

Il segnale intracellulare dell'insulina: complessità e interferenze nella trasmissione del messaggio

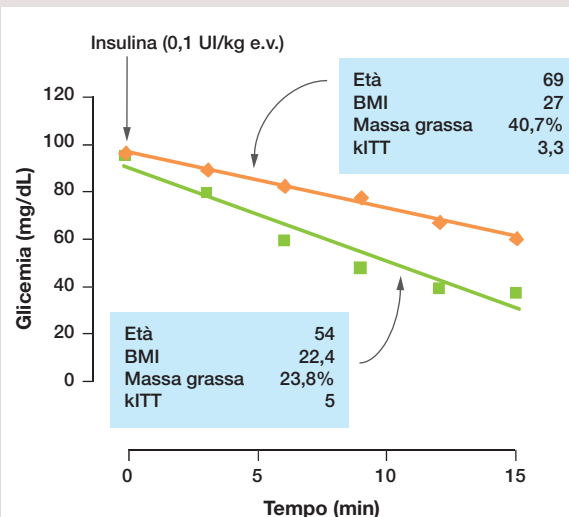
Francesco Giorgino

Medicina Interna, Endocrinologia e Malattie Metaboliche, Dipartimento dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi, Università degli Studi di Bari

La trasmissione del segnale dell'insulina all'interno della cellula rappresenta un processo complesso e potenzialmente suscettibile di numerose interferenze. Lo si può comprendere molto bene se si fa riferimento a una esperienza essenzialmente clinica che è la effettuazione di un test di tolleranza insulinica (ITT) in soggetti differenti. L'infusione di insulina in vena alla dose di 0,1 UI/kg in un soggetto di età media normopeso e con una normale quantità di tessuto adiposo produce nei minuti successivi una progressiva riduzione della glicemia (Figura 1). Se però la stessa dose di insulina viene somministrata a un altro soggetto che ha la stessa glicemia di base ma è più anziano, in sovrappeso e con una maggiore quantità di tessuto adiposo, la caduta della glicemia è meno pronunciata, cosicché la pendenza della linea che descrive l'andamento della glicemia in funzione del tempo è decisamente inferiore (Figura 1). Il secondo soggetto si definisce insulino-resistente rispetto al primo e questa differenza è espressa anche dal valore della costante del test (kITT), che risulta inferiore. Questa esperienza, che può essere effettuata anche in un ambulatorio di diabetologia, esprime molto chiaramente il concetto che l'insulina possiede un messaggio biologico che può essere espresso in modo differente da soggetto a soggetto, in relazione ad alcune caratteristiche cliniche che modificano l'efficienza con cui il messaggio viene decodificato, in primo luogo dal recettore insulinico e quindi dall'apparato di trasmissione del segnale a livello intracellulare (1).

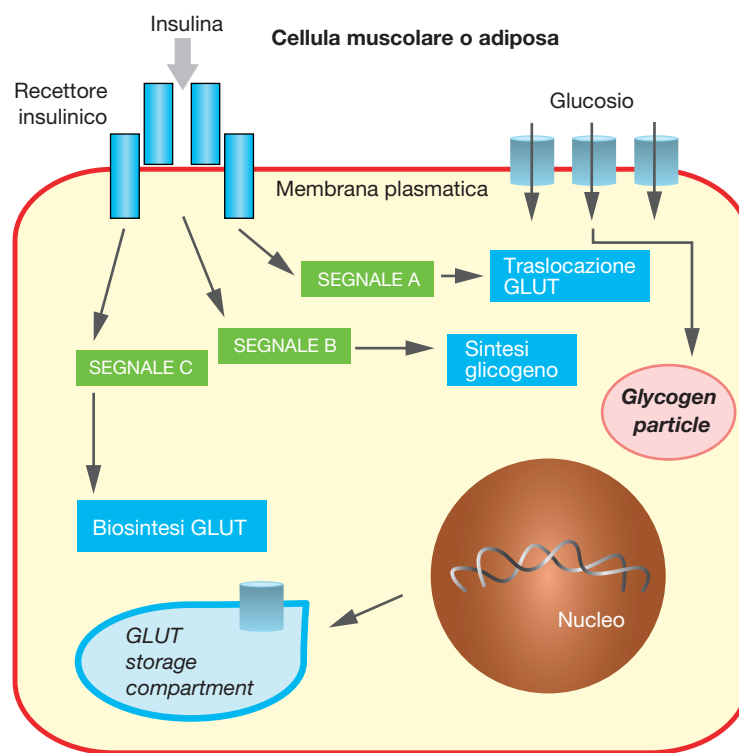
La capacità dell'insulina di ridurre la glicemia deriva dall'attivazione di molteplici segnali all'interno della cellula e ci riferiamo in particolare alle cellule muscolari o adipose (Figura 2). L'insulina si lega al suo recettore localizzato sulla superficie cellulare e attiva in primo luogo un segnale, che possiamo definire "segnale A", responsabile della traslocazione dei trasportatori del glucosio (GLUT) sulla superficie cellulare. Una volta che si sono posizionati sulla membrana plasmatica,

Figura 1 Test di tolleranza insulinica eseguito in due soggetti con differenti caratteristiche cliniche



La massa grassa è stata determinata mediante bioimpedenziometria

Lettura Premio SID Alcmeone, XXII Congresso della Società Italiana di Diabetologia. Torino, 26-29 maggio 2008

Figura 2 **Complessità del segnale insulinico**

Sono illustrati i tre segnali A, B e C, che regolano rispettivamente la traslocazione dei trasportatori del glucosio sulla membrana plasmatica, la sintesi di glicogeno e la biosintesi dei GLUT in cellule muscolari scheletriche e adipose

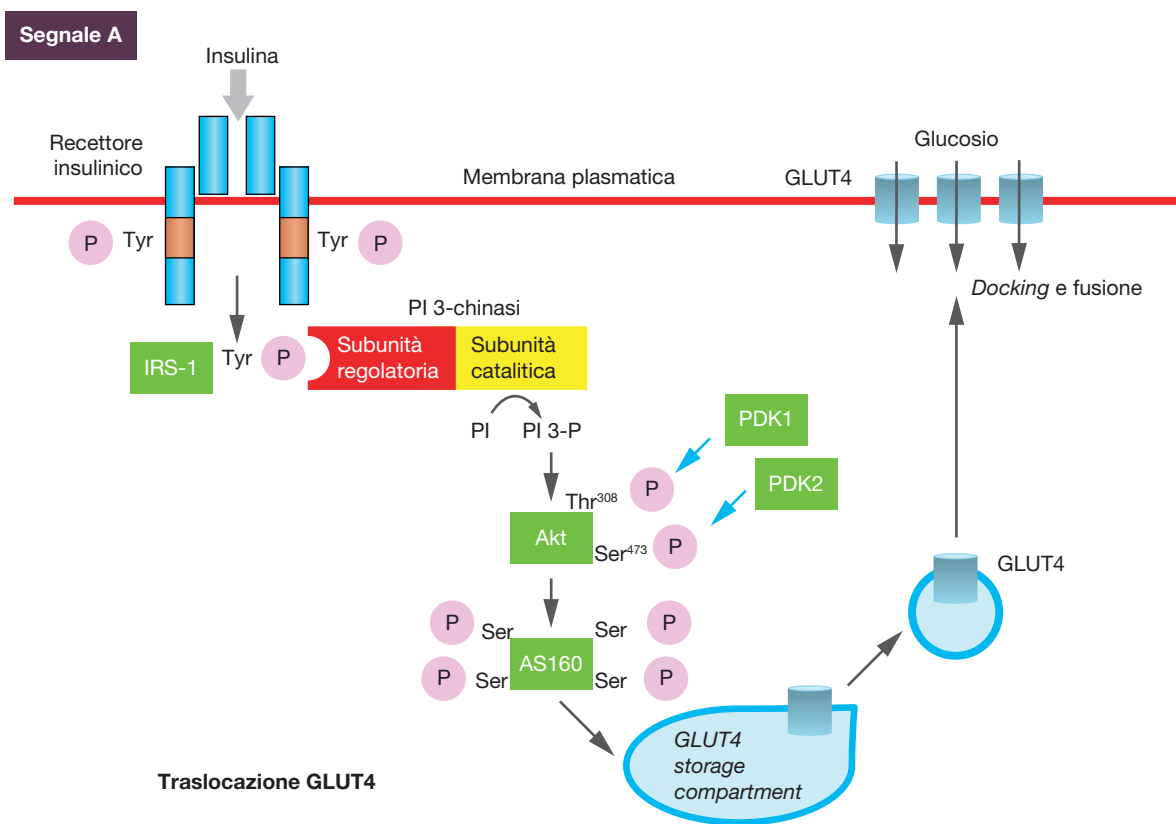
questi trasportatori costituiscono dei veri e propri canali che consentono l'ingresso del glucosio nella cellula. Il metabolismo del glucosio a livello cellulare è regolato anche da un secondo segnale, il "segnale B", responsabile della trasformazione del glucosio in glicogeno attraverso l'azione di alcuni enzimi tra cui la esochinasi (che fosforila il glucosio in glucosio 6-fosfato) e la glicogeno-sintetasi. Infine, l'insulina ha effetti importanti sulla trascrizione genica e può regolare la stessa biosintesi dei trasportatori del glucosio attraverso un aumento dei livelli di mRNA dei GLUT. Anche questo processo è regolato dall'attivazione di uno specifico segnale prodotto dall'insulina ("segnale C"). È importante sottolineare che la piena azione insulinica sul metabolismo del glucosio è costituita da tutte e tre queste componenti: rappresenta quindi il risultato della integrazione di più segnali che devono essere attivati in maniera efficace e bilanciata perché l'insulina possa trasmettere pienamente il suo messaggio biologico alla cellula.

