



Regulació hormonal del metabolisme hepàtic del glicògen: efectes del glucagó, l'epinefrina i la insulina

Joan Massagué Solé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACULTAT DE FARMÀCIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

REGULACIÓ HORMONAL DEL METABOLISME HEPÀTIC
DEL GLICOGEN
EFECTES DEL GLUCAGÓ, L'EPINEFRINA I LA INSULINA

JOAN MASSAGUÉ SOLÉ

Tesi presentada pel Llicenciat
D. Joan Massagué Solé per optar
al grau de Doctor en Farmàcia.

Ha estat realitzada al Departament
de Bioquímica de la Facultat de
Farmàcia de la Universitat de Barcelona,
sota la direcció del Professor
Dr. Joan J. Guinovart Cirera.

Barcelona, setembre del 1978.

Que difícil hauria estat la realització d'aquest treball sense l'ajut o l'exemple dels qui l'han bressolat!

Sense l'ajut i l'exemple de Manuel Rosell, vela enllà de l'horitzó, ben present a la memòria.

D'en Joan Guinovart, amb qui em considero afortunat de poder treballar.

D'en Joan Massagué Vendrell i de Maria Solé.

De l'Agustí Salavert, de l'Albert Boronat. I de Fausto García Hegardt i dels altres companys que es serveixen fidels al camí de la recerca, a voltes tan aspre.

A tots ells, respectuosament, dedico aquesta obra.

PRESENTACIÓ

El mecanisme d'acció a nivell molecular de les hormones glucagó, epinefrina i insulina constitueix el centre d'interés al qual apunta el nostre treball. Un camí especialment adequat per aproximar-nos als fets desencadenats a la cèl.lula per l'arribada dels senyals hormonals esmentats és el que es basa en emprar com a testimonis d'aquests fets les vies de síntesi i degradació del glicogen, el carbohidrat de reserva als animals i a l'home. Ben justament, car:

- a) aquestes vies metabòliques són molt susceptibles a les accions hormonals,
- b) són comunes a la majoria dels teixits de mamífer, tot i que a cadascun d'aquests hi presenten característiques particulars,
- c) ocupen una posició clau dins del metabolisme energètic de l'organisme

A més, hem fixat l'atenció en el teixit hepàtic. Al fetge, òrgan que té un paper cabdal en l'administració de la reserva de carbohidrats de l'organisme, el mecanisme i les particularitats del control hormonal de les vies metabòliques del glicogen presenta encara molts punts obscurs. Els coneix-

xements actuals sobre el tema estan ben allunyats de conclusions definitives.

En el transcurs dels darrers vint anys treballs notabilíssims dins la Bioquímica han reeixit a mostrar bastant clarament quin és el mecanisme utilitzat per les hormones com l'epinefrina per forçar el catabolisme i la producció d'energia al teixit muscular. Ara bé, l'extrapolació gratuïta d'aquestes troballes per al cas del fetge és una operació extremadament perillosa. El glucagó i la pròpia epinefrina impulsen la glicogenolisi hepàtica. Per la temptació de simplificar hom podria atribuir a ambdues hormones un mecanisme d'acció al fetge igual al que opera al múscul esquelètic a mercé de l'epinefrina. Durant una bona colla d'anys recents no s'ha comptat amb cap evidència experimental sèria contra aquesta suposició. Però certes troballes han anat suggerint grans diferències entre la manera de fer del glucagó i de l'epinefrina al fetge, i entre la manera com actua aquesta darrera hormona al teixit muscular o a l'hepàtic.

D'altra banda també cal contemplar l'acció de la insulina. L'efectivitat del control del metabolisme hepàtic per aquesta hormona ha estat motiu de controversia àmpliament debatut. A aquest fet hi han contribuït la dificultat per observar efectes directes de l'hormona sobre els elements cel·lulars i el desconeixement existent sobre els detalls del seu mecanisme d'acció el qual es revela complexíssim.

Tal estat de coses ofereix una oportunitat àmplia per a treballar-hi. Per fer-ho hem escollit la tècnica que actualment permet la millor aproximació als esdeveniments desencadenats pels estímuls hormonals sobre el metabolisme hepàtic; ens referim a l'isolament i utilització com a material d'estudi de cèl·lules del parènquima hepàtic de mamífer (rata) intactes es-

tractural i funcionalment.

Les dades obtingudes en el present estudi clarifiquen el mecanisme d'acció del glucagó, defineixen el caràcter dels efectes de l'epinefrina i recolzen fermament la possibilitat del control del metabolisme hepàtic del glicogen per la insulina.

ABREVIATURES MÉS USUALS EN AQUESTA OBRA.

AMP	Adenosina 5' monofosfat.
AMP cíclic, AMPc	Adenosina 3'-5' monofosfat.
ATP	Adenosina 5' trifosfat.
BSA	Albúmina sérica bovina.
^{14}C	Carboni 14.
Ci, mCi, μCi	Curi, millicuri, microcuri
c.p.m.	Comptes per minut.
Db AMPc	Dibutiril adenosina 3'-5' monofosfat
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Àcid desoxirribonuclèic
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetraacetat
EGTA	Etilenglicol bis (β -aminoetil eter)
	N,N'-tetraacetat.
x g	Gravetats
G-1-P	Glucosa 1-fosfat
G-6-P	Glucosa 6-fosfat
GMP cíclic	Guanosina 3'-5' monofosfat
^3M	Triti
Km	Constant de Michaelis aparent
M, mM, μM	Molar, milimolar, micromolar
mA	Miliamper
MIX	Metil isobutil xantina
nm	Manometre
NAD ⁺	Nicotinamido adenina dinucleòtid
^{32}P	Fòsfor 32
Pi	Fosfat inorgànic
p.m.	Pes molecular
PPO	2,5-difeniloxazol
r.p.m.	Revolucions per minut
TCA	Àcid tricloroacètic

TEMED	N,N,N',N',tetrametiletilen diamida
Tris	Tris (hidroximetil)aminometà
U	Unitats internacionals d'activitat en <u>zimàtica</u>
UDP glucosa,UDPG	Uridina difosfoglucosa
UTP	Uridina trifosfat
Vmax	Velocitat màxima

CONTINGUT.

	<u>Pág.</u>
1.- INTRODUCCIÓ	1
1.1. El metabolisme del glicogen i la seva regulació: un model altament complex d'interrelació molecular	2
1.2. Control hormonal del nivell intracel.lular d'AMP cíclic	15
1.3. Proteïna quinases dependents d'AMP cíclic.	27
1.4. Fosforilasa quinasa	38
1.5. Glicogen fosforilasa	47
1.6. Glicogen sintasa quinases independents d'AMP cíclic	54
1.7. Glicogen sintasa	57
1.8. Fosfoproteïna fosfatases al metabolisme del glicogen	76
1.9. Efectes hormonals sobre el metabolisme hepàtic del glicogen	86
2.- MATERIALS I MÈTODES	95
2.1. Animals utilitzats	96
2.2. Isolament de cèl.lules de parènquima hepàtic	98
2.3. Incubació dels hepatòcits	105
2.4. Tècniques determinatives	107
2.5. Reactius i productes utilitzats	123
3.- RESULTATS	131
3.1. Proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica	132
3.2. Estudi dels mecanismes moleculars involucrats a l'acció del glucagó sobre cèl.lules parenquimàtiques de fetge.	161
3.3. Estudi de control hormonal del metabolisme del glicogen als hepatòcits per catecolamines i agents relacionats	179

	<u>Pág.</u>
3.4. Accions de la insulina en hepatòcits en absència de glucosa	209
4.- DISCUSSIÓ	229
4.1. Els hepatòcits isolats com a material d'estu di	230
4.2. Control hormonal de la glicogenolisi hepàti- ca. Mecanisme d'acció del glucagó	232
4.3. El caràcter alfa-adrenèrgic de les catecola- mines	246
4.4. Aproximació al mecanisme d'acció de la insu- lina	254
5.- CONCLUSIONS	263
6.- BIBLIOGRAFIA	273

1. INTRODUCCIÓ

1.1. EL METABOLISME DEL GLICOGEN I LA SEVA REGULACIÓ: UN MODEL ALTAMENT COMPLEX D'INTERRELACIÓ MOLECULAR.

Amb una freqüència gairebé absoluta als sistemes biològics els cal captar, d'una manera o d'una altra, molècules relativament complexes del medi extern i degradar-les deslliurant-ne l'energia que contenen per tal d'utilitzar-la en el manteniment de llur activitat vital. Molt sovint, també, els processos de captació de molècules riques energèticament i els degradatius, fenòmens desvinculats entre si, es produeixen amb intensitat fluctuant. Les fases de baix consum d'energia poden ser simultànies amb l'entrada al sistema de materials presents a l'entorn i aleshores el saldo d'ingrés és notòriament positiu. Alternativament, aquesta economia pren el signe contrari: les despeses energètiques incrementades, o àdhuc desencadenades de sobte, poden superar amb escreix l'aport del medi. A molts organismes aquests fets han pressionat l'aparició de formes d'acumulació i reserva, i de cessió en el moment oportú, de les molècules donadores d'energia.

Quan el sistema viu és la cèl.lula animal i l'obtenció d'energia es basa en oxidar metabòlicament molècules de glucosa, el dipòsit que les acumula per cedir-les quan calgui és el glicogen, un polímer de glucosa, un polisacàrid doncs, estructurat en cadenes intensament ramificades formades per

unitats glucosíliques enllaçades entre elles. Aquesta estructura el fa molt apte per a ser mobilitzat ràpidament per la glicogen fosforilasa, l'enzim responsable de la seva degradació, que actua sobre els extrems de les cadenes separant-ne unitats de glucosa 1-fosfat. L'estructura ramificada també li confereix una solubilitat elevada i l'alt pes molecular que li es propi fa que exerceixi una pressió osmòtica modesta al costat de la que produiria una quantitat comparable de glucosa lliure. La localització del glicogen a la cèl.lula és predominantment citoplasmàtica. Es presenta associat fortament amb proteïnes, i en especial amb les que actuen com a enzims del seu metabolisme.

La glicogen sintasa i la glicogen fosforilasa són, respectivament, els enzims responsables directes de la formació i degradació del carbohidrat. La via de síntesi generalment acceptada segueix el pas de glucosa a glucosa 6-fosfat i, d'aquesta a glucosa 1-fosfat. El donador de grups glucosil a la reacció de la glicogen sintasa és la uridina difosfo glucosa (UDPG) formada per acció de la UDPG-pirofosforilasa sobre la glucosa 1-fosfat i l'uridina trifosfat (UTP) (ESQUEMA I). El procés degradatiu es basa en la separació d'unitats de glucosa 1-fosfat a partir de glicogen en la reacció que catalitza la glicogen fosforilasa. La glucosa 1-fosfat alliberada pot passar a glucosa 6-fosfat posant-se a l'abast del procés glicolític deslliurador de l'energia continguda a la molècula del monosacàrid.

