

Received: 2010.12.29
Accepted: 2011.04.05
Published: 2011.05.06

Rola białka AS160/TBC1D4 w transporcie glukozy do wnętrza miocytów

The role of protein AS160/TBC1D4 in the transport of glucose into skeletal muscles

Agnieszka Mikłosz, Karolina Konstantynowicz, Tomasz Stepek, Adrian Chabowski

Zakład Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Streszczenie

Mięśnie szkieletowe to jedno z najważniejszych tkanek uczestniczących w utrzymaniu homeostazy glukozy całego organizmu. Glukoza przenika do komórek mięśniowych na zasadzie dyfuzji ułatwionej, zachodzącej z udziałem transporterów glukozy (GLUT). Stymulacja insulinowego (związanego z aktywacją 3-kinazy fosfatidyloinozytolu – PI3K) bądź też niezależnego od insuliny (związanego z aktywacją kinazy zależnej od AMP – AMPK) szlaku przekazywania sygnału uruchamia kaskadę reakcji prowadzącą do translokacji GLUT-4 do błony komórkowej, a w konsekwencji do wzrostu wychwytu glukozy w miocytach. W prowadzonych ostatnio badaniach wykazano, że bezpośrednio w proces translokacji GLUT-4 jest zaangażowane białko sygnałowe określane jako AS160 – substrat Akt o masie cząsteczkowej 160 kDa. Białko to prawdopodobnie jest ogniwem łączącym szlak insulinowy ze szlakiem zależnym od aktywacji kinazy AMPK. Badania potwierdzają, iż fosforylacja AS160 ulega wzmożeniu zarówno pod wpływem stymulacji insuliną, jak też podczas wysiłku fizycznego, co wskazuje na ich addytywną zależność. W mięśniach szkieletowych osób z opornością na insulinę i/lub cukrzycą typu 2 dochodzi do znacznego obniżenia zależnej od insuliny fosforylacji białka AS160 i spadku translokacji do błony GLUT-4. Stąd też zmniejszony poziom insulinozależnej fosforylacji AS160 może odgrywać istotną rolę w oporności na insulinę *in vivo*.

Słowa kluczowe:

mięśnie szkieletowe • AS160 • GLUT-4 • PI3K • AMPK • insulinooporność

Summary

Skeletal muscle plays an essential role in the regulation of whole-body glucose homeostasis. Glucose is transported into the muscle cells via protein-mediated transport that requires sarcolemmal glucose transporters (GLUT). Translocation of GLUT-4 to the plasma membranes is the most potent factor stimulating glucose uptake by myocytes. Relocation of GLUT-4 from an intracellular pool(s) to the plasma membranes is activated by either insulin (associated with activation of kinase PI3K), or physical activity (associated with activation of kinase AMPK). Recent studies have shown that the signaling protein known as AS160 is involved in the directed GLUT-4 intramyocellular redistribution. AS160 protein appears to be activated by the insulin pathway as well as by AMPK. Moreover, in human skeletal muscles that are insulin-resistant, insulin-stimulated phosphorylation of AS160 is significantly impaired. Therefore, decreased insulin-induced AS160 phosphorylation that results in diminished GLUT-4 redistribution to the plasma membrane may play an important role in insulin resistance *in vivo*.

Key words:

skeletal muscle • AS160 • GLUT-4 • AMPK • PI3K • insulin resistance

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=941635>**Word count:** 2609**Tables:** –**Figures:** 1**References:** 55**Adres autora:** prof. dr hab. Adrian Chabowski, Zakład Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. Mickiewicza 2c, 15-230 Białystok; e-mail: adrian@umwb.edu.pl

1. WPROWADZENIE

Mięśnie szkieletowe to jedno z najważniejszych tkanek uczestniczących w utrzymaniu homeostazy glukozy całego organizmu. Stanowią one prawie 40% masy ciała i odpowiedzialne są za 80% wychwyty glukozy krążącej we krwi [15,26]. Glukoza jako substancja polarna nie może swobodnie przenikać przez błonę komórkową zbudowaną głównie z fosfolipidów i cząsteczek cholesterolu. Transport glukozy do wnętrza miocytów wymaga więc udziału swoistych przenośników białkowych, określanych skrótem GLUT (glucose transporter). Głównym transporterem glukozy w mięśniach poprzecznie prążkowanych, podlegającym regulacji jest GLUT-4 (glucose transporter-4). Ulega on translokacji ze struktur wewnątrzkomórkowych do błony komórkowej miocytów [23,43]. W warunkach podstawowych (brak stymulacji komórek mięśniowych) więcej niż 90% całkowitej liczby transporterów GLUT-4 umiejscowionych w strukturach wewnątrzkomórkowych, a jedynie około 10% w błonie komórkowej [25,54]. Stymulacja zależnego od insuliny (związanego z aktywacją kinazy PI3K) bądź też niezależnego od insuliny (związanego z aktywacją kinazy AMPK) szlaku przekazywania sygnału uruchamia kaskadę reakcji prowadzącą do translokacji GLUT-4 do błony komórkowej, a w konsekwencji do wzrostu wychwyty glukozy [32]. Jest to zależność wprost proporcjonalna, im większa liczba transporterów GLUT-4 w błonie komórkowej tym większy jest transport glukozy do wnętrza komórki. Zaobserwowano, że już 2-3 min po stymulacji insuliną, dochodzi do translokacji około 50% białek GLUT-4 do sarkolemy [22]. W mięśniu szkieletowym pobudzenie transportu glukozy przez insulinę zwiększa jej dostępność dla przemiany glikolitycznej i syntezy glikogenu. Natomiast pobudzenie transportu glukozy poprzez aktywację kinazy AMPK zwiększa dostępność glukozy głównie do przemian oksydacyjnej fosforylacji i powoduje zahamowanie syntezy glikogenu [25].

