

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Charles University, Faculty of Science
Department of Biochemistry

Doktorský studijní program: Biochemie
Doctoral study programme: Biochemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of Doctoral thesis



Příprava a charakterizace selektivních analogů insulin a IGF-2 pro obě isoformy insulinového
receptoru a IGF-1 receptoru

The preparation and characterisation of analogues of insulin and IGF-2 selective for both
isoforms of insulin receptor and IGF-1 receptor

Mgr. Květoslava Mlčochová

Školitel/Supervisor: RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

Praha, 29. 09. 2019

ABSTRAKT

Insulin a insulinu podobné růstové faktory 1 (IGF-1) a 2 (IGF-2) jsou příbuzné proteinové hormony s rozdílnými, avšak překrývajícími se biologickými funkcemi. Všechny tři hormony interagují, i když s různou afinitou, s receptory, patřící do systému insulinu-IGF (insulinové receptory A a B (IR-A, B), IGF-1 receptor (IGF-1R)). Právě rozdílná schopnost interakce s jednotlivými receptory je jeden z hlavních nástrojů regulace tohoto systému, který je nezbytný pro správné fungování organismu.

Ačkoli aminokyseliny, které se přímo účastní interakce s receptory, se nacházejí zejména v doménách A a B, domény C a D mají patrně určitou úlohu ve vazebné specificitě. V rámci tohoto projektu jsme se nejprve zaměřili na vliv domén D z molekul IGF-1 a 2 (D₁ a D₂) a domény C z IGF-2 (C₂). Abychom mohli sledovat vliv domén C a D, připravili jsme insulinové analogy s celými nebo částmi jednotlivých domén tak, aby uspořádání odpovídalo přirozené pozici v molekule IGF. U takto připravených analogů byly studovány vazebné afinity a jejich schopnost aktivovat receptor. Výsledky odhalily, že úvodní část domény D₁ má ničivý účinek na afinitu k IR. Tento účinek je pouze mírně zvýrazněn přítomností zbytku domény (D₁). Doména D₂ nemá téměř žádný účinek na afinitu k IR. Dále bylo zjištěno, že přidání aminokyselin odvozených z domény C₂ na C-konec řetězce B vede ke zvýšení afinity a schopnosti aktivovat IR-B. Toto nečekané zjištění otevírá nové možnosti zvýšení specificity vůči isoformě B IR.

Abychom byli schopni připravovat nové analogy IGF-2, vyvinuli jsme novou jednoduchou metodu přípravy IGF-2 a jeho analogů. První soubor analogů IGF-2 obsahoval unikátní mutace v rámci domén B a C, které byly odvozeny z IGF-1 (tj. Asn29, Gly30-Ser31 a Pro35-Gln36). Takto změněné analogy vykazovaly významně sníženou afinitu k IR-A, přičemž nejvýznamnější snížení bylo pozorováno u analogů s vloženou sekvencí Pro-Gln do domény C. U těchto analogů byl pomocí NMR charakterizace potvrzen posun C-smyčky společně s jejím „otevřenějším“ prostorovým uspořádáním. Kombinace insertu Pro-Gln a mutace Ser29Asn vedla k téměř 2násobnému zvýšení afinity k IGF-1R. U analogu Asn29,Ser29(Pro-Gln)-IGF-2 byla díky snížené afinitě k IR-A a současně zvýšené afinitě k IGF-1R pozorována téměř 10násobně vyšší IGF-1R/IR-A vazebná specificita v porovnání s přirozeným IGF-2.

Druhý soubor analogů byl inspirován HisA4HisA8 insulinem, který je známý pro svou disproporci ve vazebné afinitě a schopnosti aktivace IR. Systematicky jsme upravovali pozice 44, 45 a 48 v molekule IGF2, které odpovídají pozicím A4 a A8 v molekule insulinu či jsou v jejich blízkém kontaktu. U těchto analogů byla měřena vazebná afinita k IR-A a IGF-1R a schopnost jejich autofosforylace. Z původně zamýšlených analogů se podařilo připravit pouze Gln45-IGF-2, Gln45,His48-IGF-2, a His48-IGF-2. Vytvořené analogy si zachovaly původní schopnost vázat a aktivovat IGF-1R, avšak substituce His48 vedla k významně vysokým afinitám k obou isoformám IR. IGF-2 analogy obsahující His48 váží IR s doposud nejvyšší známou afinitou. U žádného z analogů nebyl pozorován výrazný nesoulad mezi vazebnou afinitou k IR-A a IGF-1R a schopností jejich aktivace. Disproporce mezi schopností vázat a aktivovat receptor je patrně omezená na interakci insulin-IR.

Nedávná CryoEM strukturní analýza vazby insulinu na IR-A odhalila detaily interakce v oblastech vazebných míst 1 a 2. Publikované výsledky ale nejsou zcela v souladu s výsledky substitučních studií, jelikož interakce v oblasti vazebného místa 2 nezahrnuje všechny doposud předpokládané aminokyseliny. Z toho důvodu jsme se v poslední fázi našeho výzkumného projektu zaměřili na „opomenuté“ aminokyseliny spadající do vazebné oblasti 2 (50, 52, 53, 57). Aminokyselina na těchto pozicích jsme zaměňovali za His a za aminokyselinu s podobnými vlastnostmi. Na základě výsledků studie je patrné, že pozice 50, 53 a 57 jsou relativně tolerantní k zavedení modifikací. Zjištěné výsledky nepodávají jednoznačnou evidenci o roli pozic 50, 52, 53 a 57 v interakci v oblasti vazebného místa 2. Avšak výsledky studie metadynamiky odpovídajících mutací v molekule insulinu naznačují, že uvedené substituce mohou ovlivňovat vnitřní dynamiku molekuly a inhibovat schopnost zaujmout vazebné uspořádání, což je důležité zejména pro interakce v oblasti vazebného místa 1.

ÚVOD

Insulin společně s insulinu podobnými růstovými faktory 1 (IGF-1) a 2 (IGF-2) jsou hormony s rozmanitou biologickou aktivitou (74, 137, 141, 142). Předmětem tohoto výzkumného projektu bylo studium vybraných oblastí molekul insulinu a IGF-2, které mohou přispívat k receptorové specificitě, jelikož identifikace strukturních determinantů, odpovědných za receptorovou specificitu, poskytuje důležité terapeutické uplatnění.

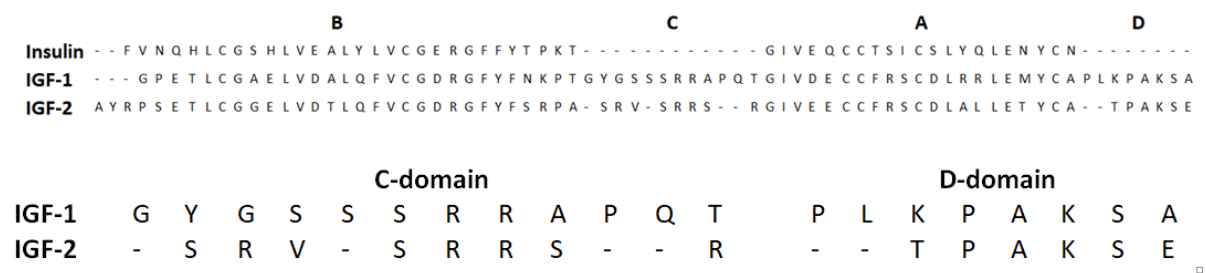
Význam domén C a D IGF

IGF-1 má vysokou afinitu k IGF-1 receptoru (IGF-1R) a současně téměř žádnou afinitu k oběma isoformám insulinového receptoru. Na druhou stranu IGF-2 je schopný interagovat s vysokou afinitou s IGF-1R i IR-A (86, 141, 158). Předpokládá se, že domény C a D významně přispívají k rozdílné vazebné afinitě a následně rozmanitým biologickým aktivitám jednotlivých hormonů. Domény C a D jsou obsaženy v obou molekulách IGF. V koncové molekule insulinu není ani C ani D doména. C-peptid proinsulinu je odštěpen během zrání molekuly a jeho sekvence není podobná doménám z IGF. Když uvážíme nízkou afinitu proinsulinu k IR, C-peptid patrně hraje úlohu během zrání a sbalování molekuly a přispívá k jiným fyziologickým funkcím (157). Domény D jsou obsaženy pouze v IGF.

Domény C a D molekuly IGF-1 (C_1 a D_1 domény) jsou v porovnání s jejich protějškem v IGF-2 (C_2 a D_2) delší, ale sdílejí několik konzervovaných pozic (viz Obrázek 1). Prohození C a D domén mezi IGF-1 a IGF-2 nevede ke globálním strukturním změnám (159).

Doména C_1 v IGF-1 je klíčová pro vazbu a aktivaci IGF-1R (160). Nezbytnost přítomnosti domény C_1 pro správnou vazbu a aktivaci IGF-1R byla potvrzena ve studii s hybridními analogy IGF-1/IGF-2. Zatímco přítomnost domény D_1 v IGF-1 měla pouze malý vliv na vazebnou afinitu a aktivaci IGF-1R (159, 160), nahrazení C_1 doménou C_2 snížilo afinitu IGF analogu k IGF-1R a schopnosti jeho aktivace na úroveň IGF-2. Překvapivě obě domény, C_1 i D_1 , rovnoměrně přispěly ke zvýšení afinity IGF-2 analogu k IGF-1R (2,9 a 2,6násobně pro C a D domény, respektive, v porovnání s nativním IGF-2) (159).

Obrázek 1 – Porovnání sekvence jednotlivých domén insulinu a IGF. Domény C a D IGF-1 a IGF-2 jsou vyobrazeny v detailu



Bylo potvrzeno, že C₂ a D₂ domény jsou důležité rovněž pro vazbu na IR-A, jelikož zvyšují vazebnou afinitu hybridního IGF-1 analogu (1.9násobně (C₂) a 1.5násobně (D₂)). Přispění obou domén bylo aditivní a vyústilo v afinitu blízkou IGF-2 afinitě. Hybridní molekula IGF-2, která obsahovala C₁ a D₁ domény, měla pouze mírně vyšší afinitu k IR-A než IGF-1. Schopnost aktivovat receptor IR-A reflektovala vazebné afinity, ale ovlivnění bylo výraznější. Domény C a D rovněž podobným způsobem regulovaly afinitu k IR-B, avšak afinita k isoformě B byla nižší než k isoformě A (159).

Mitogenní účinek domén D byl sledován v hybridní molekule insulinu, kde přítomnost D₁ domény snížila vazebnou afinitu k IR na jednu třetinu (měřeno na adipocytech z potkanů) a schopnost stimulovat oxidaci glukózy na 20 % aktivity přirozeného insulinu. Na druhou stranu, schopnost inkorporovat tymidin do DNA byla 2.8krát vyšší než u přirozeného insulinu (měřeno na lidských fibroblastech) (166). Naproti tomu doména D₂ sama o sobě nedokázala dostatečně zvýšit mitogenní potenciál insulinu (167).

Příspěvek obou domén je třeba dále zkoumat. Nicméně na základě pozorovaných výsledků hrají domény C a D obou IGF klíčovou roli v receptorové specificitě. Role domény C₁ převyšuje roli domény D₁ při interakci s IGF-1R. Doména C₂ podněcuje afinitu k IR-A na rozdíl od domény C₁ (168). Přítomnost domény D₁ má ničivý účinek na afinitu k IR-A a vede ke zvýšení mitogenního potenciálu, zatímco doména D₂ nemá téměř žádný mitogenní účinek (167).

Insulin/IGF substituce vedoucí k disproporčním schopnosti vázat a aktivovat receptor

Modulace biologické aktivity systému insulin/IGF může být docílena buď analogy s vazebnou specificitou nebo určením aspektů vedoucích k modifikaci intenzity signalizace, kde účinnost vazby není nebo je pouze málo ovlivněna. Specifičtí antagonisté IR-A a zejména IGF-1R

mohou sloužit jako užitečný nástroj v léčbě širokého spektra onemocnění, jelikož několik typů karcinomů se špatnou prognózou jsou doprovázeny zvýšenou expresí IR-A a IGF-1R (89).

Schaffer et al. (169) připravil sérii peptidů cílících vazebnou oblast 1 a 2 insulinového receptoru. Se svými kolegy dokázal, že kovalentním propojením těchto fragmentů můžeme docílit agonistického nebo antagonistického účinku na IR v závislosti na způsobu propojení. Na jeho výzkum navázal Whittaker se svými kolegy (170), kteří se zaměřili na analogy insulinu s disproporčně sníženou schopností aktivovat TK a vazebnou afinitou. Insulinový analog s vloženým His na pozici A4 a A8 (HisA4HisA8-insulin) měl zachovanou vazebnou afinitu k IR, ale sníženou schopnost aktivovat receptor. V lidském insulinu jsou na pozicích A4 a A8 Glu a Thr. Glu (A4) zasahuje do klasické vazebné oblasti (vazebná oblast 1) (22, 171). Tato pozice nebyla během evoluce striktně konzervována. Nicméně se u ostatních obratlovců vyskytovaly pouze „mírné“ (mild) záměny zachovávající negativní náboj (Asp) anebo podobnou velikost (Gln) (28). Vložením pozitivně nabitého His na tuto pozici se výrazně snížila vazebná afinita společně se schopností stimulovat signalizaci skrze Akt a autofosforylaci receptoru (IR) (170). Whittaker a kolegové předpokládali, že interakce GluA4 s Asp707 v α CT-segmentu insulinového receptoru patrně přispívá ke konformačním změnám vedoucích k aktivaci receptoru.

Pozice A8 je méně konzervovaná. V insulinech obratlovců je přítomné široké spektrum aminokyselin. Zavedení His s pozitivním nábojem a objemným postranním řetězcem vedlo k vyšší afinitě k rozpustnému IR a současně vyšší účinnosti v aktivaci Akt a autofosforylaci IR (170). Na základě substitučních studií se předpokládalo, že se ThrA8 účastní vazebné interakce. Nedávná CryoEM analýza komplexu insulin-IR skutečně ukázala, že ThrA8 se účastní interakce ve vazebné oblasti 2 (114, 117, 119, 123).

GluA4 z insulinu má svůj ekvivalent v obou molekulách IGF, Asp45 (IGF-1) a Glu44 (IGF-2). Zastoupení Asp i Glu spadá do variability insulinu vyskytujících se u obratlovců (28). Tento fakt podporuje význam pozice v rámci systému insulin-IGF.

Doposud nebyly ohlášeny analogy IGF-1 ani IGF-2, které by působily jako antagonisté IGF-1R. Zajímavé vlastnosti HisA4HisA8-insulinu otevírají další možnosti pro analýzu těchto pozic v IGF-1 a 2, které vedou k modulaci antagonistických nebo agonistických vlastností.

Interakce IGF-2 s vazebnou oblastí 2 receptoru (IGF-1R/IR)

Doposud neexistuje žádná struktura komplexu IGF-2 s receptorem (IR nebo IGF-1R). Předpokládá se, že IGF-2 při interakci s receptorem používá podobné mechanismy jako insulin nebo IGF-1. Nicméně existují rozdíly v příspěvku jednotlivých aminokyselin (126, 128).

Zatímco význam vazebné oblasti 1 je evidentní, stále není jasné, do jaké míry je významná vazebná oblast 2 při interakcích IGF-IGF-1R/IR. Tato otázka je podpořena faktem, že IGF se váže na hybridní receptor s vysokou afinitou, srovnatelnou s tou, se kterou interaguje s IGF-1R (96).

Alvino a jeho kolegové (126) využili sekvenční a strukturní podobnost mezi insulinem a IGF a navrhli vazebnou oblast 1 a 2 molekuly IGF-2 inspirovanou vazebnou oblastí insulinové molekuly. Vazebná oblast 1 zahrnuje Val14, Gln18, Gly41, Ile42, Glu45, Phe48, Tyr59, Ala61, Gly25, Phe28 a dále aminokyseliny Val43, Phe26, Tyr27, u kterých bylo již dříve potvrzeno, že jsou důležité pro vazbu na IR, IGF-1R a také IGF-2R (69). Aminokyseliny interagující s vazebnou oblastí 2 se mohou skládat z Glu12, Asp15, Phe19, Asp52, Leu53 a Glu5.

Ala substituce aminokyselin v původní vazebné oblasti 2 molekuly IGF-2 odhalila, že nahrazením Asp52 alaninem vede k mírnému zvýšení afinity k oběma receptorům (přibližně 130 % nativní hodnoty IGF-2 pro oba receptory), což poukazuje na to, že pozice patrně není klíčová pro vazebnou interakci. Dále substituce Asp15 vede k výraznému snížení, více než dvojnásobnému, afinity k mini IGF-1R konstrukt, který obsahuje pouze vazebnou oblast 1. Nadto Asp15 je přilehlá k Val14, Gln18 a hydrofobním aminokyselinám, které vytvářejí vazebnou oblast 1 (Val14, Phe28, Val43, Phe26 a Tyr27). Tím se předpokládá, že Asp15 přispívá k interakcím ve vazebné oblasti 1 spíše než ve vazebné oblasti 2. Bohužel nízká afinita IGF-2 k insulinovému mini-receptorovému konstrukt neumožňuje hodnocení interakce pouze s vazebnou oblastí 1 v rámci IR.

Doposud existuje pouze několik málo analogů, které sledují afinitu vazebné oblasti 2 nebo prozkoumávají vazebný povrch oblasti 2 na molekule IGF-2. Další analogy mohou osvětlit význam vazebné oblasti 2 a následně zvýšit naše znalosti o molekule IGF-2 a její fyziologické úloze.

METODY

Syntéza řetězců insulinu

Řetězce A a B byly připraveny totální chemickou syntézou na pevné fázi s použitím Wangovy/2-chlorotrityllové pryskyřice a aminokyselin s chráněnými α -aminoskupinami 9-fluorenylmethoxykarbonylovou skupinou (Fmoc) a s chráněnými funkčními skupinami postranních řetězců. Syntéza byla provedena na automatizovaném syntetizátoru (ABI 433A od společnosti Applied Biosystems, Foster City, CA). Peptidy byly odštěpeny z pryskyřice a SH skupiny cysteine byly převedeny na S-sulfonáty. S-sulfonáty řetězců byly odsoleny na nízkotlaké koloně Sephadex G10 (4 cm \times 85 cm) v 50 mM NH_4HCO_3 a následně vyčištěny za použití RP-HPLC (Nucleosil C18, 250 mm \times 21 mm, 5 μm).

