



**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

IV. RESUM GENERAL

Els transportadors de glucosa de difusió facilitada (GLUTs) són proteïnes essencials per tal de permetre l'entrada de glucosa dins la cèl·lula. En mamífers han estat identificades dotze isoformes (GLUT1-12) amb diferents característiques cinètiques i amb un patró d'expressió tissular i regulació ben diferenciats. Concretament, el GLUT4 s'ha descrit com la isoforma més important per al manteniment de la glucèmia, ja que és mediador de l'acció de la insulina sobre els teixits diana per incrementar la taxa de captació de glucosa. Fins el moment en peixos solament s'han identificat quatre isoformes de GLUTs, i entre elles hi destaca el GLUT4, el qual va ser clonat per primera vegada en truita comuna (*Salmo trutta*) (Planas et al., 2000a). A l'inici d'aquesta tesi, ja hi havia evidències sobre la regulació de la insulina sobre l'expressió d'aquest transportador *in vivo* específicament en múscul vermell de truita (Capilla et al., 2002). No obstant, es desconeixia si l'acció de la insulina era un efecte directe sobre el teixit muscular o bé actuava a través d'altres mediadors. Per altra banda, tampoc es coneixia l'acció de la insulina sobre la proteïna GLUT4 de truita, un fet important si considerem que la proteïna en definitiva és la que exerceix la funció transportadora de glucosa. Per tant, en aquesta tesi ens hem proposat intentar resoldre aquestes qüestions per tal de poder contribuir a un millor coneixement d'un dels elements importants que intervé en el metabolisme de carbohidrats en peixos teleostis.

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

L'objectiu d'aquest treball ha estat analitzar el possible efecte de la insulina *in vivo* sobre el contingut de transportador GLUT4 en múscul esquelètic de truita. Per tal d'assolir aquest objectiu s'han realitzat una sèrie d'experiments *in vivo*, dels quals és ja conegut que provoquen canvis en els nivells d'insulina en sang (Capilla et al., 2002) i, posteriorment, s'ha avaluat la quantitat de proteïna GLUT4 en el múscul esquelètic. En concret, s'han portat a terme tres tipus d'experiments: un experiment de dejuni, un experiment d'injecció d'insulina i finalment, un experiment d'injecció d'arginina; el primer, dirigit a disminuir la quantitat d'insulina circulant, i el segon i tercer dirigits a augmentar els nivells d'insulina en sang. Els resultats obtinguts suggereixen que el contingut de proteïna GLUT4 en el múscul vermell està correlacionat amb els canvis

que es produeixen en els nivells d'insulina en sang i que, per tant, la insulina podria estar modulant la quantitat de GLUT4 present en aquest teixit. Així, hem observat que després de 24 hores del tractament amb insulina la quantitat de transportador GLUT4 augmenta en el múscul vermell de les truites injectades amb insulina. Prèviament, Capilla i col. (2002) han demostrat que l'augment de la insulina circulant induït per la injecció d'insulina també incrementa el contingut d'ARN missatger de GLUT4 en el múscul vermell 24 hores després del tractament. Això ens indica que l'augment de la insulina en plasma provoca un increment de l'expressió de GLUT4 de truita tant a nivell d'ARN missatger com de proteïna, pel qual sembla probable que la insulina estigui modulant l'expressió d'aquest transportador en múscul vermell mitjançant mecanismes pre-traduccional. De forma contrària al que s'ha descrit en peixos, Cusin i col. (1990) han demostrat que en mamífers un estat d'hiperinsulinèmia comporta una reducció del transportador GLUT4 en el múscul esquelètic, mentre que en el teixit adipós porta a un increment de la quantitat de GLUT4. Malgrat els nivells d'insulina circulants no han estat determinats en el nostre estudi, s'ha detectat que el tractament d'insulina ha tingut un efecte hipoglucèmic. Sis hores després del tractament s'ha vist que les truites injectades amb insulina presenten uns nivells de glucosa en sang més baixos que les truites injectades amb salí, demostrant així que el tractament amb insulina ha estat efectiu. Tot i que no hem analitzat la quantitat de GLUT4 present en el múscul esquelètic al cap de sis hores del tractament, és possible que el descens de la glucèmia sigui degut a un augment de les molècules de GLUT4 a la membrana plasmàtica de les fibres musculars. En un altre capítol d'aquesta tesi hem vist com l'acció de la insulina sobre les cèl·lules musculars induint l'expressió del GLUT4 és un efecte a llarg termini que requereix almenys 12 hores per a ser visible. Per altra banda, en aquesta tesi també s'ha demostrat que la insulina té un efecte ràpid sobre el GLUT4 de truita provocant la seva redistribució cap a la superfície cel·lular i incrementant així la capacitat de transport de glucosa de les cèl·lules musculars. Per tant, és possible que en la regulació de la glucèmia *in vivo* per insulina intervinguin dos mecanismes diferents: una acció ràpida, no transcripcional i una acció lenta, transcripcional.

En aquest estudi també s'ha realitzat un experiment d'injecció d'arginina. L'arginina és coneguda per ser un potent secretagog de la insulina en peixos, especialment en sàlmonids, essent fins i tot més efectiva que la pròpia glucosa estimulant la secreció d'insulina (Mommsen and Plisetskaya, 1991). Malgrat els nivells

d'insulina en sang solament han estat determinats 24 després del tractament, prèviament ja s'ha demostrat que els efectes insulínotropics de l'arginina són visibles a partir de 2 hores després de la injecció (Banos et al., 1997; Capilla et al., 2002; Parrizas et al., 1994; Plisetskaya et al., 1991). En aquest cas, el contingut de GLUT4 en el múscul vermell de les truites tractades amb arginina tendeix a augmentar, encara que aquest augment no és significatiu. En canvi, la quantitat d'ARN missatger del transportador sí que incrementa de manera significativa en resposta al tractament amb arginina (Capilla et al., 2002). Hem de tenir en compte, però, que l'arginina no només estimula la secreció d'insulina, sinó que també és inductora de la secreció d'altres hormones com el glucagó (Mommsen and Plisetskaya, 1991; Navarro et al., 2002). Per tant, l'absència d'un efecte clar sobre la quantitat de GLUT4 en el múscul vermell dels peixos tractats amb arginina ens indica que probablement existeixen altres factors que participen, juntament amb la insulina, en la regulació del contingut de GLUT4 en aquest teixit. És possible que aquests factors estiguin emmascarant l'acció de la insulina mitjançant mecanismes de regulació a nivell traduccional, ja sigui incidint en l'eficiència de traducció dels transcrits de GLUT4 o bé en la taxa de degradació de la proteïna. D'altra banda, els nivells de proteïna GLUT4 en el múscul vermell de truita es redueixen pràcticament a la meitat després d'un període de dejuni. Aquesta clara disminució del contingut proteic del GLUT4 en múscul vermell concorda amb la reducció de l'expressió del gen descrita anteriorment (Capilla et al., 2002). En mamífers, els nivells de proteïna GLUT4 també disminueixen en el múscul vermell d'animals dejunats encara que la quantitat de missatger no varia (Camps et al., 1992).

També hem analitzat els canvis en la quantitat de GLUT4 en el múscul blanc de truita en resposta als diferents experiments *in vivo*. Al contrari del que hem observat en el múscul vermell, el contingut de proteïna GLUT4 en múscul blanc no varia amb els augments de la concentració d'insulina en sang causats per la injecció d'insulina i arginina. En el mateix sentit, l'expressió de GLUT4 tampoc es veu afectada per l'increment d'insulina circulant (Capilla et al., 2002). En canvi, la quantitat de GLUT4 en múscul blanc és més baixa en les truites dejunades, mentre que els nivells d'ARN missatger no canvien (Capilla et al., 2002). Aquests resultats suggereixen l'existència d'una regulació diferent a nivell d'ARN i proteïna. Per tant, és possible que altres factors intervinguin en la regulació del GLUT4 en el múscul blanc a través de mecanismes post-transcripcionals que no són detectats a nivell d'ARN missatger. En

mamífers també s'observa un efecte diferent del dejuni sobre la quantitat d'ARN i proteïna GLUT4 en múscul blanc (Camps et al., 1992), però en aquest cas el contingut de GLUT4 no varia, mentre que en truita disminueix significativament.

Així doncs, la diferent regulació *in vivo* del contingut de GLUT4 en múscul vermell i múscul blanc posa de manifest que el GLUT4 és regulat de manera diferent segons el tipus de fibra muscular d'acord amb les seves propietats metabòliques. El múscul vermell està format per fibres musculars que tenen una quantitat de mitocondris més elevada i una major capacitat oxidativa que les fibres del múscul blanc, i paral·lelament també una taxa de transport de glucosa més alta. En els mamífers aquesta major capacitat de transport de glucosa del múscul vermell es correspon amb una expressió més elevada de GLUT4 (Camps et al., 1992; Kern et al., 1990; Marette et al., 1992). De la mateixa manera en truita també s'ha vist que el múscul vermell presenta uns nivells més alts d'ARN missatger (Capilla et al., 2002) i proteïna GLUT4 respecte el múscul blanc, el qual es tradueix amb una taxa de captació de glucosa més elevada (Blasco et al., 1996).

Efecte de la insulina sobre l'expressió *in vitro* del GLUT4 de truita

Per tal de determinar si l'efecte de la insulina sobre l'expressió gènica del GLUT4 de truita és degut a una acció directa de la insulina sobre el múscul esquelètic, així com per estudiar l'expressió d'aquest transportador al llarg del procés de miogènesi, s'ha utilitzat com a model experimental el cultiu primari de cèl·lules satèl·lit musculars de truita. Aquest tipus de cultiu ha estat prèviament ben caracteritzat (Fauconneau and Paboeuf, 2000; Rescan et al., 1995) i és una bona eina per a estudiar *in vitro* el procés de diferenciació muscular. D'aquesta manera, mitjançant la tècnica de PCR en temps real s'ha analitzat l'expressió del GLUT4 de truita durant els diferents estadis de diferenciació de les cèl·lules musculars, és a dir, durant el seu pas de mioblasts (cèl·lules mononuclears no diferenciades) a miotubs (cèl·lules multinucleades i diferenciades). Paral·lelament també ha estat determinada l'expressió de GLUT1, una altra isoforma de GLUT que també s'expressa en múscul esquelètic, tant en peixos com en mamífers (Capilla et al., 2002; Zorzano et al., 1996). L'expressió del GLUT4 de truita augmenta durant el procés de diferenciació muscular, tal i com ha estat descrit

prèviament en mamífers, ja sigui en cultius primaris (Al-Khalili et al., 2003; Guillet-Deniau et al., 1994) o en línies estables de cèl·lules musculars (Shimokawa et al., 1998). En canvi, l'expressió de GLUT1 en cèl·lules musculars de truita es manté força estable al llarg del cultiu o, si més no, la seva expressió incrementa molt poc si la comparem amb la del GLUT4. Aquest fet contrasta amb el que s'observa en mamífers, en els quals la diferenciació muscular va generalment lligada a una reducció de l'expressió de GLUT1 (Al-Khalili et al., 2003; Guillet-Deniau et al., 1994; Shimokawa et al., 1998).

