) Insulin's structural behavior and its relation to activity. *Biopolymers* **22**, 281-291
7. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M., and Weiss, M. A. (1991) Receptor binding redefined by a structural switch in a mutant human insulin. *Nature* **354**, 238-241
8. De Meyts, P., Van Obberghen, E., and Roth, J. (1978) Mapping of the residues responsible for the negative cooperativity of the receptor-binding region of insulin. *Nature* **273**, 504-509
9. Weiss, M. A. (2009) The Structure and Function of Insulin: Decoding the TR Transition. In *Insulin and IGFs*, Elsevier Academic Press, Inc., San Diego
10. Derewenda, U., Derewenda, Z., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Bing, X., and Markussen, J. (1991) X-ray analysis of the single chain B29-A1 peptide-linked insulin molecule. A completely inactive analogue. *J. Mol. Biol.* **220**, 425-433
11. Mayer, J. P., Zhang, F., and DiMarchi, R. D. (2007) Insulin Structure and Function. *Bipolymers* **88**, 687-713
12. Ludvigsen, S., Roy, M., Thogersen, H., and Kaarsholm, N. C. (1994) High-resolution structure of an engineered biologically potent insulin monomer, B16 Tyr→His, as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 7998-8006
13. Hua, Q. X., Hu, S. Q., Frank, B. H., Jia, W., Chu, Y. C., Wang, S. H., Burke, G. T., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (1996) Mapping the functional surface of insulin by design: structure and function of a novel A-chain analogue. *J. Mol. Biol.* **264**, 390-403
14. Weiss, M. A., Hua, Q. X., Lynch, C. S., Frank, B. H., and Shoelson, S. E. (1991) Heteronuclear 2D NMR studies of an engineered insulin monomer: assignment and characterization of the receptor-binding surface by selective 2H and 13C labeling with application to protein design. *Biochemistry* **30**, 7373-7389
15. Hua, Q. X. and Weiss, M. A. (1991) Comparative 2D NMR studies of human insulin and des-pentapeptide insulin: sequential resonance assignment and implications for protein dynamics and receptor recognition. *Biochemistry* **30**, 5505-5515
16. Kurapkat, G., Siedentop, M., Gattner, H. G., Hagelstein, M., Brandenburg, D., Grotzinger, J., and Wollmer, A. (1999) The solution structure of a superpotent B-chain-shortened single- replacement insulin analogue. *Protein Sci.* **8**, 499-508
17. Hua, Q. X., Xu, B., Huang, K., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Jia, W. H., Wang, S., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) Enhancing the activity of a protein by stereospecific unfolding. Conformational life cycle of insulin and its evolutionary origins. *J. Biol. Chem.* **284**, 14586-14596

18. Xu, B., Huang, K., Chu, Y. C., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Wang, S. H., Wang, R. Y., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) Decoding the cryptic active conformation of a protein by synthetic photoscanning. Insulin inserts a detachable arm between receptor domains. *J. Biol. Chem.* **284**, 14597-14608
19. Jiracek, J., Zakova, L., Antolikova, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., and Brzozowski, A. M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 1966-1970
20. Mirmira, R. G., Nakagawa, S. H., and Tager, H. S. (1991) Importance of the character and configuration of residues B24, B25, and B26 in insulin-receptor interactions. *J. Biol. Chem.* **266**, 1428-1436
21. Shoelson, S. E., Lu, Z. X., Parlautan, L., Lynch, C. S., and Weiss, M. A. (1992) Mutations at the dimer, hexamer, and receptor-binding surfaces of insulin independently affect insulin-insulin and insulin-receptor interactions. *Biochemistry* **31**, 1757-1767
22. Shoelson, S., Fickova, M., Haneda, M., Nahum, A., Musso, G., Kaiser, E. T., Rubenstein, A. H., and Tager, H. (1983) Identification of a mutant human insulin predicted to contain a serine- for-phenylalanine substitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 7390-7394
23. Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kanaya, T., Kobayashi, M., and Shigeta, Y. (1981) Semisynthesis and biological properties of the [B24-leucine]-, [B25-leucine]- and [B24-leucine, B25-leucine]-analogues of human insulin. *Experientia* **37**, 811-813
24. Wollmer, A., Strassburger, W., Glatter, U., Dodson, G. G., McCall, M., Gattner, H. G., Danho, W., Brandenburg, D., and Rittel, W. (1981) Two mutant forms of human insulin. Structural consequences of the substitution of invariant B24- or B25-phenylalanine by leucine. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 581-591
25. Tager, H., Thomas, N., Assoian, R., Rubenstein, A., Saekow, M., Olefsky, J., and Kaiser, E. T. (1980) Semisynthesis and biological activity of porcine [LeuB24]insulin and [LeuB25]insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3181-3185
26. Gattner, H. G., Danho, W., Behn, C., and Zahn, H. (1980) The preparation of two mutant forms of human insulin, containing leucine in position B24 or B25, by enzyme-assisted synthesis. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1135-1138
27. Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kobayashi, M., and Shigeta, Y. (1981) Semisynthesis and properties of some insulin analogs. *Biopolymers* **20**, 1845-1858
28. Keefer, L. M., Piron, M. A., De Meyts, P., Gattner, H. G., Diaconescu, C., Saunders, D., and Brandenburg, D. (1981) Impaired negative cooperativity of the semisynthetic analogues human [LeuB24]- and [LeuB25]-insulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1229-1236
29. Assoian, R. K., Thomas, N. E., Kaiser, E. T., and Tager, H. S. (1982) [LEUB24]insulin and [ALAB24]insulin - altered structures and cellular processing of B24-substituted insulin analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **79**, 5147-5151
30. Mirmira, R. G. and Tager, H. S. (1989) Role of the phenylalanine B24 side chain in directing insulin interaction with its receptor. Importance of main chain conformation. *J. Biol. Chem.* **264**, 6349-6354
31. Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H. G., Jiracek, J., Velek, J., Blaha, I., Ubik, K., Kasicka, V., and Pospisek, J. (1994) Semisynthetic insulin analogues modified in positions B24, B25 and B29. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**, 373-378
32. Nakagawa, S. H. and Tager, H. S. (1993) Importance of main-chain flexibility and the insulin fold in insulin- receptor interactions. *Biochemistry* **32**, 7237-7243
33. Casaretto, M., Spoden, M., Diaconescu, C., Gattner, H. G., Zahn, H., Brandenburg, D., and Wollmer, A. (1987) Shortened insulin with enhanced in vitro potency. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **368**, 709-716

34. Zakova, L., Zyka, D., Jezek, J., Hanclova, I., Sanda, M., Brzozowski, A. M., and Jiracek, J. (2007) The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs. *J. Pept. Sci.* **13**, 334-341
35. Zakova, L., Kazdova, L., Hanclova, I., Protivinska, E., Sanda, M., Budesinsky, M., and Jiracek, J. (2008) Insulin analogues with modifications at position B26. Divergence of binding affinity and biological activity. *Biochemistry* **47**, 5858-5868
36. Morcavallo, A., Genua, M., Palummo, A., Kletvikova, E., Jiracek, J., Brzozowski, A. M., Iozzo, R. V., Belfiore, A., and Morrione, A. (2012) Insulin and Insulin-like Growth Factor II Differentially Regulate Endocytic Sorting and Stability of Insulin Receptor Isoform A. *J. Biol. Chem.* **287**, 11422-11436
37. Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymol.* **276**, 307-326
38. Bailey, S. (1994) The Ccp4 Suite - Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* **50**, 760-763
39. Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126-2132
40. Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025
41. Smith, G. D., Pangborn, W. A., and Blessing, R. H. (2003) The structure of T-6 human insulin at 1.0 angstrom resolution. *Acta Crystallogr. D* **59**, 474-482
42. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D* **53**, 240-255
43. Herrmann, T., Guntert, P., and Wuthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* **319**, 209-227
44. Guntert, P. and Wuthrich, K. (1991) Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *J. Biomol. NMR* **1**, 447-456
45. Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, R. J. (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668-1688
46. Tsui, V. and Case, D. A. (2000) Molecular dynamics simulations of nucleic acids with a generalized born solvation model. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2489-2498
47. Koradi, R., Billeter, M., and Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **14**, 51-55
48. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926-935
49. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular-Dynamics with Coupling to An External Bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684-3690
50. Kurtzhals, P., Schaffer, L., Sorensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C., and Trub, T. (2000) Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* **49**, 999-1005
51. Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D., and Smith, G. D. (1995) Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin. *Structure* **3**, 615-622
52. Brange, J., Ribel, U., Hansen, J. F., Dodson, G., Hansen, M. T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., Snel, L., Sorensen, A. R., and Voigt, H. O. (1988) Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature* **333**, 679-682
53. Yao, Z. P., Zeng, Z. H., Li, H. M., Zhang, Y., Feng, Y. M., and Wang, D. C. (1999) Structure of an insulin dimer in an orthorhombic crystal: the structure analysis of a human insulin mutant (B9 Ser→Glu). *Acta Crystallogr. D.* **55**, 1524-1532

54. Whittingham, J. L., Scott, D. J., Chance, K., Wilson, A., Finch, J., Brange, J., and Guy, D. G. (2002) Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *J. Mol. Biol.* **318**, 479-490
55. Ludvigsen, S., Olsen, H. B., and Kaarsholm, N. C. (1998) A structural switch in a mutant insulin exposes key residues for receptor binding *J. Mol. Biol.* **279**, 1-7
56. Cosgrove, M. S., Loh, S. N., Ha, J. H., and Levy, H. R. (2002) The catalytic mechanism of glucose 6-phosphate dehydrogenases: Assignment and H-1 NMR spectroscopy pH titration of the catalytic histidine residue in the 109 kDa Leuconostoc mesenteroides enzyme. *Biochemistry* **41**, 6939-6945
57. Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Hodgkin, D. M., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., and Reynolds, C. D. (1988) The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **319**, 369-456
58. Gauguin, L., Klaproth, B., Sajid, W., Andersen, A. S., Mcneil, K. A., Forbes, B. E., and De Meyts, P. (2008) Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **283**, 2604-2613
59. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., and Weiss, M. A. (1992) Nonlocal structural perturbations in a mutant human insulin: sequential resonance assignment and 13C-isotope-aided 2D-NMR studies of [PheB24→Gly]insulin with implications for receptor recognition. *Biochemistry* **31**, 11940-11951
60. Glendorf, T., Stidsen, C. E., Norrman, M., Nishimura, E., Sorensen, A. R., and Kjeldsen, T. (2011) Engineering of Insulin Receptor Isoform-Selective Insulin Analogues. *PLoS One* **6**, 1-6
61. Zoete, V., Meuwly, M., and Karplus, M. (2004) A comparison of the dynamic behavior of monomeric and dimeric insulin shows structural rearrangements in the active monomer*Journal of Molecular Biology* **342,** 913-929
62. Zoete, V. and Meuwly, M. (2006) Importance of individual side chains for the stability of a protein fold: Computational alanine scanning of the insulin monomer. *J. Comput. Chem.* **27**, 1843-1857
63. Tran, T. T., Treutlein, H., and Burgess, A. W. (2006) Designing amino acid residues with single-conformations. *Protein Eng. Des. Sel.* **19**, 401-408
64. Drejer, K., Kruse, V., Larsen, U. D., Hougaard, P., Bjorn, S., and Gammeltoft, S. (1991) Receptor-binding and tyrosine kinase activation by insulin analogs with extreme affinities studied in human hepatoma HepG2 cells. *Diabetes* **40**, 1488-1495

TABLE 1. Values of IC_{50}, K_d and the relative binding affinities of human insulin and insulin analogues.

