

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630891>



Влияние инсулина на фосфопротеом скелетных мышц в норме и при инсулинорезистентности

Э.И. Якупова, Д.В. Попов

Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Скелетная мускулатура является главным местом инсулинозависимого поглощения глюкозы, а появление инсулинорезистентности скелетных мышц — основным фактором развития инсулинорезистентности организма. Это нарушение связывают с дефектами канонического инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы; при этом конкретные молекулярные механизмы до сих пор остаются предметом дискуссии. Панорамный масс-спектрометрический фосфопротеомный анализ представляется оптимальным подходом для исследования сложных сигнальных сетей.

В обзоре обобщены данные фосфопротеомных исследований, в которых изучались изменения внутриклеточной сигнализации в скелетной мышце при стимуляции инсулином в норме и при инсулинорезистентности. Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что стимуляция инсулином/приём пищи вызывают масштабные изменения фосфопротеома (сотни фосфосайтов). Эти изменения затрагивают не только канонические инсулиновые каскады, но и другие сигнальные пути и множество белков, выполняющих разные функции (ферменты углеводно-жирового обмена, саркомерные и митохондриальные белки, транскрипционные факторы, шапероны и др.), а также вызывают изменения транскриптома. Инсулинорезистентность нарушает фосфопротеомный ответ на инсулин, однако эти изменения слабо затрагивают канонический инсулиновый каскад, регулирующий захват глюкозы. Обсуждается предположение, что причины нарушений инсулинозависимого захвата глюкозы вызваны главным образом комбинацией множественных нарушений в различных сигнальных молекулах, которые регулируют захват глюкозы напрямую или опосредованно, но не связаны с каноническим инсулиновым каскадом.

Ключевые слова: инсулин; скелетная мышца; сахарный диабет 2-го типа; киназы; фосфорилирование.

Как цитировать:

Якупова Э.И., Попов Д.В. Влияние инсулина на фосфопротеом скелетных мышц в норме и при инсулинорезистентности // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 3. С. 359–371. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630891>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630891>

Effect of insulin on the phosphoproteome of skeletal muscles in normal conditions and with insulin resistance

Elmira I. Yakupova, Daniil V. Popov

Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

ABSTRACT

The skeletal muscles are the main site of insulin-dependent glucose uptake, and the development of insulin resistance in skeletal muscles is the main factor in the progression of insulin resistance in the whole organism. This disorder is associated with defects in the canonical insulin cascade regulating glucose uptake; however, the specific molecular mechanisms are still debatable. Global mass spectrometry-based phosphoproteomic analysis appears to be an optimal approach to studying complex signaling networks.

The review summarizes data from phosphoproteomic studies investigating changes in intracellular signaling in skeletal muscles upon insulin stimulation under normal conditions and insulin resistance. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that insulin stimulation/food intake causes large-scale changes in the phosphoproteome (hundreds of phosphosites). These changes affect not only the canonical insulin cascades but also other signaling pathways and proteins with different functions (enzymes of carbohydrate and fat metabolism, sarcomeric and mitochondrial proteins, transcription factors, chaperones, etc.) and cause transcriptomic changes. Insulin resistance impairs the phosphoproteomic response to insulin; however, these changes only slightly affect the canonical insulin cascade regulating glucose uptake. The causes of impairments in insulin-dependent glucose uptake are hypothesized to be related primarily by a combination of multiple defects in various signaling molecules that regulate glucose uptake directly or indirectly; however, they are not associated with the canonical insulin cascade.

Keywords: insulin; skeletal muscle; type 2 diabetes mellitus; kinases; phosphorylation.

To cite this article:

Yakupova EI, Popov DV. Effect of insulin on the phosphoproteome of skeletal muscles in normal conditions and with insulin resistance. *Genes & cells*. 2024;19(3):359–371. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc630891>

Received: 24.04.2024

Accepted: 07.05.2024

Published online: 13.08.2024

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 2-го типа (СД2Т) — это форма диабета, характеризующаяся развитием резистентности тканей к инсулину и увеличением уровня глюкозы крови натощак. Этим заболеванием страдают 462 млн (более 6%) человек в мире; ежегодно более 1 млн смертей связано с СД2Т, что делает его девятой по значимости причиной смертности [1]. Основным фактором риска формирования инсулинорезистентности и СД2Т является ожирение, развивающееся из-за «западной» диеты и малоподвижного образа жизни [2, 3].

Скелетная мускулатура играет ключевую роль в регуляции метаболизма (в частности, углеводно-жирового обмена) организма человека в норме и при развитии ожирения и СД2Т [4]. Так, во время гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста (концентрация инсулина в крови — 100 мМЕ/л, или ~0,6 нМ) на скелетные мышцы приходится более 80% инсулинозависимого захвата глюкозы [5]. Это связано с тем, что скелетные мышцы (наряду с печенью и жировой тканью) имеют наибольшую чувствительность к инсулину и составляют более трети массы тела. Таким образом, скелетные мышцы являются главным местом инсулинозависимого поглощения глюкозы, а появление инсулинорезистентности скелетных мышц — основным фактором развития инсулинорезистентности организма [4, 6].

Молекулярные механизмы инсулинозависимого захвата глюкозы тканями достаточно хорошо изучены и связаны с активацией канонического инсулинового сигнального каскада «инсулиновый рецептор (insulin receptor, INSR)—фосфатидилинозитол-3-киназа (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)—RAC—серин/треонин-протеинкиназа (AKT)» и последующей транслокацией на клеточную мембрану везикул, содержащих глюкозный транспортер 4 (GLUT4) [4, 6]. Развитие инсулинорезистентности в инсулин-чувствительных тканях (скелетные мышцы, печень и жировая ткань) связывают с нарушением активации этого каскада при стимуляции инсулином. Однако конкретные молекулярные механизмы нарушений инсулинозависимой активации каскада PI3K—AKT до сих пор остаются предметом дискуссии [7].

Активированный инсулиновый рецептор может регулировать множество других мишеней AKT-киназы, а также каскад митоген-активируемой протеинкиназы 3/1 (MK03/01) (киназа 1/2, регулируемая внеклеточными сигналами, ERK1/2). Поэтому эффекты, вызванные действием инсулина, оказывают комплексное влияние на внутриклеточную сигнализацию, регулируя различные клеточные процессы, а также экспрессию ряда генов (см. ниже). Нужно отметить, что плеiotропные эффекты активации инсулинового рецептора (в том числе для скелетной мышцы) исследованы явно недостаточно, что связано прежде всего со сложностью изучения комплексных изменений в сети внутриклеточной сигнализации. В связи

с этим использование широкозахватных методов анализа, в частности фосфопротеомного масс-спектрометрического анализа, представляет большой интерес. Нужно отметить, что современный фосфопротеомный анализ позволяет детектировать в пробах скелетной мышцы более 10 000 фосфосайтов, что составляет около 10% фосфопротеома [8], поэтому результаты таких исследований характеризуют только малую часть изменений последнего.

Цель обзора — обобщить данные фосфопротеомных исследований, изучавших изменения внутриклеточной сигнализации в скелетной мышце при стимуляции инсулином в норме и при инсулинорезистентности.

Проанализированы результаты исследований, в которых изучали ответ на инсулин в человеческих миотубах iMyos, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [9, 10], а также в скелетных мышцах грызунов [11–13] и человека [14–16]. Эти данные сопоставлены с результатами исследований фосфопротеомного ответа на инсулин при моделировании инсулинорезистентности: миотубы iMyos, полученные из клеток пациентов с инсулинорезистентностью и СД2Т [9, 10]; пробы скелетной мышцы грызунов на углеводно-жировой диете [12, 13] и пациентов с инсулинорезистентностью [16].