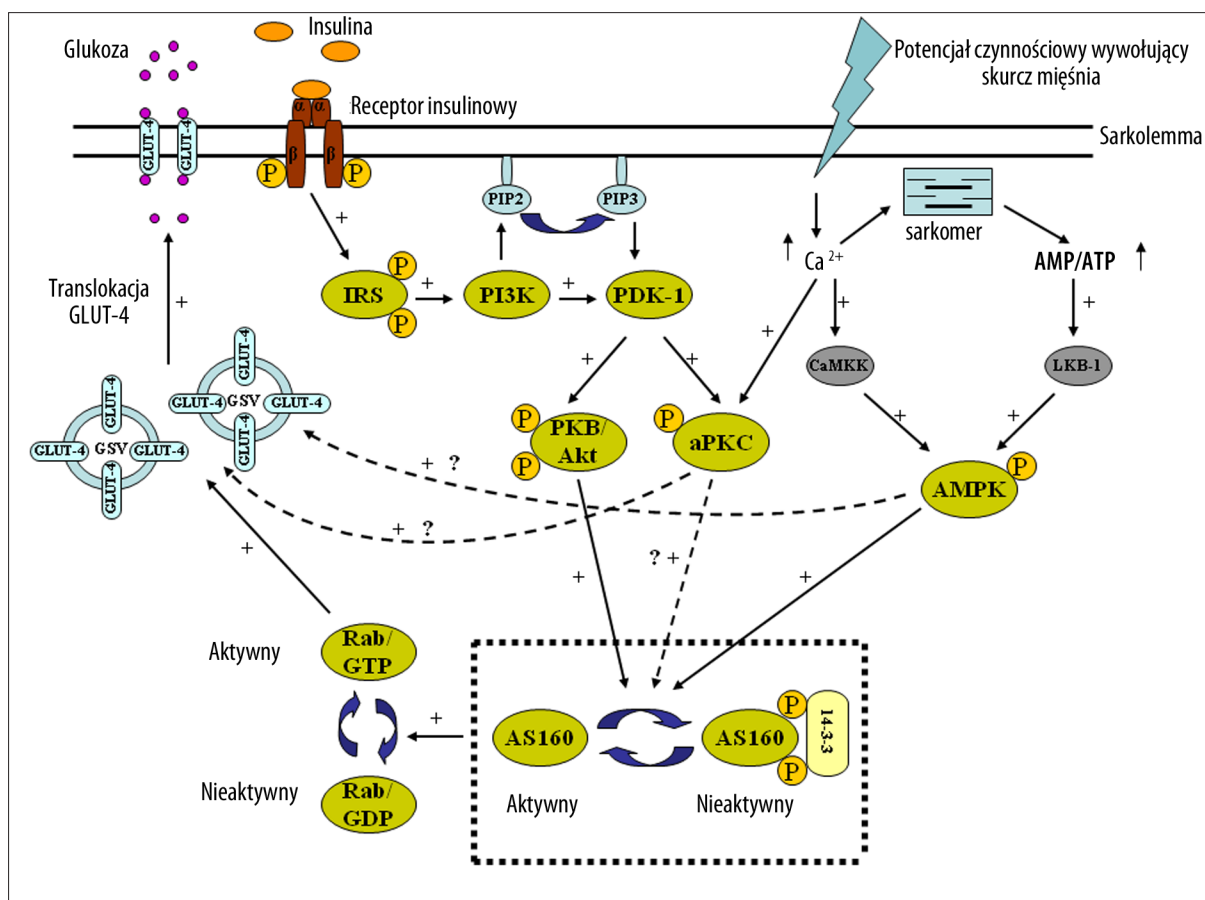
Szczególnie interesującym wydają się doniesienia sugerujące, że zarówno szlak insulinowy jak i szlak zależny od aktywacji kinazy AMPK schodzą się w jednym miejscu, aktywując białko AS160 bezpośrednio odpowiedzialne za przemieszczanie się transporterów GLUT-4 do błony komórkowej. W pracy uwzględniono główne doniesienia odnoszące się do roli AS160 w regulacji transportu glukozy do wnętrza miocytów.

2. INSULINOWY SZLAK PRZESYŁANIA SYGNAŁU

Działanie insuliny na poziomie komórkowym rozpoczyna się od jej połączenia ze swoistym receptorem insulinowym. Receptor insulinowy jest glikoproteiną o charakterze heterodimeru ($\alpha_2\beta_2$), zbudowanym z dwóch

zewnątrzkomórkowych podjednostek α oraz dwóch wewnątrzkomórkowych podjednostek β o aktywności kinazy tyrozynowej. Receptor insulinowy działa jak klasyczny enzym allosteryczny, gdyż ma regulatorową podjednostkę α oraz katalityczną podjednostkę β . Zasadniczą funkcją podjednostki α jest wiązanie insuliny, natomiast podjednostka β odpowiada za dalsze przekazywanie sygnału [40,49] (ryc. 1). Związanie insuliny prowadzi do zmian konformacyjnych receptora, których wynikiem jest autofosforylacja grup tyrozynowych w podjednostkach β . W wyniku autofosforylacji podjednostka β może fosforylować reszty tyrozynowe innych białek [25].

