

Inquadramento fisiopatologico della trasduzione del segnale insulinico

Rosario Amato, Miranda Menniti, Giorgia Bulotta, Nicola Perrotti

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica "G. Salvatore", Università Magna Graecia di Catanzaro

ABSTRACT

Pathophysiology of the insulin receptor signal transduction. Diabetes mellitus is a major public health problem. The chronic complications of diabetes are a leading cause of blindness, kidney failure, amputations, increased risk of vascular disease and stroke. In the aim to develop better therapies, many researchers have investigated areas related to insulin and diabetes. In the last decade the insulin signalling pathway has been dissected, offering to the scientific community the possibility to improve the therapeutic approach and the understanding of the molecular pathophysiology of insulin signalling. This work is mainly focused on the revision of the knowledge gathered in the last few years in the field of Insulin signal transduction, in the effort to develop an integrated review between clinical and experimental diabetologists.

GENERALITÀ

L'insulina è il più potente agente anabolizzante noto, ugualmente abile nella promozione della sintesi e dell'accumulo di carboidrati, lipidi e proteine, e dunque inibente il catabolismo e il rilascio in circolo degli stessi. La funzione principalmente connessa al recettore insulinico è la regolazione del trasporto del glucosio all'interno della cellula, attraverso la regolazione positiva della disponibilità e della funzione del trasportatore del glucosio GLUT4¹. Infatti la disponibilità e l'attività del GLUT4 è funzione del suo riciclo, mediato attraverso vescicole endo/esocitotiche specializzate.

In assenza di insulina il GLUT4 è sottoposto ad un lento riciclo (ri-localizzazione) tra la membrana plasmatica e vescicole specializzate. L'insulina stimola la traslocazione di un pool di GLUT4 a livello della membrana plasmatica; ovviamente ciò implica una drammatica down-regolazione della sua endocitosi. Un ruolo di sempre maggior rilevanza nella comprensione della fisiologia e della fisiopatologia della risposta insulinica è rivestito dal grado di specializzazione delle vescicole che, compartimentalizzando il GLUT4, rappresentano una tappa limitante nella determinazione della risposta insulinica². Tali vescicole sono arricchite in v-SNARE (solubile N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein)³ che è classificabile come una proteina della famiglia VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2), essenziale per l'interazione con l'omologa t-SNARE, sua controparte a livello della membrana plasmatica, e necessaria al suo ancoraggio. Essenziale è poi l'intenso network a livello del microtubulo e del pool actinico in risposta alla stimolazione insulinica, atto a favorire un efficiente trafficking del GLUT4. A tal fine gioca un ruolo essenziale l'assemblaggio dell'actina corticale sotto regolazione di TC10⁴ (pure essenziale nella genesi dei Lipid Rafts). In aggiunta a ciò, negli ultimi anni è emerso un ruolo nuovo, sotto attivazione insulinica, di proteine note come Kinesine (KIF5b e KIF3), nel guidare il percorso delle vescicole di trasporto del GLUT4 fino alla membrana pla-

smatica⁵.

Fisiopatologia del metabolismo glucidico

L'insulina esercita, a livello cellulare, effetti sul trasporto del glucosio, sulla sintesi di macromolecole glucidiche e proteiche, sulla proliferazione. A livello di organismo l'insulina esercita il ruolo complessivo di regolare il metabolismo dei substrati in risposta alla disponibilità di cibo. Dopo mangiato, l'insulina indirizza il metabolismo verso il deposito di glicogeno nel fegato e di trigliceridi nel tessuto adiposo, oltre a favorire il trasporto di glucosio e la sintesi di glicogeno nel muscolo. Durante il digiuno, quando i livelli di insulina sono molto bassi, si ha mobilitazione di depositi accumulati a livello cellulare. Il fegato contribuisce a mantenere normali livelli di glucosio, grazie all'enzima glucosio 6 fosfatasi, che produce