КАНОНИЧЕСКИЕ ИНСУЛИНОЗАВИСИМЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ

Канонические сигнальные каскады, индуцируемые инсулином (ERK1/2 и PI3K—AKT), изучаются уже несколько десятилетий и подробно описаны в ряде обзоров [17–19]. Связывание инсулина с INSR вызывает его автофосфорилирование (включая такие сайты каталитического домена INSR человека, как Tyr1185/1189/1190) и фосфорилирование его адаптерных белков: адаптерный белок SHC1/2 и субстрат инсулинового рецептора (insulin receptor substrate, IRS) — IRS1—IRS4, адаптерные белки GAB1 и CBL и др. [20]. Фосфорилирование SHC-изоформ p46/p52 (включая Tyr317/272) через связывание с адаптерным белком GRB2 ведёт к образованию комплекса с RAS (small GTPases derived from Rat sarcoma virus) [21]. Это в свою очередь активирует каскад «серин/треониновая-протеинкиназа A-Raf (ARAF)—киназа митоген-активируемой протеинкиназы (MP2K1/2)—MK03/01 (ERK1/2) (рис. 1). В ядре активированная ERK1/2 фосфорилирует (и активирует) ряд белков, включая серин/треониновую-протеинкиназу 1, взаимодействующую с митоген-активируемой протеинкиназой (MKNK1); киназу альфа-1 рибосомного белка S6 (KS6A1 или P90S6K); транскрипционные факторы раннего ответа (CREB1, FOS, MYC и др.), тем самым регулируя кэп-зависимую трансляцию, экспрессию

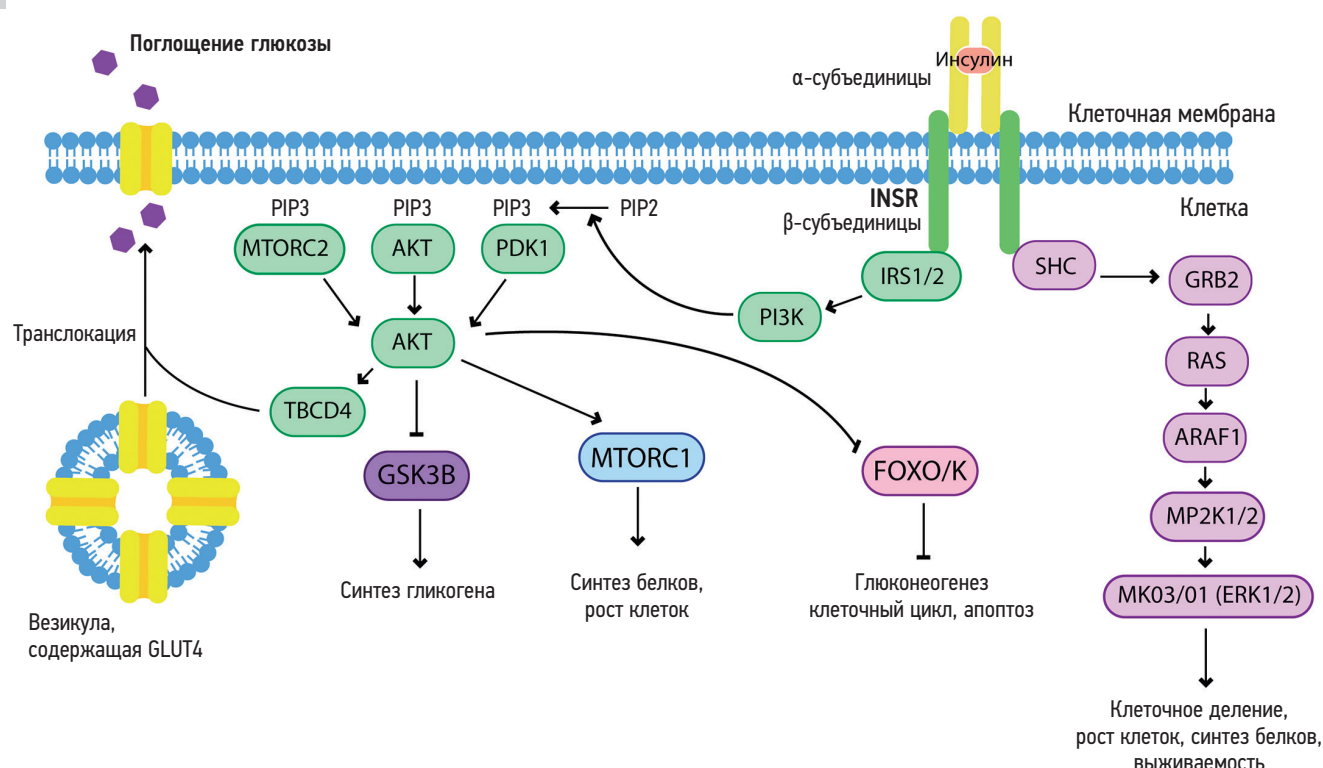


Рис. 1. Канонические инсулинозависимые сигнальные пути. Инсулиновый рецептор (INSR) активирует канонические инсулиновые каскады PI3K–АКТ и ERK1/2, регулирующие GLUT4-опосредованный захват глюкозы и митогенные эффекты соответственно. Помимо этого, АКТ регулирует множество нижележащих мишеней, включая комплекс MTORC1, киназу GSK3B (инактивирует) и транскрипционные факторы семейства FOXO/K, тем самым регулируя различные биологические процессы (метаболизм гликогена, синтез белка, клеточный цикл, апоптоз и т.д.). Объяснения см. в тексте.

Fig. 1. Canonical insulin-dependent signaling pathways. The insulin receptor (INSR) activates the canonical insulin cascades PI3K–AKT and ERK1/2, regulating GLUT4-mediated glucose uptake and mitogenic effects, respectively. In addition, AKT regulates many downstream targets, including the MTORC1 complex, GSK3B kinase (inactivated) and transcription factors of the FOXO/K family, thereby regulating various biological processes (glycogen metabolism, protein synthesis, cell cycle, apoptosis, etc.). See text for explanation.

генов раннего ответа, а также дифференцировку, выживаемость и клеточный рост [17, 22, 23].

В мышечных клетках IRS1 является основным субстратом инсулинового рецептора, регулирующим инсулинозависимый транспорт глюкозы [18], тогда как роль IRS2 незначительна [24]. Фосфорилированный IRS1 (включая Tyr612 и Tyr632) связывается с PI3K, которая фосфорилирует фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (PIP2), образуя сигнальный липид фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфат (PIP3). PIP3 рекрутирует PDK1 (фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу 1, phosphoinositide dependent protein kinase 1) и AKT на плазматическую мембрану, фосфорилируя AKT^{Thr308} и AKT^{Ser473} и активируя её [25]. Помимо этого, фосфорилирование AKT^{Ser473} может регулироваться комплексом mTORC2 [26]. В скелетных мышцах экспрессируются AKT1 и AKT2; при этом AKT2 играет ключевую роль в инсулинозависимом поглощении глюкозы [27, 28]. AKT фосфорилирует белок, активирующий Rab-ГТФазу (TBC1 domain family member 4, TBCD4) который индуцирует транслокацию и слияние везикул, содержащих GLUT4, с клеточной мембраной, тем самым увеличивая инсулинозависимый транспорт глюкозы в клетку [29]. Помимо этого AKT имеет ряд других

мишеней и регулирует многочисленные биологические процессы: например, фосфорилирует (и деактивирует) киназу гликогенсинтазы 3 бета (GSK3B^{Ser9}), тем самым регулируя синтез гликогена в печени и скелетных мышцах [30], а также фосфорилирует (и деактивирует) транскрипционные факторы семейств FOXO/K, тем самым контролируя экспрессию генов-регуляторов глюконеогенеза, клеточного цикла и апоптоза [31, 32] (см. рис. 1). Стоит отметить, что, согласно базе данных PhosphoSite Plus, для киназ AKT1/2 и ERK1/2 описано несколько сотен субстратов и фосфосайтов, что указывает на множественность потенциальных эффектов инсулина.

ПЛЕЙОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА НА СИГНАЛИЗАЦИЮ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Влияние инсулина на фосфопротеомный профиль клеток без нарушений инсулиновой чувствительности изучали в ряде работ. Эффекты инсулина в дозах, значительно превышающих физиологические (100 нМ в течение 10 мин), исследовали на миотубах, полученных

из дифференцированных в миобласты индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека [9, 10]. Фосфопротеомный ответ *in vivo* изучали в *m. soleus* [13] и *m. quadriceps* [11] мышей через 10 и 15 мин после введения инсулина соответственно, а также в *m. vastus lateralis* у добровольцев через 0,5 [16], 2 [14, 16] и 4 ч [15] после начала гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста (концентрация инсулина в крови составляла ~0,6 нМ). Помимо этого, изменение фосфопротеома исследовали при естественном приёме пищи в течение суток в *m. quadriceps* крыс, а именно ночью, когда животные активно питаются и концентрация инсулина в крови достигает ~0,5 нМ [12].

Вышеуказанные работы показали, что стимуляция инсулином вызывает масштабные изменения в фосфорилировании белков (несколько сотен фосфосайтов), более половины из которых увеличили уровень фосфорилирования. Для описания влияния инсулина на различные белки мы обобщили результаты этих исследований и выбрали белки, увеличившие или снизившие уровень фосфорилирования (в любых сайтах) более чем в одном

исследовании (приложение 1). Среди инсулин-индуцированных изменений во всех этих исследованиях ожидаемо было установлено изменение (преимущественно увеличение) фосфорилирования белков канонических инсулиновых каскадов: PI3K–АКТ и ERK1/2 (рис. 2), в том числе канонических сайтов активации киназ, входящих в них. В частности, выраженные изменения были обнаружены для канонического инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы: разнонаправленные изменения фосфорилирования IRS1/2, увеличение фосфорилирования AKT1/2 и TBCD4 — мишени АКТ и ключевого регулятора транслокации GLUT4-содержащих везикул (приложение 2). Помимо этого, инсулин регулировал ряд белков, модулирующих инсулинозависимый захват глюкозы. Так, были установлены разнонаправленные изменения адаптерного белка SRBS1 и увеличение фосфорилирования регулятора транслокации GLUT4-содержащих везикул CIP4 [12–14, 16]; снижение фосфорилирования было выявлено для фосфатазы PTN1, негативно регулирующей IRS1/2 [9, 10, 12]. Нужно отметить, что недостаточная глубина панорамного фосфопротеомного анализа, по-видимому,

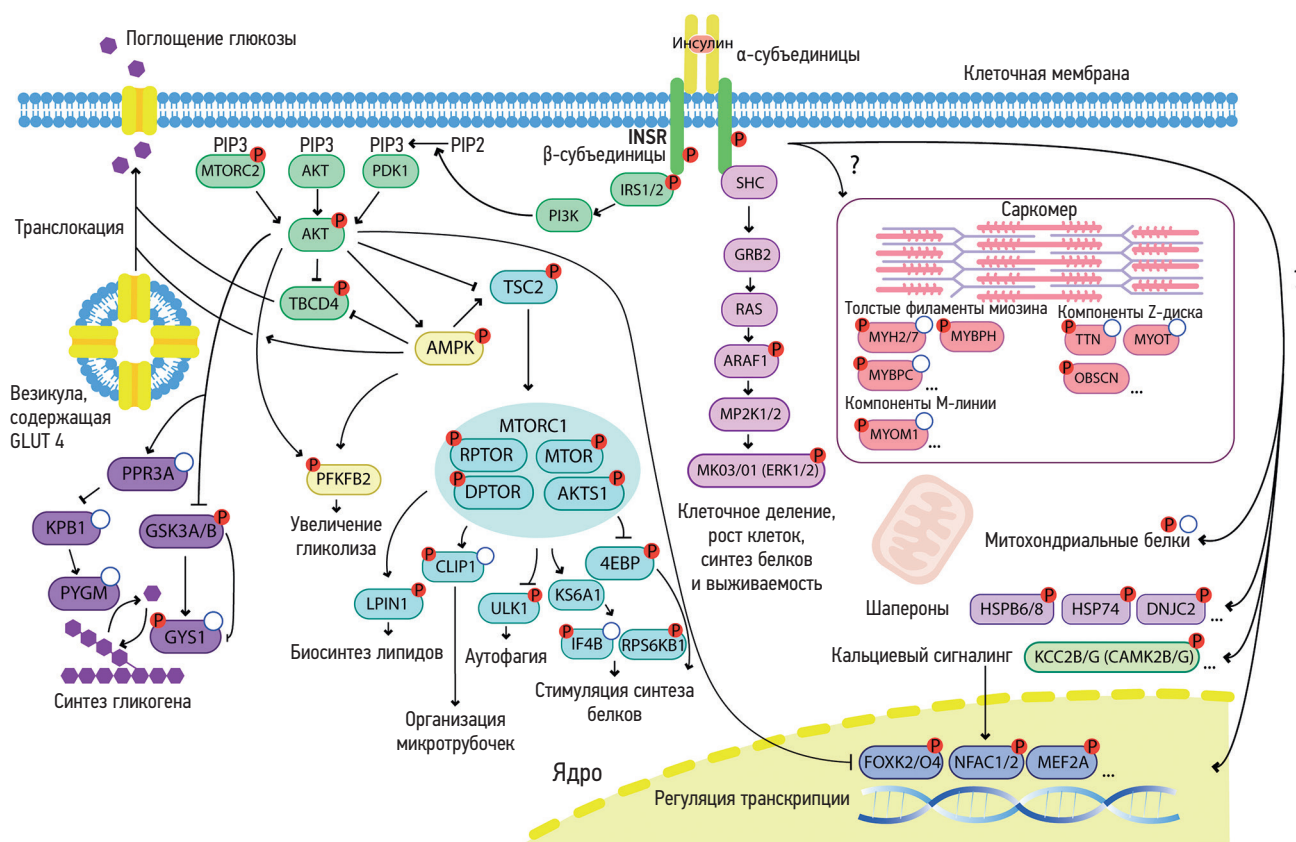


Рис. 2. Основные сигнальные каскады/функциональные группы сигнальных молекул и биологические процессы, регулируемые инсулином в скелетной мышце. Красными и белыми кружками обозначено увеличение и снижение фосфорилирования (для любых сайтов) соответственно. Список белков, изменивших фосфорилирование в ответ на инсулин (в двух и более исследованиях [9, 10, 12–14, 16]), представлен в приложении 1. Объяснения см. в тексте.

Fig. 2. The main signaling cascades/functional groups of signaling molecules and biological processes regulated by insulin in skeletal muscle. The red and white circles indicate an increase and decrease in phosphorylation (for any sites), respectively. List of proteins that have changed phosphorylation in response to insulin (in two or more studies [9, 10, 12–14, 16]) is presented in the Supplement 1. See text for explanation.

значительно ограничивает идентификацию инсулинозависимых белков/фосфосайтов. Этот факт подтверждается тем, что с помощью целевого масс-спектрометрического анализа в скелетной мышце человека через 0,5–1,0 ч после начала гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста (концентрация инсулина в крови составляет ~0,6 нМ) только для IRS1 выявлены разнонаправленные изменения более десятка фосфосайтов, функции большей части которых до сих пор неизвестны [33, 34]. Это свидетельствует о том, что изменения фосфопротеомного профиля инсулинозависимых сигнальных белков, регулирующих захват глюкозы, до сих пор изучены лишь поверхностно.