Zidentyfikowano co najmniej dziewięć wewnątrzkomórkowych substratów aktywności kinazowej receptora insulinowego [22]. Szczególne znaczenie mają białka określone symbolem IRS (insulin receptor substrate). Są to fosfoproteiny, zawierające domeny: PH (plestrin homology), PTB (phosphotyrosine binding) oraz domenę zawierającą wiele potencjalnych miejsc fosforylacji tyrozyny [50]. Zarówno IRS-1 jak i IRS-2 są substratem receptora insulinowego, jednak ich biologiczna rola jest różna. Zaobserwowano, że w insulinowym szlaku przekazywania sygnału IRS-1 odgrywa większą rolę w mięśniach szkieletowych, zaś IRS-2 w wątrobie [33,50]. Ponadto w badaniach na myszach pozbawionych genu kodującego IRS-2 wykazano, że defekt ten skutkuje opornością na insulinę, zahamowaniem wzrostu i rozwoju komórek β w trzustce, czego następstwem była cukrzyca. Natomiast usunięcie genu kodującego IRS-1 spowodowało zmniejszoną tolerancję glukozy oraz umiarkowaną insulinoporność, co jednak nie doprowadziło do rozwoju cukrzycy [10,50]. Białka IRS nie mają aktywności katalitycznej, ale zawierają domeny, poprzez które mogą aktywować inne cząsteczki sygnalizacyjne, takie jak 3-kinaza fosfatydilinozytolu (PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase). Enzym ten (PI3K) jest heterodimerem zbudowanym z podjednostki regulatorowej p85 oraz podjednostki katalitycznej p110. Białko IRS-1 łączy się z podjednostką p85 kinazy PI3K, aktywując jej katalityczną podjednostkę p110 [54]. W wyniku czego, PI3K fosforyluje występujący w błonie plazmatycznej difosforan fosfatydilinozytolu (PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) do trifosforanu fosfatydilinozytolu (PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) [10]. Kolejnym etapem insulinowego szlaku przekazywania sygnału jest połączenie PIP3 z kinazą 1 zależną od fosfatydilinozytolu (PDK-1, phosphoinositide-dependent kinase 1) [25]. Do znanych substratów PDK-1 należą kinazy białkowe B (PKB, protein kinase B) i C (PKC, protein kinase C) [6,40]. Kinaza białkowa B jest homologiem (produktu) onkogenu v-Akt, dlatego też określana jest również jako Akt. Mechanizm aktywacji tej kinazy polega na fosforylacji dwóch reszt Thr³⁰⁸ i Ser⁴⁷³ [35]. Dotychczas zidentyfikowano trzy izoformy białka



Ryc. 1. Mechanizm insulinowego oraz zależnego od wysiłku fizycznego szlaku przekazywania sygnału w komórkach mięśni szkieletowych. Stymulacja insuliną przez aktywację kinazy Akt oraz czynności skurczową poprzez kinazę AMPK prowadzi do fosforylacji białka AS160. Następstwem tego jest translokacja GLUT-4 do błony komórkowej, a w konsekwencji wzrost wychwyty glukozy do wnętrza miocytów; AMP – adenosinomonofosforan; AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; aPKC – atypowa kinaza białkowa C; AS160 – substrat Akt o masie 160 kDa; ATP – adenosynotrifosforan; CaMKK – kinaza kinazy zależnej od kalmoduliny/ Ca^{2+} ; GLUT-4 – transporter glukozy 4; GSV – pęcherzyki magazynujące GLUT-4; IRS – substrat receptora insulinowego; LKB-1 – kinaza treoninowo-serynowa 1; PDK-1 – kinaza 1 zależna od fosfatydilinozytolu; PI3K – 3-kinaza fosfatydilinozytolu; PIP_2 – 4,5-difosforan fosfatydilinozytolu; PIP_3 – 3,4,5-trifosforan fosfatydilinozytolu; PKB/Akt – kinaza białkowa B; Rab/GDP – białko Rab/guanozynodifosforan; Rab/GTP – białko Rab/guanozynotrifosforan; „+” – pobudza; „?” – przypuszczalne działanie pobudzające

Akt (α, β, γ). Podstawową funkcją Akt jest aktywacja kaskady reakcji prowadzących do wzrostu ekspresji błonowej GLUT-4 w odpowiedzi na działanie insuliny, a proces ten jest zależny głównie od Akt- β . Stwierdzono, że insulina wzmacnia aktywację Akt- β i dopiero wówczas uruchamia kaskadę reakcji prowadzącą do translokacji GLUT-4 ze struktur wewnątrzkomórkowych do błony komórkowej [11,19].

W prowadzonych ostatnio badaniach wykazano, że bezpośrednio w proces translokacji GLUT-4 jest zaangażowane kolejne białko sygnałowe określane jako AS160. Aktywacja Akt prowadzi do fosforylacji AS160 – substratu Akt o masie cząsteczkowej 160 kDa [1,4,14,34]. Białko to określane jest również jako TBC1D4 [TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) domain family, member 4]. W 2002 r. Lienhard i wsp. zidentyfikowali białko TBC1D4 jako podstawowy substrat Akt w komórkach 3T3-L1 adipocytów [28]. Następnie zaobserwowano, że AS160 funkcjonuje także w mięśniach szkieletowych myszy, szczura i człowieka [4]. Badając mięśnie szkieletowe ludzi i gryzoni, wykazano, że insulina zwiększa 2–3-krotnie fosforylację AS160 w porównaniu do stanu podstawowego [23].

Białko AS160/TBC1D4 zawiera: 2 domeny wiążące fosfotyrosynę PTB (phosphotyrosine binding), domenę CBD (calmodulin binding domain), domenę Rab GAP (Rab GTPase activating protein) oraz co najmniej 9 miejsc fosforylacji (Ser³¹⁸, Ser³⁴¹, Thr⁵⁶⁸, Ser⁵⁷⁰, Ser⁵⁸⁸, Thr⁶⁴², Ser⁶⁶⁶, Ser⁷⁰⁴ oraz Ser⁷⁵¹). Domena PTB zawiera koniec terminalny – NH_2 , zaś domena GAP – COOH [25,39,48].

