



**FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA**

**ACCIONS DE LA INSULINA SOBRE EL
TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT4 EXPRESSAT
EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC DELS PEIXOS
TELEOSTIS**

Memòria presentada per
Mònica Díaz Ferrer
Per optar al grau de
Doctor en Bioquímica

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Josep Planas Vilarnau del Departament de
Fisiologia, Facultat de Biologia.
Adscrita al departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
programa de Fisiologia (bienni 2001-2003).

Dr. Josep Planas Vilarnau

Mònica Díaz Ferrer

Barcelona. Juny, 2006

ÍNDEX

I. INTRODUCCIÓ.....	1
Metabolisme de carbohidrats en peixos teleostis.....	3
Transport de glucosa	8
Transport mediat per GLUT4 en mamífers	16
Transport facilitat de glucosa en peixos	26
II. OBJECTIUS.....	33
III. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	37

Capítol I:

Regulació del contingut de GLUT4 <i>in vivo</i> en múscul esquelètic de truita	39
<i>In vivo</i> regulation of GLUT4 content in trout skeletal muscle	43
Abstract.....	45
Introduction.....	46
Material and methods	47
Results	50
Discussion.....	54
References.....	57

Capítol II:

Acció de la insulina sobre l'expressió de GLUT4 en cèl·lules musculars de truita	61
Insulin action on GLUT4 expression in trout muscle cells in culture	65
Abstract.....	67
Introduction.....	68
Material and methods	70
Results	75
Discussion.....	85
References.....	89

Capítol III:

Regulació del tràfic del GLUT4 de truita per la insulina en cèl·lules musculars

L6.....	95
Regulation of fish GLUT4 traffic by insulin in L6 muscle cells	99
Abstract.....	101
Introduction.....	102
Material and methods	104
Results	107
Discussion.....	116
References.....	121

Capítol IV:

Regulació de la translocació del GLUT4 i el transport de glucosa per la insulina en cèl·lules musculars de truita.....

Regulation of GLUT4 translocation and glucose transport by insulin in trout muscle cells	131
Abstract.....	133
Introduction.....	134
Material and methods	135
Results	139
Discussion.....	143
References.....	146

IV. RESUM GENERAL	151
V. CONCLUSIONS	165
VI. BIBLIOGRAFIA	169
VII. PUBLICACIONS	199

ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

INTRODUCCIÓ

Fig. 1. Efecte de l'administració oral de glucosa sobre la glucèmia.....	5
Fig. 2. Model de l'estructura dels transportadors de glucosa de difusió facilitada.....	10
Fig. 3. Models de compartimentació intracel·lular del GLUT4.....	21
Fig. 4. Esquema de la via de senyalització de la insulina dependent de PI3K.....	22
Fig. 5. Esquema de les vies de senyalització de la insulina.....	24
Fig. 6. Esquema de la via de senyalització de la contracció muscular.....	25
Fig. 7. Aliniament de les seqüències d'aminoàcids dels GLUT4 de peixos.....	29
Fig. 8. Efectes de la insulina en la localització de les proteïnes okGLUT4-eGFP i ratGLUT4-eGFP.....	30

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Regulació del contingut de GLUT4 *in vivo* en múscul esquelètic de truita

Table 1. Effects of fasting and arginine injection on insulin and glucose plasma levels.....	50
Fig. 1. Effects of fasting on the btGLUT4 protein content.....	51
Fig. 2. Effects of insulin treatment on the btGLUT4 protein content.....	52
Table 2. Effects of insulin treatment on circulating levels of glucose.....	52
Fig. 3. Effects of arginine treatment on the btGLUT4 protein content.....	53

Acció de la insulina sobre l'expressió de GLUT4 en cèl·lules musculars de truita

Fig. 1. Diagram of real-time PCR using SYBR Green method.....	73
Table 1. Primers used for real-time PCR.....	74
Table 2. PCR protocol introduced in LightCycler instrument.....	75
Fig. 2. Amplification and melting plots of real-time PCR.....	76
Fig. 3. Differentiation of muscle satellite cells from rainbow trout.....	77
Fig. 4. GLUT4 expression at different days of culture.....	78
Fig. 5. GLUT1 expression at different days of culture.....	79
Fig. 6. Time course of insulin stimulated GLUT4 and GLUT1 expression.....	80
Fig. 7. GLUT4 expression in response to different doses of insulin and IGF-I.....	81
Fig. 8. GLUT1 expression in response to different doses of insulin and IGF-I.....	82

Fig. 9. Insulin and IGF-I effects on GLUT4 expression at day 2 and 10 of culture.	83
Fig. 10. Insulin and IGF-I effects on GLUT1 expression at day 2 and 10 of culture	84

Regulació del tràfic del GLUT4 de truita per la insulina en cèl·lules musculars L6

Fig. 1. Structure of btGLUT4myc and GLUT4myc expression.....	108
Fig. 2. Steady state levels of GLUT4myc at the cell surface in response to insulin and hyperosmolarity.....	109
Fig. 3. Percentage of GLUT4myc at the cell surface in response to insulin and hyperosmolarity.	110
Fig. 4. Time course of insulin and hyperosmolarity effects on steady state levels of cell surface GLUT4myc	111
Fig. 5. Dose response of insulin-stimulated 2-DG uptake in L6 myoblasts.....	112
Fig. 6. Dose response of insulin-stimulated 2-DG uptake in L6 myotubes.....	113
Fig. 7. Effect of insulin and hyperosmolarity on 2-DG uptake in L6 myoblasts and myotubes.	114
Fig. 8. Inhibition of 2-DG uptake in L6 myoblasts by cytochalasin B.....	115
Fig. 9. GLUT4myc internalization.....	116

Regulació de la translocació del GLUT4 i del transport de glucosa per la insulina en cèl·lules musculars de truita

Fig. 1. Effect of insulin on the amount of btGLUT4 at the plasma membrane.....	139
Fig. 2. Insulin-stimulated 2-DG uptake in trout muscle cells.....	140
Fig. 3. Subcellular localization of btGLUT4 in trout muscle cells.....	141
Fig. 4. Immunofluorescence of btGLUT4 in trout muscle cells after 5 days and 10 days in culture.....	142

I. INTRODUCCIÓ

METABOLISME DE CARBOHIDRATS EN PEIXOS TELEOSTIS

Els peixos tenen menys capacitat per utilitzar els carbohidrats de la dieta si els comparem amb els mamífers. Així doncs, encara que en els peixos la glucosa pugui ser primordial pel metabolisme de diversos teixits i tipus cel·lulars és possible que en alguns casos jugui un paper més secundari darrera de les proteïnes i els lípids. En el camp de l'aqüicultura, però, ja fa molts anys que s'estudia la possibilitat de reduir el contingut proteic de les dietes i augmentar la presència de carbohidrats, ja que són una font d'energia més econòmica de cara a la formulació dels pinsos i també així s'intenta reduir la descàrrega de nitrogen a l'ambient que provoca la utilització de la proteïna (Medale et al., 1995). En peixos encara no han estat determinats els requeriments dietètics de carbohidrats, però la seva retirada de la dieta provoca una reducció del creixement degut a l'augment de la taxa de degradació proteica en el múscul (Peragon et al., 1999; Wilson, 1994). El nivell òptim de carbohidrats digeribles a les dietes variarà en funció de l'espècie, ja que les espècies omnívores o herbívores com la carpa i la tilàpia toleren un nivell més elevat de carbohidrats que no pas espècies carnívores com el salmó i la truita (Anderson et al., 1984; Furuichi and Yone, 1980; Hemre et al., 1995a; Wilson, 1994). En general, es considera recomanable no més d'un 20% de contingut de carbohidrat digerible a la dieta per aquelles espècies carnívores (Wilson, 1994), encara que en el cas de la truita irisada s'ha observat que pot tolerar la dextrina fins a representar un 40% del contingut del pes sec a la dieta (Hilton et al., 1987). La utilització dels carbohidrats a la dieta depèn també de factors ambientals com la temperatura. Així s'ha demostrat que el salmó de l'Atlàntic mostra un millor creixement i una millor utilització dels carbohidrats quan és mantingut a 12°C comparat quan es fa a 2°C (Hemre et al., 1995b). Un altre factor important que intervé en l'ús dels carbohidrats de la dieta pels peixos és la complexitat del propi carbohidrat, encara que dependrà de l'espècie estudiada. Alguns autors han descrit que el salmó presenta una millor taxa de creixement quan la font de carbohidrat és glucosa, maltosa o sacarosa, que no pas quan es tracta de dextrina o fructosa (Buhler and Halver, 1961). En canvi, en carpa la taxa de creixement més elevada es dona amb dietes on és present el midó gelatinitzat en detriment de les dietes amb dextrina o glucosa (Furuichi and Yone, 1982a). Un altre element important per a la utilització dels carbohidrats és la seva digestió i absorció en el sistema digestiu. Així, les espècies herbívores o omnívores

tenen una major capacitat per digerir els carbohidrats enfront les espècies carnívores. Alguns autors han demostrat que aquesta diferència és probablement deguda a l'activitat més reduïda d'aquells enzims responsables de la hidròlisi dels glúcids com per exemple l' γ -amilasa (Hofer and Sturmbauer, 1985; Shimeno et al., 1977). De la mateixa manera les espècies herbívores i omnívores també presenten una taxa d'absorció de glucosa més elevada a nivell intestinal comparada amb aquelles espècies carnívores (Soengas and Moon, 1998). Aquesta absorció de glucosa que té lloc a la membrana apical dels enteròcits ve mitjançada per un transport actiu dependent de sodi similar al de mamífers (Collie and Ferraris, 1995). En les espècies que consumeixen dietes riques en carbohidrats la glucosa induïx un increment d'aquesta activitat transportadora intestinal, però en canvi, les espècies carnívores sembla que no poden modular la seva capacitat absorptiva en funció del contingut de carbohidrat a la dieta (Buddington and Hilton, 1987; Soengas and Moon, 1998).

Malgrat els peixos presenten una capacitat més limitada que els mamífers per digerir i absorbir els carbohidrats provinents de la dieta aquest no és l'únic coll d'ampolla en la utilització dels carbohidrats. Els glúcids, un cop són absorbits en el tracte intestinal són metabolitzats molt lentament. Diversos estudis en diferents espècies mostren que nivells elevats de carbohidrats a la dieta porten a un estat hiperglucèmic permanent (Bergot, 1979; Hemre and Hansen, 1998). Aquesta poca capacitat per metabolitzar la glucosa es posa de manifest en els tests de tolerància a la glucosa. Diversos autors han demostrat en diferents espècies que l'administració d'un bolus de glucosa, ja sigui via oral o via intravenosa, provoca una hiperglucèmia perllongada que es veu més agreujada en espècies carnívores (Blasco et al., 1996; Furuichi and Yone, 1981; Palmer and Ryman, 1972; Wright et al., 1998) (Fig. 1). Per tant, aquestes observacions han portat a diversos autors a suggerir que els peixos són intolerants a la glucosa (Hemre et al., 2002; Moon, 2001).