Perché il segnale insulinico possa essere efficace, deve possedere una intensità idonea. Vi sono però numerose situazioni in cui l'intensità del segnale può essere modificata e questo può avere delle conseguenze sulla trasmissione del messaggio biologico dell'insulina. Riferiamo questa caratteristica al segnale A. Come ricordato, il segnale A media la traslocazione del trasportatore del glucosio GLUT4 sulla superficie cellulare. Questo processo prevede in realtà l'attivazione di numerose tappe biochimiche e il coinvolgimento di molteplici proteine. Il legame dell'insulina al proprio recettore attiva la tirosin-chinasi intrinseca alla molecola recettoriale che determina la fosforilazione in tirosina della proteina *insulin receptor substrate* (IRS)-1; quando IRS-1 è fosforilata in tirosina, una seconda molecola, la fosfatidilinositolo (PI) 3-chinasi, un enzima composto da una subunità regolatoria e una subunità catalitica, si lega a IRS-1 attraverso la subunità regolatoria, quindi la subunità catalitica viene attivata e trasforma il fosfatidilinositolo (PI) in fosfatidilinosi-

tolo 3-fosfato (PI 3-P). Quest'ultimo rappresenta un ulteriore segnale biochimico che produce l'attivazione di un'altra proteina, denominata Akt, che si fosforila e va a fosforilare alcune proteine-substrato intracellulari. Una proteina molto importante per la traslocazione del GLUT4 è la AS160. In seguito a questi eventi, le vescicole contenenti i trasportatori GLUT4 si spostano da un compartimento intracellulare altamente sensibile all'insulina, il GLUT4 *storage compartment*, verso la membrana plasmatica; le vescicole contenenti il GLUT4 attraccano in prossimità della membrana plasmatica, si fondono con essa e arricchiscono la membrana di trasportatori del glucosio (Figura 3). Tutto questo avviene nell'arco di pochi minuti in seguito all'applicazione dello stimolo insulinico. Il segnale A può essere regolato nella sua intensità. Per esempio, può essere

influenzato dal grado di insulinizzazione dell'organismo. Questo può essere apprezzato esaminando ratti resi diabetici mediante iniezione di streptozotocina, una sostanza che distrugge le β -cellule pancreatiche e rende gli animali ipoinsulinemici e iperglicemici, in condizioni basali e dopo trapianto di isole pancreatiche, che ripristinano la secrezione insulinica stimolata dal glucosio e normalizzano la glicemia. Lo studio del segnale insulinico nel muscolo scheletrico di questi animali sperimentali ha consentito di dimostrare importanti variazioni dell'intensità del segnale in relazione ai livelli di insulina circolante (2, 3). In particolare, l'attivazione della PI 3-chinasi, valutata misurando la produzione del PI 3-P, risulta notevolmente aumentata nell'animale diabetico e ipoinsulinemico rispetto all'animale di controllo - sia in condizioni

Figura 3 **Segnale A, implicato nella regolazione della traslocazione del GLUT4 da un compartimento intracellulare alla membrana plasmatica**



Il segnale si trasmette attraverso l'attivazione sequenziale del recettore insulinico e delle proteine IRS-1, PI 3-chinasi, Akt e AS160. All'attivazione di Akt concorrono la chinasi PDK1 e l'ipotetica chinasi PDK2, responsabili della fosforilazione di Akt a livello rispettivamente della treonina 308 e della serina 473

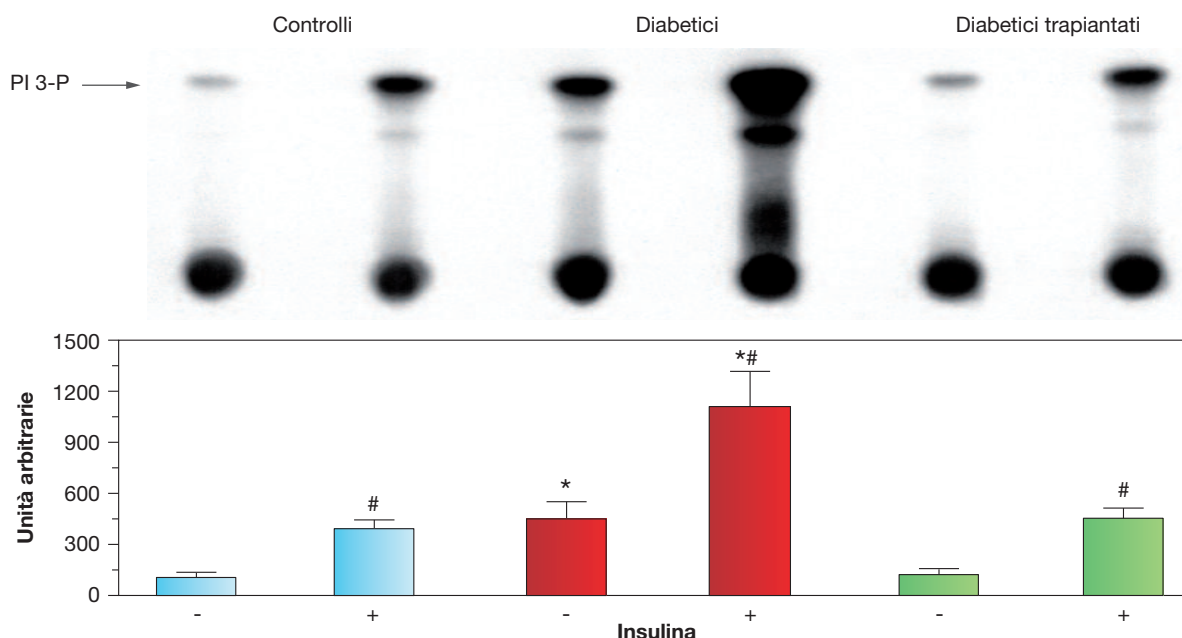
basali sia dopo stimolazione con insulina - e ritorna ai livelli normali quando il diabete da carenza di insulina viene curato mediante trapianto di isole pancreatiche (Figura 4). Quindi, in condizioni di ipoinsulinemia l'intensità del segnale viene incrementata e, quando si ripristina la secrezione insulinica, l'intensità del segnale torna ai livelli di normalità. Le variazioni di intensità del segnale derivano dalle modificazioni dei livelli di insulina piuttosto che di glicemia (2).

Un'altra importante caratteristica del segnale insulinico riguarda la cinetica di attivazione. Abbiamo recentemente studiato nel tessuto adiposo umano *in vivo* la cinetica di attivazione delle proteine del segnale insulinico dopo l'applicazione di una dose di insulina identica a quella utilizzata nell'ITT (0,1 UI/kg ev) (4). Nel tessuto adiposo sottocutaneo e in quello viscerale l'insulina attiva il suo segnale con una cinetica molto diversa (Figura 5). Ad esempio, la fosforilazione della proteina Akt dopo la stimolazione con insulina si realizza in maniera graduale e progressiva nel tessuto adiposo sottocutaneo e i livelli maggiori si ottengono sol-

tanto dopo 30 minuti. Al contrario, nel tessuto adiposo viscerale (omentale) l'insulina attiva Akt molto più rapidamente, dopo solo 6 minuti; dopo 30 minuti il segnale si riduce lievemente a indicare che, oltre a essere più rapida, la risposta è anche più transitoria. Questi studi dimostrano che il tessuto adiposo viscerale risponde con una cinetica più vivace allo stimolo insulinico rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo, probabilmente perché è più attivo dal punto di vista metabolico.

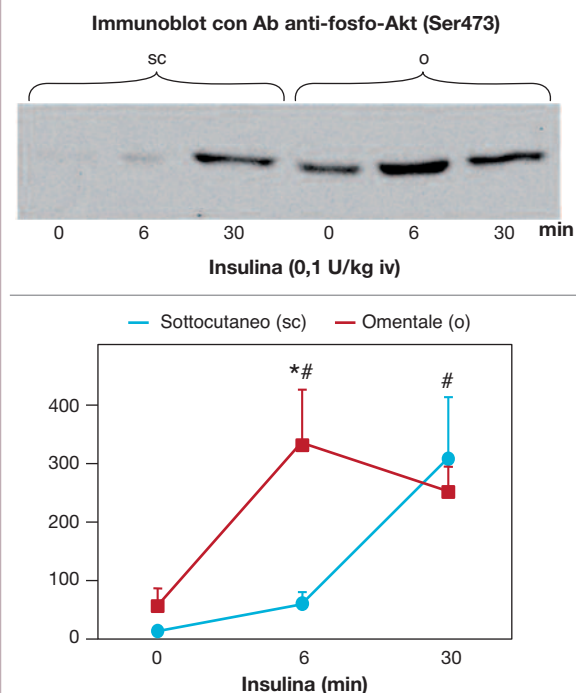
È stato suggerito da molto tempo che gli adipociti della regione addominale possono essere più sensibili a fattori nutrizionali e ormonali rispetto a quelli presenti in altre sedi corporee. Questo potrebbe essere dovuto anche alla presenza di diverse sottopopolazioni di adipociti presenti in questi diversi distretti di tessuto adiposo. Oggi è possibile studiare le popolazioni adipocitarie e i loro precursori utilizzando biopsie di tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo (5). In particolare, si possono isolare dei precursori adipocitari che possiedono molte delle caratteristiche delle cellule staminali

Figura 4 **Attività della PI 3-chinasi associata a IRS-1 nel muscolo scheletrico**



Attività della PI 3-chinasi associata a IRS-1 nel muscolo scheletrico di ratti di controllo, resi diabetici mediante somministrazione di streptozotocina e trapiantati mediante isole pancreatiche impiantate sotto la capsula renale dopo l'induzione del diabete. Gli animali sono stati studiati in condizioni basali o 30 minuti dopo la somministrazione di 20 UI di insulina per via intraperitoneale. # $p < 0,05$ vs. no insulina; * $p < 0,05$ vs. controlli e diabetici trapiantati. Mod. da (3)