W badaniach przeprowadzonych *in vitro* stwierdzono, że domena Rab-GAP wykazuje aktywność wobec kilku białek z rodziny Rab: 2A, 8A, 10, 11, 14, z czego najbardziej interesujące wydają się Rab 10, 11, 14 gdyż zostały one zlokalizowane w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach zawierających GLUT-4 [25,34,43]. Białka 10, 11, 14 Rab odgrywają więc istotną rolę w przemieszczaniu się tych pęcherzyków z transporterami GLUT-4. Ponadto zaangażowane są w każdy etap transportu pęcherzyków, tj. tworzenie, translokację, a także wiązanie i fuzję z błoną komórkową [25]. Obecne doniesienia wskazują, że w translokacji pęcherzyków z GLUT-4, AS160 nie reguluje jedynie etapu fuzji pęcherzyka z sarkolemą [20] (ryc. 1).

Liczne badania biochemiczne wykazały, że w warunkach podstawowych aktywna domena GAP AS160 utrzymuje białka Rab w stanie nieaktywnym przez ich związanie z GDP, w konsekwencji transportery GLUT-4 pozostają w wewnątrzkomórkowych strukturach, a wychwyt glukozy jest w znacznej mierze zahamowany. Po stymulacji insuliną, Akt fosforyluje AS160, dezaktywując domenę GAP, następstwem czego jest związanie białek Rab z GTP, co prowadzi do translokacji GLUT-4 do błony komórkowej. W ten sposób AS160 odgrywa rolę negatywnego regulatora translokacji GLUT-4 z pęcherzyków wewnątrzkomórkowych do błony komórkowej [14,19,24,43,44,46].

Wykazano, że AS160 ulega fosforylacji nie tylko pod wpływem insuliny, ale także IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1), EGF (nabłonkowy czynnik wzrostu) oraz AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-riboside). Każdy z tych czynników aktywuje AS160 w wyniku fosforylacji różnych miejsc [9]. Ostatnie doniesienia wskazują, że stymulacja insuliną prowadzi do fosforylacji AS160 w pozycji Thr⁶⁴² oraz interakcji AS160 z białkiem 14-3-3 [39]. Przypuszczalnie interakcja ta jest dynamiczna i krótkotrwała, wymagana jedynie do oddysocjowania AS160 od wewnątrzkomórkowych pęcherzyków magazynujących GLUT-4 (GSVs, GLUT-4 storage vesicles) do cytoplazmy. Kolejne badania potwierdzają, iż insulina zwiększa zdolność wiązania AS160 z białkiem 14-3-3 w mięśniach szkieletowych człowieka [23,24].

Wortmanina (wybiórczy inhibitor kinazy PI3K) hamuje fosforylację Akt oraz następczą aktywację AS160, w wyniku czego blokuje insulinozależną translokację GLUT-4 do błony komórkowej miocytów. Przy czym nie wpływa hamująco na translokację GLUT-4 zależną od czynników stresu komórkowego, prowadzących do zmniejszenia ilości ATP, co aktywuje kinazę AMPK. Badania te potwierdzają, że PI3K nie jest ogniwem szlaku przekazywania sygnału zależnego od skurczu mięśnia. Wykazano jednak, że wortmanina ogranicza lub nawet całkowicie hamuje fosforylację białka AS160 zależną od skurczów mięśnia szkieletowego. Wskazuje to na główną rolę AS160 jako łącznika kaskady sygnału insulinowego oraz kaskady sygnału skurczów mięśnia [7].

3. NIEZALEŻNY OD INSULINY SZLAK PRZEKAŹNICTWA SYGNAŁU

Jednym z podstawowych szlaków przekazywania sygnału niezależnych od insuliny, a wzmagających translokację GLUT-4 do błony komórkowej jest szlak aktywowany przez wysiłek fizyczny. Skurcz mięśnia szkieletowego powoduje wzrost zawartości wewnątrzkomórkowego AMP a spadek ATP, co prowadzi do zmiany stosunku AMP/ATP i skutkuje fosforylacją oraz aktywacją kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, AMP-activated protein kinase) [27,53] (ryc. 1).

Kinaza AMPK jest białkiem o strukturze heterotrimeru złożonym z jednej podjednostki katalitycznej α oraz dwóch podjednostek regulatorowych β i γ . U ssaków wyróżniono kilka izoform poszczególnych podjednostek: dwie izoformy podjednostki α (α_1, α_2), dwie izoformy podjednostki β (β_1, β_2) oraz trzy izoformy podjednostki γ ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$). Jednak tylko trzy kompleksy AMPK stwierdzono w mięśniach szkieletowych człowieka ($\alpha_1\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_1$, $\alpha_2\beta_2\gamma_3$). Fosforylacja Thr¹⁷² w α, α_2 katalitycznej podjednostki jest niezbędna do aktywacji AMPK [45].