Aquesta intolerància a la glucosa s'ha intentat justificar a través de diferents hipòtesis. En un principi alguns autors van proposar que la incapacitat per a controlar els nivells de glucosa en sang podia ser deguda a la manca d'insulina, suggerint així que els peixos teleostis eren un bon model de diabetis tipus I (Furuichi and Yone, 1982b; Wilson and Poe, 1987). En canvi, les tècniques de radioimmunoassaig han pogut demostrar que els peixos teleostis no són deficients en insulina, sinó més aviat al

contrari. En general, les concentracions circulants d'insulina en peixos tendeixen a ser més elevades que en mamífers (Mommsen and Plisetskaya, 1991). Per aquest motiu s'ha suggerit que els peixos teleostis s'ajustarien millor a un model de diabetis tipus II (Wilson, 1994). Malgrat s'observa un increment en els nivells d'insulina plasmàtics després d'una càrrega de glucosa (Blasco et al., 1996; Furuichi and Yone, 1981; Hilton et al., 1987) sembla que en algunes espècies certs aminoàcids com l'arginina o la lisina són uns secretagogs més potents de la insulina que no pas la mateixa glucosa (Carneiro et al., 1993; Plisetskaya et al., 1991). Per altra banda, s'ha de tenir en compte que el radioimmunoassaig d'insulina també detecta la forma precursora, la proinsulina, de la qual encara es desconeix si juga algun paper important en peixos (Plisetskaya, 1998). A més, la càrrega de glucosa també provoca la secreció d'altres hormones que poden interferir en l'acció de la insulina. Aquest és el cas de la somatostatina, la qual és alliberada després de l'administració de glucosa i inhibeix la secreció d'insulina, contribuint així a la intolerància a la glucosa descrita en la truita irisada (Harmon et al., 1991).

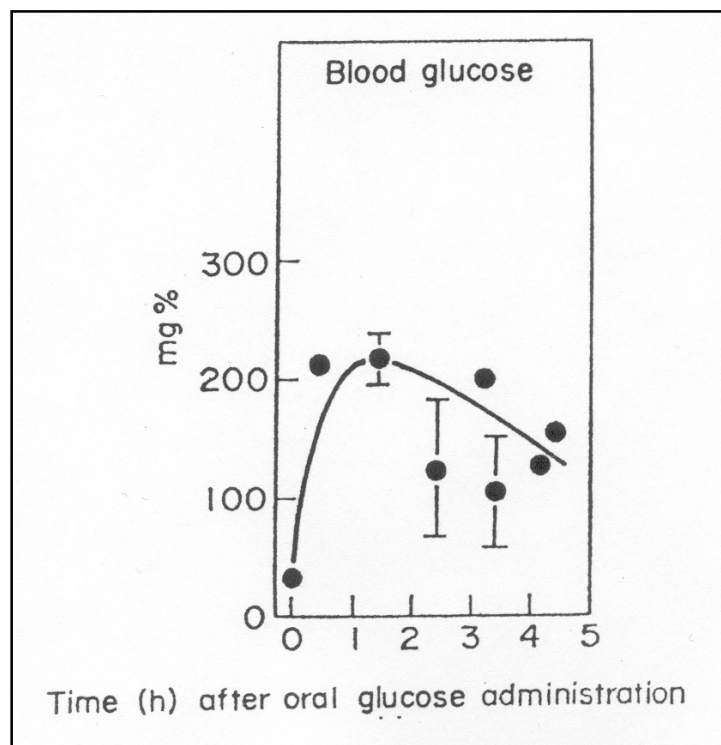


Fig. 1. Efecte de l'administració oral de glucosa (1 ml, 1 g/ml D-glucosa) sobre els nivells de glucosa circulants en truita (*Salmo gairdneri*). Adaptat de Palmer i Ryman (1972).

Els altres factors que intervenen en la regulació de la normoglucèmia es troben ja en els teixits perifèrics. Així, els primers elements que participen en l'acció de la insulina sobre els teixits diana són els propis receptors d'insulina. En peixos ha estat descrita l'existència de receptors d'insulina funcionals en diversos teixits com el múscul esquelètic, cor, teixit adipós, fetge i cervell (Parrizas et al., 1994; Planas et al., 2000b), encara que el nombre de receptors és molt inferior al que es troba en mamífers i també és més baixa l'activitat tirosina quinasa associada (Navarro et al., 1999). També s'ha demostrat que tant el nombre de receptors d'insulina com la seva activitat tirosina quinasa són més reduïts en espècies carnívores com la truita que en espècies omnívores com la carpa (Parrizas et al., 1994), el qual explicaria la major intolerància a la glucosa dels peixos carnívors. En truita el nombre de receptors d'insulina és regulat pels propis nivells d'insulina circulants, tant en teixit adipós com en múscul esquelètic. Un estat hiperinsulinèmic induït per la ingesta o per una injecció d'arginina provoca un augment dels receptors d'insulina en múscul blanc (Parrizas et al., 1994) i en teixit adipós (Planas et al., 2000c), com un mecanisme per a millorar la resposta del teixit. En canvi, en el múscul vermell, on els receptors d'insulina són més abundants que en múscul blanc, s'ha observat que l'augment dels nivells circulants d'insulina té l'efecte invers en el nombre de receptors (Banos et al., 1997). Aquesta regulació a la baixa dels receptors d'insulina en múscul vermell s'ha postulat com un mecanisme del teixit per tal d'evitar una excessiva resposta a l'hormona (Navarro et al., 1999).

Un altre factor limitant per la utilització de la glucosa per part dels teixits podria ser l'entrada de glucosa dins les cèl·lules. Aquesta entrada de glucosa és mediada per transportadors de glucosa de difusió facilitada (GLUTs). En mamífers s'han identificat diverses isoformes (Scheepers et al., 2004), entre elles el GLUT4, el qual és la isoforma regulada per la insulina. Alguns autors han postulat que la intolerància a la glucosa observada en els peixos teleostis és deguda a la manca de transportadors de glucosa induïbles per la insulina en els teixits diana (Wright et al., 1998). En canvi, més tard s'ha demostrat l'existència d'un transportador de glucosa homòleg al GLUT4 de mamífer en algunes espècies com el salmó i la truita (Capilla et al., 2004; Planas et al., 2000a).

Un cop dins la cèl·lula, el següent pas per la metabolització de la glucosa és la seva fosforilació. En mamífers s'han descrit quatre isoformes d'hexoquinases (I-IV),

essent l'hexoquinasa IV (també coneguda com glucoquinasa) la isoforma més important per al manteniment de la normoglucèmia i per a la secreció d'insulina (Niswender et al., 1997). En un principi alguns autors van suggerir que una de les limitacions per l'ús de la glucosa en peixos era la manca de fosforilació de la glucosa en el fetge (Cowey et al., 1977; Nagayama and Ohshima, 1974), però més tard Tranulis i col. (1996) van descriure l'existència d'activitat glucoquinasa en salmó. Posteriorment també s'ha demostrat que en truita, carpa i orada l'expressió i l'activitat de la glucoquinasa al fetge és induïda pels carbohidrats de la dieta (Capilla et al., 2003; Panserat et al., 2000). Per altra banda, també s'ha vist que els enzims responsables de les principals vies del metabolisme de carbohidrats com la glicòlisi, el cicle dels àcids tricarboxílics, la via de les pentoses fosfat, la gluconeogènesi i la glicogènesi són presents en peixos (Cowey and Walton, 1989). Per tant, sembla que la capacitat limitada dels peixos teleostis per metabolitzar la glucosa no pot ser explicada per l'absència d'aquests enzims.

Així doncs, el poc ús de la glucosa circulant que en fan els peixos no pot ser justificat per un sol factor, sinó que sembla que podria ser degut al sumatori de diversos factors. Com una aproximació per a millorar el metabolisme de carbohidrats en truita, Krasnov i col. (1999) van microinjectar els gens del GLUT1 i l'hexoquinasa II humans en ous fertilitzats de truita (cadascun per separat o tots dos alhora) i van analitzar en els embrions les taxes d'oxidació i captació de glucosa. D'aquesta manera, els embrions que expressaven el GLUT1 humà presentaven una taxa de captació de glucosa més elevada, així com també es veia incrementada la taxa d'oxidació. En canvi, la taxa d'oxidació de la glucosa no augmentava en aquells embrions que expressaven l'hexoquinasa II humana, pel qual van demostrar que el transport seria el pas limitant per la utilització de la glucosa en els embrions de truita. En el mateix sentit, Blasco i col. (1996) han demostrat que després d'una càrrega de glucosa, pràcticament tota la glucosa captada pels teixits, excepte en el cor i el cervell, és fosforilada, el qual també suggereix que la fosforilació de la glucosa no és un pas limitant pel transport.

La utilització de la glucosa circulant varia depenent del teixit i de l'espècie estudiada. En el bacallà, els teixits amb una taxa més elevada d'utilització de glucosa són, en ordre descendent, les brànquies, el cor, el múscul vermell, el fetge i el múscul blanc (Hemre et al., 2002). En canvi, en truita, Blasco i col. (2001) han trobat els índexs d'utilització de glucosa més elevats en teixits com la melsa, el ronyó, el cervell i les

brànquies, tots ells teixits amb una elevada taxa glicolítica, mentre que el múscul blanc i vermell mostren les taxes més baixes, ja que emmagatzemen la glucosa en forma de proteïna i glicogen. Per altra banda, estudis *in vivo* de captació de glucosa en truita indiquen que la melsa, el ronyó, el cervell i les brànquies són els teixits que tenen una major taxa de transport de glucosa, d'acord amb la seva incrementada activitat glicolítica (Blasco et al., 1996). En canvi, el múscul esquelètic presenta la taxa de captació de glucosa més baixa, però en valors absoluts és, i amb diferència, el teixit que capta més quantitat de glucosa. En el mateix estudi s'ha demostrat que com a conseqüència de l'administració d'una càrrega de glucosa, la qual provoca una hiperglucèmia i un increment en els nivells d'insulina circulants, només el múscul blanc i vermell incrementen la seva capacitat transportadora de glucosa. Aquest fet ens porta a pensar que en peixos, igual que en mamífers, el múscul esquelètic és el teixit més important que participa en el manteniment de la normoglucèmia, i que contribueix en major grau a l'eliminació de la glucosa del corrent circulatori, i a la vegada, és un teixit que pot regular la seva capacitat de transport de la glucosa, possiblement en resposta a la insulina. Per tant, és important entendre com es regula el transport de glucosa en múscul esquelètic i quin paper té la insulina en aquest procés.

TRANSPORT DE GLUCOSA

La glucosa és la principal font d'energia per a la major part de cèl·lules eucariotes. Degut a la seva naturalesa hidrofílica la glucosa és incapaç de travessar la membrana plasmàtica per difusió simple, de manera que requereix la presència de proteïnes transportadores que medien la seva entrada a l'interior de la cèl·lula. S'han descrit dues famílies de transportadors de glucosa: 1) els transportadors de glucosa dependents de sodi, i 2) els transportadors de glucosa de difusió facilitada. Els primers són, de fet, co-transportadors de glucosa i sodi, i s'encarreguen del transport actiu de glucosa en contra de gradient de concentració, mentre que els segons transporten glucosa a favor de gradient de concentració i sense despesa energètica.