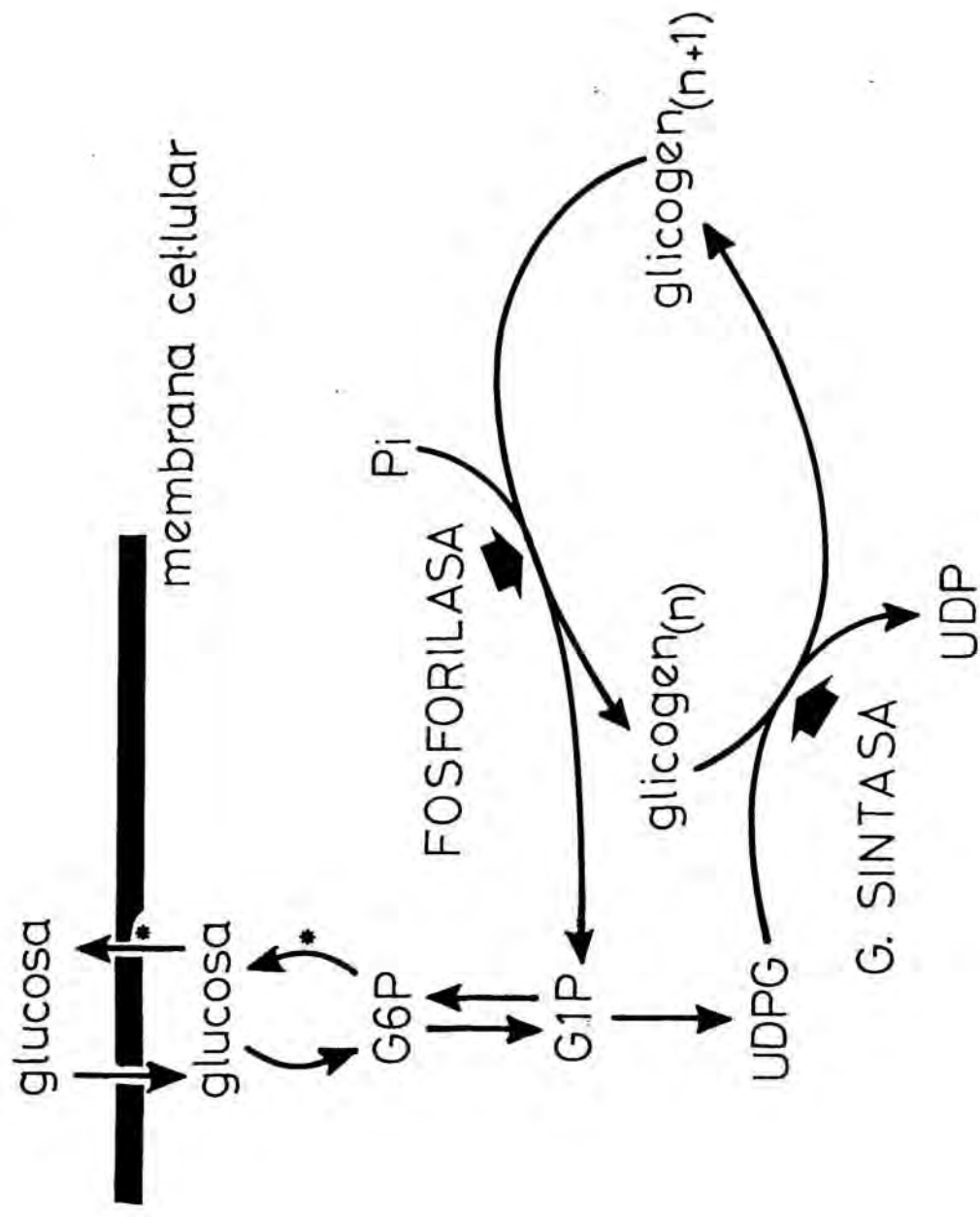
Com a conseqüència del desenvolupament evolutiu, els animals superiors, i entre ells l'home, són un agrupament de cèl.lules simples i altament diferenciades que derivaren potser d'una cèl.lula indiferenciada existent fa centenars de milions d'anys. La diferenciació comportà l'especialització

d'unes cèl.lules en una determinada funció de la qual en podrien prescindir unes altres per, al seu torn, diferenciar-se també. El resultat final ha estat l'aparició d'una alt grau d'interdependència d'una banda i, de l'altra, l'establiment d'acurats sistemes de control de les funcions primordials. Controlar de manera efectiva i a nivell general certes funcions comporta necessàriament enfrontar-se a problemes de comunicació específica derivats de la separació espacial dels components funcionals de l'organisme. L'establiment de glàndules en docrines cobreix en molts casos aquesta necessitat. Les hormones que lliuren a la sang serveixen de senyal específic per a justar les funcions d'unes cèl.lules determinades als requeriments generals de l'organisme.

L'acumulació, la distribució i la utilització de material energètic en forma de glicogen, contitueixen casos genuïns de processos que impliquen interrelació entre teixits i control general mitjançant hormones.

D'antuvi, interrelació entre teixits. Malgrat que el glicogen està present a les cèl.lules de la major part dels teixits de l'organisme d'un mamífer, cal distingir clarament el sentit fisiològic que té en cada cas la presència d'aquest carbohidrat. De fet, a la majoria de teixits, dels quals se'n ha pres com a model el múscul esquelètic per la seva importàcia quantitativa, el glicogen hi té una funció de reserva limitada de glucosa immediatament movilitzable per a l'ús particular de la cèl.lula que el conté, i res més. El control que exerceix la pròpia cèl.lula, i el control exterior tenen la missió de menar el metabolisme vers la síntesi o la degradació del polisacàrid segons que calgui. Ara bé, al fetge, òrgan amb un potencial metabòlic formidable, la presència de glicogen revesteix unes característiques especials i importantís

ESQUEMA I : VIES DE SÍNTESI I DEGRADACIÓ DEL GLICOGEN

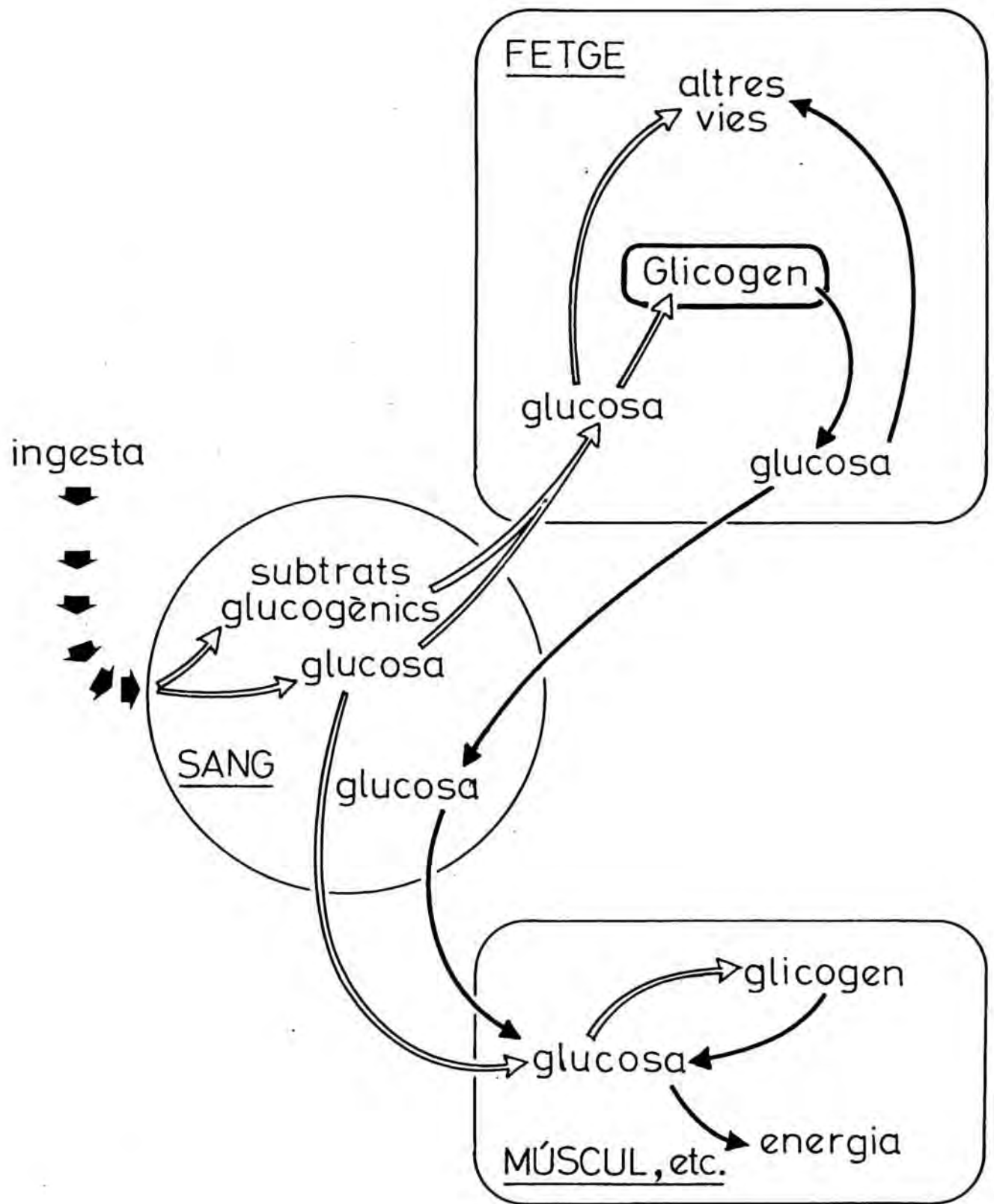


(*) al fetsge

simes. La capacitat relativa del fetge per acumular glicogen és molt elevada a diferència dels altres teixits. Quan la glucosa i altres substrats glicogènics apareixen sobtadament a la sang després d'una ingesta, són transformats en polisacàrid i acumulats. El fetge, que té la possibilitat específica de transformar glucosa 6-fosfat en glucosa per acció de l'enzim glucosa 6-fosfatasa, es converteix des d'ara en l'administrador de la reserva de glucosa de l'organisme. Quan les necessitats generals ho imposin, el glicogen hepàtic serà degradat fins a glucosa la qual, vessada a la sang, arribarà als llocs que la reclamin. Aquestes interrelacions es presenten en l'ESQUEMA II.

