



Insulinsignalering och sockerupptag i skelettmuskel med försämrad insulinkänslighet

Personer med typ 2 diabetes karaktäriseras av en reducerad känslighet för hormonet insulin och har därför ett försämrat upptag av socker i skelettmuskulerna. Vilka cellulära mekanismer ligger bakom detta, och hur påverkas insulinresponsen av läkemedelsbehandling och av fysisk träning?



HÅKAN K. R. KARLSSON

SEKTIONEN FÖR
INTEGRATIV FYSIOLOGI
INSTITUTIONEN FÖR
MOLEKYLÄR MEDICIN
OCH KIRURGI
KAROLINSKA INSTITUTET

Introduktion

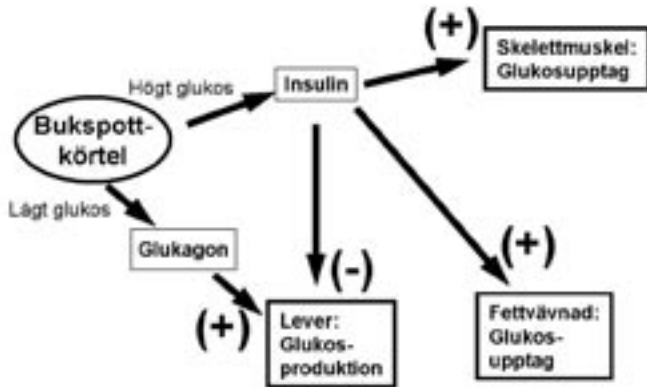
Ökningen av fetma och sjukdomar relaterade till fetma stiger dramatiskt i stora delar av världen. Detta fenomen beror till stor del på förändrade levnadssätt för människor i det moderna samhället där det finns en ökad tillgänglighet på kost som är rik på fett och socker, samtidigt som människors fysiska aktivitet blir lägre. Fetma grundläggs ofta redan hos barn, vilket visas av att andelen överviktiga barn är betydligt högre idag.

Typ 2 diabetes, eller åldersdiabetes, är en sjukdom som är starkt sammankopplad med fetma och kännetecknas av en för hög koncentration av socker i blodet. Koncentrationen av socker kontrolleras huvudsakligen av hormonerna insulin och glukagon vilka produceras av bukspottkörteln. Figur 1 visar förenklat hur sockerbalansen i blodet regleras. Efter en måltid, när socker tas upp i blodet, frisätts insulin som därmed leder till ett ökat upptag av socker i främst muskel- och fettvävnad. Insulinet signalerar även till levern att minska sockerproduktionen. Motsatt förhållande sker vid låga sockerkoncentrationer då glukagon frisätts och signalerar till levern att öka sockerproduktionen. Denna regleringsmekanism för att bibehålla en normal sockerkoncentration är försämrad hos personer med typ 2 diabetes. I de allra flesta fall har levern en nedsatt känslighet för insulin, insulinresistens, och produktionen av socker från levern kan därför inte bromsas i tillräcklig omfattning. Samtidigt har muskel- och fettvävnad också en nedsatt känslighet för insulin, vilket leder till ett försämrat upptag

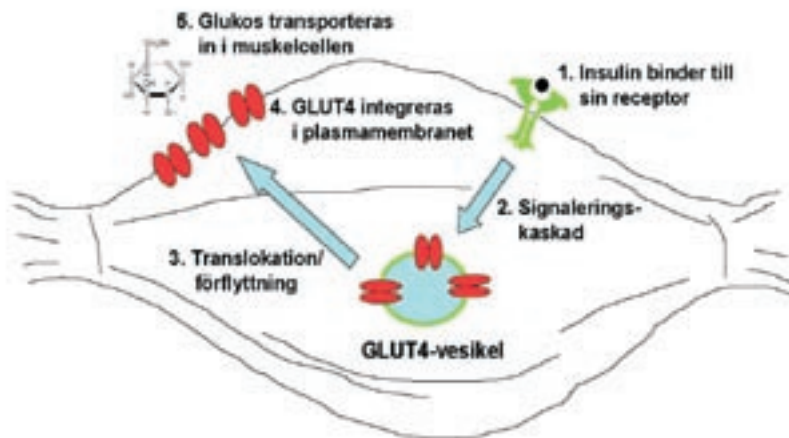
av socker i dessa vävnader. I början av sjukdomsförloppet kan bukspottkörteln kompensera kroppens insulinresistens med att frisätta mer insulin, vilket leder till höga insulinkoncentrationer i blodcirkulationen, hyperinsulinemi. Med tiden gör dessa höga insulinkoncentrationer att kroppens målorgan för insulin (främst lever, muskel och fett) blir än mer resistent mot insulinets effekter. Detta resulterar slutligen i alltför höga sockerkoncentrationer i blodet, hyperglykemi, som är själva kännetecknet för diabetes.