Figura 5 Fosforilazione di Akt indotta dall'insulina nel tessuto adiposo umano sottocutaneo e viscerale *in vivo*



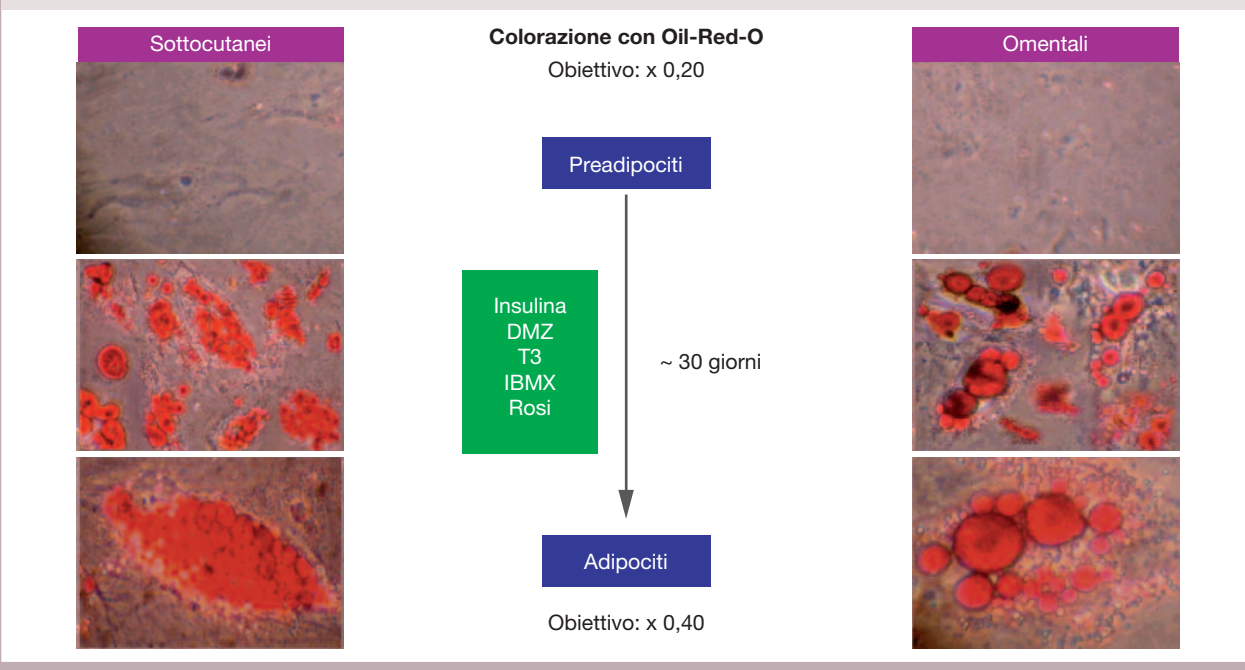
Soggetti normali sono stati stimolati con 0,1 UI/kg di insulina iniettata in vena nel corso di un intervento chirurgico eseguito per altre finalità. La glicemia è stata mantenuta prossima a 100 mg/dL attraverso la contemporanea infusione di soluzione glucosata al 5%. Biopsie di tessuto adiposo sottocutaneo addominale e omentale sono state ottenute in condizioni basali e 6 e 30 minuti dopo l'applicazione dello stimolo insulinico. La fosforilazione di Akt a livello della serina 473 è stata rilevata mediante l'uso di anticorpi fosfo-specifici. # $p < 0,05$ vs. basale; * $p < 0,05$ vs. tessuto adiposo sottocutaneo. Mod. da (4)

presenti nel midollo osseo, metterli in coltura e differenziarli in adipociti maturi grazie all'azione di sostanze che favoriscono il differenziamento in senso adipocitario, quali *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) γ agonisti, desametasone (DMZ), insulina, inibitori delle fosfodiesterasi, T_3 (Figura 6). È importante sottolineare che gli adipociti ottenuti in questo modo vengono ottenuti *in vitro* nel corso di alcune settimane, lontano dal microambiente del tessuto adiposo di provenienza. Se questi adipociti vengono esaminati per la loro reattività allo stimolo insulinico, si osservano alcune delle caratteristiche riferite alla diversa cinetica di attivazione del segnale insulinico che sono evidenziabili *in vivo* (Figura 5). Infatti, la fosforilazione del recettore insulinico e di molte delle proteine del segnale intracellulare (IRS-1, Akt, *mitogen-activated protein*

(MAP) chinasi) avviene in maniera più graduale negli adipociti differenziati dai precursori del tessuto adiposo sottocutaneo e più rapidamente e transitoriamente negli adipociti differenziati dai precursori del tessuto adiposo viscerale (Figura 7). La diversità di cinetica è associata a importanti differenze dal punto di vista biologico: infatti, il trasporto del glucosio viene stimolato dall'insulina in misura molto maggiore negli adipociti differenziati dai precursori viscerali (Figura 7), suggerendo che, anche quando differenziate *in vitro* da cellule progenitrici, queste cellule appaiono metabolicamente più attive rispetto alla controparte sottocutanea (5). Quindi la diversa cinetica del segnale insulinico sembra essere già in qualche modo presente nelle cellule progenitrici isolabili dal tessuto adiposo viscerale o sottocutaneo. Ancor prima di diventare adipociti, queste cellule sarebbero già orientate ad acquisire un assetto metabolico specifico che viene poi espresso pienamente al termine del processo di differenziamento in adipociti maturi. Naturalmente, anche fattori estrinseci (metabolici, ormonali, neuronali, vascolari) intervengono nelle varie tappe del differenziamento e possono modulare l'attività dei fattori trascrizionali adipogenetici (Figura 8). Che questa ipotesi possa essere vera è suggerito anche dal recente studio di Tchkonja et al. (6) che ha dimostrato come il profilo di espressione genica di precursori cellulari presenti nel tessuto adiposo viscerale (omentale) sia notevolmente diverso rispetto al profilo di espressione genica dei precursori sottocutanei.

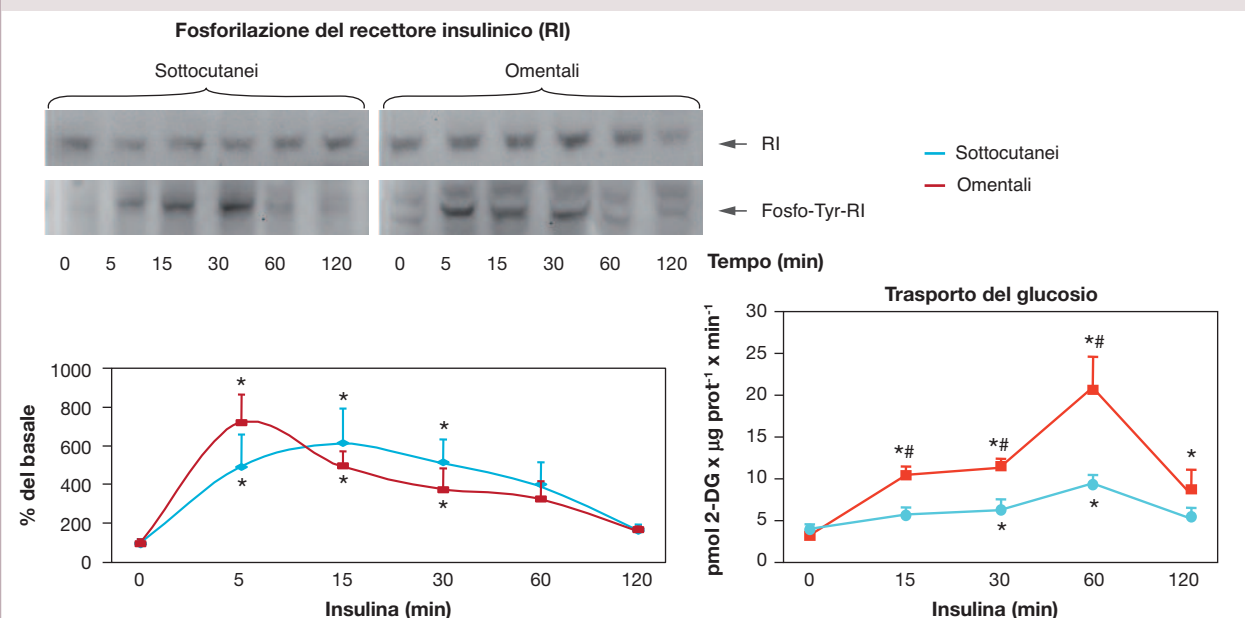
Una terza caratteristica del segnale è rappresentata dall'efficienza con cui esso si trasmette da una proteina situata a monte a una proteina situata a valle nella cascata biochimica che viene attivata nella cellula. A tale proposito, possono essere richiamate due situazioni che riguardano rispettivamente la regolazione della PI 3-chinasi e la trasmissione del segnale da Akt a GSK-3. È noto che la esposizione ai glucocorticoidi comporta la induzione di una condizione di insulino-resistenza e a volte anche di iperglicemia. Il meccanismo molecolare attraverso il quale i glucocorticoidi inducono insulino-resistenza a livello del muscolo scheletrico non è rappresentato dalla riduzione del numero di recettori insulinici nelle cellule, che sono al contrario aumentati (7). Invece, nelle cellule muscolari scheletriche esposte a un eccesso di glucocorticoidi, l'attività della PI 3-chinasi stimolata da insulina o IGF-I (un fattore di crescita insulino-simile spesso utilizzato al posto dell'insulina per stimolare le cellule musco-