I també control per hormones. Tot i que simples canvis a la concentració de metabolits i d'ions a l'interior de la cèl.lula poden modificar consegüentment el metabolisme del glicogen, el control més potent a nivell general és el protagonitzat per les hormones. La glicogen sintasa i la fosforilasa són enzims regulables per canvis en llur grau de fosforilació o contingut en fosfat unit covalentment a la molècula proteïca. Les formes de la glicogen sintasa actives fisiològicament són les no fosforilades (formes I), mentre que les més actives de la fosforilasa són, precisament, les fosforilades (formes a). Els canvis del grau de fosforilació poden ser induïts per la presència d'hormones a l'entorn cel.lular. Hormones com el glucagó i les catecolamines, altrament anomenades hormones glicogenolítiques, provoquen en molts teixits la fosforilació de la sintasa i de la fosforilasa mitjançant l'activació de proteïna quinases, els enzims que catalitzen aquest tipus de reacció. En conseqüència la sintasa resulta inhibida i la fosforilasa activada. El resultat net de l'operació és la conducció de metabolisme del glicogen vers la degradació (ESQUEMA III). Hormones com la insulina, al contrari, poden

ESQUEMA II: EL GLICOGEN COM A RESERVA ENERGETICA DE L'ORGANISME:
RELACIÓ ENTRE LA FUNCIO ADMINISTRADORA DEL FETGE I LA
UTILITZACIÓ A ALTRES TEIXITS.



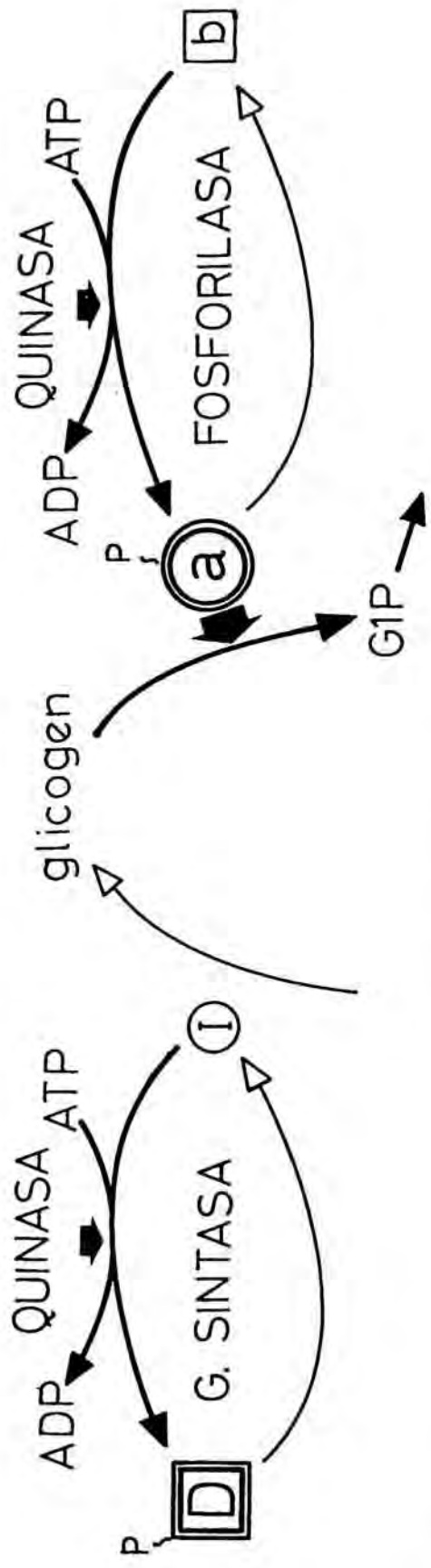
provocar el fenomen invers, és a dir, la pèrdua del fosfat lli_gat als enzims, per mecanismes encara mal coneguts. El resultat d'una acció hormonal d'aquest tipus és l'increment de la síntesi del glicogen.

Els mecanismes detallats pels quals els senyals hor_{mon}als que arriben a la cèl.lula es materialitzen en canvis de l'activitat de la glicogen sintasa i de la fosforilasa, quins són?. Cal tenir clar que cap de les hormones esmentades penetra a l'interior de la cèl.lula i que per a dur a terme llur efecte, el senyal hormonal que arriba a la membrana cito_{plasmàtica} ha de recòrrer viaranyes específics i complexos abans de modificar covalentment ambdós enzims.

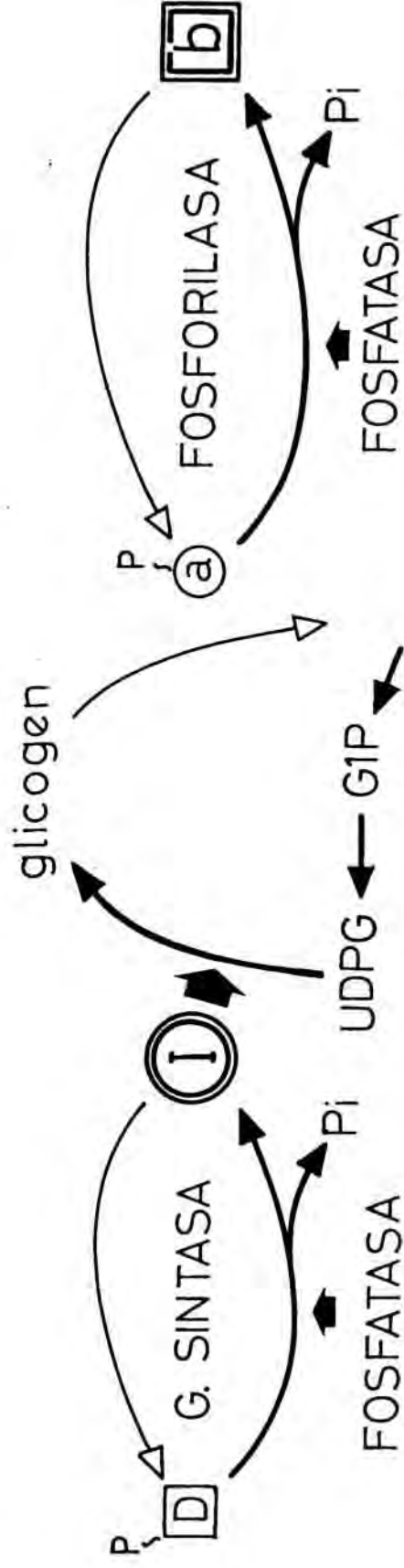
Els fenòmens involucrats en els mecanismes d'acció d'aquestes hormones presenten unes característiques decididament sofisticades als nostres ulls. S'hi inclouen fixacions específiques de les hormones a receptors de membrana, interaccions intra i interproteïques, dissociació i reassociació de proteïnes formades per subunitats diferents, mecanismes de ser_{vo}control d'activitat enzimàtica, etc.

Ha passat una vintena d'anys d'ençà que la importàcia de l'adenosina monofosfat cíclic (AMP cíclic) en la regulació del metabolisme de'l glicogen va ésser reconeguda per pri_{ma}era vegada per l'equip de Sutherland (1, 2), uns quinze anys des de que el grup de Larner va demostrar l'existència de dues formes de la glicogen sintasa amb diferent activitat (3) i llur interconversió per una seqüència de reaccions de fosforilació i desfosforilació (4) i tan sols deu anys des que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic va ésser descoberta al laboratori de Krebs (5). Amb aquestes troballes va ésser possible bastir una teoria vàlida per a explicar la via per

ESQUEMA III: LA INTERCONVERSIÓ DELS ENZIMS RESPONSABLES DE LA SÍNTESI I DEGRADACIÓ DEL GLICOGEN



Predomini de quinases i fosforilació $\Rightarrow$ Glicogenólisi



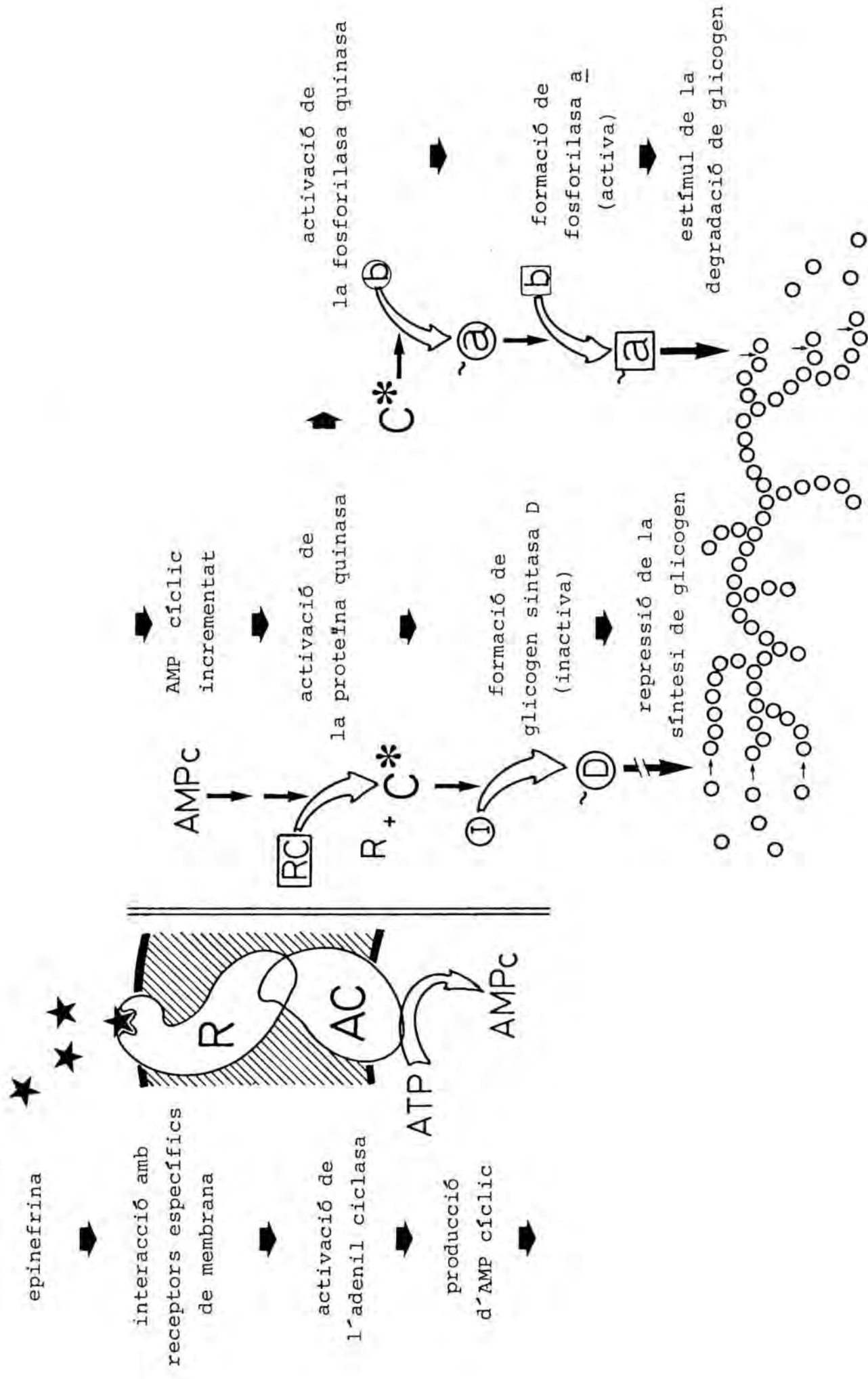
Predomini de fosfatases i desfosforilació $\Rightarrow$ Glicogènesi

la qual l'epinefrina (adrenalina) estimula la degradació del glicogen al múscul esquelètic (6, 7) (ESQUEMA IV) que posteriorment s'ha fet extensiva a altres teixits i altres hormones, les quals, com l'epinefrina, incrementen els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic. Per exemple, el glucagó al fetge.