I våra studier i avhandlingen har vi valt att studera orsakerna till insulinresistens i skelettmuskel. Insulinets främsta effekt i skelettmuskel är att öka upptaget av socker till muskelcellerna. Förenklat sker detta genom att insulin binder till en specifik receptor på ytan av muskelcellerna och en signaleringskaskad initieras inne i muskelcellen. Speciella proteiner, GLUT4, som fungerar som sockertransportörer (glukos-transportörer), befinner sig inne i cellen i membranomslutna vesiklar. Dessa vesiklar förflyttas till cellmembranet vid cellytan och GLUT4 inkorporeras i membranet och kan därmed transportera in sockermolekyler i muskelcellerna (se Figur 2).

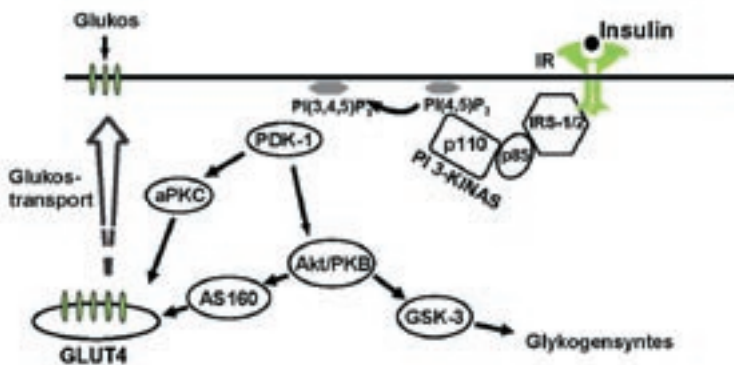
I figur 3 visas en mycket förenklad bild av de olika steg som är involverade i signaleringen som leder till förflyttning av GLUT4-vesiklarna. Insulin som binder till insulinreceptorn startar signalen. Insulinreceptorsubstraten IRS-1 och IRS-2 binder till receptorn och fosforyleras, de kan sedan forma komplex med och aktivera PI3-kinas som är ett av nyckelproteinerna i den



Figur 1. Mekanismen för balansering av blodsockernivån. Höga sockerkoncentrationer i cirkulationen triggas bukspottkörteln att frisätta hormonet insulin. Frisättning av insulin leder till ett ökat (+) sockerupptag i skelettmuskel och fettvävnad, och en minskad (-) sockerproduktion från levern. Låga sockernivåer leder till att glukagon frisätts och därmed ökar (+) sockerproduktionen från levern.



Figur 2. Principen för insulininducerat sockerupptag i skelettmuskel. Insulin binder till insulinreceptorn (1), varvid en signaleringskaskad startas inne i muskelcellen (2). Intracellulära membranomslutna vesiklar som innehåller GLUT4 förflyttas till plasmamembranet vid cellytan (3), där slutligen GLUT4 integreras i ytmembranet (4) och kan transportera socker in i muskelcellen (5).