Syntéza peptidových prekurzorů

Krátké peptidové řetězce byly syntetizovány ručně postupnou vazbou Fmoc-chráněné aminokyseliny na 2-chlorotrityllovou pryskyřici. Syntetizované peptidy byly odštěpeny za použití DCM/AcOH/trifluoroethanol směsi (6/2/2) a vyčištěny na RP-HPLC (Nucleosil C18, 250 mm \times 8 mm, 5 μm).

Rekombinace insulinových řetězců

Formování disulfidových vazeb u insulinových analogů bylo dosaženo dle dříve popsaného postupu^{1,2}. Metoda využívá redukce chráněných skupiny cysteinů na SH a jejich následné oxidace. Výsledná směs byla nanášena na nízkotlakou kolonu (Sephadex G-50 in 1 M acetic acid, 2 cm \times 75 cm) a frakce obsahující insulinový analog přečištěna na RP-HPLC (Nucleosil C18, 250 mm \times 8 mm, 5 μm).

¹ Kosinová, L., Veverka, V., Novotná, P., Collinsová, M., Urbanová, M., Moody, N. R., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., Brzozowski, A. M., and Žáková, L. (2014) Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry* 53, 3392–3402.

² Křižková, K., Veverka, V., Maletinská, L., Hexnerová, R., Brzozowski, A. M., Jiráček, J., and Žáková, L. (2014) Structural and Functional Study of the GlnB22-Insulin Mutant Responsible for Maturity-Onset Diabetes of the Young. PLoS One 9 (11), e112883.

Enzymatická semisyntéza

Insulinové analogy se záměnou v oblasti C-konce řetězce B byly připraveny metodou enzymatické semisyntézy, kde jsou spojeny des(B23–B30)-oktapeptid-insulin (DOI) a odpovídající peptid. Enzymatická semisyntéza využívá nastolení rovnováhy během enzymatického štěpení. Jako enzym byl použit trypsin ošetřený TPCK.

Rekombinantní exprese analogů IGF-2

Nové analogy IGF-2 byly vytvořeny metodou rekombinantní exprese, která je detailně popsána v této práci.

Vazebné studie

Lidský IR-A

Vazebné afinity k IR-A byly měřeny na membránách lidských IM-9 lymfocytů a hodnoty K_d byly určeny metodou popsanou Morcavallem a kol.¹. Vazebná data byla analyzována za použití algoritmu speciálně vyvinutého pro stanovení afinity na IM-9 lymfocytech v laboratoři Pierra De Meytse (A. V. Groth and R. M. Shymko, Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark). Metoda využívá nelineární regrese a program vazby do jednoho místa s tím, že je zohledněna potenciální deplece volného ligandu.

¹ Morcavallo, A., Genua, M., Palummo, A., Kletviková, E., Jiráček, 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.

Lidský IR-B

Vazebná afinita k IR-B byla stanovena na membránách fibroblastů z myších embryí, u kterých byl vymazán gen pro IGF-1R a které výlučně exprimují IR-B. Vazebné afinity byly stanoveny

dle dříve popsané metody^{1,2}. Vazebná data byla analyzována za použití programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese a vazby do jednoho místa s tím, že je zohledněna potenciální deplece volného ligandu.

¹ Kosinová, L., Veverka, V., Novotná, P., Collinsová, M., Urbanová, M., Moody, N. R., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., Brzozowski, A. M., and Žáková, L. (2014) Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry* 53, 3392–3402

² Žáková, L., Kletviková, E., Lepšík, M., Collinsova, M., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., and Brzozowski, A. M. (2014) Human insulin analogues modified at the B26 site reveal a hormone conformation that is undetected in the receptor complex. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 70, 2765–2774

Lidský IGF-1R

Vazebná afinita k IGF-1R byla stanovena na membránách fibroblastů z myších embryí, u kterých byl vymazán gen pro IGF-1R a které výlučně exprimují lidský IGF-1R. Vazebné afinity byly stanoveny dle dříve popsané metody¹. Vazebná data byla analyzována za použití programu GraphPad Prism 5 metodou nelineární regrese a vazby do jednoho místa s tím, že je zohledněna potenciální deplece volného ligandu.

¹ Kosinová, L., Veverka, V., Novotná, P., Collinsová, M., Urbanová, M., Moody, N. R., Turkenburg, J. P., Jiráček, J., Brzozowski, A. M., and Žáková, L. (2014) Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry* 53, 3392–3402

Stimulace buněk

Buňky (buněčné linie R+39, R-/IR-A, and R-/IR-B) byly inkubovány po dobu 24 hod v DMEM a následně ponechány hladovět po dobu 4 hod v mediu bez séra. Poté byly buňky stimulovány přidáním ligandu ve finální koncentraci 10^{-8} M po dobu 10 min. Reakce byla ukončena odstraněním média a zamrazením.

Imunopřenos

Buňky byly sonikovány. Buněčné extrakty separovány na 10% SDS-polyakrylamidovém gelu a přeneseny na PVDF membrány. Membrány byly testovány následujícími protilátkami: anti-phospho-IGF-1R β podjednotka (Tyr1131)/IR β (Tyr1146), (Cell Signaling Technology), anti-human IR β podjednotka (Invitrogen), and anti-IGF-1R β podjednotka (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Získané “bloty” byly vyvíjeny v substrátu SuperSignal West Femto maximum sensitivity (Pierce) and analyzovány za použití ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

CD-spektra

CD spektra byla měřena v křemenné kyvetě s optickou délkou 0.5 mm (Starna Cells) za použití a J-815 spektropolarimetru (Jasco, Japan). Daleká a blízká UV CD spektra byly použity k identifikaci změn v sekundární a terciární struktuře proteinů. Spektrální oblast byla 200–300 nm.

NMR spektroskopie

NMR spektra byla snímána na spektrometru Bruker Avance II 600-850 MHz s trojitě resonančními kryosondami (1 H/¹³C/¹⁵N) v 50mM d₄ kyselině octové, 5% D₂O a 0, 01% NaN₃. Pertrubace signálu byly sledovány metodou minimálních chemických posunů.

VÝZKUMNÉ CÍLE

- Dokončení souboru insulinových analogů s aminokyselinami odvozenými z domény C₂ a hodnocení dopadu domén C₂, D₁ a D₂ IGF na afinitu k IR a IGF-1R a na schopnost jejich aktivace.
- Zjednodušení nové metody přípravy IGF-2 vedoucí ke kompletně nativní molekule IGF-2.
- Dokončení souboru analogů IGF-2 obsahující 1 v rámci domén B a C motivy odvozené z IGF-1; hodnocení dopadu těchto substitucí na potenci k IR a IGF-1R.
- Příprava analogů IGF-2 se substitucemi na pozicích 44, 45 a 48 a jejich charakterizace se zaměřením na antagonistický účinek.
- Hodnocení role pozic 50, 52, 53 a 57 při interakcích na vazebné oblasti 2 na IR a IGF-1R.

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. Role domén D_1 , D_2 a C_2 ve vazebné specifitě

V první části tohoto projektu jsme připravili hybridní analogy insulínu s extenzí odvozenou z domén D_1 , D_2 a C_2 . Insulín se váže s vysokou afinitou na obě isoformy IR, proto představuje sensitivní sondu pro hodnocení role jednotlivých domén nebo jejich částí, kdy je současně ignorován rozdíl v doménách A a B mezi IGF a insulínem. Abychom mohli sledovat účinek C a D domén připravili jsme 1) insulínové analogy s C-koncem řetězce A prodlouženým o aminokyseliny odvozené z domén D_1 a D_2 (Analogy 1-3); 2) insulínové analogy s C-koncem řetězce B prodlouženým o aminokyseliny mimikující doménu C_2 (Analogy 4-7).

Tabulka 1 - Insulínové analogy

	Structure
Analogue 1	AlaA21Pro-Leu-LysA24-insulin
Analogue 2	AlaA21Pro-Leu-Lys-Pro-Ala-Lys-Ser-AlaA24-insulin
Analogue 3	AlaA21Trp-Pro-Ala-Lys-Ser-GluA24-insulin
Analogue 4	SerB31-insulin
Analogue 5	SerB31-LysB32-insulin
Analogue 6	SerB31-Lys-ValB33-insulin
Analogue 7	SerB31-Lys-Val-SerB34-insulin

Přidání aminokyselin z domén D_1 a D_2 mělo negativní dopad na vazebnou potenci k IR, což je v souladu s předchozími studiemi (160, 163, 167). Dle očekávání doména D_1 měla více negativní dopad na vazbu k IR (25-30 % afinity insulínu) než doména D_2 (53-85 %). Úvodní sekvence (Pro-Leu-Lys) z domény D_1 vykazovala hlavní negativní účinek, který byl pouze mírně zdůrazněn přítomností celé domény. Výsledky dále odhalily, že úvodní část D_1 sekvence přispívá k odlišné afinitě IGF-1 k IR-A a IR-B.

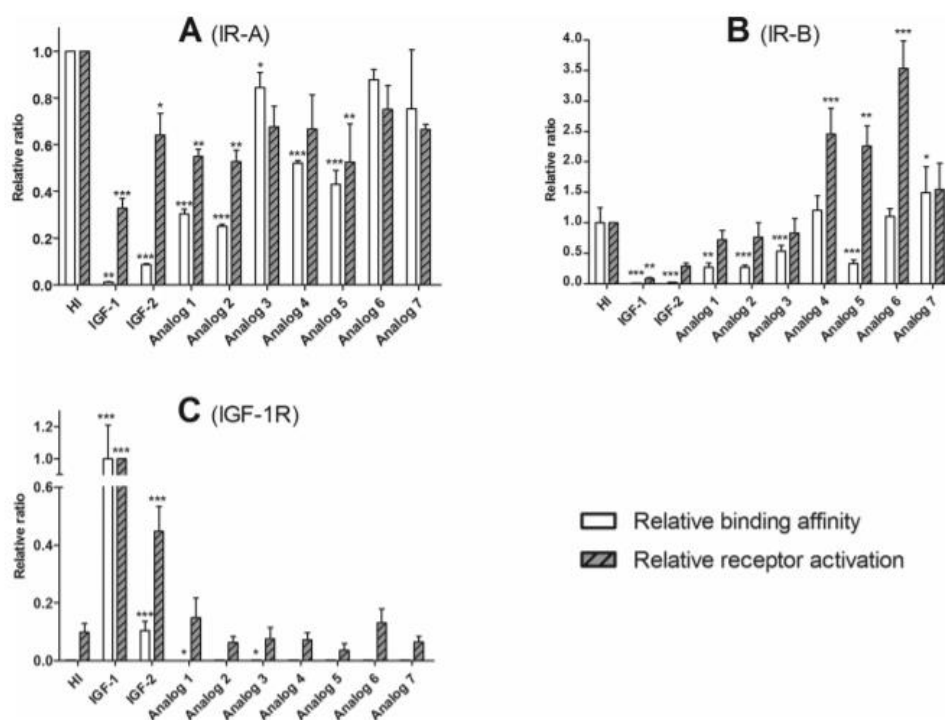
Proto předpokládáme, že negativní účinek domény D_1 na afinitu k IR je způsoben jeho úvodní specifickou sekvencí Pro-Lys-Leu, která je unikátní pro IGF-1 a patrně určuje specifickou konformaci. Doména D_2 měla spíše neutrální roli při vazbě na IR-A a přinejmenším mírně

negativní úlohu při interakci s IR-B. Rozdílné vazebné afinity se neodrazily v rozdílné schopnosti aktivovat receptor.

Navzdory našemu očekávání, zvýšení ve vazebné afinitě k IGF-1R bylo pozorováno pouze u analogu obsahujícím doménu D₂, kde bylo pozorováno více než dvojnásobné zvýšení afinity. Tyto výsledky jsou v souladu s hypotézou předpokládající, že doména D₁ sama o sobě nehraje kritickou úlohu při vazbě na IGF-1R (159) a doména D₂ nemá zničující účinek na vazbu k IGF-1R (167). Avšak, toto může taky indikovat fakt, že insulinová molekula není dostatečně senzitivní nebo vhodná sonda pro studování interakce s IGF-1R.

Druhý soubor insulinových analogů obsahoval analogy s C-koncem řetězce B prodlouženým o aminokyseliny mimikující doménu C₂. Původně jsme zamýšleli připravit analogy obsahující část nebo celou doménu C₂ stejně jako jsme to udělali v případě analogů s doménou D. Avšak nízká rozpustnost peptidů nám to neumožnila. Z toho důvodu jsme připravili analogy s jednou až čtyřmi aminokyselinami odvozenými z domény C₂. Jelikož aminokyseliny byly odvozené z domény C₂, předpokládali jsme, že jejich přidáním zvýšíme mitogenní vlastnosti molekuly insulinu. Avšak došlo pouze k mírnému nevýznamnému zvýšení ve vazebné afinitě k IGF-1R (104-150 %) a slabému poklesu afinity k IR-A (43-88 %). Schopnost aktivace receptoru reflektovala vazebné afinity. Vazebné afinity směrem k IR-B byly daleko zajímavější. Navzdory přítomnosti aminokyselin odvozených z domény C₂, afinita a schopnost aktivace IR-B byly ekvipotentní nebo dokonce zvýšené v porovnání s lidským insulinem. Výjimku tvořil analog 5-SerB31Lys32.insulin – 33 %, kde může být negativní účinek způsoben pozitivním nábojem C-koncové aminokyseliny Lys. Vysoká afinita k IR-B odhalila významný fakt, že C-konec řetězce B může představovat cíl pro zvýšení potence vůči IR-B a následně pro receptorovou selektivitu. Tyto výsledky jsou podpořeny publikacemi ukazujícími zvýšení ve specificitě k IR-B skrze modifikace C-konce řetězce B (102, 146, 177).

Obrázek 2 – Porovnání relativní vazebné afinity (bílé sloupčky) pro IR-A (A), IR-B (B) a IGF-1R (C) a relativní schopnosti aktivovat tyto receptory (šedé sloupčky) lidského insulinu (HI), IGF-1, IGF-2 a insulinových analogů obsahujících sekvence odvozené z domény D IGF-1 (1 a 2) nebo IGF-2 (3) nebo z C domény IGF-2 (4-7). Experimentální hodnoty jsou vztaženy k vazebné potenci a biologické aktivity HI (pro IR-A a IR-B) nebo IGF-1 (pro IGF-1R). Hvězdičky indikují, že vazba ligandu nebo autofosforilace určitého receptoru indukovaná ligandem se významně liší oproti insulinu (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



Data jsou uvedena v následující publikaci:

Křížková K., Chrudinová M., Povalová A., Selicharová I., Collinsová M., Vaněk V., Brzozowski A.M., Jiráček J., and Žáková L. 2016. "Insulin-Insulin-like Growth Factors Hybrids as Molecular Probes of Hormone: Receptor Binding Specificity." *Biochemistry* 55 (21): 2903–13.

2. Rekombinantní produkce analogů IGF-2

Analogy IGF-1 a IGF-2 byly připraveny metodou rekombinantní exprese v *Escherichia coli* jako fúzní protein s N-terminálním odštěpitelným GB1 proteinem (imunoglobulin vázající doménu B1 ze proteinu G streptokoka) s histidinovou značkou. Metoda využívá spontánní

sbalení molekuly na koloně, které je iniciováno jedнокrokovým přechodem z denaturujících a redukujících podmínek k ne-denaturujícím a neredukujícím podmínkám. Následné odštěpení fúzního proteinu a histidinové značky vede ke kompletně nativní molekule IGF-2 bez dalších aminokyselin. Správná struktura byla potvrzena retenčním časem na HPLC, ^1H - ^{15}N HSQC, CD spektry a vazebnou afinitou k odpovídajícím receptorům (IR-A, IGF-1R).

Detaily této nové metody jsou zahrnuty v následujících publikacích:

Hexnerová R., **Křížková K.**, Fábry M., Siegllová I., Kedrová K., Collinsová M., Ullrichová P., Srb P., Williams C., Crump M.P., Tošner Z., Jiráček J., Veverka V., and Žáková L. 2016. "Probing Receptor Specificity by Sampling the Conformational Space of the Insulin-like Growth Factor II C-Domain." *Journal of Biological Chemistry* 291 (40): 21234–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741041>

Macháčková K., Chrudinová M., Radosavljević J., Potalitsyn P., **Křížková K.**, Fábry M., Selicharová I., Collinsová M., Brzozowski A.M., Žáková L. and Jiráček J. 2018. "Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation." *Biochemistry* 57 (16): 2373–82. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01260>.

3. Role domény C ve vazebné specificitě IGF-2

Abychom získali větší vhléd do strukturního základu vazebné specificity IGF-2 k IR-A a IGF-1R, vytvořili jsme sérii mutovaných analogů obsahující aminokyseliny v rámci domén B a zejména C. Recentní sktruktura navázaného IGF-1 na IGF-1R/IR komplex odhalila, že strukturní přeuspořádání domény C₁ je patrně nezbytné k zabránění nežádoucích sterických střetů během vazby. Proto jsme se zaměřili na roli dvou částí domény C₁. Zavedené inserty byly vybrány tak, aby vyvažovaly rozdílnou délku domén C₁ a C₂ (Gly-Ser; Pro-Gln). Kromě toho insert Pro-Gln rovněž představuje výrazný strukturní aspekt domény C₁. Ser29Asn substituce byla vybrána jako nová mutace odvozená z IGF-1. Korespondující aminokyselina v IGF-1 (Asn26) byla zahrnuta do vazebné oblasti 1 IGF1 (117). Bylo navrženo celkem 6 analogů. Modifikace byly následující: 1) bodová mutace na pozici Ser29(Asn29-IGF-2); 2) insert dipeptidu Gly-Ser za Arg34 (Arg34(Gly-Ser)-IGF-2); 3) insert dipeptidu za Ser39 (Ser39(Pro-Gln)-IGF-2); 4) kombinace obou insertů; 5) kombinace mutace Asn 29 s Pro-Gln insertem; 6) kombinace mutace Asn29 s oběma inserty.