Transportadors de glucosa dependents de sodi

Els transportadors de glucosa dependents de sodi (SGLTs) aprofiten el gradient electroquímic de sodi generat per la bomba (ATPasa) sodi-potassi per tal de transportar glucosa en contra de gradient de concentració i, per tant, es tracta d'un transport actiu que consum energia. Tenen en comú una estructura secundària de 14 dominis transmembrana amb el extrems amino- i carboxi-terminals extracel·lulars (Wright, 2001). En mamífers s'han descrit diverses isoformes d'aquests transportadors. El SGLT1, transportador d'elevada afinitat, va ser clonat per primera vegada en intestí de conill (Hediger et al., 1987) i s'expressa principalment en intestí, cor i ronyó (Scheepers et al., 2004). Transporta sodi i glucosa amb un ràtio de 2:1 (2 ions sodi per cada molècula de glucosa). El SGLT2, en canvi, és un transportador de baixa afinitat que s'encarrega de reabsorbir la major part de glucosa provinent del filtrat glomerular al ronyó (Wood and Trayhurn, 2003) i el seu ràtio de co-transport sodi-glucosa és 1:1. El SGLT3 va ser inicialment identificat en una línia cel·lular renal de porc i va ser designat com un transportador d'aminoàcids (SAAT1) a partir d'experiments d'expressió en oòcits de *Xenopus* (Kong et al., 1993). Més tard va ser reclassificat com un co-transportador de sodi i glucosa de baixa afinitat (Mackenzie et al., 1994) amb un ràtio de co-transport similar al del SGLT1. S'ha observat que el SGLT3 s'expressa en ronyó, intestí, fetge i melsa (Kong et al., 1993).

Transportadors de glucosa de difusió facilitada

Els transportadors de glucosa de difusió facilitada, també coneguts amb el nom de GLUTs, constitueixen una família de proteïnes en la qual han estat identificats 14 membres (GLUT1-12,14 i HMIT1) en mamífers. Aquests transportadors s'encarreguen del transport de glucosa a través de la membrana plasmàtica a favor de gradient de concentració. Una característica comuna d'aquestes proteïnes és la seva estructura secundària, la qual està formada per 12 hèlixs alfa transmembrana amb extrems amino- i carboxi-terminals citosòlics (Fig. 2). Aquestes hèlixs alfa hidrofòbiques que constitueixen els dominis transmembrana estan unides per dominis hidrofílics els quals poden ser extracel·lulars o intracel·lulars. Tots els membres es caracteritzen per tenir un domini intracel·lular més llarg entre els dominis transmembrana 6 i 7, i un domini extracel·lular més llarg que es pot trobar entre els segments transmembrana 1 i 2 o bé entre el 9 i 10, on es troba un lloc de N-glicosilació. S'ha comparat la seqüència aminoacídica d'aquestes proteïnes i s'ha vist que comparteixen entre un 28 i un 65%

d'identitat. Per altra banda també s'ha detectat la presència de diversos residus de glicina i triptòfan conservats a la seva seqüència, els quals es consideren essencials per a la funció de transport facilitat (Wood and Trayhurn, 2003). Els membres d'aquesta família de transportadors es caracteritzen per tenir un patró d'expressió tissular específic i unes característiques cinètiques pròpies. Segons la seva similitat de seqüència han estat dividits en tres classes: classe I, II i III (Joost et al., 2002).

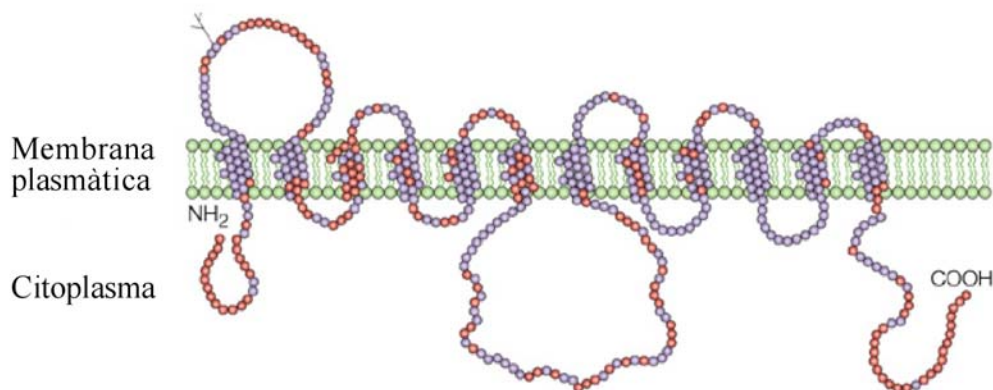


Fig. 2. Model de l'estructura dels transportadors de glucosa de difusió facilitada. Concretament, correspon a l'estructura comuna proposada pels transportadors de classe I i II. En els transportadors de classe III el domini extracel·lular més llarg es troba situat entre els dominis transmembrana 9 i 10. Adaptat de Bryant et al., 2002.

Transportadors de glucosa facilitats de classe I

En aquesta subfamília s'hi inclouen els 4 primers membres (GLUT1-4), que són, fins el moment, els més estudiats i millor caracteritzats, juntament amb el GLUT14 clonat recentment. El GLUT1 va ser el primer transportador de la família dels GLUTs identificat a mitjans dels anys 80 i va ser clonat per primera vegada a la línia cel·lular HepG2 (Mueckler et al., 1985). És un transportador de glucosa que s'expressa en pràcticament tots els teixits i que s'encarrega del transport basal de glucosa, encara que la seva màxima expressió es troba en eritròcits, cèl·lules endotelials del cervell (la barrera hematoencefàlica), teixits fetals i en línies cel·lulars transformades (Gould and Holman, 1993). En general, l'expressió de GLUT1 és induïda per estímuls de creixement com a resposta per l'increment de demanda energètica que tenen les cèl·lules en estat proliferatiu. L'expressió de GLUT1 és regulada en diferents tipus

cel·lulars per la glucosa, factor de creixement fibroblàstic, factor de necrosi tumoral γ , oncogens, hipòxia, AMP cíclic, insulina, factor de creixement tipus insulina-I i hormona de creixement, entre molts d'altres. Tots aquests factors, excepte la glucosa, incrementen l'expressió del GLUT1 (Gould and Holman, 1993; Mueckler, 1994). Diversos estudis en oòcits de *Xenopus* han demostrat que aquest transportador té una Km per la glucosa entre 5-7 mM i que és inhibible per citocalasina B. A més de glucosa també és capaç de transportar manosa, galactosa i glucosamina (Burant and Bell, 1992; Gould et al., 1991; Keller et al., 1989; Uldry et al., 2002).

El GLUT2 va ser clonat a partir de llibreries de cDNA de fetge en rata (Thorens et al., 1988) i humans (Fukumoto et al., 1988). La seva expressió és restringida al fetge, intestí prim, ronyó i les cèl·lules γ pancreàtiques. La presència del GLUT2 a la membrana basolateral de les cèl·lules epitelials de l'intestí i el ronyó suggereix que és l'encarregat del transport transepitelial de glucosa. En els hepatòcits el GLUT2 està implicat tant en la captació com en l'alliberament de glucosa cap a la sang, i a les cèl·lules γ pancreàtiques catalitza el primer pas en la secreció d'insulina induïda per la glucosa. Els estudis funcionals del GLUT2 indiquen que és un transportador de glucosa de baixa afinitat, ja que té una Km per la glucosa al voltant de 17 mM i que és inhibible per citocalasina B, però amb una constant d'inhibició molt més elevada que el GLUT1 (Burant and Bell, 1992). Aquesta baixa afinitat del transportador per la glucosa ens indica que l'activitat transportadora del GLUT2 no és saturable per les concentracions fisiològiques de glucosa. El GLUT2 pot transportar galactosa, manosa, fructosa i glucosamina.

El GLUT3 va ser clonat en una llibreria de cDNA de múscul humà fetal (Kayano et al., 1988) i es caracteritza per ser un transportador de glucosa d'alta afinitat (Km 1-2 mM) que s'expressa fonamentalment en aquells teixits que tenen uns elevats requeriments de glucosa com en el cas del cervell. L'elevada afinitat del GLUT3 garanteix un eficient transport de glucosa a les cèl·lules neuronals malgrat la concentració extracel·lular de glucosa sigui molt baixa. S'ha observat que el GLUT3 és expressat també en testicle, on és present en espermatozous (Haber et al., 1993), en múscul esquelètic (Stuart et al., 1999) i a la línia cel·lular muscular L6 (Bilan et al., 1992).

El GLUT4 va ser clonat quasi simultàniament per diversos grups en l'home (Fukumoto et al., 1989), en rata (Birnbaum, 1989; Charron et al., 1989; James et al., 1989) i en ratolí (Kaestner et al., 1989). La seva expressió està restringida a múscul esquelètic, teixit adipós i cor (Mueckler, 1994), encara que també s'ha trobat en cervell (Rayner et al., 1994). El GLUT4 també se'l coneix com el transportador de glucosa sensible a la insulina, ja que és el mediador de l'acció de la insulina disminuint els nivells de glucosa plasmàtics durant l'estadi postprandial. Així doncs, el GLUT4 és el responsable del transport de glucosa induït per la insulina en els seus teixits diana. És ben conegut que la insulina incrementa la capacitat de transport de glucosa a través de la redistribució del GLUT4 des de compartiments intracel·lulars fins a la membrana plasmàtica (Cushman and Wardzala, 1980; Suzuki and Kono, 1980). Aquest fenomen és conegut com translocació i en el múscul esquelètic també pot ser induïda per la contracció muscular o per situacions d'hipòxia (Cartee et al., 1991; Lund et al., 1995). La Km per la glucosa es troba al voltant de 5 mM i a més de glucosa també transporta manosa i galactosa (Burant and Bell, 1992; Keller et al., 1989). L'activitat transportadora del GLUT4 és també inhibida per citocalasina B i l'indinavir (inhibidor de proteases del VIH) (Murata et al., 2002).

El GLUT14 ha estat clonat recentment en humans i sembla ser que representa una duplicació del gen *GLUT3* (Wu et al., 2002). S'expressa exclusivament en testicle i fins al moment no s'ha trobat el seu ortòleg en ratolí.

Transportadors de glucosa facilitats de classe II

Els transportadors de glucosa facilitats de classe II inclouen el GLUT5, el GLUT7, el GLUT9 i el GLUT11. El GLUT5 es va aïllar en cèl·lules epitelials intestinals humanes (Kayano et al., 1990) i també a partir de llibreries de cDNA de jejú en rata i conill (Miyamoto et al., 1994; Rand et al., 1993). El GLUT5 és un transportador de fructosa amb una Km al voltant de 6 mM i no transporta glucosa ni tampoc és inhibit per citocalasina B. El GLUT5 s'expressa principalment a l'intestí prim, al testicle i al ronyó, encara que també es pot detectar en múscul esquelètic i adipòcits (Hundal et al., 1992; Shepherd et al., 1992). Situat a la membrana apical dels enteròcits, el GLUT5 és l'encarregat de l'absorció de fructosa de la dieta.

El GLUT7 va ser clonat recentment a partir d'una llibreria de cDNA d'intestí humana (Li et al., 2004) i es considera un transportador d'elevada afinitat per la glucosa i fructosa. És expressat principalment a l'intestí prim, còlon, testicle i pròstata, i concretament a l'intestí es concentra a la membrana apical dels enteròcits, de la mateixa manera que el GLUT5.