Aquesta via, que inclou una sèrie de reaccions en "cascada" ofereix la possibilitat d'amplificar els primers efectes produïts per l'arribada de l'hormona a la superfície cel·lular. Stadtman i cols. (8) han emfatitzat recentment l'enorme potencial amplificador de sistemes en "cascada" com la via glicogenolítica i dedueixen, amb consideracions teòriques, que el logaritme de la concentració d'efector hormonal necessària per produir un 50% d'activació del darrer enzim de la "cascada" és inversament proporcional al nombre de cicles que aquesta té. Com que hi ha tres esglaons entre l'AMP cíclic i la fosforilasa, segons aquestes consideracions es pot estimar que una activació del 50% de la fosforilasa pot assolir-se amb un increment de tant sols el 1% en els nivells d'AMP cíclic. Nimmo i Cohen (9) no troben aquestes xifres gens exagerades i encara creuen que, en realitat, l'efecte amplificador deu ser més gran tenint en compte els fenòmens que es deriven de la presència d'inhibidors de la proteïna quinasa (secció 1.3.4.2.) i de la possibilitat de regulació de les proteïna fosfatases (secció 1.8.).

La possibilitat de control és un segon avantatge de les cascades multicícliques. El nombre d'enzims s'incrementa a cada cicle de la cascada, i cada enzim és, potencialment, un punt separat de regulació metabòlica múltiple (8). La superfície d'una proteïna enzimàtica és, d'altra banda, limitada i podria ser impossible incorporar sobre una sola molècula tots els controls necessaris per a regular una activitat enzimàtica.

ESQUEMA IV: ESTÍMUL DE LA GLICOGENOLISI PER L'EPINEFRINA AL MÚSCUL
ESQUELÈTIC



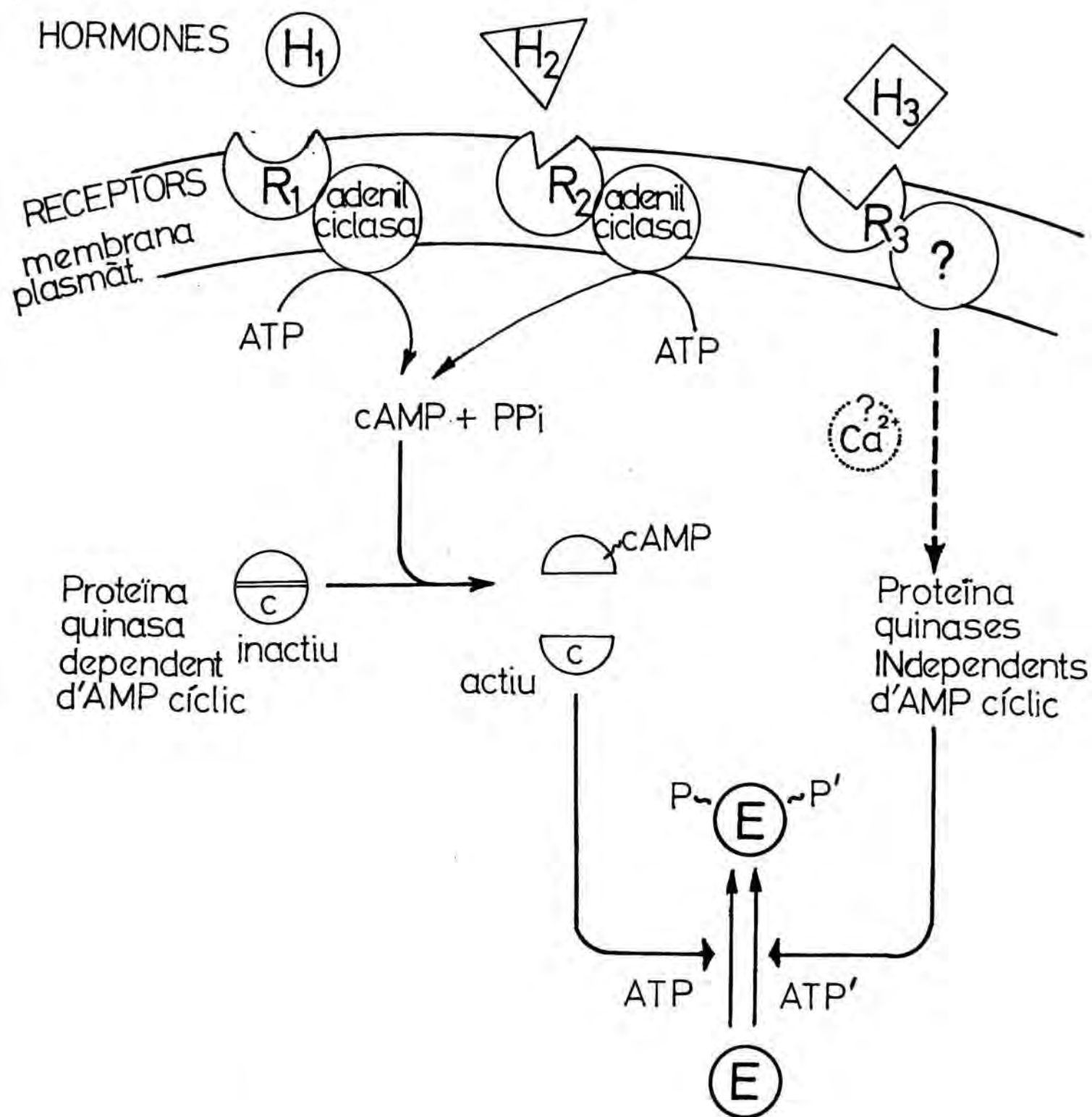
màtica que ocupés una important posició en el metabolisme (10). Un altre punt d'interés és que la concatenació d'enzims que difereixen àmpliament pel que fa a concentració en la cèl.lula, permet que el darrer de la seqüència pugui ser regulat efectivament per diversos metabolits en molt diferents concentracions "in vivo". De fet, seria impossible que la fosforilasa del múscul (concentració mitja 0,1 mM) pogués ser activada directament per l'AMP cíclic que es troba en concentracions inferiors a 1 μ M (11).

Fins fa poc temps, la colla d'esdeveniments que origina un increment d'AMP cíclic era l'únic mecanisme d'acció conegut de les hormones que controlen el metabolisme del glicogen sense penetrar a la cèl.lula. Actualment, però, se'n estan desvelant d'altres. Tal com ha estat demostrat de forma concloent fa molt poc pel grup d'Exton (12, 13) l'epinefrina no precisa induir la formació del nucleòtid per a dur a terme els seus efectes a la cèl.lula hepàtica. Actua gairebé exclusivament a través de receptors alfa-adrenèrgics que no estan relacionats amb la formació d'AMP cíclic en condicions normals, sino que semblen lligats a canvis de la concentració intracel.lular de calci. Això indueix a postular una via glicogenolítica alternativa, en la qual intervendrien proteïna quinases controlades no per l'AMP cíclic sino per altres efectors com pot ésser el mateix calci (ESQUEMA V). De fet se sap que l'activitat sintasa quinasa total present a molts teixits es comporta en la major part com a independent de l'AMP cíclic (14) i ja han estat isolades diverses proteïnes amb activitat sintasa quinasa independent d'aquest nucleòtid (15, 16, 17).

Els mecanismes d'acció de les hormones glicogenolítiques, lluny d'ésser totalment coneguts estan, però, raonablement ben perfilats. Els coneixements existents sobre les

ESQUEMA V: GLICOGENOLISI IMPULSADA PER HORMONES:

LA VIA MEDIATITZADA PER L'ADENIL CICLASA I LA PROTEÏNA
QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC I LA VIA INDEPENDENT DE
L'AMP CÍCLIC.



E = glicogen sintasa, glicogen fosforilasa quinasa, etc.

dues vies esmentades forneixen per ells mateixos un cos notable d'explicacions de fenòmens observables. Resta fosca la qüestió del mecanisme pel qual hormones com la insulina afavoreixen la síntesi de glicogen. Les alternatives són: o hi ha una via que, a mercé d'aquestes hormones, pot estimular la desfosforilació de la glicogen sintasa i de la fosforilasa, o bé aquestes hormones es limiten a obstaculitzar les vies glicogenolítiques a qualsevol de llurs nivells. O totes dues coses.

Sense descartar la primera alternativa, que per ara roman purament a la categoria de les possibilitats no comprovades, cal dir que es coneixen interaccions de la insulina amb els nivells d'AMP cíclic i amb activitats proteïna quinasas dependents del nucleòtid. No cal oblidar, a més, que la insulina exerceix nombroses accions sobre altres vies metabòliques i que, a través d'elles pot incidir indirectament, però d'una forma important, en l'equilibri del metabolisme del glicogen. L'entrada massiva de glucosa a la cèl.lula i l'estímul de la lipogènesi amb l'acceleració del cicle del fosfogluconat són exemples que no poden ser passats per alt considerant que el metabolisme a l'interior d'una cèl.lula és un sistema d'interrelacions perfectament harmòniques. Parlarem més extensament sobre aquestes qüestions a una altra secció d'aquest capítol.

1.2. CONTROL HORMONAL DEL NIVELL INTRACEL·LULAR D'AMP CÍCLIC

La importància de l'AMP cíclic en la regulació del metabolisme del glicogen va ser reconeguda per primera vegada el 1957 (1,2). Més tard, el descobriment de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (5) va servir per elucidar la via mitjançant la qual l'epinefrina estimula la glicolisi al múscul (secció 1.1.) i també va repercutir notablement sobre els estudis referents al mecanisme d'acció de diverses hormones.

Està ben clar que diferents hormones poden elevar el nivell d'AMP cíclic en diversos teixits (18), però les úniques proteïnes que fixen el nucleòtid amb alta afinitat són les proteïna quinasas dependents d'AMP cíclic i les fosfodiesterasas. Com que aquestes darreres són únicament enzims hidrolitzadors del nucleòtid, s'ha arribat al convenciment que la majoria, si no totes, les accions de l'AMP cíclic estan mediatitzades per la fosforilació de proteïnes (19,20) catalitzada per proteïna quinasas dependents d'AMP cíclic.