Vložením IGF-1 mutací jsme zamýšleli posunout vazebné vlastnosti analogů směrem k IGF-1 a současně prozkoumat dopad jednotlivých aspektů na vazebnou specificitu. Dle očekávání všechny modifikace vedly k významnému zhoršení vazby na IR-A. Asn29-IGF-2 mutant se

záměnou v doméně B vykazoval dvounásobné snížení afinity k IR-A a inserty v rámci domény C měly dokonce ještě negativnější efekt. Všechny analogy nesoucí Pro-Gln motiv vykazovaly nízkou afinitu k IR-A (1,1-1,8 % afinity insulinu). Překvapivě toto snížení bylo vyšší než účinek záměny celé domény C₂ za doménu C₁ (3,7násobně) (159). Další kombinace neměla aditivní účinek. Toto indikuje, že navzdory nezpochybnitelné úloze délky domény C₁ versus C₂, specifická sekvence aminokyselin je přinejmenším stejně důležitá jako délka domény. V tomto kontextu bychom se měli zaměřit na úlohu Pro36 (IGF-1 sekvence) reflektované v Pro-Gln insertu, která zavádí specifický strukturní aspekt do domény C₁. Náš předpoklad potvrdily výsledky NMR studií, které odhalily, že Pro-Gln insert vede k odsunutí smyčky C a její otevřenější konformaci ve srovnání s přirozeným IGF-2. Porovnatelné snížení ve vazebné afinitě k IR-A analogu Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 a Asn29,Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 rovněž indikuje, že je způsobena zejména jejich podobně změněnou strukturou smyčky C, než záměnou Ser29Asn, která byla relativně dobře tolerována na IR-A.

Překvapivě vložení IGF-1 podobných vlastností celkově vedla k mírnému snížení vazebné potence k IGF-1R. Jedinou výjimkou byla kombinace mutace Asn29 s insertem ProGln, která vyústila v téměř 2násobné zvýšení vazebné potence (18,8 % versus 10,9 % přirozeného IGF-2). Zajímavé je, že ani Asn29 mutace, ani ProGln inserce samy o sobě nedokázaly zvýšit vazebnou afinitu k IGF-1R v porovnání s přirozeným IGF-2. U Asn29,Ser29(Pro-Gln)-IGF-2 významně snížená afinita k IR-A společně se zvýšenou afinitou k IGF-1R vedla téměř k 10násobnému zvýšení IGF-1R/IR-A vazebné specifity v porovnání s IGF-2.

Mimo výše uvedené substituce existují další důležité determinanty (např. IGF-1 Tyr31) (165, 178, 179), které samy o sobě nebo v kombinaci jsou klíčové pro vysokou afinitu směrem k IGF-1R. Spolu vzato předpokládáme, že IGF-2 specifita směrem k IGF-1R je určena kompozicí aminokyselin domény C spolu s dalšími důležitými determinanty spíše než délkou domény C. Vazebné afinity jsou uvedeny v tabulce níže.

Tabulka 2 – Vazebné afinity IGF-2 a analogů IGF-2 sledované v této práci

Analogue	Relative binding affinity for human IR-A [%]	Relative binding affinity for human IGF-1R [%]
Insulin	100±5;100±8	0.08±0.01 ^a
IGF-1	1±0.3 ^b	100±21 ^a ; 100±4
Commercial IGF-2	8.2±0.4 ^b	10.8±3.3 ^b

IGF-2	7.9±0.7	10.9±5.0
Asn29-IGF-2	4.2±0.4	5.3±1.3
Arg34(Gly-Ser)-IGF-2	2.8±1.1	5.8±1.3
Ser29(Pro-Gly)-IGF-2	1.1±0.1	4.8±1.1
Arg34(Gly-Ser),Ser29(Pro-Gly)-IGF-2	1.8±0.4	4.2±1.6
Asn29,Ser29(Pro-Gly)-IGF-2	1.4±0.3	18.8±5.1
Asn29,Arg34(Gly-Ser)Ser29,(Pro-Gly) -IGF-2	1.2±0.3	7.8±2.7

^afrom Vikova et al (102)

^bfrom Krizkova et al (101)

Dva IGF-2 analogy s nejvíce významným dopadem na vazbu k receptoru Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 (nejnižší IR-A a IGF-1R vazebná afinita) a Asn29,Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 (snížená afinita IR-A a zvýšená afinita IGF-1R) byly vybrány pro NMR charakterizaci. Výsledky odhalily, že oba analogy si zachovaly jejich globální strukturní organizaci. Insert v doméně C vedl k významné změně v uspořádání s hlavní změnou mezi aminokyselinami 29 a 42. Inserce Pro-Gln za Ser39 vedla ke zvýšené svobodě uspořádání v rámci smyčky C, která vykazovala přemístění stabilizované několika novými interakcemi.

Data jsou uvedena v následující publikaci:

Hexnerová R., **Křížková K.**, Fábry M., Siegllová I., Kedrová K., Collinsová M., Ullrichová P., Srb P., Williams C., Crump M.P., Tošner Z., Jiráček J., Veverka V., and Žáková L. 2016. “*Probing Receptor Specificity by Sampling the Conformational Space of the Insulin-like Growth Factor II C-Domain.*” *Journal of Biological Chemistry* 291 (40): 21234–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741041>

4. Role pozic 44, 45 a 48 a jejich charakterizace se zaměřením na antagonistický účinek

Analogy s vysokou receptorovou specificitou, ale také ty, které vykazují disproporci mezi afinitou k receptoru a schopností jeho aktivace mají vysoký potenciál v medicíně, jelikož IGF-2 nadprodukce je spojována se špatnou prognózou u celé řady karcinomů a jiných onemocnění (180). Recentně byla ohlášena kombinace GluA4His a ThrA8His mutace vedoucí k insulinovému analogu s nativní afinitou k IR-A, ale špatnou schopností stimulovat autofosforylaci a následnou aktivaci Akt (170). Pozice odpovídající pozici A4 v insulinu jsou

Asp45 a Glu44 v IGF-1 a IGF-2, respektive. Sousedící pozice v insulinu je neutrální GlnA5 naproti tomu v molekulách IGF je přítomen Glu (44/45, 45/46).

Zde jsme se zaměřili na analogy IGF s mutací na pozicích odpovídajících A4 a A5 nebo v jejich okolí. Byly plánovány tři typy mutací: 1) substituce aminokyselin na pozicích 44 a 45 za Ala; 2) jejich substituce za His; 3) substituce aminokyseliny za odpovídající amid (např. Glu→Gln). Tyto mutace jsme měli v úmyslu spojit s Phe48His substitucí, jelikož bylo ukázáno, že odpovídající mutace ThrA8His v insulinu významně zvyšuje jeho vazebnou potenci k IR-A. Avšak nízká rozpustnost během balení (foldingu) molekuly zabránila přípravě většiny analogů. Z původně plánovaných analogů byly připraveny pouze tyto tři následující Gln45-IGF-2, Gln45,His48-IGF-2, and His48-IGF-2.

Vložené mutace dramaticky neovlivnili vazebnou afinitu k IGF-1R. Substituce Gln45 snížila vazebnou potenci na jednu polovinu hodnoty nativního IGF-2 a substituce His48 zvýšila vazebnou potenci téměř dvakrát (18,8 % afinity IGF-1). Je zajímavé, že kombinace obou mutací vykazovala stejnou vazebnou potenci jako samostatná substituce His48. Navzdory rozdílům pozorovaným ve vazebné afinitě všechny analogy aktivovaly IGF-1R obdobně, jako přirozené IGF-2. Překvapivě rozdílné trendy byly pozorovány u substituce His48 v IGF-1 a IGF-2, zatímco u IGF-2 tato mutace vedla ke zvýšení ve vazebné afinitě k IGF-1R, odpovídající substituce His49 měla spíše negativní účinek na vazebnou potenci k IGF-1R u IGF-1 (68 %). Toto naznačuje rozdílnou povahu interakcí IGF-1 a IGF-2 s IGF-1R minimálně v této pozici.

Změny v afinitách k IR-A byly daleko více fascinující. Všechny analogy vázaly IR-A lépe než přirozená molekula. Nejvýraznější změna byla pozorována u analogů s His48 substitucí (59 % afinity insulinu). Ačkoli substituce Gln45 rovněž vedla ke zvýšení afinity k IR-A v porovnání s IGF-2 (20 % afinity insulinu), kombinace obou substitucí nevedla k synergickému účinku. Nicméně oba His48-IGF-2 a His48,Gln45-IGF-2 jsou dle našich znalostí nejsilněji vázající molekuly IGF-2 dosud známy. Významně vysoká afinita His48,Gln45-IGF-2 byla rovněž pozorována u IR-B, kde afinita analogu dosahovala téměř 12 % vazebné afinity insulinu (8krát silnější afinita v porovnání s IGF-2). Přestože jsme zavedením substituce His48 očekávali zvýšení vazebné afinity k IR, jelikož odpovídající substituce v molekule insulinu HisA8 rovněž zvyšovala afinitu k IR (181-184), rozsah dopadu je překvapující.

Naše data dokazují, že zavedené substituce měly větší dopad na interakci s IR než na interakci s IGF-1R. Tato data mohou naznačovat rozdílný povrch vazebných oblastí 2 u obou receptorů, ale rovněž různorodé role interakcí ve vazebné oblasti 2 u IR a IGF-1R. Zatímco u IR je role vazebné oblasti 2 nezpochybnitelná, v případě IGF-1R není úplně objasněná (96, 152). Další možností je i to, že His na této pozici zvyšuje některé interakce ve vazebné oblasti 1, které jsou upřednostňovány IR spíše než IGF-1R.

Nepodařilo se nám splnit původní záměr a vytvořit analogy s disproporcí mezi vazebnou afinitou a schopností aktivovat receptor. významná disproporce ve vazebné afinitě a schopnost aktivovat receptor Pozorovaná u analogu s mutacemi na pozicích A4 a A8 (170) jsou patrně specifické a limitované na interakci insulin-IR.

Tabulka 3 – IR-A a IGF-1R vazebné afinity nativních hormonů a analogů

	relative binding affinity for human IGF-1R (%) relative to IGF-1	relative binding affinity for human IR-A (%) relative to HI
Human IGF-1	100±37 ^a 100±12 ^b	
Human insulin		100±20 ^c 100±28 ^d 100±43 ^e
Human IGF-2	10.9±5.7*	8.6±0.6 ^c
First series of IGF-2 analogues		
Gln45-IGF-2	5.5±0.6* ^a	20±3.8
Second series of IGF-2 analogues		
His48-IGF-2	18.2±4.7 ^a	59.3±14.3
Gln45,His48-IGF-2	18.0±1.0 ^a	46.2±8.5 ^e

*p < 0.05

^aRelative to the human IGF-1 Kd value of 0.16 ± 0.06 (n = 3).

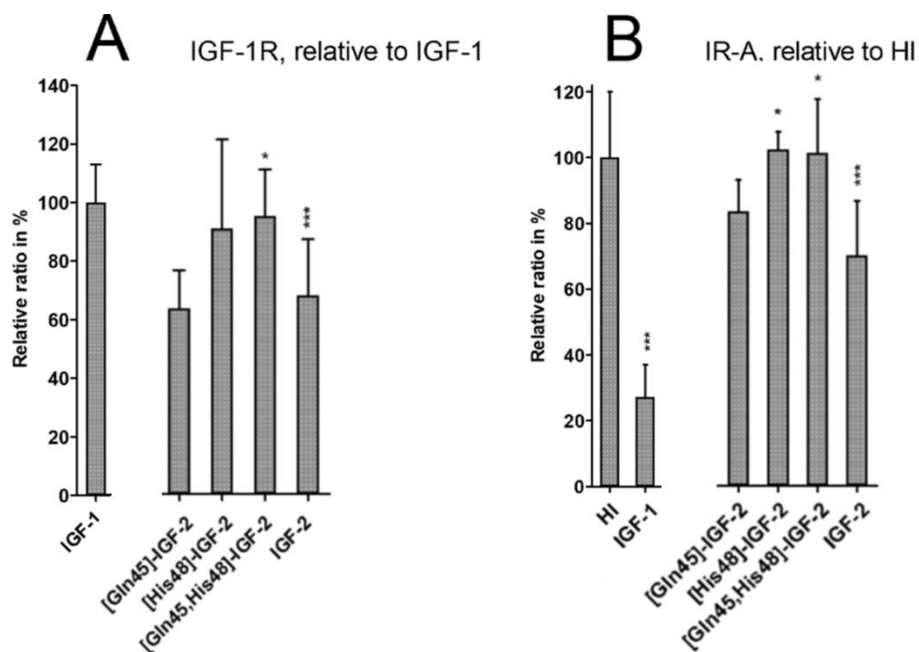
^bRelative to the human IGF-1 Kd value of 0.25 ± 0.03 (n = 4)

^cRelative to the human insulin Kd value of 0.25 ± 0.05 (n = 5)

^dRelative to the human insulin Kd value of 0.32 ± 0.09 (n = 4)

^eRelative to the human insulin Kd value of 0.30 ± 0.13 (n = 5)

Obrázek 3 – Relativní schopnosti aktivovat (A) IGF-1R a (B) IR-A lidského insulinu (HI), lidského IGF-1, lidského IGF-2 a analogů IGF-1 a IGF-2. Průměry ± SD byly vypočítány ze čtyř nezávislých experimentů (n = 4). Panel A, experimentální hodnoty jsou vztaženy k biologické aktivitě IGF-1. Panel B, experimentální hodnoty jsou vztaženy k biologické aktivitě HI. Hvězdičky indikují, že autofosforilace daného receptoru indukovaná ligandem se významně liší (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001) od účinku IGF-2. Panel A, význam účinku nativního IGF-2 (hvězdičky) je vztažen k lidskému IGF-1 a v Panelu B k lidskému insulinu. Panel B, význam účinku nativního IGF-1 (hvězdičky) vztažen k lidskému insulinu.



Data jsou obsažena v následující publikaci:

Macháčková K., Chrudinová M., Radosavljević J., Potalitsyn P., **Křížková K.**, Fábry M., Selicharová I., Collinsová M., Brzozowski A.M., Žáková L. and Jiráček J. 2018. “Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation.” *Biochemistry* 57 (16): 2373–82. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01260>.

5. Role „opomenutých aminokyselin“ v interakci ve vazebné oblasti 2

Nedávno byly publikovány dvě studie, které poskytují vhled do interakcí ve vazebné oblasti 2 insulinu s IR-A (114,123). Tyto studie omezují vazebnou oblast 2 na ThrA8, CysA7, GlnB4–GlyB8, HisB10 a GluB13 v insulinové molekule a na FnII-1 doménu molekuly receptoru. Tyto výsledky avšak zcela nekorespondují s výsledky substitučních studií s insulinem, na základě

kterých by měly být do vazebné oblasti 2 zahrnuty také aminokyseliny IleA10, SerA12, LeuA13 and GluA17.

Z toho důvodu jsme se zaměřili na „opomenuté“ aminokyseliny insulinu IleA10, SerA12, LeuA13 a GluA17 a připravili jsme sérii mutantů, abychom mohli studovat jejich interakce s receptory. Souběžně jsme zavedli podobné mutace na homologní pozice v IGF-1 a IGF-2 (pozice Ser51/50, Asp53/52, Leu54/53 a Glu58/57).

Zamýšleli jsme upravit jednotlivé pozice dvěma způsoby. Buď měla být zavedena homologní výměna; tj. Leu→Val, Ser→Thr, Glu→Asp and Asp→Glu nebo výměnu přirozeně se vyskytující aminokyseliny za His. IGF-2 analogy byly připraveny v *E. coli* buňkách, jak bylo popsáno dříve (158, 175). Žádný ze zamýšlených IGF-2 analogů se substitucí na pozici 52 se nepodařilo úspěšně připravit. Zdá se, že tato pozice je důležitá pro správné sbalení molekuly. Tento předpoklad je také podpořen faktem, že byl připraven pouze ThrA12-insulin. Nadto se nepodařilo připravit ani His57-IGF-2 navzdory mnoha pokusům. Na druhou stranu ASP57-IGF-2 byl připraven v dostatečném množství. Přestože jsme nebyli schopni vytvořit analogy se substitucí na pozici 52, mutace odpovídají pozice v insulinu spolu s dostupnými daty neindikuje klíčovou úlohu této pozice ve vazbě na receptory nebo jejich aktivaci.

Všechny IGF-2 analogy tolerovaly záměny na pozicích 50 a 53 relativně dobře. Asp57-IGF-2 vázal IR (A/B) podobně nebo o trochu lépe než přirozená molekula. Afinita k IGF-1R byla dokonce ještě silnější. Je zajímavé, že homologní Glu-to-Asp mutace na pozici 58 molekuly IGF-1 a pozici 57 v iGF-2 vyústila v rozdílný biologický efekt. Substituce Glu za Asp na pozici 58 IGF-1 snížila vazebnou afinitu zejména pro IGF-1R.

Tabulka 4 – Zjednodušený přehled relativních vazebných afinit analogů IGF-2: relativní vazebné afinity jsou ukázány v % hodnot nativních hormonů, které mají 100 % vazebnou afinitu pro specifický receptor

Position in the native hormone	Analog	Result of production	Binding affinity (in % of the native hormone) for		
			IR-A	IR-B	IGF-1R
Ser50-IGF-2	Thr50-IGF-2	+	78	153	264
	His50-IGF-2	+	100	68	136
Asp52-IGF-2	Glu52-IGF-2	-	nd	nd	nd
	His52-IGF-2	-	nd	nd	nd

Leu53-IGF-2	Val53-IGF-2	+	72	37	145
	His53-IGF-2	+	51	84	182
Glu57-IGF-2	Asp57-IGF-2	+	106	166	200
	His57-IGF-2	-	nd	nd	nd

Studovali jsme rovněž molekulární dynamiku (MD) insulinových analogů modifikovaných na pozicích A10, A12, A13 a A17, abychom analyzovali účinek zavedených mutací na dynamiku molekuly insulinu zejména klíčové oddělení (detachment) C-konce řetězce B. MD skutečně odhalilo, že dynamika nízkoafinitních mutantů obsahujících His jsou kvalitativně rozdílná v tom smyslu, že s menší pravděpodobností zaujímají konformaci s odsunutým C-koncem řetězce B, což je kompatibilní s vazbou na IR.

