



DIPARTIMENTO MEDICINA SPERIMENTALE E PATOLOGIA

Dottorato di Ricerca in Patologia Umana

-XVIII ciclo-

TESI DI DOTTORATO

**Regolazione spaziale e temporale della traslocazione del
Glut-4 da parte della flotillina-1 e della caveolina-3 nelle
cellule muscolari scheletriche**

CANDIDATO:

Dott.ssa Katia Fecchi

Dip. Del Farmaco

Istituto Superiore di Sanità

matr. C/02412

RELATORE :

Dr. Massimo Sargiacomo

Dip. Del Farmaco

Istituto Superiore di Sanità

CORRELATORE:

Prof. Matteo Antonio Russo

Dip. Medicina Sperimentale e Patologia

Università "La Sapienza" Roma

ANNO ACCADEMICO 2004/2005

A Ferruccio e Daniela

un grazie di cuore

I miei più sentiti ringraziamenti a

- Prof. Matteo Antonio Russo
Dip. Medicina Sperimentale e Patologia
Università "La Sapienza" Roma
- Dr. Massimo Sargiacomo
Dip. Del Farmaco
Istituto Superiore di Sanità
- Dott. Ferruccio Galbiati, Ph.D.
Assistant Professor
Department of Pharmacology,
University of Pittsburgh School of Medicine
- Dott.ssa Daniela Volontè, Ph.D.
Department of Pharmacology,
University of Pittsburgh School of Medicine

Indice

SCOPO DELLA TESI.....	1
INTRODUZIONE	
Caveola e microdomini glicolipidici	4
Il segnale dell'insulina.....	9
Ruolo delle caveoline nel segnale dell'insulina.....	12
MATERIALI E METODI	
Anticorpi e reagenti.....	14
Generazione di cellule muscolari scheletriche immortalizzate ...	15
Immunoblotting.....	17
Isolamento dei microdomini glicolipidici.....	18
Immunofluorescenza.....	20
Trattamento con insulina.....	21
Co – Immunoprecipitazione.....	21

<i>Small interfering RNA (siRNA)</i>	22
<i>Uptake del glucosio</i>	22

RISULTATI

Nelle cellule muscolari scheletriche il Glut-4 è arricchito nelle membrane che contengono la flotillina-1 e forma complessi stabili con la flotillina-1	23
Nelle cellule muscolari scheletriche, dopo stimolo con insulina, il Glut-4 si sposta insieme alla flotillina-1 dai depositi intracellulari alla membrana plasmatica attraverso i <i>pathways</i> PI3K- PKC ζ dipendenti	24
L'attivazione del pathway PI3-K avviene entro due minuti dalla stimolazione con insulina e richiede la caveolina-3	25
La mancanza della caveolina-3 riduce l'assorbimento del glucosio attraverso l'inibizione dello spostamento del Glut-4 al sarcolemma e l'attivazione p38 mediata del Glut-4	27
La caveolina-3 dopo stimolo con insulina si sposta dalla membrana plasmatica al citoplasma e temporaneamente interagisce con i domini contenenti flotillina-1/Glut-4	29
L'insulina, dopo 5 minuti, promuove il movimento del recettore dell'insulina dai domini contenenti caveolina-3 ai domini contenenti flotillina-1	30

Il movimento di Cbl e CrkII nei domini contenenti flotillina-1, così come l'attivazione di C3G, si verifica a 5 minuti di stimolo con insulina.....	31
L'alterazione dei domini che contengono flotillina-1 previene l'attivazione di C3G, il movimento del Glut-4 al sarcolemma, e l'assorbimento del glucosio in risposta all'insulina	32
DISCUSSIONE.....	34
BIBLIOGRAFIA.....	42

SCOPO DELLA TESI

L'insulina è il principale ormone regolatore del metabolismo, le sue azioni sono molteplici e interessano sia il metabolismo glucidico, che quello lipidico e proteico. Alterazioni dell'omeostasi del glucosio possono comportare gravi danni all'organismo. Per questa ragione lo studio delle molecole intracellulari e dei *pathways* che mediano l'azione dell'insulina, sono stati oggetto di intensi studi nel corso degli anni. L'effetto dell'insulina sul metabolismo del glucosio e dei lipidi è ben documentato ma rimangono ancora da identificare i precisi meccanismi molecolari implicati nella trasduzione del segnale. Dati recenti rivelano che la localizzazione delle molecole segnale e degli enzimi metabolici in specifici compartimenti cellulari possa chiarire lo studio dei meccanismi molecolari di questo ormone (Saltiel A.R & Pessin J. 2003; Watson R.T *et al.* 2001).

Numerosi studi indicano nella caveola, un organello della membrana plasmatica, e nei microdomini glicolipidici i siti in cui avviene il coordinamento, la regolazione e l'interazione tra i diversi recettori e le molecole segnale. (Krajewska W.M. & Maslowska I. 2004). Le principali proteine strutturali della caveola sono rappresentate dalla famiglia genica delle caveoline (caveolina -1, -2 e -3) (Scherer P.E. *et al.*1996, Okamoto T. *et al.*1998, Tang Z-

L *et al.* 1996). Le caveoline-1 e -2 sono abbondantemente espresse in adipociti, cellule endoteliali e fibroblasti, mentre l'espressione della caveolina-3 è per lo più ristretta alla muscolatura striata (Song K.S. *et al.* 1996a, Minetti C. *et al.* 1998, Galbiati F. 1999a, Galbiati F. 2000a, Galbiati F. 2000b, Galbiati F. 2001a, Scherer P.E: 1995) .

Evidenze sperimentali hanno messo in luce l'importanza della caveolina-3 nel metabolismo del glucosio. In studi condotti in topi privi di caveolina-3 è stato, infatti, dimostrato l'instaurarsi della resistenza insulinica, la diminuzione dell'assorbimento del glucosio, l'incremento di lipidi nel siero, l'aumento sia dell'adiposità che della sintesi di glicogeno (Oshikawa J. *et al* 2004, Capozza F. *et al.* 2005)

Il tessuto muscolare scheletrico rappresenta uno dei principali siti dove si verifica l'assorbimento del glucosio in risposta allo stimolo con l'insulina. E' nel muscolo infatti che è localizzato un importante glucotrasportatore, il Glut-4, insulino-dipendente. La risposta cellulare all'insulina determina il reclutamento del Glut-4 dalla riserva intracellulare al sarcolemma. I precisi meccanismi molecolari che regolano il reclutamento del Glut-4 al sarcolemma devono ancora essere pienamente identificati.

Il legame dell'insulina al recettore comporta l'attivazione spazio-temporale di differenti molecole segnale (Sharma P.M. *et al.* 1998; Chiang S-H *et al.* 2001). Tempi brevi di incubazione con insulina determinano l'attivazione: del suo recettore, della chinasi PI3-Kinasi e di Akt. In questo lavoro dimostriamo che la caveolina-3 è l'elemento chiave di questo segnale, in quanto

l'inibizione indotta della sua espressione blocca l'attivazione di PI3-Kinasi, di Akt e del movimento del Glut-4 al sarcolemma.

Inoltre, dopo l'attivazione del pathway InsR/PI3-K/Akt si osserva lo spostamento della caveolina-3 dalla membrana plasmatica al citoplasma, dove temporaneamente la caveolina-3 colocalizza con i domini contenenti la flotillina-1/Glut-4, prima che questi raggiungano il sarcolemma. Conseguentemente, si verifica il movimento del recettore dell'insulina dai domini che contengono caveolina-3 ai domini che contengono flotillina-1. La traslocazione del recettore dell'insulina si accompagna all'attivazione di un altro *pathway* di segnale: Cbl/C3G/TC10.

Agenti che alterano l'assetto molecolare dei microdomini che contengono flotillina-1 prevengono l'attivazione di C3G, la traslocazione del Glut-4 al sarcolemma e l'assorbimento del glucosio insulino-indotto.

L'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10, è mediata dalla flotillina-1 ed è successiva all'attivazione del *pathway* PI3-K-mediato.

L'insieme dei nostri risultati suggerisce che in cellule muscolari scheletriche la flotillina-1, un marcatore dei microdomini glicolipidici di cui si ignora la funzione, ha un importante ruolo nella traslocazione del Glut-4 e coopera con la caveolina-3 nel regolare il metabolismo energetico attraverso la regolazione spaziale e temporale dei componenti chiave del *signaling* dell'insulina.

Introduzione

Caveola e microdomini glicolipidici

La caveola è un'invaginazione della membrana plasmatica visibile al microscopio elettronico come un organello "fiaschiforme" di 50-100 nm (Rotberg K.G. *et al.* 1992).

Le principali proteine strutturali della caveola sono rappresentate dalla famiglia genica delle caveoline (caveolina -1, -2 e -3). Mentre le caveolina-1 e -2 sono abbondantemente espresse in adipociti, cellule endoteliali e fibroblasti, l'espressione della caveolina-3 è muscolo specifica (Song K.S *et al* 1996b).

L'analisi biochimica della caveola ha indicato un particolare assetto lipidico-proteico caratteristico solo di questo organello: glicosfingolipidi, colesterolo, sfingomieline e varie proteine recettoriali (Anderson R.G.W., 1992; Mineo C *et al.* 1996; Schlegel A. *et al.* 1998). La caratteristica sperimentale di queste specializzazioni della membrana plasmatica è rappresentata dalla loro insolubilità a detergenti non ionici (TX) a basse temperature (Brown D.A. & Rose J.K 1992). Questo rende possibile il loro isolamento in gradienti di saccarosio dal resto del contesto cellulare triton/solubile grazie al loro specifico grado di galleggiamento (bassa densità) (Sargiacomo M. *et al.* 1993)

L'identificazione di molecole segnale a seguito di attivazione specifica ha indicato la caveola quale importante centro di trasduzione del segnale (Lisanti et al.1994; Smart E. et al.1999). Precedenti studi hanno dimostrato un ruolo della caveola anche nel trasporto dei lipidi, nel processo di potocitosi (Anderson R.G.W et al. 1992), nell'endocitosi e nella transcitosi (Lisanti M.P *et al.* 1995).

La caveola non è ubiquitaria. Numerosi sistemi cellulari quali quello ematopoietico non presentano tale struttura. Tuttavia il gradiente di saccarosio di lisati di cellule ematopoietiche ha permesso di individuare frazioni di membrana plasmatica, i microdomini glicolipidici (microdomini resistenti a detergenti, DRMs), con lo stesso corredo lipidico-proteico della caveola (Parolini I. 1996, Fra A.M. et al. 1994, Sorice M. et al.1997). Pertanto si è ipotizzato che tali microdomini siano zone della membrana plasmatica identiche alla caveola in cui l'assenza dell'organello dipende dalla mancanza di espressione della caveolina. Tale ipotesi è rafforzata da studi sulla biogenesi della caveola.

La caveolina 1,2,3 interagendo tra loro a seconda della tessuto specificità formano omo-ed etero- oligomeri rappresentanti le unità strutturali della caveola (Sargiacomo M. et al.1995, Scherer P.E. et al. 1997, Parton R.G. 1996). La formazione di questi oligomeri è visibile in microscopia elettronica come un rivestimento striato della caveola (Rothberg K.G. et al. 1992). La caveolina una volta sintetizzata viene rilasciata a livello dell'apparato del Golgi dove interagisce con il colesterolo che ne consente una appropriata inserzione a livello di raggruppamenti di glicosfingolipidi persistenti nella membrana plasmatica (Murata M. et al. 1995; Harder T.&Simons 1997, Okamoto T. et al. 1998)

Un'ulteriore conferma a tale modello deriva da studi di trasfezione della caveolina-1 in cellule linfocitarie prive di caveola-caveolina. E' stato dimostrato che l'espressione transiente di caveolina-1 è sufficiente ad indurre la formazione delle caveole morfologicamente indistinguibili da un sistema cellulare esprimente caveolina endogena (Fra A.M. et al. 1995).

A livello funzionale la caveola e i microdomini glicolipidici giocano un ruolo chiave in diversi processi cellulari, come il *sorting* di membrana, l'adesione, i segnali di traduzione (Brown D.A & London E. 2000).

La caveolina-1, una proteina integrale di membrana di 21 Kda, è abbondantemente espressa in nelle cellule differenziate, quali cellule epiteliali, endoteliali, adipociti e fibroblasti. La caveolina-1 è coinvolta per interazione diretta nella regolazione di diverse proteine effettrici del segnale. E' noto infatti che l'interazione diretta con la caveolina-1 comporta l'inibizione di Ras, della subunità α della proteina G (Song K.S. 1997), dell'ossido nitrico sintasi (NOS), della proteina Kinasi C (PKC) e della proteina Kinasi A (PKA) (Couet J. et al. 1997, Engelman et al 1998a, Galbiati F. et al. 1999b, Garcia-Cardena G. et al. 1996, Li S. et al. 1995, Li S. et al. 1996, Moldovan N. et al. 1995, Sargiacomo M. et al. 1994, Scherer P.E. et al. 1995, Smart E. et al. 1994, Song K.S. et al. 1996b, Scherer P.E. et al. 1994, Razani B. et al. 1999). Diversi studi inoltre indicano che la caveolina-1 possa avere proprietà anti-proliferative (Engelman J.A. et al.1997; Engelman J.A. et al. 1998b; Lee S.W. et al 1998; Koleske A.J. et al.1995; Sager R. et al 1994). Galbiati e colleghi hanno dimostrato infatti che l'iper-espressione della caveolina-1 è sufficiente ad arrestare i

fibroblasti embrionali murini (MEFs) nella fase G0/G1 del ciclo cellulare, riducendo la loro durata proliferativa e promuovendo la senescenza cellulare prematura attraverso un *pathway* p53/p21 dipendente (Galbiati F. *et al.* 2001b, Volonte D. *et al.* 2002). Tuttavia la caveolina-1 è anche in grado di stimolare il segnale del recettore dell'estrogeno e del recettore dell'insulina (Yamamoto M. *et al.* 1998; Schlegel A. *et al.* 2001).

Nell'ambito della famiglia delle caveoline la caveolina-3 è una proteina muscolo-specifica e gioca un ruolo chiave nel tessuto muscolare scheletrico. Le alterazioni dell'espressione della caveolina-3 sono responsabili di importanti danni muscolari (distrofie muscolare, miopatie). E' stato dimostrato che l'iper-espressione della caveolina-3, nelle cellule muscolari scheletriche, può indurre un fenotipo simile alla distrofia muscolare di Duchenne, attraverso la *down-regolazione* della distrofina e delle glicoproteine associate. Inoltre è stato trovato che alti livelli di caveolina-3 inibiscono la fusione dei mioblasti in coltura (Volonte D., *et al.* 2003). Di contro, topi privi di cav-3 mostrano: perdite delle caveole nei tessuti muscolari scheletrici; cambiamenti nella distribuzione nei microdomini del complesso distrofina-glicoproteina, anomalie dei tubuli T e difetti miopatici (Galbiati F. *et al.* 2001a).

Una proteina localizzata nei microdomini glicolipidici e considerata un importante *marker* di queste specializzazioni di membrana è la flotilina-1. Questa proteina è altamente espressa in adipociti, diaframma, polmoni, cuore, cervello (Bickel P.E. *et al.* 1997). Se viene espressa in cellule di insetto la flotillina-1 è in

grado di formare vescicole intracellulari simili alle caveole (Volonte D. *et al.* 1999). Sebbene sia stato dimostrato che la flotillina-1 co-immunoprecipita con la caveolina-1 (Volonte D. *et al.* 1999), non è ancora chiaro se la flotillina-1 contribuisca all'organizzazione delle caveole. Dal momento che è stata trovata nei microdomini glicolipidici in cellule che non esprimono caveolina (Fra A.M. *et al* 1994, Salzer U. & Prohaska R. 2001) è stato ipotizzato che possa rappresentare una nuova classe di componenti strutturali dei microdomini glicolipidici non caveolari. La sua funzione rimane però ancora enigmatica.

Il segnale dell'insulina

Nei mammiferi l'ormone primario responsabile dell'omeostasi del glucosio è l'insulina. Questo ormone agisce mediante inibizione dell'*output* del glucosio nel fegato e attraverso lo stimolo dell'*uptake* del glucosio nel muscolo e nelle cellule adipose. Un'alterazione di questo bilancio potrebbe portare a malattie quali il diabete di tipo II (Moller and Kaufman, 2005).

Il diabete di tipo II è caratterizzato da due difetti patologici importanti, l'insulino resistenza nei tessuti periferici e l'incapacità del pancreas di compensare la resistenza insulinica. L'insulino resistenza si manifesta a livello di tutti i tessuti e organi coinvolti nell'omeostasi del glucosio:

- nel fegato: incapacità dell'insulina circolante elevata di sopprimere la sintesi epatica di glucosio
- nel muscolo: riduzione dell'utilizzazione periferica del glucosio
- nel tessuto adiposo: diminuzione dell'effetto inibitorio dell'insulina sulla lipolisi e conseguente aumento degli acidi grassi circolanti, a loro volta in grado di interferire in periferia con l'utilizzazione del glucosio

Nelle cellule muscolari e negli adipociti un momento critico del metabolismo del glucosio è rappresentato dal trasporto del glucosio attraverso la membrana plasmatica (Birnbaum M.J. *et al.* 1989, Charron M.J. *et al.* 1989).

In questi tessuti il trasporto del glucosio è mediato da due trasportatori: il Glut-1, responsabile del trasporto basale, e il Glut-4 responsabile del trasporto in seguito allo stimolo di insulina (Rea and James, 1997; Pessin et al. 1999).

