Biologie Aujourd'hui, 208 (2), 119-136 (2014)
© Société de Biologie, 2014
DOI: 10.1051/jbio/2014013

Contrôle de la signalisation et de l'action de l'insuline par la protéine Grb14

Anaïs Gondoin[1,2,3], Lucie Morzyglod[1,2,3], Bernard Desbuquois[1,2,3] et Anne-Françoise Burnol[1,2,3]

[1] INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France
[2] CNRS, UMR 8104, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France
[3] Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 24 rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France

Auteur correspondant : Anne-Françoise Burnol, anne-francoise.burnol@inserm.fr

Reçu le 24 avril 2014

Résumé – Les effets de l'insuline sur le métabolisme et la croissance cellulaires sont relayés par un récepteur tyrosine kinase spécifique, qui en phosphorylant plusieurs substrats déclenche l'activation de deux voies de signalisation majeures, la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/Akt et la voie Ras/*extracellular signal-regulated kinase* (ERK). L'activation du récepteur et des voies de signalisation de l'insuline est aussi soumise à un rétrocontrôle négatif mettant en jeu différents mécanismes, notamment l'interaction du récepteur et de ses substrats avec des protéines inhibitrices. Après une description des principaux mécanismes impliqués dans l'activation et l'atténuation de la signalisation de l'insuline, cette revue se focalisera sur son contrôle par la protéine adaptatrice Grb14, membre de la famille de protéines Grb7. Cette protéine a été identifiée comme un inhibiteur de la signalisation et de l'action de l'insuline, et elle est impliquée dans la résistance à l'insuline associée au diabète de type 2 et à l'obésité. L'analyse du mécanisme moléculaire d'action de Grb14 a montré qu'en s'associant au récepteur de l'insuline activé, Grb14 inhibe son activité catalytique et l'activation des voies de signalisation qui en dépend. Cependant, les conséquences de l'invalidation du gène de Grb14 sont complexes et tissu-spécifiques, et certains effets de Grb14 sur la signalisation de l'insuline semblent liés à son interaction avec des protéines effectrices en aval du récepteur. L'inhibition pharmacologique de Grb14 devrait permettre d'améliorer la sensibilité à l'insuline et la régulation de l'homéostasie énergétique dans les situations de résistance à l'insuline.

Mots clés : Récepteur de l'insuline / adaptateur moléculaire / Grb14 / signalisation / inhibition

Abstract – Control of insulin signalisation and action by the Grb14 protein.

The action of insulin on metabolism and cell growth is mediated by a specific receptor tyrosine kinase, which, through phosphorylation of several substrates, triggers the activation of two major signaling pathways, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K)/Akt pathway and the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. Insulin-induced activation of the receptor and downstream signaling is also subjected to a negative feedback control involving several mechanisms, among which the interaction of the insulin receptor and its substrates with inhibitory proteins. After summarizing the major mechanisms underlying the activation and attenuation of insulin signaling, this review focuses on its control by the Grb14 adaptor protein. Grb14 has been identified as an inhibitor of insulin signaling and action, and is involved in insulin resistance associated with type 2 diabetes and obesity. Studies on the molecular mechanism of action of Grb14 have shown that, through interaction with the activated insulin receptor, Grb14 inhibits its catalytic activity and the activation of downstream signaling. However, the consequences of Grb14 gene invalidation are complex and tissue-specific,

and some effects of Grb14 on insulin signaling appear to be linked to its interaction with effector proteins downstream the insulin receptor. Pharmacological inhibition of Grb14 should allow to enhance insulin sensitivity and improve energy homeostasis in insulin-resistant states.

Key words: Insulin receptor / molecular adaptor / Grb14 / signal transduction / inhibition

Introduction

L'insuline est une hormone clé du maintien de l'homéostasie énergétique. Des défauts de son action, ou « insulinorésistance », sont étroitement associés aux pathologies métaboliques que sont l'obésité, la stéatose hépatique et le diabète de type 2. L'action principale de l'insuline est de réguler le métabolisme du glucose et des lipides dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie, assurant ainsi la capture et l'utilisation coordonnée des produits de la digestion. Cependant, l'insuline agit dans la plupart des cellules, et son action dans les cellules β du pancréas et certaines régions du cerveau est également importante pour la régulation de l'homéostasie énergétique (Nandi *et al.*, 2004). Comme facteur de croissance, l'insuline stimule aussi la différenciation, la croissance et la survie cellulaire. Des études épidémiologiques récentes ont en effet mis en évidence une association entre le diabète de type 2 et plusieurs variétés de cancers, en liaison avec l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie (Taubes, 2012). Enfin, des études réalisées principalement chez le nématode *Cænorhabditis elegans* ont impliqué l'insuline dans la régulation de la longévité (Houtkooper *et al.*, 2010).

L'action de l'insuline est relayée par un récepteur à activité tyrosine kinase qui, en phosphorylant plusieurs substrats, déclenche l'activation de deux voies de signalisation majeures, les voies PI3K/Akt et Ras/ERK (Taniguchi *et al.*, 2006 ; Siddle, 2012). Ces voies régulent, par une cascade d'interactions moléculaires et de phosphorylations, l'activité et/ou l'expression de multiples cibles cellulaires. La signalisation de l'insuline est aussi régulée négativement par plusieurs mécanismes, notamment la déphosphorylation des composants de la signalisation par des protéine- et lipide-phosphatases, leur modification par phosphorylation et O-GlcNAcylation de résidus sérine, et leur association à des protéines inhibitrices.

Après une description des principaux mécanismes impliqués dans l'activation du récepteur et des voies de signalisation de l'insuline, cette revue se focalisera sur son contrôle par la protéine adaptatrice Grb14. Membre de la famille de protéines Grb7, Grb14 est un inhibiteur spécifique de la signalisation et de l'action de l'insuline (Daly, 1998 ; Holt & Siddle, 2005 ; Desbuquois *et al.*, 2013).

Signalisation de l'insuline

Le récepteur de l'insuline

Le récepteur de l'insuline appartient à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). À la différence des autres RTK, le récepteur de l'insuline est constitutivement dimérisé. Il est composé de deux sous-unités α extracellulaires, qui contiennent le domaine de liaison du ligand, et de deux sous-unités β transmembranaires, qui contiennent dans leur région cytoplasmique le domaine tyrosine kinase (Jensen & De Meyts, 2009). Cette particularité est partagée avec le récepteur de l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) avec lequel il présente une forte homologie de structure. Il a été suggéré que les deux gènes auraient évolué à partir de la duplication d'un gène ancestral, l'un se spécialisant dans les régulations métaboliques et l'autre dans la prolifération et la survie cellulaires (Belfiore *et al.*, 2009). Il existe deux isoformes du récepteur de l'insuline, différant par la présence (IR-B) ou l'absence (IR-A) de 12 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la sous-unité α, résultant de l'épissage alternatif de l'exon 11 du gène (Belfiore *et al.*, 2009). L'isoforme B est exprimée principalement dans les tissus cibles des effets métaboliques de l'insuline, alors que l'isoforme A est plus abondante dans le système nerveux central et les cellules hématopoïétiques (Belfiore *et al.*, 2009). Les deux isoformes lient l'insuline avec une affinité peu différente, mais l'isoforme A lie les IGF, et notamment IGF-2, avec une meilleure affinité que l'isoforme B (Belfiore *et al.*, 2009). Bien que dimérique, le récepteur ne lie qu'une seule molécule d'insuline avec haute affinité et la liaison est caractérisée par une coopérativité négative. Cette propriété a conduit à développer un modèle selon lequel l'insuline se comporte comme un ligand bivalent, ses deux domaines de liaison pontant de manière alternée deux sites de liaison partiels sur chaque sous-unité α (Jensen & De Meyts, 2009). Ce modèle a été validé par plusieurs approches (marquage par photoaffinité, mutagénèse dirigée et, plus récemment, cristallographie aux rayons X), et les deux domaines de liaison des sous-unités α ont été identifiés (Jensen & De Meyts, 2009).

À l'état basal, le récepteur de l'insuline est dans une conformation dite d'auto-inhibition, dans laquelle le site catalytique et le site de liaison de l'ATP de la

sous-unité β sont bloqués. La liaison de l'insuline, en modifiant la conformation du récepteur et en rapprochant les deux monomères β, induit l'activation du domaine catalytique et la transphosphorylation des trois résidus tyrosine de la boucle régulatrice (tyrosines 1158, 1162 et 1163), puis la phosphorylation des résidus tyrosine des régions juxtamembranaire (tyrosines 965 et 972) et carboxy-terminale (tyrosines 1328 et 1334) (Hubbard, 1997 ; De Meyts & Whittaker, 2002 ; Jensen & De Meyts, 2009).

Bien que la stimulation de l'activité kinase du récepteur soit requise pour la plupart des effets de l'insuline, des effets indépendants de cette activation ont été décrits. Il a notamment été montré qu'en l'absence de leur ligand les récepteurs de l'insuline et de l'IGF-1 ont un effet permissif sur l'apoptose, contrastant avec l'effet anti-apoptotique induit lorsqu'ils sont activés (Boucher *et al.*, 2010). Le mécanisme impliqué dans cet effet indépendant de l'activité kinase est inconnu.

Il a été récemment montré que l'activité catalytique du récepteur de l'insuline est régulée positivement par son interaction avec le glypican 4 (Gpc4), un protéoglycan membranaire impliqué dans la différenciation du tissu adipeux (Gesta *et al.*, 2006 ; Ussar *et al.*, 2012). Le Gpc4 appartient à une famille de protéoglycans ancrés à la membrane plasmique par un groupement GPI (glycosylphosphatidylinositol), qui agissent comme co-récepteurs pour plusieurs facteurs de croissance. En activant le récepteur et les voies de signalisation de l'insuline, le Gpc4 stimule la différenciation adipocytaire (Ussar *et al.*, 2012). De manière intéressante, le Gpc4 associé aux adipocytes est libéré dans la circulation sanguine, et son taux sérique est un marqueur de sensibilité à l'insuline et de l'indice de masse corporelle (Gesta *et al.*, 2006 ; Ussar *et al.*, 2012).

Substrats du récepteur de l'insuline

À la différence de la plupart des RTK, les récepteurs de l'insuline et de l'IGF1 ne s'associent pas directement aux protéines de signalisation mais à des protéines d'assemblage intermédiaires dépourvues d'activité enzymatique, qu'ils phosphorylent sur de nombreux résidus tyrosine. Les substrats de ces récepteurs les plus importants et les mieux caractérisés sont les protéines IRS et Shc (Taniguchi *et al.*, 2006 ; Siddle, 2012).

Les protéines IRS forment une famille de six membres (IRS-1 à 6), codés par des gènes différents. Les protéines IRS-1 et IRS-2, de distribution ubiquitaire, jouent un rôle primordial dans l'action de l'insuline. Ces protéines, de séquence relativement conservée, possèdent un domaine PH (*Pleckstrin Homology domain*) en position N-terminale, un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*) et de nombreux résidus tyrosine, sérine et thréonine dans leur région carboxy-terminale. La protéine IRS-2 possède également un domaine KRLB (*kinase regulatory loop binding*) qui interagit avec la boucle régulatrice du récepteur de l'insuline. La reconnaissance du domaine PH des IRS par les phospholipides membranaires induit leur association à la membrane plasmique et l'interaction de leur domaine PTB avec le résidu phosphotyrosine 972 (dans le motif NPXpY) du domaine juxtamembranaire du récepteur, puis leur phosphorylation sur les résidus tyrosine. Ces phosphotyrosines servent de motifs d'ancrage pour différentes protéines à domaines SH2 (*Src Homology 2*), principalement la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-K et l'adaptateur Grb2, mais aussi d'autres protéines telles que la tyrosine phosphatase SHP2 et la tyrosine kinase Fyn (Virkamaki *et al.*, 1999). Des études d'invalidation génique ont montré que les protéines IRS-1 et IRS-2 n'ont pas de rôle redondant, IRS-1 étant impliquée principalement dans la stimulation par l'insuline du transport du glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, et les deux protéines jouant un rôle complémentaire dans l'action de l'insuline sur le métabolisme dans le foie (Nandi *et al.*, 2004 ; Thirone *et al.*, 2006). Comme décrit plus loin, les protéines IRS sont phosphorylées sur de nombreux résidus sérine/thréonine en réponse à l'insuline et à d'autres stimuli et, selon les sites phosphorylés, leur fonction est stimulée ou inhibée.