Figura 6 Differenziamento di precursori stromali ottenuti dal tessuto sottocutaneo e omentale umano in adipociti maturi *in vitro*

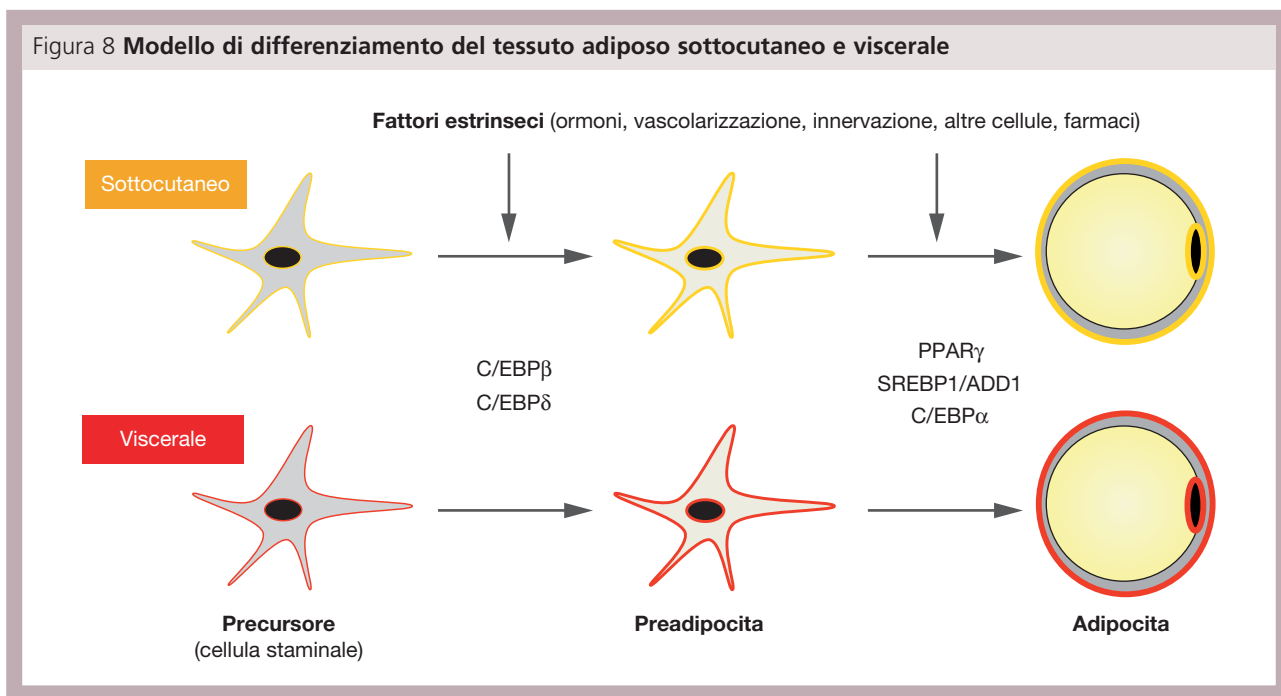


Il processo di differenziamento avviene in presenza di fattori di stimolo rappresentati da insulina, desametasone, T3, isometilbutilxantina (IBMX) e rosiglitazone (Rosi) e si compie in circa 30 giorni, al termine dei quali le cellule acquisiscono le caratteristiche goccioline lipidiche (colorate in rosso dal colorante lipofilo Oil-Red-O)

Figura 7 Attivazione del recettore insulinico e trasporto del glucosio in adipociti differenziati *in vitro* a partire da precursori stromali



Le cellule sono state stimulate con insulina 10 nM per i tempi indicati e quindi sottoposte ad analisi per valutare il contenuto totale e la fosforilazione in tirosina dei recettori per l'insulina (RI) e la velocità di trasporto del glucosio. * $p < 0,05$ vs. basale (1-way ANOVA); # $p < 0,05$ vs. adipociti sottocutanei. Mod. da (5)

Figura 8 **Modello di differenziamento del tessuto adiposo sottocutaneo e viscerale**

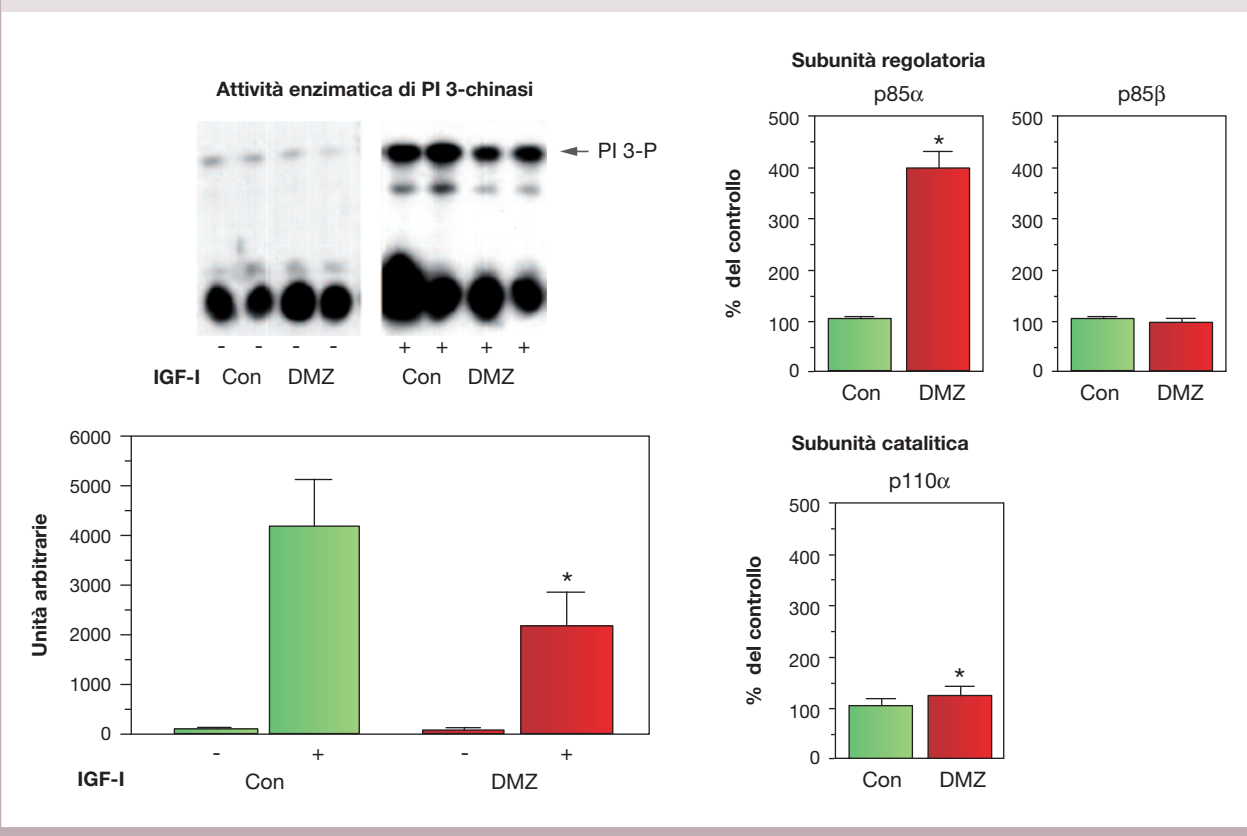
I precursori stromali indifferenziati (che presentano caratteristiche simili alle cellule staminali del midollo osseo) possiederebbero già in questo stadio caratteristiche intrinseche specifiche rispetto al tessuto di provenienza, che vengono mantenute durante il processo di differenziamento in adipociti sottocutanei e viscerali. Questo processo si compie attraverso l'azione di fattori trascrizionali che operano in senso adipogenico (C/EBP, PPAR, SREBP) e l'influenza di fattori estrinseci (ormoni, vascolarizzazione, innervazione, presenza di altri tipi cellulari e farmaci)

lari scheletriche in coltura) risulta ridotta (8). Il motivo per cui i glucocorticoidi realizzano un'interferenza nel segnale dell'IGF-I o dell'insulina inibendo l'attività della PI 3-chinasi dipende dal fatto che essi alterano l'equilibrio tra le diverse subunità dell'enzima, le subunità regolatorie e quelle catalitiche. Infatti, nelle cellule muscolari i glucocorticoidi determinano un notevole aumento dei livelli di espressione della subunità regolatoria p85 α che risultano 4 volte maggiori rispetto alle cellule di controllo (Figura 9). Non si osserva invece alcuna variazione nella quantità cellulare dell'altra isoforma regolatoria, la p85 β e vi è solo un modesto incremento della subunità catalitica p110 α (Figura 9). Questo significa che nelle cellule la subunità regolatoria p85 α può esistere allo stato monomerico cioè presente come subunità singola non associata ad alcuna subunità catalitica. In alcune condizioni che inducono insulino-resistenza, come l'eccesso di glucocorticoidi, i livelli cellulari di subunità p85 α monomerica possono aumentare. La subunità regolatoria monomerica essendo priva di subunità catalitica, non può produrre PI 3-P e quindi è enzimaticamente inattiva. Inoltre, legandosi preferenzialmente a IRS-1 al posto dell'enzima attivo eterodimerico costituito da subunità regolatoria

e subunità catalitica, blocca la trasmissione del segnale a proteine a valle come Akt (Figura 10, A e B). Questo meccanismo, che ipotizza la presenza nei tessuti e nelle cellule di subunità regolatorie monomeriche in grado di aumentare per effetto di fattori che inducono insulino-resistenza, è stato per la prima volta descritto nel caso dell'eccesso di glucocorticoidi (8). Successivamente è stato individuato in numerosi altri modelli di insulino-resistenza sperimentale e umana, tra cui quella prodotta da un eccesso di ormone della crescita (come avviene nell'acromegalia), quella associata alla gravidanza o l'insulino-resistenza del soggetto obeso o con diabete mellito tipo 2 (DMT2) (Tabella 1). La controprova sperimentale che questa ipotesi sia vera deriva da studi condotti attraverso l'approccio degli animali manipolati geneticamente, i topi *knock-out*, in cui l'eliminazione della p85 α o della p85 β migliora la sensibilità insulinica e protegge l'animale sperimentale dall'insorgenza di diabete (Tabella 2). Anche l'aumento della sensibilità insulinica che si verifica nella donna dopo il termine della gravidanza si associa a una riduzione dei livelli di subunità p85 α nel muscolo scheletrico (Tabella 2).