S'han analitzat els canvis en els nivells d'ARN missatger del GLUT4 i GLUT1 de truita en resposta a la insulina i l'IGF-I. Els nostres resultats indiquen que la insulina i l'IGF-I estimulen l'expressió d'ambdós transportadors i que, en el cas de la insulina, es requereixen com a mínim entre 12 i 18 hores d'incubació prèvia amb l'hormona per tal de veure un increment significatiu en la quantitat d'ARN missatger. Els efectes estimuladors de la insulina sobre l'expressió del GLUT4 de truita en cèl·lules musculars en cultiu concorden amb les observacions fetes prèviament *in vivo*, les quals demostren que els nivells d'insulina en sang modulen l'expressió del GLUT4 de truita en múscul vermell, però no en múscul blanc (Capilla et al., 2002). Per altra banda, l'expressió de GLUT1, al no ser afectada *in vivo* pels canvis en els nivells d'insulina plasmàtics (Capilla et al., 2002) malgrat la seva estimulació *in vitro* per insulina, està possiblement sotmesa a una regulació en la que participen altres factors, juntament amb la insulina, que podrien modular l'acció d'aquesta.

També s'ha observat que el paper de la insulina regulant l'expressió del GLUT4 de truita varia segons l'estadi de diferenciació en el que es trobi la cèl·lula muscular. L'expressió del GLUT4 en resposta a la insulina augmenta significativament en miotubs, mentre que en mioblasts no es detecta un canvi significatiu. Aquest efecte més important de la insulina en cèl·lules musculars diferenciades suggereix que podria ser mediat, en part, pel receptor d'IGF-I. Castillo i col. (2002) han demostrat que en aquest cultiu primari de cèl·lules musculars de truita el nombre de receptors d'insulina és molt baix enfront al de receptors d'IGF-I i que el nombre de receptors d'IGF-I augmenta amb la diferenciació d'aquestes cèl·lules. Això també explica el fet que l'IGF-I tingui els mateixos efectes estimuladors de la insulina amb una concentració deu vegades més baixa. Per tant, és possible que la insulina s'uneixi al seu propi receptor i al receptor d'IGF-I per estimular l'expressió de GLUT4 en miotubs. En el cas del GLUT1, no s'ha

pogut determinar si la insulina exerceix una regulació diferencial d'aquest gen en funció del grau de diferenciació cel·lular, ja que no ha provocat canvis d'expressió en cap dels dos estadis analitzats (dia 2 i dia 10 de cultiu). En canvi, l'IGF-I sí que indueix clarament l'expressió del GLUT1 només a dia 2 i no a dia 10. L'IGF-I juga un paper molt important com a regulador dels processos de creixement, diferenciació, reproducció i metabolisme cel·lulars. Recentment, Castillo i col. (2004) han demostrat que l'IGF-I és un inductor de proliferació en cèl·lules satèl·lit musculars de truita en els primers dies en cultiu, pel qual es requerirà un major aport energètic i, per tant, una major entrada de substrats metabolitzables com la glucosa.

L'increment en la quantitat d'ARN missatger de GLUT4 en cèl·lules musculars de truita induït per la insulina pot ser degut a un augment de la taxa de transcripció del gen o bé a una major estabilitat del missatger. Els temps llargs d'incubació amb insulina que es necessiten per tal de detectar un canvi en l'expressió del GLUT4 (entre 12 i 18 hores) suggereixen que l'acció de la insulina podria ser la d'incrementar la taxa transcripcional del gen. Recentment s'han identificat a la seqüència del promotor de GLUT4 de *Fugu rubripes* possibles llocs d'unió a factors de transcripció com el MEF2, MyoD i C/EBP (Morata i Planas, resultats no publicats). Els llocs d'unió a aquests factors de transcripció estan presents a la seqüència del promotor del GLUT4 de mamífer i s'ha vist que són importants per a l'expressió específica de teixit i, en alguns casos, per als efectes estimuladors de la insulina (Ezaki, 1997; Hernandez et al., 2003; Thai et al., 1998). Per tant, no es pot descartar la possibilitat que la insulina moduli l'expressió del GLUT4 de truita mitjançant la regulació d'aquests factors de transcripció.

Regulació del tràfic del GLUT4 de truita

Per tal d'estudiar el tràfic del GLUT4 de truita (btGLUT4) i la seva regulació per la insulina s'ha generat una línia estable de cèl·lules musculars de rata (L6) que sobreexpressen el btGLUT4, al qual se li ha insertat en el primer domini extracel·lular l'epítoc c-myc (btGLUT4myc). Aquest model ja ha estat, i és encara, utilitzat per estudiar el tràfic del GLUT4 de mamífer (Rudich and Klip, 2003). D'aquesta manera ha

estat possible fer una comparació directa del tràfic del GLUT4 de rata amb el del GLUT4 de truita utilitzant el mateix model cel·lular.

La inserció de l'epítot myc al GLUT4 ens ha permès mesurar la quantitat de transportador insertat a la membrana plasmàtica mitjançant un mètode colorimètric (Wang et al., 1998) i a la vegada també diferenciar el GLUT4 sobreexpressat del GLUT4 endogen. Els nostres resultats indiquen que la insulina és capaç d'incrementar la quantitat de btGLUT4myc a la membrana plasmàtica, però en menor mesura que el GLUT4myc de rata. Aquest menor efecte de la insulina sobre el btGLUT4 probablement s'explica pel fet que en estat basal les cèl·lules L6 que expressen el btGLUT4myc (L6-btGLUT4myc) mostren un major percentatge de GLUT4myc a la superfície cel·lular que no pas aquelles que sobreexpressen el GLUT4 de rata. Aquests resultats concorden amb estudis fets prèviament amb el GLUT4 de salmó (okGLUT4) (Capilla et al., 2004). L'okGLUT4 també és translocat a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina quan és expressat de manera transitòria en adipòcits 3T3-L1. De la mateixa manera, l'okGLUT4 també es presenta en major quantitat a la membrana plasmàtica en estat basal que no pas el GLUT4 de rata, malgrat que la diferència és menor que amb el btGLUT4. També s'ha observat que l'acció de la insulina induint la translocació del btGLUT4myc és independent de l'estadi de diferenciació de les cèl·lules, ja que tant a mioblasts com a miotubs l'efecte de la insulina va ser similar. D'altra banda s'han provat diferents temps d'estimulació amb insulina i posteriorment s'ha mesurat la quantitat de GLUT4myc a la superfície cel·lular. Els resultats obtinguts indiquen que les cèl·lules L6-btGLUT4myc requereixen 10 minuts d'incubació amb insulina per tal de mostrar un augment significatiu del btGLUT4myc a la membrana plasmàtica. En canvi, les cèl·lules que expressen el GLUT4myc de rata ja presenten uns nivells més elevats de GLUT4myc a la superfície cel·lular després de 5 minuts d'incubació amb insulina.

Per altra banda, també s'ha analitzat l'efecte del xoc hiperosmòtic sobre l'acumulació de GLUT4myc a la membrana plasmàtica. Aquest xoc hiperosmòtic va ser induït amb la incubació de les cèl·lules amb un medi que contenia sacarosa 0.45 M. S'ha vist que el btGLUT4myc no augmenta la seva presència a la membrana plasmàtica en resposta al xoc hiperosmòtic, ja sigui en mioblasts o en miotubs. A més, provant diferents temps d'incubació amb sacarosa (5, 10, 20 i 40 minuts) tampoc s'ha observat

en cap cas un increment del transportador a la superfície cel·lular. En canvi, és ben conegut que la hiperosmolaritat afavoreix la presència del GLUT4 de mamífer a la membrana plasmàtica. En mamífers s'ha demostrat que el xoc hiperosmòtic augmenta la quantitat de GLUT4 a la superfície cel·lular implicant la seva endocitosis des de la membrana plasmàtica (Li et al., 2001) i, en menor grau, incrementant la seva taxa d'exocitosis (Randhawa et al., 2004). Li i col. (2001) han suggerit que la hiperosmolaritat inhibeix l'endocitosis del GLUT4 de rata evitant la formació de vesícules recobertes de clatrina (Hansen et al., 1993). Per tant, la ineficiència de la sacarosa sobre el btGLUT4 suggereix que, el GLUT4 de truita, a diferència del GLUT4 de rata, podria ser internalitzat per un mecanisme independent de clatrina.

També s'ha examinat el transport de glucosa induït per insulina a les cèl·lules L6-btGLUT4myc i s'ha comparat amb el de les cèl·lules L6 que sobreexpressen el GLUT4myc de rata i amb el de cèl·lules L6 no transfectades (*wild-type*). La insulina estimula de manera dosi-dependent el transport de glucosa en totes tres línies cel·lulars, tant en estadi de mioblast com de miotub. En canvi la taxa de captació de glucosa expressada en valors absoluts (pmols 2-DG/min/mg proteïna) varia bastant entre les diferents línies, essent més elevada en les cèl·lules que sobreexpressen el GLUT4 de rata comparada amb la de les cèl·lules L6-btGLUT4myc. Aquesta diferència és deguda, en part, al menor nivell de sobreexpressió del btGLUT4myc respecte el del GLUT4myc de rata, però la raó principal es troba en la menor afinitat per la glucosa que tenen els GLUTs de peix (almenys el GLUT4 i el GLUT1) respecte els GLUTs de mamífer (Capilla et al., 2004; Teerijoki et al., 2001a). A més, també s'ha estudiat l'efecte de la hiperosmolaritat en la taxa de captació de glucosa. Les cèl·lules L6-btGLUT4myc han mostrat un cert augment del transport de glucosa en resposta al xoc hiperosmòtic, malgrat la manca de resposta en translocació del btGLUT4myc cap a la membrana plasmàtica. Aquest efecte podria ser degut a la resposta dels GLUTs que expressen aquestes cèl·lules de forma endògena enfront a un entorn hiperosmòtic, un efecte que no és detectat en els experiments de translocació ja que només són quantificats els transportadors marcats amb l'epítip myc (btGLUT4myc). En suport a aquesta hipòtesi, Barros i col. (2001) han demostrat que un xoc hiperosmòtic induïx la translocació i activació del GLUT1 en una línia cel·lular epitelial de fetge de rata.

D'altra banda també s'ha avaluat la sensibilitat del transport de glucosa a la citocalasina B en cèl·lules L6-btGLUT4myc i en cèl·lules L6 que expressen el GLUT4myc de rata. La citocalasina B és un conegut inhibidor del transport facilitat que s'uneix a la part intracel·lular del transportador (Ribe et al., 2005). S'ha vist que les cèl·lules que sobreexpressen el GLUT4myc de rata són més sensibles a la citocalasina B que no pas les L6-btGLUT4myc. Donat que ambdues línies cel·lulars només difereixen en el tipus de GLUT4 expressat hem de pensar que la diferent sensibilitat a la citocalasina B rau precisament en aquest punt. Per tant, sembla que el GLUT4 de truita seria més resistent a la inhibició per citocalasina B probablement degut a diferències en la seqüència aminoacídica que provoquen canvis en la conformació del lloc d'unió a l'inhibidor.

Per altra banda, també s'ha estudiat la internalització del GLUT4myc i s'ha observat que després de 2 minuts d'endocitosi la quantitat de btGLUT4myc present a la membrana plasmàtica és més elevada que la de GLUT4myc de rata. A més, la insulina evita en part l'endocitosi del GLUT4 de rata però no té cap efecte sobre la internalització del btGLUT4.