Subratllada la importància de l'AMP cíclic com a mediador d'efectes hormonals, tractarem en el present capítol sobre els dos enzims dels quals depèn la presència del nucleòtid a la cèl·lula: l'enzim sintetitzant, adenil ciclasa, i

l'enzim hidrolitzant, fosfodiesterasa.

1.2.1. ADENIL CICLASA

La conversió enzimàtica de l'adenosina trifosfat (ATP) en adenosina 3',5'-monofosfat cíclic (AMP cíclic) va ser descrita per primera vegada amb detall per Sutherland, Rall i col.laboradors (21-24). Trobàren que l'enzim, que utilitza va ATP i Mg^{2+} , estava unit a la fracció membranosa de la cèl.lula, i que era present en una àmplia diversitat d'organismes. En tots els casos l'enzim era estimulable per fluorur sòdic i a cada tipus de teixit per una o varies hormones específicament.

Llurs suggeriments (24-26) respecte a que l'acció de moltes hormones podia ésser mediada per l'AMP cíclic format de resultes de l'estimulació de l'adenil ciclase, han estat confirmats a bastament.

1.2.1.1. Resposta a les hormones:

Estructura dels sistemes receptor hormonal-unitat catalítica.

Degut especialment al fet que per ara el sistema a denil ciclasa present a la membrana citoplasmàtica no ha estat susceptible de purificació total, els coneixements sobre els detalls del mecanisme d'interacció amb les hormones han

avançat lentament.

L'estructura dels sistemes receptor-adenil ciclase roman al terreny especulatiu. Segons Perkins (27) la formulació probablement més simple és el model proposat per Robison, Butcher i Sutherland (28) consistent en una subunitat receptora senzilla que interactua directament amb una subunitat catalítica. En aquest cas, l'acoblament de l'hormona a la subunitat receptora produiria un canvi conformacional en la catalítica activant-la. Aquest model potser és l'existent a cèl·lules que responen a una sola hormona, com aparentment és el cas de les de l'escorça adrenal, però no sembla propi de cèl·lules subjectes a regulació multivalent com, per exemple, els adipòcits que responen com a mínim a sis hormones (epinefrina, glucagó, ACTH, LH, TSH i secretina) o els hepatòcits que ho fan al menys a quatre (glucagó, secretina, polipètid intestinal vasoactiu i prostaglandina E_1). El mateix Perkins (27) assenyala que hi ha almenys tres esquemes de relació receptors-adenil ciclase que poden ser compatibles amb la regulació multivalent: a) diferents sistemes receptor-unitat catalítica, cadascun específic d'una hormona; b) un sol tipus de sistema amb una subunitat reguladora inespecífica; i c) diferents tipus de receptors separats i específics per cada hormona units a una subunitat catalítica comú per tots ells. La major part de les evidències sostenen la darrera teoria (29-34) demostrant que: a) les concentracions màximament efectives de diferents hormones no tenen efectes additius quan són combinades; b) certs antagonistes són específics d'una sola hormona com, per exemple, el propranolol que solament bloqueja efectes de les catecolamines; i c) la capacitat per respondre a hormones diverses presenta diferent sensibilitat al tractament proteolític amb tripsina.

1.2.1.2. Factors que afecten la sensibilitat de l'adenil ciclase a les hormones.

A) Agents causants d'alteracions inespecífiques de membrana.

Els detergents iònics eliminen tant l'activitat receptora com l'activitat catalítica (21). En canvi, el tractament del múscul cardíac (35) o de l'escorça adrenal (36) amb Lubrol PX, o el de membranes hepàtiques amb digitonina, urea o fosfolipasa A (37) provoca la pèrdua de sensibilitat a les hormones mentre que conserva la capacitat d'activació per fluorur. Els efectes d'aquest darrer tractaments poden ser revertits per l'addició de determinats fosfolípids (37-40). Aquests fets indiquen que l'estimulació hormonal involucra estructures que no són imprescindibles per la manifestació de l'activitat basal o de l'activació per fluorur (27), i aquestes estructures, que serien proteiques o lipoproteiques, potser són les compromeses en l'acoblament entre el receptor i l'activitat adenil ciclase (41).

La tripsinització d'eritròcits (42) i d'adipòcits (33) altera la sensibilitat a les hormones però no té un efecte notori sobre l'activitat enzimàtica basal. Això recolza l'idea de la disposició intracel.lular del component catalític i l'extracel.lular del receptor (27).

B) Cations

Certs ions, especialment els cations divalents, tenen efectes notables sobre els sistemes adenil ciclase. El Mn^{2+} estimula l'activitat basal però en certs casos dificulta l'acu

tivació per hormones (27,31) mentre que la resposta de l'adenil ciclasa, tant de teixit adipós com d'escorça adrenal a l'ACTH és dependent de Ca^{2+} (30,32).

Recentment ha estat provat (42) que l'efecte activador del Mg^{2+} i sobretot del Mn^{2+} sobre l'enzim de membranes hepàtiques es produeix per acció directa sobre l'adenil ciclasa la qual conté un centre que fixa específicament aquest cations. També s'ha observat que la unió de l'agonista als receptors hormonals associats a l'adenil ciclasa és dependent de Mg^{+2} (43). Una proteïna activadora de l'adenil ciclasa i de la nucleotid cíclic fosfodiesterasa de cervell també és dependent de calci (44,45) (veure secció 1.2.2.2.)

C) Agents que interactuen específicament amb els receptors.

Els nucleòtids de guanina, especialment el guanidina tridofat (GTP), interactuen amb l'adenil ciclasa, d'una banda estimulant l'activitat basal (46-49) i de l'altra rebaixant l'afinitat del receptor per certes hormones com, per exemple, el glucagó (46,47). Recentement s'ha presentat evidència (50) que el sistema adenil ciclasa hepàtic té un centre de fixació de GTP específic i independent per a cadascun d'ambdós efectes. El significat fisiològic d'aquests fenòmens necessita moltes més dades per ser comprensible.

Un altre aspecte de les interaccions amb els receptors hormonals de membrana el protagonitzen aquelles substàncies que per analogia estructural amb les hormones o per propietats competitives d'altra mena bloquejen la unió dels agonistes amb llurs receptors específics.

Aquest tipus d'antagonisme ha estat demostrat en-

vers les catecolamines (23) el glucagó (51), les prostaglandines (52) i l'ACTH (53). Son, fenomens que no tenint, obviament, significat fisiològic, són altament interessants tant des del punt de vista farmacològic com per la utilitat que tenen en els treballs destinats a esbrinar interaccions hormona-receptor.

1.2.2. AMP CÍCLIC FOSFODIESTERASES

La concentració d'AMP cíclic a la cèl.lula és proporcional directament a l'activitat sintetitzant de l'adenil ciclasa i inversament a l'activitat degradadora de les fosfodiesterases. Malgrat que aquests són els fets i que l'activitat hidrolitzant es coneix des de fa tant de temps com la sintetitzant (2), el progrés en l'estudi de les fosfodiesterases ha anat endarrerit respecte al de l'adenil ciclasa fins fa relativament poc temps.

El descobriment de diferents formes de fosfodiesterasa, la troballa d'un activador proteic específic i l'estudi dels efectes hormonals sobre l'enzim són les fites que avui confereixen el major interès i complexitat a aquest sistema enzimàtic. L'avenç que resta per fer en el coneixement de l'esmentat enzim, que transforma l'AMP cíclic en adenosina monofosfat (AMP), encara és considerable. Tal com indicaven recentment Wells i Hardman (54), no se sap quines de les fosfodiesterases tenen "in vivo" les mateixes propietats de quan són estudiades "in vitro", ni quina d'elles és la més important en el control dels nivells d'AMP cíclic a la cèl.lula. Es desconeix llur localització intracel.lular així com la de l'esmentat activador proteic.

També resta per aclarir la importància real que tenen l'activador proteic i les hormones en el control fisiològic de la fosfodiesterasa. Així mateix hom ignora si existeixen altres vies de degradació de l'AMP cíclic i fins i tot si la degradació per la fosfodiesterasa és més o menys efectiva que la simple expulsió del nucleòtid cap el medi extracel·lular a l'hora de rebaixar-ne els nivells dintre de la cèl·lula.

1.2.2.1. Múltiples formes de fosfodiesterasa

Des que es va descriure per primera vegada l'isolament de diverses formes de fosfodiesterasa a partir d'extractes d'escorça cerebral de rata (55), s'han trobat almenys tres formes de l'enzim als teixits de mamífer de les quals dues són presents gairebé en tots ells. Aquestes formes es diferencien per llur comportament cinètic, per l'especificitat respecte al substrat i per altres propietats, i cada teixit les conté en una proporció determinada. Cap d'aquestes formes s'ha pogut purificar de manera homogènia i és possible que alguna d'elles sigui la component de dues o més activitats.

Una de les formes més abundoses és la representada per l'enzim preparat originalment per Butcher i Sutherland (56) a partir de cor de bou. Posteriorment ha estat purificat a altres laboratoris a partir de teixit cardíac (57-59) i cerebral (60,61) i s'ha comprovat la seva presència a molts d'altres. Aquesta forma de l'enzim, altrament anomenada fosfodiesterasa "d'alta Km", té una Km aparent més elevada per l'AMP cíclic que pel guanosina monofosfat cíclic (GMP cíclic)

i és la forma sensible a l'activador proteic de les fosfodiesteras (veure secció 1.2.2.2.). Fins al moment present totes les evidències apunten cap a la possibilitat que les activitats hidrolitzants de l'AMP cíclic i del GMP cíclic estiguin protagonitzades pel mateix centre catalític car la transformació de l'AMP cíclic és inhibida competitivament pel GMP cíclic amb un valor de K_i del mateix ordre de magnitud que el de K_m (61-63), i viceversa.

Una altra forma majoritaria de fosfodiesterasa, anomenada "fosfodiesterasa de baixa K_m " o "de cooperativitat negativa" ha estat trobada a tots els teixits examinats. Aquesta forma sembla ser l'associada a la fracció de retícul endoplasmàtic de la cèl.lula (64-68), no essent sensible a l'activador proteic però sí a certes hormones. La seva activitat es caracteritza per una relativa selectivitat envers l'AMP cíclic.

Un tercer tipus de fosfodiesterasa que segurament no es troba distribuït de forma tan àmplia com els anteriors, es caracteritza perquè petites concentracions de GMP cíclic estimulen l'hidròlisi de baixes concentracions d'AMP cíclic, però no vicerversa (64, 69-73). Aquesta forma de l'enzim és de cinètica cooperativa i hidrolitza GMP cíclic i AMP cíclic aparentment amb la mateixa velocitat màxima.