L'assorbimento del glucosio dopo stimolo di insulina si verifica quando il Glut-4 è reclutato dai residui intracellulari alla membrana plasmatica (Czech M.P. *et al.* 1993, Satoh S. *et al.* 1993)

Negli adipociti è stato dimostrato che per la traslocazione del Glut-4 dopo stimolo con insulina è richiesta l'attivazione di almeno due *pathway*.

Nel primo l'attivazione del recettore dell'insulina induce la fosforilazione delle proteine substrato del recettore dell'insulina (IRS), che a sua volta fosforilano e attivano il fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3-K). La PI3-K è un enzima eterodimerico, composto da una subunità catalitica di 110 kDa (p110) associata con una subunità regolatoria di 85 kDa (p85). Il legame di p85 con IRS fosforilato in tirosina comporta l'attivazione della subunità catalitica p100. Una volta attivata la PI3-K è in grado di fosforilare il fosfatidilinositolo 4,5- bifosfato producendo il fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PIP3). Il PIP3 è un importante regolatore allosterico della kinasi fosfoinositide dipendente (PDK). Infine, il PDK fosforila e attiva sia Akt (o proteina kinasi B, PKB) che un'isoforma atipica di proteina chinasi C (PKC ζ), stimolando la traslocazione del Glut-4 (Sharma, P.M. *et al* 1998; Okada, T. *et al* 1994; Cheatham B. *et al* 1994).

Negli adipociti è stato recentemente dimostrato un secondo *pathway* implicato nella traslocazione del Glut-4. Un differente *pool* del recettore dell'insulina è in grado di fosforilare altri substrati del recettore, quali APS e Cbl (Ahmed Z. *et al* 1999, Ribon V. *et al* 1997). Cbl è un protooncogene di 120 kDa che interagisce con la proteina associata a Cbl (CAP) (Ribon V. *et al* 1998) e può così legarsi alla flotillina-

1. (Kimura A. *et al* 2001). Questa interazione è responsabile della localizzazione di Cbl all'interno dei microdomini glicolipidici (Baumann C.A. 2000).

Cbl forma un complesso con la proteina adattatrice Crk II che viene fosforilata e reclutata nei microdomini glicolipidici. CrkII si lega così a C3G (fattore di scambio GTP/GDP) che attiva TC10 (una piccola proteina che lega il GTP della famiglia delle proteine Rho). L'attivazione di TC10 è essenziale per l'assorbimento del glucosio insulina-mediato e per la traslocazione del Glut-4 (Drivas, G. *et al* 1990; Chiang S.H. *et al* 2001).

Non è però ancora ben conosciuto il complesso delle molecole segnale che inducono il movimento del Glut-4 alla plasmamembrana. Quindi sebbene l'azione dell'insulina sull'assorbimento del glucosio sia sempre più documentata, rimangono ancora non chiari i precisi meccanismi alla base di tale evento.

Ruolo delle caveoline nel segnale dell'insulina

Negli ultimi anni studi sugli adipociti hanno evidenziato l'importanza della caveolina-1 nei meccanismi del segnale per l'assorbimento del glucosio insulino-mediato. Negli adipociti è stata osservata un'alta espressione della caveolina-1. Durante il differenziamento dei pre-adipociti 3T3-L1 in adipociti maturi si osserva un aumento di 10-25 volte dei livelli di espressione della caveolina-1 (Scherer P.E. *et al* 1994). La relazione tra la caveolina-1 e l'adiposità è stata confermata poi da studi su topi *knock out* (KO) per la caveolina-1. L'eliminazione di tale proteina comporta una drammatica riduzione dei depositi di tessuto adiposo e un fenotipo magro nei topi privi di caveolina-1 (Razani B. *et al.* 1999).

Recenti lavori mostrano inoltre che la caveolina-1 è importante sia funzionalmente che strutturalmente nel processo di biogenesi e nel metabolismo dei corpi lipidici (Cohen A.W *et al* 2004).

Controversa è invece la relazione della caveolina-1 con il Glut-4. Dati biochimici suggeriscono che negli adipociti, dopo lo stimolo con insulina, il Glut-4 si sposti nei domini della plasmamembrana ricchi in caveolina-1 (Scherer P.E. *et al* 1994; Gustavsson J. *et al* 1996). Il movimento del Glut-4 nella caveola in seguito a stimolo con insulina non è però confermato da dati di microscopia elettronica (Malide D. *et al* 2000, Voldstedlund M. *et al* 1993)

Nel tessuto muscolare scheletrico è stato dimostrato che la caveolina-3 gioca un ruolo nel segnale indotto dall'insulina. Topi privi di caveolina-3 mostrano infatti

resistenza all'insulina, come dimostrato da una diminuzione dell'assorbimento del glucosio nelle cellule muscolari scheletriche, un indebolimento della *performance* a test di tolleranza al glucosio e un incremento di lipidi nel siero (Oshikawa J. *et al* 2004).

In accordo con questi dati Lisanti e colleghi hanno recentemente dimostrato, in topi privi di caveolina-3, un incremento dell'adiposità, iper-insulinemia dopo il pranzo, resistenza all'insulina, intolleranza al glucosio e diminuzione dopo stimolo con insulina dell'assorbimento del glucosio (Capozza F. *et al* 2005).

Rimangono da analizzare possibili alterazioni del traffico del Glut-4. Sebbene nelle cellule muscolari scheletriche la caveolina-3 sembri importante nel metabolismo del glucosio, i *pathways* del segnale modulati dalla caveolina-3 in seguito a stimolo di insulina devono essere ancora pienamente identificati. Inoltre il ruolo della caveolina-3, così come quello della flotillina-1 nella traslocazione del Glut-4 in cellule muscolari scheletriche è completamente inesplorato.

In questa tesi analizziamo l'ipotesi che la flotillina-1 e la caveolina-3 modulino la cascata del segnale insulina mediato responsabile della traslocazione del Glut-4 alla membrana plasmatica nelle cellule muscolari scheletriche.

Materiali e metodi

Anticorpi e reagenti:

Anti-flotillin-1 IgG (mouse mAb 18), anti-caveolin-3 IgG (mouse mAb 26), e anti-phosphotyrosine IgG (mouse mAb PY20) provengono da Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA. Anti-Glut-4 IgG (rabbit pAb) è stato gentilmente dato da Dr. Samuel Cushman, National Institutes of Health. Anti-c-Myc IgG (rabbit pAb A-14), e anti-insulin-R β IgG (rabbit pAb C-19) sono della Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. Anti-IRS1 IgG (rabbit pAb), e anti-p85 IgG (rabbit pAb), e anti-phospho-Akt (Ser 473) IgG (rabbit pAb) provengono dalla Signaling Technology, Beverly, MA. Gli anticorpi secondari anti-mouse e anti rabbit coniugati con la perossidasi provengono dalla Pierce, Rockford, IL. L'insulin, sodium orthovanadate, e wortmannin sono stati presi presso sigma, St. Louis, MO. Okadaic acid e protein Kinase C ζ pseudosubstrate inhibitor (myristoylated) provengono dalla Calbiochem, Inc., La Jolla CA.

Generazione di cellule muscolari scheletriche immortalizzate

Le cellule muscolari scheletriche immortalizzate esprimono normali livelli di caveolina-3 endogena, la perdita dell'espressione della caveolina-3 si ottiene dagli "immortomouse" come descritto (Volonte D. *et al.* 2003; Volonte D. *et al.* 2005).

L'"immortomouse" è un topo transgenico che ha il gene tsA58 (sensibile alla temperatura) del large antigene T di SV-40, sotto il controllo di un promotore, H-2Kb (sensibile al γ interferone). Le cellule, derivate da questi topi, si moltiplicano in condizioni permissive (33 °C in presenza di γ -interferone) e si differenziano in condizioni non permissive (37 °C in assenza di γ -interferone). Diverse linee cellulari derivate da differenti tessuti sono state generate, in passato, con pieno successo usando questo modello di topo, incluse le cellule muscolari scheletriche (Jat P.S. *et al.* 1991; Kanda S. *et al.* 1996, Ehler E. *et al.* 1995, Morgan J.E. *et al.* 1994, Noble M. *et al.* 1995).

Topi di un mese (circa 15g) sono stati sacrificati e i muscoli degli arti posteriori (il gastrocnemio e il muscolo soleo) sono stati isolati da entrambe le zampe posteriori e raccolti in *dish-petri* contenenti PBS + penicillina e streptomicina. Il muscolo è stato sminuzzato in pezzi molto fini e trasferito in tubo contenente lo 0.5% di collagenasi di tipo II e 1% di dispasi diluita in PBS + penicillina e streptomicina. I muscoli sono stati incubati per 30 minuti a 37°C e mischiati durante l'incubazione. Il supernatante è stato raccolto ed è stato aggiunto un uguale volume del mezzo completo (HAM's F-10 con 20% FBS). I campioni sono stati filtrati con un filtro per

cellule e centrifugati a 900g per 10 minuti. Il pellet, che contiene le cellule muscolari scheletriche, è stato risospeso nel mezzo completo. Successivamente le cellule sono state sottoposte a 5 cicli di pre-piastramento. Le cellule sono passate in condizioni permissive per non più di 5-7 giorni: HAM's F-10 con il 20% FBS in presenza di γ -interferone (50U/ml) a 33°C (Volonte D. *et al* 2003). Il differenziamento in miotubuli multinucleati è stato realizzato attraverso la crescita delle cellule in condizioni non permissive in mezzo di differenziamento: DMEM con 2% di horse serum in assenza di γ -interferone a 37°C.

Immunoblotting

Le cellule sono state raccolte con il tampone di corsa bollente. Le proteine cellulari sono state risolte su SDS-PAGE (12.5% acrilamide; 7.5% per IRS1) e trasferite su nitrocellulosa BA83 (Schleicher&Schuell, Keene, NH).

L'*immunoblotting* è stato effettuato nel seguente modo: i filtri di nitrocellulosa sono stati incubati con una soluzione di TBST (Tris 10mM, PH 8.0, NaCl 150mM, Tween 20 0.05%) contenente il 5% p/v di "milk" non grasso (per bloccare i siti aspecifici della nitrocellulosa), per 45 minuti a temperatura ambiente, su un oscillatore. Dopo 3 lavaggi con TBST i filtri sono stati incubati, per 2 ore a temperatura ambiente, con i vari anticorpi.

Gli anticorpi in eccesso sono stati rimossi con 3 lavaggi in TBST al termine dei quali i filtri sono stati incubati con i rispettivi anticorpi secondari (diluizione 1:3000) già coniugati con la perossidasi. Dopo ulteriori lavaggi il filtro è stato immerso nella soluzione ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham) ed infine gli anticorpi legati sono stati rivelati mediante autoradiografia esponendo per il tempo necessario alla visualizzazione delle bande.

Isolamento dei microdomini glicolipidici

Un metodo usato per l'isolamento e lo studio selettivo dei microdomini glicolipidici (microdomini resistenti a detergenti, DRMs) sfrutta la capacità di flottazione dei glicosfingolipidi ad una opportuna densità di saccarosio dopo trattamento con detergente non ionico (Triton X-100) (Sargiacomo M. *et al* 1993). La lisi cellulare in Triton 1% seguita dalla sedimentazione in gradiente di saccarosio 5-40% consente di separare zattere lipidiche e proteine associate. L'isolamento dei microdomini è quindi identificabile come un anello opaco flottante ad una densità costante del 20 %. Tale anello include proteine non solubilizzate dal Triton e quindi separate dalle restanti proteine cellulari. Al contrario le proteine solubilizzate dal Triton e deprivate quindi dei lipidi associati si distribuiscono invece nelle frazioni del gradiente a più alta densità. Pertanto in base a questo criterio lo studio dell'espressione di una proteina nelle 12 frazioni del gradiente consente di stabilire la sua appartenenza ai microdomini lipidici. Le cellule sono "screperate" con 1,4 ml del tampone salino MES (25mM Mes -2- morpholino-ethanesulfonic acid monohydrate a ph 6.5, 0.15 M NaCl) contenente l'1% (v/v) di Triton X-100 più gli inibitori delle proteasi (0.1µg/ml PMSF- Phenylmethylsulfonyl fluoride, 2µg/ml aprotinin, 2µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatina A, 1 mM ortovanadato di sodio) successivamente il lisato è stato omogenizzato a freddo con pestelli di vetro tight (Wheaton Milville, New Jersey). L'omogenato è stato aggiunto al 40% di saccarosio su cui è stato formato un gradiente lineare 5 - 30%. La centrifugazione è stata eseguita a 45.000 rpm per 16-20 ore in un rotore SW60 (Beckam Instrument, Palo Alto, CA). Ciascun

gradiente, partendo dall'alto, è stato suddiviso in 12 frazioni da 0,35 ml. Le frazioni 4-6, che rappresentano i DRMs, e le frazioni 9-11, che rappresentano i non DRMs, sono state unite insieme rispettivamente. Un uguale quantità di proteina di entrambi i due gruppi è stata separata su SDS-PAGE e analizzata per immunoblotting.

Immunofluorescenza

Le cellule, fatte crescere su vetrini, sono state lavate tre volte con PBS e fissate per 30 minuti a temperatura ambiente con 2% di paraformaldeide in PBS. Le cellule fissate sono state lavate con PBS e permeabilizzate con 0.1% Triton X-100, 0.2% BSA (bovine serum albumin) per 10 minuti. Le cellule sono state trattate con 25mM NH₄Cl in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente per ridurre i gruppi aldeide liberi. Le cellule sono state lavate con PBS e incubate con l'anticorpo primario (diluito in PBS con 0.1% Triton X-100, 0.2% BSA) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS (10 minuti ciascuno), le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario per 1 ora a temperatura ambiente: *lissamine rhodamine B sulfonyl chloride-conjugate goat antibody* (5µg/ml) e/o *fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit antibody* (5µg/ml). Infine, le cellule sono state lavate tre volte con PBS (10 minuti ciascuno) e i vetrini sono state montati con il reagente *antifade slow -Fade* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Le acquisizioni sono state fatte usando il microscopio confocale Zeiss (LSM 5 Pascal). La localizzazione della flotillina-1/Glut-4 al sarcolemma o nei compartimenti perinucleari è stata determinata analizzando 100 miotubuli selezionati casualmente, prima e dopo stimolo con insulina, da tre esperimenti indipendenti. In Figura **2B** e **4B** i dati sono espressi come percentuale del numero di cellule.

Trattamento con insulina

Le cellule, private del siero per 4 ore, sono state incubate con 160mM di insulina, in mezzo libero da siero, e per i tempi indicati nei diversi esperimenti. Le cellule sono state poi analizzate per immunofluorescenza, co-immunoprecipitazione, e per isolamento dei DRMs, come indicato.

Co - Immunoprecipitazione

Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS e lisate per 30 minuti a 4°C in un tampone contenente 10 mM di Tris a pH 8.0, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, e 60mM octilglucoside (per la co-immunoprecipitazione di IRS-1/p85 le cellule sono state lisate nel seguente tampone : 137mM NaCl, 20mM Tris a pH 7.5, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 1% NP40, 10% glicerolo, 100µM ortovanadato di sodio, 100µg/ml acido okadaico).

I campioni sono stati sottoposti a *preclearing* per un ora a 4 °C usando la proteina A-sefariosio (20 µl; 1:1 con soluzione lisi). Successivamente sono stati immunoprecipitati a 4°C usando i diversi anticorpi in presenza della proteina-A di sefariosio (30µl; 1:1 con soluzione lisi). Dopo tre lavaggi con il tampone di immunoprecipitazione, i campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE (12.5% acrilamide) e trasferiti a nitrocellulosa, quindi incubati con gli anticorpi specifici.

Small interfering RNA (si RNA)

La diminuzione dell'espressione della flotillina-1 è stata ottenuta mediante trasfezione delle cellule con siRNA. La sequenza bersaglio è:

5'-AGCAAATCCAGAGGATCTCTC-3'. *Scrambled* siRNA è stato usato come controllo. Le cellule non differenziate sono state trasfettate con siRNA usando lipofectamina. Dopo 24 ore, le cellule sono state differenziate per 3 giorni e i lisati cellulari sono stati analizzati per *immunoblotting* o per immunoprecipitazione.

Uptake del glucosio

Le cellule muscolari scheletriche sono state cresciute in piastre da 12 pozzetti e lasciate senza siero per 4 ore a 37°C. Le cellule sono state poi incubate nel tampone Krebs Ringer Phosphate (KRP 128mM NaCl, 4.7 Mm KCl, 1.25 mM MgCl₂, 0.65mM CaCl₂, 0.1M Sodium Phosphate Buffer a pH 7.8) per 30 minuti a 37°C. ³H-2-deoxy-glucose (1μCi/ml) è stato aggiunto durante gli ultimi 5 minuti dell'incubazione con o senza insulina. Le cellule sono state poi trasferite in ghiaccio e lavate 3 volte con PBS freddo. Le cellule sono state successivamente solubilizzate in 0.1% SDS e il contenuto di ³H è stato determinato mediante conta per scintillazione. I risultati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti, ciascuno ripetuto in triplicato.

Risultati

Nelle cellule muscolari scheletriche il Glut-4 è arricchito nelle membrane che contengono la flotillina-1 e forma complessi stabili con la flotillina-1

Per studiare il possibile ruolo della flotillina-1 nel processo di reclutamento del Glut-4 dai depositi intracellulari alla membrana plasmatica abbiamo utilizzato le cellule muscolari scheletriche immortalizzate (Volonte D. *et al.* 2003; Volonte D. *et al.* 2005).