Les diferències observades entre el tràfic del GLUT4 de truita i el del GLUT4 de rata podrien estar relacionades amb diferències en la seqüència de determinats motius que s'han considerat importants en la internalització i la localització intracel·lular del GLUT4 de mamífer. El motiu dileucina a l'extrem carboxi-terminal s'ha demostrat que juga un paper clau en la internalització i la retenció intracel·lular del transportador (Corvera et al., 1994; Haney et al., 1995). A més, també s'ha demostrat que un pèptid que conté el motiu dileucina a l'extrem carboxi-terminal del GLUT4 de mamífer interacciona amb el complex adaptador de clatrina AP-1 (Rapoport et al., 1998). Curiosament aquestes dues leucines en posició 489 i 490 no hi són a la seqüència del GLUT4 de truita. Això explicaria la menor taxa d'endocitosi i també la major presència del transportador a la membrana plasmàtica en estat basal. El motiu dileucina també s'ha vist que està implicat en el pas del GLUT4 des del TGN (*trans-Golgi network*) fins el compartiment sensible a la insulina (Martinez-Arca et al., 2000; Sandoval et al., 2000), el qual justificaria la menor resposta a la insulina que presenta el btGLUT4 en quant a translocació cap a la superfície cel·lular. És possible que l'absència d'aquestes dues leucines pugui provocar en certa manera un direccionament incorrecte del

transportador portant-lo cap a la membrana plasmàtica en comptes de ser retingut en el compartiment de resposta a la insulina. A més, al GLUT4 de truita també li manquen dos residus d'arginina situats en posició -4 i -5 respecte el motiu dileucina que també sembla que són importants per a l'endocitosi del transportador (Sandoval et al., 2000). Per altra banda, altres autors han remarcat la importància del motiu FQQI (situat a l'extrem amino-terminal del GLUT4 de mamífer) en la localització intracel·lular del transportador de mamífer (Al-Hasani et al., 2002; Garippa et al., 1994; Khan et al., 2004). Aquest motiu està parcialment conservat en el GLUT4 de truita (FQHL) però encara manté el residu de fenilalanina, el qual sembla ser essencial de cara al correcte tràfic del GLUT4. La importància relativa de tots aquests motius en el tràfic del GLUT4 de truita és una qüestió pendent de resoldre, que es podria abordar mutant individualment aquests residus i mirant com és modificat el tràfic del transportador.

Un cop caracteritzat inicialment el tràfic del GLUT4 de truita en un sistema heteròleg com és la línia cel·lular L6, ens ha interessat saber realment com aquest transportador respon a la insulina en aquelles cèl·lules on s'expressa normalment, és a dir, en cèl·lules musculars de truita. Així, hem emprat altre cop com a eina el cultiu primari de cèl·lules satèl·lit musculars en el qual prèviament havíem detectat l'expressió de GLUT4. Tenint en compte que Castillo i col. (2004) ja havien demostrat que la insulina incrementava la taxa de captació de glucosa en aquestes cèl·lules, tot feia pensar que aquest efecte de la insulina era probablement causat per un increment en la quantitat de GLUT4 a la superfície cel·lular. Per tant, utilitzant una tècnica de purificació de membranes plasmàtiques i posteriorment per western blot hem determinat la presència del GLUT4 a la membrana plasmàtica en cèl·lules incubades en absència o presència d'insulina durant 30 minuts. Els nostres resultats ens indiquen que el GLUT4 de truita es transloca cap a la superfície cel·lular en resposta a la insulina i que, com a conseqüència, la capacitat per a transportar glucosa es veu incrementada a les cèl·lules musculars. També hem detectat que la insulina ja estimula la captació de glucosa amb tan sols 5 minuts d'incubació, el qual fa pensar que probablement el btGLUT4 ja és translocat a la membrana plasmàtica en aquest curt període de temps. Aquesta ràpida translocació del btGLUT4 en resposta a la insulina també l'havíem observat en les cèl·lules L6, malgrat en aquell cas eren necessaris entre 5 i 10 minuts per a detectar un increment del transportador a la superfície cel·lular. Per altra banda l'efecte tan ràpid de

la insulina estimulant la taxa de captació de glucosa també s'ha descrit a la línia cel·lular L6 (Niu et al., 2003; Somwar et al., 2001).

També s'ha investigat el paper de l'indinavir com a inhibidor del transport de glucosa en les cèl·lules musculars de truita. L'indinavir és un agent inhibidor de proteases del VIH (virus d'immunodeficiència humana) que és utilitzat com a fàrmac retroviral. Prèviament s'ha demostrat que l'indinavir inhibeix preferentment el transport de glucosa mediat pel GLUT4 de manera no-competitiva quan és afegit en el medi de transport (Murata et al., 2002). En cèl·lules musculars de truita l'indinavir va causar una reducció del 25% en el transport basal de glucosa, però només va reduir un 9% el transport de glucosa estimulat per insulina. Aquests resultats s'han d'interpretar amb cura. En mamífers encara no és ben conegut el mecanisme pel qual l'indinavir inhibeix el GLUT4, però alguns autors han suggerit que l'indinavir s'uneix al GLUT4 de manera no covalent i suposadament a la cara citoplasmàtica del transportador (Hertel et al., 2004). És possible que l'indinavir no sigui igual d'efectiu inhibint el GLUT4 de truita que el GLUT4 de mamífer, igual com passava amb la citocalasina B, degut a diferències en l'estructura primària de la proteïna. També desconeixem fins a quin punt el GLUT1 de truita, el qual també s'expressa en aquestes cèl·lules, és sensible a aquest inhibidor. Tot això fa difícil a partir d'aquests resultats arribar a una hipòtesi concloent sobre l'efecte de l'indinavir en el transport de glucosa d'aquestes cèl·lules musculars.

Per tal d'estudiar la localització subcel·lular del btGLUT4 en estat basal hem utilitzat la tècnica d'immunofluorescència comparant cèl·lules musculars a dia 5 de cultiu (encara mononucleades) amb cèl·lules a dia 10 (multinucleades i plenament diferenciades). En principi el senyal és molt més intens en cèl·lules diferenciades, el qual concorda amb l'expressió més elevada de GLUT4 trobada anteriorment en aquestes cèl·lules. En general, el GLUT4 de truita en estat basal es troba localitzat a l'interior de la cèl·lula però preferentment concentrat al voltant del nucli, en compartiments perinuclears. Per tant sembla que el btGLUT4 té una distribució intracel·lular similar a la del GLUT4 de mamífer (Baque et al., 1998; Thong et al., 2005; Zeigerer et al., 2004).

En resum, els resultats obtinguts indiquen que la regulació del transport de glucosa en el múscul esquelètic per part de la insulina és un mecanisme que es troba conservat al llarg de l'evolució dels vertebrats. Així, la insulina exerceix una doble

acció sobre el transportador GLUT4 en el múscul esquelètic de truita. Per una banda, té un efecte ràpid sobre el transportador provocant la seva redistribució dins les cèl·lules musculars i afavorint la seva presència a la membrana plasmàtica, i, per altra banda, té un efecte més a llarg termini incrementant la síntesi de noves molècules de transportador, molt probablement estimulant la transcripció del gen GLUT4. D'aquesta manera s'aconsegueix incrementar la capacitat de transport de glucosa en el múscul esquelètic en resposta a l'augment d'insulina en sang que es produeix durant l'estat postprandial o per una injecció d'insulina exògena. Per tant, sembla que els mecanismes bàsics reguladors de la insulina sobre el transport de glucosa ja són presents en els peixos teleostis, de manera que no suposen una limitació a l'hora de regular la glucèmia. Amb les dades que disposem fins ara podem dir que el pas limitant pel transport de glucosa en el teixit muscular probablement seria la més baixa afinitat per la glucosa que presenten aquests transportadors de difusió facilitada en els peixos. Per altra banda, també és possible que el múscul esquelètic dels peixos tingui un nombre més petit de transportadors el qual provoca que comparativament amb mamífer presenti una menor activitat transportadora de glucosa. Així doncs, la poca capacitat que tenen en general els peixos per utilitzar els carbohidrats com a font d'energia podria ser explicada, en part, per una baixa activitat transportadora de glucosa en el múscul esquelètic deguda a un nombre menor de transportadors i a la seva baixa afinitat. A més, malgrat que els mecanismes bàsics de regulació per la insulina ja existeixen, hi ha alguns elements reguladors del GLUT4 que encara no són prou eficients, com és per exemple el mecanisme de retenció intracel·lular. Hem vist que en estat basal el GLUT4 de truita es troba en major proporció a la membrana plasmàtica comparat amb el GLUT4 de mamífer. Per tant, l'efecte ràpid de la insulina augmentant el nombre de molècules de GLUT4 a la superfície cel·lular és menor. Aquest factor, juntament amb la menor afinitat i la menor expressió de transportador pot contribuir a que els peixos necessitin un període de temps més llarg per a revertir un estat hiperglucèmic. Per tant, podem concloure que els peixos teleostis no són intolerants a la glucosa ja que disposen d'un sistema de regulació de la glucèmia, encara que aquest és menys eficient que el que posseeixen els mamífers.

V. CONCLUSIONS

1. La insulina regula els nivells de proteïna GLUT4 *in vivo* en múscul esquelètic de truita. La quantitat de GLUT4 en múscul vermell ha disminuït amb el dejuni i ha augmentat amb el tractament amb insulina. En el múscul blanc només s'ha detectat una reducció en l'expressió de GLUT4 a nivell de proteïna durant el dejuni.
2. Els canvis observats en el contingut de proteïna GLUT4 *in vivo* concorden en general amb els canvis observats prèviament a nivell d'ARN missatger. Per tant, sembla que l'expressió de GLUT4 és regulada per la insulina en múscul esquelètic i que es tracta d'una regulació diferent segons el tipus de fibra muscular.
3. L'expressió de l'ARN missatger de GLUT4 en cèl·lules satèl·lit musculars de truita augmenta durant el procés de diferenciació muscular. La insulina i l'IGF-I estimulen l'expressió de GLUT4. L'efecte de la insulina requereix una incubació de 18 hores per tal que sigui significatiu. L'acció estimuladora de la insulina i l'IGF-I incrementant la quantitat d'ARN missatger de GLUT4 és més important en cèl·lules diferenciades que en cèl·lules no diferenciades.
4. L'expressió de l'ARN missatger de GLUT1 en cèl·lules satèl·lit musculars de truita incrementa també durant la diferenciació d'aquestes cèl·lules però de forma molt més modesta que el GLUT4. La insulina i l'IGF-I promouen l'acumulació d'ARN missatger de GLUT1 en les cèl·lules musculars. És necessària una incubació d'almenys 12 hores amb insulina per tal de detectar un increment significatiu en l'expressió de GLUT1. L'efecte de l'IGF-I sobre l'expressió de GLUT1 és més pronunciat en cèl·lules no diferenciades, probablement degut als majors requeriments energètics que presenten aquestes cèl·lules en estat proliferatiu.
5. S'ha generat una línia estable de cèl·lules musculars L6 que expressen el GLUT4 de truita (btGLUT4) al qual se li ha insertat en el primer domini extracel·lular l'epítip myc (btGLUT4myc). El btGLUT4myc augmenta la seva presència a la membrana plasmàtica en resposta a la insulina, però en menor mesura que el GLUT4myc de rata, possiblement degut a que en estat basal un

major percentatge de btGLUT4myc és ja present a la superfície cel·lular. Les cèl·lules L6 que expressen el btGLUT4myc requereixen un temps més llarg d'incubació amb insulina per tal de mostrar un augment significatiu del btGLUT4myc insertat a la membrana plasmàtica.