Un altro esempio di riduzione dell'efficienza di tra-

Figura 9 Riduzione dell'attività della PI 3-chinasi in cellule muscolari scheletriche esposte a un eccesso di glucocorticoidi



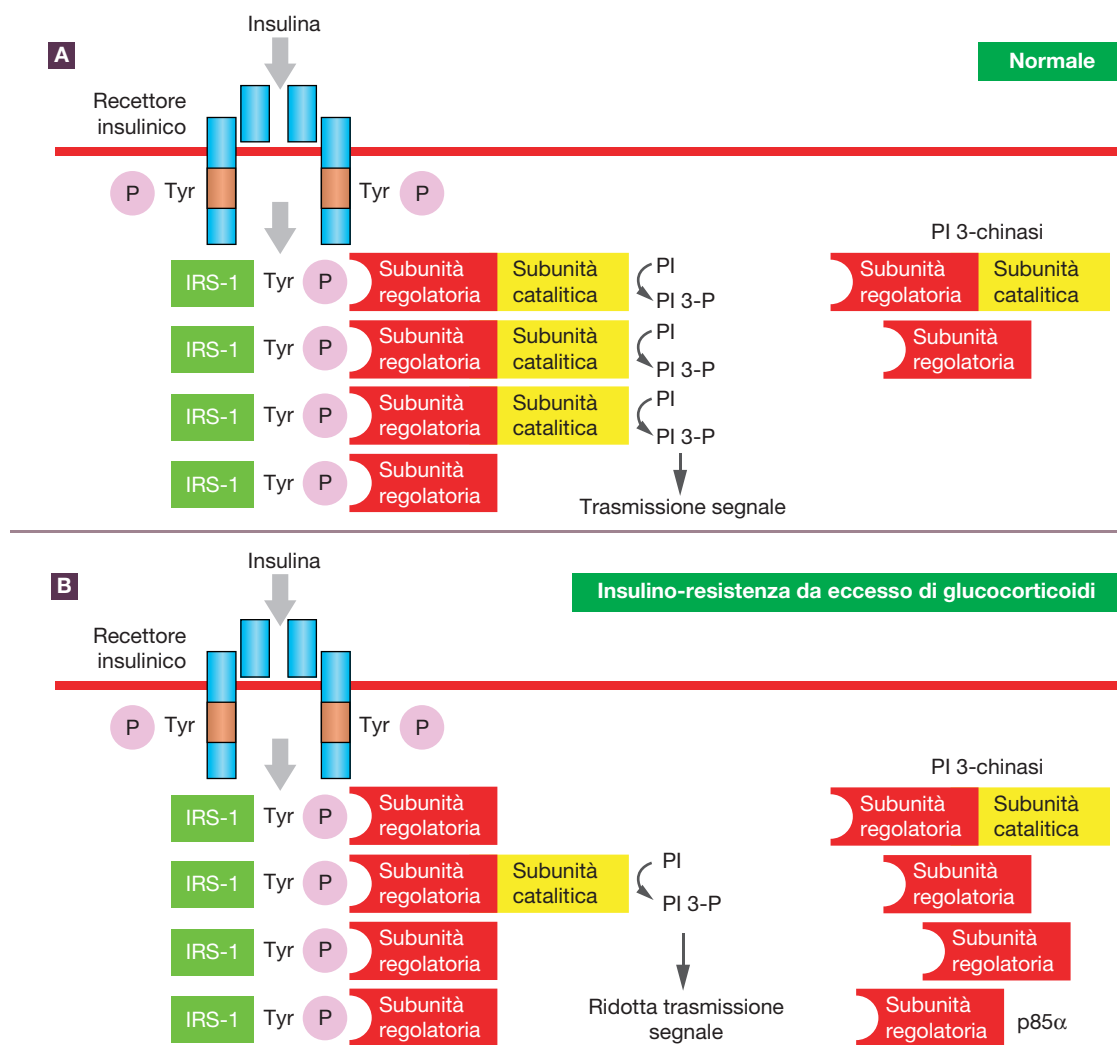
Cellule muscolari scheletriche di ratto L6 trattate con desametasone 1 μ M per 72 ore mostrano una riduzione dell'attività dell'enzima PI 3-chinasi quando stimolate acutamente per 10 minuti con il fattore insulino-simile IGF-I alla concentrazione di 100 nM. Questo si associa a un notevole aumento della subunità regolatoria di PI 3-chinasi p85 α senza variazioni della subunità regolatoria p85 β e con minime variazioni della subunità catalitica p110 α . * $p < 0,05$ vs. controllo. Mod. da (8)

missione del segnale riguarda il segnale B che regola la sintesi di glicogeno (Figura 11). Un altro substrato di Akt è rappresentato dalla chinasi GSK-3. In condizioni di base, GSK-3 fosforila la glicogeno-sintetasi, inattivandola. Se GSK-3 viene fosforilata in serina da Akt in seguito allo stimolo insulinico, l'attività chinastica di GSK-3 viene inibita e, pertanto, la glicogeno-sintetasi non è più fosforilata e può essere attivata, producendo un aumento della sintesi di glicogeno. Nel miocardio di ratti resi diabetici mediante streptozotocina la sintesi di glicogeno stimolata dall'insulina è ridotta (9). È noto, d'altra parte, che la miocardiopatia diabetica si caratterizza per la riduzione dell'utilizzo di glucosio come substrato energetico, a favore degli acidi grassi e che questo si associa a disfunzione miocardica. Nel miocardio degli animali diabetici il segnale B è inalterato fino al livello di Akt, che risulta normalmente fosforilata in

seguito allo stimolo con insulina. Tuttavia, la capacità di Akt - ancorché fosforilata e quindi apparentemente attivata - di fosforilare a sua volta GSK-3 è notevolmente deficitaria (Figura 12). Infatti, l'insulina stimola la fosforilazione di GSK-3 nel miocardio dell'animale di controllo ma non in quello dell'animale diabetico (10). Esiste quindi nel tessuto miocardico in presenza di diabete un difetto di comunicazione tra Akt e GSK-3. Per ragioni non ancora chiarite, la chinasi Akt viene fosforilata normalmente ma non riesce a fosforilare e quindi a inattivare GSK-3: questo comporta la permanenza della glicogeno-sintetasi nello stato inattivo con riduzione della sintesi di glicogeno nel miocardio diabetico.

La trasmissione del messaggio biologico dell'insulina richiede che vengano attivati in maniera integrata e bilanciata segnali o vie biochimiche indipendenti.

Figura 10 Attivazione della PI 3-chinasi in condizioni normali (A) e in presenza di un eccesso di glucocorticoidi (B)



L'eccesso di glucocorticoidi produce insulino-resistenza inducendo un eccesso cellulare di subunità regolatoria p85 α monomerica, che compete con il complesso enzimatico eterodimerico p85 α p110 α per il legame alla proteina IRS-1 fosforilata in tirosina

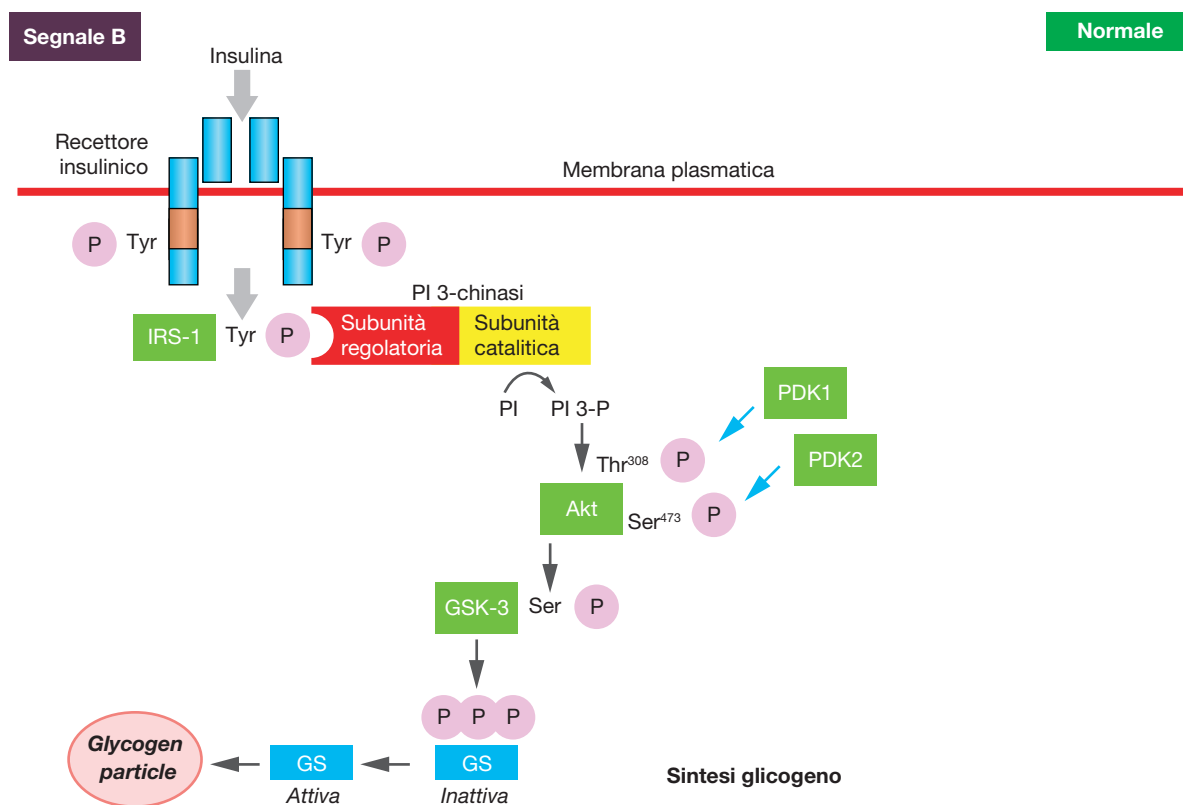
Tabella 1 Insulino-resistenza da iperespressione selettiva della p85 α