Analogue	IC_{50}± S.E.[a]	K_d ± S.E.	Potency[b]
	nM (n)	nM (n)	%
Single B24-substituted analogues			
Human insulin	0.89 ± 0.06 (3)	nd[c]	100 ± 7
Human insulin	nd	0.39 ± 0.01 (6)	100 ± 3
[HisB24]-insulin	59.5 ± 6.2 (3)	nd	1.5 ± 0.16
[D-HisB24]-insulin	0.42 ± 0.04 (3)	nd	212 ± 20
[SarB24]-insulin	14.1 ± 2.4 (5)	nd	6.3 ± 1.1
[ProB24]-insulin	nd	240 ± 7 (5)	0.16 ± 0.005
Double B24/B26-substituted analogues			
[D-HisB24,GluB26]-insulin	31.5 ± 2.9 (4)	nd	2.8 ± 0.26
[D-HisB24,GluB26,LysB28,ProB29]-insulin	49.8 ± 3.9 (4)	nd	1.8 ± 0.14
[GluB26,LysB28,ProB29]-insulin	0.46 ± 0.06 (3)	nd	193.0 ± 25

[a] IC_{50} values represent the concentrations of insulin or the analogues that cause half-maximal inhibition of binding of human [^{125}I]monoiodotyrosylA14-insulin to IR. Each value represents the mean ± S.E. of multiple determinations (n).

[b] Relative receptor binding affinity (potency) is defined as (IC_{50} or K_d of human insulin/IC_{50} or K_d of analogue) x 100.

[c] Not determined.

FOOTNOTES

*This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic grant P207/11/P430 (to L.Z.), the Ministry of Education of the Czech Republic (program "NAVRAT" LK11205, to V.V.), the Research Project of the Academy of Sciences of the Czech Republic RVO:61388963 (to the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry) and the BBSRC (PhD studentship to C.J.W.). This work was also supported by the Diamond Light Source (Didcot, United Kingdom) and the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France).

The atomic coordinates and structure factors (codes 2m2m, 2m2n, 2m2o, 2m2p and 3zi3) have been deposited in the Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb/).

©The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org/) contains supplemental Tables S1-S8, Figs S1-S5 and details of the structure preparation prior to the molecular dynamics simulation runs.

[1]To whom correspondence may be addressed: Tel.: 420220183441; Fax: 420220183571; E-mail: jiracek@uochb.cas.cz.

[2]To whom correspondence may be addressed: Tel.: 441904328265; Fax: 441904328366; E-mail: marek.brzozowski@york.ac.uk.

[3]The abbreviations used are: IR, insulin receptor; Fmoc, fluorenylmethoxycarbonyl; MD, molecular dynamics; Pac, phenylacetyl; root-mean-square deviations, RMSD.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. The side chains of the aromatic residues from the C-terminal loop of B-chain re-establish the interaction with the methyl groups from the protein core under basic conditions. Panel (A) shows a region from the 2-D NOESY spectrum of [HisB24]-insulin acquired at pH 1.9 showing NOE cross-peaks between aromatic and methyl hydrogens. The limited number of NOEs originates mainly from the contacts involving TyrA14, TyrA19, HisB5 and HisB10 with the adjacent methyl side chains. Panel (B) shows the data obtained for [HisB24]-insulin at pH 8.0. The additional NOE cross-peaks are from the contacts between the aromatic rings (HisB24 and TyrB25) and methyl groups (LeuB11 and LeuB15).

FIGURE 2. The solution structures of the [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin analogues. Structures are represented by best-fit superpositions of the protein backbone for 30 converged structures. The A-chain is colored in red and the B-chain in black in all structures. Panel (A) shows [HisB24]-insulin at pH 1.9, whilst panel (B) contains a set of structures obtained for the same analogue at pH 8.0. [D-HisB24]-insulin structure at pH 1.9 is shown on panel (C) and at pH 8.0 on panel (D). The positions of histidine side chains are colored in blue. The N and C termini of the insulin A- and B-chains are marked as $N_{A\text{-}chain}$, $C_{A\text{-}chain}$ (in red) and $N_{B\text{-}chain}$, $C_{B\text{-}chain}$ (in black), respectively. The C-terminal part of the B-chain (residues B21-B30), which is found flexible in both analogues under acidic conditions, re-established extensive contacts with the protein core in the basic environment.

FIGURE 3. An overlay of the B-chain of human insulin (pdb code 1mso (41), in grey) with the B-chain of [HisB24]-insulin (panel A, in coral) or (B) [D-HisB24]-insulin (panel B, in coral) analogues (representative NMR structures at pH 8.0). Only the positions of Phe/HisB24, PheB25 and TyrB26 side chains are shown. Dashed lines in panel A indicate selected hydrogen bonds stabilizing the structure of [HisB24]-insulin.

FIGURE 4. Backbone root-mean-square deviations (RMSD) of human insulin monomers A-B (in red) and C-D (in blue) derived from 1mso dimer (41) (panel A) and [D-HisB24]-insulin (in red) and [HisB24]-insulin (in blue) (panel B) derived from their pH 8.0 NMR structures (this work) during 50 ns MD simulation runs.

FIGURE 5. The changes in five representative distances ($B24C^{\alpha}$-$B15C^{\alpha}$ in black, $B25C^{\alpha}$-$B15C^{\alpha}$ in red, $B26C^{\alpha}$-$B12C^{\alpha}$ in blue, $B27C^{\alpha}$-$B11C^{\alpha}$ in green and $B28C^{\alpha}$-$B8C^{\alpha}$ in yellow) were measured in [HisB24]-insulin (panel A) and [D-HisB24]-insulin (panel B) in the course of 50-ns MD runs.