Figur 3. Insulinsignalering i skelettmuskel. Förenklad skiss över flera av de proteiner som är involverade i den signalväg som induceras av insulin och som leder till ett ökat sockerupptag i skelettmuskel. En mer detaljerad beskrivning återges i texten.

initiala fasen av signaleringen. Signalen fortsätter sedan genom att olika kinas blir aktiverade, bland andra PDK1, aPKC och Akt. Vid träning och muskelkontraktion aktiveras en annan signalväg som bland annat involverar kinaset AMPK. Denna signalväg resulterar också i att antalet GLUT4 ökar i membranet vid cellytan, och därmed ökar sockerupptaget i muskeln. Det är dock mera okänt hur denna signalväg fungerar i detalj.

Metoder

Vi har främst studerat de initiala stegen i insulinsignaleringsskaskaden. Muskelbiopsier från patienter med typ 2 diabetes och friska kontrollpersoner har homogeniserats för att analysera grad av fosforylering och aktivitet hos olika proteiner involverade i signaleringskedjan. Standardmetoder som Western blotting och kinasaktivitetsmätning har använts vid analyserna. För att studera insulinets effekter i muskel har försökspersonerna genomgått en euglykemisk-hyperinsulinemisk clamp (DeFronzo *et al*, 1979), vilket är en standardiserad metod där insulin och sockerlösning infunderas för att mäta insulinkänsligheten i kroppen genom att se hur mycket socker kroppen tar upp vid en viss insulinkoncentration. Muskelbiopsier tas i lårmuskeln, *vastus lateralis*, före och efter insulininfusionen för att få ett basalt och ett insulinstimulerat muskelprov.

AS160 – en länk mellan insulinsignalering och förflyttning av GLUT4

Forskningen om dels de olika stegen i insulinsignaleringsskaskaden och dels förflyttningen av GLUT4-vesiklarna har varit omfattande, och det finns nu en relativt etablerad kunskap om dessa mekanismer. Vad som däremot är ett stort frågetecken är hur själva länken mellan signaleringen och förflyttningen av GLUT4-vesiklarna fungerar. Nyligen publicerades en artikel där man identifierat ett nytt protein, AS160 (Akt Substrate 160 kDa), som fosforyleras av Akt vid insulinstimulering i fettceller (Kane *et al*, 2002). När detta protein uttrycktes i en form där flera fosforyleringsställen var muterade (genetiskt modifierade) minskade GLUT4-förflyttningen och sockerupptaget i fettcellerna (Sano *et al*, 2003). AS160 innehåller en domän som är GTPas-aktiverande för Rab-proteiner. Vissa av Rab-proteinerna är involverade i förflyttning av intracellulära vesiklar, och därmed skulle AS160 kunna vara en del av länken mellan insulinsignalering

och förflyttning av GLUT4-vesiklar.

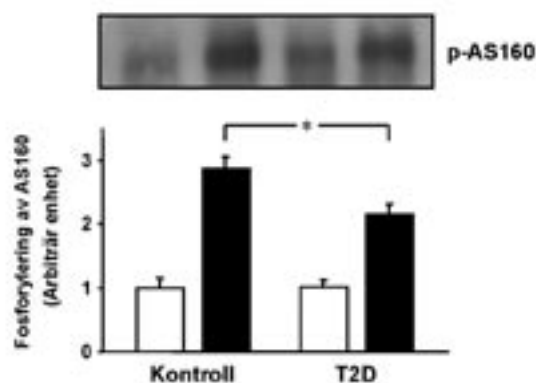
Vi undersökte graden av AS160-fosforylering i skelettmuskel hos personer med typ 2 diabetes och kontrollpersoner (Karlsson *et al*, 2005b). Vi kunde visa att den basala fosforyleringen var densamma hos diabetiker och kontrollpersoner. Däremot var den additiva fosforyleringen av AS160 vid insulinstimulering ca 40% lägre hos personerna med typ 2 diabetes jämfört med kontrollpersonerna (Figur 4).