Любопытно, что в скелетной мышце человека более 90% инсулинозависимых фосфосайтов не относятся к каноническому инсулиновому каскаду, регулирующему захват глюкозы [14]. Среди них ожидаемо было обнаружено изменение (преимущественно увеличение) фосфорилирования множества других мишеней АКТ-киназы и ниже лежащих сигнальных белков (см. рис. 2 и приложение 1), прежде всего ключевого регулятора кэп-зависимой трансляции киназы MTOR, её регуляторов (TSC2, RAGC, RICTR, RPTOR, DPTOR, AKTS1 (PRAS40)) и мишеней: регуляторов трансляции (IF4B, 4EBP1/2, KS6A1 (P90S6K), RS6 и др.), аутофагии (ULK1 и др.), биосинтеза липидов (LPIN1) и организации микротрубочек (CLIP1) [9–13, 16]. Среди других мишеней АКТ ожидаемо было обнаружено увеличение фосфорилирования ключевого активатора гликолиза — киназы/фосфатазы PFKFB2 и изменение для регуляторов гликогенового метаболизма: увеличение для киназы GSK3A/B, разнонаправленные изменения для её субстрата гликогенсинтазы GYS1, а также увеличение для гликогена (GLYG). Напротив, для регуляторов катаболизма гликогена — фосфатаз PPR3A, PYGM и киназы KPB1 — отмечено снижение фосфорилирования (маркёр деактивации), что может быть вызвано активацией АКТ и/или кальциевой сигнализации (см. ниже). Помимо этого, стимуляция инсулином вызвала увеличение фосфорилирования других субстратов АКТ — транскрипционных факторов семейства FOX (FOXO4 и FOXK2), регулирующих экспрессию многих генов, в том числе ассоциированных с инсулиноподобным фактором роста 1, метаболизмом глюкозы, гликогена и аутофагией. Помимо этого, ожидаемо обнаружено увеличение фосфорилирования белков другого канонического инсулинозависимого каскада — ERK1/2, а именно: адаптерного белка SOS1, киназы ARAF и MKO3 (ERK1) и её субстратов (киназы рибосомного белка S6 (KS6A1 или P90S6K) и MKNK2), что говорит об активации этого каскада.

Интересно отметить, что стимуляция инсулином вызвала многочисленные изменения фосфорилирования белков кальциевой сигнализации и АМФ-зависимой протеинкиназы AMPK (AMP activated protein kinase) — ключевого энергетического сенсора клетки (см. приложения 1 и 2). Среди них были белки кальциевых каналов,

расположенные в клеточной мембране (субъединицы CAC1S/B1 канала L-типа претерпели разнонаправленные изменения фосфорилирования) и митохондриальной (VDAC1/2) мембране, а также кальций-связывающие белки эндоплазматической сети (CASQ2 и STIM1), изоформы кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы 2-го типа KCC2B/G (CAMK2B/G) [12, 14, 16] и одна из мишеней кальциевой сигнализации — транскрипционный фактор NFAC1/2 [12–14] (для всех зарегистрировано увеличение фосфорилирования). Данный факт согласуется с тем, что стимуляция инсулином/нарушение инсулиновой чувствительности могут модулировать кальциевый обмен и сигнализацию в скелетной мышце [35]. Инсулин также вызвал увеличение фосфорилирования неканонических сайтов альфа 1, 2 (AAPK1/2) и гамма 2 (AAKG2) субъединиц протеинкиназы AMPK, что может быть связано с активацией АКТ [13, 14, 16]. Одновременно наблюдалось увеличение фосфорилирования субстратов протеинкиназы AMPK: регулятора GLUT4-содержащих везикул TBCD4, ключевого фермента гликолиза PFKFB2, синтазы оксида азота NOS1/3 и регулятора аутофагии ULK1, что подтверждает активацию AMPK.

Помимо хорошо изученных сигнальных белков, описанных выше, инсулин оказывает влияние на множество других белков; при этом сигнальные пути/киназы, регулирующие фосфорилирование большинства из них, остаются неизученными (приложение 2). Так, были показаны разнонаправленные изменения фосфорилирования более 70 саркомерных белков, включая титин, ключевые белки актиновых и миозиновых филаментов, Z-диска, M-линии и др., а также митохондриальных белков, участвующих в энергообмене (ферменты окислительного фосфорилирования и цикла Кребса) и биогенезе митохондрий [9–14, 16]. Последнее согласуется с результатами исследования, в котором изучали митохондриальный фосфопротеом: показано двукратное увеличение детектируемых митохондриальных фосфопептидов (до 46 фосфопептидов, которые относятся к ферментам энергетического обмена и белкам, регулирующим формирование крист) в *m. vastus lateralis* человека после 4-часового клэмп-теста [15]. Авторы предположили, что эти изменения могут быть частично связаны с инсулинозависимой транслокацией АКТ в митохондрии [36, 37].

Нужно отметить, что значительная часть белков, регулируемых инсулином, относится к ядерным (более 150 белков) (см. приложение 2). Среди них присутствуют транскрипционные факторы, описанные выше (FOXK2/O4, NFAC1/2), регулятор миогенеза MEF2A, а также YAP1, T2FA и ряд цинковых пальцев (ZC3C1, ZDHC5, ZN609, ZC3HD, ZCH18 и ZRAB2) [9, 10, 12–14, 16]. Помимо этого, найдено несколько десятков белков-регуляторов хроматина, сплайсинга и процессинга РНК. В совокупности эти данные косвенно указывают на то, что инсулин оказывает комплексное модулирующее влияние на регуляцию экспрессии генов. Это хорошо согласуется с исследованиями,

в которых обнаружено изменение транскриптома в *m. vastus lateralis* здоровых людей через 1 ч после приёма смешанной пищи (более сотни мРНК) [38] и через 3–4 ч после гиперинсулинемического зугликемического клэмп-теста (несколько сотен мРНК) [39–41].

Отдельно стоит отметить влияние инсулина на фосфорилирование (преимущественно увеличение) ряда шаперонов (HSPB6/8, DNJC2, HSP74) и ассоциированных с ними белков (BAG3, F10A1, SGTA) [9, 10, 12–14, 16]. Шапероны играют важную роль в развитии инсулинорезистентности и хронического воспаления в разных тканях [42, 43]; при этом механизмы влияния инсулина на фосфорилирование/активность этих белков и регуляцию протеостаза остаются неясными. Поиск киназ, регулирующих изменение фосфопротеома (анализ обогащения фосфосайтов, регулируемых известными киназами), показал, что среди киназ, увеличивших активность в ответ на инсулин, были AKT и её мишени MTOR, GSK3, RPS6KB1 (P70S6K1); ERK и её мишени KS6A1 (P90S6K) и KS6A3 (p90RSK2); протеинкиназа C, кальций-зависимые киназы CAMK2 и MELK; а также ряд других киназ: SGK1, MP2K1 (MEK1), MK14 (p38 MAPK), IKKB [9, 12, 16]. Напротив, среди киназ, снизивших активность, была выявлена только протеинкиназа A [12], что согласуется с наблюдением о преимущественном увеличении фосфорилирования белков при стимуляции инсулином. Участие большей части предсказанных киназ (AKT, ERK, их субстраты, а также протеинкиназа C) в развитии инсулинорезистентности хорошо согласуется с данными литературы, тогда как роль других менее очевидна и является перспективным направлением для дальнейших исследований. С другой стороны, нужно отметить, что сейчас в литературе описаны субстраты только для малой части известных киназ [8], что значительно ограничивает эффективность предсказания киназ, регулирующих изменения фосфопротеома, с помощью анализа обогащения фосфосайтов.

ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ МОДУЛИРУЕТ ФОСФОПРОТЕОМНЫЙ ОТВЕТ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ НА ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА

Развитие инсулинорезистентности, как правило, связывают с нарушениями в инсулин-индуцируемой активации канонического сигнального пути PI3K–AKT, регулирующего транслокацию GLUT4. Используя классические биохимические методы, ряд исследователей показали, что в скелетной мышце человека инсулинорезистентность и СД2Т подавляют инсулин-индуцируемое фосфорилирование отдельных ключевых сайтов молекул проксимальной части (выше AKT) канонического инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы, а также снижают их активность [44–53]. С другой стороны,

в некоторых работах не удалось обнаружить нарушения фосфорилирования/активности белков этого каскада [23, 54, 55]. Более того, в *m. vastus lateralis* пациентов с СД2Т не было обнаружено выраженных нарушений фосфорилирования нескольких десятков фосфосайтов (целевая масс-спектрометрия) IRS1/2 во время гиперинсулинемического зугликемического клэмп-теста относительно здоровых людей [33, 34]. Интересно, что панорамные фосфопротеомные исследования также выявили относительно небольшие изменения в инсулин-индуцируемом фосфорилировании белков этого каскада. Так, обнаружено, что миотубы, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с инсулинорезистентностью [10] и СД2Т [9], демонстрируют выраженные нарушения инсулинозависимого захвата глюкозы относительно клеток от здоровых доноров. Однако стимуляция миотуб инсулином (в концентрации 100 нМ, на два порядка превышающей физиологическую, в течение 10 мин) не выявила изменений в сети фосфорилируемых/дефосфорилируемых сигнальных молекул, включая молекулы канонического инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы. При этом для отдельных фосфосайтов белков этого каскада установлено подавление или даже увеличение изменений фосфорилирования в ответ на инсулин: например, в клетках от пациентов с СД2Т было более выражено инсулинозависимое фосфорилирование IRS1^{Ser270} и дефосфорилирование IRS1^{Ser348}. СД2Т также повлиял на фосфорилирование субстратов AKT: подавил увеличение для TSC2^{Ser981} и FOXO3^{Ser253} (канонический сайт) и потенцировал прирост для AKT1^{Ser212}, MTOR^{Ser2475}, MTOR^{Ser2481}, 4EBP1^{Thr46} (канонический сайт) и IF4B^{Ser422} (канонический сайт) [9]. Сходные, но несколько более масштабные различия были найдены при сопоставлении инсулинового ответа миотуб, полученных от пациентов с инсулинорезистентностью и здоровых добровольцев [10]. При этом нужно отметить, что в последнем исследовании обнаружены выраженные различия в ответе на инсулин, связанные с полом доноров клеток.

Относительно небольшое влияние инсулинорезистентности на индуцируемое инсулином изменение фосфопротеома скелетной мышцы согласуется с результатами исследований на грызунах с жировой и углеводной диетой (модель инсулинорезистентности). Так, у крыс с нормальной и пониженной чувствительностью к инсулину после приёма пищи были обнаружены сопоставимые изменения в фосфорилировании белков канонического инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы, и ряда других мишеней AKT [12]. Одновременно показаны множественные различия в ответе на инсулин для белков, не относящихся к каноническим инсулиновым каскадам PI3K–AKT и ERK1/2, в частности для ферментов-регуляторов метаболизма глюкозы/гликогена и жирных кислот. Это согласуется с результатами другой работы, в которой показано, что фосфопротеомный ответ скелетных мышц мышей на инсулин в большей степени зависит от генетических

факторов (генетические различия между линиями мышей), чем от жировой и углеводной диеты, вызывающей инсулинорезистентность [13]. С другой стороны, отсутствие нарушений в фосфорилировании сигнальных белков проксимальной части инсулинового каскада, регулирующего захват глюкозы, может быть объяснено тем, что основные нарушения инсулиновой сигнализации при инсулинорезистентности и СД2Т происходят в дистальной части этого каскада (ниже АКТ), которая изучена недостаточно [7].

Наблюдения, сделанные на модельных объектах, хорошо согласуются с инсулинозависимыми изменениями фосфопротеома в *m. vastus lateralis* пациентов с инсулинорезистентностью и здоровых людей (через 30 и 120 мин после начала клэмп-теста) [16]. В этой работе показано, что у пациентов изменения фосфопротеома связаны преимущественно с подавлением ответа на инсулин, а не с активацией (78 и 35 фосфосайтов соответственно). Среди них лишь единичные фосфосайты относились к каноническому инсулиновому каскаду, регулирующему захват глюкозы, и более того, эти сайты не являлись ключевыми регуляторными сайтами белков данного каскада. Неожиданно среди фосфосайтов с подавленным ответом на инсулин у пациентов были обнаружены субстраты комплекса MTORC1. Этот факт и положительная корреляция инсулин-стимулированного потребления глюкозы тканями (преимущественно мышцами) ног с активностью MTORC1 указывают на его роль в развитии инсулинорезистентности скелетных мышц человека. Описанные наблюдения согласуются с тем, что активация MTORC1, вызванная специфическим для мышц нокаутом гена *Tsc1*, увеличивает чувствительность мышей к инсулину [56].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Молекулярные механизмы нарушений инсулинозависимого захвата глюкозы скелетными мышцами при инсулинорезистентности и сахарном диабете 2-го типа активно исследуются в течение трёх последних десятилетий. Большинство работ связывают эти нарушения с дефектами канонического инсулинового каскада PI3K–АКТ, регулирующего транслокацию содержащих глюкозный транспортер 4 везикул. Однако конкретные молекулярные механизмы нарушений этого каскада до сих пор неясны. Они, по всей вероятности, связаны с тем, что основные нарушения могут присутствовать в дистальной части этого каскада, а также с множественностью механизмов регуляции инсулинозависимого захвата глюкозы, а именно с модуляцией работы этого каскада сигнальными молекулами, которые напрямую к нему не относятся, и с наличием неканонического инсулинового каскада.

Использование панорамного масс-спектрометрического фосфопротеомного анализа представляется оптимальной стратегией для исследования сложных

сигнальных сетей. Фосфопротеомные исследования *in vitro* и *in vivo*, на грызунах и с участием человека показали, что стимуляция инсулином (так же, как приём пищи) вызывает масштабные изменения фосфопротеома (сотни фосфосайтов). Эти изменения затрагивают не только канонические инсулиновые каскады PI3K–АКТ и ERK1/2, но и другие сигнальные пути (например, кальций- и AMPK-зависимую сигнализацию) и множество белков, выполняющих разные функции (ферменты углеводно-жирового обмена, саркомерные и митохондриальные белки, транскрипционные факторы, шапероны и др.), а также вызывают изменения транскриптома. Необходимо отметить, что большая часть киназ (и сигнальных путей), регулирующих эти масштабные изменения, до сих пор остаётся неизвестной.

Инсулинорезистентность и сахарный диабет 2-го типа изменяют фосфорилирование нескольких десятков/сотен сигнальных молекул/фосфосайтов в ответ на стимуляцию инсулином. Убедительно показано, что эти нарушения слабо затрагивают канонический инсулиновый каскад, регулирующий захват глюкозы. При этом не удалось выявить общие закономерности в изменении фосфопротеомного ответа на инсулин при развитии инсулинорезистентности. По-видимому, это связано с различиями используемых моделей (*in vitro* и *in vivo*, разные организмы и модели инсулинорезистентности, разные концентрации инсулина и время после начала стимуляции и т.д.), с недостаточной глубиной фосфопротеомного анализа, а также с малочисленностью проведённых фосфопротеомных исследований. С другой стороны, высказывается предположение, что нарушение инсулинозависимого захвата глюкозы вызвано главным образом комбинацией множественных нарушений в различных сигнальных молекулах, которые напрямую или опосредованно регулируют захват глюкозы; причём эти нарушения носят персонифицированный характер. В совокупности это подчёркивает необходимость увеличения таких исследований и перспективность использования фосфопротеомного масс-спектрометрического анализа (отдельно и в сочетании с другими широкозахватными методами: метаболомный, транскриптомный и протеомный анализ) для исследования комплексных нарушений клеточной сигнализации скелетных мышц при метаболических заболеваниях. Современный фосфопротеомный анализ позволяет исследовать меньшую часть фосфопротеома скелетной мышцы, однако оптимизация протоколов подготовки образцов, прогресс в разработке новых масс-спектрометров и методов анализа получаемых данных позволяют надеяться на значительное увеличение глубины фосфопротеомного анализа в ближайшем будущем.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Приложение 1. Список белков, изменивших фосфорилирование (в двух и более фосфопротеомных исследованиях



[9, 10, 12–14, 16]) в мышечных клетках в ответ на инсулин при нормальной чувствительности к инсулину. Представлены белки человека или человеческие ортологи белков крысы. Лист 1 — Список белков, увеличивших свое фосфорилирование, Лист 2 — Список белков, снизивших свое фосфорилирование. <https://doi.org/10.17816/gc630891-4201965>



Приложение 2. Биологические функции и клеточная локализация белков, изменивших фосфорилирование в мышечных клетках в ответ на инсулин. <https://doi.org/10.17816/gc630891-4201966>

Источник финансирования. Научное исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-10146).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Э.И. Якупова — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование рукописи; Д.В. Попов — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи.