Výsledky metadynamických studií ukázaly, že mutace mohou ovlivnit vnitřní dynamiku insulinu a inhibovat jeho schopnost zaujmout vazebné uspořádání, což je důležité zejména pro interakce v oblasti vazebného místa 1. Výsledky jsou v souladu s hypotézou Weise a kolegů, kteří predikovali, že A12, A13, A17 a B17 aminokyseliny mohou hrát úlohu během iniciálního shlukování insulinu na receptor (123). To částečně vysvětluje významný a různý dopad mutace těchto pozic, které jsou specifické hormon a receptor.

Celkově, když vezmeme v úvahu všechna data, jsme ukázali, že pozice A10, A13 a A17 v molekule insulinu jsou důležité pro biologickou aktivitu hormonu. Pozice 51/50 a 54/53 molekul IGF-1/IGF-2 patrně nehrají žádnou významnou roli při vazbě na receptor. Předpokládáme, že pozice 58 molekuly IGF může být zahrnuta v přímé interakci ve vazebné oblasti 1 IGF-1R.

Data jsou uvedena v následující publikaci:

Macháčková K., **Mlčochová K.**, Potalitsyn, P., Hanková K., Socha O., Buděšínský M., Muždalo A., Lepšík M., Černeková M., Radosavljević J., Fábry M., Mitrová M., Chrudinová M., Lin L., Yurenko J., Hobza P., Selicharová I., Žáková L. and Jiráček J. (2019). "Mutations at hypothetical binding site 2 in insulin and insulin-like growth factors 1 and 2 result in receptor- and hormone-specific responses." *Journal of Biological Chemistry* 294, *in press*

SHRNUTÍ

- Role domény D je evidentně odlišná u IR a IGF-1R. Přidání domény D₁ k insulinu mělo negativní efekt na vazebnou afinitu k IR. Negativní účinek je zejména způsoben jeho iniciální sekvencí (Pro-Leu-Lys), která je unikátní pro IGF-1 a patrně určuje specifickou konformaci. Dále, úvodní část domény D₁ je pravděpodobně významný faktor pro různou afinitu k IR-A vs. IR-B. D₂ doména měla neutrální roli při vazbě na IR.

Navzdory našemu očekávání, zvýšení vazebné afinity k IGF-1R bylo pozorováno pouze u analogu obsahující doménu D₂, kde bylo pozorováno více než dvojnásobné zvýšení.

Analog s připojenými jednou až čtyřmi aminokyselinami z domény C₂ vykazoval pouze střední zvýšení ve vazebné afinitě k IGF-1R a mírný pokles afinity k IR-A. Překvapivě jejich afinita a schopnost aktivace IR-B byly ekvipotentní nebo dokonce zvýšené oproti hodnotám přirozeného insulinu s výjimkou Ser31Lys32-insulinu.

- V druhé části projektu jsme se zaměřili na analogy IGF-2. Abychom byli schopni připravovat nové analogy IGF-2 zavedli jsme a následně zjednodušili nový protokol produkce IGF-2. Náš protokol využívá spontánního sbalení molekuly na Ni²⁺ koloně. Je jednoduchý a nákladově efektivní.

- První soubor IGF-2 analogů obsahoval unikátní mutace odvozené z IGF-1 v rámci domén B a C (tj. Asn26, Gly30-Ser31 a Pro35-Gln36). Zavedené mutace vykazovaly sníženou afinitu k IR-A ve srovnání s přirozeným IGF-2, zejména analog obsahující Pro-Gln insert, kde byl určen odsun smyčky C a její otevřenější konformace smyčky C pomocí NMR charakterizace. Nízká afinita k IR-A samostatného insertu nebyla dále prohloubena kombinací insertů (Gly-Ser, Pro-Gln). Proto specifická sekvence aminokyselin je přinejmenším stejně důležitá jako délka domény C u vazebné afinity k IR-A.

Žádná z vybraných záměn nedokázala obnovit vazebnou afinitu k IGF-1R. Avšak kombinace insertu Pro-Gln se substitucí Ser29Asn vedla k téměř dvojnásobnému zvýšení vazebné afinity. Podobně jako IR specifita IGF-2 směrem k IGF-1R je patrně určena kompozicí aminokyselin domény C spolu s dalšími důležitými determinanty spíše než jeho délkou.

Významně snížená afinita k IR-A spolu se zvýšenou afinitou IGF-1R u analogu Asn29,Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 vedla k 10násobnému zvýšení IGF-1R/IR-A vazebné specificity v porovnání s přirozeným IGF-2.

- Ze zamýšlených analogů se substitucí na pozicích 44,45 a 48 byly připraveny úspěšně pouze analogy Gln45-IGF-2, Gln45,His48-IGF-2 a His48-IGF-2. Vazebná potence k IGF-1R nebyla dramaticky změněna a byla zachována schopnost aktivovat receptor. Avšak všechny analogy lépe vázaly IR-A než IGF-2, zejména ty se substitucí His48. Oba His48-IGF-2 a His48, Gln45-IGF-2 váží IR-A nejlépe z dosud známých analogů. Pozoruhodně vysoká afinita analogu His48, Gln45-IGF-2 byla také pozorována pro IR-B. Tudiž pozice 48 v IGF-2 má důležitou roli ve vazebné afinitě k IR, podobně jako pozice A8 u insulinu. Schopnosti aktivovat receptor reflektovaly vazebné afinity. Původní záměr nebyl dosažen, jelikož antagonistický efekt substitucí HisA4, HisA8 je pravděpodobně limitován na interakci insulin-IR.
- Pozice 50, 53 a 57 u IGF-2 jsou relativně tolerantní k záměnám. Naše výsledky neposkytují jednoznačnou evidenci o úloze pozic 50, 52, 53 a 57 v IGF-2 v rámci interakce ve vazebné oblasti 2. Rozdílná odpověď IGF-1, IGF-2 a insulinu k záměnám na pozicích odpovídajících 53 a 57 podporují hypotézu, že každý hormon používá mírně odlišný způsob interakce s receptorem (IR, IGF-1R).

ABSTRACT

Insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) are related protein hormones with different but overlapping biological functions. All the hormones interact with a receptor within the insulin-IGF system (insulin receptor A and B, IGF-1 receptor), however with different affinity. The different interaction with individual receptors is just one of the main tools for regulation of the system that is essential for the proper functioning of the organism. The residues directly interacting with receptors are mainly located in A and B domains, however, the C and D domains probably play a role in receptor specificity. Here, we firstly focused on the impact of D domains of IGF-1 and 2 (D₁ and D₂ domains) and C domain of IGF-2 (C₂ domain). We prepared insulin analogues containing a part of or an entire domain following a pattern seen in IGFs. The receptor-binding affinities of these analogues and their receptor autophosphorylation potentials were characterised.

Our results revealed that the initial part of D₁ domain has a detrimental effect on IR affinity that is only slightly enhanced by the rest of the D₁ domain. D₂ domain has rather neutral effect on IR affinity. We further showed that the addition of amino acids derived from the C₂ domain to the C-terminus of the B-chain led to increased IR-B affinity and ability of its activation. This unexpected finding opens a new possibility of enhancement of IR-B specificity.

To prepare new IGF-2 analogues, we developed a novel and straightforward protocol of IGF-2 production. The first set of IGF-2 analogues contained unique IGF-1-like mutations in the B and C domains (i.e. Asn29, Gly30-Ser31, and Pro35-Gln36). All analogues exhibited significantly reduced affinity towards IR-A, particularly the analogues with a Pro-Gln insertion in the C domain where a displacement of the C-loop and more open C-loop conformation were confirmed by the NMR characterisation. The combination of Pro-Gln insertion and Ser29Asn mutation led to an almost 2-fold increase in IGF-1R affinity. Due to the decrease in IR-A affinity and concurrent increase in IGF-1R affinity, Asn29,Ser29(Pro-Gln)-IGF-2 showed an almost 10-fold higher IGF-1R/IR-A binding specificity compared to native IGF-2.

The second set of IGF-2 analogues were inspired by HisA4HisA8 insulin known for its disproportionate effects on IR binding and activation. We systematically modified IGF-2 positions 44, 45 and 48, which correspond to or are close to insulin sites A4 and A8. The IGF-1R and IR-A binding and autophosphorylation potencies of these analogues were characterised.

Of the intended analogues, Gln45-IGF-2, Gln45, His48-IGF-2, and His48-IGF-2 were successfully prepared. They retained the main IGF-1R-related properties, but the His48 substitution showed a high affinity for IR-A and for IR-B, leading to the strongest IGF-2 binders yet reported. All analogues activated IR-A and IGF-1R without major discrepancies between their ability of receptor activation and binding affinities. Thus, the disproportion between receptor affinity and the ability of its activation is probably specific for insulin-IR interaction.

Recently, CryoEM studies revealed details of insulin interaction with IR-A through binding sites 1 and 2. But this picture does not fully match the results of mutagenesis studies, as several “supposedly site 2 residues” were not included in the interaction. Therefore, in the last part of this project, we focused on the “neglected” site 2 residues (50, 52, 53, 57). We modified these residues in two ways for His or for a similar amino acid. The study revealed that IGF-2 positions 50, 53 and 57 are relatively tolerant to modifications. Our results did not provide ambiguous evidence on the role of positions 50, 52, 53 and 57 of IGF-2 in site 2 interactions. However, computational metadynamics of corresponding mutations in insulin indicate that these modifications can affect the internal dynamics and inhibit its ability to adopt receptor-bound conformation, which is mainly important for binding to receptor site 1.

INTRODUCTION

Insulin, together with insulin-like growth factors 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) are hormones with diverse biological activity (74,137,141,142). The matter of this project was to probe selected parts of insulin and IGF-2 molecules which could contribute to receptor specificity, as identification of the structural determinants responsible for receptor specificity offers an important therapeutic application.

The importance of C and D domains of IGFs

IGF-1 possesses a high affinity to IGF-1R and almost no affinity to both isoforms of IR, while IGF-2 is able to interact with IGF-1R and IR-A with high affinity (86,141,158). C and D domains are suspected to significantly contribute to different affinities and consequently the diverse biological activity of individual hormones. C and D domains are present in both IGFs. Mature insulin lacks C and D domains. The C-peptide of proinsulin is cleaved off during maturation and does not share any sequential similarity with the C domains of IGFs. Considering the poor affinity of proinsulin to IR, the C-peptide plays a role mainly during

maturation and folding, and contributes to other physiological functions (157). D domains are unique to IGFs only.

C and D domains of IGF-1 (C₁ and D₁ domains) are longer, compared to their counterparts in IGF-2 (C₂ and D₂ domains), but share several conserved positions (see Figure 1). The swapping of C and D domains between IGF-1 and 2 did not lead to any global structural changes (159).

Figure 1 - The comparison of sequence of individual domains in insulin and IGFs. The C and D domains of IGF-1 and 2 are depicted in detail.

		B										C										A										D																																												
Insulin	- -	F	V	N	Q	H	L	C	G	S	H	L	V	E	A	L	Y	L	V	C	G	E	R	G	F	F	Y	T	P	K	T	- - - - -	G	I	V	E	Q	C	C	T	S	I	C	S	L	Y	Q	L	E	N	Y	C	N	- - - - -																						
IGF-1	- - -	G	P	E	T	L	C	G	A	E	L	V	D	A	L	Q	F	V	C	G	D	R	G	F	Y	F	N	K	P	T	G	Y	G	S	S	R	R	A	P	Q	T	G	I	V	D	E	C	C	F	R	S	C	D	L	R	R	L	E	M	Y	C	A	P	L	K	P	A	K	S	A						
IGF-2	A	Y	R	P	S	E	T	L	C	G	G	E	L	V	D	T	L	Q	F	V	C	G	D	R	G	F	Y	F	S	R	P	A	-	S	R	V	-	S	R	R	S	-	-	R	-	-	R	G	I	V	E	E	C	C	F	R	S	C	D	L	A	L	L	E	T	Y	C	A	-	-	T	P	A	K	S	E

		C-domain										D-domain									
IGF-1	G	Y	G	S	S	S	R	R	A	P	Q	T	P	L	K	P	A	K	S	A	
IGF-2	-	S	R	V	-	S	R	R	S	-	-	R	-	-	T	P	A	K	S	E	

The C₁ domain in IGF-1 is crucial for binding and activation of IGF-1R (160). The necessity of the presence of the C₁ domain for proper binding to and activation of IGF-1R was confirmed in a study with IGF-1/IGF-2 hybrid analogues. While the presence of the D₁ domain in IGF-1 had only little impact on the binding affinity and activation of IGF-1R (159,160), the substitution of C₁ with C₂ domains decreased the affinity of the IGF-1 analogue to IGF-1R and its activation close to those of IGF-2. Surprisingly, both domains (C₁ and D₁) equally contributed to the increasing affinity of IGF-2 analogues to IGF-1R (2.9- or 2.6-fold higher affinity for C and D domains, respectively, as compared to native IGF-2) (159).

The C₂ and D₂ domains proved to be important also for binding to IR-A, as they increased the binding affinity of the IGF-1 analogue 1.9-fold (C₂ domain) and 1.5-fold (D₂ domain). The contribution of both domains was additive and resulted in an affinity close to that of IGF-2. The IGF-2 hybrid containing C₁ and D₁ had only a slightly higher IR-A affinity than IGF-1. The effect on activation of IR-A followed the pattern of binding abilities but was more pronounced. C and D domains also regulated affinity to IR-B in a similar way. However, the affinity to isoform B was lower than that to isoform A (159).

Mitogenic effect of D domains was evaluated in the insulin molecule, where the presence of the D₁ domain decreased the binding potency to IR to one-third (measured on rat adipocytes)

and the ability to stimulate glucose oxidation to 20 % of the activity of native insulin. On the other hand, the ability to incorporate thymidine into the DNA of human fibroblast was 2.8-fold higher than that of insulin (166). On the contrary, the D₂ domain itself was not sufficient to increase the mitogenic potency of insulin (167).

The contribution of both domains needs to be further investigated. Nevertheless, on the basis of the observed results, the C and D domains of both IGFs play a crucial role in receptor specificity. Regarding IGF-1R, the role of the C₁ domain exceeds the role of the D₁ domain. The C₂ domain promotes the affinity to IR-A compared to the C₁ domain (168). The presence of the D₁ domain has a detrimental effect on the affinity to IR-A and leads to an increase in the mitogenic potential, while the D₂ domain fails to have any mitogenic effect (167).

Insulin/IGFs substitution leading to disproportionate binding and activation ability

Modulation of biological activity of the insulin/IGF-system could be aimed either at binding-specific analogues or by the determination of the aspects leading to modification of signal intensity when the binding potency is not affected or only slightly affected. Specific antagonists of IR-A and mainly IGF-1R could serve as a useful tool in the treatment of a wide spectrum of diseases, as several types of cancer with poor prognoses are accompanied by IR-A and IGF-1R over-expression (89).

Schaffer et al. (169) prepared a series of peptides targeting site 1 or site 2 of the insulin receptor. They showed that covalent linkage of these fragments can lead to agonists or antagonists of the IR, depending on the linkage pattern. Consequently, Whittaker and colleagues (170) followed up their results and focused on insulin analogues with disproportionately impaired TK activation and binding affinity. The insulin analogue with His substitution at positions A4 and A8 (HisA4HisA8-insulin) showed a native IR binding affinity, but poor ability of IR activation. In human insulin, Glu and Thr are at positions A4 and A8, respectively. Glu at position A4 contributes to the classic binding site (binding site 1) (22,171). This position has not been strictly conserved during development. However, only mild mutations maintaining the negative charge (Asp) or similar size (Gln) can be seen in the insulin of other vertebrates (28). By the introduction of positively-charged His at this position, binding affinity, together with the ability to stimulate Akt activation and IR autophosphorylation, significantly decreased (170). Whittaker and colleagues proposed that interaction of GluA4 with Asp707 in the α CT-segment

of the insulin receptor probably contributes to the conformational changes leading to receptor activation.

Position A8 is less conserved. A wide pattern of amino acids is presented in vertebrate insulin. Introduction of His with the positive charge and bulkier side chain led to higher affinity to soluble human IR, also with higher efficacy of Akt activation and IR autophosphorylation (170). ThrA8 was considered as participating in the binding interaction on the basis of mutagenesis studies. The latest CryoEM analysis of the insulin –IR complex showed that ThrA8 is included in interactions at site 2 (114,117,119,123).

GluA4 in the insulin molecule has its equivalent in both IGFs, Asp45 (IGF-1) and Glu44 (IGF-2). The presence of Asp or Glu is in the frame of variability observed in the insulin of vertebrates (28) and further highlights the significance of the position within the insulin-IGF system.

To date, no analogue of IGF-1 or IGF-2 has been reported that acts as an antagonist of IGF-1R. The interesting properties of HisA4HisA8-insulin open up a further opportunity for analysing positions in IGF-1 and 2, which could lead to the modulation of antagonistic or agonistic properties.

Interaction of IGF-2 with binding site 2 of the receptor (IGF-1R /IR)

To date, there is no structure of the IGF-2/receptor (IR or IGF-1R) complex. It is proposed that IGF-2 uses similar mechanisms as insulin or IGF-1 when binding to cognate receptors. However, there are probably differences in the contribution of individual residues (126,128).

While the importance of site 1 is evident, it is still not clear how site 2 is important in the IGF-IGF-1R/IR interaction. This question is endorsed by the fact that IGFs bind a hybrid receptor with high affinity comparable to that of IGF-1R (96).

Alvino and colleagues (126) took advantage of sequence and structural similarity between insulin and IGFs and proposed IGF-2 site 1 and site 2 residues, inspired by known receptor-binding surface of the insulin molecule. The site 1 surface includes Val14, Gln18, Gly41, Ile42, Glu45, Phe48, Tyr59, Ala61, Gly25, Phe28, and residues Val43, Phe26, Tyr27 that were previously shown to be important for IR and IGF-1R and also IGF-2R binding (69). Site 2 residues supposedly consist of Glu12, Asp15, Phe19, Asp52, Leu53, and Glu5.