Condizione	Tessuto	Referenza
Eccesso di glucocorticoidi	Muscolo scheletrico	Giorgino F, J Biol Chem, 1997 Giorgino F, J Clin Invest, 1995
Eccesso di GH	Muscolo scheletrico Tessuto adiposo	Barbour LA, J Biol Chem, 2005 Del Rincon JP, Diabetes, 2007
GH placentare	Muscolo scheletrico	Barbour LA, Endocrinology, 2004
Soggetti insulino-resistenti o con DMT2	Muscolo scheletrico	Bandyopadhyay GK, Diabetes, 2005
Soggetti dopo carico calorico	Muscolo scheletrico	Cornier M-A, Diabetologia, 2006

Tabella 2 **Miglioramento della sensibilità insulinica in seguito a riduzione dei livelli di espressione della subunità regolatoria di PI 3-chinasi**

Subunità	Modello sperimentale	Referenza
p85 α	Cellule da topi <i>knock-out</i>	Ueki K, Mol Cell Biol, 2002
p85 α	Topi <i>knock-out</i>	Terauchi Y, Nat Genet, 1999
p85 α	Topi <i>knock-out</i>	Mauvais-Jarvis F, J Clin Invest, 2002
p85 β	Topi <i>knock-out</i>	Ueki K, PNAS, 2002
p85 β	Adipociti bruni	Ueki K, J Biol Chem, 20
p85 α	Muscolo scheletrico di donne <i>post-partum</i>	Kirwan J, JCEM, 2004

Figura 11 **Segnale B, responsabile dell'attivazione della glicogeno-sintetasi e della sintesi di glicogeno nelle cellule muscolari e adipose**

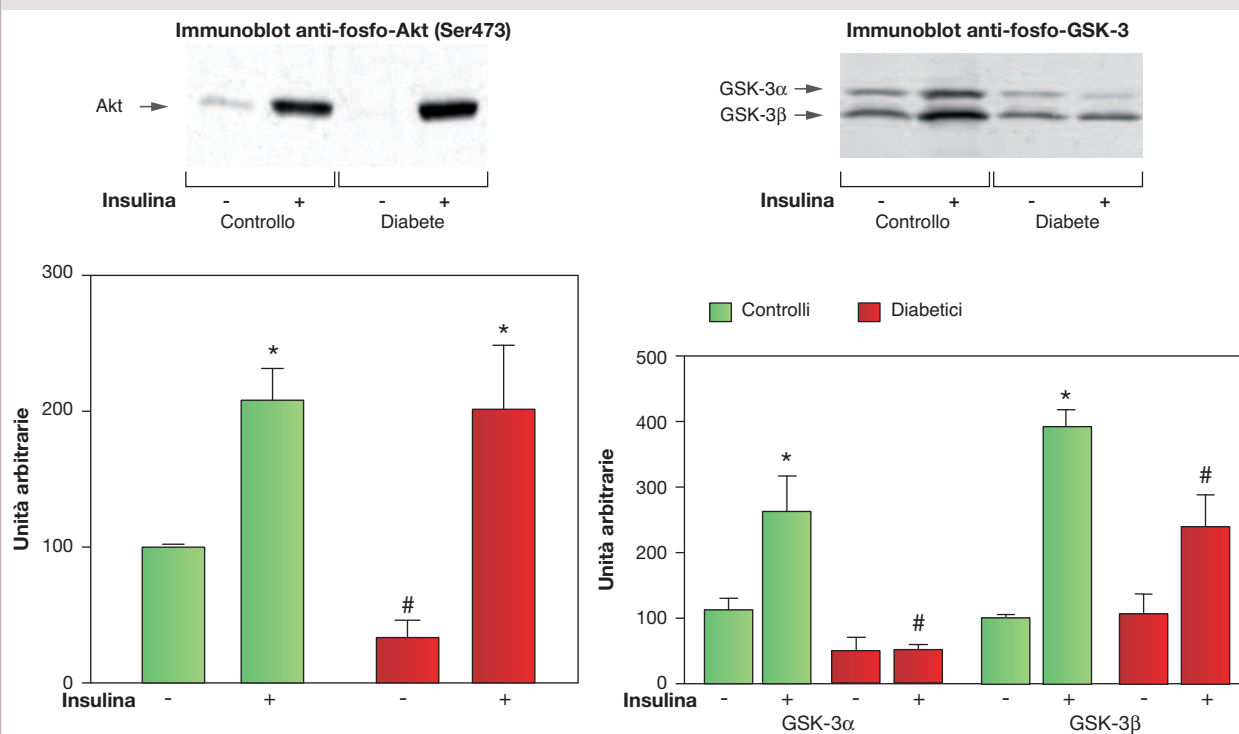


Il segnale si trasmette attraverso l'attivazione sequenziale del recettore insulinico e delle proteine IRS-1, PI 3-chinasi e Akt. Quindi Akt fosforila e inattiva GSK-3, responsabile a sua volta della fosforilazione e inattivazione della glicogeno-sintetasi

Come ricordato in precedenza, il segnale C regola la biosintesi dei trasportatori del glucosio (Figura 13). L'insulina attiva questo segnale intracellulare attraverso una via diversa che in alcuni tipi di cellule coinvolge

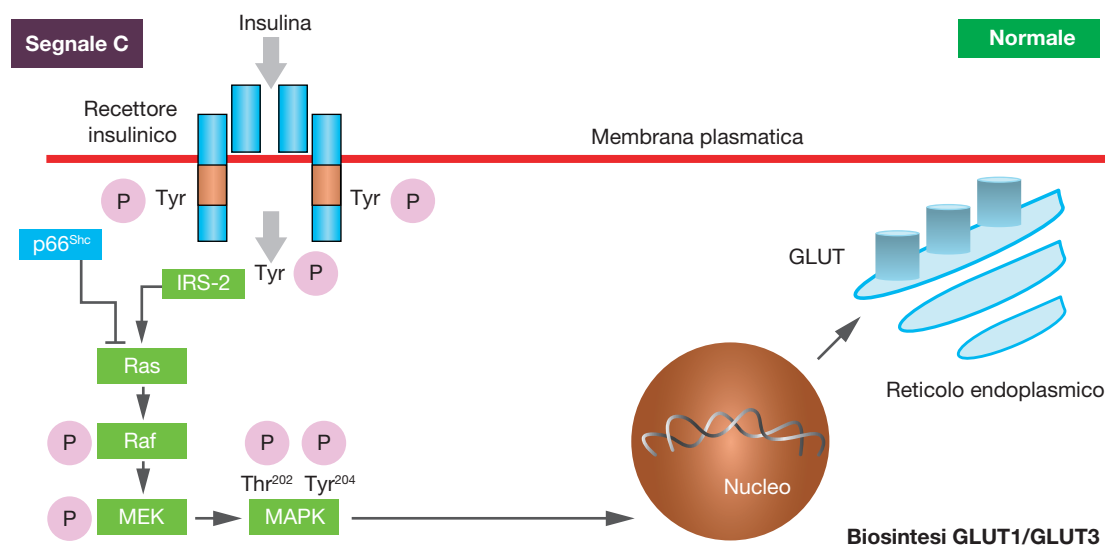
il substrato recettoriale IRS-2 (piuttosto che IRS-1) e la MAP chinasi. Nelle cellule muscolari scheletriche, la fosforilazione di MAP chinasi in seguito allo stimolo insulinico è seguita dalla migrazione di questa pro-

Figura 12 Fosforilazione e attività della chinasi Akt nel miocardio di ratti resi diabetici mediante streptozotocina



Gli animali sono stati studiati in condizioni basali o 30 minuti dopo la somministrazione di 20 UI di insulina per via intraperitoneale. Sono stati valutati i livelli di fosforilazione delle chinasi Akt e GSK-3 (isoforme α e β) attraverso l'impiego di anticorpi fosfo-specifici. *p<0,05 vs. no insulina; #p<0,05 vs. controlli. Mod. da (10)

Figura 13 Segnale C, implicato nella regolazione della biosintesi dei trasportatori del glucosio GLUT1 e GLUT3