Figure 1

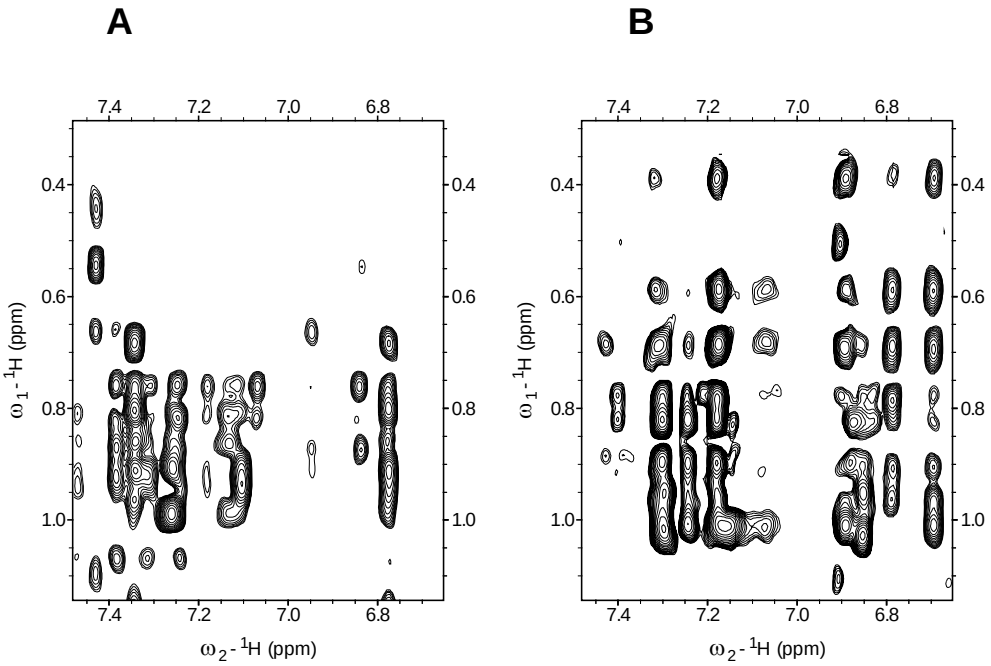


Figure 2

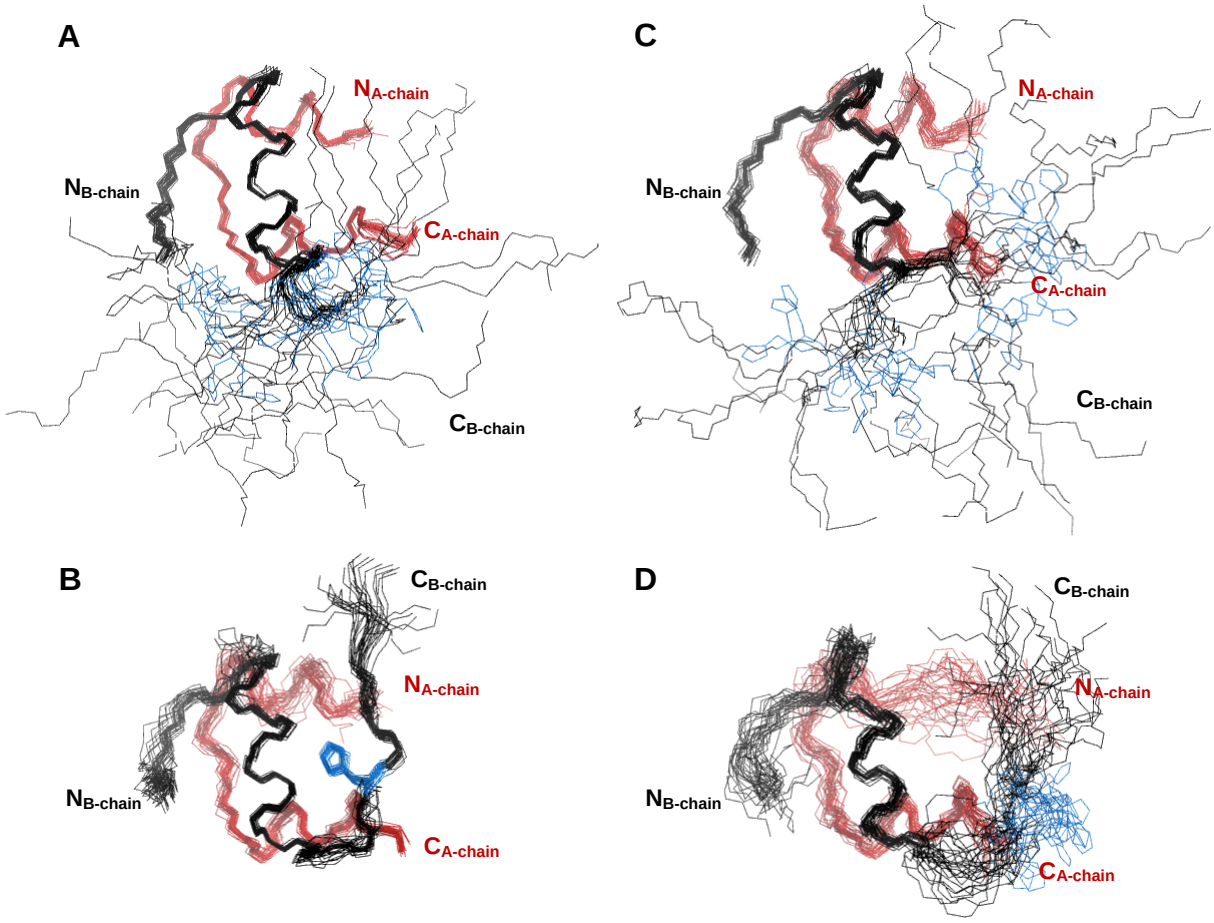

A
$N_{A\text{-chain}}$
$N_{B\text{-chain}}$
$C_{A\text{-chain}}$
$C_{B\text{-chain}}$
C
$N_{A\text{-chain}}$
$N_{B\text{-chain}}$
$C_{A\text{-chain}}$
$C_{B\text{-chain}}$
B
$C_{B\text{-chain}}$
$N_{A\text{-chain}}$
$N_{B\text{-chain}}$
$C_{A\text{-chain}}$
D
$C_{B\text{-chain}}$
$N_{A\text{-chain}}$
$N_{B\text{-chain}}$
$C_{A\text{-chain}}$

Figure 3

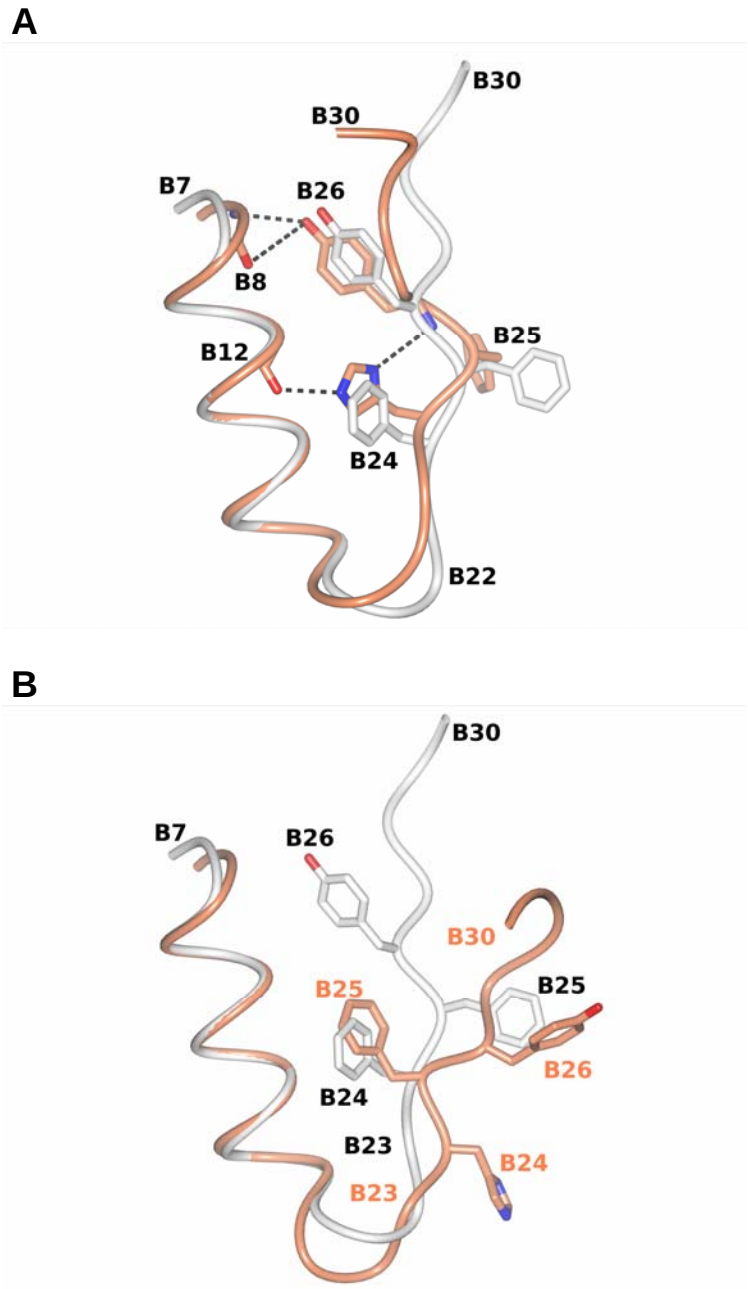

A
B30
B30
B7
B26
B8
B25
B12
B24
B22
B
B30
B7
B26
B30
B25
B25
B26
B24
B23
B24
B23

Figure 4

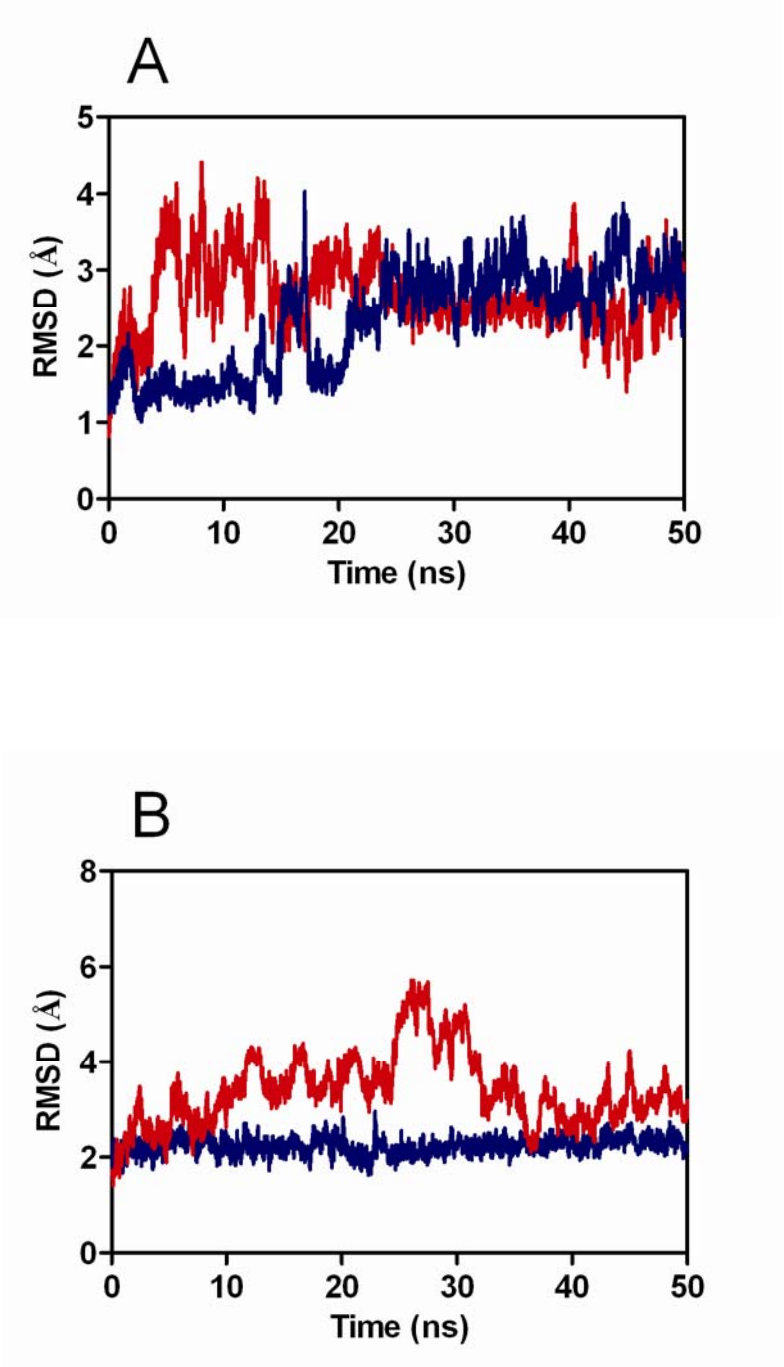
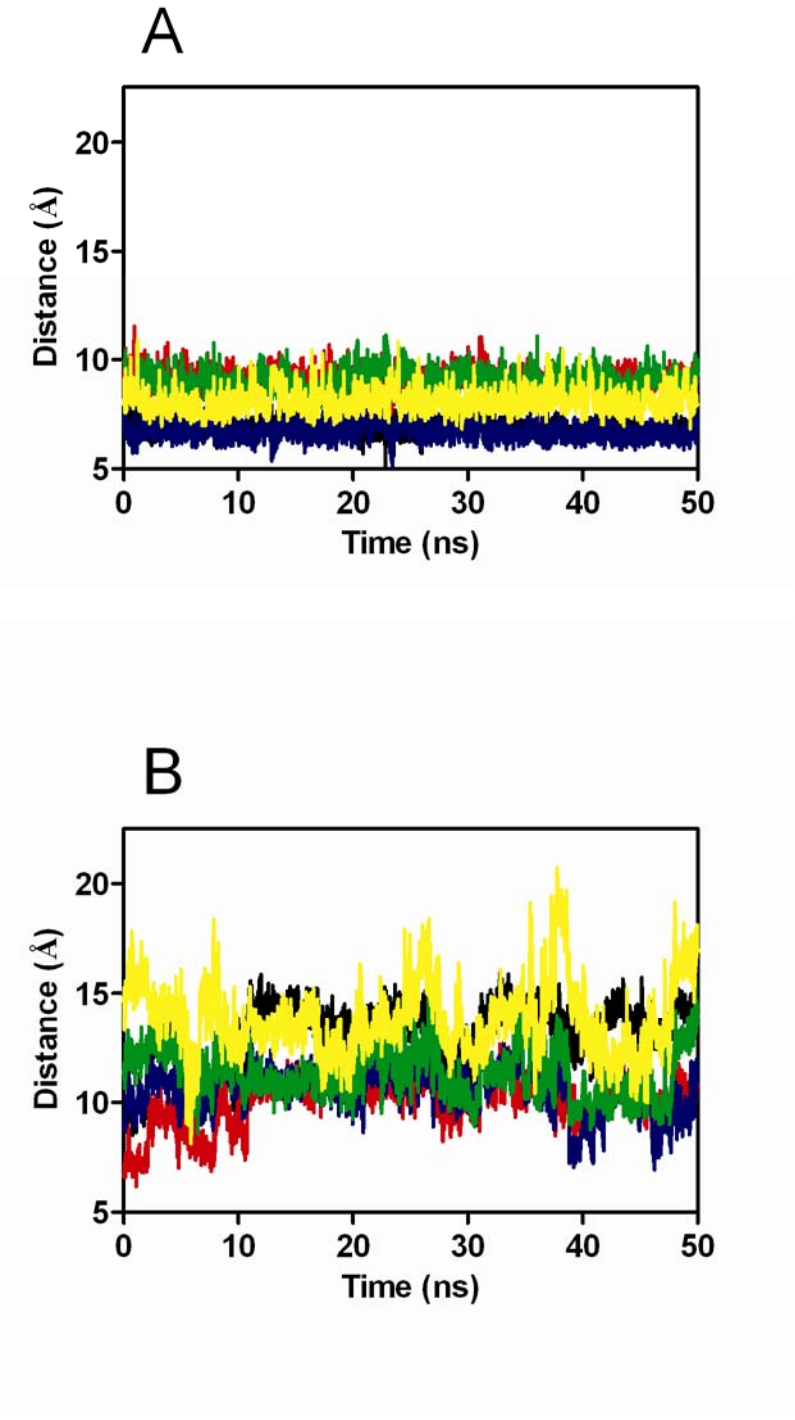