Identifiées initialement comme des proto-oncogènes impliqués dans la signalisation de facteurs de croissance (Pelicci *et al.*, 1996), les protéines Shc sont les substrats de nombreux RTK. Elles forment une famille de quatre membres, codés par des gènes distincts. La forme la mieux caractérisée est la protéine ShcA, d'expression ubiquitaire et dont il existe plusieurs variants d'épissage (p66, p52 et p46) (Wills & Jones, 2012). Ces protéines sont constituées d'un domaine PTB N-terminal, d'une région effectrice centrale riche en résidus glycine et proline, et d'un domaine SH2 C-terminal. Comme les protéines IRS, ces protéines se lient par leur domaine PTB au résidu tyrosine 972 phosphorylé dans le domaine juxtamembranaire du récepteur de l'insuline. Leur phosphorylation sur des résidus tyrosine par le récepteur activé permet leur interaction avec le domaine SH2 de l'adaptateur Grb2. En raison de la compétition potentielle des protéines IRS et Shc pour se lier au récepteur de l'insuline (Gustafson *et al.*, 1995), leur recrutement relatif est probablement déterminé par leur niveau d'expression ou leur localisation subcellulaire.

Parmi les autres substrats du récepteur de l'insuline figurent les protéines des familles Gab, Dok, Crk et SH2B (Siddle, 2012). Formée de trois membres,

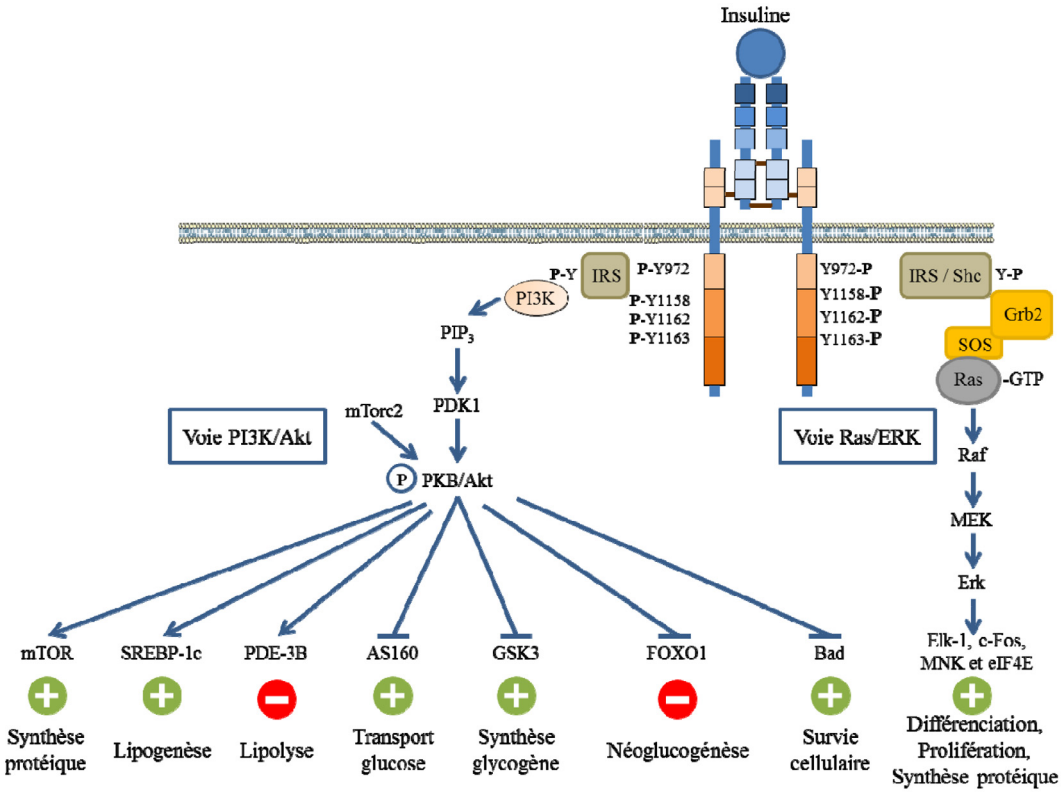

Fig. 1. Voies de signalisation de l'insuline et réponses cellulaires.
Grb : *Growth factor Receptor Bound*, IRS : *Insulin Receptor Substrate*, MEK : MAP Kinase Kinase, mTORC : *mammalian Target Of Rapamycin Complex* ; PDK1 : *Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1* ; PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase ; PIP3 : Phosphatidyl Inositol-3,4,5-triphosphate ; Shc : *Src Homology/ Collagen*, SOS : *Son Of Sevenless*.

la famille SH2B module l'activation de RTK et JAK (*Janus kinases*) par des facteurs de croissance et des cytokines (Siddle, 2012 ; Desbuquois *et al.*, 2013). Deux membres de cette famille, SH2B1 et SH2B2 (appelée aussi APS), s'associent par leur domaine SH2 à la boucle d'activation du récepteur de l'insuline. Dans des modèles cellulaires, SH2B1 et SH2B2 potentialisent l'activation du récepteur et des voies de signalisation de l'insuline, mais *in vivo* seule SH2B1 est impliquée dans une régulation positive de l'action de l'insuline et de l'homéostasie énergétique, notamment par son action au niveau du système nerveux central (Ren *et al.*, 2007 ; Desbuquois *et al.*, 2013).

Voie de signalisation PI3K/Akt

Les PI3K constituent une famille d'enzymes à activité lipide kinase qui catalysent la phosphorylation des phosphoinositides membranaires en position 3 du groupement inositol. Trois classes de PI3K (I, II et III) ont été identifiées (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Les PI3K impliquées dans les effets métaboliques de l'insuline appartiennent à la classe I, qui catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI-4,5-P_2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI-3,4,5-P_3). Ces PI3K sont des hétérodimères constitués d'une sous-unité catalytique de 110 kDa, dont il existe trois isoformes (α, β et δ) et d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa dont il existe cinq isoformes. Leur activation par l'insuline est induite par l'association du domaine SH2 de la sous-unité régulatrice aux phosphotyrosines des protéines IRS, et s'accompagne de leur redistribution du cytosol à la membrane plasmique. Agissant comme second messager, le PIP3 généré induit l'association des sérine kinases PDK1 (*Phosphoinositide Dependent Kinase 1*), Akt/PKB (*Protein Kinase B*) et aPKC (PKC atypiques) à la membrane plasmique par leur domaine PH, permettant ainsi leur activation.

La sérine/thréonine kinase Akt/PKB joue un rôle essentiel dans l'action de l'insuline sur le métabolisme, la croissance, la survie et la différenciation cellulaires (Manning & Cantley, 2007) (figure 1). Trois isoformes d'Akt (Akt1 ou PKBα, Akt2 ou PKBβ et Akt3 ou PKBγ), codées par des gènes distincts, ont

été identifiées chez les mammifères. Elles diffèrent par leur distribution tissulaire, leur localisation subcellulaire et leurs fonctions (Taniguchi *et al.*, 2006). Des études d'invalidation génique ont montré qu'Akt2 est impliquée dans les effets métaboliques de l'insuline, alors qu'Akt1 intervient dans la régulation de la croissance et de la longévité (Cho *et al.*, 2001a, 2001b). Après recrutement à la membrane plasmique par son domaine PH, Akt est activée par phosphorylation de deux résidus sérine, d'abord le résidu Ser473 dans son domaine régulateur hydrophobe, puis le résidu Thr308 dans son domaine catalytique. Ces phosphorylations sont catalysées, respectivement, par les sérine kinases mTORC2 (*mechanistic Target Of Rapamycin Complex 2*) et PDK1 (Alessi *et al.*, 1997 ; Sarbassov *et al.*, 2005). Après activation, Akt se dissocie de la membrane plasmique et phosphoryle différents substrats cytoplasmiques ou nucléaires impliqués dans l'action de l'insuline.

Voie de signalisation Ras/ERK

Cette voie met en jeu les MAPK, des sérine/thréonine kinases activées par un grand nombre de signaux extracellulaires. Son activation par l'insuline est déclenchée par l'interaction de l'adaptateur Grb2 avec les protéines Shc et IRS phosphorylées. L'association constitutive de Grb2 à Sos (*Son of Sevenless*), un facteur d'échange GDP/GTP, permet le recrutement de ces protéines à la membrane plasmique et l'activation de la GTPase Ras. Celle-ci déclenche, par une cascade de phosphorylations, l'activation successive des kinases Raf, MEK1/2 et ERK1/2 (figure 1). Les kinases ERK phosphorylent différentes cibles cellulaires, notamment la p90 kinase ribosomale S6 et le facteur de transcription ELK1. Cette voie est classiquement associée aux effets proliférateurs de l'insuline. Toutefois, les souris KO pour ERK1 montrent un défaut de différenciation des adipocytes et une résistance à l'obésité induite par un régime gras, suggérant que la voie Ras-ERK1 est également importante pour les effets métaboliques de l'insuline (Bost *et al.*, 2005).

Atténuation du signal de l'insuline

Internalisation du récepteur et dégradation de l'insuline

En même temps qu'elle active son récepteur, l'insuline induit son internalisation et son association aux endosomes. Après dissociation des complexes insuline-récepteur dans la lumière endosomale, l'insuline est dégradée, et les récepteurs sont déphosphorylés, inactivés et généralement en grande partie recyclés. L'essentiel de la dégradation de l'insuline (90 %) se fait au niveau du foie. Bien que ces processus représentent un mécanisme d'atténuation du signal insuline, les récepteurs associés aux endosomes restent transitoirement activés et phosphorylés, et capables de recruter et/ou d'activer des protéines de signalisation (Posner & Laporte, 2010). Plusieurs études ont montré que l'inhibition de l'internalisation du récepteur interfère avec la phosphorylation de la protéine Shc et l'activation de la voie Ras/ERK, mais n'affecte ni la phosphorylation d'IRS-1 ni l'activation de la voie PI3K/Akt (Jensen & De Meyts, 2009).

Interaction de protéines inhibitrices avec l'ectodomaine du récepteur de l'insuline

La liaison de l'insuline et l'activation de son récepteur peuvent être contrôlées par différentes protéines présentes dans le milieu extracellulaire ou dans la membrane des cellules qui s'associent à l'ectodomaine du récepteur de l'insuline.

La fétuine-A ou AHSG (α2-Heremans-Schmid glycoprotéine) est une glycoprotéine de 60 kDa produite par le foie. Elle est libérée dans la circulation sanguine en réponse à une élévation de la glycémie (Takata *et al.*, 2009) ou du taux des acides gras libres (Dasgupta *et al.*, 2010), et son taux plasmatique est augmenté chez des sujets atteints de diabète de type 2 et de cancer du foie (Stefan *et al.*, 2008 ; Aleksandrova *et al.*, 2014). *In vivo* et dans des modèles cellulaires, la fétuine-A inhibe l'autophosphorylation du récepteur, la phosphorylation d'IRS-1 et l'activation des voies PI3K/Akt et Ras/ERK en réponse à l'insuline (Srinivas *et al.*, 1993). Inversement, l'invalidation du gène de la fétuine A améliore la sensibilité à l'insuline et confère une résistance à l'obésité induite par un régime riche en lipides (Mathews *et al.*, 2002). L'effet inhibiteur de la fétuine-A sur l'autophosphorylation du récepteur est maintenu dans des cellules exprimant un récepteur constitutivement activé et dépourvu de sous-unité α, suggérant qu'elle se lie à la région extracellulaire de la sous-unité β, probablement aux deux domaines fibronectine de type 3 (Goustin & Abou-Samra, 2011).

La protéine PC-1 (*Plasma Cell membrane glycoprotein 1*) ou ENPP1 (EctoNucleotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase 1) est une protéine transmembranaire de classe II de distribution ubiquitaire (Goding *et al.*, 1998). Son expression dans les cellules cibles de l'insuline est augmentée chez les sujets insulino-résistants et diabétiques de type 2 (Goldfine *et al.*, 1998). Expérimentalement, la surexpression de la protéine PC-1 dans des cellules en culture inhibe l'autophosphorylation du récepteur et l'activation des voies de signalisation de l'insuline, et induit *in vivo* un état d'insulino-résistance (Goldfine *et al.*, 1998). La protéine PC-1 se lie au domaine connectif

de la sous-unité α, localisé dans la séquence 485-599 (Goldfine *et al.*, 1998 ; Maddux & Goldfine, 2000). Des études génétiques ont montré que l'allèle K121Q de la protéine PC-1, un meilleur inhibiteur de l'activité kinase du récepteur, est associé à l'insulinorésistance et au diabète de type 2 (Goldfine *et al.*, 1998 ; Maddux & Goldfine, 2000).