6. La captació de glucosa en les cèl·lules L6-btGLUT4myc és estimulada per la insulina de manera dosi-dependent. La taxa basal de captació de glucosa en les cèl·lules L6-btGLUT4myc és més baixa que en les cèl·lules L6 que expressen el GLUT4myc de rata, d'acord amb el nivell més baix d'expressió del btGLUT4myc i la menor afinitat per la glucosa que presenta el GLUT4 de peix. Així mateix, la taxa d'internalització del btGLUT4myc és més baixa que la del GLUT4 de rata i no es veu afectada per la insulina. A diferència del GLUT4 de rata, el btGLUT4myc no s'acumula a la membrana plasmàtica en resposta a un xoc hiperosmòtic, la qual cosa suggereix que l'endocitosi del btGLUT4 podria ser independent de clatrina.
7. La insulina incrementa la presència del btGLUT4 a la membrana plasmàtica en cèl·lules musculars de truita, afavorint paral·lelament la capacitat per a transportar glucosa. Els efectes de la insulina sobre la captació de glucosa ja són visibles al cap de 5 minuts d'incubació amb l'hormona.
8. Els estudis d'immunofluorescència demostren que, en cèl·lules musculars de truita, el btGLUT4 es troba en compartiments intracel·lulars i concentrat a la regió perinuclear. Així mateix, també s'observa que el marcatge del btGLUT4 és més intens en els miotubs, d'acord amb la major expressió de GLUT4 detectada en les cèl·lules musculars diferenciades.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abel, E. D., Peroni, O., Kim, J. K., Kim, Y. B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. I. and Kahn, B. B.** (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* **409**, 729-33.
- Ahmed, Z., Smith, B. J., Kotani, K., Wilden, P. and Pillay, T. S.** (1999). APS, an adapter protein with a PH and SH2 domain, is a substrate for the insulin receptor kinase. *Biochem J* **341** (Pt 3), 665-8.
- Al-Hasani, H., Kunamneni, R. K., Dawson, K., Hinck, C. S., Muller-Wieland, D. and Cushman, S. W.** (2002). Roles of the N- and C-termini of GLUT4 in endocytosis. *J Cell Sci* **115**, 131-40.
- Al-Khalili, L., Chibalin, A. V., Kannisto, K., Zhang, B. B., Permert, J., Holman, G. D., Ehrenborg, E., Ding, V. D., Zierath, J. R. and Krook, A.** (2003). Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content. *Cell Mol Life Sci* **60**, 991-8.
- Al-Khalili, L., Forsgren, M., Kannisto, K., Zierath, J. R., Lonnqvist, F. and Krook, A.** (2005). Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1. *Diabetologia* **48**, 1173-9.
- Aldegunde, M., Andres, M. D. and Soengas, J. L.** (2000). Uptake of 3-O-methyl-D-[U-14C]glucose into brain of rainbow trout: possible effects of melatonin. *J Comp Physiol [B]* **170**, 237-43.
- Anderson, J., Jackson, A. J., Matty, A. J. and Capper, B. S.** (1984). Effects of Dietary Carbohydrate and Fiber on the Tilapia *Oreochromis-Niloticus* (Linn). *Aquaculture* **37**, 303-314.
- Antonescu, C. N., Huang, C., Niu, W., Liu, Z., Eysers, P. A., Heidenreich, K. A., Bilan, P. J. and Klip, A.** (2005). Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. *Endocrinology* **146**, 3773-81.
- Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Dowd, L. O., Phay, J. E., Moley, J. F. and Moley, K. H.** (2004). Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem* **279**, 16229-36.
- Bandyopadhyay, G., Standaert, M. L., Galloway, L., Moscat, J. and Farese, R. V.** (1997). Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and

- noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* **138**, 4721-31.
- Banos, N., Moon, T. W., Castejon, C., Gutierrez, J. and Navarro, I.** (1997). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding in fish red muscle: regulation by high insulin levels. *Regul Pept* **68**, 181-7.
- Baque, S., Montell, E., Camps, M., Guinovart, J. J., Zorzano, A. and Gomez-Foix, A. M.** (1998). Overexpression of glycogen phosphorylase increases GLUT4 expression and glucose transport in cultured skeletal human muscle. *Diabetes* **47**, 1185-92.
- Barros, L. F., Barnes, K., Ingram, J. C., Castro, J., Porras, O. H. and Baldwin, S. A.** (2001). Hyperosmotic shock induces both activation and translocation of glucose transporters in mammalian cells. *Pflugers Arch* **442**, 614-21.
- Basu, A., Basu, R., Shah, P., Vella, A., Johnson, C. M., Jensen, M., Nair, K. S., Schwenk, W. F. and Rizza, R. A.** (2001). Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes* **50**, 1351-62.
- Baumann, C. A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D. C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P. E., Pessin, J. E. and Saltiel, A. R.** (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**, 202-7.
- Beguino, F., Kahn, C. R., Moses, A. C. and Smith, R. J.** (1986). The development of insulin receptors and responsiveness is an early marker of differentiation in the muscle cell line L6. *Endocrinology* **118**, 446-55.
- Bergot, F.** (1979). Effects of Dietary Carbohydrates and of Their Mode of Distribution on Glycemia in Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri* Richardson). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* **64**, 543-547.
- Bilan, P. J., Mitsumoto, Y., Maher, F., Simpson, I. A. and Klip, A.** (1992). Detection of the GLUT3 facilitative glucose transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 1129-37.
- Birnbaum, M. J.** (1989). Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* **57**, 305-15.

- Blasco, J., Fernandez-Borras, J., Marimon, I. and Requena, A.** (1996). Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: Effect of an intravascular glucose load. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **165**, 534-541.
- Blasco, J., Marimon, I., Viaplana, I. and Fernandez-Borras, J.** (2001). Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiology and Biochemistry* **24**, 247-258.
- Block, N. E., Menick, D. R., Robinson, K. A. and Buse, M. G.** (1991). Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J Clin Invest* **88**, 1546-52.
- Bogan, J. S., Hendon, N., McKee, A. E., Tsao, T. S. and Lodish, H. F.** (2003). Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* **425**, 727-33.
- Bonen, A., Tan, M. H. and Watson-Wright, W. M.** (1981). Insulin binding and glucose uptake differences in rodent skeletal muscles. *Diabetes* **30**, 702-4.
- Bourey, R. E., Koranyi, L., James, D. E., Mueckler, M. and Permutt, M. A.** (1990). Effects of altered glucose homeostasis on glucose transporter expression in skeletal muscle of the rat. *J Clin Invest* **86**, 542-7.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bruss, M. D., Arias, E. B., Lienhard, G. E. and Cartee, G. D.** (2005). Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. *Diabetes* **54**, 41-50.
- Bryant, N. J., Govers, R. and James, D. E.** (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 267-77.
- Buddington, R. K. and Hilton, J. W.** (1987). Intestinal adaptations of rainbow trout to changes in dietary carbohydrate. *Am J Physiol* **253**, G489-96.
- Buhl, E. S., Jessen, N., Schmitz, O., Pedersen, S. B., Pedersen, O., Holman, G. D. and Lund, S.** (2001). Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes* **50**, 12-7.

- Buhler, D. R. and Halver, J. E.** (1961). Nutrition of Salmonoid Fishes .9. Carbohydrate Requirements of Chinook Salmon. *Journal of Nutrition* **74**, 307-&.
- Burant, C. F. and Bell, G. I.** (1992). Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* **31**, 10414-20.
- Bustin, S. A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-93.
- Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Monfar, M., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A.** (1992). Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J* **282 (Pt 3)**, 765-72.
- Cantley, L. C.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655-7.
- Capilla, E., Diaz, M., Albalat, A., Navarro, I., Pessin, J. E., Keller, K. and Planas, J. V.** (2004). Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E348-57.
- Capilla, E., Diaz, M., Gutierrez, J. and Planas, J. V.** (2002). Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E44-9.
- Capilla, E., Medale, F., Navarro, I., Panserat, S., Vachot, C., Kaushik, S. and Gutierrez, J.** (2003). Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul Pept* **110**, 123-32.
- Carneiro, N. M., Navarro, I., Gutierrez, J. and Plisetskaya, E. M.** (1993). Hepatic Extraction of Circulating Insulin and Glucagon in Brown Trout (*Salmo-Trutta Fario*) after Glucose and Arginine Injection. *Journal of Experimental Zoology* **267**, 416-422.
- Castello, A., Cadefau, J., Cusso, R., Testar, X., Hesketh, J. E., Palacin, M. and Zorzano, A.** (1993). GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporter expression is differentially regulated by contractile activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **268**, 14998-5003.
- Castello, A., Rodriguez-Manzaneque, J. C., Camps, M., Perez-Castillo, A., Testar, X., Palacin, M., Santos, A. and Zorzano, A.** (1994). Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from

- fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* **269**, 5905-12.
- Castillo, J., Ammendrup-Johnsen, I., Codina, M., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2006). IGF-I and insulin receptor signal transduction in trout muscle cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1683-90.
- Castillo, J., Codina, M., Martinez, M. L., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2004). Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R935-41.
- Castillo, J., Le Bail, P. Y., Paboeuf, G., Navarro, I., Weil, C., Fauconneau, B. and Gutierrez, J.** (2002). IGF-I binding in primary culture of muscle cells of rainbow trout: changes during in vitro development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R647-52.
- Chaney, L. K. and Jacobson, B. S.** (1983). Coating cells with colloidal silica for high yield isolation of plasma membrane sheets and identification of transmembrane proteins. *J Biol Chem* **258**, 10062-72.
- Chang, L., Chiang, S. H. and Saltiel, A. R.** (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* **10**, 65-71.
- Charron, M. J., Brosius, F. C., 3rd, Alper, S. L. and Lodish, H. F.** (1989). A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2535-9.
- Charron, M. J. and Kahn, B. B.** (1990). Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipose cells in vivo. *J Biol Chem* **265**, 7994-8000.
- Collie, N. S. and Ferraris, R. P.** (1995). Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In *Metabolic Biochemistry*, vol. 4 (eds P. W. Hochachka and T. P. Mommsen), pp. 221-239. Amsterdam: Elsevier Science.
- Corvera, S., Chawla, A., Chakrabarti, R., Joly, M., Buxton, J. and Czech, M. P.** (1994). A double leucine within the GLUT4 glucose transporter COOH-terminal domain functions as an endocytosis signal. *J Cell Biol* **126**, 979-89.
- Coster, A. C., Govers, R. and James, D. E.** (2004). Insulin stimulates the entry of GLUT4 into the endosomal recycling pathway by a quantal mechanism. *Traffic* **5**, 763-71.