El GLUT9 presenta la seva màxima expressió en fetge i ronyó, encara que també s'han detectat nivells baixos d'expressió en intestí prim, placenta, pulmó i leucòcits (Phay et al., 2000). Recentment, Augustin i col. (2004) han descrit l'existència de diferents formes d'*splicing* alternatives i també han demostrat, mitjançant l'expressió heteròloga en oòcits de *Xenopus*, que és un transportador de deoxiglucosa de baixa afinitat i no inhibible per citocalasina B. Més recentment aquest mateix grup ha demostrat que l'expressió de proteïna GLUT9 es veu incrementada en fetge i ronyó de ratolins diabètics per tractament amb estreptozotocina (Keembiyehetty et al., 2006).

El GLUT11 presenta una baixa afinitat pel transport de glucosa i per la unió de citocalasina B, i a més, el transport de glucosa és inhibit per fructosa (Doerge et al., 2001). S'han descrit tres isoformes generades per *splicing* alternatiu i el seu ARN missatger s'ha detectat en diversos teixits com el múscul esquelètic, cor, pàncrees, ronyó i placenta (Sasaki et al., 2001).

Transportadors de glucosa facilitats de classe III

Els transportadors de glucosa facilitats de classe III comprenen 5 membres: GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 i HMIT. A diferència dels transportadors de classe I i II, els transportadors d'aquesta subfamília es caracteritzen per tenir el primer domini extracel·lular més curt i sense lloc de glicosilació. En canvi, tenen el domini extracel·lular 9 més llarg que és on es troba aquest lloc de glicosilació (Joost et al., 2002).

El GLUT6 (inicialment conegut com GLUT9) s'ha definit com un transportador de baixa afinitat per la glucosa que s'expressa en cervell, melsa i en leucòcits perifèrics (Doerge et al., 2000a). A l'extrem amino-terminal presenta un motiu dileucina que direcciona la proteïna cap a compartiments intracel·lulars, encara que no ha estat

identificat l'estímul que indueix la translocació de la proteïna cap a la membrana plasmàtica (Lisinski et al., 2001).

El GLUT8 (inicialment anomenat GLUTX1) és un transportador d'elevada afinitat per la glucosa, amb una Km al voltant de 2 mM, encara que també pot transportar fructosa i galactosa i és inhibit per citocalasina B (Ibberson et al., 2000). Igual que el GLUT6, el GLUT8 també presenta un motiu dileucina a l'extrem amino-terminal que el fa ser internalitzat. L'ARN missatger del GLUT8 es troba principalment en testicle, encara que també es troba en menys quantitat en diversos teixits com el múscul esquelètic, cor, intestí prim i cervell (Doege et al., 2000b).

El GLUT10 s'expressa de manera predominant al fetge i al pàncrees, però també s'ha trobat expressió en múscul esquelètic, cor, cervell, placenta i ronyó (Dawson et al., 2001; McVie-Wylie et al., 2001). Quan el GLUT10 és expressat en oòcits de *Xenopus* presenta un transport de 2-deoxi-D-glucosa amb elevada afinitat que competeix amb el transport de D-glucosa i D-galactosa.

El GLUT12 és expressat principalment en cor i pròstata i s'ha vist que transporta glucosa quan és expressat en oòcits de *Xenopus* (Macheda et al., 2002; Rogers et al., 2003). Aquest transport de glucosa pot ser inhibit per D-galactosa i D-fructosa.

El transportador de mio-inositol acoblat a protons (HMIT) s'expressa predominantment al cervell i transporta de manera específica mio-inositol (Uldry et al., 2001). No s'hi ha pogut detectar activitat transportadora de glucosa. Per la seva expressió concentrada al cervell s'ha suggerit que aquest transportador pot jugar un paper important en el metabolisme del mio-inositol en aquest òrgan.

En aus també han estat identificades diverses isoformes de GLUTs. Concretament han estat clonades 4 isoformes: GLUT1, GLUT2, GLUT3 i GLUT8. El GLUT1 va ser clonat inicialment en fibroblasts d'embrió de pollastre i s'ha vist que presenta un 95% de similaritat als GLUT1 descrits en mamífers (Wagstaff et al., 1995). S'ha trobat expressió de GLUT1 en molts teixits, però la més elevada es troba en cervell i teixit adipós (Kono et al., 2005). Per altra banda, el GLUT2 ha estat identificat en

fetge de pollastre i la proteïna presenta una elevada homologia amb el GLUT2 humà i de rata (Wang et al., 1994). L'expressió de GLUT2 és exclusiva de fetge i ronyó (Kono et al., 2005). El GLUT3 ha estat clonat en fibroblasts d'embrió de pollastre (White et al., 1991) i s'expressa preferentment en cervell (Kono et al., 2005). El GLUT8, identificat en testicle de pollastre, té una identitat de seqüència del 56% amb el GLUT8 humà (Seki et al., 2003). Malgrat tenir una expressió ubíqua, aquest transportador s'expressa en major quantitat en ronyó i teixit adipós (Kono et al., 2005). D'altra banda, l'existència del GLUT4 en aus encara roman en discussió. Thomas-Delloye i col. (1999) van detectar una proteïna de pes molecular similar al GLUT4 en múscul esquelètic d'ànec utilitzant un anticòs contra el GLUT4 de rata. A més, van observar que aquesta proteïna incrementava la seva presència a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina, un fet característic de la isoforma GLUT4. Malgrat tot, diversos autors han intentat identificar molecularment aquest transportador en diverses espècies d'aus i no ho han aconseguit, pel qual han arribat a la conclusió que la isoforma GLUT4 és absent a les aus (Duclos et al., 1993; Seki et al., 2003; Sweazea and Braun, 2006).

En peixos, diversos estudis a principis dels anys 90 van començar a suggerir l'existència del transport facilitat de glucosa. Diferents treballs en eritròcits d'anguila i d'un ciclòstom van demostrar que el transport de glucosa era saturable, estereoespecífic i inhibit per citocalasina B (Soengas and Moon, 1995; Tse and Young, 1990; Young et al., 1994). Tiihonen i col. (1995) també van estudiar el transport de glucosa en eritròcits de carpa i van trobar que era inhibit per citocalasina B però, en canvi, no era saturable, pel qual van descartar que pogués estar mediat per transportadors de difusió facilitada. D'altra banda, estudis del transport de glucosa en múscul cardíac d'anguila i en cervell de truita irisada també suggerien l'existència de transportadors facilitats (Aldegunde et al., 2000; Rodnick et al., 1997). Fins i tot, amb l'ús d'anticòs contra el GLUT1 humà va ser detectada una proteïna de pes molecular similar al GLUT1 en els eritròcits d'un agnat i en cor i cervell de tilàpia (Wright et al., 1998; Young et al., 1994). Tanmateix, Wright i col. (1998) van analitzar l'expressió de GLUT4 en tilàpia emprant sondes i anticòs contra el GLUT4 de mamífer, però no van poder detectar la presència de GLUT4 en cap dels teixits estudiats, ni a nivell d'ARN ni de proteïna. D'altra banda, Legate i col. (2001) van estudiar el transport de glucosa en membranes de múscul blanc de tres espècies (anguila, truita irisada i peix gat) demostrant que era saturable i estereoespecífic, però no era inhibit per citocalasina B. Així mateix no van ser capaços

de detectar ARN missatger ni proteïna de GLUT1 i GLUT4 en múscul esquelètic i cor de cap de les tres espècies estudiades utilitzant sondes i anticossos contra les isoformes de mamífer. Per tant, van concloure que aquests transportadors eren absents en aquestes espècies. A l'any 2000 serien identificats a nivell molecular els primers transportadors de glucosa de difusió facilitada en peixos teleostis (Planas et al., 2000a; Teerijoki et al., 2000).

TRANSPORT MEDIAT PER GLUT4 EN MAMÍFERS

El GLUT4 s'expressa principalment en teixit adipós blanc, teixit adipós marró, en múscul esquelètic i múscul cardíac, encara que també s'expressa de forma discreta en altres teixits com el cervell i el ronyó que no participen en el manteniment de la normoglicèmia (Shepherd et al., 2000). El GLUT4 juga un paper clau en l'homeòstasi de la glucosa com a mediador de l'acció de la insulina estimulant la captació de glucosa en el teixit adipós i en el múscul esquelètic (Shepherd and Kahn, 1999). En estats de resistència a la insulina com l'obesitat o la diabetis tipus 2 l'expressió de GLUT4 és reduïda al teixit adipós, però no al múscul esquelètic (Shepherd and Kahn, 1999). Aquesta disminució de l'expressió en el teixit adipós no sembla ser massa important ja que el múscul esquelètic contribueix fins un 85% a l'eliminació de la glucosa que es produeix després d'una infusió de glucosa mentre que el teixit adipós hi contribueix molt menys (Basu et al., 2001). Per altra banda, la supressió de l'expressió de GLUT4 no comporta una resistència severa a la insulina ni tampoc diabetis (Watson et al., 2004a). De fet, malgrat els ratolins *knockouts* per GLUT4 tenen un període de vida més curt, retràs en el creixement i presenten anomalies en el teixit adipós i cardíac, només presenten lleus defectes en l'homeòstasi de la glucosa i no són diabètics (Katz et al., 1995). Aquests resultats suggereixen que el GLUT4 no és indispensable pel control de la glucèmia en els rosegadors. Tanmateix, també s'ha observat que els ratolins mascles als quals els manca un al·lel del GLUT4 presenten una resistència a la insulina acompanyada per hiperinsulinèmia i hiperglicèmia, i cap als 8 o 12 mesos ja presenten histopatologies diabètiques al cor i al ronyó (Stenbit et al., 1997). Encara es desconeix el motiu pel qual aquests ratolins heterozigots presenten un fenotip més sever que els *knockouts* homozigots per GLUT4. Per altra banda, també s'ha intentat estudiar la

funció del GLUT4 en determinats teixits eliminant l'expressió del gen específicament en un teixit determinat. D'aquesta manera, en ratolins, la supressió del gen *GLUT4* específicament al múscul esquelètic provoca resistència a la insulina i intolerància a la glucosa (Zisman et al., 2000). D'altra banda, la disrupció del gen *GLUT4* en teixit adipós comporta en els ratolins una captació de glucosa deficient i una hiperinsulinèmia (Abel et al., 2001). En aquests animals el teixit adipós és resistent a la insulina però, sorprenentment, el fetge i el múscul també desenvolupen resistència a la insulina, malgrat l'expressió de GLUT4 únicament ha estat eliminada en el teixit adipós. Per tant, sembla que l'afectació dels nivells d'expressió de GLUT4 en determinats teixits pot ser un factor que contribueixi a la resistència a la insulina en altres teixits perifèrics.

Regulació de l'expressió de GLUT4

L'expressió de GLUT4 està regulada tan a nivell transcripcional com a nivell post-transcripcional per un gran nombre de factors. D'entrada, el GLUT4 és típicament expressat per aquells teixits postnatsals o cèl·lules plenament diferenciades (Gray et al., 2002; Guillet-Deniau et al., 1994; Mitsumoto et al., 1991; Zorzano et al., 1998). Així, l'expressió de GLUT4 en cor, múscul esquelètic i en teixit adipós és baixa durant el període fetal de la rata i durant la fase perinatal es produeix una progressiva inducció tan a nivell d'ARN missatger com de proteïna GLUT4 (Santalucia et al., 1992). De la mateixa manera, Rosenblatt-Velin i col. (2004) han demostrat que la desdiferenciació de cardiomiòcits comporta una reducció en l'expressió de GLUT4. L'activació de la transcripció del gen *GLUT4* en múscul esquelètic i cardíac sembla que depèn de la cooperació entre els factors de transcripció MyoD, MEF2 i el TR γ 1 (receptor de l'hormona tiroidea) (Santalucia et al., 2001).