Déphosphorylation des protéines de signalisation par des phosphoprotéines phosphatases

La déphosphorylation du récepteur joue un rôle important dans la régulation négative du signal de l'insuline (Asante-Appiah & Kennedy, 2003). Bien que plusieurs phosphoprotéines tyrosine phosphatases (PTPα, PTPε, LAR, SHP2 et PTP-1B) aient été impliquées dans cette régulation, les données les plus convaincantes concernent la PTP1B, une enzyme exprimée dans les cellules cibles de l'insuline et localisée dans le réticulum endoplasmique. La surexpression de la PTP1B dans des cellules isolées (hépatocytes, adipocytes, cellules musculaires) inhibe la phosphorylation du récepteur de l'insuline et de la protéine IRS-1, l'activation des voies PI3K et ERK1/2, et la stimulation de la synthèse du glycogène et du transport du glucose (Egawa *et al.*, 2001). Inversement, l'invalidation du gène de la PTP1B améliore la sensibilité à l'insuline, augmente la phosphorylation du récepteur et d'IRS-1 induite par l'insuline dans le foie et le tissu adipeux, et confère une résistance à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Elchebly *et al.*, 1999). De même, la déplétion en PTP1B par des oligonucléotides anti-sens normalise la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline de souris diabétiques (Zinker *et al.*, 2002). Des études utilisant des phosphopeptides synthétiques et des mutants de la PTP1B dépourvus d'activité catalytique ont montré que la PTP1B s'associe à la boucle d'activation du récepteur et déphosphoryle ses trois résidus phosphotyrosines, avec une affinité maximale pour le tandem pTyr1162/pTyr1163 (Salmeen *et al.*, 2000). La technique de BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) a permis de montrer que l'insuline stimule rapidement l'interaction entre la PTP1B et le récepteur de l'insuline. De plus, dans des conditions basales, la phosphatase PTP1B peut également se lier au précurseur du récepteur de l'insuline dans le réticulum endoplasmique, prévenant ainsi une activité autonome du récepteur de l'insuline avant la fin de sa maturation (Boute *et al.*, 2003).

La déphosphorylation des protéines IRS et Shc, ainsi que de la sérine kinase Akt, représente un autre mécanisme de régulation négative de la signalisation. Deux sérine-thréonine phosphatases ont été impliquées dans la déphosphorylation d'Akt : la PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), qui déphosphoryle le résidu phosphothréonine 308, et les phosphatases PHLPP1/2 (*PH domain Leucine-rich Protein Phosphatase 1/2*) qui déphosphorylent le résidu phosphosérine 473 (Gao *et al.*, 2005 ; Brognard *et al.*, 2007). Les phosphatases PHLPP1/2 ont une certaine spécificité de substrat : PHLPP1 déphosphoryle Akt2 et Akt3, alors que PHLPP2 déphosphoryle spécifiquement Akt1 et Akt3 (Brognard *et al.*, 2007).

Phosphorylation des protéines de signalisation sur des résidus sérine/thréonine

En réponse à l'insuline, les protéines IRS sont phosphorylées sur de nombreux résidus sérine et thréonine par différentes sérine/thréonine kinases. Selon les sites phosphorylés et les kinases impliquées la signalisation en est affectée positivement ou négativement (Gual *et al.*, 2005 ; Boura-Halfon & Zick, 2009). Les sites jouant un rôle positif, tel que le résidu Ser302, sont phosphorylés les premiers, principalement par les kinases Akt et mTOR. Leur phosphorylation pourrait inhiber l'association des IRS à des tyrosine phosphatases. La phosphorylation des sites jouant un rôle négatif est plus tardive. Elle inhibe, selon la localisation, l'interaction des IRS avec le récepteur de l'insuline ou avec la sous-unité régulatrice de la PI3 kinase, et, en conséquence, la phosphorylation des IRS sur des résidus tyrosine et l'activation de la voie PI3K/Akt. Une autre conséquence de la phosphorylation de ces sites « inhibiteurs » est d'induire la dégradation des IRS dans le protéasome (Mothe & Van Obberghen, 1996 ; Greene *et al.*, 2003). De nombreuses sérine kinases sont impliquées, telles que la protéine kinase C atypique ζ, la p70-S6 kinase, mTOR, Erk1/2, JNK (Jun kinase), IKKβ (*inhibitor of nuclear factor κB kinase*), SIK-2 (*salt-inducible kinase 2*), GSK-3 et certaines PKC nouvelles. Certaines de ces kinases sont activées par l'insuline, qui exerce ainsi un rétrocontrôle sur son propre signal. Différents agents ou conditions associés à la résistance à l'insuline, tels que les cytokines proinflammatoires (TNFα et l'IL1β), les acides gras libres, l'angiotensine II, l'endothéline-1, et le stress cellulaire, stimulent la phosphorylation des sites inhibiteurs *via* l'activation de ces kinases. Ainsi, une augmentation de la phosphorylation des résidus Ser307/Ser612/Ser632 a été observée dans les états d'insulino-résistance chez l'Homme et l'animal (Boura-Halfon & Zick, 2009). Comme la protéine IRS-1, la protéine IRS-2 est phosphorylée sur des résidus sérine/thréonine (Sharfi & Eldar-Finkelman, 2008), mais les conséquences de ces phosphorylations ont été moins étudiées.

La phosphorylation du récepteur de l'insuline sur des résidus sérine/thréonine en réponse à l'insuline et à d'autres stimuli (esters de phorbol, analogues de l'AMPc) a aussi été impliquée dans une régulation

négative de la signalisation. *In vitro*, la phosphorylation de ces résidus inhibe celle des résidus tyrosine (Takayama *et al.*, 1988), et *in vivo* une augmentation de la teneur du récepteur en phosphosérine/phosphothréonine a été observée dans des états d'insulino-résistance humains et animaux (Shao *et al.*, 2000 ; Coba *et al.*, 2004). La phosphorylation des sérines 994 et 1023/1025, cibles de la PKC, a été impliquée dans l'inhibition de l'activité kinase du récepteur (Strack *et al.*, 2000).

Association de protéines adaptatrices inhibitrices au récepteur de l'insuline et à ses substrats

Deux familles d'adaptateurs moléculaires, les familles SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) et Grb7/10/14, interviennent dans une régulation négative de la signalisation insulinique.

Décrites initialement comme des inhibiteurs de la voie de signalisation JAK-STAT et de l'action des cytokines, les protéines SOCS inhibent d'autres voies de signalisation, notamment celles activées par l'insuline. Parmi les huit membres de cette famille, SOCS1 et SOCS3 ont été particulièrement étudiés dans le contexte cette régulation (Lebrun & Van Obberghen, 2008). Surexprimées dans le foie, ces protéines inhibent la phosphorylation et l'expression des protéines IRS, atténuent leur association à la PI3 kinase, et induisent un état d'insulino-résistance et de stéatose hépatique. Leur surexpression dans les adipocytes produit des effets comparables. Réciproquement, leur déplétion par des oligonucléotides anti-sens améliore la sensibilité à l'insuline de souris génétiquement obèses. Les protéines SOCS inhibent le signal insuline par trois mécanismes principaux : (i) en se liant à la boucle d'activation du récepteur de l'insuline, inhibant ainsi son activité catalytique (Mooney *et al.*, 2001 ; Ueki *et al.*, 2004) ; (ii) en se liant au résidu pTyr972 dans le domaine juxtamembranaire du récepteur, inhibant sa capacité à recruter et phosphoryler les protéines IRS et Shc (Emanuelli *et al.*, 2000 ; Ueki *et al.*, 2004) ; et (iii) en se liant aux protéines IRS, entraînant leur dégradation protéosomale *via* leur ubiquitination (Rui *et al.*, 2002). De manière intéressante, les protéines SOCS sont induites par différentes hormones, cytokines et facteurs de croissance, et leur taux d'expression dans les cellules cibles de l'insuline est augmenté chez des diabétiques de type 2 et dans des modèles animaux d'insulino-résistance (Lebrun & Van Obberghen, 2008).

Décrites initialement comme des régulateurs de la signalisation de récepteurs aux facteurs de croissance (Daly, 1998), les protéines de la famille Grb7 se lient au récepteur de l'insuline activé, mais seules deux d'entre elles, Grb10 et Grb14, sont physiologiquement impliquées dans la régulation de l'action de l'insuline et de l'IGF-1 (Holt & Siddle, 2005 ; Desbuquois *et al.*, 2013). Notre groupe a réalisé le clonage de la protéine Grb14 de rat et étudié en détail son expression et son mécanisme d'action dans des modèles cellulaires et animaux.

Grb14, un inhibiteur de la signalisation de l'insuline

Des analyses génétiques dans diverses populations humaines ont montré que des SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) du gène codant Grb14 étaient associés au diabète de type 2, à une augmentation de la glycémie et de l'insuline plasmatique à jeun, à une diminution de la sensibilité à l'insuline et à une modification de la répartition du tissu adipeux (Heid *et al.*, 2010 ; Kooner *et al.*, 2011 ; Manning *et al.*, 2012 ; Morris *et al.*, 2012 ; Scott *et al.*, 2012 ; Harder *et al.*, 2013). Par ailleurs, une corrélation inverse entre l'expression cellulaire de la protéine Grb14 et la sensibilité à l'insuline a été mise en évidence chez l'homme et dans des modèles animaux d'insulino-résistance. Grb14 est augmentée dans le tissu adipeux de sujets diabétiques de type 2 et dans le muscle squelettique de patients obèses et insulino-résistants (Cariou *et al.*, 2004b ; Park *et al.*, 2006). Chez les patients obèses, la réduction de poids induite par un *by-pass* gastrique s'accompagne d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et d'une diminution de l'expression de Grb14 dans le muscle (Park *et al.*, 2006). De même, on observe une augmentation de l'expression de Grb14 dans le tissu adipeux de rongeurs génétiquement obèses et insulino-résistants (souris ob/ob, rats GK), atténuée par un traitement insulino-sensibilisateur (Metformine ou Thiazolidinediones) (Cariou *et al.*, 2004b).

Structure de Grb14

Comme les protéines Grb7 et Grb10 avec lesquelles elle partage une forte homologie de séquence, la protéine Grb14 est constituée d'une succession de domaines d'interaction protéine-protéine et protéine-lipide et est dépourvue d'activité catalytique (Cariou *et al.*, 2004a ; Desbuquois *et al.*, 2013) (figure 2). La région N-terminale, la moins conservée, possède un motif PS/AIPNPFPEL riche en prolines, impliqué dans l'interaction de Grb14 avec des protéines à domaine SH3 (Browaeys-Poly *et al.*, 2010). Dans la région centrale se trouvent un domaine RA (*Ras-Associating like*), qui permet l'association avec des petites protéines G (GTPases) activées par l'insuline (Depetris *et al.*, 2009), et un domaine PH (*Pleckstrin Homology*), qui reconnaît les phosphoinositides membranaires, plus particulièrement ceux phosphorylés en position D2 et D3

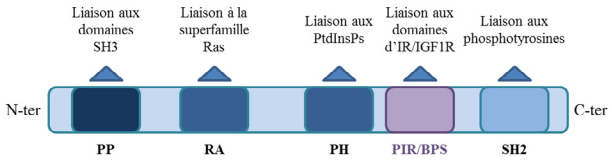

Fig. 2. Structure des protéines de la famille Grb7.
PP : *Proline rich region* ; RA : *Ras-Associating* ; PH : *Pleckstrin Homology* ; PIR ou BPS : *Phosphorylated insulin receptor-Interacting Region* ou *Between PH and SH2* ; SH2 : *Src Homology 2*.

de l'inositol. L'analyse par cristallographie de la structure des domaines RA et PH de Grb14 a montré que ces deux domaines forment une unité structurale assemblée en dimère, qui joue un rôle majeur dans la liaison de Grb14 à la GTPase Ras et l'inhibition par Grb14 de la signalisation de l'insuline (Depetris *et al.*, 2009 ; Qamra & Hubbard, 2013). Le domaine PH induit le recrutement de Grb14 à la membrane plasmique et positionne favorablement le domaine RA pour sa liaison aux GTPases. Dans la partie C-terminale se trouvent un domaine appelé BPS (*Between PH and SH2*) ou PIR (*Phosphorylated insulin receptor Interacting Region*) et un domaine SH2, tous les deux impliqués dans l'interaction avec les RTK. Le domaine BPS/PIR, unique à la famille des adaptateurs Grb7, est particulièrement important pour l'interaction de Grb14 avec le récepteur de l'insuline. Non structuré lorsqu'il est en solution (Moncoq *et al.*, 2003), ce domaine acquiert une structure tridimensionnelle lorsqu'il interagit avec le récepteur de l'insuline (Depetris *et al.*, 2005) (figure 3).