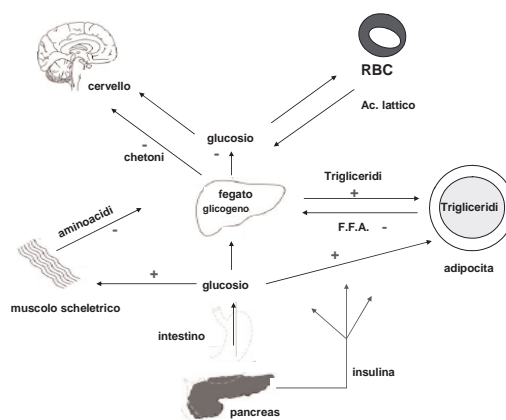


Figura 1
Rappresentazione schematica della fisiologia dell'azione insulinica

glucosio libero dal glucosio 6 fosfato, ultimo prodotto del catabolismo del glicogeno. Dal momento che l'enzima glucosio 6 fosfatasi non è espresso a livello muscolare, il glicogeno muscolare non è utilizzato per mantenere normali i livelli di glucosio nel corso del digiuno prolungato, come accade per il glicogeno epatico. Tuttavia, in queste condizioni amminoacidi di derivazione muscolare, sono utilizzati dal fegato in processi neoglucogenetici.

Il diabete mellito di tipo 2 è caratterizzato dalla presenza di gradi variabili di insulino resistenza e riduzione della secrezione insulinica. Le fasi che precedono la comparsa del diabete clinico sono caratterizzate da insulino resistenza, in genere geneticamente determinata. Il progressivo deteriorarsi della malattia è caratterizzato dal deterioramento della secrezione insulinica che, quando diventa incapace di inibire la produzione epatica del glucosio, comporta grave iperglicemia a digiuno (Tab. 1).

Fisiopatologia della trasduzione del segnale insulinico

Il recettore insulinico è un complesso eterodimerico bifunzionale, consistente di due subunità α extracellulari, due regioni transmembrana e due subunità β con attività tirosin chinasi. L'insulina legandosi alle alpha subunità induce un complesso meccanismo che porta alla trasfosforilazione da un'unità all'altra a livello di uno specifico residuo tirosinico all'interno di un cosiddetto: loop di attivazione, che risulta nell'incremento dell'attività catalitica della chinasi. Non di meno il recettore è soggetto anche ad una autofosforilazione a livello di altri residui tirosinici in prossimità della regione transmembrana e della coda intracellulare⁶. In questa fase il recettore insulinico attivato, fosforila residui tirosinici a livello di specifici substrati intracellulari quali: IRS family (da IRS1 fino IRS4), e ancora IRS5/DOK4, IRS/DOK5, gab-1, cbl, APS e Shc⁷. Molte di queste proteine inclusi IRS e Shc sono reclutati a livello di una specifica zona del dominio transmembrana contenente in motivo NPXY, mentre altre proteine come APS, si legano direttamente al loop di attivazione della coda intracellulare del recettore. Sotto attivazione fosforilativa questi substrati interagiscono con una vasta gamma di molecole effettrici o adattatrici che contengono un dominio di omologia Src2

(SH2)⁸. Tra gli effettori del recettore insulinico, quelli meglio caratterizzati sono sicuramente le proteine della famiglia IRS, che si sono giovati di numerosi e ormai accreditati studi di caratterizzazione fenotipica mediante la messa a punto di modelli murini knockout. I topi knockout per IRS1 ad esempio mostrano un grave ritardo del accrescimento, dovuto anche al blocco della trasduzione del segnale mediato dall'ormone omologo all'insulina: IGF1, che media ogni segnale di accrescimento somatico; tuttavia questi topi non sviluppano diabete ma solo insulino resistenza a livello dei tessuti periferici, con riduzione della tolleranza al glucosio. Topi knockout per IRS2 invece sono insulino resistenti sia in periferia che a livello epatico, andando incontro a sviluppo di un franco diabete di tipo 2, dovuto soprattutto alla rapida disfunzione delle cellule β del pancreas.

Recettore insulinico e loop auto-regolativo.

Dagli studi effettuati sui modelli murini sembrerebbe dunque che IRS2 sia più importante di IRS1 nella fisiopatologia del diabete mellito. Tuttavia non credo si possa dire che su questo argomento si sia, ad oggi, raggiunto un accordo unanime. Noi abbiamo provato a coimmunoprecipitare IRS1 e IRS2 con anticorpi diretti contro l'enzima PI3 Kinasi in estratti da fegato di topi digiuni da 16 ore o normalmente alimentati. Con nostra sorpresa abbiamo notato che IRS1 ma non IRS2 viene identificato in immunoprecipitati di PI3 kinasi dal fegato di topi alimentati, mentre IRS1 ed IRS2 sono identificati con paragonabile efficienza negli immunoprecipitati da fegato di topi a digiuno, suggerendo che in effetti IRS1 sia più importante di IRS2 nel tradurre il segnale insulinico, in condizioni di alimentazione (N. Perrotti, manoscritto in preparazione). L'osservazione è particolarmente interessante dal momento che l'insulina è per l'appunto l'ormone che regola il metabolismo del glucosio dopo l'assunzione di cibo, mentre il suo ruolo durante il digiuno è molto meno rilevante.