Ala substitution of original site 2 residues revealed that Ala substitution of Asp52 leads to a slight increase in affinity to both receptors (approx. 130 % of the native affinity of IGF-2 for both receptors), which indicates that this position is probably not crucial for binding interaction. Further, substitution of Asp15 leads to a marked decrease (more than 2-fold) in affinity to the mini IGF-1R construct that contains binding site 1 only. Furthermore, Asp15 is adjacent to Val14, Gln18 and hydrophobic residues that form site 1 (Val14, Phe28, Val43, Phe26 and Tyr27). Thus, it is proposed that Asp15 contributes to interaction at site 1 rather than at site 2. Unfortunately, the low affinity of IGF-2 to insulin the mini-receptor construct precludes evaluation of the interaction with site 1 only in IR.

Thus far, there are only a few analogues probing the affinity to binding site 2 or exploring the binding surface of site 2 on the IGF-2 molecule. Further analogues could shed some light on the importance of site 2 and consequently expand our knowledge about IGF-2 and its physiological role.

METHODS

Synthesis of Insulin Chains

The (un)modified A and B chains were prepared by total chemical solid-phase synthesis using Wang resin/ 2-chlorotrityl resin and Fmoc amino acids with protected side chains if needed. The synthesis was performed on an automatic solid-phase synthesizer (ABI 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA). Peptides were cleaved from the resin and converted to S-sulfonates subsequently. The chains with S-sulfonate protection were desalted on a Sephadex G10 column (4 cm × 85 cm) in 50 mM NH₄HCO₃ and purified using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Nucleosil C18 column, 250 mm × 21 mm, 5 μm).

Synthesis of Peptide Precursors

Short peptides were synthesised manually by a stepwise coupling of the corresponding Fmoc-protected amino acid on a 2-chlorotrityl resin. Synthesised peptides were cleaved from the resin with a DCM/AcOH/trifluoroethanol mixture (6/2/2). The peptides were purified using RP-HPLC (Nucleosil C18 column, 250 mm × 8 mm, 5 μm).

Recombination of Insulin Chains

The formation of disulphide bonds in insulin analogues has been performed as described previously in detail.^{1,2} The method takes advantage from the reduction of protected cysteines (S-sulfonate) to SH and subsequent oxidation. The resulting mixture was applied to a low-pressure column (Sephadex G-50 in 1 M acetic acid, 2 cm × 75 cm). The fractions containing analogues were purified using RP-HPLC (Nucleosil C18 column, 250 mm × 8 mm, 5 μm).

¹ Kosinova, L., Veverka, V., Novotna, P., Collinsova, M., Urbanova, M., Moody, N. R., Turkenburg, J. P., Jiracek, J., Brzozowski, A. M., and Zakova, L. (2014) Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry* 53, 3392–3402.

² Krizkova, K., Veverka, V., Maletinska, L., Hexnerova, R., Brzozowski, A. M., Jiracek, J., and Zakova, L. (2014) Structural and Functional Study of the GlnB22-Insulin Mutant Responsible for Maturity-Onset Diabetes of the Young. *PLoS One* 9 (11), e112883.

Enzymatic Semisynthesis

Analogues with modified C-terminus of the B-chain were prepared using enzymatic semisynthesis, where the des(B23–B30)-octapeptide-insulin (DOI) and respective peptides are coupled. Enzymatic semisynthesis takes advantage from the equilibrium during the enzymatic cleavage. The reaction was initiated by the addition of TPCK-treated trypsin.

Recombinant expression of IGF-2 analogues

New IGF-2 analogues were prepared by the novel method that is described in this thesis in detail.

Receptor Binding Studies

Human IR-A isoform

Receptor binding studies with the insulin receptor in membranes of human IM-9 lymphocytes (containing only the human IR-A isoform) were performed and K_d values determined according to the procedure described recently in detail by Morcavallo et al.¹ Binding data were analysed

using the Excel algorithms specifically developed for the IM-9 cell system in the laboratory of P. De Meyts (A. V. Groth and R. M. Shymko, Hagedorn Research Institute, Gentofte, Denmark) using a method of nonlinear regression and a one-site fitting program and taking into account potential depletion of free ligand.

¹ 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.

Human IR-B isoform

Receptor binding studies with the insulin receptor in membranes of mouse embryonic fibroblasts derived from IGF-1 receptor knockout mice that solely expressed the human IR-B isoform were performed as described in detail previously^{1, 2}. Binding data were analysed, (K_d) was determined with GraphPad Prism 5 using a method of nonlinear regression and a one-site fitting program and taking into account potential depletion of free ligand.

¹ Kosinova, L., Veverka, V., Novotna, P., Collinsova, M., Urbanova, M., Moody, N. R., Turkenburg, J. P., Jiracek, J., Brzozowski, A. M., and Zakova, L. (2014) Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry* 53, 3392–3402

² Zakova, L., Kletvikova, E., Lepsik, M., Collinsova, M., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Jiracek, J., and Brzozowski, A. M. (2014) Human insulin analogues modified at the B26 site reveal a hormone conformation that is undetected in the receptor complex. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 70, 2765–2774

Human IGF-1R

Receptor binding studies with the IGF-1 receptor in membranes of mouse embryonic fibroblasts derived from IGF-1R knockout mice and transfected with human IGF-1R were performed as described previously¹. Binding data were analysed and the dissociation constants determined by the same method that was used for IR-B.

¹ Kosinova, L., Veverka, V., Novotna, P., Collinsova, M., Urbanova, M., Moody, N. R., Turkenburg, J. P., Jiracek, J., Brzozowski, A. M., and Zakova, L. (2014) Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. *Biochemistry* 53, 3392–3402

Stimulation of Cells

Cells (cell lines R+39, R-/IR-A, and R-/IR-B) were incubated in DMEM for 24 h. Cells were afterward starved for 4 h in serum-free medium. A ligand (insulin, IGF-1, IGF-2, or an analogue) at final concentrations of 10^{-8} M was added to the medium in each well for 10 min.

Immunoblotting

Cells were lysed by sonication. Cell extracts were separated on 10% SDS–polyacrylamide gels and electroblotted to a PVDF membrane. The membranes were probed with the following antibodies: anti-phospho-IGF-1R β subunit (Tyr1131)/IR β (Tyr1146), (Cell Signaling Technology), anti-human IR β subunit (Invitrogen), and anti-IGF-1R β subunit (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The blots were developed using the SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce) and analyzed using the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

CD spectra

Circular Dichroism CD spectra were measured in a quartz cuvette with an optical path length of 0.5 mm (Starna Cells) using a J-815 spectropolarimeter (Jasco, Japan) at room temperature. The far- and near-UV CD spectra were used to identify changes in protein secondary and tertiary structures. The spectral regions were 200–300 nm.

NMR spectroscopy

All NMR data for free IGF-II and analogues were acquired using 600- and 850-MHz Bruker Avance II spectrometers, both of which were equipped with $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ cryoprobes in v 50mM d_4 acetic acid, 5% D_2O and 0, 01% NaN_3 . Signal perturbation were monitored by chemical shift.

To confirm the correct fold of IGF-II analogues, 1D ^1H spectra (unlabelled samples) and 2D ^1H - ^{15}N HSQC spectra were acquired.

RESEARCH AIMS

- Completion of the set of insulin analogues with added amino acids derived from the C₂ domain and evaluation of the impact of C₂, D₁, and D₂ domains of IGF on the affinity to IR and IGF-1R and the ability of their activation
- Simplification of the novel method of IGF-2 production leading to a completely native IGF-2 molecule
- Completion of the set of IGF-2 analogues containing IGF-1-like motifs derived from B and C domains of IGF-1; evaluation of the impact of these mutations on IR and IGF-1R potency
- Preparation of IGF-2 analogues with substitution in positions 44, 45 and 48 and their characterisation with a focus on antagonistic effects
- Evaluation of the role of positions 50, 52, 53, and 57 in interactions at site 2 on IR and IGF-1R

RESULTS AND DISCUSSION

1. The role of D₁, D₂, and C₂ domain in binding specificity

In the first part of the project, we prepared hybrid insulin analogues with extension derived from D₁, D₂ and C₂ domains. Insulin is a high affinity maternal ligand for both IR; therefore, it represents a sensitive probe for evaluation of the role of individual domains or its parts, ignoring the difference in A and B domains between IGFs and insulin. To probe the effect of C and D domains, we prepared 1) insulin analogues with the extended C-terminus of the A-chain by amino acids from D₁ and D₂ domains (Analogues 1-3); 2) insulin analogues with the C-terminus of the B-chain extended by amino acids mimicking the C₂ domain (Analogues 4-7).

Table 1 - Insulin analogues

	Structure
Analogue 1	AlaA21Pro-Leu-LysA24-insulin
Analogue 2	AlaA21Pro-Leu-Lys-Pro-Ala-Lys-Ser-AlaA24-insulin
Analogue 3	AlaA21Trp-Pro-Ala-Lys-Ser-GluA24-insulin
Analogue 4	SerB31-insulin
Analogue 5	SerB31-LysB32-insulin
Analogue 6	SerB31-Lys-ValB33-insulin
Analogue 7	SerB31-Lys-Val-SerB34-insulin

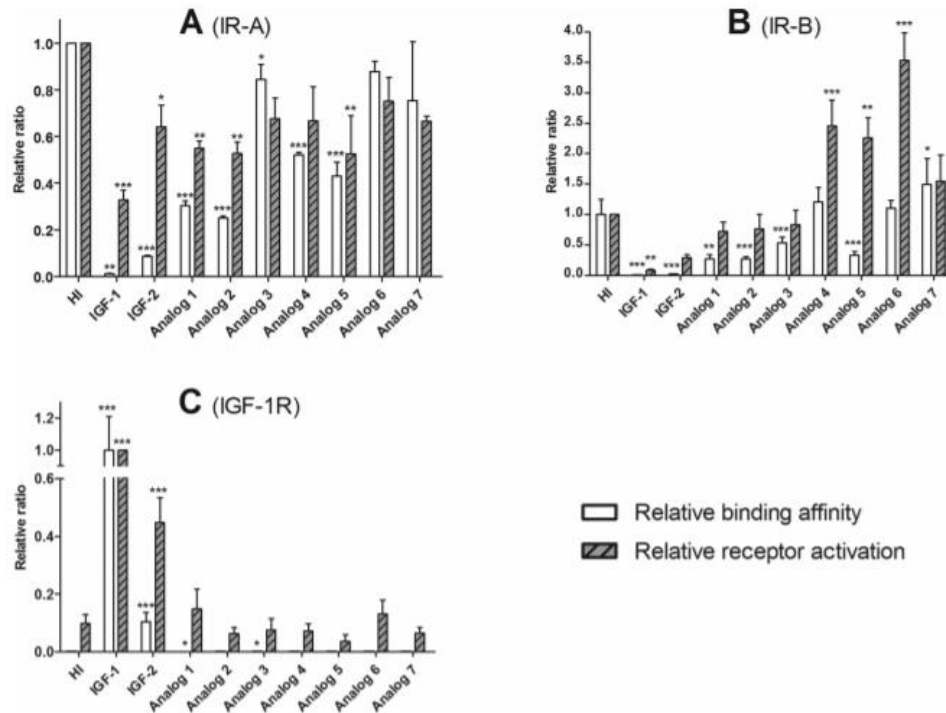
Addition of D₁ and D₂ domain amino acids had a negative impact on binding potency to IR, which is in accordance with previous studies (160,163,167). As we expected, the D₁ domain had a more negative impact on binding to IR (25-30 % of the affinity of insulin) than the D₂ domain (53-85 %). The initial sequence (Pro-Leu-Lys) of D₁ domain showed the main detrimental effect which was only slightly pronounced by the presence of the entire domain. The results further revealed that the initial part of the D₁ sequence contributes to different affinity of IGF-1 to IR-A and IR-B.

Therefore, we assume that the negative effect of the D₁ domain on IR affinity is caused by its initial specific sequence (Pro-Leu-Lys), which is unique to IGF-1 and probably determines a specific conformation. The D₂ domain has a rather neutral role in binding to IR-A and at least a slightly negative role in interaction with IR-B. The different binding affinities were not translated into the different ability of receptor activation.

Despite our expectations, the increase in binding affinity was observed only in the analogue containing D₂ domain, where a more than 2-fold increase was observed. These results agreed with the hypothesis suggesting that the D₁ domain itself does not play a critical role in IGF-1R binding (159) and D₂ domain does not have a deleterious effect on IGF-1R binding (167). However, this may also indicate that the insulin molecule is not sufficiently sensitive or a suitable probe for IGF-1R. Our results underline that the role of D domains is evidently different in the context of IR and IGF-1R.

The other set of analogues contained analogues which extended the C-terminus of the B-chain with amino acids derived from the C₂ domain. We originally proposed preparing analogues containing parts or the entire C₂ domain, as we did in the case of analogues with the D domains. However, the low solubility of peptides did not allow us to do so. Therefore, we prepared analogues with one to four initial C₂ domain-derived amino acids. As the amino acids were derived from the C₂ domain, we expected that their addition to the insulin molecule would increase the mitogenic properties of analogues. However, only a moderate and non-significant increase in the binding affinities to IGF-1R (104 – 150 %) and a slight decrease in the IR-A affinity (43-88%) were noted, with the ability of receptor activation reflecting the binding potencies. The affinities to IR-B were much more surprising. Despite the presence of C₂-derived amino acids, the affinity and ability of IR-B activation were equipotent or even increased (Figure 2), with only the exception of Analogue 5 (SerB31LysB32-insulin) (33 % of the binding affinity of insulin), where the negative effect could be caused by a positively-charged C-terminal Lys. The high affinity to IR-B revealed the important fact that the C-terminus of the B-chain could be a target for increasing potency to IR-B and consequently for receptor selectivity. These results are supported by papers demonstrating the increase in IR-B-specificity through modifications in the C-terminus of the B-chain (102,146,177).

Figure 2 - Comparison of relative binding affinities (white bars) for IR-A (A), IR-B (B), and IGF-1R (C) and relative abilities to activate these receptors (grey bars) of human insulin (HI), IGF-1, IGF-2, and insulin analogues containing sequences derived from the D domain of IGF-1 (1 and 2) or IGF-2 (3) or from the C domain of IGF-2 (4–7). The experimental values are related to the binding potency and biological activity of HI (for IRA and IR-B) or IGF-1 (for IGF-1R). Asterisks indicate that binding of the ligand or autophosphorylation of a particular receptor induced by the ligand differs significantly from that of insulin (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



The data are included in the following publication:

Křížková K., Chrudinová M., Povalová A., Selicharová I., Collinsová M., Vaněk V., Brzozowski A.M., Jiráček J., and Žáková L. 2016. “Insulin-Insulin-like Growth Factors Hybrids as Molecular Probes of Hormone: Receptor Binding Specificity.” *Biochemistry* 55 (21): 2903–13.

2. Recombinant production of IGF-2 analogues

IGF-1 and IGF-2 analogues were produced by recombinant expression in *Escherichia coli* as a fusion with an N-terminal and cleavable His₆-tagged GB1 protein (immunoglobulin binding domain B1 of streptococcal Protein-G). The method takes advantage of the on-column refolding step initiated by the one-step transition from denaturing and reducing conditions to non-denaturing and non-reducing conditions. Subsequent cleavage of the fusion protein and His-tag yields a completely native IGF-2 molecule, without any additional amino acids. The correct

structure was confirmed by HPLC retention time, $^1\text{H-}^{15}\text{NHSQC}$, CD spectra, and binding affinities to cognate receptors (IR-A, IGF-1R).

The details of the new method are included in the following publications:

Hexnerová R., **Křížková K.**, Fábry M., Siegllová I., Kedrová K., Collinsová M., Ullrichová P., Srb P., Williams C., Crump M.P., Tošner Z., Jiráček J., Veverka V., and Žáková L. 2016. “*Probing Receptor Specificity by Sampling the Conformational Space of the Insulin-like Growth Factor II C-Domain.*” *Journal of Biological Chemistry* 291 (40): 21234–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741041>

Macháčková K., Chrudinová M., Radosavljević J., Potalitsyn P., **Křížková K.**, Fábry M., Selicharová I., Collinsová M., Brzozowski A.M., Žáková L. and Jiráček J. 2018. “*Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation.*” *Biochemistry* 57 (16): 2373–82. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01260>.

3. The role of C domain in IGF-2 binding specificity

To gain a greater insight into the structural basis of IGF-2 binding specificity to IR-A and IGF-1R, we generated a series of mutants containing amino acid substitution within the B and particularly C domains. The recent structure of bound IGF-1 to the IGF-1R/IR complex revealed that the structural rearrangement of the C₁ domain is probably necessary to prevent unfavourable steric clashes during the binding. Therefore, we probed the role of two parts of the C₁ domain. The introduced insertions were chosen to counterbalance the different lengths of the C₁ and C₂ domains (Gly-Ser; Pro-Gln). Apart from that, Pro-Gln insertion also represents a marked structural aspect of the C₁ domain. Ser29Asn substitution was chosen as a novel IGF-1 derived mutation. Corresponding residue in IGF-1 (Asn26) was captured to the binding site 1 of IGF-1 (117). In total, 6 analogues were designed. The modifications were as follows: 1) a point mutation at position Ser29(Asn29-IGF-2); 2) an insertion of dipeptide Gly-Ser after Arg34 (Arg34(Gly-Ser)-IGF-2); 3) an insertion of dipeptide Pro-Gln after Ser39 (Ser39(Pro-Gln)-IGF-2); 4) a combination of both insertions; 5) a combination of the Asn29 mutation with the Pro-Gln insertion; 6) a combination of the Asn29 mutation with both insertions.