Une dimérisation de la protéine Grb14, stimulée par l'insuline, a été mise en évidence dans des cellules intactes par les techniques de BRET et d'immunoprécipitation (Nouaille *et al.*, 2006a). Les domaines RA, PH et SH2 sont impliqués dans cette dimérisation. Bien que la plupart des domaines SH2 soient monomériques, les domaines SH2 des protéines de la famille Grb7/10/14 forment des homodimères en solution (Stein *et al.*, 2003 ; Depetris *et al.*, 2005).

Partenaires de Grb14

En vertu de ses propriétés d'adaptateur moléculaire, Grb14 s'associe à de nombreux partenaires. Le récepteur de l'insuline a été l'un des premiers partenaires identifiés (Kasus-Jacobi *et al.*, 1998), mais par son domaine SH2 Grb14 interagit avec d'autres RTK, notamment le FGFR (Reilly *et al.*, 2000 ; Cailliau *et al.*, 2003), Tie2 (Jones *et al.*, 1999) et Ret (Balogh *et al.*, 2012). Les conséquences de ces interactions varient selon les récepteurs partenaires. Grb14 inhibe la signalisation du FGFR, mais par

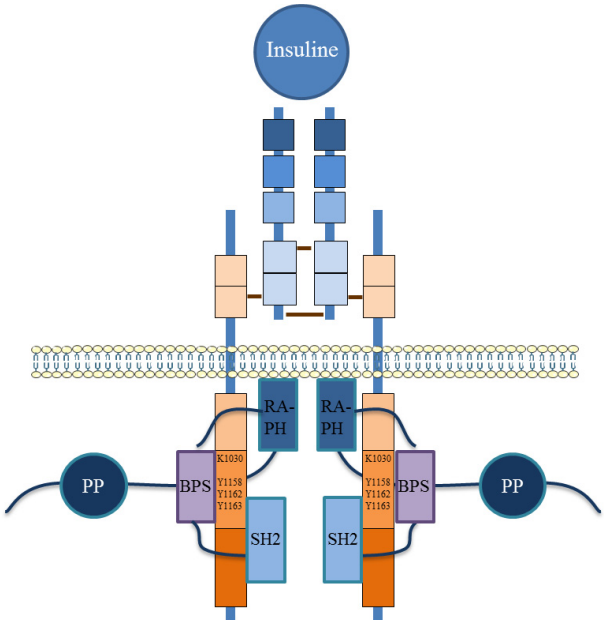

Fig. 3. Interaction entre le récepteur de l'insuline et l'adaptateur Grb14
La protéine Grb14 se fixe sur le récepteur de l'insuline activé (pY1158, pY1162, pY1163) *via* son domaine BPS (violet) et agit alors comme un pseudosubstrat inhibiteur de l'activité catalytique du récepteur. Représentation schématique (d'après Desbuquois *et al.*, 2013).
BPS : *Between PH and SH2* ; PH : *Pleckstrin Homology* ; PP : Poly Proline ; RA : *Ras Associated* ; SH2 : *Src Homology 2*.

un mécanisme moléculaire différent de celui impliqué dans l'inhibition de la signalisation du IR (Cailliau *et al.*, 2003 ; Browaeys-Poly *et al.*, 2010). En revanche, Grb14 améliore la signalisation du récepteur Ret dans des cellules issues de cancer thyroïdien, stimulant leur prolifération (Balogh *et al.*, 2012). Grb14 s'associe aussi à différentes protéines cytoplasmiques impliquées dans la signalisation de l'insuline, notamment la protéine d'assemblage IRS-1, l'adaptateur p62/ZIP, la sérine kinase PDK1 et la tyrosine phosphatase PTP1B. Les conséquences de ces interactions sur la signalisation de l'insuline sont décrites plus loin.

Dynamique d'interaction de Grb14 avec le récepteur de l'insuline

L'interaction de Grb14 avec le récepteur de l'insuline en réponse à son activation a été étudiée par co-immunoprécipitation et BRET dans des cellules surexprimant ces deux protéines, dans la lignée adipocytaire 3T3L1 et dans le foie de rat *in vivo* (Kasus-Jacobi *et al.*, 1998 ; Nouaille *et al.*, 2006a ; Desbuquois *et al.*, 2008).

Cette interaction est temps- et dose-dépendante, et se maintient tant que le récepteur reste activé et phosphorylé. Dans le foie de rat prélevé après une injection intra-veineuse d'insuline, Grb14 s'associe au récepteur activé d'abord dans la membrane plasmique puis dans les endosomes, suggérant une co-internalisation des deux protéines ou le recrutement de Grb14 cytosolique par le récepteur internalisé (Desbuquois *et al.*, 2008). Cependant, une proportion mineure de Grb14 (3 % du total) s'associe à ces compartiments membranaires, la majeure partie se distribuant entre la fraction microsomale et le cytosol.

Déterminants moléculaires de l'association de Grb14 au récepteur de l'insuline

L'analyse cristallographique du domaine BPS de Grb14 en complexe avec le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline et de son domaine SH2 a permis de préciser les modalités d'association du module BPS-SH2 au récepteur (Depetris *et al.*, 2005). Il a été montré qu'un court motif de 9 acides aminés du domaine BPS de Grb14 s'associe au site de liaison du substrat dans le récepteur, se comportant ainsi comme un pseudo-substrat inhibiteur de l'activité catalytique (Depetris *et al.*, 2005). Le domaine BPS de Grb14 forme alors deux feuillets β et une hélice α qui présentent une conformation complémentaire du site actif du récepteur. Par ailleurs, parmi les trois phosphotyrosines de la boucle d'activation du récepteur, deux (pTyr1158 et pTyr1162) s'associent au domaine SH2 de Grb14, et une (pTyr1163) à son domaine BPS.

Des études de mutagénèse dirigée ont confirmé l'importance de ces phosphotyrosines pour l'association du module BPS-SH2 de Grb14 au récepteur, et identifié dans chacun des partenaires plusieurs résidus impliqués dans leur interaction (Depetris *et al.*, 2005, 2009 ; Goenaga *et al.*, 2009). Deux interactions particulièrement importantes impliquent l'une les résidus Leu1038 de l'hélice αC du récepteur et Leu404 du domaine BPS de Grb14, et l'autre les résidus Lys1168 de la boucle d'activation du récepteur et Arg387 du domaine BPS de Grb14. De manière intéressante, les résidus 1038 du récepteur de l'insuline et Leu404 de Grb14 ne sont pas conservés respectivement dans le récepteur de l'IGF1 et les protéines Grb7/10, suggérant que leur interaction pourrait expliquer la spécificité de l'effet inhibiteur de Grb14 sur le récepteur de l'insuline. Également importants pour l'interaction de Grb14 avec le récepteur de l'insuline sont la sérine 370 dans le domaine BPS (Goenaga *et al.*, 2009) et les lysines 140 et 252 dans les domaines RA et PH (Depetris *et al.*, 2009). Ainsi, l'ensemble des domaines conservés de Grb14, à l'exclusion de la partie N-terminale, est impliqué dans son association au récepteur (Depetris *et al.*, 2005, 2009 ; Qamra & Hubbard, 2013) (figure 3).

Effets de Grb14 sur la signalisation de l'insuline *in vitro* et dans des modèles cellulaires

Des expériences réalisées *in vitro* avec des protéines purifiées ont montré que les protéines de la famille Grb7 inhibent l'activité catalytique du récepteur de l'insuline de manière dose-dépendante, Grb14 exerçant l'effet le plus marqué (Grb14 >Grb10 >Gb7). De plus, le récepteur de l'insuline est plus sensible à l'effet inhibiteur de Grb14 que le récepteur de l'IGF-1 (Stein *et al.*, 2001 ; Béréziat *et al.*, 2002). Ces différences sont probablement liées à des capacités différentes de ces protéines à s'associer à leurs partenaires, en relation avec des caractéristiques structurales différentes (Depetris *et al.*, 2005, 2009). En accord avec ces observations, la surexpression de Grb14 dans divers modèles cellulaires entraîne une inhibition de la phosphorylation des protéines IRS-1 et Shc en réponse à l'insuline, de l'activation des voies de signalisation PI3K et Erk1/2 et de la synthèse de glycogène, sans modification de la phosphorylation du récepteur (Kasus-Jacobi *et al.*, 1998 ; Hemming *et al.*, 2001 ; Béréziat *et al.*, 2002) (figure 4).

L'inhibition par ARN interférence de l'expression de la protéine Grb14 dans des hépatocytes de souris en culture primaire augmente la capacité de l'insuline à stimuler la phosphorylation des kinases Akt, ERK1/2 et GSK3 et du facteur de transcription FOXO1, et plus en aval à inhiber la production de glucose (Carré *et al.*, 2008). Cependant, de manière inattendue, bien que potentialisant l'activation par l'insuline de la voie de signalisation PI3K/Akt, la déplétion à court terme de Grb14 bloque l'induction par l'insuline de la maturation du facteur de transcription SREBP-1c, et par voie de conséquence la stimulation de la synthèse du glycogène et de l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogénèse. Ainsi, Grb14 exerce deux effets sur la signalisation de l'insuline dans les hépatocytes : l'un négatif, proximal, lié à son interaction avec le récepteur, et l'autre, positif, distal, dans le processus de maturation et/ou de l'expression de SREBP-1c. La résistance hépatique à l'insuline est caractérisée par une diminution de sa capacité à inhiber la production de glucose, alors que, paradoxalement, son effet sur la voie de la lipogénèse est préservé, voire exacerbé (Brown & Goldstein, 2008). En effet, 80 à 90 % des patients obèses ou diabétiques de type 2 présentent une stéatose hépatique. On parle d'une résistance sélective à l'insuline au niveau du foie, dont les mécanismes moléculaires sont encore mal connus. Les conséquences de la déplétion de Grb14 dans les hépatocytes suggèrent que, dans des situations d'insulino-résistance, l'inhibition de l'expression

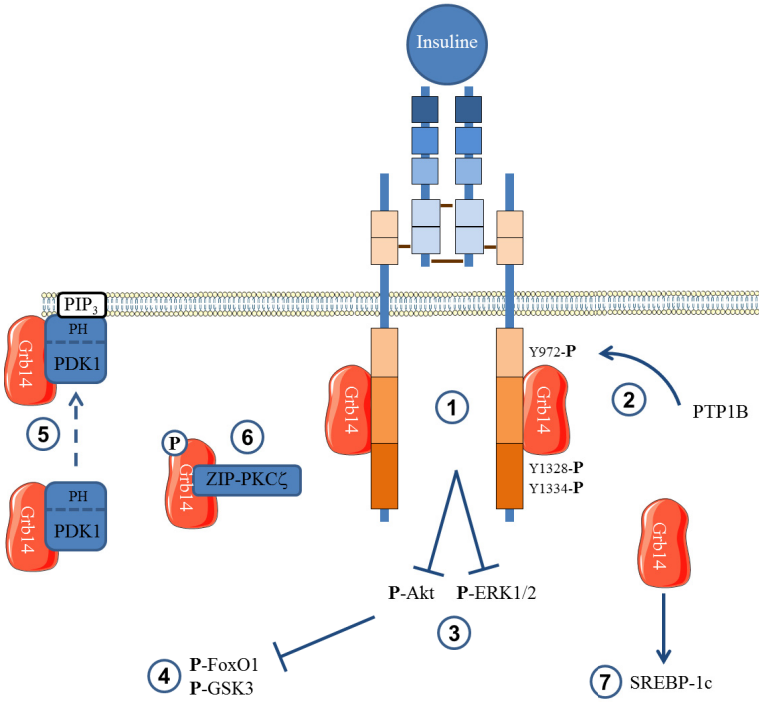

Fig. 4. Modulation de la signalisation de l'insuline par Grb14.
Grb14 inhibe l'activité catalytique du récepteur de l'insuline (1). Grb14 favorise la déphosphorylation du résidu tyrosine 972 par la protéine PTP1B ce qui inhibe la liaison des protéines substrats du récepteur de l'insuline (2). En conséquence on observe une inhibition des voies PI3K/Akt et Ras/Erk (3) et donc une inhibition des phosphorylations sur sérine des substrats d'Akt (4). Grb14 interagit avec PDK1 et semble nécessaire à sa translocation à la membrane plasmique (5). Cette interaction augmente également l'effet inhibiteur de Grb14 sur la signalisation de l'insuline. Grb14 est phosphorylée par la PKCζ, ce qui augmente son effet inhibiteur sur le récepteur de l'insuline (6). Enfin Grb14 stimule indirectement l'activation de SREBP-1c par l'insuline (7).
FOXO1 : *Forkhead box O1* ; Grb : *Growth factor receptor bound* ; GSK3 *: Glycogen Synthase Kinase 3* ; PDK1 : *Phosphatidylinositol Dependent Kinase 1* ; PH : *Pleckstrin Homology* ; PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ; PKCζ : *Protein kinase C zeta* ; PTP1B : *Protein Tyrosine Phosphatase 1B* ; SREBP-1c : *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c*, ZIP : *PKC Zeta Interacting Protein.*

de la protéine Grb14 dans le foie pourrait permettre à la fois d'améliorer l'effet de l'insuline sur la production hépatique de glucose, et donc d'abaisser la glycémie, et d'inhiber son effet sur la lipogénèse, et ainsi de diminuer la stéatose hépatique. Grb14 apparaît donc comme un nouvel acteur important de la sélectivité de la résistance à l'insuline hépatique, et représente une cible potentielle pour améliorer la sensibilité à l'insuline et le métabolisme énergétique dans le foie.