A
RMSD (Å)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
Time (ns)
B
RMSD (Å)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
40
50
Time (ns)

Figure 5


A
Distance (Å)
20
15
10
5
0
10
20
30
40
50
Time (ns)
B
Distance (Å)
20
15
10
5
0
10
20
30
40
50
Time (ns)

Supplemental Information

for

Structural Integrity of the B24 Site in Human Insulin is Important for Hormone Functionality

Lenka Žáková[‡], Emília Kletvíková[‡], Václav Veverka[‡], Martin Lepšík[‡], Christopher J. Watson[§], Johan P. Turkenburg[§], Jiří Jiráček[‡1], and Andrzej M. Brzozowski[§2]

From the [‡]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague 6, Czech Republic, the [§]York Structural Biology Laboratory, Department of Chemistry, The University of York, Heslington, York, YO10 5YW, United Kingdom

[1]To whom correspondence may be addressed: Tel.: 420220183441; Fax: 420220183571; E-mail: jiracek@uochb.cas.cz. [2]To whom correspondence may be addressed: Tel.: 441904328265; Fax: 441904328366; E-mail: marek.brzozowski@york.ac.uk.

Table of Contents

	Page
Details of structure preparation for molecular dynamics	2
Table S1	3
Table S2	4
Table S3	5
Table S4	6
Table S5	7
Table S6	8
Table S7	9
Table S8	10
Figure S1	12
Figure S2	13
Figure S3	14
Figure S4	15
Figure S5	16
List of supplemental references	17

Details of structure preparation for molecular dynamics

The wild-type human insulin structures were based on X-ray crystallographic structure (PDB code 1mso) (1) Both crystallographically independent monomers (designated as monomers A-B and C-D) were considered. In cases of alternative conformations of side chains, the first was employed. All the water molecules were discarded except the one bridging TyrB26 with GlyB8 (W609 and W623 for the A-B and C-D monomers, respectively). Histidine residues were found to be located on the insulin periphery and thus were modeled neutral, protonated on N^{ε}, except for HisB5 in the C-D monomer, which was protonated on N^{δ} due to its hydrogen bond with the backbone carbonyls of residues Cys7 and Ser9. The side chain of PheB1 of the C-D monomer lacked an experimental electron density and was thus modeled using LEaP and relaxed using short molecular dynamics (MD) (heating from 10 K to 300 K in 2 ps, then cooling to 10 K in 8 ps).

The structures of [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin were derived from the first of 30 NMR structures determined at pH 8. Histidines were protonated on N^{ε}, except for HisB5 in the D-HisB24 variant which was protonated on N^{δ} to fulfill hydrogen bonding patterns.

There were three disulfide bridges between CysA6-A11, A7-B7, and A20-B19. All Asp, Glu, Arg and Lys residues as well as the N- and C-termini were charged. Amino acid parameters were taken from the ff99SB AMBER force field ref (2).

Hydrogens were added using the Reduce (3) and LEaP module of AMBER suite (4) and relaxed using a short high-temperature molecular dynamics (2 ps at 2400 K and then cooling down to 0 K during 8 ps). Further, the water molecules and sodium counterions were minimized for 5000 cycles using the steepest descent (SD, 1000 cycles) and conjugate gradient (CG, 4000 cycles) algorithms. Next, they were subjected to 25+25 ps MD in NVT (canonical) and then NPT (isothermal-isobaric) thermodynamic ensembles at 300 K. Second, the hydrogens were optimized in 1000 SD + 4000 CG steps. Then, the whole protein was stepwise optimized with decreasing constraints on the backbone of 25, 125 and 500 kcal/mol/Å. The relaxation was finished with a 1000 SD + 4000 CG steps of free optimization.

Table S1. Data collection and refinement statistics for [HisB24]-insulin.

	[HisB24]-insulin
PDB code	3zi3
Data collection	
Beamline	Diamond LS - I24
Wavelength (Å)	0.9686
Space group	*I*422
Cell dimensions	
a, *b*, *c* (Å)	57.45 57.45 56.20
α, β, γ (°)	90.0 90.0 90.0
Resolution (Å)	28-1.70(1.79-1.70)
R_{sym}	0.118(0.674)
$\langle I / \sigma(I) \rangle$	12.6(3.9)
Completeness (%)	100(100)
Redundancy	12.2(12.6)
Wilson B factor (Å ^{2})	35.2
Refinement	
Resolution (Å)	28.0 – 1.70
No. reflections	5182
R_{work} / R_{free}	0.176/0.213
No. atoms	
Protein	309
Ligand/ion	1
Water	34
B-factors	
Protein	33.2
Ligand/ion	41.4
Water	42.4
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.025
Bond angles (°)	2.527
Ramachandran (%)	
Preferred/Allowed/Outliers	94.6/5.4/0
Crystallisation condition	0.075 mM Li_2SO_4 pH 3.0
Cryoprotectant	None

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

Table S2. ^{1}H chemical shifts for [HisB24]-insulin at pH 1.9 (25°C) (pdb code 2m2m).

	Residue	H^{N}	H^{α}	H^{β}	Others
A1	GLY		4.00		
A2	ILE	8.51	3.86	1.13	$H^{\gamma 1}$ 0.94, 0.82, $H^{\gamma 2}$ 0.76, $H^{\delta 1}$ 0.64
A3	VAL	8.09	3.60	1.91	H^{γ} 0.87, 0.92
A4	GLU	8.27	4.20	2.08	H^{γ} 2.48
A5	GLN	8.27	4.05	2.11, 2.05	H^{γ} 2.48, 2.40, $H^{\varepsilon 2}$ 7.55, 6.90
A6	CYS	8.27	4.92	3.32, 2.87	
A7	CYS	8.27	4.85	3.79, 3.33	
A8	THR	8.23	4.05	4.40	H^{γ} 1.24
A9	SER	7.39	4.76	4.04, 3.87	
A10	ILE	7.79	4.37	1.53	$H^{\gamma 1}$ 1.06, 0.41, $H^{\gamma 2}$ 0.62, $H^{\delta 1}$ 0.50
A11	CYS	9.68	4.92	3.31, 3.16	
A12	SER	8.75	4.58	4.30, 3.99	
A13	LEU	8.63	3.85	1.34	H^{γ} 1.40, H^{δ} 0.78, 0.72
A14	TYR	7.49	4.14	2.97, 2.89	H^{δ} 7.03, H^{ε} 6.80
A15	GLN	7.56	3.96	2.00	H^{γ} 2.43, 2.38, $H^{\varepsilon 2}$ 7.48, 6.94
A16	LEU	8.15	4.17	1.88, 1.68	H^{γ} 1.70, H^{δ} 0.87, 0.82
A17	GLU	8.08	4.14	2.10, 2.00	H^{γ} 2.29, 2.57
A18	ASN	7.43	4.44	2.57, 2.49	$H^{\delta 2}$ 6.51, 7.13
A19	TYR	7.89	4.49	3.00, 3.31	H^{δ} 7.30, H^{ε} 6.74
A20	CYS	7.48	4.65	3.24, 2.86	
A21	ASN	8.15	4.73	2.86, 2.82	$H^{\delta 2}$ 7.53, 6.87
B1	PHE		4.25	3.15	H^{δ} 7.20, H^{ε} 7.34, H^{ζ} 7.27
B2	VAL	8.15	4.11	1.89	H^{γ} 0.84
B3	ASN	8.48	4.71	2.71	$H^{\delta 2}$ 7.53, 6.91
B4	GLN	8.43	4.48	2.10, 1.90	H^{γ} 2.25, 2.14, $H^{\varepsilon 2}$ 7.34, 6.80
B5	HIS	8.62	4.43	3.25, 3.54	$H^{\delta 2}$ 7.39, $H^{\varepsilon 1}$ 8.57
B6	LEU	8.98	4.51	1.76	H^{γ} 1.59, H^{δ} 0.89, 0.72
B7	CYS	8.32	4.98	3.21, 2.94	
B8	GLY	9.28	3.99, 3.83		
B9	SER	9.07	4.11	3.88	
B10	HIS	8.01	4.52	3.59, 3.31	$H^{\delta 2}$ 7.46, $H^{\varepsilon 1}$ 8.67
B11	LEU	7.09	4.03	1.91, 1.24	H^{γ} 1.38, H^{δ} 0.82, 0.77
B12	VAL	7.22	3.42	2.03	H^{γ} 0.87, 0.95
B13	GLU	7.97	4.10	2.17, 2.09	H^{γ} 2.54
B14	ALA	7.84	4.11	1.51	
B15	LEU	8.16	4.02	1.70, 1.49	H^{γ} 1.64, H^{δ} 0.77, 0.72
B16	TYR	8.10	4.16	3.12	H^{δ} 7.06, H^{ε} 6.73
B17	LEU	7.90	4.09	1.91, 1.66	H^{γ} 1.81, H^{δ} 0.92, 0.91
B18	VAL	8.51	3.89	2.15	H^{γ} 1.03, 0.90
B19	CYS	8.73	4.71	3.19, 2.92	
B20	GLY	7.77	3.93, 3.90		
B21	GLU	7.93	4.27	2.04, 2.14	H^{γ} 2.51, 2.44
B22	ARG	7.91	4.24	1.92, 1.83	H^{γ} 1.66, 1.70, H^{δ} 3.19, H^{ε} 7.22
B23	GLY	8.14	3.87		
B24	HIS	8.09	4.64	3.13, 3.04	$H^{\delta 2}$ 7.10, $H^{\varepsilon 1}$ 8.56
B25	PHE	8.08	4.62	3.06, 2.92	H^{δ} 7.14, H^{ε} 7.26, H^{ζ} 7.22
B26	TYR	8.08	4.61	2.91	H^{δ} 7.03, H^{ε} 6.74
B27	THR	7.94	4.52	4.04	H^{γ} 1.18
B28	PRO		4.36	2.28, 1.99	H^{γ} 1.92, H^{δ} 3.63
B29	LYS	8.28	4.38	1.86, 1.77	H^{γ} 1.47, H^{δ} 1.68, H^{ε} 3.00
B30	THR	8.06	4.45	4.38	H^{γ} 1.16

Table S3. ^{1}H chemical shifts for [D-HisB24]-insulin at pH 1.9 (25°C) (pdb code 2m2o).