Per prima cosa abbiamo valutato il livello di espressione della flotillina-1 e del Glut-4 nei mioblasti indifferenziati e nei miotubuli differenziati. La Figura **1A** mostra che nei mioblasti l'espressione di entrambe le proteine è molto bassa, ma aumenta nel corso del differenziamento dei miotubuli. La caveolina-3, un marcatore di differenziamento terminale, è espressa soltanto nei miotubuli (Figura **1A**). Abbiamo quindi analizzato se, nei miotubuli differenziati, la flotillina-1 e il Glut-4 si presentassero arricchiti nei microdomini resistenti a detergenti (DRMs) e l'effetto dell'insulina sulla loro localizzazione.

Nelle cellule muscolari scheletriche sia la flotillina-1 che il Glut-4 sono stati trovati nei DRMs e l'insulina non comporta cambiamenti nella loro localizzazione (Figura **1B**). Questi risultati trovano conferma in **Figura 1C**, dove dimostriamo che la flotillina-1 e il Glut-4 sono parte dello stesso complesso proteico, come mostrato dalla capacità dell'anticorpo Glut-4 di co-immunoprecipitare la flotillina-1.

L'insulina non ha effetti sull'interazione tra queste due proteine (Figura **1C**).

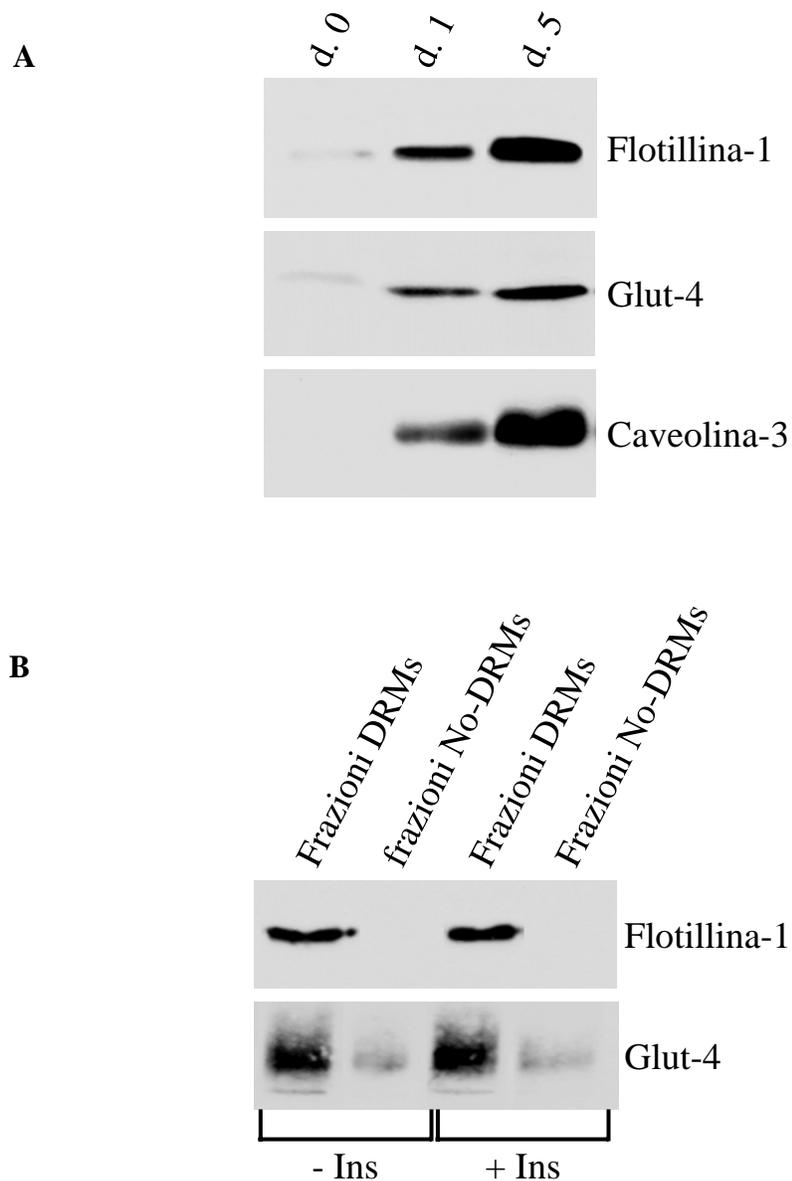


Figura 1. Flotillina-1 e Glut-4, nelle cellule muscolare scheletriche, fanno parte dello stesso complesso proteico

- A)** Analisi immunoblotting. Le cellule muscolari scheletriche sono state non differenziate o differenziate per differenti tempi (1 e 5 giorni). I lisati cellulari sono stati poi sottoposti ad analisi per *immunoblotting* con anti-flotillina-1, anti-Glut-4, e anti-caveolina-3 IgGs
- B)** Centrifugazione su gradiente di saccarosio. Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni, trattate con o senza insulina (160nM per 10 minuti), e i microdomini resistenti a detergenti (frazioni DRMs) sono stati separati dall'insieme delle membrane cellulari e proteine citosoliche (frazioni no-DRMs) mediante centrifugazione con gradiente di densità. L'espressione della flotillina-1 e del Glut-4 è stata analizzata per *immunoblotting* usando specifici anticorpi.

C

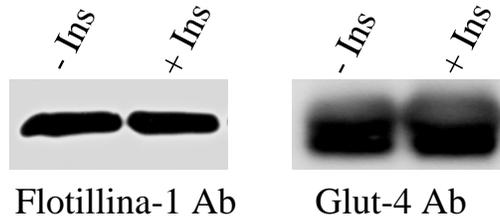
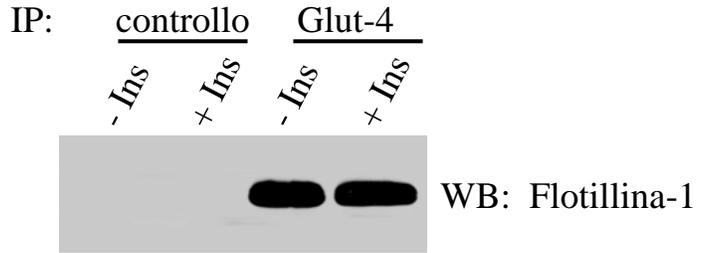


Figura 1

C) Co-Immunoprecipitazione. Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni e trattate o non trattate con 160nM di insulina per 10 minuti. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anti- Glut-4 IgGs. Gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a *Western blotting* usando anticorpi specifici per la flotillina-1. L'immunoprecipitazione soltanto con le biglie è stata usata come controllo interno. L'insulina non comporta un cambiamento dell'espressione totale proteica sia della flotillina-1 che del Glut-4.

Nelle cellule muscolari scheletriche, dopo stimolo con insulina, il Glut-4 si sposta insieme alla flotillina-1 dai depositi intracellulari alla membrana plasmatica attraverso i *pathways* PI3K- PKC ζ dipendenti

Le cellule muscolari scheletriche differenziate sono state analizzate mediante immunofluorescenza usando anticorpi fluorescenti contro la flotillina-1 e il Glut-4. La figura **2A** (riquadro in alto) illustra che in assenza di insulina le due proteine sono colocalizzate nei compartimenti perinucleari. Dopo stimolo con in insulina (160nM per 10 minuti), la flotillina-1 insieme con il Glut-4 si sposta al sarcolemma (Figura **2A**, riquadro in basso). In Figura **2B** viene mostrata la quantificazione della localizzazione della flotillina-1/Glut-4 prima e dopo stimolo con insulina.

La traslocazione dai compartimenti perinucleari alla plasmamembrana avviene in modo PI3-K e PKC- ζ dipendente, come mostrato dalla localizzazione insulino-mediata della flotillina-1 e del Glut-4 in presenza della wortmannina (antibiotico ricavato da *Penicillium funiculosum*, potente e selettivo inibitore del PI3-K) e dell'inibitore pseudosubstrato della proteina kinasi C (Figura **2C**). La specificità di questi effetti è dimostrata dall'incapacità del PD98059, un inibitore del pathway delle p42/44 MAP kinasi, di bloccare la traslocazione della flotillina-1 e del Glut-4 al sarcolemma in seguito a trattamento con insulina (Figura **2C**)

A

Sk. M CTL

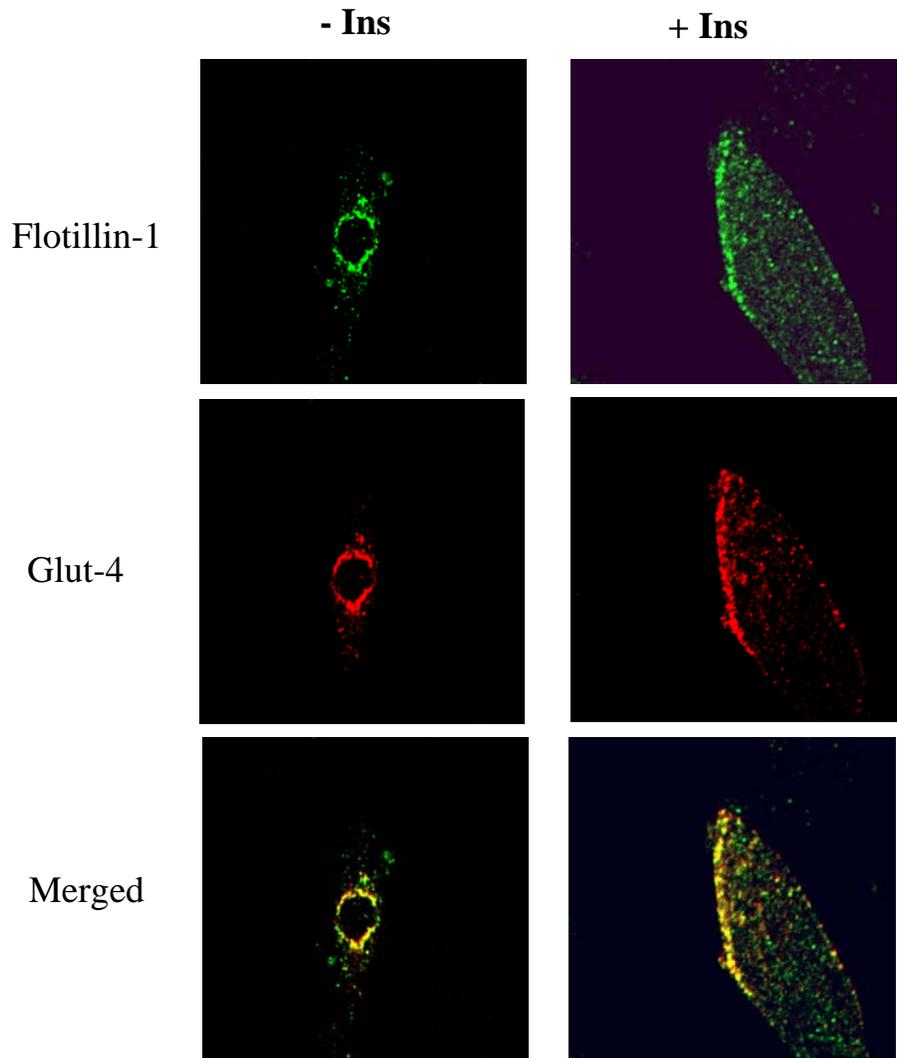


Figure 2. La Flotillina-1 e il Glut-4, in risposta all'insulina, si spostano nella plasmamembrana in modo P13K/PKC ζ - dipendente

A) **Immunofluorescenza.** Miotubuli differenziati sono stati non trattati o trattati con insulina (160nM per 10 minuti). La localizzazione della flotillina-1 e del Glut-4 è stata analizzata usando anti-flotillina-1 e anti Glut-4 IgGs, seguita dall'incubazione con anticorpi secondari fluorescenti. **Verde:** flotillina-1; **Rosso** Glut-4; il **Giallo** indica la colocalizzazione tra la flotillina-1 e Glut-4

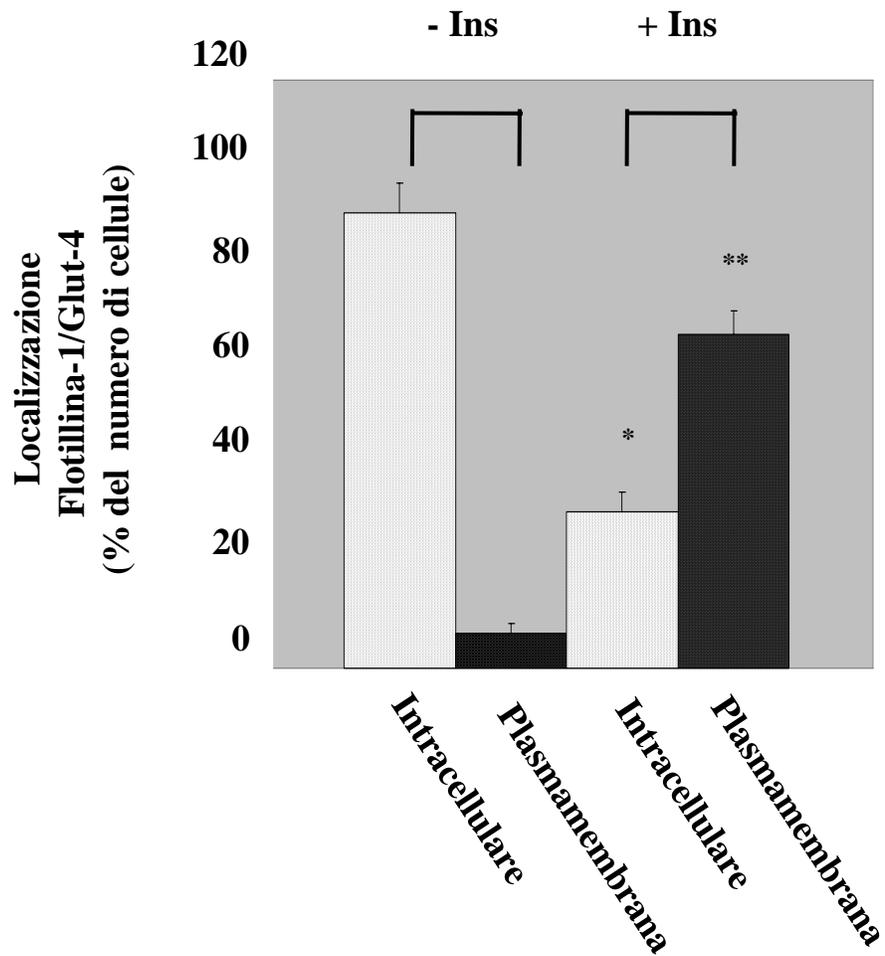


Figure 2.

B) Quantificazione. Quantificazione della localizzazione della flotillina-1 e del Glut-4 nelle cellule muscolari scheletriche, prima e dopo stimolo con insulina. Prima dello stimolo con insulina, il 93±6% delle cellule esprimono flotillina-1/Glut-4 intorno al nucleo e soltanto il 7±1.5% nel sarcolemma. Dopo stimolo con insulina, la flotillina-1/Glut-4 sono stati trovati nei compartimenti perinucleari nel 32±4% delle cellule e nella plasmamembrana nel 68±5% delle cellule. I valori rappresentano la media ± SEM. n=100; * P<-0.005 (localizzazione intracellulare +Ins vs -Ins); **P< 0.005 (localizzazione plasmamembrana +Ins vs -Ins).

C

Sk. M. CTL

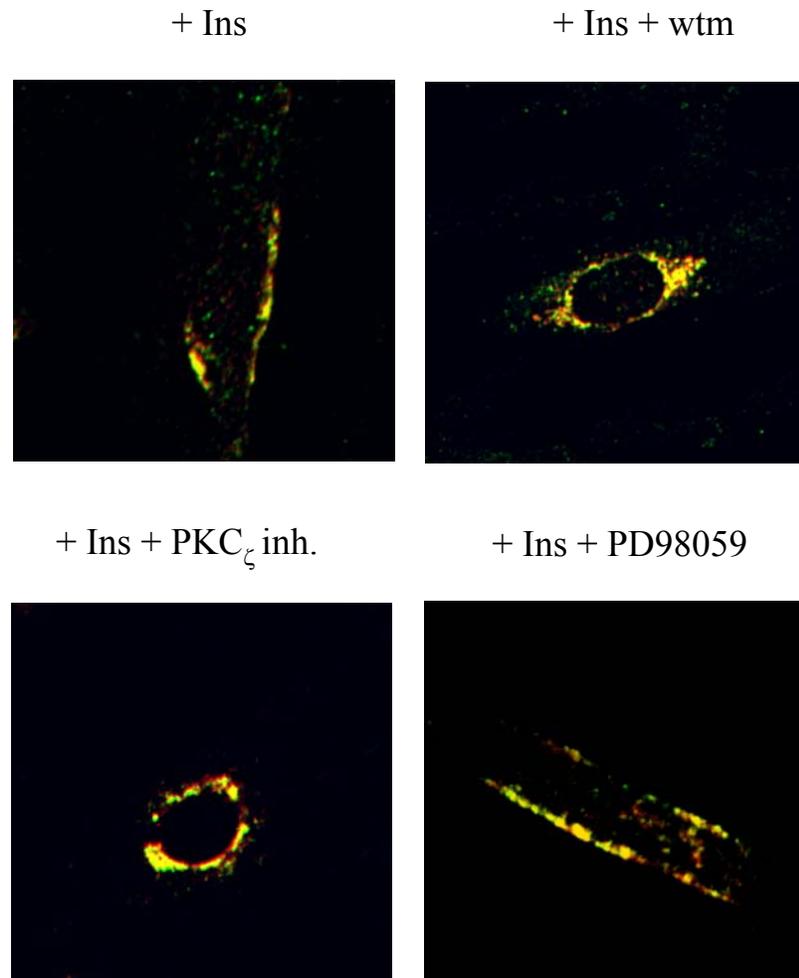


Figura 2

C) **Immunofluorescenza.**

Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni e trattate con insulina (160nM per 10 minuti) in presenza o assenza di wortmannina (wtm), del pseudoinibitore proteina kinasi C ζ (PKC ζ inh.), e di PD98059. L'espressione della flotillina-1 e del Glut-4 è stata rilevata come in figura 2A.