Ostatnie badania wskazują, że regulacja aktywności AMPK jest zależna od kinazy treoninowo-serynowej LKB-1 (serine/threonine kinase-1) [27,42]. Wykazano, że usunięcie genu kodującego LKB-1 u myszy powoduje wyraźny spadek aktywności oraz wrażliwości AMPK na zmiany zawartości komórkowego AMP w stosunku do ATP [40,53]. Jednak nadal nie wiadomo, czy LKB-1 jest odpowiedzialna tylko za aktywację kinazy AMPK, dlatego też poznanie jej roli wymaga dalszych badań. Stwierdzono, że AMPK jest również aktywowana przez lek przeciwcukrzycowy – metforminę oraz związek o nazwie AICAR, co w konsekwencji prowadzi do translokacji GLUT-4 do błony plazmatycznej [36,40]. Kilka grup badawczych wykorzystując myszy pozbawione genu kodującego podjednostki α_2 i γ_3 kinazy AMPK, wykazało całkowicie zahamowany, zależny od translokacji GLUT-4, transport glukozy. Ponadto zaobserwowano istotnie obniżony poziom fosforylacji białka AS160 w odpowiedzi na egzogenną aktywację AMPK przez AICAR, ale nie na skurcz mięśnia [27,47]. Z kolei metformina w mięśniach szkieletowych zwiększa o 20–50% transport i utlenianie glukozy oraz syntezę glikogenu, a także wzmacnia aktywność kinazy AMPK [30].

Doniesienia wskazują na istotne znaczenie białka AS160 jako łącznika insulinowego szlaku przekazywania sygnału oraz szlaku zależnego od AMPK celem osiągnięcia maksymalnej wydajności translokacji GLUT-4 do błony komórkowej miocytów [8,23]. Badania dowodzą, że AS160 jest nie tylko substratem dla Akt, ale również dla innych kinaz w tym m.in. AMPK [39,46]. Zaobserwowano wzrost fosforylacji AS160 w wyniku skurczu mięśnia szkieletowego oraz po inkubacji mięśni z AICAR, przy czym fosforylacja ta nie była zależna od aktywności Akt [3,12,17]. Kolejne badania przeprowadzane na transgenicznym modelu zwierząt również stwierdzają, że fosforylacja AS160 jest regulowana przez AMPK, a dokładniej poprzez jej podjednostkę α_2 [23]. Co więcej Treebak i wsp. w swoich badaniach sugerują, że podczas wysiłku fizycznego u ludzi, AMPK bardziej niż Akt zaangażowana jest w fosforylację AS160 [45].

Zarówno badania przeprowadzane *in vivo* jak i *in vitro* na ludziach i gryzoniach, potwierdzają, że białko AS160 ulega fosforylacji pod wpływem skurczu mięśni szkieletowych. Szlak ten jest niezależny od insuliny, jednak przypuszcza się, że białko AS160 jest wspólnym ogniwem łączącym oba szlaki. Dalsze badania wykazały, że fosforylacja AS160 ulega wzmoczeniu pod wpływem stymulacji insuliną oraz czynnością skurczową, wskazując jednocześnie na ich addytywną zależność [23,46]. Frösig i wsp. zaobserwowali widoczny po treningu wzrost ekspresji i aktywności Akt oraz białka AS160 [16]. Ponadto wykazano, że w mięśniach epitrochlearis fosforylacja AS160 pozostaje wzmoczona przez 3 godziny po wysiłku fizycznym [18,41]. Inni autorzy donoszą, o 14-godzinnej wzmoczonej fosforylacji w mięśniach szkieletowych człowieka w porównaniu do grupy w spoczynku [16].

Skurcz mięśnia szkieletowego na skutek wysiłku fizycznego uruchamia szlak zależny od wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} wewnątrz miocytu, który odpowiedzialny jest także za przemieszczanie się transporterów GLUT-4 do błony komórkowej. Wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} aktywuje kinazę kinazy zależnej od kalmoduliny/

Ca^{2+} (CaMKK, calmodulin-dependent protein kinase kinase) oraz kinazę PKC (protein kinase C) [21,40] (ryc. 1). Ostatnie doniesienia wskazują, że nadekspresja CaMKK w mięśniach szkieletowych powoduje również istotny wzrost aktywności AMPK [52]. W kolejnych badaniach wykazano, że farmakologiczne zahamowanie aktywności CaMKK poprzez inkubację szczurzych mięśni szkieletowych z STO-609 (swoistym inhibitorem CaMKK) prowadzi do znacznego obniżenia aktywności AMPK. Natomiast inkubacja mięśni szkieletowych z STO-609 stymulowanych do aktywności skurczowej nie obniżyła fosforylacji AMPK. Wskazuje to na istnienie niezależnych od siebie mechanizmów aktywacji AMPK przez kinazę CaMKK. [51,53,55]. Ponadto zaobserwowano, że wzrost ekspresji CaMKK nie jest powiązany bezpośrednio ze wzrostem fosforylacji AS160 w mięśniach szkieletowych, co wskazuje, że CaMKK inicjuje metaboliczne reakcje w sposób niezależny od aktywności AS160 [40]. Niemniej jednak brak jest badań wiążących aktywność kinazy CaMKK z bezpośrednią aktywacją AS160 w komórkach mięśni szkieletowych.

Drugą kinazą aktywowaną przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} jest kinaza PKC, która jest także elementem insulinowego szlaku przekazywania sygnału [37]. Podczas wysiłku fizycznego zwiększa się aktywność atypowych kinaz białkowych C (atypical protein kinase C – aPKC), co prowadzi do pobudzenia translokacji GLUT-4 i wzrostu wychwytu glukozy, niezależnego od aktywacji kinazy PI3K [6]. Część autorów sugeruje, że aktywowana skurczem mięśni kinaza aPKC bierze udział w transporcie glukozy poprzez aktywację AS160 [40,44]. Przypuszcza się więc, że rola aPKC w procesie translokacji GLUT-4 do błony komórkowej miocytów jest podobna do roli białka Akt w insulinowym szlaku [12,30] (ryc. 1). Należy jednak zaznaczyć, iż dokładny mechanizm działania aPKC nie jest jeszcze w pełni poznany, wobec czego wymaga dalszych badań.