	Residue	H^N	H^α	H^β	Others
A1	GLY		4.04		
A2	ILE	8.53	3.92	1.19	$H^{\gamma1}$ 0.98, $H^{\gamma2}$ 0.80, $H^{\delta1}$ 0.69
A3	VAL	8.12	3.65	1.96	H^γ 0.95, 0.90
A4	GLU	8.29	4.24	2.12	H^γ 2.53
A5	GLN	8.28	4.10	2.15, 2.08	H^γ 2.51, 2.44, $H^{\varepsilon2}$ 7.57, 6.92
A6	CYS	8.31	4.94	3.36, 2.92	
A7	CYS	8.31	4.88	3.81, 3.35	
A8	THR	8.24	4.10	4.44	H^γ 1.27
A9	SER	7.45	4.79	4.07, 3.91	
A10	ILE	7.83	4.41	1.58	$H^{\gamma1}$ 1.12, 0.48, $H^{\gamma2}$ 0.67, $H^{\delta1}$ 0.55
A11	CYS	9.66	4.95	3.35, 3.20	
A12	SER	8.78	4.62	4.33, 4.03	
A13	LEU	8.66	3.91	1.39	H^γ 1.46, H^δ 0.83, 0.77
A14	TYR	7.52	4.19	3.01, 2.93	H^δ 7.07, H^ε 6.85
A15	GLN	7.59	4.01	2.41, 2.04	H^γ 2.47, 2.42, $H^{\varepsilon2}$ 7.51, 6.97
A16	LEU	8.17	4.21	1.92, 1.70	H^γ 1.75, H^δ 0.91, 0.85
A17	GLU	8.11	4.18	2.14, 2.02	H^γ 2.61, 2.33
A18	ASN	7.48	4.49	2.62, 2.54	$H^{\delta2}$ 6.55, 7.17
A19	TYR	7.93	4.53	3.04, 3.34	H^δ 7.34, H^ε 6.78
A20	CYS	7.52	4.70	3.29, 2.89	
A21	ASN	8.16	4.77	2.90, 2.84	$H^{\delta2}$ 6.89, 7.53
B1	PHE		4.30	3.19	H^δ 7.25, H^ε 7.38, H^ζ 7.32
B2	VAL	8.19	4.15	1.94	H^γ 0.88
B3	ASN	8.49	4.75	2.76	$H^{\delta2}$ 6.94, 7.57
B4	GLN	8.45	4.51	2.14, 1.92	H^γ 2.29, 2.20, $H^{\varepsilon2}$ 7.38, 6.82
B5	HIS	8.64	4.49	3.28, 3.58	$H^{\delta2}$ 7.43, $H^{\varepsilon1}$ 8.60
B6	LEU	8.99	4.55	1.79, 0.97	H^γ 1.63, H^δ 0.92, 0.76
B7	CYS	8.35	5.00	3.25, 2.98	
B8	GLY	9.27	4.03, 3.87		
B9	SER	9.08	4.16	3.92	
B10	HIS	8.05	4.56	3.62, 3.34	$H^{\delta2}$ 7.50, $H^{\varepsilon1}$ 8.72
B11	LEU	7.15	4.08	1.95, 1.30	H^γ 1.42, H^δ 0.86, 0.81
B12	VAL	7.27	3.47	2.08	H^γ 0.99, 0.91
B13	GLU	8.00	4.13	2.20, 2.13	H^γ 2.57
B14	ALA	7.86	4.15	1.54	
B15	LEU	8.20	4.05	1.74, 1.49	H^γ 1.68, H^δ 0.80, 0.75
B16	TYR	8.14	4.18	3.15	H^δ 7.09, H^ε 6.76
B17	LEU	7.92	4.12	1.94, 1.69	H^γ 1.84, H^δ 0.94
B18	VAL	8.53	3.93	2.19	H^γ 1.07, 0.94
B19	CYS	8.75	4.74	3.24, 2.93	
B20	GLY	7.83	3.91		
B21	GLU	8.02	4.32	2.16, 2.09	H^γ 2.56, 2.47
B22	ARG	8.02	4.29	1.96, 1.87	H^γ 1.74, 1.67, H^δ 3.22, H^ε 7.24
B23	GLY	8.11	3.93		
B24	D-HIS	8.03	4.62	3.13, 3.01	$H^{\delta2}$ 7.11, $H^{\varepsilon1}$ 8.57
B25	PHE	8.21	4.66	2.88, 3.10	H^δ 7.16, H^ε 7.28, H^ζ 7.25
B26	TYR	8.12	4.64	2.96	H^δ 7.07, H^ε 6.78
B27	THR	7.94	4.56	4.08	H^γ 1.22
B28	PRO		4.40	2.31, 1.96	H^γ 2.03, 1.96, H^δ 3.67
B29	LYS	8.30	4.42	1.90, 1.80	H^γ 1.51, H^δ 1.72, H^ε 3.04
B30	THR	8.08	4.49	4.42	H^γ 1.20

Table S4. ^{1}H chemical shifts for [HisB24]-insulin at pH 8.0 (25°C) (pdb code 2m2n).

	Residue	H^{N}	H^{α}	H^{β}	Others
A1	GLY				
A2	ILE		3.96	1.20	$H^{\gamma 2}$ 0.71, H^{δ} 0.59
A3	VAL	8.23	3.71	1.99	H^{γ} 0.97, 0.91
A4	GLU	8.44	4.21	2.14, 2.07	H^{γ} 2.48, 2.29, $H^{\gamma 1}$ 0.94
A5	GLN		4.13		
A6	CYS	8.39	5.09	3.42, 2.89	
A7	CYS	8.27	4.88	3.76, 3.32	
A8	THR		4.15	4.45	H^{γ} 1.27
A9	SER		4.72	3.97, 3.86	
A10	ILE	7.89	4.24	1.60	$H^{\gamma 1}$ 1.10, 0.45, $H^{\gamma 2}$ 0.69, H^{δ} 0.51
A11	CYS				
A12	SER	8.64	4.63	4.20, 4.03	
A13	LEU	8.76	3.95	1.52	H^{γ} 1.60, H^{δ} 0.89, 0.83
A14	TYR	7.68	4.36	3.03	H^{δ} 7.15, H^{ε} 6.88
A15	GLN	7.53	3.99	2.24, 2.07	H^{γ} 2.42, 2.36, $H^{\varepsilon 2}$ 7.55, 7.01
A16	LEU	7.92	4.17	2.01, 1.46	H^{γ} 1.79, H^{δ} 0.82, 0.78
A17	GLU	8.10	4.24	2.05, 2.02	H^{γ} 2.22, 2.15
A18	ASN	7.37	4.51	2.62, 2.56	$H^{\delta 2}$ 6.61, 7.24
A19	TYR	7.97	4.38	3.20, 2.92	H^{δ} 7.18, H^{ε} 6.79
A20	CYS	7.43	5.07	3.35, 2.88	
A21	ASN	8.10	4.52	2.81, 2.66	$H^{\delta 2}$ 6.49, 7.49
B1	PHE		3.87	3.05, 3.00	H^{δ} 7.18, H^{ε} 7.30, H^{ζ} 7.25
B2	VAL		4.02	1.94	H^{γ} 0.82
B3	ASN		4.56	2.84, 2.76	$H^{\delta 2}$ 6.87, 7.57
B4	GLN		4.51	2.08, 1.95	H^{γ} 2.23, 2.15, $H^{\varepsilon 2}$ 7.40, 6.83
B5	HIS	8.45	4.38	3.08, 3.44	$H^{\delta 2}$ 6.90, $H^{\varepsilon 1}$ 7.78
B6	LEU	8.96	4.56	1.78, 0.87	H^{γ} 1.66, H^{δ} 0.91, 0.77
B7	CYS	8.49	4.98	3.26, 3.02	
B8	GLY				
B9	SER				
B10	HIS	7.91	4.51	3.39, 3.23	$H^{\delta 2}$ 7.21, $H^{\varepsilon 1}$ 7.86
B11	LEU	7.07	4.01	1.82, 1.22	H^{δ} 0.68, 0.59
B12	VAL	7.16	3.33	2.19	H^{γ} 1.01
B13	GLU	7.96	4.14	2.15	H^{γ} 2.49, 2.35
B14	ALA	7.78	4.08	1.43	
B15	LEU	8.11	3.88	1.34, 0.79	H^{γ} 1.48, H^{δ} 0.39, 0.68
B16	TYR	8.09	4.45	3.23	H^{δ} 7.29, H^{ε} 6.85
B17	LEU	7.64	4.12	1.96, 1.75	H^{γ} 1.83, H^{δ} 0.98, 0.95
B18	VAL	8.38	3.79	2.03	H^{γ} 1.01, 0.89
B19	CYS	8.71	4.78	3.27, 2.89	
B20	GLY	7.78	4.00, 3.86		
B21	GLU		4.21	2.07, 2.22	H^{γ} 2.41
B22	ARG	8.11	4.23	2.15, 2.05	H^{γ} 1.87, H^{δ} 3.33, 3.38
B23	GLY	7.49	3.92, 4.14		
B24	HIS	7.99	5.12	3.18, 3.12	$H^{\delta 2}$ 6.57, $H^{\varepsilon 1}$ 7.64
B25	PHE	8.32	4.85	3.32, 3.06	H^{δ} 7.17, H^{ε} 7.33
B26	TYR	7.64	4.63	3.08, 2.73	H^{δ} 6.89, H^{ε} 6.69
B27	THR	7.67	4.44	4.04	H^{γ} 1.17
B28	PRO		4.33	2.28, 2.04	H^{γ} 1.94, H^{δ} 3.53, 3.67
B29	LYS	8.43	4.40	1.92, 1.81	H^{γ} 1.51, H^{δ} 1.72, H^{ε} 3.03
B30	THR	7.83	4.19	4.28	H^{γ} 1.19

Table S5. ^{1}H chemical shifts for [D-HisB24]-insulin at pH 8.0 (25°C) (pdb code 2m2p).