ADDITIONAL INFORMATION



Supplement 1. List of proteins that changed phosphorylation (in two or more phosphoproteomic studies [9, 10, 12–14, 16]) in muscle cells in response to insulin in normal insulin sensitivity. Human proteins or human orthologs of rat proteins are presented. List 1 — List of proteins that phosphorylation is up regulated, List 2 — List of proteins that phosphorylation is down regulated. <https://doi.org/10.17816/gc630891-4201965>



Supplement 2. Biological functions and cellular localization of proteins altered phosphorylation in muscle cells in response to insulin. <https://doi.org/10.17816/gc630891-4201966>

Funding source. The work was supported by the Russian Science Foundation, agreement No. 21-75-10146.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). E.I. Yakupova — literature review, collection and analysis of literary data, writing and preparation of the text of the manuscript; D.V. Popov — literature review, collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text of the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khan M.A.B., Hashim M.J., King J.K., et al. Epidemiology of type 2 diabetes — global burden of disease and forecasted trends // *J Epidemiol Glob Health*. 2020. Vol. 10, N 1. P. 107–111. doi: 10.2991/jegh.k.191028.001
2. Gray N., Picone G., Sloan F., Yashkin A. Relation between BMI and diabetes mellitus and its complications among US older adults // *South Med J*. 2015. Vol. 108, N 1. P. 29–36. doi: 10.14423/SMJ.0000000000000214
3. Karin A., Jon E., Martin A., et al. Body mass index in adolescence, risk of type 2 diabetes and associated complications: a nationwide cohort study of men // *EclinicalMedicine*. 2022. Vol. 46. P. 101356. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101356
4. Merz K.E., Thurmond D.C. Role of skeletal muscle in insulin resistance and glucose uptake // *Compr Physiol*. 2020. Vol. 10, N 3. P. 785–809. doi: 10.1002/cphy.c190029
5. DeFronzo R.A., Gunnarsson R., Bjorkman O., et al. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus // *J Clin Invest*. 1985. Vol. 76, N 1. P. 149–155. doi: 10.1172/JCI111938
6. Petersen M.C., Shulman G.I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance // *Physiol Rev*. 2018. Vol. 98, N 4. P. 2133–2223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017
7. James D.E., Stöckli J., Birnbaum M.J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021. Vol. 22, N 11. P. 751–771. doi: 10.1038/s41580-021-00390-6
8. Needham E.J., Parker B.L., Burykin T., et al. Illuminating the dark phosphoproteome // *Sci Signal*. 2019. Vol. 12, N 565. P. eaau8645. doi: 10.1126/scisignal.aau8645
9. Batista T.M., Jayavelu A.K., Wewer Albrechtsen N.J., et al. A cell-autonomous signature of dysregulated protein phosphorylation underlies muscle insulin resistance in type 2 diabetes // *Cell Metab*. 2020. Vol. 32, N 5. P. 844–859. doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.007
10. Haider N., Lebastchi J., Jayavelu A.K., et al. Signaling defects associated with insulin resistance in nondiabetic and diabetic individuals and modification by sex // *J Clin Invest*. 2021. Vol. 131, N 21. P. e151818. doi: 10.1172/JCI151818
11. Kettenbach A.N., Sano H., Keller S.R., et al. SPECHT — single-stage phosphopeptide enrichment and stable-isotope chemical tagging: quantitative phosphoproteomics of insulin action in muscle // *J Proteomics*. 2015. Vol. 114. P. 48–60. doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.001
12. Small L., Brandon A.E., Parker B.L., et al. Reduced insulin action in muscle of high fat diet rats over the diurnal cycle is not associated with defective insulin signaling // *Mol Metab*. 2019. Vol. 25. P. 107–118. doi: 10.1016/j.molmet.2019.04.006

13. van Gerwen J., Masson S.W.C., Cutler H.B., et al. The genetic and dietary landscape of the muscle insulin signalling network // *Elife*. 2024. Vol. 12. P. RP89212. doi: 10.7554/eLife.89212
14. Needham E.J., Hingst J.R., Parker B.L., et al. Personalized phosphoproteomics identifies functional signaling // *Nat Biotechnol*. 2022. Vol. 40, N 4. P. 576–584. doi: 10.1038/s41587-021-01099-9
15. Zhao X., Bak S., Pedersen A.J., et al. Insulin increases phosphorylation of mitochondrial proteins in human skeletal muscle in vivo // *J Proteome Res*. 2014. Vol. 13, N 5. P. 2359–2369. doi: 10.1021/pr401163t
16. Needham E.J., Hingst J.R., Onslev J.D., et al. Personalized phosphoproteomics of skeletal muscle insulin resistance and exercise links MINDY1 to insulin action // *medRxiv*. 2024. doi: 10.1101/2024.03.11.24304084
17. Yadav Y., Dey C.S. Ser/Thr phosphatases: one of the key regulators of insulin signaling // *Rev Endocr Metab Disord*. 2022. Vol. 23, N 5. P. 905–917. doi: 10.1007/s11154-022-09727-8
18. Boucher J., Kleinriders A., Kahn C.R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014. Vol. 6, N 1. P. a009191. doi: 10.1101/cshperspect.a009191
19. White M.F., Kahn C.R. Insulin action at a molecular level — 100 years of progress // *Mol Metab*. 2021. Vol. 52. P. 101304. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101304
20. Hubbard S.R. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. Vol. 5, N 3. P. a008946. doi: 10.1101/cshperspect.a008946
21. Sasaoka T., Kobayashi M. The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor // *Endocr J*. 2000. Vol. 47, N 4. P. 373–381. doi: 10.1507/endocrj.47.373
22. Zhang J., Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging // *IUBMB Life*. 2014. Vol. 66, N 7. P. 485–495. doi: 10.1002/iub.1293
23. Beeson M., Sajan M.P., Dizon M., et al. Activation of protein kinase C- ζ by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(P04) β is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise // *Diabetes*. 2003. Vol. 52, N 8. P. 1926–1934. doi: 10.2337/diabetes.52.8.1926
24. Higaki Y., Wojtaszewski J.F., Hirshman M.F., et al. Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle // *J Biol Chem*. 1999. Vol. 274, N 30. P. 20791–20795. doi: 10.1074/jbc.274.30.20791
25. Gao X., Lowry P.R., Zhou X., et al. PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. Vol. 108, N 35. P. 14509–14514. doi: 10.1073/pnas.1019386108
26. Demir S., Nawroth P.P., Herzig S., Ekim Üstünel B. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications // *Adv Sci (Weinh)*. 2021. Vol. 8, N 18. P. e2100275. doi: 10.1002/advs.202100275
27. Cho H., Mu J., Kim J.K., et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β) // *Science*. 2001. Vol. 292, N 5522. P. 1728–1731. doi: 10.1126/science.292.5522.1728
28. Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., et al. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice // *J Biol Chem*. 2001. Vol. 276, N 42. P. 38349–38352. doi: 10.1074/jbc.C100462200
29. Sano H., Eguez L., Teruel M.N., et al. Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane // *Cell Metab*. 2007. Vol. 5, N 4. P. 293–303. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.001
30. Friedrichsen M., Birk J.B., Richter E.A., et al. Akt2 influences glycogen synthase activity in human skeletal muscle through regulation of NH(2)-terminal (sites 2 + 2a) phosphorylation // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013. Vol. 304, N 6. P. E631–E639. doi: 10.1152/ajpendo.00494.2012
31. Manning B.D., Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network // *Cell*. 2017. Vol. 169, N 3. P. 381–405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001
32. Sakaguchi M., Cai W., Wang C.H., et al. FoxK1 and FoxK2 in insulin regulation of cellular and mitochondrial metabolism // *Nat Commun*. 2019. Vol. 10, N 1. P. 1582. doi: 10.1038/s41467-019-09418-0
33. Karlsson H.K.R., Kasahara A., Ikeda M., et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of IRS1 in skeletal muscle from men with normal glucose tolerance or type 2 diabetes: a case-control study // *Metabolism*. 2021. Vol. 118. P. 154726. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154726
34. Langlais P., Yi Z., Finlayson J., et al. Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance // *Diabetologia*. 2011. Vol. 54, N 11. P. 2878–2889. doi: 10.1007/s00125-011-2271-9
35. Eshima H. Influence of obesity and type 2 diabetes on calcium handling by skeletal muscle: spotlight on the sarcoplasmic reticulum and mitochondria // *Front Physiol*. 2021. Vol. 12. P. 758316. doi: 10.3389/fphys.2021.758316
36. Bijur G.N., Jope R.S. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation // *J Neurochem*. 2003. Vol. 87, N 6. P. 1427–1435. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02113.x
37. Yang J.Y., Yeh H.Y., Lin K., Wang P.H. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium // *J Mol Cell Cardiol*. 2009. Vol. 46, N 6. P. 919–926. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.015
38. Makhnovskii P.A., Lednev E.M., Gavrilova A.O., et al. Dysregulation of early gene response to a mixed meal in skeletal muscle in obesity and type 2 diabetes // *Physiol Genomics*. 2023. Vol. 55, N 10. P. 468–477. doi: 10.1152/physiolgenomics.00046.2023
39. Coletta D.K., Balas B., Chavez A.O., et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008. Vol. 294, N 5. P. E910–E917. doi: 10.1152/ajpendo.00607.2007
40. Rome S., Clement K., Rabasa-Lhoret R., et al. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp // *J Biol Chem*. 2003. Vol. 278, N 20. P. 18063–18068. doi: 10.1074/jbc.M300293200
41. Wu X., Wang J., Cui X., et al. The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle // *Endocrine*. 2007. Vol. 31, N 1. P. 5–17. Corrected and republished from: *Endocrine*. 2007. Vol. 32, N 3. P. 356. doi: 10.1007/s12020-007-0007-x
42. Archer A.E., Von Schulze A.T., Geiger P.C. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018. Vol. 373, N 1738. P. 20160529. doi: 10.1098/rstb.2016.0529
43. Timofeev Y.S., Kiselev A.R., Dzhoieva O.N., Drapkina O.M. Heat shock proteins (HSPs) and cardiovascular complications of obesity: searching for potential biomarkers // *Curr Issues Mol Biol*. 2023. Vol. 45, N 12. P. 9378–9389. doi: 10.3390/cimb45120588
44. Krook A., Roth R.A., Jiang X.J., et al. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects // *Diabetes*. 1998. Vol. 47, N 8. P. 1281–1286. doi: 10.2337/diab.47.8.1281