Verde: flotillina-1; **Rosso** Glut-4; il **Giallo** colocalizzazione tra flotillina-1 e Glut-4

L'attivazione del pathway PI3-K avviene entro due minuti dalla stimolazione con insulina e richiede la caveolina-3

Per esaminare il *time-course* dell'attivazione del *pathway* P13K/Akt abbiamo per prima cosa analizzato la fosforilazione del recettore dell'insulina dopo lo stimolo con l'insulina. Come mostrato in Figura **3A** la fosforilazione del recettore si verifica dopo 2 minuti di trattamento con l'insulina. L'attivazione del recettore rimane elevata anche dopo 5 minuti di stimolo (Figura **3A**). In accordo con questi dati lo stimolo con insulina per 2 minuti è sufficiente ad attivare PI3-K (Figura **3B**) e Akt (Figura **3C**). Esperimenti su cellule muscolari scheletriche prive di caveolina-3 hanno rivelato che l'espressione della caveolina-3 è necessaria per l'attivazione di questo *pathway*. La Figura **3B** e **3C** mostra infatti che, in cellule muscolari scheletriche prive di caveolina-3, c'è una significativa diminuzione sia dell'attivazione di PI3-K che di Akt dopo lo stimolo con insulina. Tale riduzione dell'attivazione del *pathway* PI3-K, in cellule prive di caveolina-3, non è dovuta alla riduzione dell'espressione del recettore dell'insulina (Figura **3D**).

Successivamente abbiamo analizzato il segnale del recettore mediante attivazione con ortovanadato, un inibitore delle fosfatasi che mima l'azione dell'insulina. Sia nelle cellule controllo che in quelle prive di caveolina-3 si osserva un'espressione paragonabile della fosforilazione di Akt (Figura **3E**).

L'insieme di questi risultati suggerisce che la mancanza di caveolina-3 possa ostacolare la capacità del recettore dell'insulina di attivare, a valle, le molecole

segnale associate (PI3-K e Akt) soltanto quando il recettore è attivato dall'insulina ma non quando il recettore è attivato indipendentemente dall'insulina (ad es. da sostanze che mimano l'azione dell'insulina).

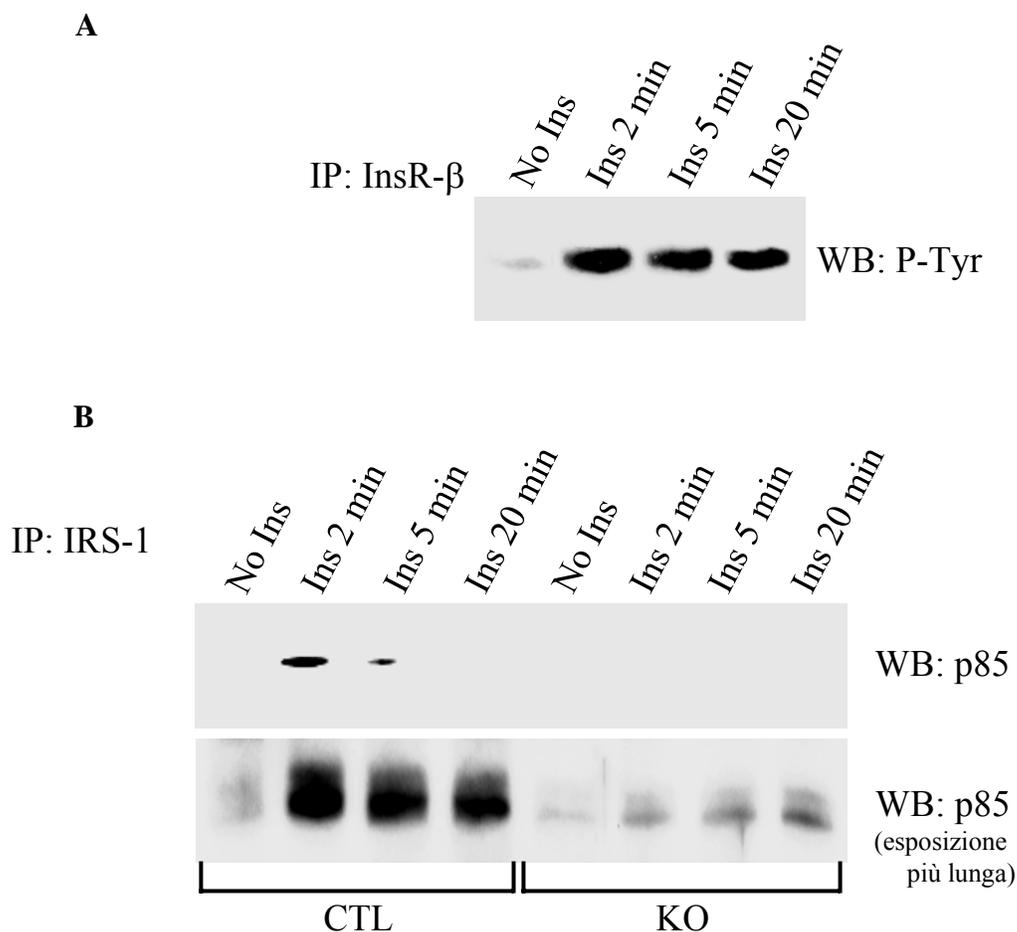


Figure 3. L'attivazione del *pathway* Ins/PI3K/Akt si verifica 2 minuti dopo lo stimolo con insulina e richiede l'espressione della caveolina-3

Le cellule muscolari scheletriche controllo (**A**, **B** e **C**) e quelle prive di caveolina-3 (**B** e **C**) sono state differenziate per 5 giorni e trattate o non trattate con l'insulina (160nM) per 2, 5, e 20 minuti. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con l'anti-recettore β IgGs (**A**), e con IRS-1 IgGs (**B**), e gli immunoprecipitati sono stati analizzati per immunoblotting usando anticorpi specifici contro proteine fosforilate in tirosina (**A**), e p85 (**B**). I lisati cellulari totali sono stati separati mediante SDS-PAGE e sottoposti ad analisi per Western blotting usando anti-fosfo-Akt e Akt IgGs (**C**). L'espressione dei totali per IRS-1, e p85 non è alterata dall'insulina (dato non mostrato). Inoltre, i lisati cellulari totali dei miotubuli controllo e dei miotubuli privi di caveolina-3 sono stati analizzati per immunoblotting con anti-Ins-R β IgGs (**D**). Infine, I miotubuli controllo e privi di caveolina-3 sono stati trattati e non con 10 μ M di ortovanadato per 15 minuti, e i lisati cellulari sono stati analizzati per immunoblotting usando anti-fosfo-Akt e akt IgGs (**E**)

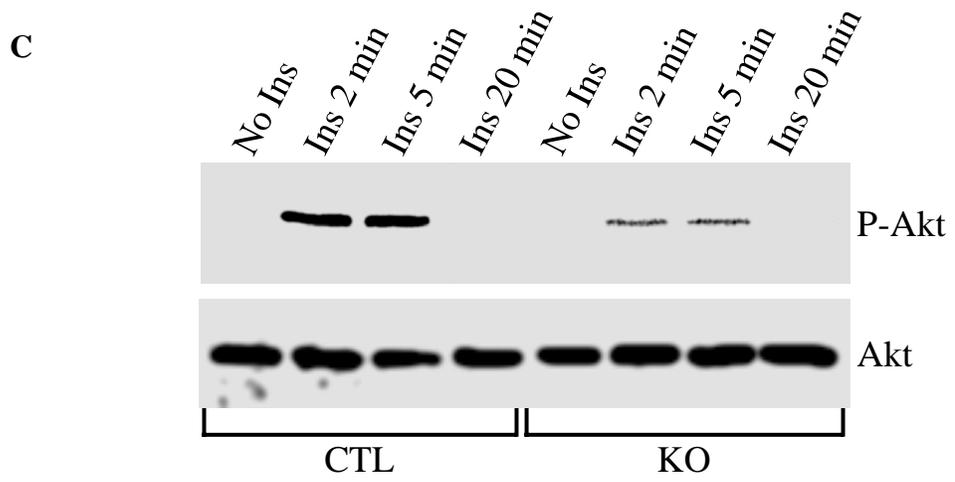


Figura 3C-D

E

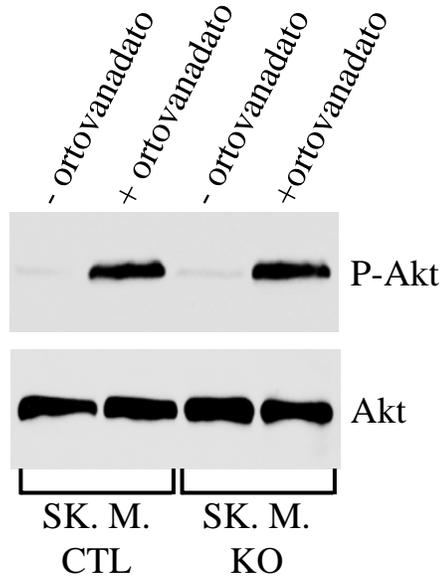


Figura 3E

La mancanza della caveolina-3 riduce l'assorbimento del glucosio attraverso l'inibizione dello spostamento del Glut-4 al sarcolemma e l'attivazione p38 mediata del Glut-4

Per analizzare il ruolo specifico della caveolina-3 nel segnale dell'insulina, siamo andati a studiare, in cellule muscolari scheletriche derivate da topi privi di caveolina-3, l'effetto dell'assenza di caveolina-3 sulla traslocazione del Glut-4 insulino-mediata e sull'assorbimento del glucosio. In Figura **4A** dimostriamo che la capacità dei domini flotillina-1/Glut-4 di raggiungere la plasmamembrana, dopo stimolo con insulina, è compromessa in maniera significativa. Infatti, mentre la flotillina-1 e il Glut-4, dopo insulina, raggiungono il sarcolemma nel $68 \pm 5\%$ delle cellule controllo (Figura **2A** e **2B**), i domini contenenti flotillina-1/Glut-4 sono stati trovati nella plasmamebrana soltanto nel $18 \pm 3\%$ delle cellule prive caveolina-3 (Figura **4A** e **4B**). Sia la flotillina-1 che il Glut-4, dopo stimolo di insulina rimangono nella regione perinucleare nella maggior parte delle cellule prive di caveolina-3 ($82 \pm 7\%$) (Figura **4A** e **4B**) rispetto alle cellule controllo ($32 \pm 4\%$, Figura **2A** e **2B**).

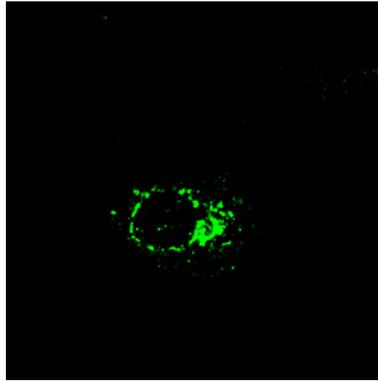
A sostegno di questi dati, le cellule prive di caveolina-3 mostrano una drammatica inibizione (circa il 68% nelle cellule controllo) dell'assorbimento del glucosio insulino-mediato (Figura **4C**).

Diversi studi hanno evidenziato che il *pathway* della MAP Kinasi p38 gioca un ruolo nell'attivazione del Glut-4 insulino-mediato (Somwar R. et al 2000; Somwar R. et al 2001; Sweeney G. et al 1999). In accordo con questi dati, in cellule muscolari

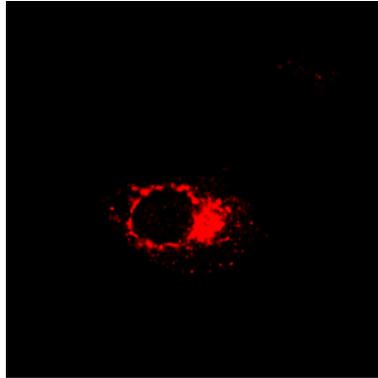
A

Sk. M. KO

Flotillina-1



Glut-4



+ Ins

Merged

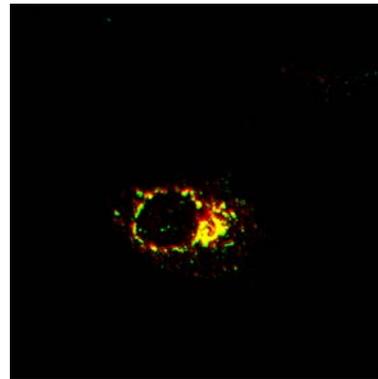


Figura 4. La traslocazione del Glut-4 e l'assorbimento del glucosio sono inibiti in cellule prive di caveolina-3

- A) **Immunofluorescenza.** Le cellule prive di caveolina-3 sono state differenziate per 5 giorni e trattate con 160nM di insulina per 10 minuti. Le cellule sono state incubate con flotillina-1 e Glut-4 IgGs. L'espressione della flotillina-1 e Glut-4 è stata determinata usando anticorpi secondari fluorescenti. **Verde:** flotillina-1; **Rosso:**Glut-4; **Giallo** colocalizzazione tra flotillina e Glut-4

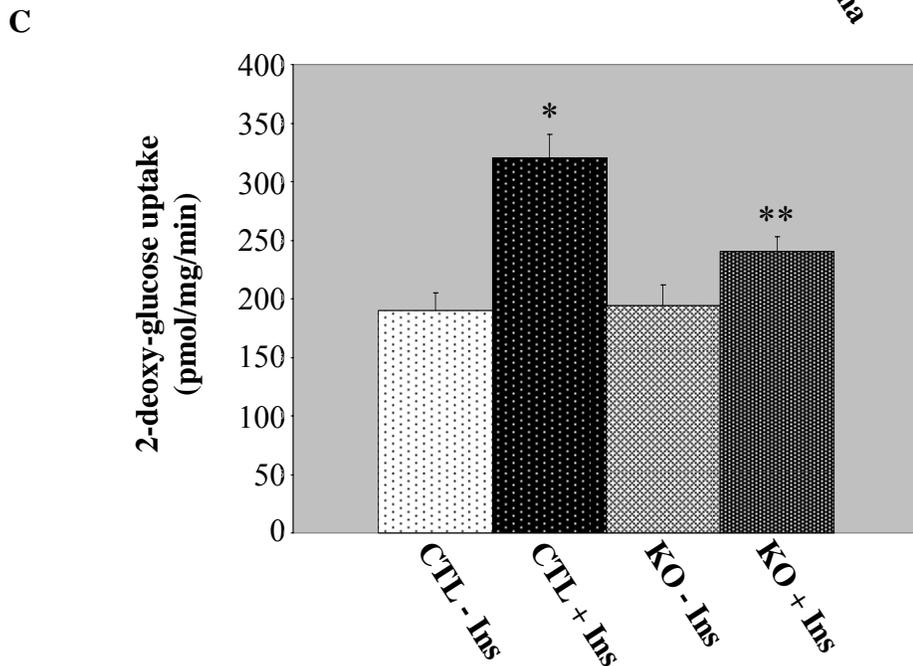
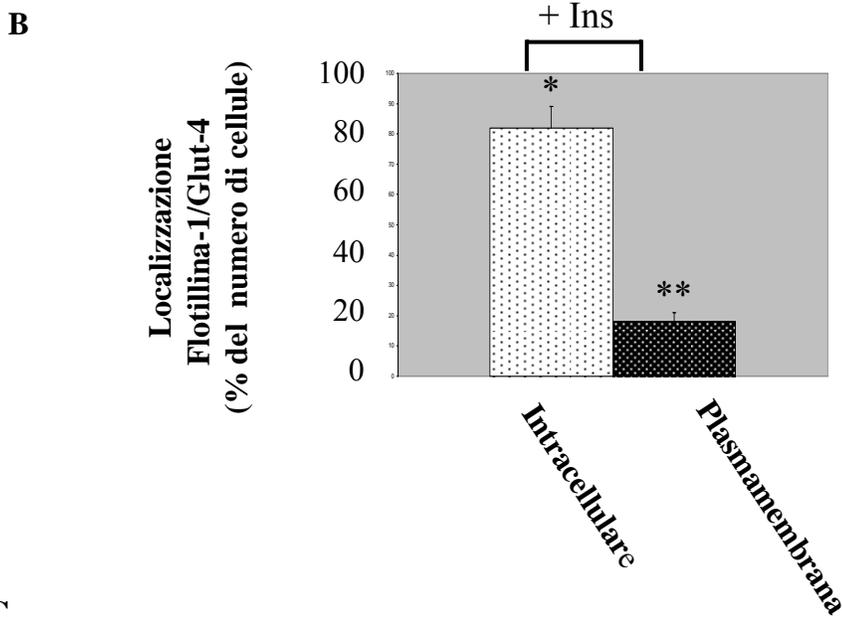


Figura 4B-C

B) Quantificazione. Quantificazione della localizzazione della flotillina-1 e del Glut-4 nei miotubuli privi di caveolina-3, dopo stimolo con insulina. La flotillina-1/Glut-4, dopo lo stimolo con insulina, rimangono localizzate nei compartimenti perinucleari nel $82\% \pm 7\%$ delle cellule e si spostano al sarcolemma nel $18\% \pm 3\%$ delle cellule. I valori rappresentano la media \pm SEM. $n=100$; * $P < 0.005$ (localizzazione intracellulare KO +Ins vs CTL+Ins (**Fig 2B**)); ** $P < 0.005$ (localizzazione plasmanembrana KO +Ins vs CTL+Ins (**Fig.2B**)).