Conséquences de l'invalidation du gène Grb14

L'invalidation globale du gène Grb14 chez la souris a mis en évidence l'implication physiologique de cette protéine dans le maintien de l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline *in vivo* (Cooney *et al.*, 2004). Les souris Grb14 KO ne présentent pas d'altérations du développement embryonnaire et ont une fertilité normale. Leur courbe de croissance révèle une diminution d'environ 5 % de leur masse corporelle lorsqu'elles sont âgées, et ce, sans modification de la prise alimentaire. L'étude comparative des poids des différents organes montre une diminution relative du poids du foie et de la rate chez des mâles âgés de 28 semaines par rapport aux souris témoins. À partir de 16 semaines, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sont améliorées. Cela s'accompagne d'une augmentation de l'effet de l'insuline sur la synthèse de glycogène dans le foie et le muscle, ainsi que d'une augmentation de la stimulation par l'insuline du transport de glucose dans le muscle, mais pas dans le tissu adipeux. L'expression du récepteur de l'insuline n'est pas altérée, mais il y a des modifications tissu-spécifiques des voies de signalisation de l'insuline. En effet, on observe une augmentation de la phosphorylation d'IRS-1, du recrutement de la PI3-K et de l'activation d'Akt dans le foie et dans le muscle, mais

pas dans le tissu adipeux. Simultanément, la phosphorylation du récepteur de l'insuline n'est pas modifiée dans le muscle, alors qu'elle est très fortement inhibée dans le foie. On assiste donc dans le foie à une situation apparemment paradoxale, où le récepteur est moins phosphorylé alors que la sensibilité à l'insuline de la voie IRS/PI3K/Akt et les effets distaux de l'insuline sont améliorés. Les souris Grb14 KO présentent également une cardiomyopathie, une détérioration de la fonction cardiaque, et une plus grande sensibilité à l'apparition d'infarctus du myocarde. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans le foie et le muscle squelettique, la phosphorylation d'Akt est diminuée dans le cœur de ces souris (Lin *et al.*, 2010). Une autre conséquence de l'invalidation de Grb14 est de bloquer l'activation par la lumière du récepteur de l'insuline associé aux cellules photoréceptrices de la rétine (Rajala *et al.*, 2009). Le rôle physiologique de Grb14 est donc complexe, il dépend du tissu considéré et n'est probablement pas limité à l'inhibition de la sensibilité à l'insuline. Il est important de souligner que la réalisation d'une invalidation globale de Grb14 à un stade précoce du développement permet à des mécanismes d'adaptation de se mettre en place, et ceci peut rendre compte des conséquences différentes à court terme et à long terme de sa déplétion. Le développement dans le futur de modèles d'invalidation inductible et ciblée de Grb14 devrait permettre d'apporter des informations plus précises sur le rôle de Grb14 dans les différents tissus qui expriment cette protéine.

Comme la protéine Grb14, la protéine Grb10 affecte négativement la signalisation de l'insuline. L'invalidation simultanée de ces deux protéines ne s'accompagne pas d'un effet additif sur la signalisation, impliquant qu'elles affectent de manière similaire la partie proximale de la signalisation. Cependant, contrairement à ce qui est observé après invalidation simple, cette double invalidation protège les souris de l'intolérance au glucose induite par un régime hyperlipidique, suggérant des effets non redondants sur la régulation de l'homéostasie du glucose (Holt *et al.*, 2009).

Interrelations entre deux inhibiteurs du récepteur de l'insuline : Grb14 et la protéine tyrosine phosphatase PTP1B

PTP1B se lie au niveau de la boucle kinase du récepteur (Li *et al.*, 2005), à proximité du site de liaison de Grb14, suggérant que ces deux protéines pourraient entrer en compétition pour le recrutement sur le récepteur. L'utilisation de la technique de BRET, qui permet de mettre en évidence des modifications d'interaction protéine-protéine, a montré que la co-expression de la protéine Grb14 diminue le signal de BRET mesuré entre le récepteur de l'insuline et PTP1B, suggérant une modification de l'interaction entre PTP1B et le récepteur lorsque Grb14 est présente. L'utilisation d'anticorps phosphospécifiques dirigés contre les différents résidus tyrosine phosphorylés du récepteur a permis de montrer que la présence de Grb14 protège les trois tyrosines de la boucle catalytique régulatrice du domaine kinase de la déphosphorylation par PTP1B, mais favorise la déphosphorylation de la tyrosine 972 située dans le domaine juxtamembranaire (figure 4). Ce résidu Y972 est le site de liaison des substrats du récepteur, les protéines Shc et IRS. L'augmentation de sa déphosphorylation en présence de Grb14 s'accompagne d'une diminution de l'interaction entre récepteur et IRS-1 ainsi que de la phosphorylation sur tyrosine d'IRS-1, et d'une diminution de l'activation des voies de signalisation en aval, telles que Akt et ERK1/2 (Nouaille *et al.*, 2006a, 2006b). Ces expériences suggèrent que l'interaction de Grb14 avec le récepteur de l'insuline inhibe l'activité du récepteur par deux mécanismes complémentaires, une inhibition directe de l'activité catalytique *via* la liaison d'un motif du domaine BPS/PIR comme pseudo-substrat au niveau du site catalytique, et *via* la redirection de l'activité de PTP1B vers le résidu Y972 juxtamembranaire. Ces observations expliquent le phénotype paradoxal du récepteur de l'insuline du foie de souris Grb14 KO (Cooney *et al.*, 2004), qui est plus actif, par suite de l'absence de l'effet inhibiteur de Grb14, mais qui est moins phosphorylé que dans les foies témoins car PTP1B peut accéder plus facilement à sa cible. Il semble donc qu'il n'y ait pas de corrélation directe entre le niveau de phosphorylation du récepteur de l'insuline et son activité catalytique, et que ces paramètres soient dépendants de l'expression relative des protéines PTP1B et Grb14 dans le tissu considéré.

Grb14 est également exprimée dans la rétine, où elle contrôle l'activation du récepteur de l'insuline en réponse à la lumière. L'interaction de Grb14 avec PTP1B, qui requiert la phosphorylation de la tyrosine 347 dans son domaine BPS, inhibe l'activité de la phosphatase, protégeant ainsi le récepteur de la déphosphorylation (Rajala *et al.*, 2009 ; Basavarajappa *et al.*, 2011).

Effets de Grb14 sur la signalisation de l'insuline non relayés par son association au récepteur

Certains effets de la surexpression de Grb14 dans des modèles cellulaires semblent être liés à son interaction avec des protéines cytoplasmiques impliquées dans la signalisation de l'insuline, en particulier l'adaptateur p62/ZIP (Cariou *et al.*, 2002) et la sérine kinase PDK1

(King & Newton, 2004) (figure 4). En relayant l'association de Grb14 à la PKCζ, l'interaction de Grb14 à l'adaptateur p62/ZIP a pour conséquence de stimuler la phosphorylation de Grb14 sur des résidus sérine, laquelle potentialise son effet inhibiteur sur la signalisation de l'insuline. L'interaction de Grb14 avec la kinase PDK1 a été impliquée dans plusieurs effets de Grb14 sur la signalisation de l'insuline, les uns positifs et d'autres négatifs. À partir d'expériences utilisant un mutant de Grb14 se liant normalement au récepteur mais incapable de se lier à la PDK1, il a été montré que l'interaction de Grb14 avec la PDK1 facilitait le recrutement de la PDK1 à la membrane et l'activation d'Akt en réponse à l'insuline dans des cellules HEK (King & Newton, 2004). Toutefois, cette interaction est également impliquée dans la capacité de Grb14 à inhiber l'action de l'insuline dans des ovocytes de xénope et des fibroblastes embryonnaires de souris (Goenaga *et al.*, 2009). Ces effets opposés de Grb14 dans des modèles cellulaires différents doivent être clarifiés.

Comme mentionné précédemment, les conséquences de l'invalidation à court terme de Grb14 dans les hépatocytes sur la synthèse du glycogène et l'expression des gènes de la glycolyse et de la lipogénèse suggèrent un site distal d'action de Grb14, en aval d'Akt mais en amont de SREBP-1c. Le ou les partenaire(s) impliqué(s) dans cette interaction reste(nt) à être identifié(s).

Conclusions

La prévalence des maladies métaboliques que sont l'obésité, le diabète de type 2 et le syndrome métabolique est en croissance quasi épidémique dans les pays industrialisés depuis plusieurs décennies, et ce phénomène atteint maintenant de façon aiguë les pays émergents et les pays en voie de développement. Ces pathologies sont étroitement associées à une insulino-résistance, qui se traduit dans un premier temps par une augmentation de la sécrétion d'insuline afin de maintenir l'homéostasie glucidique. De façon intéressante, des études épidémiologiques mettent en évidence une augmentation de la prévalence de certains cancers dans les populations atteintes d'obésité ou de diabète de type 2, suggérant une implication potentielle de l'hyperinsulinémie associée à l'insulino-résistance (Calle & Kaaks, 2004). Une meilleure connaissance des protéines effectrices impliquées dans l'ensemble des voies de signalisation activées par l'insuline et de leur implication dans le métabolisme et la croissance cellulaires est donc une étape préalable nécessaire à l'identification de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de ces pathologies. À cet égard, la protéine Grb14 est particulièrement intéressante. En effet, les analyses fonctionnelles et structurales montrent que Grb14 est un inhibiteur spécifique de l'activité catalytique du récepteur de l'insuline. En corrélation avec les études réalisées dans les modèles cellulaires et murins, les données génétiques obtenues chez l'Homme sont également en faveur d'un effet délétère de Grb14 sur la sensibilité et l'action de l'insuline. Il semble cependant que le mécanisme d'action de Grb14 ne soit pas restreint à son rôle d'inhibiteur de l'activité catalytique du récepteur de l'insuline. En effet, Grb14 semble avoir une action protectrice sur la fonction cardiaque (Lin *et al.*, 2010) et une action duelle sur la régulation du métabolisme énergétique dans le foie (Carré *et al.*, 2008). Ces effets sont attribuables à l'interaction de Grb14 avec d'autres partenaires, contribuant ainsi à la régulation de l'action de l'insuline mais aussi de la prolifération cellulaire (Goenaga *et al.*, 2009). De façon surprenante, il a été récemment montré que, dans un modèle murin de tumorigenèse associé à la présence d'un mutant ponctuel du récepteur du FGF, il existait une augmentation de l'expression de Grb14 dans les îlots pancréatiques, induisant une stimulation de la sécrétion d'insuline (Ezzat *et al.*, 2013). Cette étude suggère que l'augmentation du risque de cancer associé au FGFR mutant pourrait être dépendante de l'augmentation des concentrations circulantes d'insuline, faisant ainsi un lien entre diabète et cancer (Gallagher & LeRoith, 2013). La régulation de la sensibilité à l'insuline par Grb14 semble donc extrêmement complexe, faisant intervenir entre les différents tissus des interrelations subtiles qui demandent à être élucidées.

Références

Aleksandrova K., Boeing H., Nothlings U., Jenab M., Fedirko V., Kaaks R., Lukanova A., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Boffetta P., Trepo E., Westhpal S., Duarte-Salles T., Stepien M., Overvad K., Tjønneland A., Halkjaer J., Boutron-Ruault M.C., Dossus L., Racine A., Lagiou P., Bamia C., Benetou V., Agnoli C., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-de-Mesquita B., Peeters P.H., Gram I.T., Lund E., Weiderpass E., Quirós J.R., Agudo A., Sánchez M.J., Gavrila D., Barricarte A., Dorronsoro M., Ohlsson B., Lindkvist B., Johansson A., Sund M., Khaw K.T., Wareham N., Travis R.C., Riboli E., Pischon T., Inflammatory and metabolic biomarkers and risk of liver and bilary tract cancer. *Hepatology,* 2014 (sous presse)

Alessi D.R., James S.R., Downes C.P., Holmes A.B., Gaffney P.R., Reese C.B., Cohen P., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol*, 1997, 7, 261–269.