Topi knockout per il recettore insulinico muoiono nei primi giorni di vita in condizioni di estrema insulino-resistenza e chetoacidosi, una condizione attesa, in considerazione della grande importanza che il recettore ha nella trasduzione del segnale insulinico ma diversa da quel che si osserva nel leprecaunismo e nell'insulino-resistenza di tipo A. Risultati interessanti sono stati pure ottenuti dalla delezione genica tessuto specifica. Il topo KO per il recettore insulinico a specificità muscolare

Tabella 1

Difetti fisiopatologici durante la progressione fra prediabete e diabete di tipo 2 manifesto)

	Insulino resistenza (muscolo)	Difetto della secrezione (beta cellula)	Produzione glucosio (fegato)
Prediabete (FPG <6.1mM)	+/-	-	Normale
Rid. Toll. Gluc. (IGT)	+	-	Normale
Diabete			
Lieve (FPG: 7.0-7.8mM)	+	+	Normale
Moderato/grave (FPG: >7.8mM)	+	+	Aumentata

(MIRKO), presenta una condizione glicometabolica pressochè normale, accompagnata da un aumento dei depositi lipidici nel tessuto adiposo. Questa condizione è verosimilmente legata al trasporto preferenziale di glucosio nel tessuto adiposo, in conseguenza dell'insulino resistenza muscolare. Il topo KO per il recettore insulinico a specificità della cellula β del pancreas (bIRKO) presenta invece una difettosa risposta insulinica allo stimolo glucidico⁹.

Insulina e signaling phosphatidyl inositolo 3-Kinasi (PI3K) dipendente

La stimolazione dell' uptake del glucosio sotto regolazione insulinica è mediato dalla PI3K e dal suo pathway¹⁰. Quando IRS1 è fosforilato in tirosina, interagisce con la subunità regolatoria p85 del complesso della PI3K, cui segue la sua attivazione enzimatica, ciò comporta le eterodimerizzazione fra la sub-unità p85 stessa e la subunità p110 effettrice del medesimo complesso e legame alla membrana plasmatica. L'enzima così attivato regola la formazione del phosphatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PIP3) che modula a sua volta l'attivazione e la localizzazione di numerose proteine¹¹. L'attivazione della PI3K è attenuata dalla defosforilazione dei PIP3 mediato da 3'fosfatasi come ad esempio PTEN o 5' fosfatasi come SHIP2¹². La PI3k gioca un ruolo chiave nell'uptake del glucosio e quindi nella traslocazione del GLUT4. Infatti trattamenti con inibitori chimici irreversibili dell'enzima come ad esempio la wortmannin, bloccano completamente il richiamo di glucosio nella cellula mediato da insulina. Inoltre, l'espressione di una forma dominante negativa della PI3kinasi determina una inibizione irreversibile dell'attività insulinica sulla regolazione del bilancio di glucosio, laddove la forzata espressione di una forma costitutivamente attiva dell'enzima, mima una costitutiva azione insulinica¹³. Topi che esprimono una forma deleta della subunità regolatrice della PI3kinasi mostrano, a loro volta, un' aumentata sensibilità all'insulina, laddove topi knockout per la subunità catalitica del-

l'enzima sviluppano una grave insulino-resistenza e intolleranza al glucosio¹⁴.

Sussequente a questa attivazione, si registra il richiamo e l'attivazione in membrana di proteine esprimenti un dominio plecstrinico PH, come molte proteine adattatrici, citoscheletriche e molti enzimi. Tra questi la più rilevante è l'attivazione della serin/treonin chinasi PDK1/2, che modula l'attivazione di tutte le proteine a valle: Akt1-3, protein chinasi C (PKC) ζ/λ , serum and glucocorticoid regulated kinase (SGK1-3)¹⁵. L'iperespressione della forma legata alla membrana di akt, che mima una costitutiva attivazione dipendente da PDK1/2, risulta in un drammatico incremento del trasporto di glucosio e di localizzazione del GLUT4 in membrana plasmatica, laddove tale fenotipo è completamente inibito dal mutante dominante negativo di AKT¹⁶. Di recente è emerso come dato rilevante, il fatto che le forme di AKT1,2,3 non sono geneticamente ridondanti. Infatti studi su modelli knockout così come studi di knockdown usando siRNA, hanno dimostrato che la down regolazione della sola forma Akt1 non altera la sensibilità all'insulina, laddove invece la separata down regolazione di Akt2 riduce drammaticamente la sensibilità all'insulina e i depositi di glucosio periferici e centrali¹⁷. Tuttavia è oggi chiaro che l'attivazione del pathway della PI3K è necessaria ma non sufficiente da sola alla piena regolazione dell'uptake del glucosio, che resta dunque una funzione complessa e integrata di più vie di trasduzione del segnale metabolico.