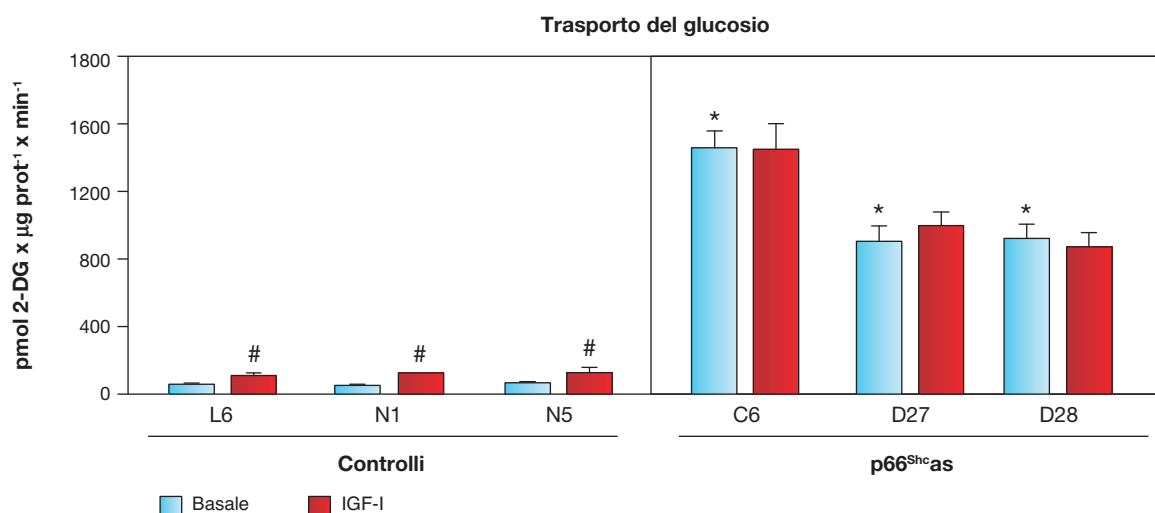
Il segnale si trasmette attraverso l'attivazione sequenziale del recettore insulinico e delle proteine IRS-2, Ras, Raf, MEK e MAP chinasi. Quest'ultima trasloca nel nucleo della cellula e stimola la trascrizione dei geni dei trasportatori incrementando i livelli di mRNA e di proteina del GLUT1 e del GLUT3

teina nel nucleo (11), finalizzata all'attivazione della trascrizione dei geni del GLUT1 e del GLUT3 con aumento dei livelli di questi trasportatori del glucosio nella cellula. Questa via, però, è regolata in maniera negativa da una proteina denominata $p66^{Shc}$. Quest'ultima fisiologicamente, in maniera continua, esercita un freno inibitorio sull'attivazione di MAP chinasi. Infatti, la riduzione dei livelli di $p66^{Shc}$ nelle cellule muscolari scheletriche, mediante l'impiego di una tecnica di biologia molecolare che utilizza un oligonucleotide antisense, comporta la iperattivazione basale e la traslocazione nucleare, in assenza di stimolo ormonale, di MAP chinasi (11). In queste cellule si osserva una notevole alterazione strutturale con dissoluzione del citoscheletro di actina (11) e si produce anche un notevole aumento dei livelli di espressione di GLUT1 e GLUT3, i principali trasportatori del glucosio presenti nelle cellule muscolari scheletriche L6 (12). Il metabolismo del glucosio risulta notevolmente alterato in seguito a queste modifiche cellulari (Figura 14). Infatti, nelle cellule di controllo lo stimolo con IGF-I incrementa il trasporto del glucosio di circa 2 volte rispetto al basale. Al contrario, nelle cellule con iperattivazione di MAP chinasi e dissoluzione del citoscheletro di actina il trasporto del glucosio è già aumentato di circa 10 volte in condizioni basali e non respon-

de più allo stimolo ormonale. Quindi, nelle cellule in cui manca la $p66^{Shc}$ la eccessiva biosintesi di trasportatori del glucosio e il sovvertimento dell'architettura cellulare si traducono in un danno metabolico perché si produce resistenza all'insulina. È la conseguenza dell'attivazione non fisiologica del segnale C, che viene acceso in maniera continua in assenza di stimolo ormonale. A tale proposito, è importante ricordare come anche nei tessuti di soggetti con DMT2 è stata documentata un'aumentata attivazione del segnale di MAP chinasi rispetto ad altri segnali attivati dall'ormone, come ad esempio la via biochimica della PI 3-chinasi.

Infine, va ricordato che il segnale intracellulare dell'insulina deve riversarsi su una proteina effettrice in grado di realizzare l'effetto biologico finale. Per l'utilizzazione del glucosio insulino-stimolato è fondamentale quindi la regolazione del trasportatore del glucosio GLUT4. Indipendentemente dalle alterazioni del segnale, variazioni nei livelli della proteina effettrice possono condizionare l'entità della risposta biologica. Negli ultimi anni sono state identificate alcune proteine in grado di interagire direttamente con il GLUT4 e di regolare questo trasportatore del glucosio (Tabella 3). Ubc9 è una proteina che interagisce direttamente con la porzione COOH-terminale del GLUT4 e

Figura 14 **Trasporto del glucosio in cellule muscolari scheletriche L6 di controllo e con riduzione dei livelli di $p66^{Shc}$ ($p66^{Shc}as$)**



La riduzione dei livelli di $p66^{Shc}$ è stata ottenuta attraverso l'impiego di uno specifico antisense. Cloni indipendenti di cellule di controllo (L6, N1, N5) o con riduzione dei livelli di $p66^{Shc}$ (C6, D27, D28) sono stati esaminati in condizioni basali o dopo stimolo con IGF-I 100 nM per 30 min. # $p < 0,05$ vs. basale; * $p < 0,05$ vs. controlli. Mod. da (12)

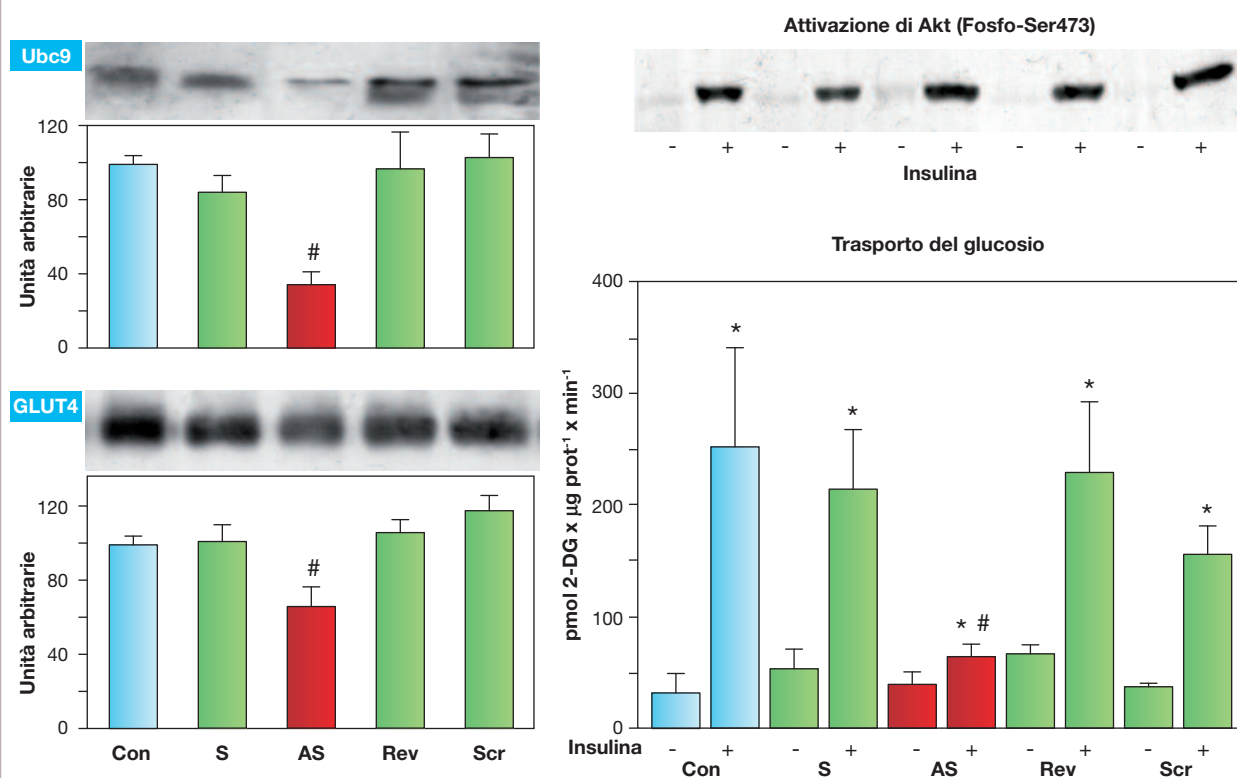
Tabella 3 Proteine che interagiscono fisicamente con il GLUT4