En el cas del múscul esquelètic l'expressió de GLUT4 també depèn del tipus de fibra muscular, ja que està comprovat que les fibres de contracció lenta (vermelles) i amb un predominant metabolisme oxidatiu tenen una major capacitat per transportar glucosa que les fibres de contracció ràpida (blanques) i glicolítiques (Bonen et al., 1981), degut a la presència més abundant de transportador GLUT4 (Camps et al., 1992; Kern et al., 1990; Marette et al., 1992). A més, l'expressió del GLUT4 en múscul

esquelètic humà disminueix amb l'edat, essent l'efecte més visible en el múscul vermell (Gaster et al., 2000).

La insulina sembla que té un paper important en la regulació de l'expressió del GLUT4, malgrat en alguns casos el seu efecte no està massa clar. En situacions d'insulinopènia com, per exemple, la diabetis induïda per estreptozotocina, el contingut d'ARN missatger i proteïna de GLUT4 disminueix en el teixit adipós, el múscul esquelètic i al cor (Bourey et al., 1990; Camps et al., 1992). Aquesta reducció de la quantitat d'ARN missatger s'ha vist que és deguda a la disminució de la taxa transcripcional del gen (Gerrits et al., 1993; Neuffer et al., 1993). A més, s'ha demostrat que els ratolins amb diabetis induïda per estreptozotocina i que han estat tractats posteriorment amb insulina recuperen els nivells basals d'expressió de GLUT4 (Olson and Pessin, 1995). Altres autors han demostrat que la hiperinsulinèmia incrementa la quantitat d'ARN missatger i proteïna GLUT4 en teixit adipós, mentre que en múscul esquelètic disminueixen tots dos paràmetres (Cusin et al., 1990). Els estudis *in vitro* dels efectes de la insulina sobre l'expressió de GLUT4 en cèl·lules musculars i adipòcits han donat resultats contradictoris. En cultius primaris de cèl·lules musculars humanes i cardiomiòcits de rata la insulina incrementa l'expressió de GLUT4 (Al-Khalili et al., 2005; Petersen et al., 1995), així com també en adipòcits de teixit adipós marró (Valverde et al., 1999). En canvi, s'ha demostrat que en cèl·lules musculars L6 i en adipòcits 3T3-L1 la insulina provoca una reducció dels nivells d'ARN missatger de GLUT4 (Flores-Riveros et al., 1993; Koivisto et al., 1991).

L'expressió de GLUT4 també és regulada per l'estat nutricional. Camps i col. (1992) han descrit que el contingut proteic de GLUT4 disminueix en teixit adipós, en múscul vermell i en cor després d'un període de dejuni, mentre que en múscul blanc roman invariable. Altres estudis, però, han obtingut resultats oposats en múscul esquelètic, postulant així que el dejuni provoca un increment del GLUT4 (Charron and Kahn, 1990; Kahn, 1994).

L'administració de dietes amb un elevat contingut de greix es coneix que provoca resistència a la insulina (Kraegen et al., 1986) i la disminució de l'expressió de GLUT4 en teixit adipós (Kahn, 1994). Per altra banda, sembla que els efectes inhibitoris d'aquestes dietes sobre l'expressió de GLUT4 en múscul esquelètic varien depenent de

la composició lipídica i de l'edat en la qual són administrades (Zorzano et al., 2005). Els factors que intervenen en la inhibició de l'expressió gènica de GLUT4 per dietes riques en greixos encara són desconeguts (Zorzano et al., 2005). Tanmateix, alguns estudis indiquen que l'àcid araquidònic redueix l'expressió de GLUT4 en adipòcits 3T3-L1 reprimint l'activitat transcripcional i reduint l'estabilitat del transcrit del GLUT4 (Tebbey et al., 1994).

La triiodo-L-tironina (T_3) s'ha descrit com un factor important per l'expressió de GLUT4 en múscul esquelètic i múscul cardíac, ja que s'ha demostrat que l'hipotiroïdisme congènit redueix el contingut de GLUT4 en aquests teixits (Castello et al., 1994; Ramos et al., 2001). El tractament amb T_3 d'aquells individus amb hipotiroïdisme incrementa l'expressió de GLUT4 en múscul cardíac (Castello et al., 1994). Per altra banda, l'administració d'hormona tiroidea en animals sans augmenta el transport basal de glucosa en múscul i teixit adipós, que en part és justificat per un augment en l'expressió de GLUT4 (Shepherd and Kahn, 1999).

Un altre factor que afavoreix el transport de glucosa en el múscul esquelètic és l'exercici (Dohm, 2002). Diversos estudis han descrit l'increment en el contingut de GLUT4 del múscul en resposta a l'exercici (Goodyear et al., 1992; Ploug et al., 1990; Rodnick et al., 1990). Així mateix, l'estimulació elèctrica del múscul també induïx l'expressió de GLUT4 (Etgen et al., 1993). S'ha demostrat que els efectes de l'exercici sobre l'expressió d'aquest transportador són tan a nivell transcripcional (MacLean et al., 2002) com a nivell traduccional (Kuo et al., 1999). Dohm (2002) ha suggerit la participació de la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK) en la via de senyalització que porta a la regulació de l'expressió del GLUT4 durant l'exercici, ja que aquesta proteïna és activada durant l'activitat física i s'ha demostrat que els agonistes d'aquesta proteïna incrementen la transcripció del gen *GLUT4* (Holmes et al., 1999).

La denervació també s'ha descrit com un altre element que modula l'expressió del GLUT4 en múscul esquelètic. Així, diferents estudis demostren que els nivells d'ARN missatger i de proteïna GLUT4 disminueixen en els músculs denervats de rata (Block et al., 1991) i conill (Castello et al., 1993).

Regulació de la localització subcel·lular del GLUT4

Abans que fossin identificats a nivell molecular els transportadors de glucosa, alguns autors ja van demostrar que la insulina era capaç d'incrementar la captació de glucosa en el teixit adipós i en el múscul esquelètic mitjançant la redistribució de transportadors de glucosa cap a la membrana plasmàtica (Cushman and Wardzala, 1980; Suzuki and Kono, 1980; Wardzala and Jeanrenaud, 1981). Més tard, amb el clonatge dels diferents GLUTs s'ha corroborat aquesta hipòtesi i s'ha identificat el GLUT4 com a mediador d'aquest efecte de la insulina (Slot et al., 1991; Zorzano et al., 1989).

El GLUT4, a diferència de la resta de membres de la família GLUT, es troba localitzat preferentment en compartiments intracel·lulars i només una petita fracció es troba a la membrana plasmàtica en estat basal (Dugani and Klip, 2005). De fet, el GLUT4 es troba contínuament viatjant entre la membrana plasmàtica i diversos compartiments intracel·lulars (Bryant et al., 2002; Watson et al., 2004a). Així, com la taxa d'exocitosi de les vesícules que contenen el GLUT4 és molt més lenta comparada amb la seva taxa endocítica, la major part del GLUT4 es troba a l'interior de la cèl·lula en absència d'estímul. L'arribada de la insulina i la posterior activació del seu receptor comporta una redistribució del GLUT4 cap a la superfície cel·lular degut a l'increment de l'exocitosi del transportador i, en menor grau, a la reducció de la seva internalització (Czech and Buxton, 1993; Jhun et al., 1992).

A l'interior de la cèl·lula el GLUT4 es troba de forma predominant en estructures vesiculars que són bioquímicament diferents de la xarxa de reciclatge endosomal però que probablement interaccionen amb aquesta (Martin et al., 2000). Aquest compartiment enriquit en GLUT4 s'ha vist que conté la proteïna VAMP2 (proteïna de membrana associada a vesícules-2) però no la isoforma VAMP3, la qual està present en els endosomes de reciclatge (Randhawa et al., 2000). Es coneix que la insulina mobilitza el GLUT4 d'aquest compartiment que conté VAMP2, el qual ha rebut el nom de "compartiment especialitzat" o "vesícules d'emmagatzematge de GLUT4" (Bryant et al., 2002; Dugani and Klip, 2005). Per altra banda, durant el seu viatge continu cap a la membrana plasmàtica i la seva posterior endocitosi, el GLUT4 passa per diversos compartiments intracel·lulars, incloent els endosomes i el TGN

(*trans-Golgi network*) (Kandror and Pilch, 1998; Ramm et al., 2000). S'han proposat 2 models per explicar l'emmagatzematge del GLUT4 i el seu tràfic intracel·lular en adipòcits 3T3-L1 (Dugani and Klip, 2005) (Fig. 3). El primer model proposa que tot el GLUT4 és reciclat cap a la membrana plasmàtica en estat basal, de manera que el magatzem intracel·lular de GLUT4 és dinàmic, i també postula que el compartiment especialitzat està totalment separat del TGN (Karylowski et al., 2004). En canvi, el segon model proposa que només una fracció del GLUT4 és reciclat cap a la membrana plasmàtica, que la insulina incrementa la quantitat de GLUT4 disponible per a ser translocat i que part del compartiment especialitzat del GLUT4 se solapa amb el TGN (Coster et al., 2004; Govers et al., 2004).

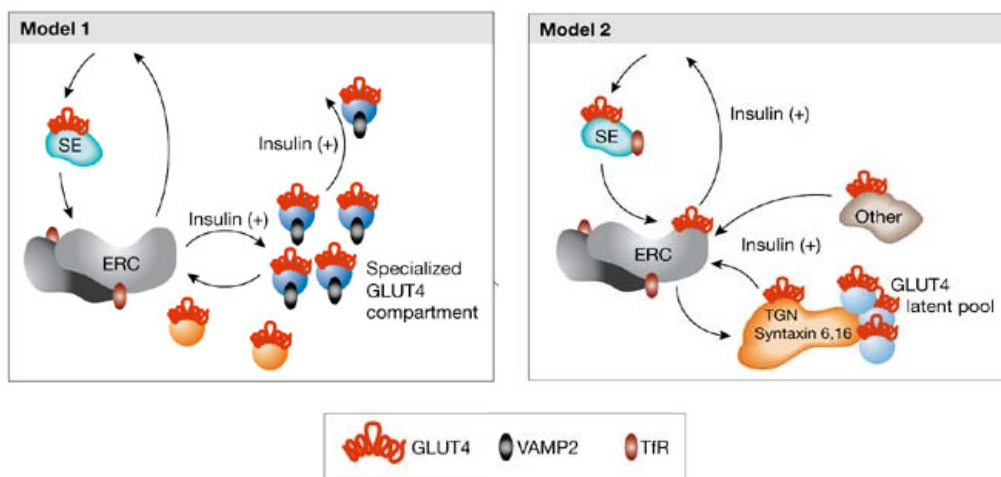


Fig. 3. Models de compartimentació intracel·lular i de sortida del GLUT4 cap a la membrana plasmàtica. Ambdós models difereixen en la suposada existència d'un pool estàtic de GLUT4, en la contribució del TGN com un lloc de magatzem de GLUT4 i en el número de rutes de sortida cap a la membrana plasmàtica. El símbol (+) indica estimulació. ERC, compartiment de reciclatge endosomal; SE, endosoma de separació; TfR, receptor de transferrina. Adaptat de Dugani i Klip (2005).