- Cowey, C. B., Knox, D., Walton, M. J. and Adron, J. W.** (1977). The regulation of gluconeogenesis by diet and insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br J Nutr* **38**, 463-70.
- Cowey, J. Y. and Walton, M. J.** (1989). Intermediary metabolism. In *Fish Nutrition*, (ed. J. E. Halver), pp. 259-329. Sant Diego: Academic Press.
- Cushman, S. W. and Wardzala, L. J.** (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* **255**, 4758-62.
- Cusin, I., Terrettaz, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Zarjevski, N., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Jeanrenaud, B.** (1990). Hyperinsulinemia increases the amount of GLUT4 mRNA in white adipose tissue and decreases that of muscles: a clue for increased fat depot and insulin resistance. *Endocrinology* **127**, 3246-8.
- Czech, M. P. and Buxton, J. M.** (1993). Insulin action on the internalization of the GLUT4 glucose transporter in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* **268**, 9187-90.
- Dawson, P. A., Mychaleckyj, J. C., Fossey, S. C., Mihic, S. J., Craddock, A. L. and Bowden, D. W.** (2001). Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* **74**, 186-99.
- del Aguila, L. F., Claffey, K. P. and Kirwan, J. P.** (1999). TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol* **276**, E849-55.
- Doege, H., Bocianski, A., Joost, H. G. and Schurmann, A.** (2000a). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* **350 Pt 3**, 771-6.
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H. G. and Schurmann, A.** (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem J* **359**, 443-9.
- Doege, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A. and Joost, H. G.** (2000b). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J Biol Chem* **275**, 16275-80.

- Dohm, G. L.** (2002). Invited review: Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise. *J Appl Physiol* **93**, 782-7.
- Duclos, M. J., Chevalier, B., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F., Goddard, C. and Simon, J.** (1993). Insulin-like growth factor-I-stimulated glucose transport in myotubes derived from chicken muscle satellite cells. *J Endocrinol* **137**, 465-72.
- Dugani, C. B. and Klip, A.** (2005). Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep* **6**, 1137-42.
- Eguez, L., Lee, A., Chavez, J. A., Miinea, C. P., Kane, S., Lienhard, G. E. and McGraw, T. E.** (2005). Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. *Cell Metab* **2**, 263-72.
- Etgen, G. J., Jr., Farrar, R. P. and Ivy, J. L.** (1993). Effect of chronic electrical stimulation on GLUT-4 protein content in fast-twitch muscle. *Am J Physiol* **264**, R816-9.
- Ezaki, O.** (1997). Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 1-6.
- Farese, R. V.** (2002). Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E1-11.
- Fauconneau, B. and Paboeuf, G.** (2000). Effect of fasting and refeeding on in vitro muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* **301**, 459-63.
- Flores-Riveros, J. R., McLenithan, J. C., Ezaki, O. and Lane, M. D.** (1993). Insulin down-regulates expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene: effects on transcription and mRNA turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 512-6.
- Foster, L. J., Li, D., Randhawa, V. K. and Klip, A.** (2001). Insulin accelerates inter-endosomal GLUT4 traffic via phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B. *J Biol Chem* **276**, 44212-21.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I. and Seino, S.** (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J Biol Chem* **264**, 7776-9.
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R. L., Fukushima, Y., Byers, M. G., Shows, T. B. and Bell, G. I.** (1988). Sequence, tissue distribution, and

- chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5434-8.
- Furtado, L. M., Poon, V. and Klip, A.** (2003). GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiologica Scandinavica* **178**, 287-296.
- Furuichi, M. and Yone, Y.** (1980). The Utilization of Carbohydrate by Fishes .1. Effect of Dietary Dextrin Levels on the Growth and Feed-Efficiency, the Chemical-Composition of Liver and Dorsal Muscle, and the Absorption of Dietary-Protein and Dextrin in Fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **46**, 225-229.
- Furuichi, M. and Yone, Y.** (1981). The Utilization of Carbohydrate by Fishes .3. Change of Blood-Sugar and Plasma-Insulin Levels of Fishes in Glucose-Tolerance Test. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **47**, 761-764.
- Furuichi, M. and Yone, Y.** (1982a). Availability of carbohydrate in nutrition of carp and red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **48**, 945-948.
- Furuichi, M. and Yone, Y.** (1982b). Effect of Insulin on Blood-Sugar Levels of Fishes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **48**, 1289-1291.
- Garcia de Herreros, A. and Birnbaum, M. J.** (1989). The regulation by insulin of glucose transporter gene expression in 3T3 adipocytes. *J Biol Chem* **264**, 9885-90.
- Garippa, R. J., Judge, T. W., James, D. E. and McGraw, T. E.** (1994). The amino terminus of GLUT4 functions as an internalization motif but not an intracellular retention signal when substituted for the transferrin receptor cytoplasmic domain. *J Cell Biol* **124**, 705-15.
- Gaster, M., Poulsen, P., Handberg, A., Schroder, H. D. and Beck-Nielsen, H.** (2000). Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E910-6.
- Gauvry, L. and Fauconneau, B.** (1996). Cloning of a trout fast skeletal myosin heavy chain expressed both in embryo and adult muscles and in myotubes neoformed in vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **115**, 183-90.
- Gerrits, P. M., Olson, A. L. and Pessin, J. E.** (1993). Regulation of the GLUT4/muscle-fat glucose transporter mRNA in adipose tissue of insulin-deficient diabetic rats. *J Biol Chem* **268**, 640-4.

- Goodyear, L. J., Hirshman, M. F., Valyou, P. M. and Horton, E. S.** (1992). Glucose transporter number, function, and subcellular distribution in rat skeletal muscle after exercise training. *Diabetes* **41**, 1091-9.
- Gould, G. W. and Holman, G. D.** (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* **295 (Pt 2)**, 329-41.
- Gould, G. W., Thomas, H. M., Jess, T. J. and Bell, G. I.** (1991). Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* **30**, 5139-45.
- Govers, R., Coster, A. C. and James, D. E.** (2004). Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol Cell Biol* **24**, 6456-66.
- Gray, S., Feinberg, M. W., Hull, S., Kuo, C. T., Watanabe, M., Sen-Banerjee, S., DePina, A., Haspel, R. and Jain, M. K.** (2002). The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem* **277**, 34322-8.
- Guillet-Deniau, I., Leturque, A. and Girard, J.** (1994). Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat foetuses. *J Cell Sci* **107 (Pt 3)**, 487-96.
- Gutierrez, J., Carrillo, M., Zanuy, S. and Planas, J.** (1984). Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of sea bass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *Gen Comp Endocrinol* **55**, 393-7.
- Haber, R. S., Weinstein, S. P., O'Boyle, E. and Morgello, S.** (1993). Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter. *Endocrinology* **132**, 2538-43.
- Hall, J. R., MacCormack, T. J., Barry, C. A. and Driedzic, W. R.** (2004). Sequence and expression of a constitutive, facilitated glucose transporter (GLUT1) in Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol* **207**, 4697-706.
- Hall, J. R., Richards, R. C., MacCormack, T. J., Ewart, K. V. and Driedzic, W. R.** (2005). Cloning of GLUT3 cDNA from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and expression of GLUT1 and GLUT3 in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta* **1730**, 245-52.

- Haney, P. M., Levy, M. A., Strube, M. S. and Mueckler, M.** (1995). Insulin-sensitive targeting of the GLUT4 glucose transporter in L6 myoblasts is conferred by its COOH-terminal cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **129**, 641-58.
- Hansen, S. H., Sandvig, K. and van Deurs, B.** (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* **121**, 61-72.
- Harmon, J. S., Eilertson, C. D., Sheridan, M. A. and Plisetskaya, E. M.** (1991). Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. *Am J Physiol* **261**, R609-13.
- Hayashi, T., Hirshman, M. F., Kurth, E. J., Winder, W. W. and Goodyear, L. J.** (1998). Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* **47**, 1369-73.
- Hediger, M. A., Coady, M. J., Ikeda, T. S. and Wright, E. M.** (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* **330**, 379-81.
- Hemre, G. I. and Hansen, T.** (1998). utilisation of different dietary starch sources and tolerance to glucose loading in Atlantic salmon during parr-smolt transformation. *Aquaculture* **161**, 145-157.
- Hemre, G. I., Mommsen, T. P. and Krogdahl, A.** (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* **8**, 175-194.
- Hemre, G. I., Sandnes, K., Lie, O., Torrissen, O. and Waagbo, R.** (1995a). Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilization. *Aquaculture Nutrition* **26**, 149-154.
- Hemre, G. I., Torrissen, O., Krogdahl, A. and Lie, O.** (1995b). Glucose tolerance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., dependance on adaptation to dietary starch and water temperature. *Aquaculture Nutrition* **1**, 69-75.
- Hernandez, R., Teruel, T. and Lorenzo, M.** (2003). Insulin and dexamethasone induce GLUT4 gene expression in foetal brown adipocytes: synergistic effect through CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *Biochem J* **372**, 617-24.
- Hertel, J., Struthers, H., Horj, C. B. and Hruz, P. W.** (2004). A structural basis for the acute effects of HIV protease inhibitors on GLUT4 intrinsic activity. *J Biol Chem* **279**, 55147-52.

- Heuser, J. E. and Anderson, R. G.** (1989). Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108**, 389-400.
- Hilton, J. W., Plisetskaya, E. M. and Leatherland, J. F.** (1987). Does oral 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiology and Biochemistry* **4**, 113-120.
- Hofer, R. and Sturmbauer, C.** (1985). Inhibition of Trout and Carp Alpha-Amylase by Wheat. *Aquaculture* **48**, 277-283.
- Holmes, B. F., Kurth-Kraczek, E. J. and Winder, W. W.** (1999). Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* **87**, 1990-5.
- Huang, C., Thirone, A. C., Huang, X. and Klip, A.** (2005). Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in 16 myotubes. *J Biol Chem* **280**, 19426-35.
- Hundal, H. S., Ahmed, A., Guma, A., Mitsumoto, Y., Marette, A., Rennie, M. J. and Klip, A.** (1992). Biochemical and immunocytochemical localization of the 'GLUT5 glucose transporter' in human skeletal muscle. *Biochem J* **286 (Pt 2)**, 339-43.
- Ibberson, M., Uldry, M. and Thorens, B.** (2000). GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* **275**, 4607-12.
- Ishiki, M. and Klip, A.** (2005). Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* **146**, 5071-8.
- James, D. E., Strube, M. and Mueckler, M.** (1989). Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**, 83-7.
- JeBailey, L., Rudich, A., Huang, X., Di Ciano-Oliveira, C., Kapus, A. and Klip, A.** (2004). Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling. *Mol Endocrinol* **18**, 359-72.
- Jessen, N. and Goodyear, L. J.** (2005). Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **99**, 330-7.
- Jhun, B. H., Rampal, A. L., Liu, H., Lachaal, M. and Jung, C. Y.** (1992). Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat

- adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling. *J Biol Chem* **267**, 17710-5.
- Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., Doege, H., James, D. E., Lodish, H. F., Moley, K. H. et al.** (2002). Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E974-6.
- Kaestner, K. H., Christy, R. J., McLenithan, J. C., Braiterman, L. T., Cornelius, P., Pekala, P. H. and Lane, M. D.** (1989). Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3150-4.
- Kahn, B. B.** (1994). Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J Nutr* **124**, 1289S-1295S.
- Kahn, B. B.** (1996). Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action. *Diabetes* **45**, 1644-54.
- Kandror, K. V. and Pilch, P. F.** (1998). Multiple endosomal recycling pathways in rat adipose cells. *Biochem J* **331 (Pt 3)**, 829-35.
- Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A. and McGraw, T. E.** (2004). GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol Biol Cell* **15**, 870-82.
- Katz, E. B., Stenbit, A. E., Hatton, K., DePinho, R. and Charron, M. J.** (1995). Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* **377**, 151-5.
- Kayano, T., Burant, C. F., Fukumoto, H., Gould, G. W., Fan, Y. S., Eddy, R. L., Byers, M. G., Shows, T. B., Seino, S. and Bell, G. I.** (1990). Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* **265**, 13276-82.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R. L., Fan, Y. S., Byers, M. G., Shows, T. B. and Bell, G. I.** (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* **263**, 15245-8.
- Keembiyehetty, C., Augustin, R., Carayannopoulos, M. O., Steer, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I. and Moley, K. H.** (2006). Mouse glucose transporter 9

- splice variants are expressed in adult liver and kidney and are up-regulated in diabetes. *Mol Endocrinol* **20**, 686-97.
- Keller, K., Strube, M. and Mueckler, M.** (1989). Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *J Biol Chem* **264**, 18884-9.
- Kern, M., Wells, J. A., Stephens, J. M., Elton, C. W., Friedman, J. E., Tapscott, E. B., Pekala, P. H. and Dohm, G. L.** (1990). Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level. *Biochem J* **270**, 397-400.
- Khan, A. H., Capilla, E., Hou, J. C., Watson, R. T., Smith, J. R. and Pessin, J. E.** (2004). Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is dependent upon both the amino terminus and the large cytoplasmic loop. *J Biol Chem* **279**, 37505-11.
- Khan, A. H. and Pessin, J. E.** (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* **45**, 1475-83.
- Kimura, A., Baumann, C. A., Chiang, S. H. and Saltiel, A. R.** (2001). The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9098-103.
- Klip, A. and Paquet, M. R.** (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* **13**, 228-43.
- Koivisto, U. M., Martinez-Valdez, H., Bilan, P. J., Burdett, E., Ramlal, T. and Klip, A.** (1991). Differential regulation of the GLUT-1 and GLUT-4 glucose transport systems by glucose and insulin in L6 muscle cells in culture. *J Biol Chem* **266**, 2615-21.
- Kong, C. T., Yet, S. F. and Lever, J. E.** (1993). Cloning and expression of a mammalian Na⁺/amino acid cotransporter with sequence similarity to Na⁺/glucose cotransporters. *J Biol Chem* **268**, 1509-12.
- Kono, T., Nishida, M., Nishiki, Y., Seki, Y., Sato, K. and Akiba, Y.** (2005). Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *Br Poult Sci* **46**, 510-5.
- Koumans, J. T. M., Akster, H. A., Dulos, G. J. and Osse, J. W. M.** (1990). Myosatellite Cells of *Cyprinus-Carpio* (Teleostei) In vitro - Isolation, Recognition and Differentiation. *Cell and Tissue Research* **261**, 173-181.

- Kraegen, E. W., James, D. E., Storlien, L. H., Burleigh, K. M. and Chisholm, D. J.** (1986). In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia* **29**, 192-8.
- Krasnov, A., Pitkanen, T. I., Reinisalo, M. and Molsa, H.** (1999). Expression of Human Glucose Transporter Type 1 and Rat Hexokinase Type II Complementary DNAs in Rainbow Trout Embryos: Effects on Glucose Metabolism. *Mar Biotechnol (NY)* **1**, 25-32.
- Krasnov, A., Teerijoki, H. and Molsa, H.** (2001). Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic glucose transporter. *Biochim Biophys Acta* **1520**, 174-8.
- Kuo, C. H., Browning, K. S. and Ivy, J. L.** (1999). Regulation of GLUT4 protein expression and glycogen storage after prolonged exercise. *Acta Physiol Scand* **165**, 193-201.
- Larance, M., Ramm, G., Stockli, J., van Dam, E. M., Winata, S., Wasinger, V., Simpson, F., Graham, M., Junutula, J. R., Guilhaus, M. et al.** (2005). Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. *J Biol Chem* **280**, 37803-13.
- Legate, N. J., Bonen, A. and Moon, T. W.** (2001). Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology* **122**, 48-59.
- Li, D., Randhawa, V. K., Patel, N., Hayashi, M. and Klip, A.** (2001). Hyperosmolarity reduces GLUT4 endocytosis and increases its exocytosis from a VAMP2-independent pool in l6 muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 22883-91.
- Li, L. V. and Kandrор, K. V.** (2005). Golgi-localized, gamma-ear-containing, Arf-binding protein adaptors mediate insulin-responsive trafficking of glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* **19**, 2145-53.
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J. D., Chen, X. Z. and Cheeseman, C. I.** (2004). Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G236-42.
- Lisinski, I., Schurmann, A., Joost, H. G., Cushman, S. W. and Al-Hasani, H.** (2001). Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J* **358**, 517-22.

- Lund, S., Holman, G. D., Schmitz, O. and Pedersen, O.** (1995). Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5817-21.
- Macheda, M. L., Kelly, D. J., Best, J. D. and Rogers, S.** (2002). Expression during rat fetal development of GLUT12--a member of the class III hexose transporter family. *Anat Embryol (Berl)* **205**, 441-52.
- Mackenzie, B., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D., Lever, J. E. and Wright, E. M.** (1994). SAAT1 is a low affinity Na⁺/glucose cotransporter and not an amino acid transporter. A reinterpretation. *J Biol Chem* **269**, 22488-91.
- MacLean, P. S., Zheng, D., Jones, J. P., Olson, A. L. and Dohm, G. L.** (2002). Exercise-induced transcription of the muscle glucose transporter (GLUT 4) gene. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 409-14.
- Marette, A., Richardson, J. M., Ramlal, T., Balon, T. W., Vranic, M., Pessin, J. E. and Klip, A.** (1992). Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am J Physiol* **263**, C443-52.
- Marsh, B. J., Alm, R. A., McIntosh, S. R. and James, D. E.** (1995). Molecular regulation of GLUT-4 targeting in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biol* **130**, 1081-91.
- Martin, O. J., Lee, A. and McGraw, T. E.** (2006). GLUT4 distribution between the plasma membrane and the intracellular compartments is maintained by an insulin-modulated bipartite dynamic mechanism. *J Biol Chem* **281**, 484-90.
- Martin, S., Millar, C. A., Lyttle, C. T., Meerloo, T., Marsh, B. J., Gould, G. W. and James, D. E.** (2000). Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3427-38.
- Martinez-Arca, S., Lalioti, V. S. and Sandoval, I. V.** (2000). Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs. *J Cell Sci* **113 (Pt 10)**, 1705-15.
- McGowan, K. M., Long, S. D. and Pekala, P. H.** (1995). Glucose transporter gene expression: regulation of transcription and mRNA stability. *Pharmacol Ther* **66**, 465-505.
- McVie-Wylie, A. J., Lamson, D. R. and Chen, Y. T.** (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10),

- localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* **72**, 113-7.
- Medale, F., Brauge, C., Vallee, F. and Kaushik, S.** (1995). Effects of dietary protein/energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout. *Water Science and Technology* **31**, 185-194.
- Mitsumoto, Y., Burdett, E., Grant, A. and Klip, A.** (1991). Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **175**, 652-9.
- Mitsumoto, Y. and Klip, A.** (1992). Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem* **267**, 4957-62.
- Miyamoto, K., Tatsumi, S., Morimoto, A., Minami, H., Yamamoto, H., Sone, K., Taketani, Y., Nakabou, Y., Oka, T. and Takeda, E.** (1994). Characterization of the rabbit intestinal fructose transporter (GLUT5). *Biochem J* **303 (Pt 3)**, 877-83.
- Mommsen, T. P.** (2001). Paradigms of growth in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**, 207-19.
- Mommsen, T. P. and Plisetskaya, E. M.** (1991). Insulin in Fishes and Agnathans - History, Structure, and Metabolic-Regulation. *Reviews in Aquatic Sciences* **4**, 225-259.
- Moon, T. W.** (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**, 243-9.
- Moran, J. L., Li, Y., Hill, A. A., Mounts, W. M. and Miller, C. P.** (2002). Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiol Genomics* **10**, 103-11.
- Mueckler, M.** (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**, 713-25.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E. and Lodish, H. F.** (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941-5.
- Munoz, P., Mora, S., Sevilla, L., Kaliman, P., Tomas, E., Guma, A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A.** (1996). Expression and insulin-regulated distribution of caveolin in skeletal muscle. Caveolin does not colocalize with GLUT4 in intracellular membranes. *J Biol Chem* **271**, 8133-9.
- Murata, H., Hruz, P. W. and Mueckler, M.** (2002). Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *Aids* **16**, 859-63.

- Nagayama, F. and Ohshima, H.** (1974). Studies on Enzyme-System of Carbohydrate-Metabolism in Fish .1. Properties of Liver Hexokinase. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **40**, 285-290.
- Navarro, I., Canals, P., Sanchez, J., Gutierrez, J. and Planas, J.** (1991). Some plasma hormones and metabolites in the Pyrenean brown trout (*Salmo trutta fario*). *Comp Biochem Physiol A* **100**, 919-23.
- Navarro, I. and Gutierrez, J.** (1995). Fasting and starvation. In *Metabolic Biochemistry*, (ed. P. M. Hochachka, Mommsen, T. P.), pp. 393-434. Amsterdam: Elsevier Science.
- Navarro, I., Gutierrez, J. and Planas, J.** (1992). Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* **102**, 401-7.
- Navarro, I., Leibush, B., Moon, T. W., Plisetskaya, E. M., Banos, N., Mendez, E., Planas, J. V. and Gutierrez, J.** (1999). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **122**, 137-53.
- Navarro, I., Rojas, P., Capilla, E., Albalat, A., Castillo, J., Montserrat, N., Codina, M. and Gutierrez, J.** (2002). Insights into insulin and glucagon responses in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **27**, 205-216.
- Neufer, P. D., Carey, J. O. and Dohm, G. L.** (1993). Transcriptional regulation of the gene for glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle. Effects of diabetes and fasting. *J Biol Chem* **268**, 13824-9.
- Niswender, K. D., Shiota, M., Postic, C., Cherrington, A. D. and Magnuson, M. A.** (1997). Effects of increased glucokinase gene copy number on glucose homeostasis and hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* **272**, 22570-5.
- Niu, W., Huang, C., Nawaz, Z., Levy, M., Somwar, R., Li, D., Bilan, P. J. and Klip, A.** (2003). Maturation of the regulation of GLUT4 activity by p38 MAPK during L6 cell myogenesis. *J Biol Chem* **278**, 17953-62.
- Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O. and Ui, M.** (1994). Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* **269**, 3568-73.