Asante-Appiah E., Kennedy B.P., Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin

action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284, E663–E670.

Balogh K., Asa S., Zheng L., Cassol C., Cheng S., Ezzat S., The insulin resistance Grb14 adaptor protein promotes thyroid cancer ret signaling and progression. *Oncogene*, 2012, 31, 4012–4021.

Basavarajappa D.K., Gupta V.K., Dighe R., Rajala A., Rajala R.V., Phosphorylated Grb14 is an endogenous inhibitor of retinal protein tyrosine phosphatase 1B, and light-dependent activation of Src phosphorylates Grb14. *Mol Cell Biol*, 2011, 31, 3975–3987.

Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R., Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*, 2009, 30, 586–623.

Béréziat V., Kasus-Jacobi A., Perdereau D., Cariou B., Girard J., Burnol A.F., Inhibition of insulin receptor catalytic activity by the molecular adapter Grb14. *J Biol Chem*, 2002, 277, 4845–4852.

Bost F., Aouadi M., Caron L., Even P., Belmonte N., Prot M., Dani C., Hofman P., Pagès G., Pouysségur J., Le Marchand-Brustel Y., Binétruy B., The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for *in vitro* and *in vivo* adipogenesis. *Diabetes*, 2005, 54, 402–411.

Boucher J., Macotela Y., Bézy O., Mori M.A., Kriauciunas K., Kahn C.R., A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal*, 2010, 3, ra87.

Boura-Halfon S., Zick Y., Serine kinases of insulin receptor substrate proteins. *Vitam Horm*, 2009, 80, 313–349.

Boute N., Boubekeur S., Lacasa D., Issad T., Dynamics of the interaction between the insulin receptor and protein tyrosine-phosphatase 1B in living cells. *EMBO Rep*, 2003, 4, 313–319.

Brognard J., Sierecki E., Gao T., Newton A.C., PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*, 2007, 25, 917–931.

Browaeys-Poly E., Blanquart C., Perdereau D., Antoine A.F., Goenaga D., Luzy J.P., Chen H., Garbay C., Issad T., Cailliau K., Burnol A.F., Grb14 inhibits FGF receptor signaling through the regulation of PLC gamma recruitment and activation. *FEBS Lett*, 2010, 584, 4383–4388.

Brown M.S., Goldstein J.L., Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*, 2008, 7, 95–96.

Cailliau K., Le Marcis V., Béréziat V., Perdereau D., Cariou B., Vilain J.P., Burnol A.F., Browaeys-Poly E., Inhibition of FGF receptor signalling in Xenopus oocytes: differential effect of Grb7, Grb10 and Grb14. *FEBS Lett,* 2003, 548, 43–48.

Calle E.E., Kaaks R., Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4, 579–591.

Cariou B., Béréziat V., Moncoq K., Kasus-Jacobi A., Perdereau D., Le Marcis V., Burnol A.F., Regulation and functional roles of Grb14. *Front Biosci*, 2004a, 9, 1626–1636.

Cariou B., Capitaine N., Le Marcis V., Véga N., Béréziat V., Kergoat M., Laville M., Girard J., Vidal H., Burnol A.F., Increased adipose tissue expression of Grb14 in several models of insulin resistance. *Faseb J*, 2004b, 18, 965–967.

Cariou B., Perdereau D., Cailliau K., Browaeys-Poly E., Béréziat V., Vasseur-Cognet M., Girard J., Burnol A.-F., The adapter protein ZIP binds Grb14 and regulates its inhibitory action on insulin signaling by recruiting Protein Kinase Cζ. *Mol Cell Biol*, 2002, 22, 6959–6970.

Carré N., Caüzac M., Girard J., Burnol A.-F., Dual effect of the adapter Grb14 on insulin action in primary hepatocytes. *Endocrinology*, 2008, 149, 3109–3117.

Cho H., Mu J., Kim J.K., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Crenshaw E.B., 3rd, Kaestner K.H., Bartolomei M.S., Shulman G.I., Birnbaum M.J., Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science,* 2001a, 292, 1728–1731.

Cho H., Thorvaldsen J.L., Chu Q., Feng F., Birnbaum M.J., Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 2001b, 276, 38349–38352.

Coba M.P., Munoz M.C., Dominici F.P., Toblli J.E., Pena C., Bartke A., Turyn D., Increased *in vivo* phosphorylation of insulin receptor at serine 994 in the liver of obese insulin-resistant Zucker rats. *J Endocrinol*, 2004, 182, 433–444.

Cooney G.J., Lyons R.J., Crew A.J., Jensen T.E., Molero J.C., Mitchell C.J., Biden T.J., Ormandy C.J., James D.E., Daly R.J., Improved glucose homeostasis and enhanced insulin signalling in Grb14-deficient mice. *Embo J*, 2004, 23, 582–593.

Daly R.J., The Grb7 family of signalling proteins. *Cell Signal*, 1998, 10, 613–618.

Dasgupta S., Bhattacharya S., Biswas A., Majumdar S.S., Mukhopadhyay S., Ray S., NF-kappaB mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochem J*, 2010, 429, 451–462.

De Meyts P., Whittaker J., Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1, 769–783.

Depetris R.S., Hu J., Gimpelevich I., Holt L.J., Daly R.J., Hubbard S.R., Structural basis for inhibition of the insulin receptor by the adaptor protein Grb14. *Mol Cell*, 2005, 20, 325–333.

Depetris R.S., Wu J., Hubbard S.R., Structural and functional studies of the Ras-associating and pleckstrin-homology domains of Grb10 and Grb14. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16, 833–839.

Desbuquois B., Béréziat V., Authier F., Girard J., Burnol A.F., Compartmentalization and *in vivo* insulin-induced translocation of the insulin-signaling inhibitor Grb14 in rat liver. *Febs J*, 2008, 275, 4363–4377.

Desbuquois B., Carré N., Burnol A.F., Regulation of insulin and type 1 insulin-like growth factor signaling and action by the Grb10/14 and SH2B1/B2 adaptor proteins. *Febs J*, 2013, 280, 794–816.

Egawa K., Maegawa H., Shimizu S., Morino K., Nishio Y., Bryer-Ash M., Cheung A.T., Kolls J.K., Kikkawa R., Kashiwagi A., Protein-tyrosine phosphatase-1B negatively regulates insulin signaling in L6 myocytes and Fao hepatoma cells. *J Biol Chem*, 2001, 276, 10207−10211.

Elchebly M., Payette P., Michaliszyn E., Cromlish W., Collins S., Loy A.L., Normandin D., Cheng A., Himms-Hagen J., Chan C.C., Ramachandran C., Gresser M.J., Tremblay M.L., Kennedy B.P., Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene. *Science*, 1999, 283, 1544–1548.

Emanuelli B., Peraldi P., Filloux C., Sawka-Verhelle D., Hilton D., Van Obberghen E., SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J Biol Chem*, 2000, 275, 15985–15991.

Ezzat S., Zheng L., Florez J.C., Stefan N., Mayr T., Hliang M.M., Jablonski K., Harden M., Stancakova A., Laakso M., Haring H.U., Ullrich A., Asa S.L., The cancer-associated FGFR4-G388R polymorphism enhances pancreatic insulin secretion and modifies the risk of diabetes. *Cell Metab*, 2013, 17, 929–940.

Gallagher E.J., LeRoith D., Does a single nucleotide polymorphism in the FGFR explain the connection between diabetes and cancer? *Cell Metab*, 2013, 17, 808−809.

Gao T., Furnari F., Newton A.C., PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*, 2005, 18, 13–24.

Gesta S., Bluher M., Yamamoto Y., Norris A.W., Berndt J., Kralisch S., Boucher J., Lewis C., Kahn C.R., Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 6676–6681.

Goding J.W., Terkeltaub R., Maurice M., Deterre P., Sali A., Belli S.I., Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. *Immunol Rev*, 1998, 161, 11–26.

Goenaga D., Hampe, C., Carré N., Cailliau K., Browaeys-Poly E., Perdereau D., Holt L.J., Daly R.J., Girard J., Broutin I., Issad T., Burnol A.F., Molecular determinants of Grb14-mediated inhibition of insulin signaling. *Mol Endocrinol*, 2009, 23, 1043–1051.

Goldfine I.D., Maddux B.A., Youngren J.F., Frittitta L., Trischitta V., Dohm G.L., Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance. *Mol Cell Biochem*, 1998, 182, 177–184.

Goustin A.S., Abou-Samra A.B., The "thrifty" gene encoding Ahsg/Fetuin-A meets the insulin receptor: Insights into the mechanism of insulin resistance. *Cell Signal*, 2001, 23, 980–990.

Greene M.W., Sakaue H., Wang L., Alessi D.R., Roth R.A., Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J Biol Chem*, 2003, 278, 8199–8211.

Gual P., Le Marchand-Brustel Y., Tanti J.F., Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*, 2005, 87, 99–109.

Gustafson T.A., He W., Craparo A., Schaub C.D., O'Neill T.J., Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor *via* a novel Non-SH2 domain. *Mol Cell Biol*, 1995, 15, 2500–2508.

Harder M.N., Ribel-Madsen R., Justesen J.M., Sparso T., Andersson E.A., Grarup N., Jorgensen T., Linneberg A., Hansen T., Pedersen O., Type 2 diabetes risk alleles near BCAR1 and in ANK1 associate with decreased beta-cell function whereas risk alleles near ANKRD55 and Grb14 associate with decreased insulin sensitivity in the Danish Inter99 cohort. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98, E801–E806.

Heid I.M., Jackson A.U., Randall J.C., Winkler T.W., Qi L., Steinthorsdottir V., Thorleifsson G., Zillikens M.C., Speliotes E.K., Magi R., Workalemahu T., White C.C., Bouatia-Naji N., Harris T.B., Berndt S.I., Ingelsson E., Willer C.J., Weedon M.N., Luan J., Vedantam S., Esko T., Kilpeläinen T.O., Kutalik Z., Li S., Monda K.L., Dixon A.L., Holmes C.C., Kaplan L.M., Liang L., Min J.L., Moffatt M.F., Molony C., Nicholson G., Schadt E.E., Zondervan K.T., Feitosa M.F., Ferreira T., Lango Allen H., Weyant R.J., Wheeler E., Wood A.R., MAGIC, Estrada K., Goddard M.E., Lettre G., Mangino M., Nyholt D.R., Purcell S., Smith A.V., Visscher P.M., Yang J., McCarroll S.A., Nemesh J., Voight B.F., Absher D., Amin N., Aspelund T., Coin L., Glazer N.L., Hayward C., Heard-Costa N.L., Hottenga J.J., Johansson A., Johnson T., Kaakinen M., Kapur K., Ketkar S., Knowles J.W., Kraft P., Kraja A.T., Lamina C., Leitzmann M.F., McKnight B., Morris A.P., Ong K.K., Perry J.R., Peters M.J., Polasek O., Prokopenko I., Rayner N.W., Ripatti S., Rivadeneira F., Robertson N.R., Sanna S., Sovio U., Surakka I., Teumer A., van Wingerden S., Vitart V., Zhao J.H., Cavalcanti-Proença C., Chines P.S., Fisher E., Kulzer J.R., Lecoeur C., Narisu N., Sandholt C., Scott L.J., Silander K., Stark K., Tammesoo M.L., Teslovich T.M., Timpson N.J., Watanabe R.M., Welch R., Chasman D.I., Cooper M.N., Jansson J.O., Kettunen J., Lawrence R.W., Pellikka N., Perola M., Vandenput L., Alavere H., Almgren P., Atwood L.D., Bennett A.J., Biffar R., Bonnycastle L.L., Bornstein S.R., Buchanan T.A., Campbell H., Day I.N., Dei M., Dörr M., Elliott P., Erdos M.R., Eriksson J.G., Freimer N.B., Fu M., Gaget S., Geus E.J., Gjesing A.P., Grallert H., Grässler J., Groves C.J., Guiducci C., Hartikainen A.L., Hassanali N., Havulinna A.S., Herzig K.H., Hicks A.A., Hui J., Igl W., Jousilahti P., Jula A., Kajantie E., Kinnunen L., Kolcic I., Koskinen S., Kovacs P., Kroemer H.K., Krzelj V., Kuusisto J., Kvaloy K., Laitinen J., Lantieri O., Lathrop G.M., Lokki M.L., Luben R.N., Ludwig B., McArdle W.L., McCarthy A., Morken M.A., Nelis M., Neville M.J., Paré G., Parker A.N., Peden J.F., Pichler I., Pietiläinen K.H., Platou C.G., Pouta A.,