	Residue	H^N	H^α	H^β	Others
A1	GLY				
A2	ILE				$H^{\gamma 1}$ 1.26, 1.02, $H^{\gamma 2}$ 0.81, $H^{\delta 2}$ 0.72
A3	VAL	8.24	3.74	1.99	H^γ 0.94, 0.92
A4	GLU	8.42	4.21	2.10, 1.99	H^γ 2.44, 2.29
A5	GLN				
A6	CYS		5.13	3.46, 2.92	
A7	CYS		4.90	3.72, 3.32	
A8	THR		4.22	4.47	H^γ 1.28
A9	SER		4.70	3.97, 3.87	
A10	ILE	7.90	4.22	1.65	$H^{\gamma 1}$ 1.16, $H^{\gamma 2}$ 0.71, $H^{\delta 2}$ 0.56
A11	CYS			3.27	
A12	SER	8.62	4.63	4.19, 4.03	
A13	LEU	8.71	4.00	1.53	H^γ 1.61
A14	TYR	7.74	4.39	3.04	H^δ 7.15, H^ε 6.89
A15	GLN	7.61	4.02	2.26, 2.08	H^γ 2.43, 2.36, $H^\varepsilon 2$ 7.01, 7.56
A16	LEU	7.97	4.22	2.00, 1.52	H^γ 1.81
A17	GLU	8.23	4.14	2.09, 1.98	H^γ 2.43, 2.19
A18	ASN	7.50	4.52	2.59	$H^{\delta 2}$ 6.64, 7.25
A19	TYR	8.00	4.58	3.35, 3.03	H^δ 7.31, H^ε 6.81
A20	CYS	7.61		3.35, 2.93	
A21	ASN	7.99	4.53	2.80, 2.64	$H^{\delta 2}$ 6.74, 7.36
B1	PHE		3.84	3.04, 2.99	H^δ 7.19, H^ε 7.32
B2	VAL		4.04	1.96	H^γ 0.85
B3	ASN		4.59	2.79, 2.86	$H^{\delta 2}$ 7.59
B4	GLN		4.48	2.08, 1.96	H^γ 2.25, 2.18, $H^\varepsilon 2$ 7.42
B5	HIS		4.42	3.39, 3.08	$H^{\delta 2}$ 6.89, $H^{\varepsilon 1}$ 7.71
B6	LEU		4.57	1.78, 1.64	H^γ 1.65, H^δ 0.93, 0.80
B7	CYS	8.52	4.96	3.27, 3.03	
B8	GLY				
B9	SER				
B10	HIS		4.52	3.36, 3.22	$H^{\delta 2}$ 7.18, $H^{\varepsilon 1}$ 7.82
B11	LEU	7.16	4.10	1.84, 1.38	H^γ 1.41, H^δ 0.86, 0.80
B12	VAL	7.19	3.46	2.15	H^γ 1.01, 0.98
B13	GLU	8.01	4.09	2.13	H^γ 2.46, 2.33
B14	ALA	7.79	4.13	1.45	
B15	LEU	8.24	3.97	1.59, 1.14	H^γ 1.61, H^δ 0.75, 0.61
B16	TYR	8.08	4.25	3.13	H^δ 7.12, H^ε 6.78
B17	LEU	7.68	4.18	1.94, 1.76	H^γ 1.80
B18	VAL	8.34	3.89	2.09	H^γ 1.04, 0.94
B19	CYS	8.73	4.85	3.35, 2.89	
B20	GLY	7.90	4.03, 3.86		
B21	GLU		4.31	2.17, 2.03	H^γ 2.36, 2.29
B22	ARG	8.07	4.38	2.09, 1.87	H^γ 1.74, 1.70, H^δ 3.25
B23	GLY	8.18	3.92		
B24	D-HIS		4.59	2.97, 2.85	$H^{\delta 2}$ 6.88, $H^{\varepsilon 1}$ 7.73
B25	PHE		4.72	3.06, 2.91	H^δ 7.07, H^ε 7.20
B26	TYR	8.31	4.65	2.99	H^δ 7.10, H^ε 6.82
B27	THR	8.00	4.53	4.07	H^γ 1.22
B28	PRO		4.40	2.32, 2.05	H^γ 1.95, H^δ 3.69
B29	LYS	8.48	4.43	1.94, 1.82	H^γ 1.53, H^δ 1.73, H^ε 3.05
B30	THR	7.83	4.20	4.29	H^γ 1.20

Table S6. NMR constraints and structural statistics for the analogues at pH 1.9 and pH 8.0.

	[L-HisB24]		[D-HisB24]	
	pH 1.9	pH 8.0	pH 1.9	pH 8.0
Non-redundant distance constrains	868	766	797	424
Intraresidue NOEs	223	186	225	130
Sequential NOEs (i, i+1)	272	194	238	102
Medium-range NOEs (i,i>1 i≤4)	222	175	191	89
Long-range NOEs (i, i ≥5)	151	211	143	103
Constrains per residue	17.0	15.0	15.6	8.3
Average number of distance constraints violations				
0.0 Å to 0.1 Å	12.5±3.3	8.3±2.9	7.2±2.4	3.0±1.9
0.1 Å to 0.2 Å	11.8±2.4	5.6±2.3	6.0±2.4	2.8±1.2
0.2 Å to 0.3 Å	0.5±0.8	0.4±0.6	0.8±0.8	0.03±0.18
> 0.3 Å	0.1±0.3	0.1±0.3	0.3±0.5	0
r.m.s.d. (Å)	0.0094±0.0001	0.0095±0.0002	0.0094±0.0001	0.0099±0.0001
Average AMBER energy (kcal.mol^{-1})	-1546.7±8.5	-1405.2±5.3	-1675.0±12.7	-1677.0±16.9
Residues within allowed regions of the Ramachandran plot				
Backbone atom r.m.s.d.	0.50±0.14	0.95±0.23	0.95±0.20	1.43±0.28
Heavy atom r.m.s.d.	0.94±0.13	1.53±0.25	1.44±0.22	2.13±0.35

Table S7. Differences in ^{1}H chemical shift values of H^{N} and H^{α} between [HisB24]-insulin and [D-HisB24]-insulin.

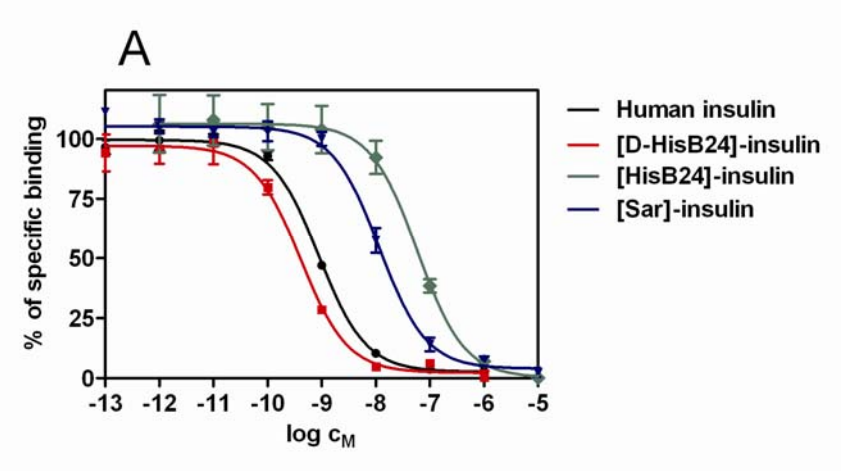
		pH 1.9		pH 8.0	
	Residue	ΔH^{N}	ΔH^{α}	ΔH^{N}	ΔH^{α}
A1	GLY		-0.04		
A2	ILE	-0.02	-0.06		
A3	VAL	-0.03	-0.05	-0.01	-0.03
A4	GLU	-0.01	-0.04	0.02	0.00
A5	GLN	-0.01	-0.04		
A6	CYS	-0.04	-0.02		-0.04
A7	CYS	-0.04	-0.03		-0.02
A8	THR	-0.01	-0.05		-0.07
A9	SER	-0.06	-0.03		0.02
A10	ILE	-0.04	-0.04	-0.01	0.02
A11	CYS	0.02	-0.03		
A12	SER	-0.03	-0.04	0.02	0.00
A13	LEU	-0.03	-0.06	0.05	-0.05
A14	TYR	-0.03	-0.05	-0.06	-0.03
A15	GLN	-0.03	-0.04	-0.08	-0.03
A16	LEU	-0.02	-0.04	-0.05	-0.05
A17	GLU	-0.03	-0.04	-0.13	0.10
A18	ASN	-0.05	-0.05	-0.13	-0.01
A19	TYR	-0.04	-0.04	-0.03	-0.20
A20	CYS	-0.04	-0.05	-0.18	
A21	ASN	-0.01	-0.04	0.11	-0.01
B1	PHE		-0.05		0.03
B2	VAL	-0.04	-0.04		-0.02
B3	ASN	-0.01	-0.04		-0.03
B4	GLN	-0.02	-0.03		0.03
B5	HIS	-0.02	-0.06		-0.04
B6	LEU	-0.01	-0.04		-0.01
B7	CYS	-0.03	-0.02	-0.03	0.02
B8	GLY	0.01	-0.04		
B9	SER	-0.01	-0.04		
B10	HIS	-0.04	-0.04		-0.01
B11	LEU	-0.06	-0.04	-0.09	-0.09
B12	VAL	-0.05	-0.05	-0.03	-0.13
B13	GLU	-0.03	-0.03	-0.05	0.05
B14	ALA	-0.02	-0.03	-0.01	-0.05
B15	LEU	-0.04	-0.03	-0.13	-0.09
B16	TYR	-0.04	-0.02	0.01	0.20
B17	LEU	-0.01	-0.03	-0.04	-0.06
B18	VAL	-0.02	-0.04	0.04	-0.10
B19	CYS	-0.02	-0.03	-0.02	-0.07
B20	GLY	-0.06		-0.12	
B21	GLU	-0.09	-0.05		-0.10
B22	ARG	-0.11	-0.05	0.04	-0.15
B23	GLY	0.03	-0.06	-0.69	
B24	HIS	0.06	0.02		0.53
B25	PHE	-0.13	-0.04		0.13
B26	TYR	-0.04	-0.03	-0.67	-0.02
B27	THR	0.00	-0.04	-0.33	-0.09
B28	PRO		-0.04		-0.07
B29	LYS	-0.02	-0.04	-0.05	-0.03
B30	THR	-0.02	-0.04	0.00	-0.01

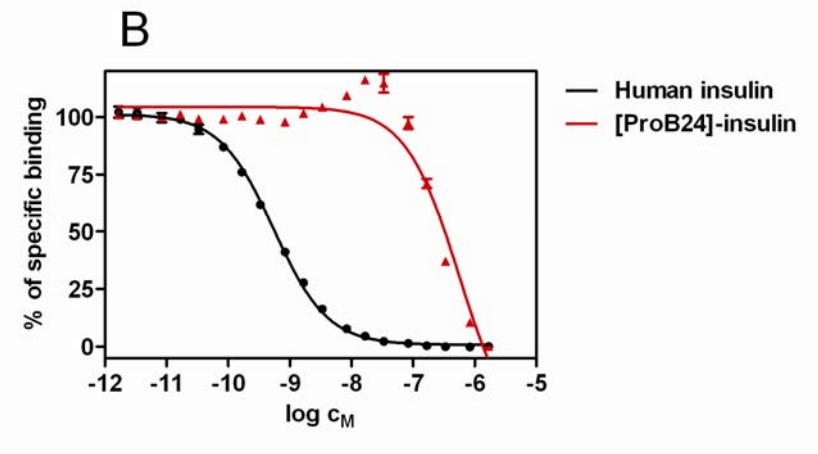
Table S8. List of insulin receptor binding affinities or biological potencies and main structural features of the C-terminus of the B-chain in several previously published structures of insulin analogues modified at the position B24.