La via de senyalització que dona lloc a la translocació del GLUT4 cap a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina ha estat, i encara és, molt estudiada, però malgrat els notables avenços que s'han realitzat en aquest camp encara se'n desconeixen alguns aspectes (Fig. 4). Diversos autors han revisat aquest tema (Chang et al., 2004; Watson and Pessin, 2006; Zorzano et al., 2005). La interacció de la insulina amb el seu receptor indueix l'autofosforilació del receptor en residus de tirosina. El receptor d'insulina activat fosforila residus de tirosina a diverses molècules adaptadores com la família dels IRS (substrats del receptor d'insulina), Cbl i APS (substrat associat

a proteïna), entre d'altres. Un cop fosforilats, aquests substrats interaccionen amb una sèrie d'efectors o proteïnes adaptadores que contenen dominis SH2 (dominis d'homologia amb Src), els quals reconeixen específicament diferents residus de tirosina fosforilats. Existeixen diverses isoformes d'IRS, però l'IRS-1 i -2 són les que estan implicades en el transport de glucosa estimulat per la insulina (Tamemoto et al., 1994; Withers et al., 1998).

Les proteïnes IRS, un cop activades, interaccionen amb la subunitat reguladora p85 de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), el qual provoca l'activació de l'enzim i el seu reclutament cap a la membrana plasmàtica. L'activitat enzimàtica de la PI3K genera fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat (PIP₃), el qual regula la localització i activació de diverses proteïnes (Shepherd, 2005). La inactivació de la PI3K mitjançant inhibidors com la wortmanina bloqueja completament el transport de glucosa estimulat per insulina (Okada et al., 1994), indicant així que aquest enzim juga un paper clau en aquest procés. L'augment de PIP₃ promou el reclutament cap a la membrana plasmàtica de proteïnes que contenen dominis PH (dominis d'homologia a pleckstrina) (Cantley, 2002) com l'Akt i les PDK-1 i -2 (quinases dependents de 3'-fosfoinosotòsids) (Zorzano et al., 2005).

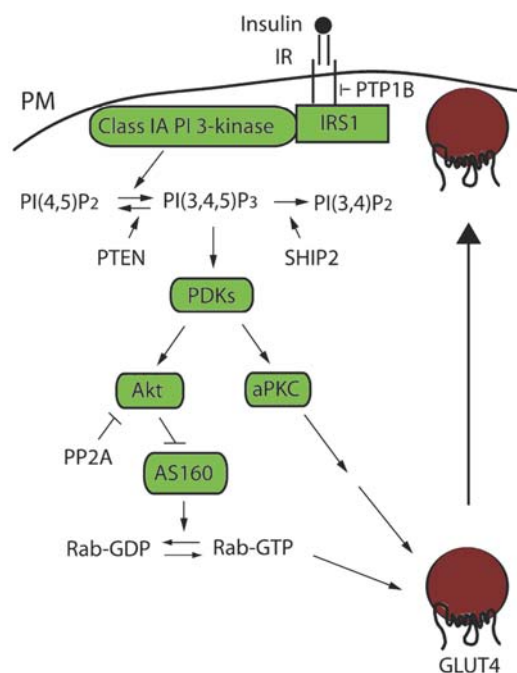


Fig. 4. Esquema de la via de senyalització dependent de PI3K que regula el tràfic del GLUT4. Adaptat d'Ishiki i Klip (2005).

Les quinases PDK són les responsables de la fosforilació de l'Akt i les aPKC (proteïnes quinases C atípiques). Les aPKC han estat implicades en els efectes de la insulina sobre la captació de glucosa en el múscul esquelètic i en els adipòcits (Farese, 2002). En el mateix sentit, també s'ha demostrat que l'Akt participa en la translocació del GLUT4 (Rea and James, 1997). S'han identificat diversos substrats candidats de l'Akt que potencialment poden estar implicats en la regulació del transport de glucosa; d'entre aquests hi destaca l'AS160 (substrat de l'Akt de 160 kDa). L'AS160 és una proteïna Rab-GAP (proteïna activadora de GTPases Rab) la qual es considera important per a la retenció intracel·lular del GLUT4 en adipòcits (Eguez et al., 2005), de manera que l'expressió disminuïda d'aquesta proteïna incrementa la presència del GLUT4 a la membrana plasmàtica (Larance et al., 2005).

Recentment, també s'ha descrit que la insulina regula el transport de glucosa a través d'una altra via de senyalització independent de la PI3K (Fig. 5). Aquesta via s'origina possiblement en aquelles regions de la membrana plasmàtica enriquides en colesterol, esfingolípids i glicolípids anomenades *lipid rafts*. El receptor d'insulina activat fosforila la proteïna Cbl i la proteïna APS (Ahmed et al., 1999; Ribon and Saltiel, 1997), la qual és necessària per la unió de Cbl al receptor d'insulina. La proteïna Cbl fosforilada interacciona amb la proteïna CAP (proteïna associada a Cbl) (Ribon et al., 1998) que a la seva vegada s'uneix també a la flotilina, una proteïna localitzada en els *lipid rafts* (Kimura et al., 2001). Aquesta interacció entre les proteïnes CAP i la flotilina és la que possibilita la localització de Cbl en els *lipid rafts* després de l'estimulació amb insulina (Baumann et al., 2000). Aleshores la proteïna Cbl fosforilada uneix la proteïna adaptadora CrkII, la qual a la seva vegada interacciona amb el factor intercanviador de guanilnucleòtids C3G. La proteïna TC10 és una proteïna G petita de la família Rho que es troba associada als *lipid rafts*. El factor C3G catalitza l'intercanvi de GDP per GTP en la proteïna TC10 (Khan and Pessin, 2002) passant-la al seu estat actiu. S'han identificat diverses molècules efectores que actuen per sota de TC10 però els mecanismes pels quals estimulen el moviment del GLUT4 cap a la membrana plasmàtica encara no estan massa clars (Chang et al., 2004). Tanmateix, se sap que TC10 uneix proteïnes implicades en la remodelació del citoesquelet d'actina i s'ha proposat que a través d'aquest mecanisme TC10 promou la translocació de GLUT4 en resposta a la insulina en adipòcits (Khan and Pessin, 2002). Alguns estudis indiquen que aquesta via de senyalització dependent de TC10 no participa en el reclutament del

GLUT4 cap a la membrana plasmàtica induït per insulina en cèl·lules musculars (JeBailey et al., 2004).

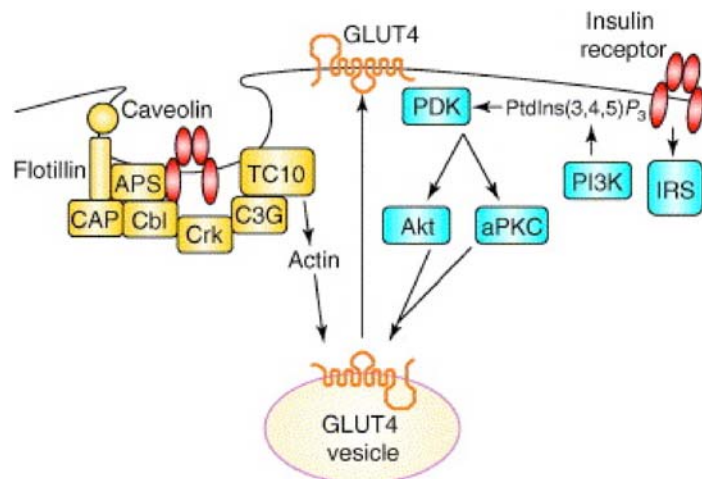


Fig. 5. Esquema de les vies de senyalització que participen en la translocació del GLUT4 en resposta a la insulina. Segons Watson et al., 2006.

La insulina no és l'únic factor que contribueix a afavorir el transport de glucosa modulant la presència del GLUT4 a la superfície cel·lular. En el múscul esquelètic la contracció muscular, l'exercici i la hipòxia també incrementen la captació de glucosa promovent la translocació del GLUT4 des de compartiments intracel·lulars fins a la membrana plasmàtica (Cartee et al., 1991; Douen et al., 1990; Lund et al., 1995) (Fig. 6). S'ha demostrat que aquests factors estimulen la translocació de GLUT4 per mecanismes independents a la via de la PI3K. La inhibició de la PI3K per wortmanina no inhibeix el transport de glucosa estimulat per l'activitat contràctil del múscul (Lund et al., 1995; Yeh et al., 1995). A més, diversos autors han suggerit que l'activació de la proteïna AMPK (quinasa activada per 5'-AMP), com a conseqüència de la reducció dels nivells d'ATP cel·lulars, està implicada en la translocació del GLUT4 en resposta a la contracció muscular (Buhl et al., 2001; Hayashi et al., 1998). Aquesta hipòtesi ha estat recolzada pels efectes de l'AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- γ -4-ribofuranòsid), una molècula activadora de l'AMPK, en el transport de glucosa en

múscul esquelètic. Així, diversos estudis han demostrat que l'AICAR incrementa el transport de glucosa i la translocació de GLUT4 en el múscul (Buhl et al., 2001; Hayashi et al., 1998). D'altra banda, Bruss i col. (2005) també han suggerit la implicació de l'AMPK en la fosforilació de la proteïna AS160 en resposta a la contracció muscular.

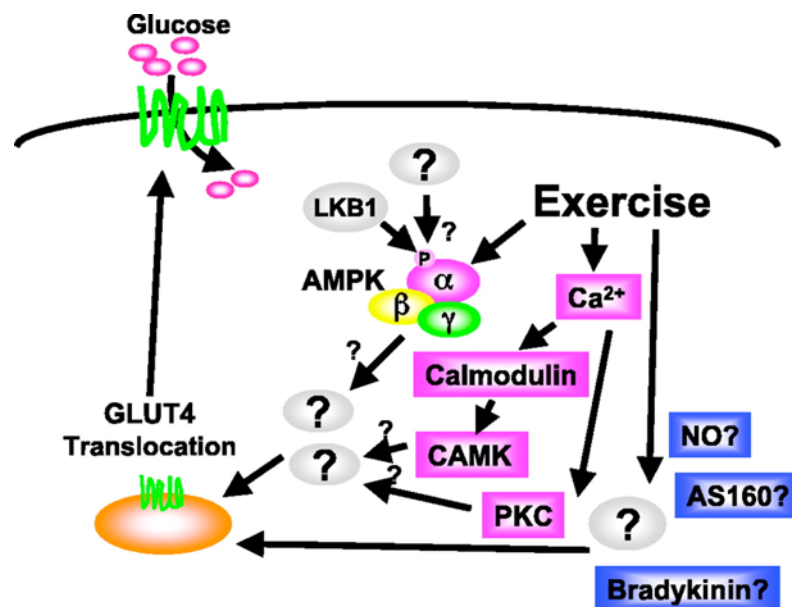


Fig. 6. Esquema de la possible via de senyalització que s'activa amb la contracció muscular i que provoca la translocació del GLUT4 cap a la membrana plasmàtica. Segons Jessen i Goodyear (2005).