- Olson, A. L. and Pessin, J. E.** (1995). Transcriptional regulation of the human GLUT4 gene promoter in diabetic transgenic mice. *J Biol Chem* **270**, 23491-5.
- Palmer, R. M., Thompson, M. G., Knott, R. M., Campbell, G. P., Thom, A. and Morrison, K. S.** (1997). Insulin and insulin-like growth factor-I responsiveness and signalling mechanisms in C2C12 satellite cells: effect of differentiation and fusion. *Biochim Biophys Acta* **1355**, 167-76.
- Palmer, T. N. and Ryman, B. E.** (1972). Studies on Oral Glucose Intolerance in Fish. *Journal of Fish Biology* **4**, 311-&.
- Panserat, S., Medale, F., Blin, C., Breque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R. and Kaushik, S.** (2000). Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream, and common carp. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R1164-70.
- Parrizas, M., Banos, N., Baro, J., Planas, J. and Gutierrez, J.** (1994). Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul Pept* **53**, 211-22.
- Peragon, J., Barroso, J. B., Garcia-Salguero, L., de la Higuera, M. and Lupianez, J. A.** (1999). Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **179**, 425-437.
- Pereira, L. O. and Lancha, A. H., Jr.** (2004). Effect of insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. *Prog Biophys Mol Biol* **84**, 1-27.
- Petersen, S., Bahr, M. and Eckel, J.** (1995). Insulin-dependent regulation of Glut4 gene expression in ventricular cardiomyocytes: evidence for a direct effect on Glut4 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **213**, 533-40.
- Phay, J. E., Hussain, H. B. and Moley, J. F.** (2000). Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* **66**, 217-20.
- Piper, R. C., Tai, C., Kulesza, P., Pang, S., Warnock, D., Baenziger, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., Puri, C. and James, D. E.** (1993). GLUT-4 NH2 terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestration. *J Cell Biol* **121**, 1221-32.
- Planas, J. V., Capilla, E. and Gutierrez, J.** (2000a). Molecular identification of a glucose transporter from fish muscle. *FEBS Lett* **481**, 266-70.

- Planas, J. V., Mendez, E., Banos, N., Capilla, E., Castillo, J., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2000b). Fish insulin, IGF-I and IGF-II receptors: A phylogenetic approach. *American Zoologist* **40**, 223-233.
- Planas, J. V., Mendez, E., Banos, N., Capilla, E., Navarro, I. and Gutierrez, J.** (2000c). Insulin and IGF-I receptors in trout adipose tissue are physiologically regulated by circulating hormone levels. *J Exp Biol* **203**, 1153-9.
- Plisetskaya, E., Pollock, H. G., Rouse, J. B., Hamilton, J. W., Kimmel, J. R. and Gorbman, A.** (1985). Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) insulin. *Regul Pept* **11**, 105-16.
- Plisetskaya, E. M.** (1998). Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **121**, 3-11.
- Plisetskaya, E. M., Buchellinarvaez, L. I., Hardy, R. W. and Dickhoff, W. W.** (1991). Effects of Injected and Dietary Arginine on Plasma-Insulin Levels and Growth of Pacific Salmon and Rainbow-Trout. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* **98**, 165-170.
- Ploug, T., Stallknecht, B. M., Pedersen, O., Kahn, B. B., Ohkuwa, T., Vinten, J. and Galbo, H.** (1990). Effect of endurance training on glucose transport capacity and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **259**, E778-86.
- Powell, R. L., Dodson, M. V. and Cloud, J. G.** (1989). Cultivation and Differentiation of Satellite Cells from Skeletal-Muscle of the Rainbow-Trout *Salmo-Gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology* **250**, 333-338.
- Ramlal, T., Sarabia, V., Bilan, P. J. and Klip, A.** (1988). Insulin-mediated translocation of glucose transporters from intracellular membranes to plasma membranes: sole mechanism of stimulation of glucose transport in L6 muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 1329-35.
- Ramm, G., Slot, J. W., James, D. E. and Stoorvogel, W.** (2000). Insulin recruits GLUT4 from specialized VAMP2-carrying vesicles as well as from the dynamic endosomal/trans-Golgi network in rat adipocytes. *Mol Biol Cell* **11**, 4079-91.
- Ramos, S., Goya, L., Alvarez, C., Martin, M. A., Agote, M., Escriva, F. and Pascual-Leone, A. M.** (2001). Different role of insulin in GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E1073-81.

- Rand, E. B., Depaoli, A. M., Davidson, N. O., Bell, G. I. and Burant, C. F.** (1993). Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol* **264**, G1169-76.
- Randhawa, V. K., Bilan, P. J., Khayat, Z. A., Daneman, N., Liu, Z., Ramlal, T., Volchuk, A., Peng, X. R., Coppola, T., Regazzi, R. et al.** (2000). VAMP2, but not VAMP3/cellubrevin, mediates insulin-dependent incorporation of GLUT4 into the plasma membrane of L6 myoblasts. *Mol Biol Cell* **11**, 2403-17.
- Randhawa, V. K., Thong, F. S., Lim, D. Y., Li, D., Garg, R. R., Rudge, R., Galli, T., Rudich, A. and Klip, A.** (2004). Insulin and hypertonicity recruit GLUT4 to the plasma membrane of muscle cells by using N-ethylmaleimide-sensitive factor-dependent SNARE mechanisms but different v-SNAREs: role of TI-VAMP. *Mol Biol Cell* **15**, 5565-73.
- Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E. and Kirchhausen, T.** (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *Embo J* **17**, 2148-55.
- Rayner, D. V., Thomas, M. E. and Trayhurn, P.** (1994). Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can J Physiol Pharmacol* **72**, 476-9.
- Rea, S. and James, D. E.** (1997). Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* **46**, 1667-77.
- Rescan, P. Y., Gauvry, L. and Paboeuf, G.** (1995). A gene with homology to myogenin is expressed in developing myotomal musculature of the rainbow trout and in vitro during the conversion of myosatellite cells to myotubes. *FEBS Lett* **362**, 89-92.
- Ribe, D., Yang, J., Patel, S., Koumanov, F., Cushman, S. W. and Holman, G. D.** (2005). Endofacial competitive inhibition of glucose transporter-4 intrinsic activity by the mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580. *Endocrinology* **146**, 1713-7.
- Ribon, V., Printen, J. A., Hoffman, N. G., Kay, B. K. and Saltiel, A. R.** (1998). A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* **18**, 872-9.

- Ribon, V. and Saltiel, A. R.** (1997). Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* **324** (Pt 3), 839-45.
- Rodnick, K., Bailey, J., West, J. and Driedzic, A.** (1997). Acute regulation of glucose uptake in cardiac muscle of the American eel *Anguilla rostrata*. *J Exp Biol* **200**, 2871-80.
- Rodnick, K. J., Holloszy, J. O., Mondon, C. E. and James, D. E.** (1990). Effects of exercise training on insulin-regulatable glucose-transporter protein levels in rat skeletal muscle. *Diabetes* **39**, 1425-9.
- Rodnick, K. J., Slot, J. W., Studelska, D. R., Hanpeter, D. E., Robinson, L. J., Geuze, H. J. and James, D. E.** (1992). Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* **267**, 6278-85.
- Roe, J. A., Baba, A. S., Harper, J. M. and Buttery, P. J.** (1995). Effects of growth factors and gut regulatory peptides on nutrient uptake in ovine muscle cell cultures. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **110**, 107-14.
- Rogers, S., Chandler, J. D., Clarke, A. L., Petrou, S. and Best, J. D.** (2003). Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 422-6.
- Rosenblatt-Velin, N., Lerch, R., Papageorgiou, I. and Montessuit, C.** (2004). Insulin resistance in adult cardiomyocytes undergoing dedifferentiation: role of GLUT4 expression and translocation. *Faseb J* **18**, 872-4.
- Rossetti, L., Stenbit, A. E., Chen, W., Hu, M., Barzilai, N., Katz, E. B. and Charron, M. J.** (1997). Peripheral but not hepatic insulin resistance in mice with one disrupted allele of the glucose transporter type 4 (GLUT4) gene. *J Clin Invest* **100**, 1831-9.
- Rudich, A. and Klip, A.** (2003). Push/pull mechanisms of GLUT4 traffic in muscle cells. *Acta Physiol Scand* **178**, 297-308.
- Rudich, A., Konrad, D., Torok, D., Ben-Romano, R., Huang, C., Niu, W., Garg, R. R., Wijesekara, N., Germinario, R. J., Bilan, P. J. et al.** (2003). Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. *Diabetologia* **46**, 649-58.
- Sandoval, I. V., Martinez-Arca, S., Valdueza, J., Palacios, S. and Holman, G. D.** (2000). Distinct reading of different structural determinants modulates the

- dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMPII and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem* **275**, 39874-85.
- Santalucia, T., Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Nuel, A., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A.** (1992). Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology* **130**, 837-46.
- Santalucia, T., Moreno, H., Palacin, M., Yacoub, M. H., Brand, N. J. and Zorzano, A.** (2001). A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. *J Mol Biol* **314**, 195-204.
- Sarabia, V., Lam, L., Burdett, E., Leiter, L. A. and Klip, A.** (1992). Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin. *J Clin Invest* **90**, 1386-95.
- Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, S., Kawasaki, K. and Shimizu, N.** (2001). Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 1218-24.
- Scheepers, A., Joost, H. G. and Schurmann, A.** (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **28**, 364-71.
- Seatter, M. J., De la Rue, S. A., Porter, L. M. and Gould, G. W.** (1998). QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose and is involved in substrate selection at the exofacial binding site. *Biochemistry* **37**, 1322-6.
- Seki, Y., Sato, K., Kono, T., Abe, H. and Akiba, Y.** (2003). Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *Gen Comp Endocrinol* **133**, 80-7.
- Shepherd, P. R.** (2005). Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* **183**, 3-12.
- Shepherd, P. R., Abel, E. D. and Kahn, B. B.** (2000). In *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*, (eds D. R. LeRoith J. M. Olefsky and S. I. Taylor), pp. 627-641. Philadelphia: J. P. Lippincott Co.