A part de les esmentades formes de dosfodiesterasa se'n ha descrites moltes altres més o menys exclusives d'un tipus determinat de teixit, però no està clar si totes les formes presents als homogenats ho estan a les cèl.lules d'on provenen o si, al contrari, són artefactes del procés extractiu (58) o conseqüència d'efectes proteolítics (74).

1.2.2.2. Proteïnes activadores i inhibidores de la fosfodiesterasa.

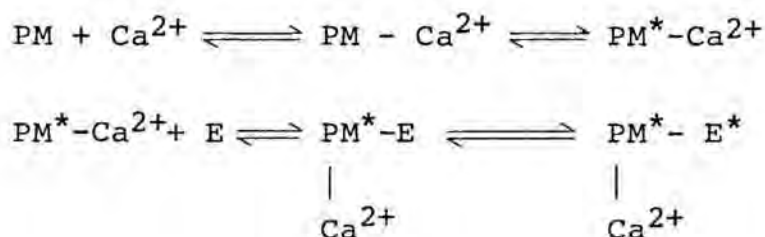
L'existència d'un activador proteic de la fosfodiesterasa de cervell va ser descrita de forma simultània i independent per Cheung (75-77) i per Kakiuchi i cols. (78).

El grup de Kakiuchi (79,80) va mostrar que l'activador únicament estimulava una forma de la fosfodiesterasa dependent de calci. Tal factor proteic, una vegada purificat, va resultar ser dependent de Ca^{2+} per a activar la fosfodiesterasa (81). Es una cadena polipeptídica senzilla de 18.000 daltons de pes molecular (82-84).

Recentment, ha estat demostrat que l'activador proteic de la fosfodiesterasa, el qual ha rebut el nom més ampli de proteïna moduladora dependent de calci, també pot activar a l'adenil ciclase cerebral (44,45), i a la $(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa de membrana eritrocitària (85,86). Recentment ha estat purificada a partir del múscul esquelètic de conill una proteïna quinasa activable pel modulador dependent de calci (87). La proteïna quinasa afectada no és dependent d'AMP cíclic ni de GMP cíclic (87) i té activitat fosforilant sobre histona, fosforilasa quinasa i miosina de cadenes lleugeres (87).

L'activació de la fosfodiesterasa i de l'adenil ciclase per la proteïna moduladora dependent de calci sembla involucrar la següent seqüència de reaccions (84, 88-91):

.../...



on PM i E indiquen, respectivament, la proteïna moduladora i l'enzim modulable, i PM^* i E^* llurs formes activades. Sobre la base dels pesos moleculars respectius, hom ha suggerit que cada molècula d'enzim fixa dues molècules de modulador (89).

També ha estat trobada al teixit cerebral de bou una proteïna inhibidora de la fosfodiesterasa dependent de calci l'efecte de la qual consisteix en bloquejar l'acció del modulador (92,93). A més d'aquest inhibidor, se'n ha trobat d'altres que actuen directament sobre la fosfodiesterasa. Aquests, presents a la retina (94) i al cervell de bou (95) tenen una major estabilitat tèrmica que el citat més amunt.

L'estudi dels activadors i inhibidors proteics de la fosfodiesterasa està en fase d'expansió. Les implicacions fisiològiques de llur acció, que s'extén a altres sistemes enzimàtics diferents del de la fosfodiesterasa, poden ser molt importants, especialment dintre els mecanismes de control hormonal que involucren canvis en la concentració intracel.lular de Ca^{2+} .

1.2.2.3. Sensibilitat a hormones i a altres agents.

La forma enzimàtica de fosfodiesterasa afectable per hormones sembla ser únicament la de baixa Km (96-102, 68) que està associada al retícul endoplasmàtic tant als adipòcits (100) com als hepatòcits de rata (68). El mecanisme d'activació per hormones, desconegut fins ara, segurament no involucra la proteïna activadora (secció 1.2.2.2.) perquè aquesta no afecta "in vitro" la forma de baixa Km de la fosfodiesterasa.

L'activitat fosfodiesterasa d'adipòcits i hepatòcits pot ser incrementada no sol per la insulina (96-100,68), hormona amb caràcter glucogènic i lipogènic, sino també per agents hormonals glucogenolítics i lipolítics. Per exemple, l'epinefrina i l'ACTH estimulen la fosfodiesterasa d'adipòcits (101), i el glucagó la d'hepatòcits (68,102). La forma de l'enzim afectada és la mateixa que l'estimulada per la insulina - (68,102) i cal suposar que la insulina duu a terme els seus efectes per mecanismes diferents dels de les altres hormones (101). Ulteriors estudis han de clarificar tant les característiques dels mecanismes d'activació hormonal com la importància real que tenen en el control global del metabolisme cel·lular.

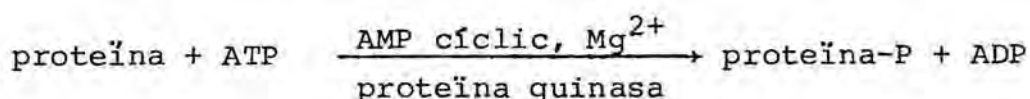
Esmentarem també, per llur importància farmacològica, i com a auxiliars per esbrinar les característiques del centre catalític de les fosfodiesterases, l'existència de compostos amb un alt poder inhibidor de l'activitat d'aquets enzims. De bon tros, els més importants són el del grup de les metilxantines (2,56): la cafeïna, la teofilina, la teobromina i l'aminofilina. Estudis "in vitro" (56, 103, 104) indiquen

que causen inhibicions competitives sobre les diverses formes de l'enzim.

Altres compostos amb acció inhibidora "in vitro" són la puromicina (105) les 4-benzil-2 imidazolidinones (106) i la papaverina.

1.3. PROTEÏNA QUINASES DEPENDENTS D'AMP CÍCLIC

Les proteïna quinases dependents d'AMP cíclic són una classe de quinases formades per dos tipus de subunitats: unes anomenades reguladores (R) que són les que fixen l'AMP cíclic, i unes altres anomenades catalítiques (C) que contenen el centre actiu i que actüen solament quan estan lliures, és a dir, quan el conjunt holoenzimàtic RC és dissociat per la fixació d'AMP cíclic a les subunitats R. La reacció catalitzada per les proteïna quinases dependents d'AMP cíclic pot esquematitzar-se així (107-109):



L'existència d'aquest sistema era intuïble des que hom sabia que tant l'activació de la fosforilasa quinasa (110) com la inactivació de la glicogen sintasa (111, 112) eren catalitzades per quinases en presència d'AMP cíclic. La primera demostració de l'existència de tals enzims es deu al grup d'E. Krebs (5) que originalment va descriure la nova activitat enzimàtica descoberta al múscul esquelètic com "fosforilasa quinasa". Soderling i col.laboradors demostràren posteriorment (113) que l'enzim isolat per Krebs també podia actuar sobre la glicogen sintasa. La presència de proteïna quinases depen

dents d'AMP cíclic va ser establerta ràpidament en molts altres teixits (6, 114-117).

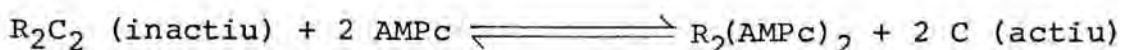
La seva localització és predominantment citoplasmàtica al múscul esquelètic (5) i cardíac (6), al fetge (118) i a altres teixits, però el cervell (119), la hipòfisi anterior (120), el ronyó (121) i el cor (122) també presenten l'enzim associat a la fracció membranosa.

1.3.1. FORMES I i II DE L'ENZIM

Moltes de les formes de proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic obtingudes a partir de diferents teixits han resultat ser artefactes produïts en el transcurs dels processos de purificació i no tenen cap mena de significat fisiològic. Malgrat tot, ha esdevingut un fet comprovat l'existència d'almenys dues formes o tipus de l'enzim en molts teixits de mamífer. Aquestes formes, anomenades respectivament pics I i II, són separables per cromatografia en columnes de DEAE-cel·lulosa (123, 124), d'aquí el seu nom. La proporció de cadascuna d'aquestes formes depen de cada teixit i, per un mateix teixit, de l'espècie animal. Fins i tot s'han descrit diferències segons el tipus de cèl·lules dins d'un mateix teixit com, per exemple, el muscular.

Les formes holoenzimàtiques del pic I de múscul esquelètic de conill (125) i del pic II de múscul cardíac boví (126, 127) són les més ben conegudes. Han estat purificades fins a l'homogeneïtat i llurs propietats fisicoquímiques i enzimàtiques estan bastant ben definides. Amb dues presenten

una estructura R_2C_2 . El pic I de múscul esquelètic pot fixar 2 mols d'AMP cíclic per mol d'holoenzim dissociant-se i donant dímers reguladors i monòmers catalític (128) segons la següent equació:



Al pic II de múscul cardíac se li havia atribuït la mateixa estequiometria de reacció (128) però en un treball publicat recentment es descriu la incorporació de 4 mols d'AMP cíclic per mol de dímer de subunitat reguladora (129).

El pes molecular de l'holoenzim I és 170.000 (130) i el del monòmer R corresponent, 49.000 (130). Els pesos moleculars de l'holoenzim II i del seu monòmer R són 174.000 (131) i 55.000 (126) respectivament. El pes molecular de les subunitats catalítiques és idèntic en tots dos casos: 40.000 (130, 131).

Una propietat notable de la forma II de múscul cardíac és la capacitat que té d'autofosforilarse (123, 132, 133). Durant aquest procés es transfereix una molècula de fosfat de l'ATP a un residu de serina de cada un dels monòmer R que formen part de l'holoenzim. Les subunitats catalítiques, en canvi, no es fosforilen (123, 132). Com la majoria de les reaccions catalitzades per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, l'autofosforilació es pot revertir (134). Els efectes de l'autofosforilació "in vitro" són una major susceptibilitat de l'holoenzim a la dissociació per AMP cíclic (130, 131) i l'increment aparent de l'afinitat de la proteïna quinasa pel nucleòtid (123).

Segons que indiquen Nimmo i Cohen (9) l'isolament

de formes de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic que no siguin les dels tipus I i II és gairebé sempre conseqüència de fenòmens que modifiquen o alteren aquestes dues formes principals de l'enzim. Cal concloure, segons aquests autors que les formes I i II descrites són les úniques existents en molts teixits.

La proteïna quinasa hepàtica, la implicada en el sistema estudiat per nosaltres, va ser purificada originalment per Yamamura i col.laboradors (135) i per Kumon i col.laboradors (136). Es presenta en les dues formes clàssiques I i II amb un sol tipus de subunitat catalítica i un tipus de subunitat reguladora diferents per cadascuna d'elles. S'ha indicat que també presenten diferències quant a la capacitat de dissociació per AMP cíclic (135-137). La localització intracel·lular és gairebé enterament citosòlica (90%) i ambdues formes es troben en aquest teixit en la mateixa proporció (118, 124, 136, 138).