Proteina	Sito di interazione sul GLUT4	Effetto dell'interazione	Referenza
GTBP70	COOH-terminale ansa intracitoplasmatica	non conosciuta	Liu H, J Biol Chem, 1995
C109 (MHCb peptide)	COOH-terminale	↓ traslocazione GLUT4	Lee W, BBRC, 1997
Aldolasi	COOH-terminale	associazione GLUT4/F-actina	Kao AW, J Biol Chem, 1999
Ubc9	COOH-terminale	regola i livelli di GLUT4 (post-traslazionale)	Giorgino F, PNAS, 2000 Liu LB, Diabetes, 2007
Daxx	COOH-terminale	Daxx è substrato di Ubc9	Lalioi VS, J Biol Chem, 2002
TUG	ansa intracitoplasmatica	regola il traffico di GLUT4	Bogan JS, Nature, 2003 Yu C, J Biol Chem, 2007
EHD2	non conosciuto	regola il traffico di GLUT4	Park SY, Biochemistry, 2004 Guilherme A, J Biol Chem, 2004

attraverso questa interazione regola i livelli di GLUT4 con un meccanismo post-traslazionale: non viene aumentata l'espressione del gene ma viene rallentata la degradazione fisiologica del trasportatore e quindi nella cellula aumentano i livelli di GLUT4. I risultati ottenuti nelle cellule muscolari scheletriche (13) sono stati confermati in un altro tipo cellulare responsivo all'insulina, la cellula adiposa (14–16). Negli adipociti Ubc9 modifica la propria localizzazione intracellulare in relazione al grado di differenziamento adipocitario: è una proteina nucleare nei preadipociti, e probabilmente in questa fase svolge un ruolo strettamente legato alla regolazione dell'espressione genica, come il controllo della proliferazione cellulare mentre, in seguito all'avvio del differenziamento adipocitario, va a localizzarsi nel citoplasma, in compartimenti in cui è presente anche il GLUT4 (14, 15). La riduzione dei livelli di Ubc9 negli adipociti, ottenuta con la tecnica dell'antisense, comporta una riduzione del contenuto cellulare di GLUT4 e la inibizione dell'effetto stimolatorio dell'insulina sul trasporto del glucosio (16) (Figura 15). In queste stesse condizioni sperimentali l'attivazione del segnale insulinico è preservata, a dimostrazione che le variazioni dei livelli della proteina effettrice della risposta biologica (vedi il GLUT4 regolato da Ubc9) sono molto importanti nel condizionare l'azione insulinica. Ubc9 favorisce l'accumulo di GLUT4 nel compartimento intracellulare altamente

sensibile all'insulina (14, 15) così che, quando viene applicato lo stimolo insulinico, il segnale A si riversa su un trasportatore presente in quantità appropriata e nella sede cellulare idonea a garantire la pienezza dell'effetto biologico.

La trasmissione del messaggio biologico dell'insulina a livello cellulare è quindi complessa e presenta molteplici meccanismi di regolazione che, se da un lato permettono un adattamento del sistema a varie situazioni fisiologiche e para-fisiologiche, dall'altro possono produrre alterazioni in grado di compromettere l'azione dell'ormone generando così insulino-resistenza (Tabella 4). Il segnale insulinico può essere alterato per variazioni di intensità (vedi l'effetto di regolazione legato ai livelli insulinemici) o di cinetica (vedi la diversità di cinetica nel tessuto adiposo viscerale rispetto a quello sottocutaneo), per fattori che ne compromettono la trasmissione a proteine situate a valle nella cascata biochimica (vedi il dialogo PI 3-chinasi/Akt e Akt/GSK-3), per la attivazione eccessiva di una via biochimica (via di MAP chinasi) rispetto alle altre e per variazioni dei livelli della proteina effettrice (GLUT4) a seguito dell'azione di proteine regolatrici (Ubc9). Come medici e come ricercatori ci confrontiamo quotidianamente con il messaggio biologico dell'insulina, con la sua complessità e con le ragioni per cui questo messaggio non viene efficacemente trasmesso nei pazienti affetti da DMT2. Ancora altri studi e

Figura 15 Effetti del *knock-down* di Ubc9 sul trasporto di glucosio in adipociti 3T3-L1

Le cellule sono state trattate con una sequenza antisense specifica per Ubc9 (AS) per ridurre i livelli cellulari di questa proteina. Le cellule sono state anche trattate con sequenze di controllo (S, Rev, Scr). Sono stati valutati i livelli cellulari totali di Ubc9 e GLUT4. La fosforilazione in serina 473 di Akt e il trasporto del glucosio sono esaminati in condizioni basali e dopo stimolo con insulina 100 nM per 30 min. * $p < 0,05$ vs. basale; # $p < 0,05$ vs. controlli. Mod. da (16)

Tabella 4 Caratteristiche del segnale insulinico e meccanismi di possibile alterazione del segnale

Caratteristica	Meccanismo di alterazione
Intensità	Intensità ridotta o eccessiva
Cinetica di attivazione	Differente cinetica di attivazione
Efficienza di trasmissione	Interruzione della trasmissione a proteine a valle nella cascata biochimica intracellulare
Integrazione di vie biochimiche indipendenti	Squilibrio nell'attivazione di vie biochimiche indipendenti
Livelli cellulari della proteina effettrice (GLUT4)	Ridotto contenuto e/o anomala localizzazione della proteina effettrice (GLUT4)

nuove ricerche saranno necessari per comprendere appieno i meccanismi alla base dell'insulino-resistenza e soprattutto per identificare nuove strategie terapeutiche in grado di correggere il difetto di azione insulinica nelle persone affette da diabete.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare i Professori Riccardo Giorgino, Riccardo Vigneri e Robert J. Smith, che hanno contribuito in maniera determinante alla mia formazione scientifica e professionale; i miei collaboratori Luigi Laviola, Sebastio Perrini e Annalisa

Natalicchio, che hanno condiviso con me gli anni di lavoro che hanno portato ai risultati presentati in questa lettura; Angelo Cignarelli, Anna Leonardini, Mariangela Melchiorre, Francesca De Stefano, Alessandro Pescechiera, Romina Ficarella, Marcos C. Carreira, Sabina Martemucci, Cristina Caccioppoli, Maria Paola Barbaro, Antonella Conserva e Fabrizio Losurdo per il contributo dato al lavoro sperimentale; i colleghi Giovanni De Pergola, Gabriella Garruti, Anna Ciampolillo, Aurelia Bellomo Damato, Francesco Brescia, Francesco Logoluso, e Giovanna Stefanelli; i colleghi e collaboratori di altre Università e Centri di ricerca Michele De Fazio, Vincenzo Memeo, Francesco P. Schena, Maria Svelto e Giovanna Valenti (Università di Bari), Mauro Cignarelli (Università di Foggia), Raffaele Napoli (Università di Napoli "Federico II"), Alberto M. Davalli (H San Raffaele, Milano), Antonino Belfiore e Vincenzo Trischitta (Università di Catania), Laurie J. Goodyear, Michael F. Hirshman, Theodore K. Alexandrides, Abdoulraouf Almahfouz, Jeng-Horn Chen, Edward S. Horton e Gordon C. Weir (Joslin Diabetes Center - Harvard Medical School di Boston, MA, USA), Robert J. Smith (Brown University, Providence, RI, USA), Ping H. Wang (University of California, Irvine, CA, USA), Juleen R. Zierath (Karolinska Institutet, Stoccolma, Svezia) e Oluf Pedersen (Steno Diabetes Center, Gentofte, Danimarca). Ringrazio gli enti che hanno fornito un supporto finanziario fondamentale per lo svolgimento delle ricerche: la Comunità Europea, il Consiglio Nazionale delle Ricerche, la European Association for the Study of Diabetes, la Juvenile Diabetes Research Foundation International, il Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, il Ministero della Salute, la Società Italiana di Diabetologia, l'Università degli Studi di Bari, la Eli Lilly and Co., la Novo Nordisk, la Pfizer e la Takeda. Un grazie particolare, infine, ai miei genitori, a mia moglie Ada e ai miei figli Riccardo e Michele.

Bibliografia

1. R. Scandurra, L. Politi. In: I recettori per gli ormoni. A cura di A. Beretta Anguissola, R. Lauro, R. De Pirro, 1981.
2. Giorgino F, Chen J-H, Smith RJ. Changes in tyrosine phosphorylation of insulin receptors and a Mr 170,000 non-receptor protein in the skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats: Effects of insulin and glucose. *Endocrinology* 130: 1433-1444, 1992.
3. Giorgino F, Logoluso F, Davalli AM, et al. Islet transplantation restores normal levels of insulin receptor and substrate tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle and myocardium of streptozotocin diabetic rats. *Diabetes* 48: 801-812, 1999.
4. Laviola L, Perrini S, Cignarelli A, et al. Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* 55: 952-961, 2006.
5. Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, et al. Fat depot-related differences in gene expression, adiponectin secretion, and insulin action and signalling in human adipocytes differentiated in vitro from precursor stromal cells. *Diabetologia* 51: 155-164, 2008.
6. Tchkonja T, Lenburg M, Thomou T, et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: E298-307, 2007.
7. Giorgino F, Almahfouz A, Goodyear LJ, Smith RJ. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest* 91: 2020-2030, 1993.
8. Giorgino F, Pedrini MT, Matera L, Smith RJ. Specific increase in p85 α expression in response to dexamethasone is associated with inhibition of Insulin-like Growth Factor-I stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in cultured muscle cells. *J Biol Chem* 272: 7455-7463, 1997.
9. Wang PH, Almahfouz A, Giorgino F, et al. In vivo insulin signaling in the myocardium of streptozotocin-diabetic rats: Opposite effects of diabetes on insulin stimulation of glycogen synthase and c-Fos. *Endocrinology* 140: 1141-1150, 1999.
10. Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, et al. Effects of streptozotocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in diabetic heart. *Diabetes* 50: 2709-2720, 2001.
11. Natalicchio A, Laviola L, De Tullio C, et al. Role of the p66Shc isoform in IGF-I receptor signaling through MEK/ERK and regulation of actin cytoskeleton in rat myoblasts. *J Biol Chem* 279: 43900-43909, 2004.
12. Natalicchio A, De Stefano F, Perrini S, et al. Involvement of the p66^{Shc} protein in glucose transport regulation in skeletal muscle myoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, in corso di stampa.
13. Giorgino F, de Robertis O, Laviola L, et al. The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1125-1130, 2000.
14. Liu LB, Omata W, Kojima I, Shibata H. The SUMO conjugating enzyme Ubc9 is a regulator of GLUT4 turnover and targeting to the insulin-responsive storage compartment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 56: 1977-1985, 2007.
15. Melchiorre M, Miccoli S, Renna LA, et al. The SUMO-conjugating enzyme Ubc9 is essential in adipocyte differentiation. *Diabetes* 56 (Suppl 1): A6, 2007.
16. Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, et al. Requirement of the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 for insulin-responsive glucose transport in adipocytes. *Diabetes* 52 (Suppl 1): A282, 2003.