- Shepherd, P. R., Gibbs, E. M., Wesslau, C., Gould, G. W. and Kahn, B. B.** (1992). Human small intestine facilitative fructose/glucose transporter (GLUT5) is also present in insulin-responsive tissues and brain. Investigation of biochemical characteristics and translocation. *Diabetes* **41**, 1360-5.
- Shepherd, P. R. and Kahn, B. B.** (1999). Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* **341**, 248-57.
- Shimeno, S., Hosokawa, H., Hirata, H. and Takeda, M.** (1977). Comparative Studies on Carbohydrate-Metabolism of Yellowtail and Carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **43**, 213-217.
- Shimokawa, T., Kato, M., Ezaki, O. and Hashimoto, S.** (1998). Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 287-92.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Gigengack, S., Lienhard, G. E. and James, D. E.** (1991). Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol* **113**, 123-35.
- Soengas, J. and Moon, T.** (1995). Uptake and metabolism of glucose, alanine and lactate by red blood cells of the American eel *Anguilla rostrata*. *J Exp Biol* **198**, 877-88.
- Soengas, J. L. and Moon, T. W.** (1998). Transport and metabolism of glucose in isolated enterocytes of the black bullhead *Ictalurus melas*: effects of diet and hormones. *J Exp Biol* **201 (Pt 23)**, 3263-73.
- Somwar, R., Kim, D. Y., Sweeney, G., Huang, C., Niu, W., Lador, C., Ramlal, T. and Klip, A.** (2001). GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* **359**, 639-49.
- Stenbit, A. E., Tsao, T. S., Li, J., Burcelin, R., Geenen, D. L., Factor, S. M., Houseknecht, K., Katz, E. B. and Charron, M. J.** (1997). GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* **3**, 1096-101.
- Stuart, C. A., Wen, G. and Jiang, J.** (1999). GLUT3 protein and mRNA in autopsy muscle specimens. *Metabolism* **48**, 876-80.
- Suarez, E., Bach, D., Cadefau, J., Palacin, M., Zorzano, A. and Guma, A.** (2001). A novel role of neuregulin in skeletal muscle. Neuregulin stimulates glucose uptake,

- glucose transporter translocation, and transporter expression in muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 18257-64.
- Suzuki, K. and Kono, T.** (1980). Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 2542-5.
- Sweazea, K. L. and Braun, E. J.** (2006). Glucose transporter expression in English sparrows (*Passer domesticus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*.
- Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N. and Klip, A.** (1999). Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *J Biol Chem* **274**, 33085-91.
- Tamemoto, H., Kadowaki, T., Tobe, K., Yagi, T., Sakura, H., Hayakawa, T., Terauchi, Y., Ueki, K., Kaburagi, Y., Satoh, S. et al.** (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* **372**, 182-6.
- Tebbey, P. W., McGowan, K. M., Stephens, J. M., Buttke, T. M. and Pekala, P. H.** (1994). Arachidonic acid down-regulates the insulin-dependent glucose transporter gene (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting transcription and enhancing mRNA turnover. *J Biol Chem* **269**, 639-44.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Gorodilov, Y., Krishna, S. and Molsa, H.** (2001a). Rainbow trout glucose transporter (OnmyGLUT1): functional assessment in *Xenopus laevis* oocytes and expression in fish embryos. *J Exp Biol* **204**, 2667-73.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Pitkanen, T. I. and Molsa, H.** (2000). Cloning and characterization of glucose transporter in teleost fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochim Biophys Acta* **1494**, 290-4.
- Teerijoki, H., Krasnov, A., Pitkanen, T. I. and Molsa, H.** (2001b). Monosaccharide uptake in common carp (*Cyprinus carpio*) EPC cells is mediated by a facilitative glucose carrier. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **128**, 483-491.
- Thai, M. V., Guruswamy, S., Cao, K. T., Pessin, J. E. and Olson, A. L.** (1998). Myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-binding site is required for GLUT4 gene expression in transgenic mice. Regulation of MEF2 DNA binding activity in insulin-deficient diabetes. *J Biol Chem* **273**, 14285-92.

- Thomas-Delloye, V., Marmonier, F., Duchamp, C., Pichon-Georges, B., Lachuer, J., Barre, H. and Crouzoulon, G.** (1999). Biochemical and functional evidences for a GLUT-4 homologous protein in avian skeletal muscle. *Am J Physiol* **277**, R1733-40.
- Thong, F. S., Dugani, C. B. and Klip, A.** (2005). Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)* **20**, 271-84.
- Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R. and Lodish, H. F.** (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* **55**, 281-90.
- Tiihonen, K., Nikinmaa, M. and Lappivaara, J.** (1995). Glucose transport in carp erythrocytes: individual variation and effects of osmotic swelling, extracellular pH and catecholamines. *J Exp Biol* **198**, 577-83.
- Tranulis, M. A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, A. and Borrebaek, B.** (1996). A glucokinase-like-enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **114**, 35-9.
- Tse, C. M. and Young, J. D.** (1990). Glucose transport in fish erythrocytes: variable cytochalasin-B-sensitive hexose transport activity in the common eel (*Anguilla japonica*) and transport deficiency in the paddyfield eel (*Monopterus albus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Exp Biol* **148**, 367-83.
- Ueyama, A., Yaworsky, K. L., Wang, Q., Ebina, Y. and Klip, A.** (1999). GLUT-4myc ectopic expression in L6 myoblasts generates a GLUT-4-specific pool conferring insulin sensitivity. *Am J Physiol* **277**, E572-8.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J. D., Chatton, J. Y., Riederer, B. M. and Thorens, B.** (2001). Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *Embo J* **20**, 4467-77.
- Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M. and Thorens, B.** (2002). GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* **524**, 199-203.
- Uldry, M. and Thorens, B.** (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.*
- Valverde, A. M., Navarro, P., Teruel, T., Conejo, R., Benito, M. and Lorenzo, M.** (1999). Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner. *Biochem J* **337 (Pt 3)**, 397-405.

- Verhey, K. J. and Birnbaum, M. J.** (1994). A Leu-Leu sequence is essential for COOH-terminal targeting signal of GLUT4 glucose transporter in fibroblasts. *J Biol Chem* **269**, 2353-6.
- Verhey, K. J., Yeh, J. I. and Birnbaum, M. J.** (1995). Distinct signals in the GLUT4 glucose transporter for internalization and for targeting to an insulin-responsive compartment. *J Cell Biol* **130**, 1071-9.
- Vinals, F., Fandos, C., Santalucia, T., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M. and Zorzano, A.** (1997). Myogenesis and MyoD down-regulate Sp1. A mechanism for the repression of GLUT1 during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* **272**, 12913-21.
- Wagstaff, P., Kang, H. Y., Mylott, D., Robbins, P. J. and White, M. K.** (1995). Characterization of the avian GLUT1 glucose transporter: differential regulation of GLUT1 and GLUT3 in chicken embryo fibroblasts. *Mol Biol Cell* **6**, 1575-89.
- Walker, P. S., Ramlal, T., Donovan, J. A., Doering, T. P., Sandra, A., Klip, A. and Pessin, J. E.** (1989). Insulin and glucose-dependent regulation of the glucose transport system in the rat L6 skeletal muscle cell line. *J Biol Chem* **264**, 6587-95.
- Wang, M. Y., Tsai, M. Y. and Wang, C.** (1994). Identification of chicken liver glucose transporter. *Arch Biochem Biophys* **310**, 172-9.
- Wang, Q., Khayat, Z., Kishi, K., Ebina, Y. and Klip, A.** (1998). GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. *FEBS Lett* **427**, 193-7.
- Wardzala, L. J. and Jeanrenaud, B.** (1981). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat diaphragm. Apparent translocation of intracellular transport units to the plasma membrane. *J Biol Chem* **256**, 7090-3.
- Watson, R. T., Kanzaki, M. and Pessin, J. E.** (2004a). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev* **25**, 177-204.
- Watson, R. T., Khan, A. H., Furukawa, M., Hou, J. C., Li, L., Kanzaki, M., Okada, S., Kandrор, K. V. and Pessin, J. E.** (2004b). Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. *Embo J* **23**, 2059-70.
- Watson, R. T. and Pessin, J. E.** (2006). Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem Sci* **31**, 215-22.

- White, M. K., Rall, T. B. and Weber, M. J.** (1991). Differential regulation of glucose transporter isoforms by the src oncogene in chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* **11**, 4448-54.
- Wilson, R. P.** (1994). Utilization of Dietary Carbohydrate by Fish. *Aquaculture* **124**, 67-80.
- Wilson, R. P. and Poe, W. E.** (1987). Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disaccharides as energy sources. *J Nutr* **117**, 280-5.
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I. et al.** (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* **391**, 900-4.
- Wood, I. S. and Trayhurn, P.** (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* **89**, 3-9.
- Wright, E. M.** (2001). Renal Na(+)-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F10-8.
- Wright, J. R., Jr., O'Hali, W., Yang, H., Han, X. X. and Bonen, A.** (1998). GLUT-4 Deficiency and severe peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *Gen Comp Endocrinol* **111**, 20-7.
- Wu, X. and Freeze, H. H.** (2002). GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* **80**, 553-7.
- Yang, J., Clarke, J. F., Ester, C. J., Young, P. W., Kasuga, M. and Holman, G. D.** (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase acts at an intracellular membrane site to enhance GLUT4 exocytosis in 3T3-L1 cells. *Biochem J* **313** (Pt 1), 125-31.
- Yeh, J. I., Gulve, E. A., Rameh, L. and Birnbaum, M. J.** (1995). The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. *J Biol Chem* **270**, 2107-11.
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Tse, C. M., Davies, A. and Baldwin, S. A.** (1994). Functional and Molecular Characteristics of a Primitive Vertebrate Glucose-Transporter - Studies of Glucose-Transport by Erythrocytes from the Pacific Hagfish (Eptatretus-Stouti). *Journal of Experimental Biology* **186**, 23-41.
- Zeigerer, A., McBrayer, M. K. and McGraw, T. E.** (2004). Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. *Mol Biol Cell* **15**, 4406-15.
- Zhang, Z., Wu, R. S., Mok, H. O., Wang, Y., Poon, W. W., Cheng, S. H. and Kong, R. Y.** (2003). Isolation, characterization and expression analysis of a hypoxia-

responsive glucose transporter gene from the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Eur J Biochem* **270**, 3010-7.

Zisman, A., Peroni, O. D., Abel, E. D., Michael, M. D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B. B., Wojtaszewski, J. F., Hirshman, M. F., Virkamaki, A., Goodyear, L. J. et al. (2000). Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* **6**, 924-8.

Zorzano, A., Munoz, P., Camps, M., Mora, C., Testar, X. and Palacin, M. (1996). Insulin-induced redistribution of GLUT4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT4 trafficking pathways. *Diabetes* **45 Suppl 1**, S70-81.

Zorzano, A., Palacin, M. and Guma, A. (2005). Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **183**, 43-58.

Zorzano, A., Santalucia, T., Palacin, M., Guma, A. and Camps, M. (1998). Searching for ways to upregulate GLUT4 glucose transporter expression in muscle. *Gen Pharmacol* **31**, 705-13.

Zorzano, A., Wilkinson, W., Kotliar, N., Thoidis, G., Wadzinski, B. E., Ruoho, A. E. and Pilch, P. F. (1989). Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem* **264**, 12358-63.

VII. PUBLICACIONES

Capilla, E., Díaz, M., Gutiérrez, J. and Planas, J. V. (2002). Physiological regulation of the expression of a GLUT4 homolog in fish skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E44-9.

Capilla, E., Díaz, M., Albalat, A., Navarro, I., Pessin, J. E., Keller, K. and Planas, J. V. (2004). Functional characterization of an insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) from fish adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E348-57.

Navarro, I., Capilla, E., Castillo, J., Albalat, A., Díaz, M., Gallardo, M. A., Blasco, J., Planas, J. V., Gutiérrez, J. Insulin metabolic effects in fish tissues. Fish Endocrinology. Eds. G. Zaccane, M. Reinecke and B.G. Kapoor. 100378-Kapoor Science publishers, Inc. Enfield (NH), Plymouth, England (2006). En premsa. ISBN: 1-57808-318-4

Díaz, M. and Planas, J. V. *In vivo* regulation of GLUT4 content in trout skeletal muscle. En preparació.

Díaz, M., Serrare, R. and Planas, J. V. Insulin action on GLUT4 expression in trout muscle cells in culture. En preparació.

Díaz, M., Antonescu, C., Klip, A. and Planas, J. V. Regulation of fish GLUT4 traffic by insulin in L6 muscle cells. En preparació.

Díaz, M., Serrare, R. and Planas, J. V. Regulation of GLUT4 translocation and glucose transport by in trout muscle cells. En preparació.