C) Uptake del glucosio. Le cellule muscolari scheletriche provenienti da topi controllo e topi privi di caveolina-3 sono state differenziate per 5 giorni e trattate con o senza insulina (160nM) per 10 minuti. 3H-2 -deoxy-glucose ($1\mu\text{Ci/mol}$) è stato aggiunto durante gli ultimi 5 minuti di incubazione. Le cellule sono state successivamente solubilizzate e il contenuto di 3H è stato determinato mediante conta per scintillazione. I valori rappresentano la media \pm SEM. $n=9$; * $P < 0.005$ (CTL+Ins vs CTL-Ins (**Fig 2B**)); ** $P < 0.01$ (KO +Ins vs CTL+Ins).

scheletriche controllo, abbiamo trovato che l'inibitore della p38 MAP kinasi (SB203580) previene in maniera drammatica l'assorbimento del glucosio (Figura **4D**). Interessante è che l'attivazione della p38 MAP Kinasi da parte dell'insulina è significamene inibita nei miotubuli privi di caveolina-3 (Figura **4E**).

Questi risultati contribuiscono a spiegare la riduzione dell'assorbimento del glucosio insulina-mediato che abbiamo osservato in cellule prive di caveolina-3.

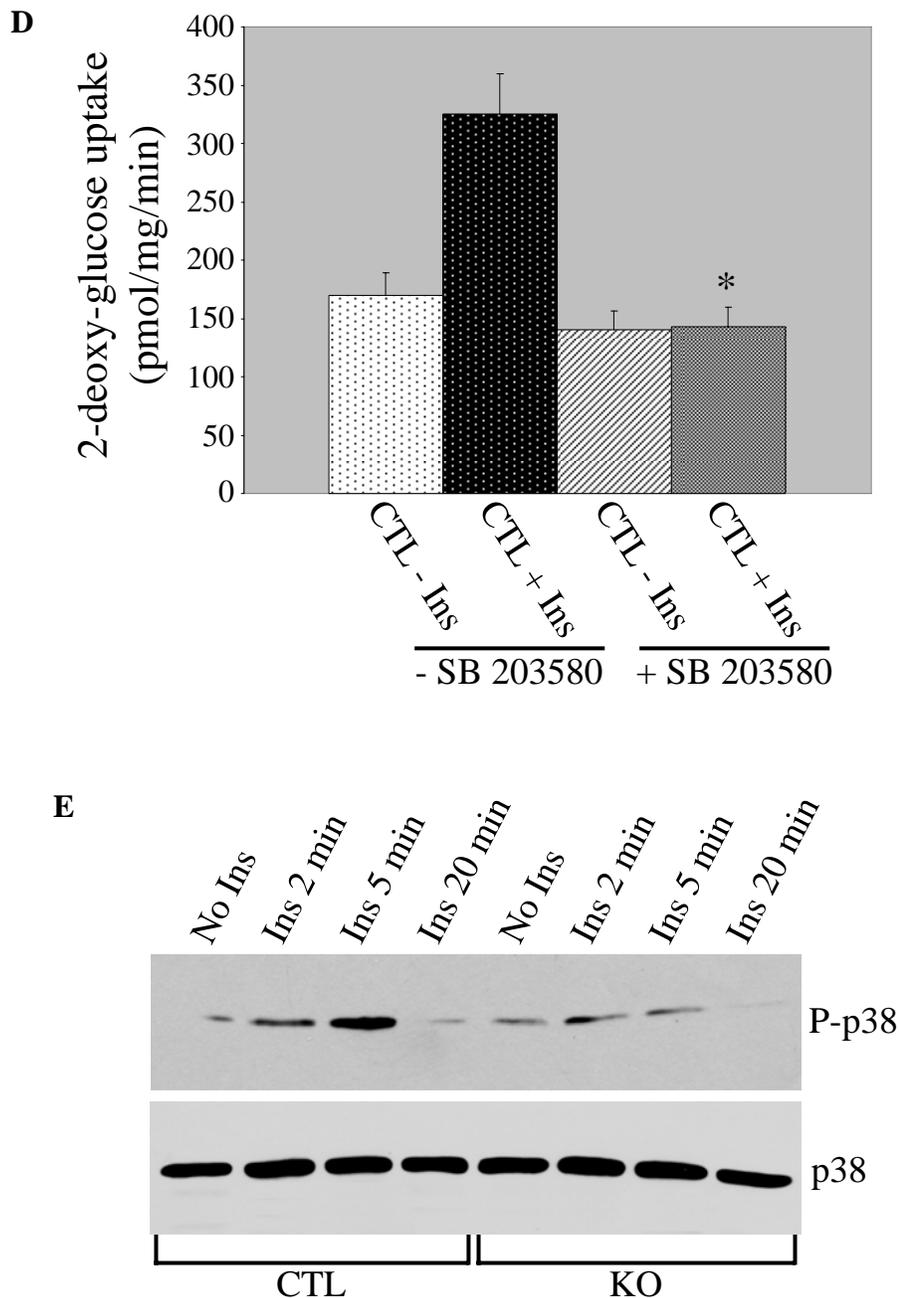


Figura 4D-E

- D)** **Uptake del glucosio.** Le cellule muscolari scheletriche controllo sono state differenziate per 5 giorni e trattate o no con insulina (160nM per 10 minuti), in presenza o assenza dell'inibitore della p38MAP kinasi SB203580 (SB203580 è stato aggiunto durante la starvation per 4 ore) L'uptake del glucosio è stato determinato come descritto in Fig C. I valori rappresentano la media \pm SEM. n=9; *P< 0.005 (CTL+Ins+SB vs CTL+Ins -SB).
- E)** **Analisi Immunoblotting.** Miotubuli differenziati, privi di caveolina-3 sono stati non trattati o trattati con l'insulina (160nM) per differenti tempi (2, 5, e 20 minuti). I lisati cellulari sono stati analizzati per immunoblotting usando anticorpi specifici per la forma fosforilata di p38 MAP. L'immunoblotting con anti-p38 MAP Kinase IgGs (pannello in basso), che riconosce il totale di p38 MAP kinase, indica che l'espressione totale di p38MAP Kinase non viene modificata dal trattamento con insulina

La caveolina-3 dopo stimolo con insulina si sposta dalla membrana plasmatica al citoplasma e temporaneamente interagisce con i domini contenenti flotillina-1/Glut-4

E' noto che nei miotubuli differenziati la caveolina-3 è localizzata nel sarcolemma (Volonte D. et al 2003; Volonte D. et al 2005). Dato che in figura **2A** abbiamo mostrato che quando le cellule sono trattate con insulina la flotillina-1, insieme con il Glut-4, si sposta dalla plasmamembrana, ci siamo chiesti se in miotubuli differenziati la localizzazione della caveolina-3 potesse essere influenzata dall'insulina. In Figura **5A** dimostriamo che la caveolina-3, dopo insulina (160nM per 10 minuti), si sposta dal sarcolemma (riquadro a sinistra) al citoplasma (riquadro a destra), mentre il Glut-4 si sposta dai compartimenti intracellulari (riquadro a sinistra) alla plasmamembrana (riquadro a destra).

Interessante è che quando le cellule sono trattate con l'insulina per 5 minuti la caveolina-3 e il Glut-4 co-localizzano nel citoplasma. Questo suggerisce che i domini che contengono la caveolina-3, nel momento in cui si spostano dal sarcolemma (notare freccia in Figura **5A**, riquadro centrale), possano interagire temporaneamente con i domini contenenti flotillina-1/Glut-4, prima che questi raggiungano il sarcolemma. (vedere freccia in Figura **5A**, riquadro centrale)

A conferma di questi dati in Figura **5B** abbiamo dimostrato che in assenza di insulina la caveolina-3 e la flotillina-1 non interagiscono e che la loro interazione è invece massima dopo 5 minuti di trattamento con l'ormone. La loro interazione ritorna a livelli basali dopo 20 minuti di stimolo (Figura **5B**).

A

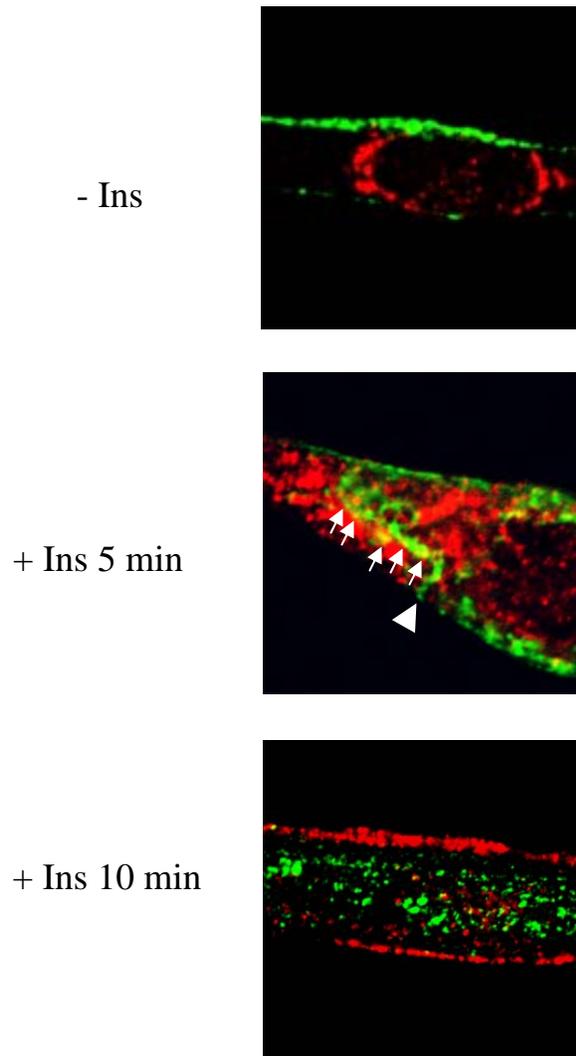


Figura 5. La caveolina-3 si sposta dal sarcolemma e interagisce con il glut-4 dopo stimolo con insulina

A) Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni. Le cellule sono state non trattate (quadro in alto) o trattate con insulina (160nM) per 5 minuti (quadro centrale) e 10 minuti (quadro in basso). Le cellule sono state incubate con anticorpi specifici per la caveolina-3 e il Glut-4, seguiti dall'incubazione con gli anticorpi secondari fluorescenti. **Verde:** caveolina-3; **Rosso:**Glut-4; **Giallo** colocalizzazione tra caveolina-3 e Glut-4

B

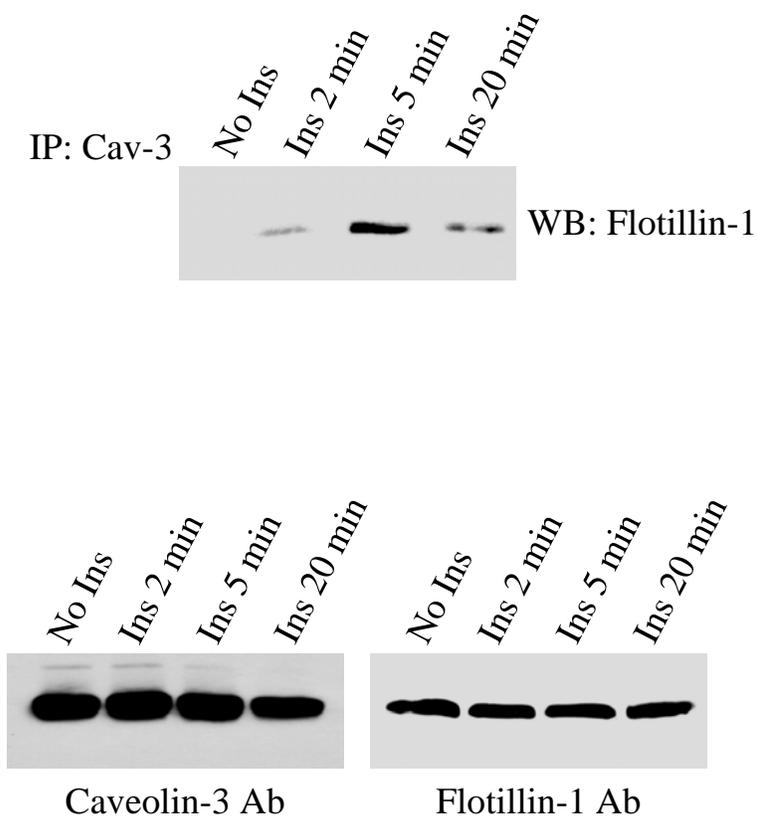


Figura 5

B) I miotubuli differenziati sono stati non trattati o trattati con 160nM di insulina per differenti tempi (2,5, e 20 minuti). I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anti caveolina-3 IgGs. Gli immunoprecipitati sono stati analizzati con anticorpi specifici per la flotillina-1. L'insulina non cambia l'espressione totale della caveolina-3 e della flotillina-1

L'insulina, dopo 5 minuti, promuove il movimento del recettore dell'insulina dai domini contenenti caveolina-3 ai domini contenenti flotillina-1

Recentemente è stato dimostrato che, nel tessuto muscolare scheletrico, il recettore dell'insulina co-immunoprecipita con la caveolina-3 (Oshikawa J. *et al* 2004).

Dal momento che dopo 5 minuti di stimolo con insulina abbiamo osservato un'interazione tra i domini che contengono caveolina-3 e i domini contenenti flotillina-1/Glut-4, ci siamo domandati se il recettore, prima dello stimolo con insulina, facesse parte dello stesso complesso di proteine con la caveolina-3 e se, dopo stimolo, potesse interagire invece con la flotillina-1. A tale fine i lisati cellulari di miotubuli differenziati sono stati immunoprecipitati con l'anti-recettore dell'insulina IgGs, e l'immunoprecipitato è stato analizzato mediante *immunoblotting* con anticorpi specifici per la caveolina-3 e per la flotillina-1. La Figura **6A** mostra che, in assenza di stimolo con insulina, il recettore dell'insulina è localizzato principalmente nei domini contenenti la caveolina-3. Dopo stimolo il recettore si sposta invece dai domini contenenti caveolina-3 ai domini contenenti flotillina-1. L'interazione tra il recettore dell'insulina e la flotillina-1 a 5 minuti è in accordo con i dati mostrati in Figura **5B**, dove dimostriamo che l'interazione tra i domini contenenti caveolina-3 e quelli con flotillina-1 è massima a 5 minuti dal trattamento con insulina.

Il movimento di Cbl e CrkII nei domini contenenti flotillina-1, così come l'attivazione di C3G, si verifica a 5 minuti di stimolo con insulina

Studi sugli adipociti hanno dimostrato che la flotillina-1 è in grado di legare direttamente la proteina CAP associata a Cbl (Kimura A. *et al* 2001). Dato che in Figura **6A** abbiamo dimostrato che il recettore dell'insulina, dopo 5 minuti di stimolo con insulina, si sposta dai domini contenenti caveolina-3 ai domini contenenti flotillina-1 ci siamo chiesti se, nelle cellule muscolari scheletriche, la flotillina-1 mediasse l'attivazione, stimolata dall'insulina, del *pathway* Cbl/C3G/TC10.

Miotubuli differenziati sono stati immunoprecipitati usando anticorpi diretti contro Cbl, CrkII e C3G. Le immunoprecipitazioni sono state poi sottoposte a *immunoblotting* usando anti-flotillina-1 IgGs.

La Figura **6B** dimostra che sia Cbl che CrkII, dopo 5 minuti di stimolo con insulina, temporaneamente si spostano nei domini contenenti flotillina-1. Di contro C3G, il fattore di scambio GDP/GTP, si presenta localizzato nei domini contenenti flotillina-1 sia prima che dopo lo stimolo con insulina (Figura **6B**). L'attivazione di C3G si ha comunque dopo 5 minuti di trattamento con insulina (Figura **6C**) e quindi combacia temporalmente con la traslocazione del recettore dell'insulina, di Cbl, e di CrkII all'interno dei domini che contengono flotillina-1.

L'insieme di questi dati suggerisce che la flotillina-1 possa mediare l'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10 5 minuti dopo lo stimolo di insulina e che l'attivazione di questo *pathway* sia successiva all'attivazione del pathway PI3K/Akt dipendente, che si verifica invece 2 minuti dopo lo stimolo.