Analogue	Relative binding affinity or biological potency [%]	References	Main structural features of the C-terminus of the B-chain	References
Human insulin	100			
[LeuB24]-insulin	10-50	(5-11)		
[SerB24]-insulin	7-15	(12, 13)	NMR in 20% deuterioacetic acid, pH 1.9 (pdb code 1hiq): Less ordered than human insulin but retains nearly native structure.	(14)
[AlaB24]-insulin	0.1-5	(11, 15-17)		
[AlaB24,LysB28,ProB29]-insulin	3.6	(18)	NMR (pdb code 2k91): Nearly native structure.	(18)
[AibB24]-insulin	0.3	(17)		
[D-ProB24]-insulin	1.3	(17)		
[D-AlaB24]-insulin	150	(17)		
[D-AlaB24, LysB28,ProB29]-insulin	199	(18)	NMR (pdb code 2k9r): Disordered at B21-B30.	(18)
[D-PheB24]-insulin	140-180	(12, 17)		
[D-Phe(p-ethyl)B24]-insulin	86	(19)		
[GlyB24]-insulin	22-78	(12, 17, 20)	NMR in 20% deuterioacetic acid, pH 1.9 (pdb code 1hit): Disordered at B21-B30.	(21, 22)
[GlyB24,GluB16,*des*B30]-insulin	14.9	(23)	NMR in aqueous solution, pH 8.0 (pdb code 1a7f): Nearly native structure. Phe B25 fits into the pocket normally occupied by PheB24.	(23)

[GlyB24,AspB10,LysB28,ProB29]-insulin	50	(12)
[NMePheB24]-insulin	3	(24)
[D-PheB24,AspB10,LysB28,ProB29]-insulin	330	(12)
[SerB24,AspB10,LysB28,ProB29]-insulin	14	(12)
[D-TyrB24,PheB26]-insulin	163	(25)
[TyrB24,PheB26]-insulin	2	(25)

Figure S1. Inhibition of binding of human [^{125}I]-insulin to adipose plasma membranes (panels A and C) or IM-9 plasma mebranes (panel B) by human insulin and insulin analogues.





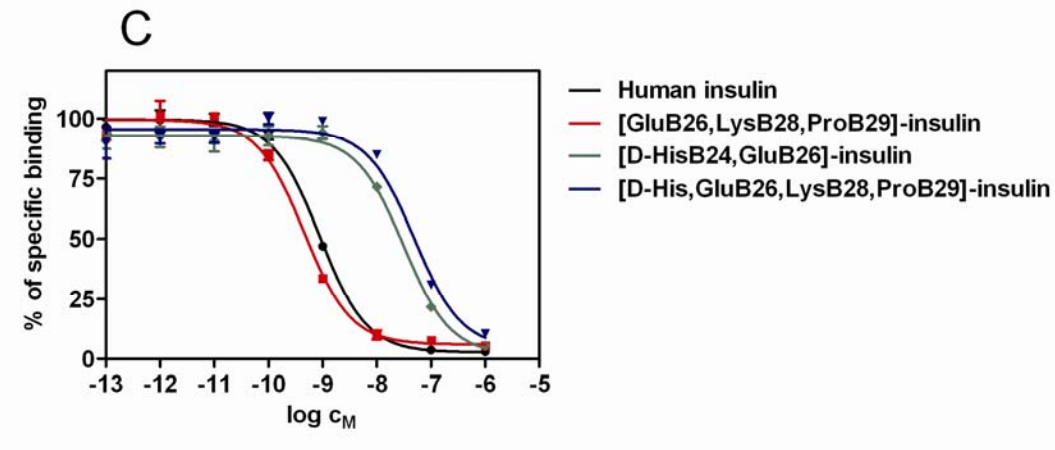


Figure S2. Comparison of the overall fold of the X-ray structure of the [HisB24]-insulin (coral) with wild-type insulin (white, pdb 1mso) (1); the B-chain in the analogue can be traced only to C^{α} atom of the B21 site.

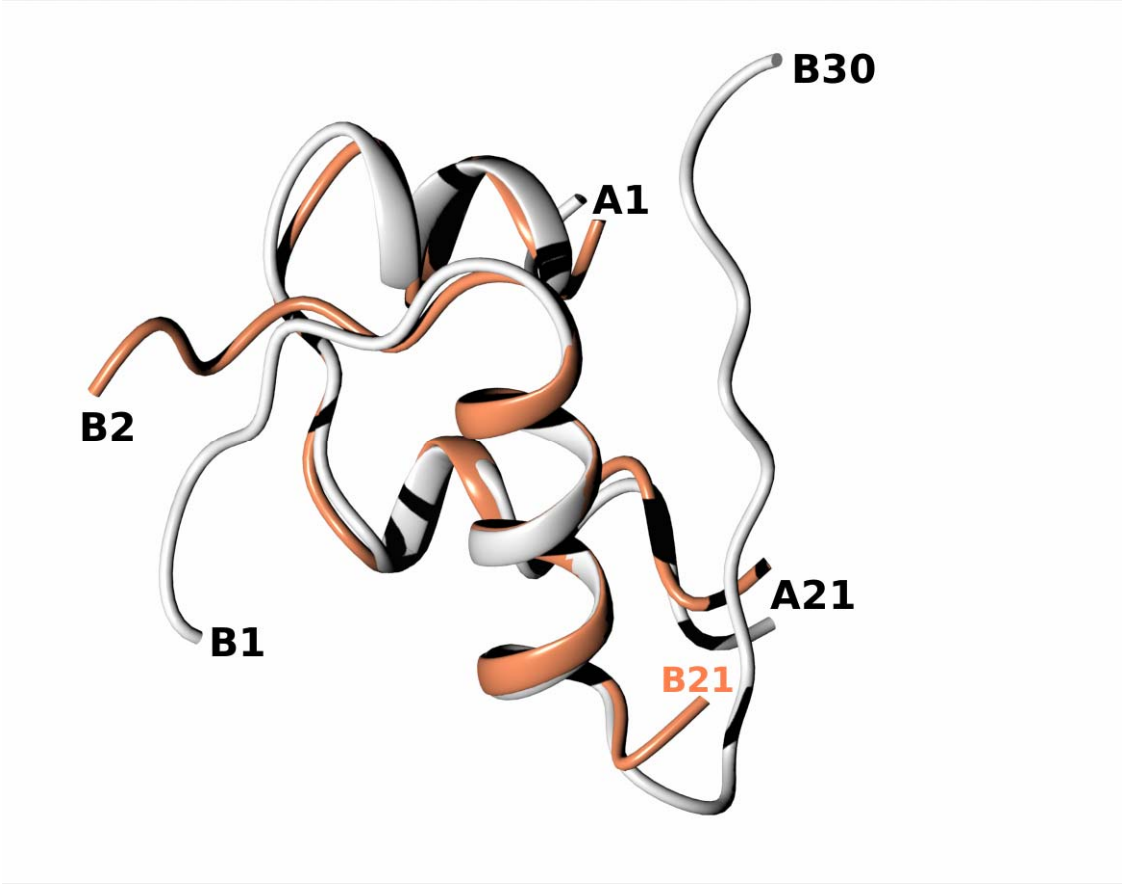


Figure S3. An overlay of the B-chain of human insulin (pdb code 1mso, in grey) (1) with the B-chain of [D-HisB24]-insulin (in coral, representative NMR structure at pH 8.0) analogue. In addition to the positions of Phe/HisB24, PheB25 and TyrB26 side chains, the uncovered ValB12 and LeuB15 that are involved in the van der Waals interactions with B16 and B24/B25 side chains respectively are also shown.