1.3.2. CARACTERÍSTIQUES PARTICULARS DE LES SUBUNITATS ISOLADES.

La major part de les evidències suggereixen que hi ha dos tipus principals de subunitats reguladores de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i un de sol de catalítica en els teixits de mamífer. Versemblantment, les formes holoenzimàtiques I i II estan constituïdes pel mateix tipus de subunitat catalítica i la principal diferència que presenten estriba en el tipus de subunitat reguladora que contenen. De la proporció d'un i d'altre tipus de subunitat reguladora de

pendria, segons aquestes suposicions, la proporció de formes holoenzimàtiques a la cèl.lula. De fet, s'ha demostrat que les subunitats catalítiques de l'holoenzim I poden reassociar-se amb les reguladores del II i que les catalítiques del II poden fer-ho amb les reguladores de l'I (139, 140).

Les subunitats catalítiques procedents de les formes I i II presenten el mateix pes molecular estimat per diferents mètodes (126, 130, 131, 141). Algunes preparacions de subunitat catalítica presenten dues formes moleculars amb igual massa però amb diferències en el punt isoelèctric (118, 139). Tot fa pensar, però, que una d'elles es tracta simplement d'un producte format per proteolisi molt lleugera de l'altra durant el procés de purificació. La uniformitat de les subunitats catalítiques sembla, doncs, molt acusada.

Les subunitats reguladores dels holoenzims I i II tenen lleugeres diferències de pes molecular (126, 130) i no presenten reactivitat immunològica creuada (142). En canvi, els holoenzims II de teixits diferents es comporten immunològicament de forma idèntica (142).

1.3.3. SUBSTRATS ESPECÍFICS DE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC.

En els estudis inicials sobre proteïna quinases musculars i hepàtiques es van identificar com a substrats seus la fosforilasa quinasa, la caseïna i la protamina (5), certes histones (143, 144) i la fosvitina (144). A aquesta llista s'hi afegiren algunes altres proteïnes enzimàtiques sotmeses

a control per fosforilació, entre elles la glicogen sintasa (113, 145). La primera impressió és que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic presenta una especificitat de substrat relativament molt baixa (146). De fet és possible demostrar que qualsevol proteïna és fosforilable si es posa en presència d'una quantitat elevada de proteïna quinasa.

Ara bé, si es tenen en compte les consideracions de Cohen i col.laboradors (147) cal concloure que la proteïna quinasa és un enzim altament específic. Aquests autors mostraren (147) que l'enzim fosforila amb una velocitat significativa únicament dos dels dos centenars de residus de serina i cap dels cent cinquanta de treonina que conté la fosforilasa quinasa. Aquestes xifres plantejaren l'interrogant de quines són les estructures determinants de la fosforilació de les proteïnes en uns punts tan concrets.

Diverses observacions (148, 149) indicaven que certes proteïnes amb una estructura terciària minsa i algunes proteïnes desnaturalitzades eren especialment susceptibles a l'acció fosforilant de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Aquests fets suggerien que alguna característica de l'estructura primària, més que no pas de la secundària o terciària, era primordial per a que l'enzim reconegués als seus substrats. Tals idees eren recolzades per treballs (150) en els quals es mostrava que la capacitat de fosforilació de proteïnes bàsiques de la mielina es conservava en certs pèptids també bàsics que eren originats per tractament tèrmic o per digestió peptídica d'aquestes proteïnes. D'altra banda hi havia l'observació que les seqüències d'aminoàcids de diversos centres de fosforilació eren molt diferents entre sí (147, 151-153) indicant que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic tampoc identifica seqüències específiques d'aminoàcids (148,

150-154).

En diferents laboratoris s'ha observat (148, 155-157), però, que les seqüències d'aminoàcids que contenen un residu de serina fosforilable presenten a la vora d'aquest, i de la banda de l'extrem aminoterminal, dos aminoàcids, i de vegades més, amb caràcter bàsic. Aquesta coincidència notable sembla ser un fet definitiu pel reconeixement d'una proteïna com a substrat natural de la quinasa dependent d'AMP cíclic (158).

1.3.4. REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT DE L'ENZIM

En principi la clau més important de la regulació de l'activitat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic és, obviament, la concentració de nucleòtide que l'envolta. Però cal esmentar també, per la transcendència que poden tenir "in vivo", els efectes de l'inhibidor proteic específic purificat a partir del múscul esquelètic per Walsh i col.laboradors (159) i els encara mal coneguts efectes de l'autofosforilació de la forma II de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (123, 132, 133).

1.3.4.1. Regulació pels nivells intracel·lulars d'AMP cíclic i mecanismes relacionats.

Tal com es preocupen d'asseyalar Nimmo i Cohen (9),

cal tenir present abans de realitzar estudis sobre la dissociació i la reassociació "in vivo" de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i abans de treure'n conclusions, que hi ha certs problemes tècnics que poden desdibuixar notablement els fets reals. Tant si es valora l'activació de l'enzim pel seu estat de dissociació com si es fa per la relació d'activitats mesurades en absència i en presència d'AMP cíclic, és necessari prendre precaucions a fi d'evitar que en el procés d'homogenització del teixit i en les operacions subsegüents es produeixin canvis en l'estat d'activació de l'enzim que poden ser deguts, al seu torn, a canvis en la concentració de nucleòtid cíclic envoltant. Tenir la plena garantia de que l'estat d'activació es manté inalterat al llarg d'aquells processos és una fita tan cobejable com difícil d'assolir. A més, si l'activitat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic és mesurada pel mètode de la relació d'activitats cal evitar la interferència d'altres activitats proteïna quinasa presents als assajos, precaució oblidada en alguns treballs.

Les dades més fiables que hi ha sobre l'estat d'activació basal de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic en diferents teixits (160-168) assenyalen valors al voltant del 20% sobre la activitat màxima que pot presentar. El contingut d'AMP cíclic en la majoria dels teixits és de l'ordre de 10^{-7} a 10^{-6} mols per kg de pes humit (18). Si es fa cas de certes dades sobre la K_a (constant d'activació) de l'enzim, que li atorguen un valor de 10^{-8} a 10^{-7} M (9), és a dir, de deu a cent vegades per dessota les concentracions basals d'AMP cíclic, no s'enten com és possible que la proteïna quinasa no estigui ja totalment dissociada en aquestes condicions. Com que la dissociació en condicions basals no és compatible amb regulació de l'activitat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic "in vivo", alguns autors han proposat que única-

ment una porció mínima de l'AMP cíclic de la cèl.lula esta a l'abast de l'enzim en condicions basals, sia perque es troba segrestat per alguna estructura cel.lular (169, 170), sia per que tant ell com l'enzim es troben en uns hipotètics compartiments separats entre sí (171). Sense negar la possibilitat que siguin certes, tals teories no són imprescindibles per comprendre les coses. Efectivament ha estat demostrat (172, 173) que els valors de K_a trobats 'in vitro' estan molt per dessota dels que probablement existeixen "in vivo". El valor fisiològic de la K_a de la proteïna quinasa per l'AMP cíclic solament pot ser estimat operant amb concentracions fisiològiques d'enzim. En aquestes circumstàncies la K_a assoleix un valor de $1,5 \times 10^{-6}$ M (174), ja per damunt de les concentracions basals d'AMP cíclic en la cèl.lula.

1.3.4.2. L'inhibidor proteic de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Walsh i col.laboradors (159) han purificat un factor proteic que es troba present en els extractes crus de múscul esquelètic de conill i que pot causar la inactivació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (112, 159, 175, 176). Aquest factor es comporta molecularment com a proteïna termestable i no afecta a altres proteïna quinasas que no siguin les dependents d'AMP cíclic (176).

La inhibició causada és de tipus no competitiu respecte a l'ATP, a l'AMP cíclic o al substrat proteic (159). Interactua amb les subunitats catalítiques lliures, presumiblement en un centre diferent del catalític, però no afecta

a les formes holoenzimàtiques (177, 178). L'efecte inhibitori no és alterat per la presència d'AMP cíclic (177, 178).

En canvi, hi ha poca informació sobre les seves característiques moleculars. Se li ha estimat un pes molecular de 26.000 per gel-filtració (159) però aquest valor és més baix que l'atribuïble a una proteïna normal tenint en compte el valor del seu coeficient de sedimentació. Ha estat suggerit (159), en vistes d'això, que la fracció proteica està combinada amb una altra lipídica o de carbohidrat. En tot cas, i com que el procés de purificació cursa amb calefacció a 95°C i precipitació amb àcid tricloracètic al 15%, sembla que la proteïna és relativament pobre en estructures secundària i terciària.

Encara és aviat per arribar a conclusions definitives sobre la transcendència fisiològica de l'inhibidor de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, però si les extrapolacions de "in vitro" a "in vivo" són correctes, en teixits com el cardíac aquest factor pot bloquejar fins el 20% de la proteïna quinasa total dissociada (159). L'efecte de l'inhibidor pot ser poderós en teixits que, com el cardíac, en contenen una quantitat elevada. El contingut és alt també al cervell i al múscul esquelètic, però és baix al fetge i al ronyó (176, 177). Aquestes dades menen a la conclusió que "in vivo", una bona part de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic que es troba dissociada, pot estar perfectament bloquejada pel seu inhibidor proteic en condicions basals.

1.3.4.3. Efecte de l'autofosforilació de la forma II.

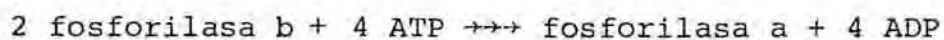
La importància fisiològica de l'autofosforilació de la forma II de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic resta encara lluny de ser determinada.

Hi ha acord general sobre el fet que l'autofosforilació facilita la dissociació de l'holoenzim "in vitro" (130, 131) augmentant l'afinitat per l'AMP cíclic (123). D'altra banda s'ha demostrat (179, 180) que l'autofosforilació retarda, també "in vitro", la reassociació de llurs subunitats.

La possibilitat que l'autofosforilació sigui controlable "in vivo" per hormones, compta amb certs resultats experimentals que la recolzen (181). Si aquesta possibilitat fós certa, caldria aclarir quina activitat fosfoproteïna fosfatada reverteix la fosforilació (133) i si la introducció de fosfat a la molècula d'enzim es realitza sobre els mateixos punts que "in vitro".

1.4. FOSFORILASA QUINASA

La fosforilasa quinasa catalitza la reacció (182)



La reacció és irreversible, incorporant-se 4 mols de fosfat per mol de fosforilada a muscular (183). La màxima activitat de la fosforilasa, però, és observable quan solament han estat incorporats 2 mols de fosfat per mol de fosforilasa a. S'ha comprovat (184) que el procés de la fosforilació es produeix per passos, amb la producció de formes intermèdies parcialment fosforilades (185).