INSULINA E SIGNALING RAS DIPENDENTE

L'attivazione di Ras, allocato sul lato interno della membrana plasmatica, coinvolge SOS (son-of-seven-less), che è un fattore di scambio dei nuocleotidi guanidinici, promuovente lo scambio GDP/GTP su Ras, attivandola in tal modo. SOS è strettamente legata a GRB-2 attraverso un dominio di omologia Src 3 (SH3); il complesso GRB-2/SOS così formato è in grado di legare i residui tirosinici su IRS1-2 e Shc, quando questi sono

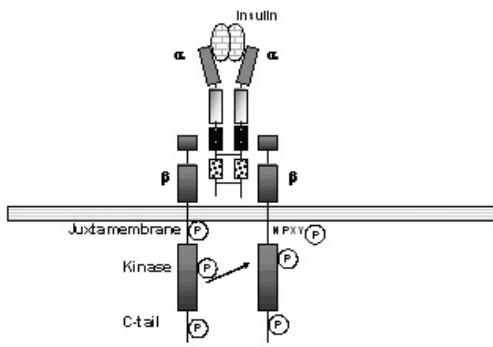


Figura 2
Parzialmente modificato da: Chang L, Chiang SH, Saltiel AR Insulin signaling and the regulation of glucose transport Mol Med. 2004 10(7-12):65-71

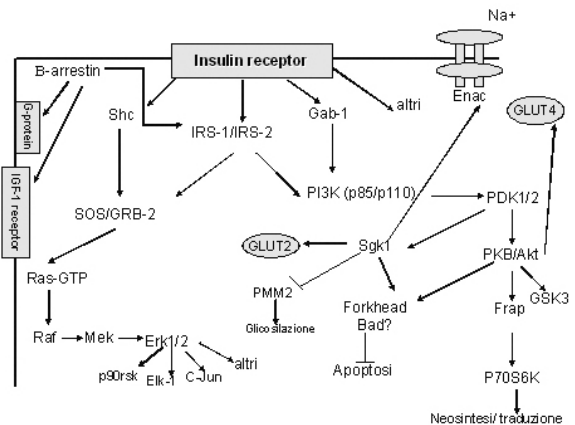


Figura 3
Trasduzione del segnale insulinico-dipendente: nuovi pathway, nuove prospettive

fosforilati dal recettore insulinico. In questo modo il complesso GRB-2/SOS si lega la membrana plasmatica, chiudendo in questo loop attivativo Ras che in tal modo è in grado di avviare la trasduzione del segnale che partendo da Raf porta all'attivazione delle MAP chinasi (mitogen activated protein kinase)¹⁸. Ras-GTP ma non Ras-GDP lega Raf, che tuttavia non è attivato da questo legame ma solo traslocato alla membrana dove invece è regolata la sua attività chinasi. Raf, a sua volta, fosforila Mek, che è una chinasi a doppia specificità (tirosin/serin-treonin chinasi) che regola infine la fosforilazione di Erk1/2 in tirosina e treonina su motivi TEY. Il range dei target di Erk1/2 è poi numerosissimo e vede soprattutto l'attivazione di numerosi fattori trascrizionali, tra i quali spiccano elk-1, c-Jun e numerose chinasi tra cui p90rsk¹⁸. Questa via di segnale è quella massimamente coinvolta nella regolazione della fase G2/M insulino-dipendente, laddove la via neosintetica è spostata principalmente sulla regolazione insulino-dipendente di G1, specie attraverso P70 S6 Kinasi. Su questo punto tuttavia la letteratura è contrastante, infatti, se Mendez et al. concordano su questa interpretazione, in Welsh e Proud si legge che la regolazione insulino dipendente dell'incremento della fosforilazione sovrabasale di eIF4G (e quindi degli eventi traduzionali) richiederebbe l'attivazione delle MAP Kinasi¹⁹.