Ridderstråle M., Samani N.J., Saramies J., Sinisalo J., Smit J.H., Strawbridge R.J., Stringham H.M., Swift A.J., Teder-Laving M., Thomson B., Usala G., van Meurs J.B., van Ommen G.J., Vatin V., Volpato C.B., Wallaschofski H., Walters G.B., Widen E., Wild S.H., Willemsen G., Witte D.R., Zgaga L., Zitting P., Beilby J.P., James A.L., Kähönen M., Lehtimäki T., Nieminen M.S., Ohlsson C., Palmer L.J., Raitakari O., Ridker P.M., Stumvoll M., Tönjes A., Viikari J., Balkau B., Ben-Shlomo Y., Bergman R.N., Boeing H., Smith G.D., Ebrahim S., Froguel P., Hansen T., Hengstenberg C., Hveem K., Isomaa B., Jørgensen T., Karpe F., Khaw K.T., Laakso M., Lawlor D.A., Marre M., Meitinger T., Metspalu A., Midthjell K., Pedersen O., Salomaa V., Schwarz P.E., Tuomi T., Tuomilehto J., Valle T.T., Wareham N.J., Arnold A.M., Beckmann J.S., Bergmann S., Boerwinkle E., Boomsma D.I., Caulfield M.J., Collins F.S., Eiriksdottir G., Gudnason V., Gyllensten U., Hamsten A., Hattersley A.T., Hofman A., Hu F.B., Illig T., Iribarren C., Jarvelin M.R., Kao W.H., Kaprio J., Launer L.J., Munroe P.B., Oostra B., Penninx B.W., Pramstaller P.P., Psaty B.M., Quertermous T., Rissanen A., Rudan I., Shuldiner A.R., Soranzo N., Spector T.D., Syvanen A.C., Uda M., Uitterlinden A., Völzke H., Vollenweider P., Wilson J.F., Witteman J.C., Wright A.F., Abecasis G.R., Boehnke M., Borecki I.B., Deloukas P., Frayling T.M., Groop L.C., Haritunians T., Hunter D.J., Kaplan R.C., North K.E., O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, Hirschhorn JN, Assimes T.L., Wichmann H.E., Thorsteinsdottir U., van Duijn C.M., Stefansson K., Cupples L.A., Loos R.J., Barroso I., McCarthy M.I., Fox C.S., Mohlke K.L., Lindgren C.M. , Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat Genet*, 2010, 42, 949–960.

Hemming R., Agatep R., Badiani K., Wyant K., Arthur G., Gietz R.D., Triggs-Raine B., Human growth factor receptor bound 14 binds the activated insulin receptor and alters the insulin-stimulated tyrosine phosphorylation levels of multiple proteins. *Biochem Cell Biol*, 2001, 79, 21–32.

Holt L.J., Lyons R.J., Ryan A.S., Beale S.M., Ward A., Cooney G.J., Daly R.J., Dual ablation of Grb10 and Grb14 in mice reveals their combined role in regulation of insulin signaling and glucose homeostasis. *Mol Endocrinol*, 2009, 23, 1406–1414.

Holt L.J., Siddle K., Grb10 and Grb14: enigmatic regulators of insulin action–and more? *Biochem J*, 2005, 388, 393–406.

Houtkooper R.H., Williams R.W., Auwerx J., Metabolic networks of longevity. *Cell*, 2010, 142, 9–14.

Hubbard S.R., Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J*, 1997, 16, 5572–5581.

Hubbard S.R., The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5, 1–12.

Jensen M., De Meyts P., Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm*, 2009, 80, 51–75.

Jones N., Master Z., Jones J., Bouchard D., Gunji Y., Sasaki H., Daly R., Alitalo K., Dumont D.J., Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem*, 1999, 274, 30896–30905.

Kasus-Jacobi A., Perdereau D., Auzan C., Clauser E., Van Obberghen E., Mauvais-Jarvis F., Girard J., Burnol A.-F., Identification of the rat adapter Grb14 as an inhibitor of insulin actions. *J Biol Chem*, 1998, 273, 26026–26035.

King C.C., Newton A.C., The adaptor protein Grb14 regulates the localization of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J Biol Chem*, 2004, 279, 37518–37527.

Kooner J.S., Saleheen D., Sim X., Sehmi J., Zhang W., Frossard P., Been L.F., Chia K.S., Dimas A.S., Hassanali N., Jafar T., Jowett J.B., Li X., Radha V., Rees S.D., Takeuchi F., Young R., Aung T., Basit A., Chidambaram M., Das D., Grundberg E., Hedman A.K., Hydrie Z.I., Islam M., Khor C.C., Kowlessur S., Kristensen M.M., Liju S., Lim W.Y., Matthews D.R., Liu J., Morris A.P., Nica A.C., Pinidiyapathirage J.M., Prokopenko I., Rasheed A., Samuel M., Shah N., Shera A.S., Small K.S., Suo C., Wickremasinghe A.R., Wong T.Y., Yang M., Zhang F, DIAGRAM; MUTHER, Abecasis G.R., Barnett A.H., Caulfield M., Deloukas P., Frayling T.M., Froguel P., Kato N., Katulanda P., Kelly M.A., Liang J., Mohan V., Sanghera D.K., Scott J., Seielstad M., Zimmet P.Z., Elliott P., Teo Y.Y., McCarthy M.I., Danesh J., Tai E.S., Chambers J.C., Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet*, 2011, 43, 984–989.

Lebrun P., Van Obberghen E., SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol* (Oxf), 2008, 192, 29–36.

Li S., Depetris R.S., Barford D., Chernoff J., Hubbard S.R., Crystal structure of a complex between protein tyrosine phosphatase 1B and the insulin receptor tyrosine kinase. *Structure*, 2005, 13, 1643–1651.

Lin R.C., Weeks K.L., Gao X.M., Williams R.B., Bernardo B.C., Kiriazis H., Matthews V.B., Woodcock E.A., Bouwman R.D., Mollica J.P. Speirs H.J., Dawes I.W., Daly R.J., Shioi T., Izumo S., Febbraio M.A., Du X.J., McMullen J.R., PI3K(p110 alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30, 724–732.

Maddux B.A., Goldfine I.D., Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs *via* direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes*, 2000, 49, 13–19.

Manning A.K., Hivert M.F., Scott R.A., Grimsby J.L., Bouatia-Naji N., Chen H., Rybin D., Liu C.T., Bielak L.F., Prokopenko I., Amin N., Barnes D., Cadby G., Hottenga J.J., Ingelsson E., Jackson A.U., Johnson T.,

Kanoni S., Ladenvall C., Lagou V., Lahti J., Lecoeur C., Liu Y., Martinez-Larrad M.T., Montasser M.E., Navarro P., Perry J.R., Rasmussen-Torvik L.J., Salo P., Sattar N., Shungin D., Strawbridge R.J., Tanaka T., van Duijn C.M., An P., de Andrade M., Andrews J.S., Aspelund T., Atalay M., Aulchenko Y., Balkau B., Bandinelli S., Beckmann J.S., Beilby J.P., Bellis C., Bergman R.N., Blangero J., Boban M., Boehnke M., Boerwinkle E., Bonnycastle L.L., Boomsma D.I., Borecki I.B., Böttcher Y., Bouchard C., Brunner E., Budimir D., Campbell H., Carlson O., Chines P.S., Clarke R., Collins F.S., Corbatón-Anchuelo A., Couper D., de Faire U., Dedoussis G.V., Deloukas P., Dimitriou M., Egan J.M., Eiriksdottir G., Erdos M.R., Eriksson J.G., Eury E., Ferrucci L., Ford I., Forouhi N.G., Fox C.S., Franzosi M.G., Franks P.W., Frayling T.M., Froguel P., Galan P., de Geus E., Gigante B., Glazer N.L., Goel A., Groop L., Gudnason V., Hallmans G., Hamsten A., Hansson O., Harris T.B., Hayward C., Heath S., Hercberg S., Hicks A.A., Hingorani A., Hofman A., Hui J., Hung J., Jarvelin M.R., Jhun M.A., Johnson P.C., Jukema J.W., Jula A., Kao W.H., Kaprio J., Kardia S.L., Keinanen-Kiukaanniemi S., Kivimaki M., Kolcic I., Kovacs P., Kumari M., Kuusisto J., Kyvik K.O., Laakso M., Lakka T., Lannfelt L., Lathrop G.M., Launer L.J., Leander K., Li G., Lind L., Lindstrom J., Lobbens S., Loos R.J., Luan J., Lyssenko V., Mägi R., Magnusson P.K., Marmot M., Meneton P., Mohlke K.L., Mooser V., Morken M.A., Miljkovic I., Narisu N., O'Connell J., Ong K.K., Oostra B.A., Palmer L.J., Palotie A., Pankow J.S., Peden J.F., Pedersen N.L., Pehlic M., Peltonen L., Penninx B., Pericic M., Perola M., Perusse L., Peyser P.A., Polasek O., Pramstaller P.P., Province M.A., Räikkönen K., Rauramaa R., Rehnberg E., Rice K., Rotter J.I., Rudan I., Ruokonen A., Saaristo T., Sabater-Lleal M., Salomaa V., Savage D.B., Saxena R., Schwarz P., Seedorf U., Sennblad B., Serrano-Rios M., Shuldiner A.R., Sijbrands E.J., Siscovick D.S., Smit J.H., Small K.S., Smith N.L., Smith A.V., Stančáková A., Stirrups K., Stumvoll M., Sun Y.V., Swift A.J., Tönjes A., Tuomilehto J., Trompet S., Uitterlinden A.G., Uusitupa M., Vikström M., Vitart V., Vohl M.C., Voight B.F., Vollenweider P., Waeber G., Waterworth D.M., Watkins H., Wheeler E., Widen E., Wild S.H., Willems S.M., Willemsen G., Wilson J.F., Witteman J.C., Wright A.F., Yaghootkar H., Zelenika D., Zemunik T., Zgaga L., DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium; Multiple Tissue Human Expression Resource (MUTHER) Consortium, Wareham N.J., McCarthy M.I., Barroso I., Watanabe R.M., Florez J.C., Dupuis J., Meigs J.B., Langenberg C., A genome-wide approach accounting for body mass index identifies genetic variants influencing fasting glycemic traits and insulin resistance. *Nat Genet*, 2012, 44, 659−669.

Manning B.D., Cantley L.C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007, 129, 1261–1274.

Mathews S.T., Singh G.P., Ranalletta M., Cintron V.J., Qiang X., Goustin A.S., Jen K.L., Charron M.J., Jahnen-Dechent W., Grunberger G., Improved insulin sensitivity and resistance to weight gain in mice null for the Ahsg gene. *Diabetes*, 2002, 51, 2450–2458.

Moncoq K., Broutin I., Larue V., Perdereau D., Cailliau K., Browaeys-Poly E., Burnol A.F., Ducruix A., The PIR domain of Grb14 is an intrinsically unstructured protein: implication in insulin signaling. *FEBS Lett,* 2003, 554, 240–246.

Mooney R.A., Senn J., Cameron S., Inamdar N., Boivin L.M., Shang Y., Furlanetto R.W., Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and 6 associate with and inhibit the insulin receptor: A potential mechanism for cytokine mediated insulin resistance. *J Biol Chem*, 2001, 276, 25889–25893.