45. Tonks K.T., Ng Y., Miller S., et al. Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects // *Diabetologia*. 2013. Vol. 56, N 4. P. 875–885. doi: 10.1007/s00125-012-2811-y
46. Albers P.H., Pedersen A.J., Birk J.B., et al. Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes // *Diabetes*. 2015. Vol. 64, N 2. P. 485–497. doi: 10.2337/db14-0590
47. Vind B.F., Birk J.B., Vienberg S.G., et al. Hyperglycaemia normalises insulin action on glucose metabolism but not the impaired activation of AKT and glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes // *Diabetologia*. 2012. Vol. 55, N 5. P. 1435–1445. doi: 10.1007/s00125-012-2482-8
48. Kim Y.B., Kotani K., Ciaraldi T.P., et al. Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction // *Diabetes*. 2003. Vol. 52, N 8. P. 1935–1942. doi: 10.2337/diabetes.52.8.1935
49. Kim Y.B., Nikoulina S.E., Ciaraldi T.P., et al. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes // *J Clin Invest*. 1999. Vol. 104, N 6. P. 733–741. doi: 10.1172/JCI6928
50. Bandyopadhyay G.K., Yu J.G., Ofrecio J., Olefsky J.M. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase

- activity in insulin-resistant human skeletal muscle // *Diabetes*. 2005. Vol. 54, N 8. P. 2351–2359. doi: 10.2337/diabetes.54.8.2351
51. Karlsson H.K., Zierath J.R., Kane S., et al. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects // *Diabetes*. 2005. Vol. 54, N 8. P. 2351–2359. doi: 10.2337/diabetes.54.8.2351
52. Krook A., Bjornholm M., Galuska D., et al. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients // *Diabetes*. 2000. Vol. 49, N 2. P. 284–292. doi: 10.2337/diabetes.49.2.284
53. Cusi K., Maezono K., Osman A., et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle // *J Clin Invest*. 2000. Vol. 105, N 3. P. 311–320. doi: 10.1172/JCI7535
54. Højlund K., Staehr P., Hansen B.F., et al. Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH2-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes // *Diabetes*. 2003. Vol. 52, N 6. P. 1393–1402. doi: 10.2337/diabetes.52.6.1393
55. Meyer M.M., Levin K., Grimmsmann T., et al. Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease // *Diabetologia*. 2002. Vol. 45, N 6. P. 813–822. doi: 10.1007/s00125-002-0830-9
56. Guridi M., Tintignac L.A., Lin S., et al. Activation of mTORC1 in skeletal muscle regulates whole-body metabolism through FGF21 // *Sci Signal*. 2015. Vol. 8, N 402. P. ra113. doi: 10.1126/scisignal.aab3715

REFERENCES

1. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, et al. Epidemiology of type 2 diabetes — global burden of disease and forecasted trends. *J Epidemiol Glob Health*. 2020;10(1):107–111. doi: 10.2991/jegh.k.191028.001
2. Gray N, Picone G, Sloan F, Yashkin A. Relation between BMI and diabetes mellitus and its complications among US older adults. *South Med J*. 2015;108(1):29–36. doi: 10.14423/SMJ.0000000000000214
3. Karin A, Jon E, Martin A, et al. Body mass index in adolescence, risk of type 2 diabetes and associated complications: a nationwide cohort study of men. *EclinicalMedicine*. 2022;46:101356. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101356
4. Merz KE, Thurmond DC. Role of skeletal muscle in insulin resistance and glucose uptake. *Compr Physiol*. 2020;10(3):785–809. doi: 10.1002/cphy.c190029
5. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, et al. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1985;76(1):149–155. doi: 10.1172/JCI111938
6. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133–2223. doi: 10.1152/physrev.00063.2017
7. James DE, Stöckli J, Birnbaum MJ. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(11):751–771. doi: 10.1038/s41580-021-00390-6
8. Needham EJ, Parker BL, Burykin T, et al. Illuminating the dark phosphoproteome. *Sci Signal*. 2019;12(565):eaau8645. doi: 10.1126/scisignal.aau8645
9. Batista TM, Jayavelu AK, Wewer Albrechtsen NJ, et al. A cell-autonomous signature of dysregulated protein phosphorylation underlies muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2020;32(5):844–859.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2020.08.007

10. Haider N, Lebastchi J, Jayavelu AK, et al. Signaling defects associated with insulin resistance in nondiabetic and diabetic individuals and modification by sex. *J Clin Invest*. 2021;131(21):e151818. doi: 10.1172/JCI151818
11. Kettenbach AN, Sano H, Keller SR, et al. SPECHT — single-stage phosphopeptide enrichment and stable-isotope chemical tagging: quantitative phosphoproteomics of insulin action in muscle. *J Proteomics*. 2015;114:48–60. doi: 10.1016/j.jpro.2014.11.001
12. Small L, Brandon AE, Parker BL, et al. Reduced insulin action in muscle of high fat diet rats over the diurnal cycle is not associated with defective insulin signaling. *Mol Metab*. 2019;25:107–118. doi: 10.1016/j.molmet.2019.04.006
13. van Gerwen J, Masson SWC, Cutler HB, et al. The genetic and dietary landscape of the muscle insulin signalling network. *Elife*. 2024;12:RP89212. doi: 10.7554/eLife.89212
14. Needham EJ, Hingst JR, Parker BL, et al. Personalized phosphoproteomics identifies functional signaling. *Nat Biotechnol*. 2022;40(4):576–584. doi: 10.1038/s41587-021-01099-9
15. Zhao X, Bak S, Pedersen AJ, et al. Insulin increases phosphorylation of mitochondrial proteins in human skeletal muscle in vivo. *J Proteome Res*. 2014;13(5):2359–2369. doi: 10.1021/pr401163t
16. Needham EJ, Hingst JR, Onslev JD, et al. Personalized phosphoproteomics of skeletal muscle insulin resistance and exercise links MINDY1 to insulin action. medRxiv. 2024. doi: 10.1101/2024.03.11.24304084
17. Yadav Y, Dey CS. Ser/Thr phosphatases: one of the key regulators of insulin signaling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2022;23(5):905–917. doi: 10.1007/s11154-022-09727-8

18. Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(1):a009191. doi: 10.1101/cshperspect.a009191
19. White MF, Kahn CR. Insulin action at a molecular level — 100 years of progress. *Mol Metab.* 2021;52:101304. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101304
20. Hubbard SR. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(3):a008946. doi: 10.1101/cshperspect.a008946
21. Sasaoka T, Kobayashi M. The functional significance of Shc in insulin signaling as a substrate of the insulin receptor. *Endocr J.* 2000;47(4):373–381. doi: 10.1507/endocrj.47.373
22. Zhang J, Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB Life.* 2014;66(7):485–495. doi: 10.1002/iub.1293
23. Beeson M, Sajan MP, Dizon M, et al. Activation of protein kinase C- ζ by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(P04)3 is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes.* 2003;52(8):1926–1934. doi: 10.2337/diabetes.52.8.1926
24. Higaki, Y, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, et al. Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1999;274(30):20791–20795. doi: 10.1074/jbc.274.30.20791
25. Gao X, Lowry PR, Zhou X, et al. PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(35):14509–14514. doi: 10.1073/pnas.1019386108
26. Demir S, Nawroth PP, Herzig S, Ekim Üstünel B. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications. *Adv Sci (Weinh).* 2021;8(18):e2100275. doi: 10.1002/advs.202100275
27. Cho H, Mu J, Kim JK, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science.* 2001;292(5522):1728–1731. doi: 10.1126/science.292.5522.1728
28. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, et al. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38349–38352. doi: 10.1074/jbc.C100462200
29. Sano H, Eguéz L, Teruel MN, et al. Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. *Cell Metab.* 2007;5(4):293–303. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.001
30. Friedrichsen M, Birk JB, Richter EA, et al. Akt2 influences glycogen synthase activity in human skeletal muscle through regulation of NH₂-terminal (sites 2 + 2a) phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(6):E631–E639. doi: 10.1152/ajpendo.00494.2012
31. Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell.* 2017;169(3):381–405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001
32. Sakaguchi M, Cai W, Wang CH, et al. FoxK1 and FoxK2 in insulin regulation of cellular and mitochondrial metabolism. *Nat Commun.* 2019;10(1):1582. doi: 10.1038/s41467-019-09418-0
33. Karlsson HKR, Kasahara A, Ikeda M, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis of IRS1 in skeletal muscle from men with normal glucose tolerance or type 2 diabetes: a case-control study. *Metabolism.* 2021;118:154726. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154726
34. Langlais P, Yi Z, Finlayson J, et al. Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance. *Diabetologia.* 2011;54(11):2878–2889. doi: 10.1007/s00125-011-2271-9
35. Eshima H. Influence of obesity and type 2 diabetes on calcium handling by skeletal muscle: spotlight on the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. *Front Physiol.* 2021;12:758316. doi: 10.3389/fphys.2021.758316
36. Bijur GN, Jope RS. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem.* 2003;87(6):1427–1435. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02113.x
37. Yang JY, Yeh HY, Lin K, Wang PH. Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(6):919–926. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.015
38. Makhnovskii PA, Lednev EM, Gavrilova AO, et al. Dysregulation of early gene response to a mixed meal in skeletal muscle in obesity and type 2 diabetes. *Physiol Genomics.* 2023;55(10):468–477. doi: 10.1152/physiolgenomics.00046.2023
39. Coletta DK, Balas B, Chavez AO, et al. Effect of acute physiological hyperinsulinemia on gene expression in human skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E910–E917. doi: 10.1152/ajpendo.00607.2007
40. Rome S, Clément K, Rabasa-Lhoret R, et al. Microarray profiling of human skeletal muscle reveals that insulin regulates approximately 800 genes during a hyperinsulinemic clamp. *J Biol Chem.* 2003;278(20):18063–18068. doi: 10.1074/jbc.M300293200
41. Wu X, Wang J, Cui X, et al. The effect of insulin on expression of genes and biochemical pathways in human skeletal muscle. *Endocrine.* 2007;31(1):5–17. Corrected and republished from: *Endocrine.* 2007;32(3):356. doi: 10.1007/s12020-007-0007-x
42. Archer AE, Von Schulze AT, Geiger PC. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2018;373(1738):20160529. doi: 10.1098/rstb.2016.0529
43. Timofeev YS, Kiselev AR, Dzhoieva ON, Drapkina OM. Heat shock proteins (HSPs) and cardiovascular complications of obesity: searching for potential biomarkers. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(12):9378–9389. doi: 10.3390/cimb45120588
44. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, et al. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes.* 1998;47(8):1281–1286. doi: 10.2337/diab.47.8.1281
45. Tonks KT, Ng Y, Miller S, et al. Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects. *Diabetologia.* 2013;56(4):875–885. doi: 10.1007/s00125-012-2811-y
46. Albers PH, Pedersen AJ, Birk JB, et al. Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2015;64(2):485–497. doi: 10.2337/db14-0590
47. Vind BF, Birk JB, Vienberg SG, et al. Hyperglycaemia normalises insulin action on glucose metabolism but not the impaired activation of AKT and glycogen synthase in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55(5):1435–1445. doi: 10.1007/s00125-012-2482-8
48. Kim YB, Kotani K, Ciaraldi TP, et al. Insulin-stimulated protein kinase C λ /zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes.* 2003;52(8):1935–1942. doi: 10.2337/diabetes.52.8.1935
49. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, et al. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of

phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 1999;104(6):733–741. doi: 10.1172/JCI6928

50. Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes*. 2005;54(8):2351–2359. doi: 10.2337/diabetes.54.8.2351

51. Karlsson HK, Zierath JR, Kane S, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2005;54(6):1692–1697. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1692

52. Krook A, Björnholm M, Galuska D, et al. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2000;49(2):284–292. doi: 10.2337/diabetes.49.2.284

53. Cusi K, Maezono K, Osman A, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest*. 2000;105(3):311–320. doi: 10.1172/JCI7535

54. Højlund K, Staehr P, Hansen BF, et al. Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH₂-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(6):1393–1402. doi: 10.2337/diabetes.52.6.1393

55. Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, et al. Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia*. 2002;45(6):813–822. doi: 10.1007/s00125-002-0830-9

56. Guridi M, Tintignac LA, Lin S, et al. Activation of mTORC1 in skeletal muscle regulates whole-body metabolism through FGF21. *Sci Signal*. 2015;8(402):ra113. doi: 10.1126/scisignal.aab3715

ОБ АВТОРАХ

* **Якупова Эльмира Ильдаровна**, канд. биол. наук;
адрес: Россия, 123007, Москва, Хорошевское ш., д. 76а;
ORCID: 0000-0001-6949-7391;
e-mail: yakupova.mira@mail.ru

Попов Даниил Викторович, д-р биол. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-3981-244X;
eLibrary SPIN: 3148-2905;
e-mail: danil-popov@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* **Elmira I. Yakupova**, Cand. Sci. (Biology);
address: 76A Khoroshevskoe shosse, Moscow 123007, Russia;
ORCID: 0000-0001-6949-7391;
e-mail: yakupova.mira@mail.ru

Daniil V. Popov, Dr. Sci. (Biology), Professor;
ORCID: 0000-0002-3981-244X;
eLibrary SPIN: 3148-2905;
e-mail: danil-popov@yandex.ru