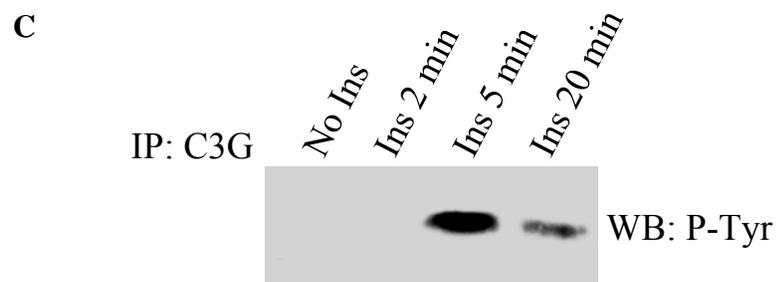
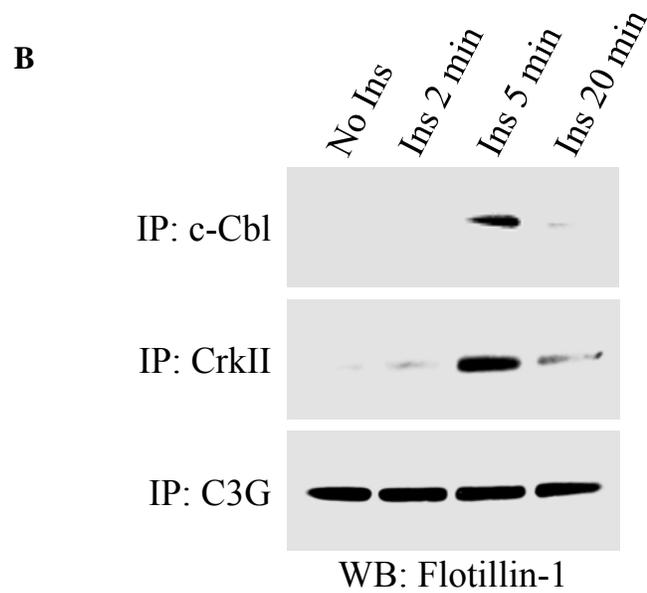
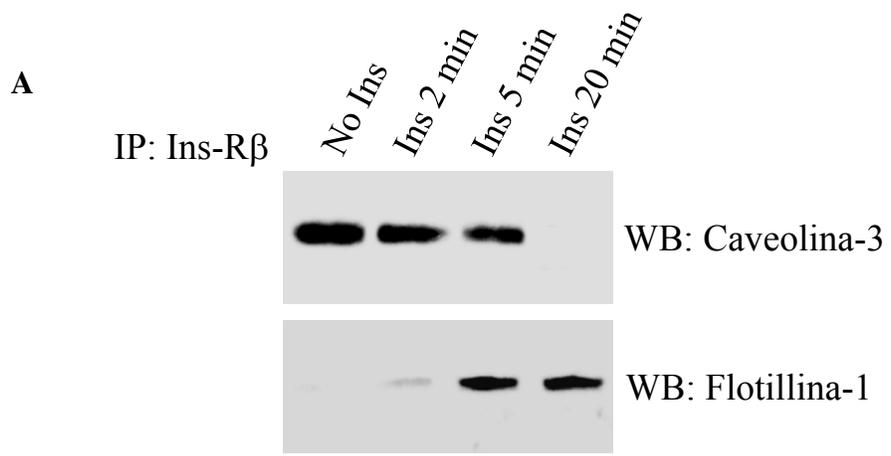


Figura 6. L'attivazione del pathway Ins-R/ Cbl/C3G avviene dopo 5 minuti di stimolo con insulina

Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni e trattate con o senza insulina (160nM) per 2,5 e 20 minuti. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anti-Ins-R β (A), anti-Cbl IgGs (B), e anti-C3G IgGs (B e C); gli immunoprecipitati sono stati analizzati per immunoblotting usando anti-caveolina-3 IgGs (A), anti flotillina-1 IgGs (A e B), e anti-fosfotirosina IgGs (C). L'espressione totale della caveolina-3, della flotillina-1, di Cbl, CrkII, e C3G non è alterata dall'insulina (dato non mostrato)

L'alterazione dei domini che contengono flotillina-1 previene l'attivazione di C3G, il movimento del Glut-4 al sarcolemma, e l'assorbimento del glucosio in risposta all'insulina

Per confermare un maggior ruolo della flotillina-1 nell'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10 e nella traslocazione del Glut-4, dopo stimolo con insulina, abbiamo alterato l'assetto molecolare dei domini contenenti la flotillina-1 usando la ciclodestrina (MbetaCD), una droga in grado di rimuovere il colesterolo.

In Figura **7A** mostriamo che i domini contenenti flotillina-1 sono stati modificati con successo, come dimostrato dall'esclusione della flotillina-1 e del Glut-4 dai DRMs nei miotubuli differenziati trattati con insulina, dopo il trattamento con MbetaCD. L'incubazione con MbetaCD, inoltre, previene l'interazione tra il recettore dell'insulina e la flotillina-1, 5 minuti dopo lo stimolo con insulina (Figura **7B**). In accordo con l'idea che la traslocazione insulino-mediata del recettore dell'insulina nei domini che contengono flotillina-1 sia richiesta per la conseguente attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10, in Figura **7C** mostriamo che l'attivazione di C3G insulino-mediata è fortemente inibita dal trattamento con MbetaCD.

Interessante è che l'alterazione dei domini contenenti flotillina-1 con la MbetaCD previene la traslocazione sia della flotillina-1 che del Glut-4 al sarcolemma in risposta all'insulina (Figura **7D**). A conferma di questi dati l'assorbimento del glucosio insulino-indotto è impedito dal trattamento con la MbetaCD (Figura **7E**).

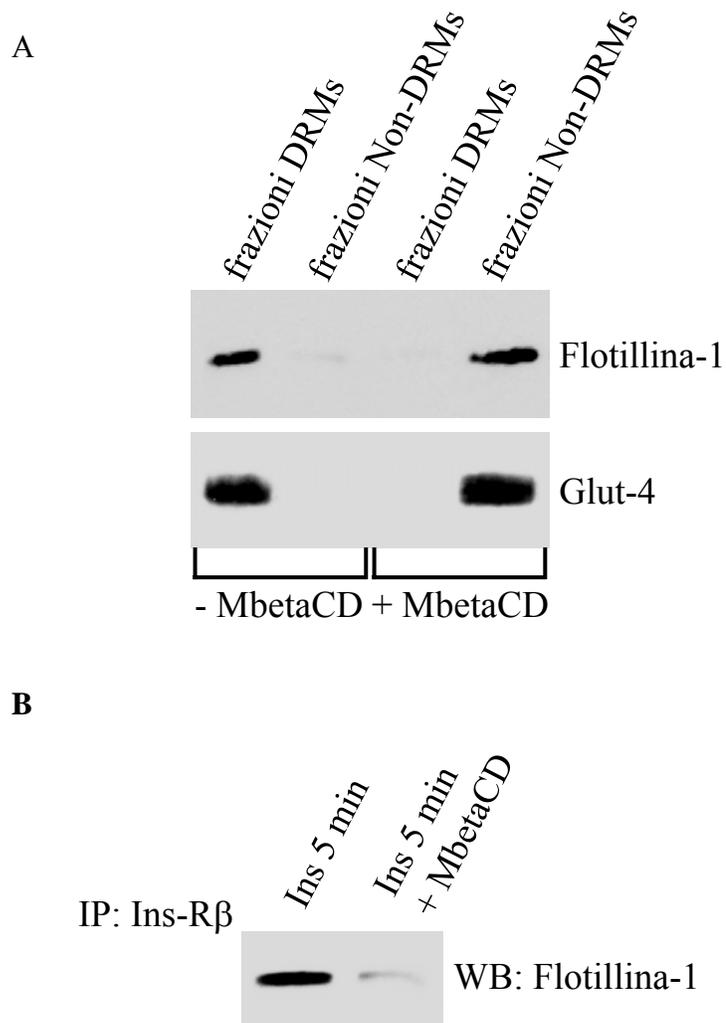


Figura 7. L'alterazione dei domini che contengono la flotillina-1 previene l'attivazione di C3G, il movimento di Glut-4 al sarcolemma, e l'assorbimento del glucosio dopo il trattamento con insulina.

- A) Centrifugazione su gradiente di saccarosio.** Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni e trattate con o senza 10mM metil-beta-ciclodestrina (MbetaCD) per 1 ora prima dello stimolo con insulina (160nM per 10 minuti) in assenza o presenza di MbetaCD. I microdomini detergenti-resistenti (DRMs) sono stati separati dall'insieme delle membrane cellulari e delle proteine citosoliche (frazioni no-DRMs) mediante centrifugazione su gradiente di densità di saccarosio. L'espressione della flotillina-1 e del Glut-4 è stata analizzata usando anticorpi specifici.
- B) E C) Co-immunoprecipitazione.** Le cellule muscolari scheletriche sono state differenziate per 5 giorni e trattate con o senza 10 mM di MbetaCD per 1 ora prima dello stimolo con insulina (160nM per 5 minuti) in assenza o presenza di MbetaCD. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anti-Ins-R β IgGs (**B**) e C3G IgGs (**C**). Gli immunoprecipitati sono stati poi analizzati per *Western blotting* con anti-flotillina-1 IgGs (**B e C**) e anti-fosfotirosina IgGs (**C**). La MbetaCD non cambia l'espressione totale di Ins-R β , flotillina-1, e C3G (dato non mostrato)

E

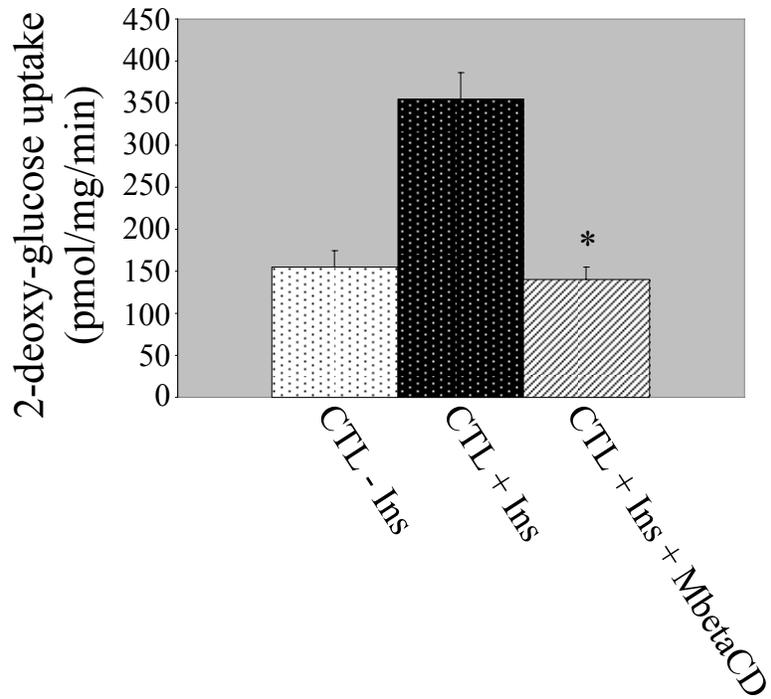


Figura 7.

E) Uptake glucosio. Le cellule muscolari scheletriche controllo sono state differenziate per 5 giorni e trattate con o senza 10mM di MbetaCD per 1 ora prima dello stimolo con insulina (160nM per 10 minuti) in presenza o assenza di MbetaCD. 3H-2 deossi-glucosio (1 μ Ci/ml) è stato aggiunto durante gli ultimi 5 minuti di incubazione. Le cellule sono state poi solubilizzate e il contenuto 3H è stato determinato mediante conta per scintillazione. I valori rappresentano la media \pm SEM. n=9; *P<- 0.005 (CTL+Ins+MbetaCD vs CTL+Ins).

Per un'ulteriore dimostrazione del ruolo diretto della flotillina-1 nell'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10, è stata analizzata l'attivazione di C3G dopo che l'espressione endogena della flotillina-1 è stata *down-regolata* da siRNA. La Figura **8A** illustra che l'espressione della flotillina-1 è fortemente ridotta in circa il 90% dei miotubuli trasfettati con siRNA diretti contro la flotillina-1.

La down-regolazione dell'espressione della flotillina-1 comporta una riduzione dell'interazione tra C3G e la flotillina-1 (Figura **8B**, riquadro alto). Inoltre, la riduzione dei livelli della flotillina-1 sono sufficienti per inibire in modo drammatico l'attivazione di C3G in risposta all'insulina, come dimostrato dalla ridotta fosforilazione di C3G nelle cellule trasfettate con si-RNA flotillina-1, in confronto ai miotubuli trasfettati con siRNA controllo (Figura **8B**, riquadro centrale). I bassi livelli di fosforilazione di C3G non sono accompagnati da una riduzione dell'espressione totale della proteina C3G nelle cellule trasfettate con siRNA flotillina-1 (Figura **8B**, riquadro in basso). Al contrario, l'espressione di C3G è up-regolata nelle cellule dove l'espressione della flotillina-1 è ridotta da siRNA, questo potrebbe rappresentare un meccanismo compensatorio adottato, non con successo, dalle cellule per contrastare la riduzione dell'attivazione di C3G dovuta alla mancanza della flotillina-1.

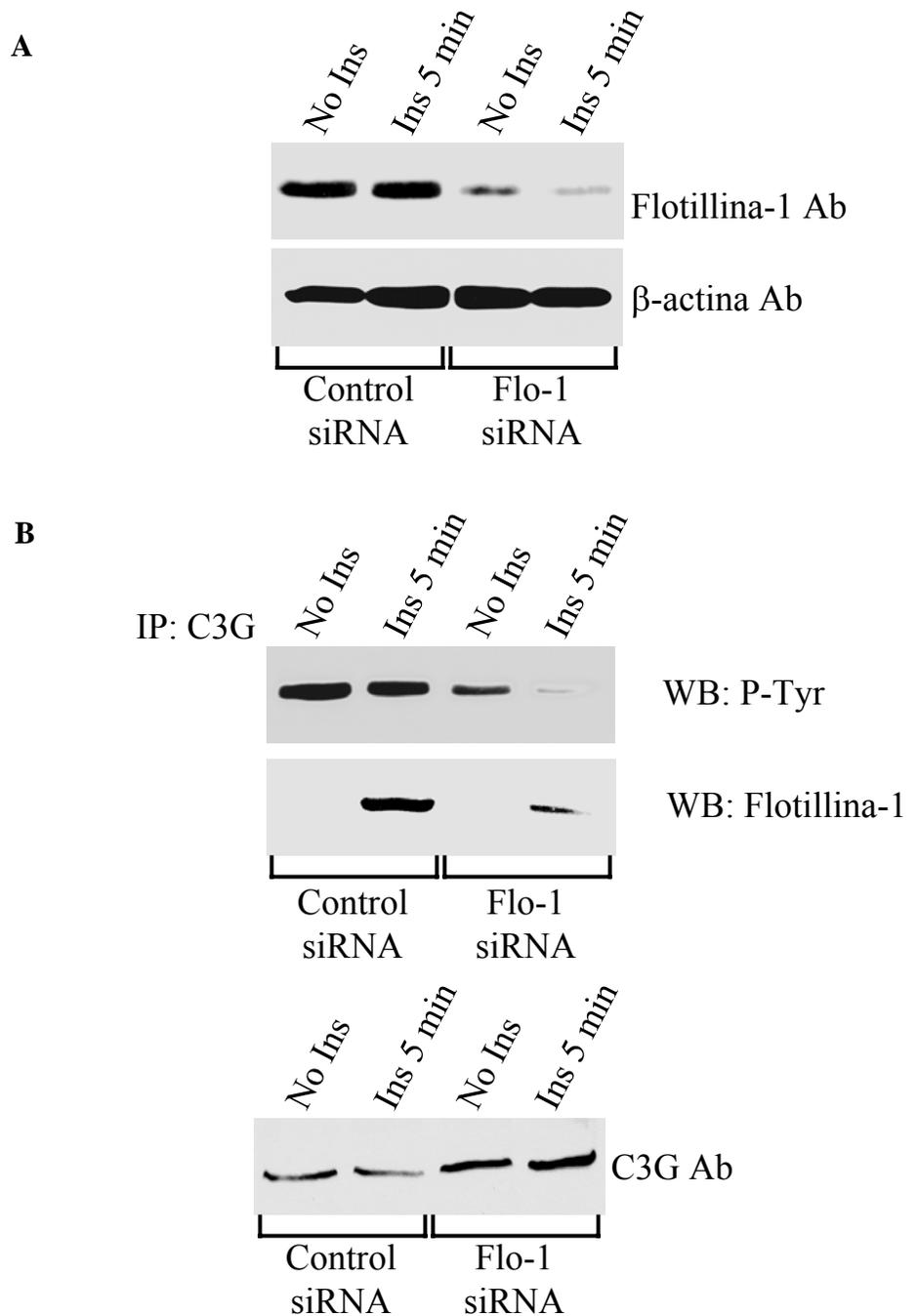


Figura 8. La down-regolazione dell'espressione della flotillina-1 previene l'attivazione di C3G insulino-mediata

- A) Mioblasti non differenziati sono stati trasfettati con la flotillina-1 siRNA (Flo siRNA). La trasfezione con *scrambled* siRNA è stato usato come controllo. Le cellule sono state poi differenziate in miotubuli multinucleati per 3 giorni e i lisati cellulari sono stati sottoposti a immunoblotting usando un anticorpo specifico per la flotillina-1. L'immunoblotting con anti- β -actina IgGs è stato usato come controllo interno.
- B) Le cellule state trasfettate e differenziate come in A. Le cellule sono state poi trattate con o senza insulina (160nM) per 5 minuti. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anti C3G IgGs e gli immunoprecipitati sono stati analizzati per immunoblotting usando anti-flotillina-1 IgGs e anti-fosfotirosine IgGs. Il totale dell'espressione di C3G è mostrata nel pannello in basso.