TRANSPORT FACILITAT DE GLUCOSA EN PEIXOS

Malgrat les primeres evidències sobre l'existència de transportadors de glucosa de difusió facilitada en peixos ja sorgeixen durant els anys 90, fins l'any 2000 no es comencen a identificar a nivell molecular els primers transportadors en truita (Planas et al., 2000a; Teerijoki et al., 2000). Fins al moment han estat clonades 4 isoformes (GLUT1-4) en diferents espècies.

El GLUT1 va ser inicialment clonat en alevins de truita irisada (Teerijoki et al., 2000). La proteïna de 492 aminoàcids presenta entre un 77 i un 79% d'identitat amb els GLUT1 de pollastre i de mamífer. A més també presenta la seqüència d'aminoàcids GADSQ a l'extrem carboxi-terminal, la qual és un motiu característic de tots els GLUT1. S'ha detectat un nombre abundant de trànscrips de GLUT1 en el cor de truites adultes, així com un nivell d'expressió més baix en altres teixits com el múscul esquelètic, el fetge i el cervell. Els estudis d'hibridació *in situ* en embrions de truita han demostrat que l'expressió de GLUT1 ja és detectada en estadis molt primerencs del desenvolupament com l'estadi de blàstula (Teerijoki et al., 2001a). Per altra banda, la isoforma GLUT1 també ha estat identificada en una línia de cèl·lules epitelials de carpa (EPC) (Teerijoki et al., 2001b); és una proteïna de 478 aminoàcids que presenta un 78% d'identitat amb les seqüències aminoacídiques del GLUT1 de pollastre i de mamífer. Els estudis de transport de 3-O-metilglucosa (3-OMG) en aquesta línia cel·lular han demostrat que és un transport inhibït per citocalasina B i floretina, dues característiques pròpies del transport facilitat de glucosa. De fet, el GLUT1 de truita irisada ha estat expressat en un sistema heteròleg com són els oòcits de *Xenopus* (Teerijoki et al., 2001a), el qual és un sistema idoni que ha permès fer estudis cinètics i funcionals de la major part dels GLUTs identificats en mamífers. Els estudis funcionals del GLUT1 de truita en oòcits de *Xenopus* han demostrat que el transport de glucosa és saturable, estereoespecífic i que és inhibït per citocalasina B i floretina. A més, la constant d'afinitat del GLUT1 de truita per la glucosa es troba entre 8 i 15 mM, més elevada doncs que la del seu homòleg humà que és al voltant de 7 mM (Burant and Bell, 1992). També s'ha vist que el GLUT1 de truita a més de glucosa pot transportar manosa.

Més recentment, el GLUT1 també ha estat clonat en bacallà (Hall et al., 2004) i s'ha vist que el seu cDNA codifica per una proteïna de 489 aminoàcids que presenta un

85% i un 80% d'identitat amb la seqüència del GLUT1 de truita irisada i de carpa, respectivament, a la vegada que també mostra un 78% d'identitat amb el GLUT1 humà. Aquest transportador té una expressió àmpliament distribuïda en diferents teixits, encara que els nivells d'expressió més elevats es troben en cervell, brànquia, cor i ronyó. De la mateixa manera que el GLUT1 de truita, la seva expressió ja és detectada en els ous fertilitzats. En quant als canvis d'expressió enfront a diferents situacions fisiològiques, Hall i col. (2004) han demostrat que l'expressió de GLUT1 en el cor no es veu afectada ni pel dejuni ni per efecte de la temperatura. En canvi, després de mantenir els animals durant 24 hores en condicions d'hipòxia l'expressió de GLUT1 augmenta a les brànquies i disminueix a la melsa (Hall et al., 2005). En el mateix sentit, Capilla i col. (2002) també han demostrat que l'expressió de GLUT1 en múscul esquelètic de truita no varia després d'un període de dejuni.

El GLUT2 ha estat clonat en fetge de truita irisada (Krasnov et al., 2001) i el seu cDNA codifica per una proteïna de 483 aminoàcids que té un 58% i un 52% d'identitat amb les seqüències aminocídiques del GLUT2 d'aus i el de mamífer, respectivament. L'expressió de GLUT2 s'ha trobat en el fetge, ronyó i intestí d'animals adults.

El GLUT3 va ser identificat inicialment en ronyó de carpa (Zhang et al., 2003). El gen consta de 12 exons i 11 introns i codifica per un polipèptid de 533 aminoàcids el qual presenta una identitat de seqüència del 60% amb els GLUT3 d'altres espècies de vertebrats. És expressat sobretot en ronyó però també existeix una expressió més baixa a l'ull, la brànquia, al cervell, al cor, al fetge i al múscul esquelètic. S'ha demostrat que l'expressió d'aquest gen es veu induïda després d'un període d'hipòxia sobretot en el ronyó, però també a les brànquies i als ulls. Més recentment, ha estat clonat el GLUT3 en bacallà (Hall et al., 2004). Aquest transportador presenta una seqüència de 519 aminoàcids, amb un 66% d'identitat amb el GLUT3 de carpa i un 60-62% d'identitat amb els GLUT3 d'aus i mamífers. El teixit on es troba una expressió més abundant del GLUT3 és el ronyó, seguit de la melsa, les brànquies, el cervell i el cor, però el seu transcrit ha estat detectat a la resta de teixits analitzats. A diferència del que es dona en carpa, en el bacallà l'expressió de GLUT3 en resposta a la hipòxia només varia a la melsa, la qual presenta una reducció del contingut d'ARN missatger de GLUT3 en aquells animals sotmesos a un estat d'hipòxia durant 24 hores.

La isoforma GLUT4 va ser inicialment identificada en múscul vermell de truita comuna (Planas et al., 2000a). El seu cDNA codifica una proteïna de 503 aminoàcids que presenta un elevat grau de similitud (80%) amb les seqüències de GLUT4 de mamífers. La seqüència aminocídica d'aquest transportador, anomenat btGLUT4, conté alguns motius o residus característics dels GLUTs en general i del GLUT4 en particular (Fig. 7). Concretament, en el primer domini extracel·lular el btGLUT4 presenta un lloc de glicosilació que és característic dels transportadors de glucosa facilitats de classe I i II en mamífers. A més, el btGLUT4 també conté el motiu QLS en el domini transmembrana VII, el qual determina un lloc d'elevada afinitat pel reconeixement del substrat transportat (Seatter et al., 1998), així com els residus fenilalanina i glutamina en posicions 5 i 6 que semblen ser importants per a la internalització del GLUT4 humà (Garippa et al., 1994). El btGLUT4 s'expressa de forma predominant en múscul blanc i vermell, brànquia i ronyó, encara que també mostra una expressió més baixa en testicle, intestí, teixit adipós, cervell, fetge i cor (Planas et al., 2000a). S'ha estudiat la regulació de l'expressió del btGLUT4 *in vivo* en múscul esquelètic de truita (Capilla et al., 2002) realitzant diferents experiments dirigits a alterar els nivells d'insulina circulants. Així s'ha demostrat que l'expressió del btGLUT4 és regulada pels nivells d'insulina circulants en múscul vermell. En una situació en la qual disminueixen els nivells d'insulina en sang, com per exemple, després d'un període de dejuni, també es veu reduït el contingut d'ARN missatger de btGLUT4 en múscul vermell. De la mateixa manera, quan augmenten els nivells d'insulina plasmàtics, ja sigui com a conseqüència d'una injecció d'insulina o bé per un tractament amb arginina, la quantitat de transcrits de btGLUT4 també augmenta. En canvi, en el mateix estudi s'ha vist que l'expressió de btGLUT4 en el múscul blanc roman invariable enfront els canvis en els nivells d'insulina circulants. Per tant, sembla que la regulació de l'expressió del btGLUT4 és específica del tipus de fibra muscular.