Vi analyserade även fosforyleringen av Akt, kinaset som fosforylerar AS160. För att Akt ska aktiveras krävs fosforylering av två aminosyror i peptidsekvensen, Thr308 och Ser473. Fosforyleringsgraden av Ser473 var densamma hos patienter med typ 2 diabetes och kontrollpersoner vid både basal och insulinstimulering. Däremot var den additiva fosforyleringsgraden av Thr308 vid insulinstimulering reducerad med ca 50% hos typ 2 diabetiker jämfört med friska kontrollpersoner. Den reducerade fosforyleringen av AS160 skulle då kunna förklaras av en reducerad fosforylering/aktivitet hos dess aktiverande kinas Akt. Vidare kan den reducerade fosforyleringen av AS160 hos personer med typ 2 diabetes vara en del av förklaringen till den försämrade förflyttningen av GLUT4 och upptaget av socker vid insulinstimulering.

Det har även rapporterats att AS160 fosforyleras vid elektriskt inducerade muskelkontraktioner *in vitro* i skelettmuskel från råttor (Bruss *et al*, 2005). Detta är intressant eftersom AS160 därmed skulle kunna utgöra en knutpunkt för de olika signalvägarna inducerade av respektive insulin och muskelkontraktion. Detta är en attraktiv hypotes som skulle kunna kasta ljus över hur länken mellan signalering och GLUT4-förflyttning fungerar, men fortsatt forskning krävs för att kunna påvisa detta samband.

Behandling av typ 2 diabetes – läkemedel och träning

I ett av delarbetena i min avhandling studerade vi nyligen diagnostiserade typ 2 diabetiker, före och efter behandling med två olika läkemedelspreparat, metformin och rosiglitazone (Karlsson *et al*, 2005a). Metformin har använts under lång tid vid behandling av typ 2 diabetes och har en blodsockersänkande effekt. De kliniska effekterna av metforminbehandling är väldokumenterade, men fortfarande är de molekylära mekanismerna för dess effekt omstridda. Det är dock klarlagt



Figur 4. Basal och insulinstimulerad fosforylering av AS160 i skelettmuskel från kontrollpersoner och patienter med typ 2 diabetes. Bilden visar en representativ immunoblot. Vita staplar = basal, svarta staplar = insulinstimulering. Figuren visar medelvärden \pm SE för basal ($n=6$ kontroll, och $n=9$ typ 2 diabetes) och insulinstimulering ($n=8$ kontroll, och $n=9$ typ 2 diabetes). * $P<0.05$ (data från (Karlsson *et al*, 2005b)).

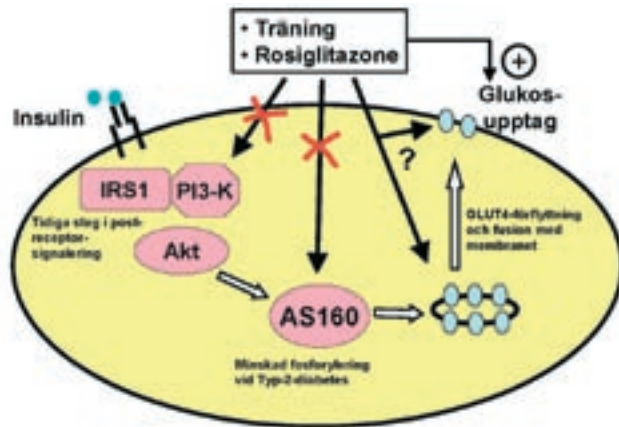
att metformin utgör sin största effekt genom att öka insulinkänsligheten i levern. Rosiglitazone tillhör en ny typ av läkemedel, thiazolidindioner, som fungerar som agonister för peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ). PPAR γ är en transkriptionsfaktor som är involverad i uttrycket av ett flertal proteiner som deltar i cellens metabolism. PPAR γ är rikligt uttryckt i fettceller men finns även uttryckt i mindre utsträckning i muskelceller.

Patienterna som deltog i denna studie delades slumpvis in i tre olika grupper. En grupp behandlades med metformin, en med rosiglitazone och den tredje gruppen fick placebo. Studien var designad som "dubbelblind", vilket innebär att varken patienter eller forskningspersonal visste vilken grupp som fick respektive behandling. Före och efter 26 veckors behandling genomgick samtliga patienter en euglykemisk-hyperinsulinemisk clamp. Patienterna fick vid clamp-tillfällena också genomföra en lågintensiv träningsövning av typ "benspark" med sitt ena ben, medan det andra benet förblev i vila. Lårmuskelbiopsier togs före respektive clamp-tillfälle och från vardera benet vid insulinstimulering, vid vila och efter lågintensiv en-bens-träning. Genom att använda PET-scan-teknik i denna studie kunde det direkta sockerupptaget i lårmuskulaturen mätas.