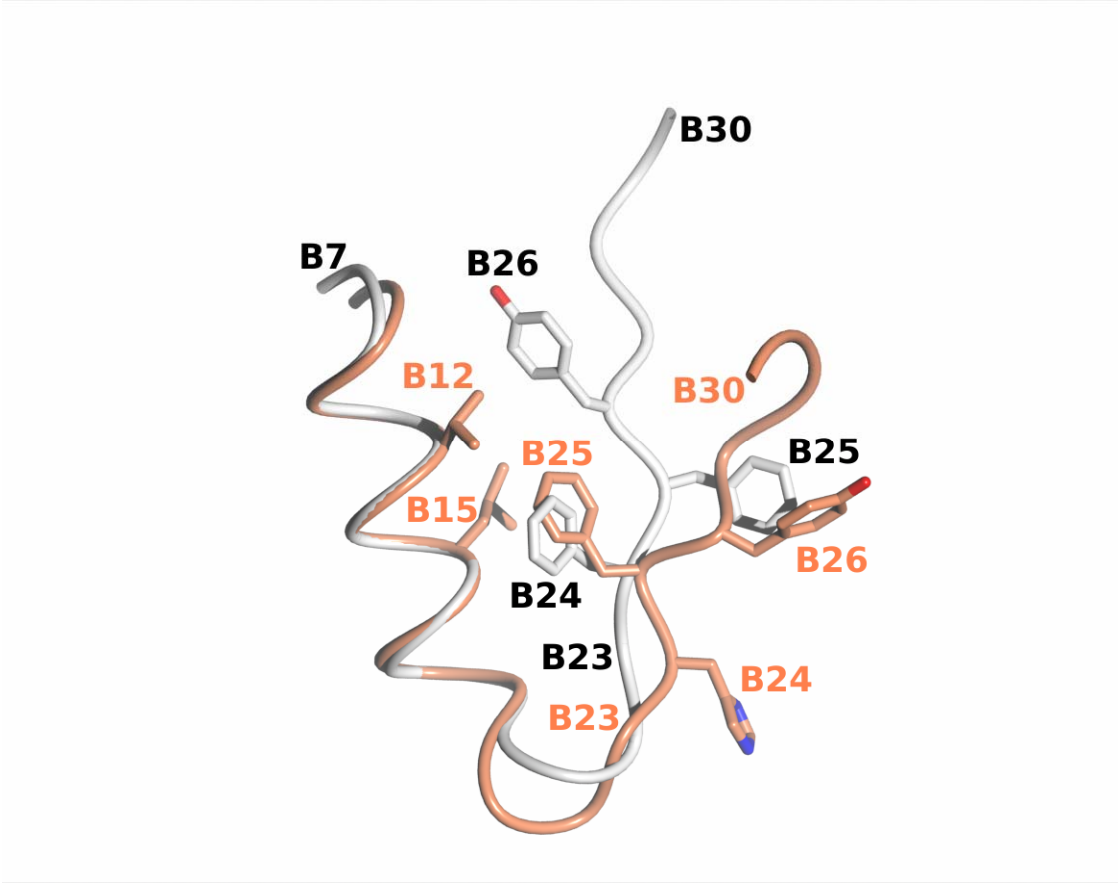


Figure S4. The evolution of distances between C^{α} atoms of selected residues ($B24C^{\alpha}$-$B15C^{\alpha}$ in black, $B25C^{\alpha}$-$B15C^{\alpha}$ in red, $B26C^{\alpha}$-$B12C^{\alpha}$ in blue, $B27C^{\alpha}$-$B11C^{\alpha}$ in green and $B28C^{\alpha}$-$B8C^{\alpha}$ in yellow) in monomers A-B (panel A) and C-D (panel B) of human insulin (pdb structure 1mso) (1) during the time course of 50 ns molecular dynamis simulation runs.

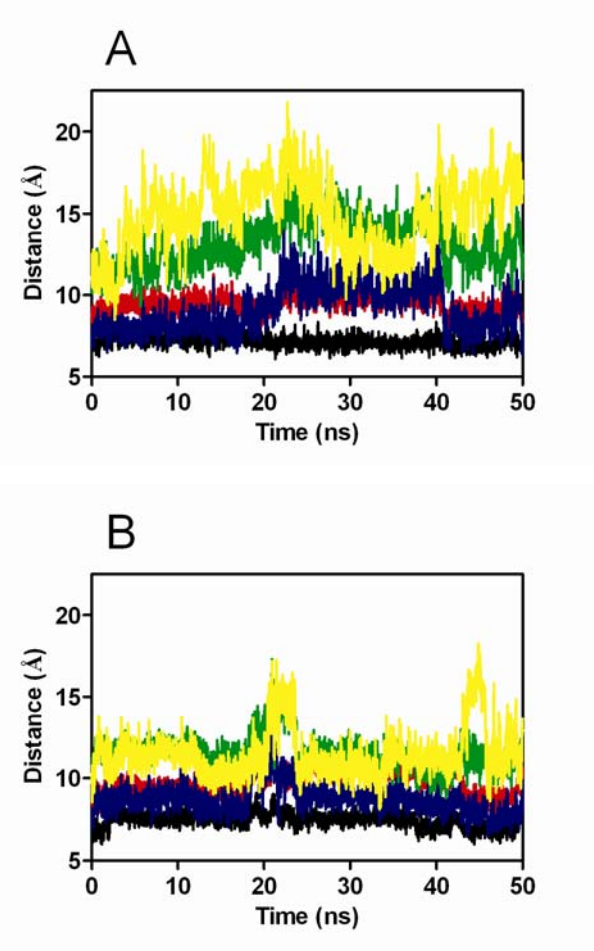
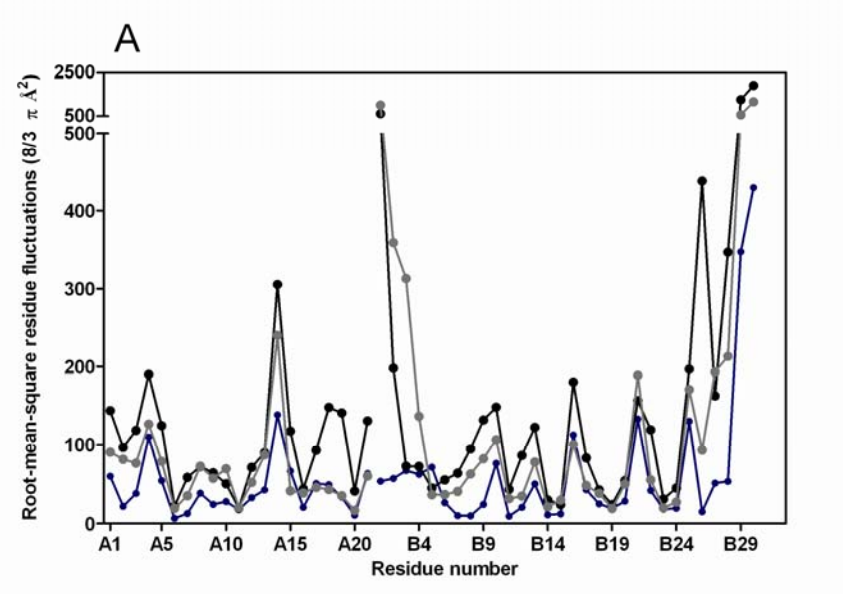
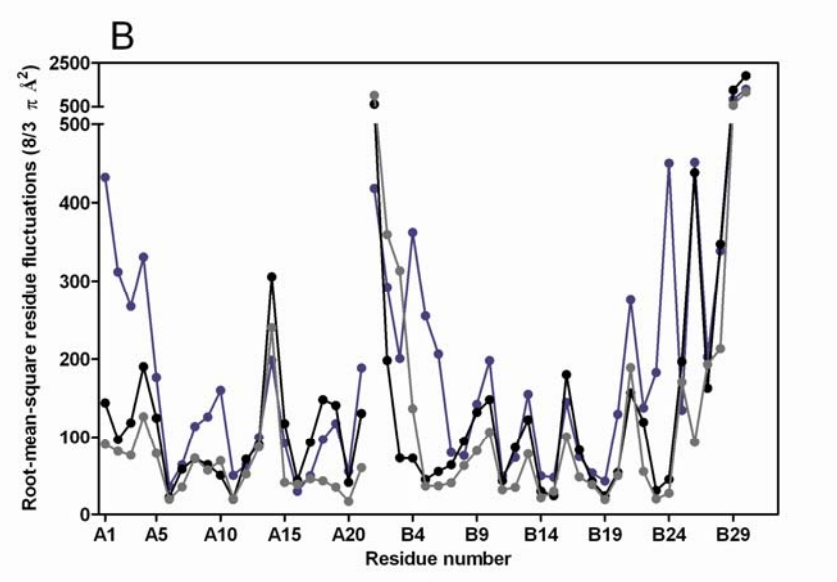


Figure S5. Positional fluctuations of residues in [HisB24]-insulin (in blue, panel A) and [D-HisB24]-insulin (in blue, panel B) compared with fluctuations in monomers A-B (in black) and C-D (in grey) of human insulin (pdb structure 1mso) (1) over 50 ns of molecular dynamics simulation runs.





REFERENCES

1. Smith, G. D., Pangborn, W. A., and Blessing, R. H. (2003) *Acta Crystallogr. D* **59**, 474-482
2. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006) *Proteins* **65**, 712-725
3. Word, J. M., Lovell, S. C., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1999) *J. Mol. Biol.* **285**, 1735-1747
4. Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham III, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B. P., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossvai, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M. J., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., and Kollman, P. A. (2010) AMBER 11. University of California, San Francisco
5. Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kanaya, T., Kobayashi, M., and Shigeta, Y. (1981) *Experientia* **37**, 811-813
6. Wollmer, A., Strassburger, W., Glatter, U., Dodson, G. G., McCall, M., Gattner, H. G., Danho, W., Brandenburg, D., and Rittel, W. (1981) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362**, 581-591
7. Tager, H., Thomas, N., Assoian, R., Rubenstein, A., Saekow, M., Olefsky, J., and Kaiser, E. T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 3181-3185
8. Gattner, H. G., Danho, W., Behn, C., and Zahn, H. (1980) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1135-1138
9. Inouye, K., Watanabe, K., Tochino, Y., Kobayashi, M., and Shigeta, Y. (1981) *Biopolymers* **20**, 1845-1858
10. Keefer, L. M., Piron, M. A., De Meyts, P., Gattner, H. G., Diaconescu, C., Saunders, D., and Brandenburg, D. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1229-1236
11. Assoian, R. K., Thomas, N. E., Kaiser, E. T., and Tager, H. S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5147-5151
12. Shoelson, S. E., Lu, Z. X., Parlautan, L., Lynch, C. S., and Weiss, M. A. (1992) *Biochemistry* **31**, 1757-1767
13. Shoelson, S., Fickova, M., Haneda, M., Nahum, A., Musso, G., Kaiser, E. T., Rubenstein, A. H., and Tager, H. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 7390-7394
14. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Inouye, K., and Weiss, M. A. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90,** 582-586
15. Kristensen, C., Kjeldsen, T., Wiberg, F. C., Schaffer, L., Hach, M., Havelund, S., Bass, J., Steiner, D. F., and Andersen, A. S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12978-12983
16. Chen, H., Shi, M., Guo, Z. Y., Tang, Y. H., Qiao, Z. S., Liang, Z. H., and Feng, Y. M. (2000) *Protein Eng.* **13**, 779-782
17. Mirmira, R. G. and Tager, H. S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6349-6354
18. Hua, Q. X., Xu, B., Huang, K., Hu, S. Q., Nakagawa, S., Jia, W. H., Wang, S., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., and Weiss, M. A. (2009) *J. Biol. Chem* **284**, 14586-14596
19. Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H. G., Jiracek, J., Velek, J., Blaha, I., Ubik, K., Kasicka, V., and Pospisek, J. (1994) *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **375**, 373-378
20. Nakagawa, S. H. and Tager, H. S. (1993) *Biochemistry* **32**, 7237-7243
21. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Kochoyan, M., and Weiss, M. A. (1991) *Nature* **354**, 238-241
22. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., and Weiss, M. A. (1992) *Biochemistry* **31**, 11940-11951
23. Ludvigsen, S., Olsen, H. B., and Kaarsholm, N. C. (1998) *J. Mol. Biol.* **279**, 1-7
24. Antolikova, E., Zakova, L., Turkenburg, J. P., Watson, C. J., Hanclova, I., Sanda, M., Cooper, A., Kraus, T., Brzozowski, A. M., and Jiracek, J. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 36968-36977
25. Mirmira, R. G., Nakagawa, S. H., and Tager, H. S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1428-1436