4. ROLA AS160 W ZABURZENIACH TRANSPORTU GLUKOZY DO WNĘTRZA MIOCYTÓW

Niedobór insuliny i/lub brak jej prawidłowego działania w mięśniach szkieletowych jest głównym czynnikiem patogenetycznym charakteryzującym cukrzycę [11]. Oporność na działanie insuliny w mięśniach szkieletowych jest związana przede wszystkim z niedostateczną translokacją transporterów GLUT-4 do błony komórkowej miocytów. Zaburzenia wrażliwości komórek mięśniowych na stymulację insuliną w znacznej mierze decydują o ogólnoustrojowej insulinoporności, ponieważ mięśnie szkieletowe są podstawową tkanką regulującą wychwyt glukozy krążącej we krwi [13].

Wykazano, że w insulinoporności oraz cukrzycy typu 2 dochodzi do osłabienia aktywności białka IRS-1 i/lub kinazy PI3K i/lub Akt w mięśniach szkieletowych [15,20,21,30,53]. Zahamowanie fosforylacji Akt w pozycji Thr³⁰⁸ i spadek jej aktywności powoduje wtórne upośledzenie fosforylacji AS160. Obecnie wiadomo, że w wyniku fizjologicznej stymulacji insuliną *in vivo* w mięśniach szkieletowych człowieka zwiększa się fosforylacja białka AS160. Jednak fosforylacja AS160 ulega znacznemu obniżeniu u osób z insulinopornością i/lub cukrzycą typu 2 [3]. W badaniach wykazano, że u pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 poziom ekspresji białka AS160 zbliżony jest do poziomu

osób zdrowych. Natomiast różnica dotyczy fosforylacji tegoż białka i jest ona zmniejszona o 40% w grupie osób chorych [31,35]. Należy także podkreślić, że zahamowanie fosforylacji AS160 pociąga za sobą znaczący spadek insulinozależnej translokacji GLUT-4 do błony komórkowej.

W badaniach na zwierzętach doświadczalnych (myszach) pozbawionych genu kodującego białko GLUT-4 wykazano, że podczas skurczu mięśnia szkieletowego *in vitro* wychwyt glukozy jest 4-krotnie zmniejszony w porównaniu do grupy kontrolnej [5,38]. W mięśniach szkieletowych pacjentów chorych na cukrzycę typu 2 ekspresja genu i białka GLUT-4 jest prawidłowa, natomiast zmniejszony wychwyt glukozy jest rezultatem zmniejszonej translokacji GLUT-4 do błony komórkowej [25,29,35]. Jednakże część badaczy zauważa także, że mimo indukcji insulinoporności w mięśniach szkieletowych i spadku transportu glukozy do wnętrza miocytów nie dochodzi jednak do odpowiedniego spadku translokacji GLUT-4. Autorzy tych badań sugerują więc istnienie tzw. aktywności wewnętrznej GLUT-4 [2].

Wiele grup badawczych wykazało, iż mutacja AS160-4P polegająca na wprowadzeniu alaniny w cztery miejsca fosforylacji (Ser³¹⁸, Ser⁵⁸⁸, Thr⁶⁴², Thr⁷⁵¹) prowadzi do zahamowania aż 80% insulinozależnej translokacji GLUT-4 w adipocytach oraz mięśniach szkieletowych, co wskazuje na istotną rolę AS160 w translokacji GLUT-4 do sarkomeru miocytów [32,36,39,43,44,55].

Stopień zwiększenia aktywności AMPK, a zatem i fosforylacji AS160 jest zależny od czasu trwania oraz intensywności wysiłku. Zaobserwowano, że reakcja ta jest ograniczona u chorych na cukrzycę typu 2 połączoną z otyłością, dlatego też uzyskanie porównywalnego wyniku do osób szczupłych wymaga wysiłku o większej intensywności [42]. Vind i wsp. w swoich badaniach wykazali, że trening zwiększa stężenie białka AS160 prawie o 20% zarówno u pacjentów z cukrzycą typu 2 jak i w grupie kontrolnej. Ponadto wykazano stymulowany treningiem 20% wzrost błonowego stężenia białka GLUT-4 w grupie kontrolnej i 30% w grupie z cukrzycą [48]. U chorych na cukrzycę typu 2 wysiłek fizyczny może korzystnie wpływać na insulinowrażliwość komórek mięśniowych i sprzyjać normalizacji glikemii [3].