Discussione

La localizzazione all'interno della cellula della flotillina-1, proteina la cui funzione è tutt'oggi sconosciuta, rappresenta un argomento di un certo interesse.

Liu e colleghi hanno dimostrato che la localizzazione della flotillina-1 varia a seconda del tipo cellulare preso in esame. In cellule CHO, HepG2, e HeLa la flotillina è localizzata in plasmamembrana, in cellule COS-1 presenta una distribuzione intracellulare tipo Golgi, mentre ha una distribuzione a granuli in pre-adipociti e in MDCK (Liu J. *et al* 2005). Interessante è che durante il differenziamento dei pre-adipociti in adipociti la flotillina-1 si sposta dalle strutture granulari intracellulari alla plasmamembrana.

Si è giunti così alla conclusione che la flotillina-1 è localizzata sia nella plasmamembrana che nelle strutture intracellulari e che questo movimento dai compartimenti intracellulari alla plasmamembrana possa essere promosso da specifici meccanismi del segnale. A sostegno di tale ipotesi, nel presente studio, abbiamo dimostrato che nelle cellule muscolari scheletriche, in condizioni basali, la flotillina-1 è localizzata nei domini perinucleari e che lo stimolo con l'insulina promuove il suo movimento verso la plasmamembrana.

Il Glut-4 prima della sua traslocazione, insulino-mediata, alla plasmamembrana è stato ritrovato in depositi intracellulari. Tuttavia, rimane ancora da caratterizzare la natura di tali depositi. Nel presente studio, dimostriamo per la prima volta che nelle

cellule muscolari scheletriche, in condizioni basali, il Glut-4 è localizzato nei domini che contengono flotillina-1, e che questi sono concentrati nella regione perinucleare. Dopo lo stimolo con insulina, invece, il Glut-4 insieme con la flotillina-1, si sposta verso il sarcolemma, la zona dove avviene l'assorbimento del glucosio.

Il fatto che in assenza di stimolo la flotillina-1 presenti nelle cellule muscolari scheletriche una distribuzione in regioni perinucleari, mentre negli adipociti ha una distribuzione in plasmamembrana (Liu J. *et al* 2005), suggerisce che il ruolo della flotillina-1 nel trasporto del Glut-4 insulino-mediato verso la plasmamembrana è diverso nel tessuto muscolare rispetto a quello grasso.

Nelle cellule muscolari scheletriche, il ruolo chiave dei domini contenenti flotillina-1 nella traslocazione del Glut-4 al sarcolemma è dimostrato sia dalla perdita di fluorescenza del Glut-4 nella plasmamembrana e che dalla diminuzione dell'assorbimento del glucosio che si ha quando i domini con flotillina-1 vengono distrutti da sostanze che sequestrano il colesterolo.

E' noto che lo stimolo con insulina induce l'attivazione del *pathway* Ins-R/PI3K. La dinamica di tale attivazione non è ancora stata esplorata in cellule muscolari scheletriche.

Qui dimostriamo che in questo tipo cellulare il recettore dell'insulina, PI3K, e Akt sono tutti attivati entro due minuti dallo stimolo con insulina. L'espressione della caveolina-3 risulta essere necessaria per l'attivazione di questo *pathway*, come dimostrato dalla riduzione sia dell'attivazione di PI3K che di Akt in cellule prive di tale proteina.

Questi risultati sono consistenti con i dati che dimostrano che la caveolina-3 co-immunoprecipita con il recettore dell'insulina (Oshikawa J. *et al* 2004) e che la caveolina-3 è in grado di stimolare la fosforilazione di IRS-1 *in vivo* se co-trasfettata con il recettore dell'insulina (Ikeda S. *et al.* 1998).

Possiamo quindi concludere che nelle cellule muscolari scheletriche l'attivazione del *pathway* Ins-R/PI3K avviene nella caveola e rappresenta un evento iniziale.

La PI3K, dopo lo stimolo con insulina è in grado di attivare oltre ad Akt anche un'atipica PKC (Le Good J.A. *et al* 1998, Alessi D.R. *et al.* 1997). In questo lavoro dimostriamo che l'attivazione di PCK ζ è richiesta per mediare il *pathway* del segnale, insulino-indotto, che guida la traslocazione dei domini che contengono flotillina-1/Glut-4 verso la plasmamembrana in risposta all'insulina, come mostrato dalla localizzazione perinucleare sia della flotillina-1 che di Glut-4 dopo lo stimolo di insulina in presenza dell'inibitore pseudosubstrato della proteina kinasi C ζ . A conferma di questi dati mostriamo che la wortmannina, un inibitore della PI3K, produce effetto identico.

Se l'attivazione del *pathway* PI3K mediata dalla caveolina-3 è richiesta per la traslocazione dei domini contenenti flotillina-1/Glut-4 dai compartimenti perinucleari al sarcolemma, in cellule che sono prive di caveolina-3 si dovrebbe osservare un'inibizione di questo processo. A tale proposito dimostrano che in miotubuli privi di caveolina-3 i domini contenenti flotillina-1/Glut-4 rimangono localizzati nei

compartimenti perinucleari anche dopo lo stimolo con insulina. In accordo con questi dati dimostriamo che in queste cellule anche l'assorbimento del glucosio insulino-mediato è diminuito. Il fatto che nei miotubuli privi di caveolina-3 l'assorbimento del glucosio in seguito a stimolo con insulina non sia completamente inibito è in accordo con l'attivazione marginale sia di PI3K (Figura **3B**) che di Akt (Figura **3C**), così come con il residuo spostamento del Glut-4 al sarcolemma (Figura **4B**) che si osserva in queste cellule trattate con insulina.

Per il movimento del glucosio alla plasmamembrana è richiesta, in aggiunta al *pathway* PI3K/Akt anche l'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10. Il ruolo di questo *pathway* nella traslocazione del Glut-4 in cellule muscolari scheletriche non è pienamente conosciuto.

In questa tesi dimostriamo che nei miotubuli differenziati c-Cbl e CrkII si spostano transientemente nei domini che contengono la flotillina-1 dopo 5 minuti di stimolo con insulina. Di contro, il C3G (fattore di scambio GDP/GTP) che attiva TC10 (GTPasi della famiglia Rho) co-immunoprecipita con la flotillina-1 sia prima che dopo lo stimolo con insulina. E' noto che la fosforilazione è un evento necessario per l'attivazione di C3G (De Jong R. *et al* 1998; Shivakrupa R. *et al* 2003; Ling L. *et al* 2003; Ichiba T. *et al* 1999). Interessante è che la fosforilazione transiente di C3G si verifica anch'essa entro 5 minuti dallo stimolo con insulina. I domini che contengono flotillina-1 sono richiesti per l'attivazione di questo *pathway* come dimostrato dalla drammatica riduzione dell'attivazione di C3G, sotto stimolo di insulina, quando i

domini contenenti flotillina-1 sono alterati o da un agente che sequestra il colesterolo (Metilbetaciclodestrina) o dall'uso di siRNA flotillina-1.

L'insieme di questi risultati indica che nelle cellule muscolari scheletriche l'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10 si verifica all'interno dei domini che contengono flotillina-1 ed è un evento tardivo.

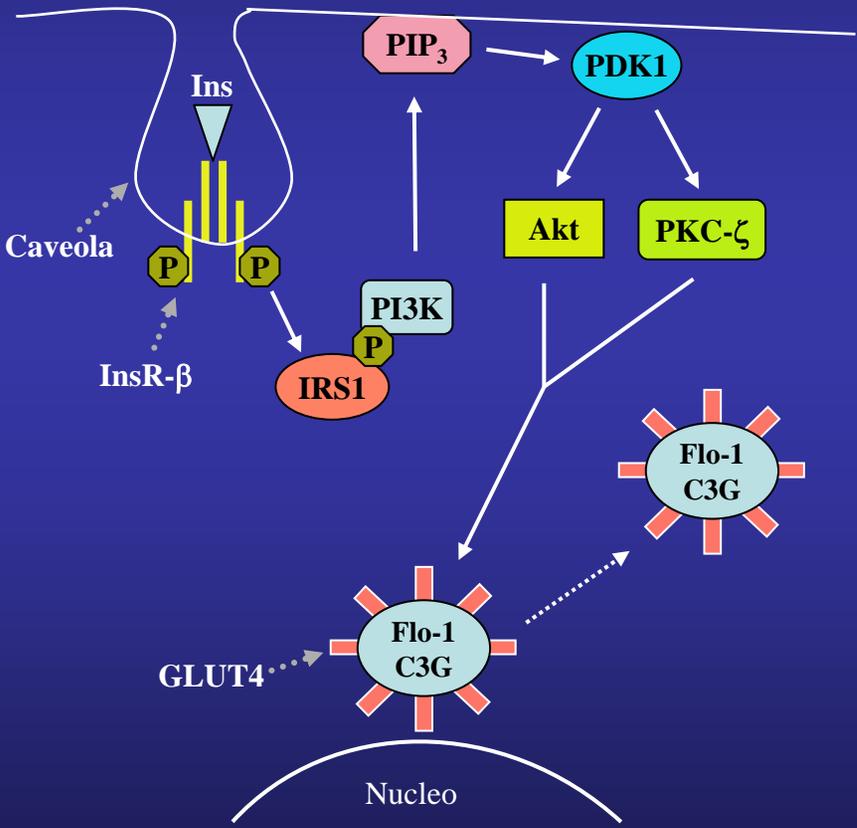
In letteratura è noto che negli adipociti ci sono 2 *pools* separati del recettore dell'insulina che mediano l'attivazione dei *pathways* PI3K/Akt e Cbl/C3G/TC10.

Nel presente lavoro dimostrano che in cellule muscolari scheletriche la caveolina-3, dopo lo stimolo con insulina, si sposta dalla plasmamembrana e temporaneamente interagisce con i domini che contengono flotillina-1/Glut-4 (a 5 minuti di stimolo con insulina) prima che questi raggiungano il sarcolemma. Inoltre, dimostriamo che il recettore dell'insulina si sposta dai domini che contengono caveolina-3 ai domini che contengono flotillina-1 (dopo 5 minuti di trattamento con insulina) dove si accompagna temporalmente all'attivazione di C3G.

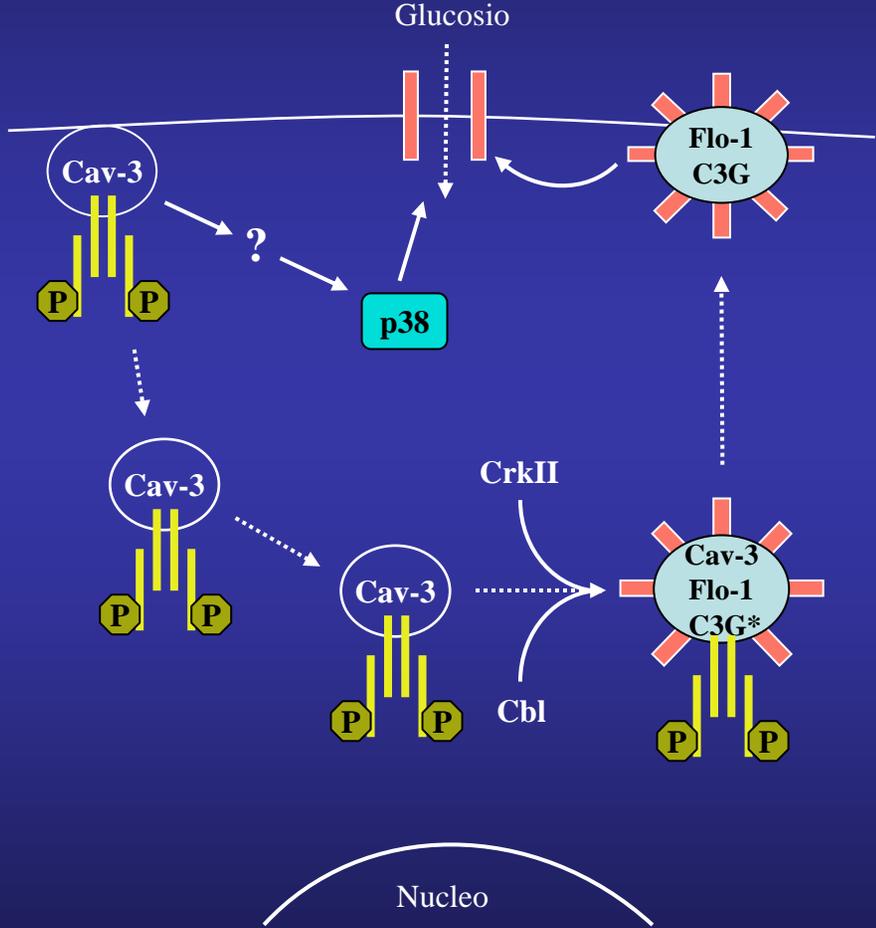
I nostri risultati indicano per la prima volta che lo stesso *pool* del recettore dell'insulina possa attivare entrambi i *pathways* in due eventi successivi che sono spazialmente e temporalmente regolati dalla caveolina-3 e dalla flotillina-1 (Figura **9**).

FASE I: entro 2 minuti di stimolo con insulina il recettore dell'insulina attiva il *pathway* PI3-K dipendente nelle caveole.

Fase I (Early: 0-2 min)



Fase II (Late: 2-5 min)



FASE II : entro 5 minuti di stimolo il recettore dell'insulina si sposta dai domini contenenti caveolina-3 ai domini contenenti flotillina-1, dove si verifica l'attivazione del *pathway* Cbl/C3G/TC10.

Questo è il primo modello di cooperazione funzionale tra due differenti tipi di DRMs nella regolazione dello stesso pathway del segnale.

La compartimentalizzazione spaziale e temporale delle molecole segnale da parte della caveolina-3 e della flotillina-1 potrebbe giocare un ruolo chiave nel conferire specificità ai processi di traffico/aggancio/fusione delle vescicole contenenti Glut-4.

In dettaglio, l'attivazione iniziale del *pathway* PI3K mediata dalla caveolina-3 potrebbe essere importante per il traffico dei domini che contengono flotillina-1 /Glut-4 dai compartimenti perinucleari al sarcolemma. Successivamente, l'attivazione tardiva del pathway Cbl/C3G/TC10 mediata dalla flotillina-1 potrebbe invece servire per l'aggancio finale e la fusione delle vescicole di Glut-4 alla plasmamembrana.

Dato che l'insulina non è soltanto uno stimolo in grado di attivare il *pathway* PI3K, l'esistenza di un secondo *pathway* indotto da questo ormone, come il *pathway* Cbl/C3G/TC10, che è PI3K indipendente, potrebbe fornire un meccanismo di difesa per evitare l'assorbimento del glucosio non regolato quando le cellule sono sotto l'influenza di stimoli che attivano PI3K in modo indipendente dal recettore dell'insulina.

Il movimento alla plasmamembrana e l'attivazione di Glut-4 si ritiene che siano modulati da due meccanismi separati. La p38 MAP Kinasi è stata proposta come un possibile regolatore positivo, in risposta all'insulina, dell'attività di Glut-4, ma non della sua traslocazione (Somwar R. et al 2001; Somwar et al 2000; Sweeney R. et al 1999). In questa tesi dimostriamo che nei miotubuli il controllo della p38 MAP kinasi è attivata dall'insulina e che l'inibizione di questo *pathway* con un inibitore specifico, quale SB203580, previene completamente l'assorbimento del glucosio. Inoltre, dimostriamo che l'attivazione inulina-mediata del pathway p38 MAP kinasi è significativamente inibita nei miotubuli privi di caveolina-3, dove si osserva anche una diminuzione dell'assorbimento del glucosio.

Possiamo così concludere che:

- i) l'attivazione del *pathway* della MAP chinasi p38 è necessaria per l'assorbimento del glucosio,
- ii) l'espressione della caveolina-3 regola in maniera positiva l'attivazione mediata dall'insulina della MAP chinasi p38,
- iii) la riduzione dell'attivazione della MAP chinasi p38 scoperta in cellule prive di caveolina-3 potrebbe contribuire a spiegare la riduzione dell'assorbimento del glucosio osservata in assenza della caveolina-3.

Le proteine che legano il Glut-4 potrebbero giocare un ruolo nel promuovere l'attività di questo glucotrasportatore. Ad esempio, un inibitore potrebbe essere rimosso dal Glut-4 dopo stimolo con insulina, come suggerito da precedenti studi che dimostrano che l'estremità C citosolica del Glut-4 è più accessibile agli anticorpi

sotto stimolo di insulina rispetto a prima dello stimolo (Wang W. *et al* 1996; Smith R.M. *et al* 1991).

Di notevole interesse è che le caveoline sono conosciute legare direttamente numerose molecole segnale. È quindi possibile supporre che l'interazione temporanea tra i domini che la caveolina-3 e i domini contenenti la flotillina-1/Glut-4 comporti non solo la traslocazione del recettore dell'insulina dal primo al secondo tipo di dominio, ma anche il movimento di un potenziale inibitore del Glut-4 dai domini che contengono flotillina-1/Glut-4 ai domini che contengono caveolina-3, guidando così l'attivazione del Glut-4. Studi futuri saranno necessari per confermare tale ipotesi.