Morris A.P., Voight B.F., Teslovich T.M., Ferreira T., Segre A.V., Steinthorsdottir V., Strawbridge R.J., Khan H., Grallert H., Mahajan A., Prokopenko I., Kang H.M., Dina C., Esko T., Fraser R.M., Kanoni S., Kumar A., Lagou V., Langenberg C., Luan J., Lindgren C.M., Müller-Nurasyid M., Pechlivanis S., Rayner N.W., Scott L.J., Wiltshire S., Yengo L., Kinnunen L., Rossin E.J., Raychaudhuri S., Johnson A.D., Dimas A.S., Loos R.J., Vedantam S., Chen H., Florez J.C., Fox C., Liu C.T., Rybin D., Couper D.J., Kao W.H., Li M., Cornelis M.C., Kraft P., Sun Q., van Dam R.M., Stringham H.M., Chines P.S., Fischer K., Fontanillas P., Holmen O.L., Hunt S.E., Jackson A.U., Kong A., Lawrence R., Meyer J., Perry J.R., Platou C.G., Potter S., Rehnberg E., Robertson N., Sivapalaratnam S., Stančáková A., Stirrups K., Thorleifsson G., Tikkanen E., Wood A.R., Almgren P., Atalay M., Benediktsson R., Bonnycastle L.L., Burtt N., Carey J., Charpentier G., Crenshaw A.T., Doney A.S., Dorkhan M., Edkins S., Emilsson V., Eury E., Forsen T., Gertow K., Gigante B., Grant G.B., Groves C.J., Guiducci C., Herder C., Hreidarsson A.B., Hui J., James A., Jonsson A., Rathmann W., Klopp N., Kravic J., Krjutškov K., Langford C., Leander K., Lindholm E., Lobbens S., Männistö S., Mirza G., Mühleisen T.W., Musk B., Parkin M., Rallidis L., Saramies J., Sennblad B., Shah S., Sigurðsson G., Silveira A., Steinbach G., Thorand B., Trakalo J., Veglia F., Wennauer R., Winckler W., Zabaneh D., Campbell H., van Duijn C., Uitterlinden A.G., Hofman A., Sijbrands E., Abecasis G.R., Owen K.R., Zeggini. E., Trip M.D., Forouhi N.G., Syvänen A.C., Eriksson J.G., Peltonen L., Nöthen M.M., Balkau B., Palmer C.N., Lyssenko V., Tuomi T., Isomaa B., Hunter D.J., Qi L., Wellcome Trust Case Control Consortium; Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium (MAGIC) Investigators; Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) Consortium; Asian Genetic Epidemiology Network–Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium; South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium, Shuldiner A.R, Roden M., Barroso I., Wilsgaard T., Beilby J., Hovingh K., Price J.F., Wilson J.F.,

Rauramaa R., Lakka T.A., Lind L., Dedoussis G., Njølstad I., Pedersen N.L., Khaw K.T., Wareham N.J., Keinanen-Kiukaanniemi S.M., Saaristo T.E., Korpi-Hyövälti E., Saltevo J., Laakso M., Kuusisto J., Metspalu A., Collins F.S., Mohlke K.L., Bergman R.N., Tuomilehto J., Boehm B.O., Gieger C., Hveem K., Cauchi S., Froguel P., Baldassarre D., Tremoli E0, Humphries S.E., Saleheen D., Danesh J., Ingelsson E., Ripatti S., Salomaa V., Erbel R., Jöckel K.H., Moebus S., Peters A., Illig T., de Faire U., Hamsten A., Morris A.D., Donnelly P.J., Frayling T.M., Hattersley A.T., Boerwinkle E., Melander O., Kathiresan S., Nilsson P.M., Deloukas P., Thorsteinsdottir U., Groop L.C., Stefansson K., Hu F., Pankow J.S., Dupuis J., Meigs J.B., Altshuler D., Boehnke M., McCarthy M.I., DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium., Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2012, 44, 981–990.

Mothe I., Van Obberghen E., Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J Biol Chem,* 1996, 271, 11222–11227.

Nandi A., Kitamura Y., Kahn C.R., Accili D., Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev*, 2004, 84, 623–647.

Nouaille S., Blanquart C., Zilberfarb V., Boute N., Perdereau D., Burnol A.F., Issad T., Interaction between the insulin receptor and Grb14: a dynamic study in living cells using BRET. *Biochem Pharmacol*, 2006a, 72, 1355–1366.

Nouaille S., Blanquart C., Zilberfarb V., Boute N., Perdereau D., Roix J., Burnol A.F., Issad T., Interaction with Grb14 results in site-specific regulation of tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. *EMBO Rep*, 2006b 7, 512–518.

Park J.J., Berggren J.R., Hulver M.W., Houmard J.A., Hoffman E.P., Grb14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 2006, 27, 114–121.

Pelicci G., Dente L., De Giuseppe A., Verducci-Galletti B., Giuli S., Mele S., Vetriani C., Giorgio M., Pandolfi P.P., Cesareni G., Pelicci P.G., A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene*, 1996, 13, 633–641.

Pollak M., Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8, 915–928.

Posner B.I., Laporte S.A., Cellular signalling: Peptide hormones and growth factors. *Prog Brain Res*, 2010, 181, 1-16.

Qamra R., Hubbard S.R., Structural basis for the interaction of the adaptor protein Grb14 with activated ras. *PLoS One*, 2013, 8, e72473.

Rajala A., Daly R.J., Tanito M., Allen D.T., Holt L.J., Lobanova E.S., Arshavsky V.Y., Rajala R.V., Growth factor receptor-bound protein 14 undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors: functional role in retinal insulin receptor activation. *Biochemistry*, 2009, 48, 5563–5572.

Reilly J.F., Mickey G., Maher P.A., Association of fibroblast growth factor receptor 1 with the adaptor protein Grb14. Characterization of a new receptor binding partner. *J Biol Chem*, 2000, 275, 7771–7778.

Ren D., Zhou Y., Morris D., Li M., Li Z., Rui L., Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*, 2007, 117, 397–406.

Rui L., Yuan M., Frantz D., Shoelson S., White M.F., SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem*, 2002, 277, 42394–42398.

Salmeen A., Andersen J.N., Myers M.P., Tonks N.K., Barford D., Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell*, 2000, 6, 1401–1412.

Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 2005, 307, 1098–1101.

Scott R.A., Lagou V., Welch R.P., Wheeler E., Montasser M.E., Luan J., Magi R., Strawbridge R.J., Rehnberg E., Gustafsson S., Kanoni S., Rasmussen-Torvik L.J., Yengo L., Lecoeur C., Shungin D., Sanna S., Sidore C., Johnson P.C., Jukema J.W., Johnson T., Mahajan A., Verweij N., Thorleifsson G., Hottenga J.J., Shah S., Smith A.V., Sennblad B., Gieger C., Salo P., Perola M., Timpson N.J., Evans D.M., Pourcain B.S., Wu Y., Andrews J.S., Hui J., Bielak L.F., Zhao W., Horikoshi M., Navarro P., Isaacs A., O'Connell J.R., Stirrups K., Vitart V., Hayward C., Esko T., Mihailov E., Fraser R.M., Fall T., Voight B.F., Raychaudhuri S., Chen H., Lindgren C.M., Morris A.P., Rayner N.W., Robertson N., Rybin D., Liu C.T., Beckmann J.S., Willems S.M., Chines P.S., Jackson A.U., Kang H.M., Stringham H.M., Song K., Tanaka T., Peden J.F., Goel A., Hicks A.A., An P., Müller-Nurasyid M., Franco-Cereceda A., Folkersen L., Marullo L., Jansen H., Oldehinkel A.J., Bruinenberg M., Pankow J.S., North K.E., Forouhi N.G., Loos R.J., Edkins S., Varga T.V., Hallmans G., Oksa H., Antonella M., Nagaraja R., Trompet S., Ford I., Bakker S.J., Kong A., Kumari M., Gigante B., Herder C., Munroe P.B., Caulfield M., Antti J., Mangino M., Small K., Miljkovic I., Liu Y., Atalay M., Kiess W., James A.L., Rivadeneira F., Uitterlinden A.G., Palmer C.N., Doney A.S., Willemsen G., Smit J.H., Campbell S., Polasek O., Bonnycastle L.L., Hercberg S., Dimitriou M., Bolton J.L., Fowkes G.R., Kovacs P., Lindström J., Zemunik T., Bandinelli S., Wild S.H., Basart H.V., Rathmann W., Grallert H., DIAbetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Maerz W., Kleber M.E., Boehm B.O., Peters A., Pramstaller P.P., Province M.A., Borecki I.B., Hastie N.D., Rudan I., Campbell H., Watkins H., Farrall M., Stumvoll M., Ferrucci L., Waterworth D.M., Bergman R.N., Collins F.S., Tuomilehto J., Watanabe R.M., de Geus E.J., Penninx B.W., Hofman A., Oostra B.A., Psaty B.M., Vollenweider P., Wilson J.F., Wright A.F., Hovingh G.K., Metspalu A., Uusitupa M., Magnusson P.K.,

Kyvik K.O., Kaprio J., Price J.F., Dedoussis G.V., Deloukas P., Meneton P., Lind L., Boehnke M., Shuldiner A.R., van Duijn C.M., Morris A.D., Toenjes A., Peyser P.A., Beilby J.P., Körner A., Kuusisto J., Laakso M., Bornstein S.R., Schwarz P.E., Lakka T.A., Rauramaa R., Adair L.S., Smith G.D., Spector T.D., Illig T., de Faire U., Hamsten A., Gudnason V., Kivimaki M., Hingorani A., Keinanen-Kiukaanniemi S.M., Saaristo T.E., Boomsma D.I., Stefansson K., van der Harst P., Dupuis J., Pedersen N.L., Sattar N., Harris T.B., Cucca F., Ripatti S., Salomaa V., Mohlke K.L., Balkau B., Froguel P., Pouta A., Jarvelin M.R., Wareham N.J., Bouatia-Naji N., McCarthy M.I., Franks P.W., Meigs J.B., Teslovich T.M., Florez J.C., Langenberg C., Ingelsson E., Prokopenko I., Barroso I., Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet,* 2012, 44, 991–1005.

Shao J., Catalano P.M., Yamashita H., Ruyter I., Smith S., Youngren J., Friedman J.E., Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM. *Diabetes*, 2000, 49, 603–610.

Sharfi H., Eldar-Finkelman H., Sequential phosphorylation of insulin receptor substrate-2 by glycogen synthase kinase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase plays a role in hepatic insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294, E307–E315.

Siddle K., Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol* (Lausanne), 2012, 3, 34.

Srinivas P.R., Wagner A.S., Reddy L.V., Deutsch D.D., Leon M.A., Goustin A.S., Grunberger G., Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol*, 1993, 7, 1445–1455.

Stefan N., Fritsche A., Weikert C., Boeing H., Joost H.G., Haring H.U., Schulze M.B., Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes*, 2008, 57, 2762−2767.

Stein E.G., Gustafson T.A., Hubbard S.R., The BPS domain of Grb10 inhibits the catalytic activity of the insulin and IGF-1 receptors. *FEBS Lett*, 2001, 493, 106−111.

Stein E.G., Ghirlando R., Hubbard S.R., Structural Basis for Dimerization of the Grb10 Src Homology 2 Domain. Implications For Ligand Specificity. *J Biol Chem*, 2003, 278, 13257–13264.

Strack V., Hennige A.M., Krutzfeldt J., Bossenmaier B., Klein H.H., Kellerer M., Lammers R., Haring H.U., Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoforms beta2 and theta. *Diabetologia*, 2000, 43, 443−449.

Takata H., Ikeda Y., Suehiro T., Ishibashi A., Inoue M., Kumon Y., Terada Y., High glucose induces transactivation of the alpha2-HS glycoprotein gene through the ERK1/2 signaling pathway. *J Atheroscler Thromb*, 2009, 16, 448–456.

Takayama S., White M.F., Kahn C.R., Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J Biol Chem*, 1988, 263, 3440–3447.

Taniguchi C.M., Emanuelli B., Kahn C.R., Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7, 85–96.

Taubes G., Cancer research. Unraveling the obesity-cancer connection. *Science*, 2012, 335, 28, 30–22.

Thirone A.C., Huang C., Klip A., Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17, 72–78.

Ueki K., Kondo T., Tseng Y.H., Kahn C.R., Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 10422–10427.

Ussar S., Bezy O., Bluher M., Kahn C.R., Glypican-4 enhances insulin signaling *via* interaction with the insulin receptor and serves as a novel adipokine. *Diabetes*, 2012, 61, 2289–2298.

Vanhaesebroeck B., Stephens L., Hawkins P., PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13, 195–203.

Virkamaki A., Ueki K., Kahn C.R., Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 1999, 103, 931–943.

Wills M.K., Jones N., Teaching an old dogma new tricks: twenty years of Shc adaptor signalling. *Biochem J*, 2012, 447, 1–16.

Zinker B.A., Rondinone C.M., Trevillyan J.M., Gum R.J., Clampit J.E., Waring J.F., Xie N., Wilcox D., Jacobson P., Frost L. Kroeger P.E., Reilly R.M., Koterski S., Opgenorth T.J,. Ulrich R.G., Crosby S., Butler M., Murray S.F., McKay R.A., Bhanot S., Monia B.P., Jirousek M.R., PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99, 11357–11362.