5. PODSUMOWANIE

Białko AS160 wydaje się ogniwem łączącym szlak insulinowy ze szlakiem zależnym od wysiłku fizycznego. Fosforylacja AS160 jest niezbędna w procesie translokacji GLUT-4, jest to głównym etapem kontrolującym utrzymanie homeostazy glukozy. Zarówno insulina jak i skurcz mięśnia szkieletowego powodują translokację GLUT-4 z wewnątrzkomórkowych struktur do błony komórkowej miocytów, co w konsekwencji prowadzi do wzrostu wychwytu glukozy. W mięśniach szkieletowych osób z opornością na insulinę i/lub cukrzycą typu 2 dochodzi do znacznego obniżenia zależnej od insuliny fosforylacji białka AS160. Stąd też zmniejszony poziom insulinozależnej fosforylacji AS160 może odgrywać istotną rolę w oporności na insulinę *in vivo*. Aczkolwiek fizjologiczna regulacja aktywności AS160 w mięśniach szkieletowych człowieka wymaga jeszcze dokładnego poznania.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alkhateeb H., Chabowski A., Glatz J.F., Gurd B., Luiken J.J., Bonen A.: Restoring AS160 phosphorylation rescues skeletal muscle insulin resistance and fatty acid oxidation while not reducing intramuscular lipids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009; 297: E1056–E1066
- [2] Alkhateeb H., Chabowski A., Glatz J.F., Luiken J.F., Bonen A.: Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 293: E783–E793
- [3] Arias E.B., Kim J., Funai K., Cartee G.D.: Prior exercise increases phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E1191–E1200
- [4] Baus D., Yan Y., Li Z., Garyantes T., de Hoop M., Tennagels N.: A robust assay measuring GLUT4 translocation in rat myoblasts overexpressing GLUT4-myc and AS160_v2. *Anal. Biochem.*, 2010; 397: 233–240
- [5] Beck-Nielsen H., Vaag A., Poulsen P., Gaster M.: Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects: experiences from relatives and twin studies. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 17: 445–467
- [6] Beeson M., Sajan M.P., Dizon M., Grebenev D., Gomez-Daspet J., Miura A., Kanoh Y., Powe J., Bandyopadhyay G., Standaert M.L., Farese R.V.: Activation of protein kinase C- ζ by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes*, 2003; 52: 1926–1934
- [7] Bruss M.D., Arias E.B., Lienhard G.E., Cartee G.D.: Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes*, 2005; 54: 41–50
- [8] Cartee G.D., Funai K.: Exercise and insulin: convergence or divergence at AS160 and TBC1D1? *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 2009; 37: 188–195
- [9] Chen S., Murphy J., Toth R., Campbell D.G., Morrice N.A., Mackintosh C.: Complementary regulation of TBC1D1 and AS160 by growth factors, insulin and AMPK activators. *Biochem. J.*, 2008; 409: 449–459
- [10] Czech M.P., Corvera S.: Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1865–1868
- [11] Dash S., Sano H., Rochford J.J., Semple R.K., Yeo G., Hyden C.S., Soos M.A., Clark J., Rodin A., Langenberg C., Druet C., Fawcett K.A., Tung Y.C., Wareham N.J., Barroso I., Lienhard G.E., O'Rahilly S., Savage D.B.: A truncation mutation in TBC1D4 in a family with acanthosis nigricans and postprandial hyperinsulinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 9350–9355
- [12] Dreyer H.C., Drummond M.J., Glynn E.L., Fujita S., Chinkes D.L., Volpi E., Rasmussen B.B.: Resistance exercise increases human skeletal muscle AS160/TBC1D4 phosphorylation in association with enhanced leg glucose uptake during postexercise recovery. *J. Appl. Physiol.*, 2008; 105: 1967–1974
- [13] Dugani C.B., Klip A.: Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep.*, 2005; 6: 1137–1142
- [14] Eguez L., Lee A., Chavez J.A., Miinea C.P., Kane S., Lienhard G.E., McGraw T.E.: Full intracellular retention of GLUT-4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab.*, 2005; 2: 263–272
- [15] Frösig C., Richter E.A.: Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling. *Obesity*, 2009; 17: S15–S20
- [16] Frösig C., Rose A.J., Treebak J.T., Kiens B., Richter E.A., Wojtaszewski J.F.: Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle. *Diabetes*, 2007; 56: 2093–2102
- [17] Funai K., Cartee G.D.: Contraction-stimulated glucose transport in rat skeletal muscle is sustained despite reversal of increased PAS-phosphorylation of AS160 and TBC1D1. *J. Appl. Physiol.*, 2008; 105: 1788–1795
- [18] Funai K., Schweitzer G.G., Sharma N., Kanzaki M., Cartee G.D.: Increased AS160 phosphorylation, but not TBC1D1 phosphorylation, with increased postexercise insulin sensitivity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009; 297: E242–E251
- [19] Gonzalez E., McGraw T.E.: Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 7004–7009
- [20] Hawley J.A., Lessard S.J.: Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol.*, 2008; 192: 127–135
- [21] Holloszy J.O.: Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol.*, 2005; 99: 338–343
- [22] Hou J.C., Pessin J.E.: Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2007; 19: 466–473
- [23] Howlett K.F., Mathews A., Garnham A., Sakamoto K.: The effect of exercise and insulin on AS160 phosphorylation and 14-3-3 binding capacity in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008; 294: E401–E407
- [24] Howlett K.F., Sakamoto K., Garnham A., Cameron-Smith D., Hargreaves M.: Resistance exercise and insulin regulate AS160 and interaction with 14-3-3 in human skeletal muscle. *Diabetes*, 2007; 56: 1608–1614
- [25] Ishikura S., Koshkina A., Klip A.: Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic. *Acta Physiol.*, 2008; 192: 61–74
- [26] Jazet I.M., Schaart G., Gastaldelli A., Ferrannini E., Hesselink M.K., Schrauwen P., Romijn J.A., Maassen J.A., Pijl H., Ouwens D.M., Meinders A.E.: Loss of 50 % of excess weight using a very low energy diet improves insulin-stimulated glucose disposal and skeletal muscle insulin signaling in obese insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetologia*, 2008; 51: 309–319
- [27] Jessen N., Goodyear L.J.: Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 2005; 99: 330–337
- [28] Kane S., Sano H., Liu S.C., Asara J.M., Lane W.S., Garner C.C., Lienhard G.E.: A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 22115–22118
- [29] Karlsson H.K., Ahlsén M., Zierath J.R., Wallberg-Henriksson H., Koistinen H.A.: Insulin signaling and glucose transport in skeletal muscle from first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2006; 55: 1283–1288
- [30] Karlsson H.K., Hällsten K., Björnholm M., Tsuchida H., Chibalin A.V., Virtanen K.A., Heinonen O.J., Lönnqvist F., Nuutila P., Zierath J.R.: Effects of metformin and rosiglitazone treatment on insulin signaling and glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Diabetes*, 2005; 54: 1459–1467
- [31] Karlsson H.K., Zierath J.R., Kane S., Krook A., Lienhard G.E., Wallberg-Henriksson H.: Insulin stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 2005; 54: 1692–1697
- [32] Kramer H.F., Witczak C.A., Taylor E.B., Fujii N., Hirshman M.F., Goodyear L.J.: AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 31478–31485
- [33] Krook A., Björnholm M., Galuska D., Jiang X.J., Fahlman R., Myers M.G. Jr., Wallberg-Henriksson H., Zierath J.R.: Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2000; 49: 284–292
- [34] Larance M., Ramm G., Stöckli J., van Dam E.M., Winata S., Wasinger V., Simpson F., Graham M., Junutula J.R., Guilhaum M., James D.E.: Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 37803–37813
- [35] O'Gorman D.J., Karlsson H.K., McQuaid S., Yousif O., Rahman Y., Gasparro D., Glund S., Chibalin A.V., Zierath J.R., Nolan J.J.: Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2006; 49: 2983–2992
- [36] Peck G.R., Chavez J.A., Roach W.G., Budnik B.A., Lane W.S., Karlsson H.K., Zierath J.R., Lienhard G.E.: Insulin-stimulated phosphorylation of the Rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 30016–30023
- [37] Rose A.J., Richter E.A.: Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology (Bethesda)*, 2005; 20: 260–270
- [38] Ryder J.W., Kawano Y., Galuska D., Fahlman R., Wallberg-Henriksson H., Charron M.J., Zierath J.R.: Postexercise glucose uptake and glycogen synthesis in skeletal muscle from GLUT4-deficient mice. *FASEB J.*, 1999; 13: 2246–2256
- [39] Sakamoto K., Holman G.D.: Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2008; 295: E29–E37
- [40] Santos J.M., Ribeiro S.B., Gaya A.R., Appell H.J., Duarte J.A.: Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake. *Int. J. Sports Med.*, 2008; 29: 785–794