By introducing the IGF-1-like mutations, we aimed to shift the binding properties of the analogues towards those of IGF-1 and concurrently to explore the impact of individual aspects on the binding specificity. As expected, all modifications led to significantly impaired IR-A binding. The Asn29-IGF-2 B domain mutant gave a 2-fold reduction in IR-A affinity and the insertions in the C domain exhibited even stronger negative effects. All analogues bearing the

Pro-Gln motif showed low affinity to IR-A (1.1 to 1.8% of insulin affinity). Interestingly, this reduction was greater than the effect of swapping the entire C₂ for C₁ domain (3.7-fold) (159). Further combinations did not appear to have any additive effect. This indicates that despite the undeniable role of the length of C₁ versus C₂ domains, the specific amino acid sequence is at least as important as the length. In this context, attention should be paid to the role of Pro36 (IGF-1 sequence, reflected in Pro-Gln insertion) which introduces a specific structural aspect to the C₁ domain. Our assumption was confirmed in NMR studies which revealed that the Pro-Gln insertion leads to a displacement of the C-loop and more open C-loop conformation compared to the native IGF-2. A comparable decrease in IR-A binding affinities of Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 and Asn29,Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 also indicates that it is caused mainly by their similarly altered C-loop structures rather than Ser29Asn replacement, which was relatively well tolerated by IR-A.

Interestingly, an insertion of IGF-1-like features generally led to a moderate decrease of binding potency to IGF-1R. One exception was a combination of Asn29 mutation and a Pro-Gln insertion, which resulted in an almost 2-fold increase in binding potency (18.8 % versus 10.9 % of native IGF-2). Surprisingly, neither Asn29 mutation nor Pro-Gln insertion itself increased the binding affinity to IGF-1R compared to the native IGF-2. Asn29,Ser29(Pro-Gln)-IGF-2, together with its markedly lowered affinity for IR-A and increased binding affinity toward IGF-1R, resulted in an almost 10-fold enhanced IGF-1R/IR-A binding specificity in comparison with IGF-2.

Besides the aforementioned substitutions, there are other important determinants (e.g. IGF-1 Tyr31) (165,178,179) which, on their own or in combination, are crucial for the high affinity interaction toward IGF-1R. Taking together, we suppose that IGF-2 specificity toward IGF-1R is determined by the amino acid composition of the C domain together with other important determinants, rather than by the length of the C domain. The binding affinities are showed in Table 2.

Table 2 - The receptor binding affinities of hormones and IGF-2 analogues reported in this work

Analogue	Relative binding affinity for human IR-A [%]	Relative binding affinity for human IGF-1R [%]
Insulin	100±5;100±8	0.08±0.01 ^a
IGF-1	1±0.3 ^b	100±21 ^a ; 100±4
Commercial IGF-2	8.2±0.4 ^b	10.8±3.3 ^b
IGF-2	7.9±0.7	10.9±5.0
Asn29-IGF-2	4.2±0.4	5.3±1.3
Arg34(Gly-Ser)-IGF-2	2.8±1.1	5.8±1.3
Ser29(Pro-Gly)-IGF-2	1.1±0.1	4.8±1.1
Arg34(Gly-Ser),Ser29(Pro-Gly)-IGF-2	1.8±0.4	4.2±1.6
Asn29,Ser29(Pro-Gly)-IGF-2	1.4±0.3	18.8±5.1
Asn29,Arg34(Gly-Ser)	1.2±0.3	7.8±2.7
Ser29,(Pro-Gly) -IGF-2		

^afrom Vikova et al (102)

^bfrom Krizkova et al (101)

Two IGF-2 analogues with the most pronounced impact on receptor binding, Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 (lowest IR-A and IGF-1R binding) and Asn29,Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 (decreased in the IR-A and enhanced IGF-1R affinity) were selected for NMR characterisation. Results revealed that both analogues preserved their overall structural organisation. The C domain insertion led to a significant change in its conformational space, with the main differences residing between residues 29 and 42. Insertion of Pro-Gln after Ser39 led to increased conformational freedom within the C-loop that generated a rearrangement stabilised by several new packing interactions.

The data are included in the following publication:

Hexnerová R., **Křížková K.**, Fábry M., Siegllová I., Kedrová K., Collinsová M., Ullrichová P., Srb P., Williams C., Crump M.P., Tošner Z., Jiráček J., Veverka V., and Žáková L. 2016. “*Probing Receptor Specificity by Sampling the Conformational Space of the Insulin-like Growth Factor II C-Domain.*” *Journal of Biological Chemistry* 291 (40): 21234–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741041>

4. The role of positions 44, 45 and 48 and their characterisation with a focus on antagonistic effects

Analogues with high receptor specificity but also those exhibiting a disproportion between receptor affinity and the ability of its activation have medical potential as IGF-2 overproduction has been associated with poor prognosis in cancer or other diseases (180). Recently, it was reported that a combination of GluA4His and ThrA8His mutations results in an insulin analogue with native IR-A binding affinity, but poor ability to stimulate IR autophosphorylation and downstream Akt activation (170). Corresponding positions to A4 in insulin are Asp45 and Glu44 in IGF-1 and 2, respectively. A neighbouring position in insulin is neutral GlnA5, contrary to Glu (44/45, 45/46) which is present in both IGFs.

Here, we focused on IGF analogues with mutations at positions corresponding to or closely related to A4 and A5. Three types of mutations were planned 1) substitution of the residues at positions 44 and 45 for Ala; 2) their substitution for His; 3) substitution of the acids by corresponding amides (e.g. Glu→Gln). These mutations were also planned to combine with the Phe48His substitution as it has been shown that the insulin corresponding mutation ThrA8His significantly increased IR-A binding potency. However, the low solubility during the folding step precluded preparation of the majority of analogues. Only three of the originally planned IGF-2 analogues were successfully prepared. These were Gln45-IGF-2, Gln45,His48-IGF-2, and His48-IGF-2.

The introduced mutations did not dramatically alter the binding affinities to IGF-1R. Gln45 substitution decreased the binding potency to one-half of the native IGF-2 and the His48 substitution increased the binding potency almost 2-times (18.8% of the IGF-1 affinity). Interestingly, the combination of both mutations exhibited the same binding potency as a single His48 substitution did. Despite the difference seen in the binding potencies, all analogues activated IGF-1R similarly to that which native IGF-2 did. Interestingly, different trends were observed for the His48 substitution in IGF-1 and 2. While in IGF-2 this mutation led to an increase in binding affinity to IGF-1R, the corresponding substitution (His49) had a rather negative effect on the binding potency to IGF-1R in IGF-1 (68 %). This indicates the different nature of interactions of IGF-1 and IGF-2 with IGF-1R, at least at this position.

The changes in affinities to IR-A were much more fascinating. All analogues are better IR-A binders than the native molecule. The most pronounced change was seen in the analogue with

single His48 substitution (59 % of the insulin affinity). Although Gln45 substitution also led to the increase in the IR-A affinity in comparison with IGF-2 (20 % of the insulin affinity), the combination of both substitutions did not lead to a synergistic effect. Nonetheless, both His48-IGF-2 and His48,Gln45-IGF-2, to our knowledge, are the strongest IR-A binders reported to date. The remarkably high affinity of His48,Gln45-IGF-2 was also seen for IR-B, where the analogue reached almost 12 % of the binding affinity of insulin (8-fold stronger than the native IGF-2). Although we expected the increase in IR binding affinity by the introduction of His48 as the corresponding substitution in insulin (HisA8) to increase the affinity to IR (181–184), the scope of the impact is surprising.

Our data demonstrate the greater impact of the substitution on the interaction with IR than IGF-1R. This may indicate a different binding surface at site 2 interactions in both receptors, but also a diverse role of site 2 interaction for IR and IGF-1R. While in IR the role of site 2 is undeniable, it is not completely elucidated in the case of IGF-1R (96,152). The other possibility is also that His at this position enhances some contacts with elements of site 1 interactions which are more favourable for IR rather than IGF-1R.

We did not meet the original goal to design analogues with disproportionate character between binding affinity and ability of receptor activation. Thus, the observed significant disproportionate binding and activation of insulin analogues mutated at A4 and A8 (170) are probably specific to and limited to insulin-IR interactions.

Table 3 - IR-A and IGF-1R binding affinities of native hormones and analogues

	relative binding affinity for human IGF-1R (%) relative to IGF-1	relative binding affinity for human IR-A (%) relative to HI
Human IGF-1	100±37 ^a	
	100±12 ^b	
Human insulin		100±20 ^c
		100±28 ^d
		100±43 ^e
Human IGF-2	10.9±5.7*	8.6±0.6 ^c
First series of IGF-2 analogues		
Gln45-IGF-2	5.5±0.6* ^a	20±3.8

Second series of IGF-2 analogues

His48-IGF-2	18.2±4.7 ^a	59.3±14.3
Gln45,His48-IGF-2	18.0±1.0 ^a	46.2±8.5 ^e

*p < 0.05

^aRelative to the human IGF-1 K_d value of 0.16 ± 0.06 (n= 3).

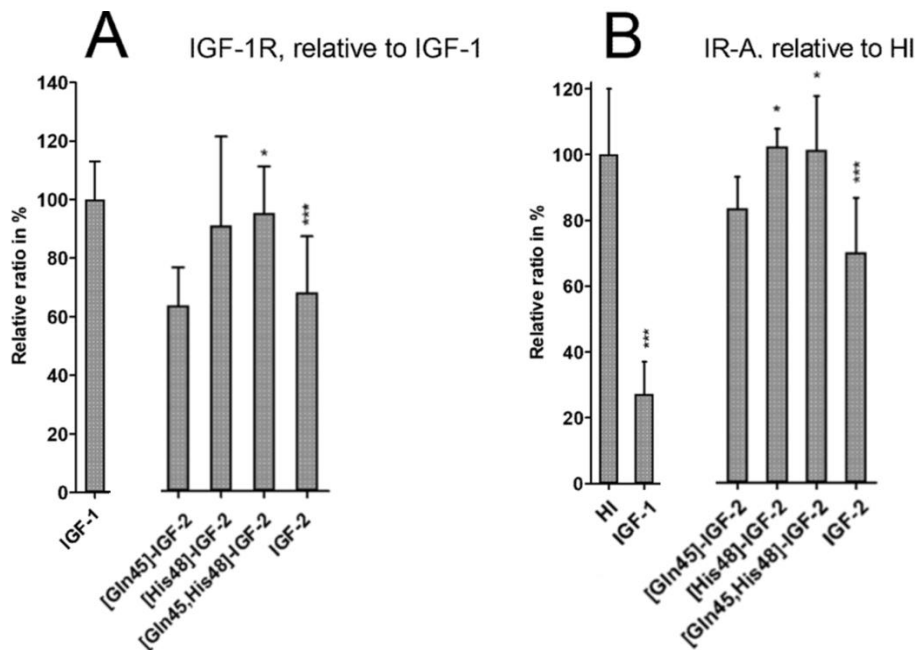
^bRelative to the human IGF-1 K_d value of 0.25 ± 0.03 (n = 4)

^cRelative to the human insulin K_d value of 0.25 ± 0.05 (n = 5)

^dRelative to the human insulin K_d value of 0.32 ± 0.09 (n = 4)

^eRelative to the human insulin K_d value of 0.30 ± 0.13 (n = 5)

Figure 3 - Relative abilities to activate (A) IGF-1R and (B) IR-A of human insulin (HI), human IGF-1, and IGF-2, and IGF-1 and IGF-2 analogues. Mean ± SD values were calculated from four independent experiments (n = 4). In panel A, the experimental values are related to the biological activity of IGF-1. In panel B, the experimental values are the biological activity of HI. Asterisks indicate that induction of autophosphorylation of a particular receptor induced by a ligand differs significantly (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001) from the effect of IGF-2. In panel A, the significance of the effect of native IGF-2 (asterisks) is related to human IGF-1, and in panel B to human insulin. In panel B, the significance of the effect of native IGF-1 (asterisks) is related to human insulin.



The data are included in the following publication:

Macháčková K., Chrudinová M., Radosavljević J., Potalitsyn P., **Křížková K.**, Fábry M., Selicharová I., Collinsová M., Brzozowski A.M., Žáková L. and Jiráček J. 2018. "Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation." *Biochemistry* 57 (16): 2373–82. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01260>.

5. The role of “neglected site 2 amino acids” in the interaction at site 2

Recently, two studies provided insight into the site 2 interactions of insulin with IR-A (114,123). The studies restricted site 2 to ThrA8, CysA7, GlnB4–GlyB8, HisB10, and GluB13 residues in the insulin molecule and to the FnIII-1 domain on the receptor molecule. These structural results, however, do not fully match the results of mutagenesis studies with insulin that also assumed involvement of amino acids IleA10, SerA12, LeuA13 and GluA17.

Therefore, we focused on these “neglected” insulin residues IleA10, SerA12, LeuA13, and GluA17 and prepared a series of mutants to study their interactions with the receptors. In parallel, similar mutations were prepared in homologous positions of IGF-1 and IGF-2 (positions Ser51/50, Asp53/52, Leu54/53 and Glu58/57).

We intended to mutate each position in two ways. We either introduced a homologous exchange; i.e. Leu→Val, Ser→Thr, Glu→Asp and Asp→Glu or exchanged the wild-type amino acid for His. IGF-2 analogues were prepared in *E. coli* cells as described previously (158,175). Neither of the intended analogues with substitution in position 52 of IGF-2 was successfully prepared. It seems that this position is important for folding of the molecule. This hypothesis is also supported by the fact that only ThrA12-insulin was prepared. In addition, His57-IGF-2 was not successfully prepared, despite many attempts. However, on the contrary, Asp57-IGF-2 was prepared in a sufficient quantity. Although we were not able to prepare analogues with substituted position 52, the mutation of the corresponding position in insulin together with available data do not indicate any crucial role of this position in binding to receptors (IR, IGF-1R) or their activation.

All IGF-2 analogues tolerated the substitutions at positions 50 and 53 relatively well. Asp57-IGF-2 bound the IR (A/B) similarly or slightly better than the native molecule. The affinity to IGF-1R was even stronger (see Table 4). Interestingly, homologous Glu-to-Asp mutations at position 58 in IGF-1 and position 57 in IGF-2 resulted in different biological effects. Glu-to-Asp change at position 58 of IGF-1 had reducing effects on the analogue’s binding affinities and especially for IGF-1R.

Table 4 - Simplified overview of relative receptor-binding affinities of IGF-2 analogs; the relative binding affinities are shown in % of the native hormone, which has 100 % binding affinity for the specific receptor

Position in the native hormone	Analog	Result of production	Binding affinity (in % of the native hormone) for		
			IR-A	IR-B	IGF-1R
Ser50-IGF-2	Thr50-IGF-2	+	78	153	264
	His50-IGF-2	+	100	68	136
Asp52-IGF-2	Glu52-IGF-2	-	nd	nd	nd
	His52-IGF-2	-	nd	nd	nd
Leu53-IGF-2	Val53-IGF-2	+	72	37	145
	His53-IGF-2	+	51	84	182
Glu57-IGF-2	Asp57-IGF-2	+	106	166	200
	His57-IGF-2	-	nd	nd	nd

We also employed molecular dynamics (MD) analysis for insulin analogues modified at positions A10, A12, A13 and A17 to analyse the effect of mutations on the dynamics of the insulin molecule, especially the crucial detachment of the B-chain C-terminus. MD indeed revealed that the dynamics of the low-affinity His-mutants are qualitatively different in that they are less likely to assume conformation with the detached B-chain C-terminus compatible with IR-binding.

The results of computational metadynamics demonstrated that mutations can affect the internal dynamics of insulin and inhibit its ability to adopt receptor-bound conformation, which is important for binding to receptor site 1. These results are in good agreement with the hypothesis of Weis and colleagues, who predicted that A12, A13, A17 and B17 residues can play a role during the initial docking of insulin to the receptor (123). This partially explains the significant and different impact of mutation at these positions which are hormone receptor-specific.

Overall, considering all the data, we show that insulin's positions A10, A13 and A17 are important for the biological activity of the hormone. Positions 51/50 and 54/53 of IGF-1/IGF-2 probably do not play any important role in receptor binding. We propose that position 58 in IGF-1 may be involved in direct interaction with site 1 of the IGR-1R.

The data are included in the following publication:

Macháčková K., **Mlčochová K.**, Potalitsyn, P., Hanková K., Socha O., Buděšínský M., Muždalo A., Lepšík M., Černeková M., Radosavljević J., Fábry M., Mitrová M., Chrudinová M., Lin L., Yurenko J., Hobza P., Selicharová I., Žáková L. and Jiráček J. (2019). “Mutations at hypothetical binding site 2 in insulin and insulin-like growth factors 1 and 2 result in receptor- and hormone-specific responses.” *Journal of Biological Chemistry* 294, *in press*

CONCLUSION

- The role of D domains is evidently different in the context of IR and IGF-1R. The addition of the D₁ domain to insulin had a negative effect on binding affinities to IR. The negative effect is mainly caused by its initial sequence (Pro-Leu-Lys) which is unique to IGF-1 and probably determines a specific conformation. Further, the initial part of the D₁ domain is probably an important factor for different IR-A versus IR-B affinity. The D₂-domain had a neutral role in binding to IR.

Despite our expectations, the increase in binding affinity to IGF-1R was observed only in the analogue containing D₂ domain, where a more than 2-fold increase was observed.

Analogues with attached one to four initial C₂ domain-derived amino acids exhibited only a moderate increase in the binding affinities to IGF- and a slight decrease in the IR-A affinity. Surprisingly, their affinity to and ability of IR-B activation were equipotent to or even increased compared to native insulin with only the exception of Ser31Lys32-insulin.

- In the second part of the project, we focused on IGF-2 analogues. To be able to prepare new IGF-2 analogues, we established and subsequently simplified a novel protocol of IGF-2 production. Our protocol takes advantage of the spontaneous folding on a Ni²⁺ column. It is user-friendly and cost-effective.

- The first set of IGF-2 analogues contained unique IGF-1-like mutations in the B and C domains (i.e. Asn26, Gly30-Ser31, and Pro35-Gln36). The introduced mutations showed reduced IR-A affinity compared to native IGF-2, especially analogues containing Pro-Gln insertion where a displacement of the C-loop and more open C-loop conformation was determined by the NMR characterisation. The low IR-A affinity of single insertion (Pro-Gln)

was not further pronounced in a combined insertion (Gly-Ser, Pro-Gln). Therefore, the specific amino acid sequence is at least as important as the length of domain C in IR-A affinity.

Neither of our selected changes was sufficient to recover IGF-1-like binding affinity to IGF-1R. However, the combination of the Pro-Gln insertion with Ser29Asn substitution led to an almost 2-fold increased binding affinity. Similarly to IR, the IGF-2 specificity toward IGF-1R is probably determined by the amino acid composition of the C domain together with other important determinants rather than by its length.