Gruppen som behandlades med rosiglitazone hade ett förbättrat, 32% högre, sockerupptag i det vilande benet vid insulinstimulering jämfört med före behandlingen. I benet som dessutom utfört träningsrutinen var det insulinstimulerade upptaget av socker

70% högre jämfört med före behandlingen. Varken gruppen som behandlats med metformin eller placebogruppen hade någon signifikant förändring av sockerupptaget efter behandlingen. Vår hypotes var att den förbättrade insulinkänsligheten var beroende av en förbättrad insulinsignalering. Vi genomförde en rad analyser av de signaleringssteg som utgör insulinsignaleringsskaskaden. Analyser av tyrosin-fosforylering av IRS-1, aktiviteten av IRS-1-associerat PI 3-kinas, Ser473-fosforylering av Akt och fosforylering av AS160 utfördes. I motsats till vår hypotes var inget av dessa signaleringssteg förändrade i någon av grupperna efter behandling, varken vid vila eller vid lågintensiv träning.

Orsakerna till den markanta ökningen av sockerupptag som observerades efter behandling med rosiglitazone kan vara flera. En alternativ förklaring kan vara en effekt på fettvävnaden, eftersom koncentrationen av fria fettsyror i blodet var reducerad med ca 50% under insulinstimulering efter behandling med rosiglitazone. I kontrast till denna förklaring kan nämnas att i gruppen som behandlats med metformin var koncentrationen av fria fettsyror reducerad med ca 30%, utan någon förändring av sockerupptaget. En annan potentiell förklaring kan vara att det sker förändringar av de mekanismer som styr förflyttningen av GLUT4 till cellmembranet vid cellytan, alternativt fusionen av GLUT4-vesiklarna med cellmembranet. Vi genomförde analyser av det totala proteinuttrycket av GLUT4, vilket var oförändrat i samtliga grupper efter behandlingsperioden. Fortsatta studier



Figur 5. Behandling med rosiglitazone eller träning ökar glukosupptaget i skelettmuskel oberoende av förbättrad insulinsignalering. En möjlig hypotes är att komponenter involverade i GLUT4-förflyttning och/eller fusion med membranet vid cellytan påverkas och leder till förbättrat sockerupptag.

av processen för GLUT4-förflyttning behöver genomföras innan direkta slutsatser kan dras utifrån denna förklaringsmodell.

I en liknande studie som vi har genomfört tidigare i vår forskargrupp undersökte vi sockerupptag och insulinsignalering före och efter fem månaders träning hos patienter med kroniskt hjärtfel (Kempainen *et al*, 2003). Denna patientgrupp är inte diabetiker men visar sig ha en försämrad känslighet för insulin. Vid undersökning med euglykemisk-hyperinsulinemisk clamp hade denna patientgrupp 20% lägre upptag av socker jämfört med en kontrollgrupp bestående av välmatchade friska personer. Patienterna med kroniskt hjärtfel delades in i två grupper där den ena gruppen genomgick fem månaders standardbehandling, medan den andra gruppen fick genomföra ett fem månaders träningsprogram. Träningen bestod av både styrke- och uthållighetsträning, och skedde under handledning tre gånger/vecka plus två pass/vecka som de deltagande skötte på egen hand i hemmet med hjälp av ergometercykel eller löpband. Träningsintensiteten vid uthållighetsträningen ökades successivt till 70% av deras respektive VO_{2max} . Styrketräningen bestod av standardiserade övningar för hela kroppen. Efter träningsperioden upprepades samma analyser som genomförts före och gruppen som genomfört träningsprogrammet hade i genomsnitt förbättrat sitt VO_{2max} med 20%. Vid clamp-tillfället hade gruppen som genomfört träningsprogrammet förbättrat sitt upptag av socker under insulinstimulering med ca 25%. Sockerupptaget hos