- [41] Sharma N., Arias E.B., Cartee G.D.: Rapid reversal of insulin-stimulated AS160 phosphorylation in rat skeletal muscle after insulin exposure. *Physiol. Res.*, 2010; 59: 71–78
- [42] Sriwijitkamol A., Coletta D.K., Wajsborg E., Balbontin G.B., Reyna S.M., Barrientes J., Eagan P.A., Jenkinson C.P., Cersosimo E., DeFronzo R., Sakamoto K., Musi N.: Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. *Diabetes*, 2007; 56: 836–848
- [43] Stöckli J., Davey J.R., Hohnen-Behrens C., Xu A., James D.E., Ramm G.: Regulation of glucose transporter 4 translocation by the Rab guanosine triphosphatase-activating protein AS160/TBC1D4: role of phosphorylation and membrane association. *Mol. Endocrinol.*, 2008; 22: 2703–2715
- [44] Thong F.S., Bilan P.J., Klip A.: The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes*, 2007; 56: 414–423
- [45] Treebak J.T., Birk J.B., Rose A.J., Kiens B., Richter E.A., Wojtaszewski J.F.: AS160 phosphorylation is associated with activation of $\alpha_2\beta_2\gamma_1$ -but not $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ -AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E715–E722
- [46] Treebak J.T., Frøsig C., Pehmøller C., Chen S., Maarbjer S.J., Brandt N., MacKintosh C., Zierath J.R., Hardie D.G., Kiens B., Richter E.A., Pilegaard H., Wojtaszewski J.F.: Potential role of TBC1D4 in enhanced post-exercise insulin action in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 2009; 52: 891–900
- [47] Treebak J.T., Glund S., Deshmukh A., Klein D.K., Long Y.C., Jensen T.E., Jørgensen S.B., Viollet B., Andersson L., Neumann D., Wallimann T., Richter E.A., Chibalin A.V., Zierath J.R., Wojtaszewski J.F.: AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes*, 2006; 55: 2051–2058
- [48] Vind B.F., Pehmøller C., Treebak J.T., Birk J.B., Hey-Mogensen M., Beck-Nielsen H., Zierath J.R., Wojtaszewski J.F., Højlund K.: Impaired insulin-induced site-specific phosphorylation of TBC1 domain family, member 4 (TBC1D4) in skeletal muscle of type 2 diabetes patients is restored by endurance exercise-training. *Diabetologia*, 2010; 54: 157–167
- [49] Watson R.T., Pessin J.E.: Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog. Horm. Res.*, 2001; 56: 175–193
- [50] White M.F.: IRS proteins and common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2002; 283: E413–E422
- [51] Witczak C.A., Fujii N., Hirshman M.F., Goodyear L.J.: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- α regulates skeletal muscle glucose uptake independent of AMP-activated protein kinase and Akt activation. *Diabetes*, 2007; 56: 1403–1409
- [52] Woods A., Dickerson K., Heath R., Hong S.P., Momcilovic M., Johnstone S.R., Carlson M., Carling D.: Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.*, 2005; 2: 21–33
- [53] Woods A., Johnstone S.R., Dickerson K., Leiper F.C., Fryer L.G., Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., Carlson M., Carling D.: LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.*, 2003; 13: 2004–2008
- [54] Zaid H., Antonescu C.N., Randhawa V.K., Klip A.: Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem. J.*, 2008; 413: 201–215
- [55] Zeigerer A., McBrayer M.K., McGraw T.E.: Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol. Biol. Cell.*, 2004; 15: 4406–4415

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.