NUOVE EVIDENZE NEL CAMPO DELLA DIABETOLOGIA MOLECOLARE

Nell'ultimo decennio la ricerca nel campo della diabetologia molecolare ha aperto nuove vie di studio e nuovi spiragli nella comprensione delle complesse vie di regolazione che presiedono al metabolismo intermedio, specie quello insulino-dipendente. Come prima enunciato in merito al pathway della PI3K molte chinasi risultano attivate nel processo seguente al legame dell'insulina al suo proprio recettore, una di queste è Sgk1, serin treonin

chinasi, la cui attivazione è dipendente da PDK1/PDK2 e PKA²⁰, dimostratasi essenziale nella comprensione degli effetti sodio ritentivi dell'insulina. Infatti sgk1 si è mostrata essere la principale regolatrice del canale del sodio amiloride sensibile²¹, che in cellule principali del rene, è il canale massimamente coinvolto nella regolazione ormonale del riassorbimento apicale del sodio e da cui dipende il funzionamento della controparte basolaterale: la Na/K ATPasi. In ragione di ciò, sgk1 è ad oggi uno dei principali candidati atti a spiegare i meccanismi molecolari della sindrome metabolica, definita da ipertensione, insulino-resistenza, ridotta tolleranza glucidica e obesità. Sgk1 è inoltre di recente emersa come una delle principali molecole regolatrici del

GLUT1²², che solo di recente, sembra, rompendo un tabù classico, essere stato dimostrato un trasportatore insulino-regolato. Sgk1 nel contesto della fisiopatologia diabetica è uno dei massimi candidati atti a spiegare una delle principali complicanze d'organo che subentra in un diabete di lunga storia e tendenzialmente scompensato: la nefropatia diabetica²³. Sgk1 infatti medierebbe un potente effetto ipertrozzante, solo parzialmente ascrivibile ad un iper riassorbimento di sodio ma che coinvolge il ruolo di sgk1 nella regolazione di un fenotipo fibrotico tipico di geni coinvolti nella transizione epiteliomesenchimale. Di recente nei nostri laboratori si è dimostrato un ruolo di sgk1 sotto attivazione insulinica nell'inibizione della glicosilazione co-traduzionale mediata da PMM2 (fosfomannomutasi di tipo 2)²⁴.

Un altro gene di estremo interesse che negli ultimi anni sembra aver modificato il modo di intendere il ciclo connesso al recettore insulinico è β -arrestina 1²⁵ che medierebbe la desensibilizzazione alla risposta insulinica, promuovendo, specie in condizioni di iperinsulinemia o di stimolazione cronica, la degradazione ubiquitino-dipendente e proteosoma mediata di IRS1, principale regolatore della trasduzione del segnale insulinico. In tal modo β -arrestina concorrerebbe alla determinazione di insulino resistenza. Interessante è notare che in condizioni fisiologiche insulina induce fosforilazione e degradazione di β -arrestina, inducendo in tal modo una desensibilizzazione eterologa delle G protein e del recettore dell'IGF-1 ma in condizioni di stimolazione cronica e patologica, β -arrestina shiftando sul complesso recettoriale a valle del recettore insulinico ne limiterebbe come meccanismo controregolativo l'eccesso di stimolazione, causando in tal modo insulino-resistenza.

Per ciò che attiene invece l'internalizzazione del recettore insulinico, dopo legame all'ormone, sembra importante il ruolo svolto a livello epatico dal primo substrato specifico per il recettore insulinico ad essere stato identificato pp120 (CEACAM-1)²⁶. Questa è una fosfoproteina di membrana, espressa specificamente a livello epatocitario, caratterizzata dalla presenza di una porzione extracellulare dotata di attività Ecto-ATPasica e di una porzione intracitoplasmatica, che contiene una tirosina suscettibile di fosforilazione in risposta alla stimolo insulinico. Di recente è anche emerso un ruolo chiave del fattore HMGA1 (high mobility group type A1) nella regolazione trascrizionale del recettore insulinico: pazienti che presentano mutazioni a carico di questo gene manifestano un fenotipo di insulino resistenza con progressiva tendenza al franco diabete, fenotipo parzialmente identificato anche in modelli murini KO per il gene che codifica per lo stesso fattore di trascrizione⁵.