de personer i gruppen som genomgått standardbehandling var oförändrat efter fem månader. Lårmuskelbiopsier som tagits hos samtliga deltagande i de båda grupperna analyserades i syfte att studera insulinsignaleringen. Vi analyserade tyrosin-fosforylering av IRS-1, aktiviteten av IRS-1-associerat PI 3-kinas samt Ser473-fosforylering av Akt. Vi kunde konstatera att det inte förekommit några förändringar i dessa steg i insulinsignaleringsskaskaden i någon utav de två grupperna jämfört före och efter fem-månadersperioden. I likhet med behandlingsstudien tidigare beskriven, kunde vi alltså observera ett förbättrat sockerupptag i avsaknad av förbättrad insulinsignalering i skelettmuskel (Figur 5).

Avslutande kommentar

En av huvudupptäckterna i mitt avhandlingsarbete är att vi för första gången kunde detektera en försämrad fosforylering av AS160 i skelettmuskel hos patienter med typ 2 diabetes. AS160 är ett nyligen identifierat protein, som är väldigt intressant för sin potentiella egenskap som länk mellan insulinsignaleringsskedjan och förflyttningen av GLUT4 till cellens ytmembran. Mycket arbete återstår för att avgöra den egentliga mekanismen för AS160's involvering i GLUT4-förflyttningen, bland annat att identifiera de Rab-proteiner som fungerar som substrat till GTPas-aktiviteten hos AS160. I våra studier där effekterna av behandling med läkemedel eller träning undersöktes, uppkom det kanske mer frågor än vad som besvarades. Även här återstår ytterligare studier för att hitta förklaringen till de mekanis-

mer som leder till ett ökat upptag av socker i skelettmuskel. Det är av stort intresse att i fortsatta studier undersöka de mekanismer som möjliggör förflyttningen av GLUT4-vesiklarna i muskelcellerna och om det förekommer förbättringar i dessa steg vid olika typer av behandling. Detta är viktigt för att öka kunskapen och därigenom kunna ta fram läkemedel som kan användas för effektiv behandling av patienter med insulinresistens.

Slutligen vill jag tacka Centrum för Idrottsforskning för finansiellt stöd under mitt avhandlingsarbete.

Referenser

- Bruss, M. D., Arias, E. B., Lienhard, G. E. and Cartee, G. D. Increased phosphorylation of Akt Substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. 2005; *Diabetes* 54(1):41-50
- DeFronzo, R. A., Tobin, J. D. and Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. 1979; *Am J Physiol Endocrinol Metab* 237(3): E214-223
- Kane, S., Sano, H., Liu, S. C. H., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. C. and Lienhard, G. E. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-Activating Protein (GAP) domain. 2002; *J Biol Chem* 277(25):22115-22118
- Karlsson, H. K.R., Hällsten, K., Björnholm, M., Tsuchida, H., Chibalin, A. V., Virtanen, K. A., Heinonen, O. J., Lönnqvist, F., Nuutila, P. and 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. 2005a; *Diabetes* 54(5):1459-1467
- Karlsson, H. K.R., Zierath, J. R., Kane, S., Krook, A., Lienhard, G. E. and Wallberg-Henriksson, H. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of Type 2 diabetic subjects. 2005b; *Diabetes* 54(6):1692-1697
- Kempainen, J., Tsuchida, H., Stolen, K., Karlsson, H., Björnholm, M., Heinonen, O. J., Nuutila, P., Krook, A., Knutti, J. and Zierath, J. R. Insulin signalling and resistance in patients with chronic heart failure. 2003; *J Physiol (Lond)* 550(1):305-315
- Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C. P., Asara, J. M., Lane, W. S., Garner, C. W. and Lienhard, G. E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. 2003; *J Biol Chem* 278(17):14599-14602

Kontaktadress:

Håkan Karlsson
Integrativ Fysiologi
von Eulers väg 4, plan 4
171 77 Stockholm
E-post: hakan.karlsson@kirurgi.ki.se