Bibliografia

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 substrate for the insulin receptor kinase *Biochem J* 341 (Pt3), 665-668

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 7:261-9.

Anderson R. G. W (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:199-225

Anderson R. G. W., Kamen B. A., Rothberg K. G., and Lacey S. W. (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae *Science* 255:410-411

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, 202-207

Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF. (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem.* 272:13793-802

Birnbaum M.J. (1989) Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57. 305-315

Brown D. A. and London E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts *J. Biol. Chem.* 275:17221-17224

Brown D. A., and Rose J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface *Cell* 68:533-544

Capozza F, Combs TP, Cohen AW, Cho YR, Park SY, Schubert W, Williams TM, Brasaemle DL, Jelicks LA, Scherer PE, Kim JK, Lisanti MP. (2005) Caveolin-3 knockout mice show increased adiposity and whole body insulin resistance, with ligand-induced insulin receptor instability in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288:C1317-31.

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 USA* 86, 2535-2539

Cheatham B., Vlahos C., Cheatham L., Wang L., Blenis J., and Kahn C.R. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation *Mol Cell Biol* 14, 4902-4911

Chiang S.H., Baumann C.A., Kanzaki M., Thurmond D.C., Watson R.T., Neudauer C.L., Macara I.G., Pessin J.E., and Saltiel A.R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* 410. 944-948

Cohen AW, Razani B, Schubert W., Williams T.M., Wang X.B., Iyengar P., Brasaemle D.L., Scherer P.E., Lisanti M.P.(2004) Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53:1261-70.

Couet J., Li S., Okamoto T., Scherer P.S., and Lisanti M.P. (1997) Molecular and cellular biology of caveolae: Paradoxes and Plasticities. *Trend in Cardiovascular Medicine* 7, 103-110

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. 9187-9190

De Jong R, van Wijk A, Heisterkamp N, Groffen J. (1998) C3G is tyrosine-phosphorylated after integrin-mediated cell adhesion in normal but not in Bcr/Abl expressing cells. *Oncogene*. 17:2805-10.

Drivas G., Shih A., Coutavas E., Rush M. and D'Eustachio P. (1990) Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol* 10. 1793-179

Ehler E, Jat PS, Noble MD, Citi S, Draeger A. (1995) Vascular smooth muscle cells of H-2Kb-tsA58 transgenic mice. Characterization of cell lines with distinct properties.

Circulation. 92:3289-96.

Engelman J.A., Zhang X.L., Galbiati F., Volonte D., Sotgia D., Pestell R.G., Minetti C., Scherer P.E., Okamoto T., and Lisanti M.P. (1998a) Molecular genetics of the Caveolin Gene Family: Implications for Human Cancers, diabetes, Alzheimer's disease, and Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genetics* 63, 1578-1587

Engelman J.A., Lee R.J., Karnezis A., Bearsi D.J., Webster M., Siegel P., Muller W.J., Windle J.J., Pestell R.G., and Lisanti M.P. (1998b) Reciprocal regulation of Neu tyrosine Kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implication for mammary tumorigenesis. *J. Biol. Chem* 273, 20448-20455

Engelman J.A., Wycoff C.C., Yasuhara S., Song K.S., Okamoto T., and Lisanti M.P. (1997) Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth *J.Biol.Chem.* 272, 16374-16381

Fra A. M., Williamson E., Simons K., and Parton R.G. (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 92:8655-8659

Fra A. M., Williamson E., Simons K., and Parton R. G. (1994) Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae *J. Biol. Chem.* 269:30745-30748

Galbiati F., Enfigelman J.A., Volonte D., Zhang X.L., Minetti C., Li M., Hou H.Jr., Kneitz B., Edelmann W., and Lisanti M.P. (2001a) Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 21425-21433

Galbiati F, Volonte D, Liu J, Capozza F, Frank PG, Zhu L, Pestell RG, Lisanti MP. (2001b) Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 12(8):2229-44.

Galbiati F., Volonte D., Minetti C., Bregman D.B., and Lisanti M.P. (2000a) limb-girdle Muscular Dystrophy (LGDM -1 C) Mutants of Caveolin-3 Undergo Ubiquitination and Proteasomal Degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGDM-1C mutants and rescues wild-type caveolin-3. *J Biol Chem* 275, 37702-37711

Galbiati F., Volonte D., Chu J.B., Li M., Fine S.W., Fu M., Bermudez J., Pedemonte M., Weidenheim K.M., Pestell R.G., Minetti C., and Lisanti M.P. (2000b) Transgenic overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc Natl acad Sci USA* 97, 9689-9694

Galbiati F., Volonte D., Minetti C., Chu J.B. and Lisanti M.P (1999a) Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGDM-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex. *J Biol Chem* 274, 25632-25641

Galbiati F., Volonte D., Meani D., Milligan G., Lublin D.M., Lisanti M.P., and Parenti M. (1999b) The dually acylated NH₂-terminal domain of g_{i1} alpha is sufficient to target fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein alpha subunits in vivo. *J. Biol. Chem* 274, 5843-5850

Garcia-Cardena G., Oh P., Liu J., Schnitzer J.E., and Sessa W.C.(1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for caveolae localization. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 93,6448-6453

Gustavsson J, Parpal S, Stralfors P. (1996) Insulin-stimulated glucose uptake involves the transition of glucose transporters to a caveolae-rich fraction within the plasma membrane: implications for type II diabetes. *Mol Med.* 2:367-72.

Harder T., Simons K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. (1997) *Curr Opin Cell Biol.* 9:534-42. Review.

Ichiba T, Hashimoto Y, Nakaya M, Kuraishi Y, Tanaka S, Kurata T, Mochizuki N, Matsuda M. (1999) Activation of C3G guanine nucleotide exchange factor for Rap1 by phosphorylation of tyrosine 504. *J Biol Chem.* 274:14376-81.

Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.* 17:1371-84.

Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5096-100.

Kanda S, Landgren E, Ljungstrom M, Claesson-Welsh L. (1996) Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. *Cell Growth Differ.* 7:383-95.

Kimura A., Baumann C.A., Chang 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 USA* 98, 9098-9103

Koleske A.J., Baltimore D., and Lisanti M.P. (1995) Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells *Proc Natl. Acad. Sci USA* 92.1381-1385

Krajewska W.M. and Maslowska Izabela (2004) Caveolins: structure and function in signalling trasduction *Cellular & Molecular Biology Letters.* 9: 195-220

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281:2042-5.

Lee S.W., Reimer C.L., Oh P., Campbel L.D.B-, and Schnitzer J.E. (1998) Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells *Oncogene* 16, 1391-1397

Li S., Okamoto T., Chun M., Sargiacomo M., Casanova J.E., Hansen S.H., Nishimoto I., and Lisanti M.P. (1995) Evidence for a regulated interaction of hetero-trimeric G proteins with caveolin *J. Biol. Chem* 270, 15693-15701

Li S., Song K.S., and Lisanti M.P. (1996) Expression and characterization of recombinant caveolin: Purification by poly-histidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J. Biol. Chem* 271, 568-573

Ling L, Zhu T, Lobie PE. (2003) Src-CrkII-C3G-dependent activation of Rap1 switches growth hormone-stimulated p44/42 MAP kinase and JNK/SAPK activities. *J Biol Chem.* 278:27301-11.

Lisanti M. P., Scherer P. E., Tang Z., Kurbler E., Koleske A. J., and Sargiacomo M. (1995) Caveolae and human disease: functional roles in transcytosis, potocytosis, signalling, and cell polarity *Semin. Dev. Biol.* 6:47-58

Lisanti M.P., Scherer P., Tang Z.L., Sargiacomo M. (1994) Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: A signalling hypothesis. *Trends In Cell Biology.* 4, 231-235

Liu J., Deyoung S.M., Zhang M., Dold L.H., Saltiel A.R. (2005) The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 280:16125-34.

Malide D, Ramm G, Cushman SW, Slot JW. (2000) Immunoelectron microscopic evidence that GLUT4 translocation explains the stimulation of glucose transport in isolated rat white adipose cells. *J Cell Sci.* 23:4203-10.

Mineo C., James G. L., Smart E. J. and Anderson R. G. (1996) Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane *J. Biol. Chem.* 271: 11930-11935.

Minetti C., Sotoglia F., Bruno C., Scartezzini P., Broda P., Bado M., Masetti E., Mazzocco P., Egeo A., Donati M.A., Volontà D., Galbiati F., Cordone G., BRicarelli F.D., Lisanti M.P., and Zara F. (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18, 365-368
*Mol Biol Cell.*13(7):2502-17.

Moldovan N., Heltianu C., Simionescu N., and Simionescu M.(1995) Ultrastructural evidence of differential solubilità in Triton X-100 of endothelial vesicles and plasma membrane. *Exp. Cell Res* 219, 309-313

Moller D.E. and Kaufman K.D. (2005) Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 56. 45-62

Morgan JE, Beauchamp JR, Pagel CN, Peckham M, Ataliotis P, Jat PS, Noble MD, Farmer K, Partridge TA. (1994) Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev Biol.* 162:486-98.

Murata M., Peramen J., Schreiner R., Wieland F., Kurzchalia T. V., and Simons K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein *Proc. Natl.Acad. USA* 92:10339-10343

Noble M, Groves AK, Ataliotis P, Ikram Z, Jat PS. (1995) The H-2KbtsA58 transgenic mouse: a new tool for the rapid generation of novel cell lines. *Transgenic Res.* 4:215-25. Review.

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, 3568-3573

Okamoto T., Schlegel A., Scherer P.E., and Lisanti M.P. (1998) Caveolins, A family of scaffolding proteins for organizing “pre-assembled signalling complexes” at the plasma membrane *J.Biol. Chem.*, (Mini-review) 273, 5419-542

Oshikawa J, Otsu K, Toya Y, Tsunematsu T, Hankins R, Kawabe J, Minamisawa S, Umemura S, Hagiwara Y, Ishikawa Y. (2004) Insulin resistance in skeletal muscles of caveolin-3-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:12670-5.

Parolini I, Sargiacomo M, Lisanti MP, Peschle C. (1996) Signal transduction and glycoposphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood.* 87:3783-94.

Parton R. G.(1996) Caveolae and caveolins *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 542-548

Pessin J., Thurmond D., Elmendorf J., Coker K., and Okada S. 1999 Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking: Location!Location!Location! *J Biol Chem.* 274:2593-2596

Razani B., Combs T.P., Wang XB, Frank P.G., Park D.S., Russel R.G., Li M., Tang B., Jelicks L.A., Scherer P.E., Lisanti M.P. (2002) Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem.* 277:8635-47.

Rea S. and James D.E. 1997 moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles *Diabetes* 46:1667-1677

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 signalling in 3T3-L1 adipocytes *Mol Cell Biol* 18, 872-879

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* 324 839-845

Rothberg K. G., Heuser J. E., Donzell W. C., Ying Y-S., Glenney J. R., and Anderson R. G. W. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats *Cell* 68:673-682

Sager R, Sheng S, Anisowicz A, Sotiropoulou G, Zou Z, Stenman G, Swisshelm K, Chen Z, Hendrix MJ, Pemberton P., Rafidi K., and ryan K. (1994) RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 59:537-46.

Saltiel A.R., Pessin J.E. (2003) Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. *Traffic.* 4:711-6. Review.

Salzer U, Prohaska R. (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood.* 97:1141-3.

Sargiacomo M., Scherer P. E., Tang Z-L, Kubler E., Song K. S., Sanders M. C., and Lisanti M. P. (1995) Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:9407-9411

Sargiacomo M., Scherer P.E., Tang Z-L., Casanova J.E., and Lisanti M.P. (1994) In vitro phosphorylation of caveolin-rich membrane domains: Identification of an associated serine kinase activity as a casein kinase II-like enzyme. *Oncogene* 9, 2589-2595

Sargiacomo M., Sudol M., Tang Z-L., and Lisanti M. P. (1993) Signal transducing molecules and GPI- linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 122:789-807

Satoh S., Nishimura H., Clark A.E., Kozka I.J., Vannucci S.J., Simpson I.A., Quon M.J., Cushman S.W., and Holman G.D. (1993) Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J Biol Chem* 268. 17820-17829

Scherer P.E., Lewis R.Y., Volonte D., Engelman J.A., Galbiati F., Couet J., Kohtz D.S., van Donselaar E., Peters P., and Lisanti M.P. (1997) Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo *J.Biol.Chem.* 272, 29337-29346

Scherer P.E., Okamoto T., Chun., M., Nishimoto I., Lodish H. F., and Lisanti M.P. (1996) Identification sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 131-135

Scherer P.E., Tang Z-L, Chun M.C., Sargiacomo M., Lodish H.F., and Lisanti M.P. (1995) Caveolin isoform differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution: Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270, 16395-16401

Scherer P.E., Lisanti M.P., Baldini G., Sargiacomo M., Corley-Mastik C., and Lodish H.F.(1994) Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT-4 with caveolin-rich vesicles *J. Cell. Biol.* 127, 1233-1243

Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP. (2001) Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J.* 359: 203-10.

Schlegel A., Volonté D., Engelman J. A., Galbiati F., Mehta P., Zhang X-L., Scherer P. E., and Lisanti M. P. (1998) Crowded little caves: Structure and function of Caveolae *Cell Signal.* 20 10: 457- 63 Review

Sharma P.M., Egawa K., Huang Y., Martin J.L., Huvar I., Boss G.R., and Olefsky J.M. (1998) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action *J Biol Chem* 273, 18528-18537

Shivakrupa R, Radha V, Sudhakar Ch, Swarup G. (2003) Physical and functional interaction between Hck tyrosine kinase and guanine nucleotide exchange factor C3G results in apoptosis, which is independent of C3G catalytic domain. *J Biol Chem.* 278:52188-94.

Smart E. J., Graf G. A., McNiven M. A., Sessa W. C., Engelman J.A., Scherer P., Okamoto T., and Lisanti M. (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction *Mol. Cell. Biol.* 19: 7289- 730

Smart E., Ying Y-S, Conrad P., and Anderson R.G.W. (1994) Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell. Biol.* 127, 1185-1197

Smith R.M , Charron M.J., Shah N., Lodish H.F., Jarett L. (1991) Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:6893-7.

Somwar R., Kim D:Y., Sweeney G., Huang C., Niu W., Lador C., Ramlal T. and Klip A. (2001) Glut-4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of Glut-4 via p38 mitogen-activated protein kinase *Biochem J* 359, 639-649

Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Cote CH, Klip A, Marette A. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucosetransport. *Diabetes.* 49:1794-800.

Song K.S., Sargiacomo M., Galbiati F., Parenti M., and Lisanti M.P. (1997) Targeting of a G alpha subunit (G_i alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: Clarifying the role of N-myristoylation *Cell. Mol.Bio. (Noisy-Le- Grand)* 43, 293-303

Song K. S., Scherer P. E., Tang Z-L., Okamoto T., Li S., Chafel M., Chu C., Kohtz D. S., and Lisanti M. P. (1996a) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins *J. Biol. Chem.* 271:15160-15165

Song K.S, Li S., Okamoto T., Quilliam L., Sargiacomo M., and Lisanti M.P. (1996b) Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent free purification of caveolae membranes *J.Biol.Chem* 271, 9690-9697

Song K.S., Scherer P.E., Tang Z.-L, Okamoto T., Li S., Chafel M., Chu C., Kohtz D.S., and Lisanti M.P. (1996) Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins *J.Biol.Chem.* 271, 15160-15165

Sorice M., Parolini I., Sansolini T., Garofalo T., Dolo V., Sargiacomo M., Tai T., Peschle C., Torrisi M. R., and Pavan A. (1997) Evidence for the existence of ganglioside-enriched plasma membrane domains in human peripheral lymphocytes *J. Lipid Res.* 38:98-109

Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem.* 274:10071-8.

Tang Z.-L., Scherer P.E., Okamoto T., Song K., Chu C., Kohtz D.S., Nishimoto I., Lodish H.F., and Lisanti M.P. (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle *J.Biol.Chem.* 271, 2255-226

Voldsteland M., Tranum-Jensen J., Vinten J.(1993) Quantitation of Na⁺/K⁺-ATPase and glucose transporter isoforms in rat adipocyte plasma membrane by immunogold labelling *J Membr Biol.* 136:63-73.

Volonte D., Liu Y., Galbiati F. (2005) The modulation of caveolin-1 expression controls satellite cell activation during muscle repair. *FASEB J.* 19:237-9.

Volonte D, Peoples AJ, Galbiati F. (2003) Modulation of myoblast fusion by caveolin-3 in dystrophic skeletal muscle cells: implications for Duchenne muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy-1C. *Mol Biol Cell.* 14: 4075-88.

Volonte D., Zhang K., Lisanti M.P., Galbiati F. (2002) Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 13, 2502-2517

Volonte D., Galbiati F., Li S., Nishiyama K., Okamoto T., Lisanti M.P. (1999) Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem.* 274(18):12702-9.

Wang W., Hansen P.A., Marshall B.A, Holloszy J.O., Mueckler M. (1996) Insulin unmasks a COOH-terminal Glut4 epitope and increases glucose transport across T-tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 135:415-30.

Watson R.T. , Shigematsu S., Chiang S-H, Mora S., Kanzaki M., Macara I.G., Saltiel A.R., and Pessin J.E. (2001) Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulina signalling and Glut-4 translocation. *J.Cell.Biol.* 154: 829-840

Yamamoto M., Toya Y., Schewencke C., Lisanti M.P., Myers m., and Ishikawa Y. (1998) Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem.* 273(41):26962-269688.