Abbreviazioni del signaling insulinico: Erk1/2: extracellular-ligand regulated kinase; GRB-2: growth factor receptor bound protein; GSK-3: glycogen synthase Kinase-3; IGF-1: insulin like growth factor; IRS1/2: insulin receptor substrate; MAPK: mitogen activated protein kinase; mTor: mammalian TOR (target of rapamycin); PMM2: Phosphomannomutase type 2; PDK1/2: Phospholipid-dependent kinase 1/2; PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase; PKA: Protein Kinase A; PKB: Protein Kinase B; P70s6K: the 70 KDa ribosomal protein S6 Kinase-1; Sgk1: serum and glucocorticoid regulated Kinase; SH: Src homology; SHC: adaptor protein with homology with Src and collagen; SOS: son of seven less;

BIBLIOGRAFIA

1. Furtado LM, Sonar R, Sweeney G, Niu W, Kip A. Activation of glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem. Cell Biol.* 2002;80:569-78
2. Holman GD, Lo Leggio L, Cushman SW. Insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter recycling: a problem in membrane protein subcellular trafficking through multiple tools. *J Biol. Chem.* 1994;269:17516-24
3. Randhawa VK, Thong FS, Lim DY, Li D, Garg RR, et al. VAMP2 but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol Biol. Cell* 2000;11:2403-17
4. Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, Kip A. Insulin induced cortical actin remodelling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J Clin. Invest* 2001;108:371-81
5. Semiz S et al. Conventional Kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. *EMBO J* 2003;22:2387-99.
6. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic* 2003;4:711-16
7. White MF, Yenush L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;228: 179-208.
8. Proud CG. Translation. Turned on by insulin. *Nature* 1994 ;371(6500):747-8.
9. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 1996;12(1):106-9
10. Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. Regulated membrane trafficking of the insulin responsive glucose transporter 4 in adipocyte. *Endocr. Rev.* 2004;25:177-204
11. Shepherd PR.. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-Kinase signalling in insulin sensitive tissues. *Acta Physiol. Scand.* 2005;183:3-12
12. Pesesse X, Deleu S, De Smedt F, Drayer L, Erneux C.. Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1997 ;239:697-700
13. Martin SS, Haruta T, Morris AJ, Kippel A, Olefsky JM. Activated phosphatidylinositol 3-Kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1996;271:17605-8
14. Brachmann SM, Ueki K, Engelman JA, Kahn RC, Cantley LC. Phosphoinositide 3-Kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Moll. Cell. Biol* 2005; 25:1596-607
15. Mora A, Komander D, Van Aalten DM, Alessi DR. PDK1, the master regulator of AGC Kinase signal transduction. *Semin cell Dev. Biol.* 2004;15:161-70
16. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, et al. Protein Kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblast. *Moll Cell Biol* 1999 ;19:4008-18
17. Jiang ZY, Zhou QL, Coleman KA, Chouinard M, Boese Q, et al. Insulin signalling through Akt/protein Kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 100: 2003;7569-74
18. Denton RM, Tavare JM. Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *Eur J Biochem* 1995;227(3):597-611
19. Welsh GI, Proud CG. Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J.* 1993;284 (Pt 1):19-23.
20. Perrotti N, He R.A., Phillips S., Haft C.R., Taylor S.I. Activation of Serum and Glucocorticoid regulated kinase by Insulin and c AMP. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276, (11) 9406-9412
21. Faletti CJ, Perrotti N, Taylor SI, Blazer-Yost BL. sgk: an essential convergence point for peptide and steroid hormone regulation of ENaC-mediated Na⁺ transport. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(3):C494-500.
22. Palmada M, Boehmer C, Akel A, Rajamanickam J, Jeyaraj S, et al. SGK1 kinase upregulates GLUT1 activity and plasma membrane expression. *Diabetes.* 2006;55(2):421-7.
23. Reeves WB, Andreoli TE. Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;5;97(14):7667-9.
24. Menniti M, Iuliano R, Amato R, Boito R, Perrotti N. Serum and glucocorticoid-regulated kinase Sgk1 inhibits insulin-dependent activation of phosphomannomutase 2 in transfected COS-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(1):C148-55.
25. Usui I, Imamura T, Huang J, Satoh H, Shenoy SK, et al. beta-arrestin-1 competitively inhibits insulin-induced ubiquitination and degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol.* 2004;24(20):8929-37
26. Perrotti N, Accili D, Marcus-Samuels B, Rees-Jones RW, Taylor SI. Insulin stimulates phosphorylation of a 120-kDa glycoprotein substrate (pp120) for the receptor-associated protein kinase in intact H-35 hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(10):3137-40.
27. Foti D, Chiefari E, Fedele M, Iuliano R, Brunetti L, et al. Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat Med.* 2005;11(7):765-73.