The markedly lowered affinity for IR-A together with increased binding affinity toward IGF-1R in Asn29,Ser39(Pro-Gln)-IGF-2 led to a 10-fold enhanced IGF-1R/IR-A binding specificity in comparison with IGF-2.

- Of the intended analogues with substitution in positions 44, 45 and 48, Gln45-IGF-2, Gln45,His48-IGF-2, and His48-IGF-2 were successfully prepared. The binding potency to IGF-1R was not dramatically altered and the ability of receptor activation remained unaffected. However, all analogues were better IR-A binders than IGF-2, especially those with His48 substitution. Both His48-IGF-2 and His48, Gln45-IGF-2 are the strongest IR-A binders reported so far. The remarkably high affinity of His48, Gln45-IGF-2 was also seen for IR-B. Thus, position 48 in IGF-2 has an important role in IR affinity, similarly to position A8 in insulin. The ability of receptor activation reflected binding potencies. The original intention was not met, as the antagonistic effect of HisA4, HisA8 substitutions is probably limited to insulin–IR interaction.

- Positions 50, 53, and 57 in IGF-2 are relatively tolerant to modifications. Our results did not provide unambiguous evidence on the role of positions 50, 52, 53 and 57 of IGF-2 in site 2 interactions. The different response of IGF-1, IGF-2 and insulin to modification at corresponding positions to 53 and 57 endorses the hypothesis that each hormone uses a slightly different way in interaction with the receptor (IR, IGF-1R).

REFERENCE/REFERENCES

1. Dull TJ, Gray A, Hayflick JS, Ullrich A. Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature*. 1984 Sep 30;310(5980):777–81.
2. Hua Q, Mayer JP, Jia W, Zhang J, Weiss MA. The Folding Nucleus of the Insulin Superfamily a flexible peptide model foreshadows the native state. *J Biol Chem*. 2006 Sep 22;281(38):28131–42.
3. Murray-Rust J, McLeod AN, Blundell TL, Wood SP. Structure and evolution of insulins: implications for receptor binding. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 1992 May;14(5):325–31.
4. Bathgate RAD, Samuel CS, Burazin TCD, Layfield S, Claasz AA, Reytomas IGT, et al. Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1148–57.
5. Burkhardt E, Adham IM, Hobohm U, Murphy D, Sander C, Engel W. A human cDNA coding for the Leydig insulin-like peptide (Ley I-L). *Hum Genet*. 1994 Jul;94(1):91–4.
6. Conklin D, Lofton-Day CE, Haldeman BA, Ching A, Whitmore TE, Lok S, et al. Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics*. 1999 Aug 15;60(1):50–6.
7. Lu C, Lam HN, Menon RK. New members of the insulin family: regulators of metabolism, growth and now ... reproduction. *Pediatr Res*. 2005 May;57(5 Pt 2):70R-73R.
8. Wu Q, Brown MR. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu Rev Entomol*. 2006;51:1–24.
9. Shabanpoor F, Separovic F, Wade JD. The human insulin superfamily of polypeptide hormones. *Vitam Horm*. 2009;80:1–31.
10. Iwami M. Bombyxin: An Insect Brain Peptide that Belongs to the Insulin Family. *Zoolog Sci*. 2000 Nov 1;17(8):1035–44.
11. De Meyts P, Sajid W, Palsgaard J, Theede AM, Gauguin L, Aladdin H, et al. Insulin and IGF-I receptor structure and binding mechanism. *Mech Insul Action Med Intell Unit*. 2007;1–32.
12. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279029/>
13. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 2009 Oct;30(6):586–623.
14. Ward CW, Lawrence MC. Landmarks in Insulin Research. *Front Endocrinol*. 2011 Nov 22;2.
15. Weiss MA. The structure and function of insulin: decoding the TR transition. *Vitam Horm*. 2009;80:33–49.
16. Derewenda U, Derewenda Z, Dodson EJ, Dodson GG, Reynolds CD, Smith GD, et al. Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*. 1989 Apr 13;338(6216):594–6.
17. Jacoby E, Krüger P, Karatas Y, Wollmer A. Distinction of structural reorganisation and ligand binding in the T \rightleftharpoons R transition of insulin on the basis of allosteric models. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1993 Sep;374(9):877–85.
18. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2273–89.
19. Lundquist I, Ekholm R, Ericson LE. Monoamines in the pancreatic islets of the mouse. 5-hydroxytryptamine as an intracellular modifier of insulin secretion, and the hypoglycaemic action of monoamine oxidase inhibitors. *Diabetologia*. 1971 Dec;7(6):414–22.
20. Ustione A, Piston DW, Harris PE. Minireview: Dopaminergic regulation of insulin secretion from the pancreatic islet. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2013 Aug;27(8):1198–207.
21. Culina S, Brezar V, Mallone R. Mechanisms in endocrinology: Insulin and type 1 diabetes: immune connections. *Eur J Endocrinol*. 2013 Feb 1;168(2):R19–31.
22. Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, et al. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1988 Jul 6;319(1195):369–456.
23. De Meyts P. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2004 Dec;26(12):1351–62.

24. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*. 2002 Nov;45(11):1475–83.
25. Lisgarten DR, Palmer RA, Lobley CMC, Naylor CE, Chowdhry BZ, Al-Kurdi ZI, et al. Ultra-high resolution X-ray structures of two forms of human recombinant insulin at 100 K. *Chem Cent J*. 2017 Aug 1;11:73.
26. Jacoby E, Hua QX, Stern AS, Frank BH, Weiss MA. Structure and dynamics of a protein assembly. 1H-NMR studies of the 36 kDa R6 insulin hexamer. *J Mol Biol*. 1996 Apr 26;258(1):136–57.
27. Olsen HB, Ludvigsen S, Kaarsholm NC. Solution structure of an engineered insulin monomer at neutral pH. *Biochemistry*. 1996 Jul 9;35(27):8836–45.
28. Conlon JM. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides*. 2001 Jul;22(7):1183–93.
29. Oh Y, Beukers MW, Pham HM, Smanik PA, Smith MC, Rosenfeld RG. Altered affinity of insulin-like growth factor II (IGF-II) for receptors and IGF-binding proteins, resulting from limited modifications of the IGF-II molecule. *Biochem J*. 1991 Aug 15;278 (Pt 1):249–54.
30. Blundell T, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D. Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology by. In: Anfinsen CB, Edsall JT, Richards FM, editors. *Advances in Protein Chemistry* 26, Academic Press; 1972. p. 279–402.
31. Salmon WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*. 1957 Jun;49(6):825–36.
32. Froesch ER, Bürgi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity*. *J Clin Invest*. 1963 Nov;42(11):1816–34.
33. Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Jul;73(7):2365–9.
34. Rinderknecht E, Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Dec;73(12):4379–81.
35. Engström W, Shokrai A, Otte K, Granérus M, Gessbo A, Bierke P, et al. Transcriptional regulation and biological significance of the insulin like growth factor II gene. *Cell Prolif*. 1998 Dec;31(5–6):173–89.
36. McRory JE, Sherwood NM. Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA Cell Biol*. 1997 Aug;16(8):939–49.
37. Renehan AG, Jones J, O'Dwyer ST, Shalet SM. Determination of IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, and IGFBP-3 levels in serum and plasma: comparisons using the Bland-Altman method. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 2003 Dec;13(6):341–6.
38. Khosla S, Hassoun AA, Baker BK, Liu F, Zein NN, Whyte MP, et al. Insulin-like growth factor system abnormalities in hepatitis C-associated osteosclerosis. Potential insights into increasing bone mass in adults. *J Clin Invest*. 1998 May 15;101(10):2165–73.
39. De Meyts P, Sajid W, Palsgaard J, Theede A-M, Gauguin L, Aladdin H, et al. Insulin and IGF-I Receptor Structure and Binding Mechanism [Internet]. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6192/>
40. Andersen M, Nørgaard-Pedersen D, Brandt J, Pettersson I, Slaaby R. IGF1 and IGF2 specificities to the two insulin receptor isoforms are determined by insulin receptor amino acid 718. *PLoS One*. 2017 Jun 1;12(6):e0178885.
41. Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature*. 1984 Sep 30;310(5980):781–4.
42. Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. *Gerontology*. 2013;59(3):240–9.

43. Chao W, D'Amore PA. IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Apr;19(2):111–20.
44. Reik W, Constancia M, Dean W, Davies K, Bowden L, Murrell A, et al. Igf2 imprinting in development and disease. *Int J Dev Biol.* 2000;44(1):145–50.
45. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell.* 1991 Feb 22;64(4):849–59.
46. Zumstein PP, Luthi C, Humbel RE. Amino Acid Sequence of a Variant Pro-Form of Insulin-Like Growth Factor II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(10):3169–72.
47. Khosla S, Ballard FJ, Conover CA. Use of site-specific antibodies to characterize the circulating form of big insulin-like growth factor II in patients with hepatitis C-associated osteosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Aug;87(8):3867–70.
48. Daughaday WH, Trivedi B. Measurement of derivatives of proinsulin-like growth factor-II in serum by a radioimmunoassay directed against the E-domain in normal subjects and patients with nonislet cell tumor hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Jul;75(1):110–5.
49. Qiu Q, Jiang J-Y, Bell M, Tsang BK, Gruslin A. Activation of Endoproteolytic Processing of Insulin-Like Growth Factor-II in Fetal, Early Postnatal, and Pregnant Rats and Persistence of Circulating Levels in Postnatal Life. *Endocrinology.* 2007 Oct 1;148(10):4803–11.
50. Hudgins WR, Hampton B, Burgess WH, Perdue JF. The identification of O-glycosylated precursors of insulin-like growth factor II. *J Biol Chem.* 1992 Apr 25;267(12):8153–60.
51. Valenzano KJ, Heath-Monnig E, Tollefsen SE, Lake M, Lobel P. Biophysical and biological properties of naturally occurring high molecular weight insulin-like growth factor II variants. *J Biol Chem.* 1997 Feb 21;272(8):4804–13.
52. Terasawa H, Kohda D, Hatanaka H, Nagata K, Higashihashi N, Fujiwara H, et al. Solution structure of human insulin-like growth factor II; recognition sites for receptors and binding proteins. *EMBO J.* 1994 Dec 1;13(23):5590–7.
53. Torres AM, Forbes BE, Wallace JC, Francis GL, Norton RS. Solution structure of human insulin-like growth factor II. Relationship to receptor and binding protein interactions. *J Mol Biol.* 1995 Apr 28;248(2):385–401.
54. De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Oct;1(10):769–83.
55. Hassan AB. Keys to the hidden treasures of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Am J Pathol.* 2003 Jan;162(1):3–6.
56. MacDonald RG, Tepper MA, Clairmont KB, Perregaux SB, Czech MP. Serum form of the rat insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor is truncated in the carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem.* 1989 Feb 25;264(6):3256–61.
57. Olson LJ, Yammani RD, Dahms NM, Kim J-JP. Structure of uPAR, plasminogen, and sugar-binding sites of the 300 kDa mannose 6-phosphate receptor. *EMBO J.* 2004 May 19;23(10):2019–28.
58. Reddy ST, Chai W, Childs RA, Page JD, Feizi T, Dahms NM. Identification of a Low Affinity Mannose 6-Phosphate-binding Site in Domain 5 of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. *J Biol Chem.* 2004 Oct 9;279(37):38658–67.
59. Schmidt B, Kiecke-Siemsen C, Waheed A, Bräulke T, Figura K von. Localization of the Insulin-like Growth Factor II Binding Site to Amino Acids 1508–1566 in Repeat 11 of the Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor. *J Biol Chem.* 1995 Jun 23;270(25):14975–82.
60. Brown J, Delaine C, Zaccheo OJ, Siebold C, Gilbert RJ, van Boxel G, et al. Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *EMBO J.* 2008 Jan 9;27(1):265–76.
61. Williams C, Rezgui D, Prince SN, Zaccheo OJ, Foulstone EJ, Forbes BE, et al. Structural insights into the interaction of insulin-like growth factor 2 with IGF2R domain 11. *Struct Lond Engl.* 2007 Sep;15(9):1065–78.
62. Costello M, Baxter RC, Scott CD. Regulation of Soluble Insulin-Like Growth Factor II/Mannose 6-Phosphate Receptor in Human Serum: Measurement by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Feb 1;84(2):611–7.
63. Liu Q, Grubb JH, Huang SS, Sly WS, Huang JS. The Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor-II Receptor Is a Substrate of Type V Transforming Growth Factor- β Receptor. *J Biol Chem.* 1999 Sep 7;274(28):20002–10.

64. El-Shewy HM, Luttrell LM. Chapter 24 Insulin-Like Growth Factor-2/Mannose-6 Phosphate Receptors. In: Vitamins & Hormones [Internet]. Academic Press; 2009 [cited 2018 Oct 17]. p. 667–97. (Insulin and IGFs; vol. 80). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672908006249>
65. Harris LK, Westwood M. Biology and significance of signalling pathways activated by IGF-II. *Growth Factors Chur Switz*. 2012 Feb;30(1):1–12.
66. El-Shewy HM, Lee M-H, Obeid LM, Jaffa AA, Luttrell LM. The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem*. 2007 Sep 7;282(36):26150–7.
67. Roth BV, Bürgisser DM, Lüthi C, Humbel RE. Mutants of human insulin-like growth factor II: expression and characterization of analogs with a substitution of TYR27 and/or a deletion of residues 62–67. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Dec 16;181(2):907–14.
68. Forbes BE, Hartfield PJ, McNeil KA, Surinya KH, Milner SJ, Cosgrove LJ, et al. Characteristics of binding of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II analogues to the type 1 IGF receptor determined by BIAcore analysis. *Eur J Biochem*. 2002 Feb;269(3):961–8.
69. Sakano K, Enjoh T, Numata F, Fujiwara H, Marumoto Y, Higashihashi N, et al. The design, expression, and characterization of human insulin-like growth factor II (IGF-II) mutants specific for either the IGF-II/cation-independent mannose 6-phosphate receptor or IGF-I receptor. *J Biol Chem*. 1991 Nov 5;266(31):20626–35.
70. Bürgisser DM, Roth BV, Giger R, Lüthi C, Weigl S, Zarn J, et al. Mutants of human insulin-like growth factor II with altered affinities for the type 1 and type 2 insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem*. 1991 Jan 15;266(2):1029–33.
71. Ziegler AN, Chidambaram S, Forbes BE, Wood TL, Levison SW. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-II analogs with enhanced insulin receptor- α binding affinity promote neural stem cell expansion. *J Biol Chem*. 2014 Feb 21;289(8):4626–33.
72. Delaine C, Alvino CL, McNeil KA, Mulhern TD, Gauguin L, De Meyts P, et al. A novel binding site for the human insulin-like growth factor-II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor on IGF-II. *J Biol Chem*. 2007 Jun 29;282(26):18886–94.
73. De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network [Updated 2016 Apr 27]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2018 Oct 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/>
74. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*. 1999 May;19(5):3278–88.
75. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, Lawrence MC, Sciacca L, Frasca F, et al. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocr Rev*. 2017 01;38(5):379–431.
76. Bass J, Chiu G, Argon Y, Steiner DF. Folding of insulin receptor monomers is facilitated by the molecular chaperones calnexin and calreticulin and impaired by rapid dimerization. *J Cell Biol*. 1998 May 4;141(3):637–46.
77. De Meyts P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci*. 2008 Aug;33(8):376–84.
78. Lawrence MC, McKern NM, Ward CW. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr Opin Struct Biol*. 2007 Dec 1;17(6):699–705.
79. Sparrow LG, McKern NM, Gorman JJ, Strike PM, Robinson CP, Bentley JD, et al. The Disulfide Bonds in the C-terminal Domains of the Human Insulin Receptor Ectodomain. *J Biol Chem*. 1997 Nov 21;272(47):29460–7.
80. McKern NM, Lawrence MC, Streltsov VA, Lou M-Z, Adams TE, Lovrecz GO, et al. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature*. 2006 Sep 14;443(7108):218–21.
81. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):85–96.
82. Backer JM, Shoelson SE, Weiss MA, Hua QX, Cheatham RB, Haring E, et al. The insulin receptor juxtamembrane region contains two independent tyrosine/ β -turn internalization signals. *J Cell Biol*. 1992 Aug;118(4):831–9.
83. Baillyes EM, Navé BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J*. 1997 Oct 1;327 (Pt 1):209–15.

84. Benecke H, Flier JS, Moller DE. Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues. *J Clin Invest*. 1992 Jun;89(6):2066–70.
85. Ramalingam L, Oh E, Thurmond DC. Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2013 Aug;70(16):2815–34.
86. Louvi A, Accili D, Efstratiadis A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol*. 1997 Sep 1;189(1):33–48.
87. Belfiore A, Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Aug;18(4):R125-147.
88. Wang C-F, Zhang G, Zhao L-J, Qi W-J, Li X-P, Wang J-L, et al. Overexpression of the insulin receptor isoform A promotes endometrial carcinoma cell growth. *PLoS One*. 2013;8(8):e69001.
89. Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE. The Insulin Receptor Isoform Exon 11- (IR-A) in Cancer and Other Diseases: A Review. *Horm Metab Res*. 2003 Nov;35(11/12):778–85.
90. García-Arencibia M, Molero S, Dávila N, Carranza MC, Calle C. 17beta-Estradiol transcriptionally represses human insulin receptor gene expression causing cellular insulin resistance. *Leuk Res*. 2005 Jan;29(1):79–87.
91. Kaminska D, Hämäläinen M, Cederberg H, Käkälä P, Venesmaa S, Miettinen P, et al. Adipose tissue INSR splicing in humans associates with fasting insulin level and is regulated by weight loss. *Diabetologia*. 2014 Feb;57(2):347–51.
92. Malakar P, Chartarifsky L, Hija A, Leibowitz G, Glaser B, Dor Y, et al. Insulin receptor alternative splicing is regulated by insulin signaling and modulates beta cell survival. *Sci Rep*. 2016 Aug 16;6:31222.
93. Sen S, Talukdar I, Liu Y, Tam J, Reddy S, Webster NJG. Muscleblind-like 1 (Mbnl1) Promotes Insulin Receptor Exon 11 Inclusion via Binding to a Downstream Evolutionarily Conserved Intronic Enhancer. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25426–37.
94. Talukdar I, Sen S, Urbano R, Thompson J, Yates JR, Webster NJG. hnRNP A1 and hnRNP F modulate the alternative splicing of exon 11 of the insulin receptor gene. *PLoS One*. 2011;6(11):e27869.
95. Yamaguchi Y, Flier JS, Yokota A, Benecke H, Backer JM, Moller DE. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*. 1991 Oct;129(4):2058–66.
96. Benyoucef S, Surinya KH, Hadaschik D, Siddle K. Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation. *Biochem J*. 2007 May 1;403(3):603–13.
97. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2409–13.
98. Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring HU. The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Jun 28;177(3):1013–8.
99. Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, et al. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell*. 2001 Mar;7(3):559–70.
100. Nevado C, Valverde AM, Benito M. Role of insulin receptor in the regulation of glucose uptake in neonatal hepatocytes. *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3709–18.
101. Křížková K, Chrudinová M, Povalová A, Selicharová I, Collinsová M, Vaněk V, et al. Insulin-Insulin-like Growth Factors Hybrids as Molecular Probes of Hormone:Receptor Binding Specificity. *Biochemistry*. 2016 May 31;55(21):2903–13.
102. Víková J, Collinsová M, Kletvíková E, Buděšínský M, Kaplan V, Žáková L, et al. Rational steering of insulin binding specificity by intra-chain chemical crosslinking. *Sci Rep*. 2016 Jan 21;6:19431.
103. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):505–18.
104. Pollak M. The insulin receptor/insulin-like growth factor receptor family as a therapeutic target in oncology. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Jan 1;18(1):40–50.
105. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*. 1986 Oct;5(10):2503–12.