	1				50
btGLUT4	MPPGFOHL.G	..GE...TV	TGTLALSVFT	AVLGSFQFGY	NIGVINAPQK
okGLUT4	MPSGFOQL.G	..GE...TV	TGTLALSVFT	AVLGSFQFGY	NIGVINAPQK
codGLUT4	MPAGFOQLNG	..GE...TV	TRTLALSVFT	AVLGSLQFGY	NIGVINAPQK
fuguGLUT4	MPTGFOQL.G	..GE...TV	TGTFVLSVFT	AVLGSLQFGY	NIGVINAPQK
ratGLUT4	MPSGFOQLGS	EDGEPPQQRV	TGTLVLAVFS	AVLGSLQFGY	NIGVINAPQK
	51				100
btGLUT4	IEEADYNATW	VHRYG...E	LIPTATLTPP	WSLSVAIFSI	GGMISSFCVG
okGLUT4	IEEADYNATW	VHRYG...E	PIPSSTLTTL	WSLSVAIFSI	GGMISSFCVG
codGLUT4	IEEQDYNATW	QHRYG...E	PISPGTLTSL	WSLSVAIFSI	GGMASSFCVG
fuguGLUT4	RIEGEYNATW	IHRYG...A	PIPAGTLTSL	WSLSVAIFSI	GGMLSSFCVG
ratGLUT4	VIEQSYNATW	LGRQGPGGPD	SIPQGTLTTL	WALSVAIFSV	GGMISSFLIG
	101				150
btGLUT4	VISEWLGRRK	AMLINNLFAF	IGGSLMGMAK	ISRSFEMMIL	GRFVIGAYCG
okGLUT4	VISEWLGRRK	AMLINNLFAF	IGGGLMGMAK	ISRSFEMMIL	GRFVIGAYCG
codGLUT4	FVSEWLGRRK	AMLINNLFAF	IGGGLMGMSK	ICRSIEMMVL	GRFVIGAYCG
fuguGLUT4	FVSEWLGRRK	AMLINNMFAx	IGxExxxLFP	.ARSFEMLIL	GRFVIGVYCG
ratGLUT4	IISQWLGRKR	AMLANNVLAV	LGGALMGLAN	AAASYEILIL	GRFLIGAYS
	151				200
btGLUT4	LASGLVPMYV	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILIAQVL	GLESLLGSEE
okGLUT4	LASGLVPMYV	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILMAQVL	GLESLLGSEE
codGLUT4	LASGLTPMYV	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILIAQVL	GLEALLGSEA
fuguGLUT4	LASGLTPMYV	GEIAPTSLRG	ALGTLHQLAI	VTGILIAQIL	GLDQLLGSBD
ratGLUT4	LTSGLVPMYV	GEIAPTHLRG	ALGTLNQLAI	VIGILVAQVL	GLESMLGTAT
	201				250
btGLUT4	LWPVLVGVTV	LPTVLQMAL	PFCPESPRFL	YIIRCQEHHA	KSGLRRLTGR
okGLUT4	LWPVLVGVTV	LPTVLQMVLL	PFCPESPRFL	YIIRSQEHHA	KSGLRRLTGR
codGLUT4	LWPVLLGVTV	LPTVLQMAL	PFCPESPRFL	YIVRSQEHQA	KNGLRRLTGR
fuguGLUT4	LWPLLLGVTV	VPTVLQMSFL	PFCPESPRFL	YIVRCQEHQA	KRGLKRLTGR
ratGLUT4	LWPLLLAITV	LPALLQLLLL	PFCPESPRYL	YIIRNLEGPA	RKSLKRLTGW
	251				300
btglutrt	QEVGDMLAEM	KEEKRRMDME	RKVSIAELFR	SPMYRQPIII	AILLQLSQQL
okGLUT4	QEVGDMLAEM	KEEKRRMDME	RKVSIAELFR	SPMYRQPIII	AILLQLSQQL
codGLUT4P	HDVGDLLAEM	KEEKRRMDME	RKVSIPELFR	SNVYRQPMFI	AILLQLSQQL
fuguGLUT4	LDVGDMLAEM	KEEKRRMEME	RKVSILELFR	SPVYRQPIII	SILLQLSQQL
ratGLUT4	ADVSDALAEI	KDEKRKLERE	RPLSLLQLLG	SRTHRQPLII	AVVLQLSQQL
	301				350
btGLUT4	SGVNAVFFYS	TSIFQKAGVQ	SPVYATIGAG	VVNSAFTVVS	LFLVERTGRR
okGLUT4	SGVNAIFYYS	TSIFQKAGVQ	SPVYATIGAG	VVNCAFTVVS	LFLVERTGRR
codGLUT4	SGVNAIFYYS	TSIFMKAGVQ	SPVYATIGAG	VVNCAFTVVS	LFLVERMGRR
fuguGLUT4	SGINAIFFYS	TSIFMKAGVQ	SPVYATIGAG	VVNCAFTVVS	LFLIERMGRR
ratGLUT4	SGINAVFFYS	TSIFELAGVE	QPAYATIGAG	VVNTVFTLVS	VLLVERAGR
	351				400
btGLUT4	TLHMLGLFGM	CGCAIVMTIA	LALLDSVPWM	SYISMLAIFG	FVAFFEIVGPG
okGLUT4	TLHMLGLSGM	CGCAIVMTMA	LALLDSVPWM	SYISMLAIFG	FVAFFEIVGPG
codGLUT4	TLHMLGLGGM	CVCALVMTIA	LALSDSIP..	PFVSMIAIFG	FVAFFEIVGPG
fuguGLUT4	TLHMIGLGGM	CVCVIMTAA	LALLDSIPWM	SYISMLAIYS	FVAFFEIVGPG
ratGLUT4	TLHLLGLAGM	CGCAILMTVA	LLLLERVPSM	SYVSIVAIFG	FVAFFEIVGPG
	401				450
btGLUT4	PIPWFFVAEL	FSQGPRPAAM	AVAGFSNNTA	NFIIGFGFQY	LAELCGPYVF
okGLUT4	PIPWFFVAEL	FSQGPRPAAM	AVAGFANNTA	NFIIGFGFQY	VAELCGPYVF
codGLUT4	PIPWFFVAEL	FSQGPRPAAM	AVAGFSNNTA	NFLIGMGFQS	LADLCGPYVF
fuguGLUT4	PIPWFFVAEL	FSQGPRPAAM	AVAGFCNNTA	NFIVGMCFQY	VANLCGPYVF
ratGLUT4	PIPWFFVAEL	FSQGPRPAAM	AVAGFSNNTC	NFIVGMGFQY	VADAMGPYVF
	451				500
btGLUT4	LIFAVLLFF	LIFTFFRVPE	TRGKTFDQIS	TSFSQHP.PA	M...MDLDMEL
okGLUT4	LIFAALLFF	LIFTFFRVPE	TRGKTFDQIS	NTFSKHS.PA	MIDMDLDMEL
codGLUT4	LIFAGLLFF	LVFTFFRVPE	TRGKTFDQIS	SSFGQRPVSG	MMDMDLGLDA
fuguGLUT4	LIFAALLFF	LIFTFFRVPE	TRGKTFDQIA	ADFHQHEGEG	MIDMDLN...
ratGLUT4	LLFAVLLGF	FIFTFLRVPE	TRGRTFDQIS	ATFRR..TPS	LIEQEV....
	501		518		
btGLUT4	GKRS	TELDYL	GGEGSLD~		
okGLUT4	GKHS	TELDYL	GEEGSLN*		
codGLUT4	DKLS	TELDCL	GGDLN~~		
fuguGLUT4	.KLS	TELEPF	GGDRDLN~		
ratGLUT4	.KPS	TELEYL	GPDENND~~		

Fig. 7. Alineament de les seqüències d'aminoàcids del GLUT4 de diferents espècies de peixos amb la del GLUT4 de rata (SwissProt: P19357). btGLUT4 (*Salmo trutta*, GenBank: AF247395), okGLUT4 (*Oncorhynchus kisutch*, GenBank: AF502957), codGLUT4 (*Gadus morhua*, GenBank: DQ109810), fuguGLUT4 (*Fugu rubripes*, clonat *in silico*, FuguCr_scaffold_18.307500-314500). Els motius importants pel tràfic del GLUT4 de mamífer es troben remarcats.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi es va publicar el clonatge del GLUT4 en teixit adipós de salmó (Capilla et al., 2004). El cDNA d'aquest transportador, anomenat okGLUT4, codifica per una proteïna de 505 aminoàcids que presenta una identitat de seqüència del 95% amb el GLUT4 de truita i és al voltant d'un 79% similar als GLUT4 de mamífer. Igual que el btGLUT4, l'okGLUT4 també conté el lloc de glicosilació en el primer domini extracel·lular, així com els residus fenilalanina i glutamina a l'extrem amino-terminal (Fig. 7). En aquest mateix treball s'han realitzat estudis bioquímics de l'okGLUT4 mitjançant la seva expressió en oòcits de *Xenopus*, demostrant que l'okGLUT4 és un transportador de glucosa funcional, i que aquest transport és estereoespecífic, saturable i inhibible per citocalasina B i etiliden glucosa. L'okGLUT4 té una constant d'afinitat per la glucosa (K_m) més baixa que el GLUT1 de truita (7.6 mM enfront a 8-15 mM). De la mateixa manera que el GLUT1 de truita, l'okGLUT4 presenta una constant d'afinitat per la glucosa major que el seu homòleg en mamífers (7.6 mM enfront a 5 mM). D'altra banda també s'ha demostrat que l'okGLUT4, quan és expressat transitòriament en adipòcits 3T3-L1, és capaç d'incrementar la seva presència a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina (Capilla et al., 2004) (Fig. 8) tal i com s'ha descrit prèviament pel GLUT4 de mamífer (Bryant et al., 2002).

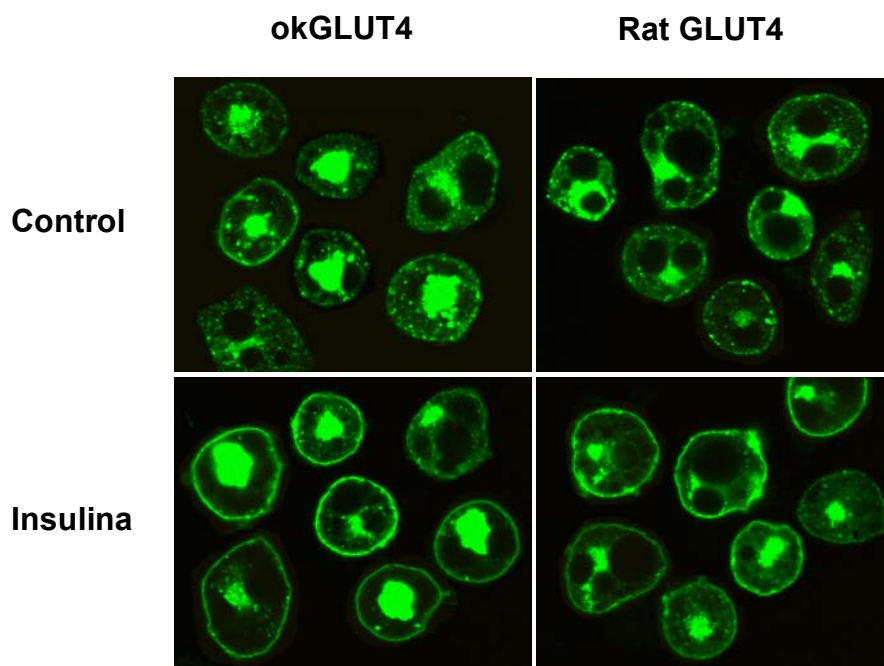


Fig. 8. Efectes de la insulina en la localització de les proteïnes de fusió okGLUT4-eGFP i ratGLUT4-eGFP. Adaptat de Capilla i col. (2004).

Malgrat l'existència d'aquests primers estudis sobre el GLUT4 en peixos teleostis, encara es desconeixen certs aspectes importants sobre la naturalesa i la regulació del GLUT4. Concretament, no es coneix la possible regulació de la insulina sobre el contingut de proteïna btGLUT4, el qual és important si tenim en compte que la proteïna finalment és la que exerceix la funció i que, per tant, permet la captació de glucosa per part del teixit muscular. Per altra banda, també es desconeix si la regulació observada a nivell del múscul vermell és deguda a l'acció directa de la insulina sobre el múscul esquelètic o bé si aquesta resposta és mediada per algun altre factor que actui com a intermediari. Per tant, serà important estudiar si la insulina té algun efecte sobre l'expressió de GLUT4 en cèl·lules musculars de truita. D'altra banda, s'ha descrit l'efecte de la insulina estimulants la translocació del GLUT4 de salmó cap a la membrana plasmàtica quan és expressat en cèl·lules de mamífer 3T3-L1, però encara no sabem si la insulina promou també la presència del GLUT4 de truita a la superfície cel·lular per tal d'afavorir el transport de glucosa i, el més important, si aquest fenomen es dona en cèl·lules de truita. Així doncs, serà interessant determinar la localització subcel·lular del GLUT4 de truita i estudiar com és regulat el tràfic del GLUT4 per la insulina.

Per tant, resoldre aquestes qüestions sobre el GLUT4 de truita ens ajudarà a entendre millor com es regula el transport de glucosa en el múscul esquelètic dels peixos teleostis i quin paper juga la insulina en aquest fenomen. A la vegada, la resposta a aquestes preguntes ens pot proporcionar una millor comprensió del metabolisme dels carbohidrats en peixos, així com poder determinar fins a quin punt el transport de glucosa és un factor important que contribueix a la dificultat dels peixos a utilitzar els carbohidrats de la dieta.

II. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat aprofundir en l'estudi d'un element clau en el metabolisme dels carbohidrats en peixos teleostis com és el transport de glucosa. Més concretament, s'ha estudiat el transport de glucosa en el múscul esquelètic de truita i el paper de la insulina regulant aquest procés, per tal de tenir un millor coneixement dels mecanismes que participen a la relativa intolerància a la glucosa que presenten aquests animals.

A partir d'aquest objectiu general, s'han definit els següents objectius més concrets:

1. Estudiar la possible regulació *in vivo* per part de la insulina de l'expressió del GLUT4 a nivell proteic en el múscul esquelètic de truita.
2. Estudiar l'expressió de GLUT4 i GLUT1 a nivell d'ARN missatger durant la diferenciació muscular en cultius primaris de cèl·lules musculars de truita i analitzar els efectes de la insulina i l'IGF-I sobre l'expressió d'aquests gens.
3. Conèixer la regulació del tràfic del GLUT4 de truita per part de la insulina en cèl·lules musculars. Generació d'una línia estable de cèl·lules musculars L6 que expressen el GLUT4 de truita.
4. Analitzar els efectes de la insulina sobre la localització subcel·lular del GLUT4 de truita i la captació de glucosa en cèl·lules musculars de truita.