106. Adams TE, Epa VC, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2000 Jul;57(7):1050–93.
107. Whitten AE, Smith BJ, Menting JG, Margetts MB, McKern NM, Lovrecz GO, et al. Solution structure of ectodomains of the insulin receptor family: the ectodomain of the type 1 insulin-like growth factor receptor displays asymmetry of ligand binding accompanied by limited conformational change. *J Mol Biol*. 2009 Dec 18;394(5):878–92.
108. Xu Y, Kong GK-W, Menting JG, Margetts MB, Delaine CA, Jenkin LM, et al. How ligand binds to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nat Commun*. 2018 Feb 26;9(1):821.
109. Croll TI, Smith BJ, Margetts MB, Whittaker J, Weiss MA, Ward CW, et al. Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain: Multi-Modal Inclusion of the Insert Domain. *Struct Lond Engl* 1993. 2016 Mar 1;24(3):469–76.
110. De Meyts P, Roth J, Neville DM, Gavin JR, Lesniak MA. Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973 Nov 1;55(1):154–61.
111. Ward CW, Lawrence MC. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2009 Apr;31(4):422–34.
112. Ward CW, Lawrence MC. Similar but different: ligand-induced activation of the insulin and epidermal growth factor receptor families. *Curr Opin Struct Biol*. 2012 Jun;22(3):360–6.
113. Kiselyov VV, Versteijne S, Gauguin L, De Meyts P. Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol Syst Biol*. 2009 Feb 17;5:243.
114. Scapin G, Dandey VP, Zhang Z, Prosser W, Hruza A, Kelly T, et al. Structure of the insulin receptor-insulin complex by single-particle cryo-EM analysis. *Nature*. 2018 05;556(7699):122–5.
115. Hao C, Whittaker L, Whittaker J. Characterization of a second ligand binding site of the insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 18;347(1):334–9.
116. Whittaker L, Hao C, Fu W, Whittaker J. High-affinity insulin binding: insulin interacts with two receptor ligand binding sites. *Biochemistry*. 2008 Dec 2;47(48):12900–9.
117. Menting JG, Whittaker J, Margetts MB, Whittaker LJ, Kong GK-W, Smith BJ, et al. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor. *Nature*. 2013 Jan 10;493(7431):241–5.
118. Gauguin L, Delaine C, Alvino CL, McNeil KA, Wallace JC, Forbes BE, et al. Alanine scanning of a putative receptor binding surface of insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem*. 2008 Jul 25;283(30):20821–9.
119. De Meyts P. Insulin/receptor binding: the last piece of the puzzle? What recent progress on the structure of the insulin/receptor complex tells us (or not) about negative cooperativity and activation. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2015 Apr;37(4):389–97.
120. Tatulian SA. Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling. *Biochemistry*. 2015 Sep 15;54(36):5523–32.
121. Ward CW, Menting JG, Lawrence MC. The insulin receptor changes conformation in unforeseen ways on ligand binding: sharpening the picture of insulin receptor activation. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2013 Nov;35(11):945–54, doi/10.1002/bies.201370111.
122. Hua QX, Shoelson SE, Kochoyan M, Weiss MA. Receptor binding redefined by a structural switch in a mutant human insulin. *Nature*. 1991 Nov 21;354(6350):238–41.
123. Weis F, Menting JG, Margetts MB, Chan SJ, Xu Y, Tennagels N, et al. The signalling conformation of the insulin receptor ectodomain. *Nat Commun*. 2018 Oct 24;9(1):1–10.
124. Houde D, Demarest SJ. Fine details of IGF-1R activation, inhibition, and asymmetry determined by associated hydrogen/deuterium-exchange and peptide mass mapping. *Struct Lond Engl* 1993. 2011 Jun 8;19(6):890–900.
125. Whittaker J, Groth AV, Mynarcik DC, Pluzek L, Gadsbøll VL, Whittaker LJ. Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43980–6.
126. Alvino CL, McNeil KA, Ong SC, Delaine C, Booker GW, Wallace JC, et al. A novel approach to identify two distinct receptor binding surfaces of insulin-like growth factor II. *J Biol Chem*. 2009 Mar 20;284(12):7656–64.

127. Alvino CL, Ong SC, McNeil KA, Delaine C, Booker GW, Wallace JC, et al. Understanding the mechanism of insulin and insulin-like growth factor (IGF) receptor activation by IGF-II. *PLoS One*. 2011;6(11):e27488.
128. Gauguin L, Klapproth B, Sajid W, Andersen AS, McNeil KA, Forbes BE, et al. Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J Biol Chem*. 2008 Feb 1;283(5):2604–13.
129. Jensen M, De Meyts P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm*. 2009;80:51–75.
130. Siddle K. Molecular Basis of Signaling Specificity of Insulin and IGF Receptors: Neglected Corners and Recent Advances. *Front Endocrinol*. 2012 Feb 28;3.
131. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*. 1994 Dec 22;372(6508):746–54.
132. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*. 2011 Aug;47(1):R1-10.
133. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002 Dec;13(10):444–51.
134. Proud CG. Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans*. 2006 Apr;34(Pt 2):213–6.
135. Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1150–60.
136. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(12):2707–19.
137. Versteyhe S, Klapproth B, Borup R, Palsgaard J, Jensen M, Gray SG, et al. IGF-I, IGF-II, and insulin stimulate different gene expression responses through binding to the IGF-I receptor. *Front Endocrinol*. 2013 Aug 9;4.
138. Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR, Miller WT. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol*. 2001 Dec;8(12):1058–63.
139. Cai W, Sakaguchi M, Kleinridders A, Gonzalez-Del Pino G, Dreyfuss JM, O'Neill BT, et al. Domain-dependent effects of insulin and IGF-1 receptors on signalling and gene expression. *Nat Commun*. 2017 27;8:14892.
140. Mulligan C, Rochford J, Denyer G, Stephens R, Yeo G, Freeman T, et al. Microarray analysis of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor signaling reveals the selective up-regulation of the mitogen heparin-binding EGF-like growth factor by IGF-1. *J Biol Chem*. 2002 Nov 8;277(45):42480–7.
141. Morrione A, Valentini B, Xu S, Yumet G, Louvi A, Efstratiadis A, et al. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3777–82.
142. Baudry A, Lamothe B, Bucchini D, Jami J, Montarras D, Pinset C, et al. IGF-1 receptor as an alternative receptor for metabolic signaling in insulin receptor-deficient muscle cells. *FEBS Lett*. 2001 Jan 19;488(3):174–8.
143. Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sørensen AR, Wiberg FC, Klein HH, et al. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J*. 1996 Apr 1;315 (Pt 1):271–9.
144. Sacco A, Morcavallo A, Pandini G, Vigneri R, Belfiore A. Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology*. 2009 Aug;150(8):3594–602.
145. Morcavallo A, Stefanello M, Iozzo RV, Belfiore A, Morrione A. Ligand-mediated endocytosis and trafficking of the insulin-like growth factor receptor I and insulin receptor modulate receptor function. *Front Endocrinol*. 2014 Dec 17;5.
146. Morcavallo A, Genua M, Palumbo A, Kletvikova E, Jiracek J, Brzozowski AM, et al. Insulin and insulin-like growth factor II differentially regulate endocytic sorting and stability of insulin receptor isoform A. *J Biol Chem*. 2012 Mar 30;287(14):11422–36.
147. Kasuga M, Fujita-Yamaguchi Y, Blithe DL, White MF, Kahn CR. Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. *J Biol Chem*. 1983 Sep 25;258(18):10973–80.
148. Soos MA, Siddle K. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with insulin receptors. *Biochem J*. 1989 Oct 15;263(2):553–63.

149. Blanquart C, Achi J, Issad T. Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochem Pharmacol.* 2008 Oct 1;76(7):873–83.
150. Soos MA, Field CE, Siddle K. Purified hybrid insulin/insulin-like growth factor-I receptors bind insulin-like growth factor-I, but not insulin, with high affinity. *Biochem J.* 1993 Mar 1;290(Pt 2):419–26.
151. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39684–95.
152. Slaaby R, Schäffer L, Lautrup-Larsen I, Andersen AS, Shaw AC, Mathiasen IS, et al. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-I affinity irrespective of the IR splice variant. *J Biol Chem.* 2006 Sep 8;281(36):25869–74.
153. Lüthi C, Roth BV, Humbel RE. Mutants of human insulin-like growth factor II (IGF II). Expression and characterization of truncated IGF II and of two naturally occurring variants. *Eur J Biochem.* 1992 Apr 15;205(2):483–90.
154. Hampton B, Burgess WH, Marshak DR, Cullen KJ, Perdue JF. Purification and characterization of an insulin-like growth factor II variant from human plasma. *J Biol Chem.* 1989 Nov 15;264(32):19155–60.
155. Hashimoto R, Fujiwara H, Higashihashi N, Enjoh-Kimura T, Terasawa H, Fujita-Yamaguchi Y, et al. N-terminal deletion mutants of insulin-like growth factor-II (IGF-II) show Thr7 and Leu8 important for binding to insulin and IGF-I receptors and Leu8 critical for all IGF-II functions. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):18013–8.
156. Francis GL, Aplin SE, Milner SJ, McNeil KA, Ballard FJ, Wallace JC. Insulin-like growth factor (IGF)-II binding to IGF-binding proteins and IGF receptors is modified by deletion of the N-terminal hexapeptide or substitution of arginine for glutamate-6 in IGF-II. *Biochem J.* 1993 Aug 1;293(Pt 3):713–9.
157. Steiner DF. The proinsulin C-peptide--a multirole model. *Exp Diabetes Res.* 2004 Mar;5(1):7–14.
158. Hexnerová R, Křížková K, Fábry M, Siegllová I, Kedrová K, Collinsová M, et al. Probing Receptor Specificity by Sampling the Conformational Space of the Insulin-like Growth Factor II C-domain. *J Biol Chem.* 2016 Aug 10;jbc.M116.741041.
159. Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, 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 Baltim Md.* 2004 Oct;18(10):2502–12.
160. Bayne ML, Applebaum J, Underwood D, Chicchi GG, Green BG, Hayes NS, et al. The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type 1 IGF receptor. *J Biol Chem.* 1989 May 7;264(19):11004–8.
161. Schäffer L, Kjeldsen T, Andersen AS, Wiberg FC, Larsen UD, Cara JF, et al. Interactions of a hybrid insulin/insulin-like growth factor-I analog with chimeric insulin/type I insulin-like growth factor receptors. *J Biol Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3044–7.
162. Cara JF, Mirmira RG, Nakagawa SH, Tager HS. An insulin-like growth factor I/insulin hybrid exhibiting high potency for interaction with the type I insulin-like growth factor and insulin receptors of placental plasma membranes. *J Biol Chem.* 1990 Oct 15;265(29):17820–5.
163. Kristensen C, Andersen AS, Hach M, Wiberg FC, Schäffer L, Kjeldsen T. A single-chain insulin-like growth factor I/insulin hybrid binds with high affinity to the insulin receptor. *Biochem J.* 1995 Feb 1;305 (Pt 3):981–6.
164. Henderson ST, Brierley GV, Surinya KH, Priebe IK, Catcheside DEA, Wallace JC, et al. Delineation of the IGF-II C domain elements involved in binding and activation of the IR-A, IR-B and IGF-IR. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc.* 2015 Feb;25(1):20–7.
165. Bayne ML, Applebaum J, Chicchi GG, Miller RE, Cascieri MA. The roles of tyrosines 24, 31, and 60 in the high affinity binding of insulin-like growth factor-I to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1990 Sep 15;265(26):15648–52.
166. King GL, Kahn CR, Samuels B, Danho W, Bullesbach EE, Gattner HG. Synthesis and characterization of molecular hybrids of insulin and insulin-like growth factor I. The role of the A-chain extension peptide. *J Biol Chem.* 1982 Sep 25;257(18):10869–73.
167. De Vroede MA, Rechler MM, Nissley SP, Ogawa H, Joshi S, Burke GT, et al. Mitogenic activity and receptor reactivity of hybrid molecules containing portions of the insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, and insulin molecules. *Diabetes.* 1986 Mar;35(3):355–61.
168. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Aug 1;16(4):421–39.

169. Schäffer L, Brissette RE, Spetzler JC, Pillutla RC, Østergaard S, Lennick M, et al. Assembly of high-affinity insulin receptor agonists and antagonists from peptide building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4435–9.
170. Whittaker J, Whittaker LJ, Roberts CT, Phillips NB, Ismail-Beigi F, Lawrence MC, 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 U S A*. 2012 Jul 10;109(28):11166–71.
171. Pullen RA, Lindsay DG, Wood SP, Tickle IJ, Blundell TL, Wollmer A, et al. Receptor-binding region of insulin. *Nature*. 1976 Feb;259(5542):369–73.
172. Mynarcik DC, Williams PF, Schaffer L, Yu GQ, Whittaker J. Identification of common ligand binding determinants of the insulin and insulin-like growth factor 1 receptors. Insights into mechanisms of ligand binding. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):18650–5.
173. Schwartz GP, Burke GT, Katsoyannis PG. A superactive insulin: [B10-aspartic acid]insulin(human). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Sep;84(18):6408–11.
174. Glendorf T, Sørensen AR, Nishimura E, Pettersson I, Kjeldsen T. Importance of the solvent-exposed residues of the insulin B chain alpha-helix for receptor binding. *Biochemistry*. 2008 Apr 22;47(16):4743–51.
175. Macháčková K, Chrudinová M, Radosavljević J, Potalitsyn P, Křížková K, Fábry M, et al. Converting Insulin-like Growth Factors 1 and 2 into High-Affinity Ligands for Insulin Receptor Isoform A by the Introduction of an Evolutionarily Divergent Mutation. *Biochemistry*. 2018 Apr 24;57(16):2373–82.
176. Kristensen C, Kjeldsen T, Wiberg FC, Schäffer L, Hach M, Havelund S, et al. Alanine Scanning Mutagenesis of Insulin. *J Biol Chem*. 1997 May 16;272(20):12978–83.
177. Žáková L, Kletvíková E, Lepšík M, Collinsová M, Watson CJ, Turkenburg JP, et al. Human insulin analogues modified at the B26 site reveal a hormone conformation that is undetected in the receptor complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014 Sep 27;70(Pt 10):2765–74.
178. Maly P, Lüthi C. The binding sites of insulin-like growth factor I (IGF I) to type I IGF receptor and to a monoclonal antibody. Mapping by chemical modification of tyrosine residues. *J Biol Chem*. 1988 May 25;263(15):7068–72.
179. Keyhanfar M, Booker GW, Whittaker J, Wallace JC, Forbes BE. Precise mapping of an IGF-I-binding site on the IGF-1R. *Biochem J*. 2007 Jan 1;401(Pt 1):269–77.
180. Dynkevich Y, Rother KI, Whitford I, Qureshi S, Galiveeti S, Szulc AL, et al. Tumors, IGF-2, and Hypoglycemia: Insights From the Clinic, the Laboratory, and the Historical Archive. *Endocr Rev*. 2013 Dec 1;34(6):798–826.
181. Simon J, Freychet P, Rosselin G, DeMeyts P. Enhanced binding affinity of chicken insulin in rat liver membranes and human lymphocytes: relationship to the kinetic properties of the hormone-receptor interaction. *Endocrinology*. 1977 Jan;100(1):115–21.
182. Weiss MA, Hua Q-X, Jia W, Nakagawa SH, Chu Y-C, Hu S-Q, et al. Activities of Monomeric Insulin Analogs at Position A8 Are Uncorrelated with Their Thermodynamic Stabilities. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26;276(43):40018–24.
183. Weiss MA, Wan Z, Zhao M, Chu Y-C, Nakagawa SH, Burke GT, et al. Non-standard insulin design: structure-activity relationships at the periphery of the insulin receptor. *J Mol Biol*. 2002 Jan 11;315(2):103–11.
184. Wan Z, Xu B, Huang K, Chu Y-C, Li B, Nakagawa SH, et al. Enhancing the activity of insulin at the receptor interface: crystal structure and photo-cross-linking of A8 analogues. *Biochemistry*. 2004 Dec 28;43(51):16119–33.
185. Menting JG, Lawrence CF, Kong GK-W, Margetts MB, Ward CW, Lawrence MC. Structural Congruency of Ligand Binding to the Insulin and Insulin/Type 1 Insulin-like Growth Factor Hybrid Receptors. *Struct Lond Engl* 1993. 2015 Jul 7;23(7):1271–82.
186. Jiráček J, Žáková L, Antolíkova E, Watson CJ, Turkenburg JP, Dodson GG, et al. 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*. 2010 Feb 2;107(5):1966–70.