La fosforilasa quinasa també pot catalitzar "in vitro" la pròpia fosforilació (secció 1.4.2.2.) i la de la caseïna, aquesta a molt baixa velocitat. La glicogen sintasa ha estat descrita com a no fosforilable per aquest enzim (186). La fosforilasa quinasa muscular catalitza la fosforilació i activació de la fosforilasa b hepàtica (187).

La fosforilada quinasa de múscul esquelètic ha estat purificada fins a homogeneïtat i caracteritzada amb molt de detall. Comparativament, en canvi, hom sap molt poca cosa referent a la fosforilasa quinasa d'altres teixits.

1.4.1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA FOSFORILASA QUINASA DE TEIXIT MUSCULAR

Mitjançant electroforesi en gels de poliacrilamida amb SDS (sodi dodecil sulfat) (185) la fosforilasa quinasa de múscul es resol en quatre components anomenats α , α' , β i γ amb els pesos moleculars de 145.000, 140.000, 128.000 i 45.000 deltons respectivament (185). Es creu que aquests quatre components provenen de dos isoenzims amb les estructures $(\alpha, \beta, \gamma)_4$ i $(\alpha', \beta, \gamma)_4$ respectivament (185, 188, 189). Ambdós isoenzims, anomenats w i r respectivament (189), tenen un pes molecular a la vora de 1.300.000 (185, 189).

A la massa muscular completa del conill l'isoenzim w és el més abundant (80-90%) i músculs com el psoas major de fibra blanca el contenen en un 95-98% (190). Altres músculs de conill amb fibra roja, com el soleus i el cardíac, solament contenen isoenzim r (189, 190). Gairebé tots els detalls sobre les propietats de la fosforilasa quinasa es refereixen a l'enzim preparat a partir de la musculatura total del conill, que és essencialment isoenzim w.

1.4.2. REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LA FOSFORILASA QUINASA MUSCULAR.

Com molts altres enzims del metabolisme del glicogen, la fosforilasa quinasa de múscul esquelètic es presenta en dues formes, una fisiològicament activa, forma a, i una altra inactiva o forma b, que poden ser distingides l'una

de l'altra "in vitro" per l'activitat que presenten a pH 6,8 (pH fisiològic). En presència de Ca^{2+} i de concentracions òptimes de Mg-ATP, la forma b presenta molt poca activitat a pH 6,8 en comparació amb la que presenta a pH 8,2 (185, 191, 110). La relació de l'activitat a pH 6,8 respecte la de pH 8,2 és de 0,01 a 0,02. La forma a presenta en canvi una relació d'activitats de 0,30-0,40, essent de 50 a 100 vegades més activa que la forma b (185).

El pas de la forma b a formes actives pot assolir-se "in vitro" per tres mecanismes: per fosforilació catalitzada per proteïna quinases, per autofosforilació i per proteolisi limitada.

1.4.2.1. Fosforilació per proteïna quinases

Mitjançant la fosforilació per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, la forma b de la fosforilasa quinasa passa a forma a activa (110, 192, 193). La incubació de la forma b "in vitro" amb aquesta proteïna quinasa, en presència de MgATP i d'AMP cíclic, provoca la fosforilació tant de les subunitats α com de les β , mentre que les γ no es fosforilen en aquestes condicions. (185, 194). La reacció es completa quan s'arriben a introduir dos mols de fosfat per mol de complex $\alpha \beta \gamma$ (185). Dels dos fosfat introduïts, un està situat sobre la subunitat α i l'altra sobre la β (185, 194).

L'especificitat de la fosforilació de la fosforilasa quinasa per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic ha estat confirmada per aïllament i seqüenciació dels fragments fosforilats de cada subunitat (147).

Les subunitats β es fosforilen primerament (185, 194) i el fenomen va acompanyat per l'increment de l'activitat de l'enzim. La fosforilació de la subunitat α no incrementa l'activitat de l'enzim (185, 194) però sembla que modifica la velocitat de la desfosforilació de la subunitat β causada per la fosforilasa quinasa fosfatasa (195). Quan el contingut de fosfat és d'un mol per mol de conjunt ($\alpha\beta\gamma$) les subunitats β contenen el 75% del fosfat. La velocitat de fosforilació en aquest cas és 50 a 100 vegades més baixa que quan s'introdueixen 2 fosfats per conjunt ($\alpha\beta\gamma$), un sobre la subunitat α i l'altre sobre la β (195). La inactivació de l'enzim segueix estretament la desfosforilació de les subunitats β fins al punt que quan aquestes ja no contenen fosfat i les α encara retenen la major part del que posseïen inicialment, l'enzim presenta una relació d'activitats a pH 6,8/8,2 similar a la de la fosforilasa quinasa b totalment desfosforilada (195).

Cohen considera que la fosforilació de la subunitat α altera la conformació de la fosforilasa quinasa de tal manera que la desfosforilació de la subunitat β és facilitada (195). Aquest fenomen probablement és cooperatiu car necessita, segons que sembla, que es fosforilin almenys dues de les quatre subunitats α del complex ($\alpha \beta \gamma$)₄ (188, 195), de la mateixa manera que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic necessitava fosforilar les dues subunitats β abans de començar a fosforilar de forma efectiva les subunitats α (185, 194). La qüestió de si tots aquests fenòmens es produeixen "in vivo" encara és una incògnita.

Recentment ha estat descrita (196) l'activació de la fosforilasa quinasa de múscul de conill per fosforilació de les subunitats α i β a càrrec d'una proteïna quinasa independent d'AMP cíclic i activable per Ca^{2+} , isolada del teixit

cerebral de rata (197). Aquesta proteïna quinasa, que no guarda relació amb cap de les formes de la dependent d'AMP cíclic, prové d'una espècie proenzimàtica de la qual en deriva per acció d'una proteasa dependent de Ca^{2+} que es troba al mateix teixit (197).

1.4.2.2. Autofosforilació de la fosforilasa quinasa.

L'activació de la fosforilasa quinasa també es produeix "in vitro" per autofosforilació en presència de MgATP i de Ca^{2+} (110, 185, 192-194). S'ha observat (198) que en certes condicions es pot produir la incorporació de set a nou molècules de fosfat per grup ($\alpha\beta\gamma$), assolint-se una activitat enzimàtica doble de la que manifesta quan actua la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Tots els fosfats són incorporats sobre les subunitats α i β , restant infofosforilades les γ .

1.4.2.3. Activació per la proteïna quinasa dependent del modulador.

Ha estat descrita recentment (87) una proteïna quinasas de múscul esquelètic de conill que, de manera similar a la fosfodiesterasa dependent de Ca^{2+} (75-77), a l'adenil ciclasa de cervell (44, 45) i a la $(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+})$ -ATPasa de membrana eritrocitària (85, 86), és activable pel modulador proteic dependent de Ca^{2+} .

Aquesta quinasa independent d'AMP cíclic, és capaç de fosforilar la fosforilasa quinasa (87) i produir la seva activació. Tal fet suggereix que aquesta nova proteïna quinasa pot mediar efectes del Ca^{2+} en el procés d'activació de la fosforilasa derivat de l'estímul neuronal de la contracció muscular, coordinant així la regulació de la glicogenolisi i de la contracció.

1.4.2.4. Activació de la fosforilasa quinasa per proteolisi limitada.

La proteolisi parcial de la fosforilasa quinasa, que causa la seva activació, pot ser catalitzada per una activitat proteinasa de múscul, el "factor activador de la quinasa", que és dependent de Ca^{2+} , i també per proteinases com la tripsina (199-201). La tripsina produeix una forma anomenada a' que té una relació d'activitats a pH 6,8/ 8,2 de 0,67 (185).

1.4.2.5. Regulació al·lostèrica per calci.

Totes les formes de la fosforilasa quinasa muscular (a, b, i a'') necessiten forçosament Ca^{2+} per llur actuació (199, 200, 191, 202). Aquest efecte és independent de l'activació per proteases dependents de Ca^{2+} (201) i consisteix en un increment notable (13 vegades més) de l'afinitat de l'enzim pel substrat (202). L'activació de la fosforilasa quinasa "in vitro" pot ser bloquejada mitjançant l'addició de fragments de

retícul sarcoplasmàtic. Aquest afecte pot ser revertit per l'addició de Ca^{2+} (191). Així, el segrestant natural de Ca^{2+} al múscul pot competir satisfactòriament amb la fosforilasa quinasa per aquest ion, la qual cosa suggereix que "in vivo" l'activació de l'enzim per Ca^{2+} és reversible (9).

1.4.2.6. Desfosforilació de la fosforilasa quinasa.

La reversió de la fosforilació de la fosforilasa quinasa és realitzada per activitats fosfoproteïna fosfatases. Ha estat indicat (203) que les subunitats α i β de la fosforilada quinasa són desfosforilades per dos enzims diferents, les α i β fosforilasa quinasa fosfatases respectivament (veure secció 1.8.1.). L'activitat β fosforilasa quinasa fosfatasa és la que de fet catalitza el pas de la forma a a la forma b de l'enzim, inactivant-lo (203) i coincideix amb altres activitats fosfatasa (secció 1.8.1.). La α -fosforilasa quinasa fosfatasa té un significat fisiològic poc conegut encara (203).

1.4.2.7. Regulació de l'activitat de la fosforilasa quinasa "in vivo".

La fosforilació de la fosforilasa quinasa per la proteïna quinasa "in vivo", acompanyada per l'activació de l'enzim, ha estat demostrada per injecció d'epinefrina a animals tractats previament amb $(^{32}\text{P})\text{ATP}$ (153). La fosforilació es feia observable per la incorporació de ^{32}P als fragments peptídics

de la fosforilasa quinasa que contenen el centre fosforilable per proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (147). La fosforilació es revertia totalment "in vitro" si el fluorur sòdic que actua com inhibidor de l'activitat fosfoproteïna fosfatasa era llevat del medi.

Com que l'autofosforilació de la fosforilasa quinas probablement introdueix fosfats en centres diferents dels fosforilables per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (198) cal pensar que l'autofosforilació no jugava un paper significatiu en aquests experiments "in vivo" (147).

1.4.3. FOSFORILASA QUINASA HEPÀTICA.

Les dades conegudes fins ara sobre la fosforilasa quinasa hepàtica són molt més escases que les conegudes sobre l'enzim del múscul esquelètic. No hi ha, per exemple, cap indicació sobre la subestructura molecular de l'enzim.

Del fet que l'activitat fosforilasa quinasa present als extractes crus de fetge s'inactivi a pH 7,4 en el transcurs del temps i sigui reactivable en afegir-hi MgATP (204) es pot deduir que existeix en dues formes, una no fosforilada i molt poc activa al pH fisiològic del fetge i l'altra fosforilada i activa a aquest pH (204). El pas de la forma inactiva a l'activa està catalitzat per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic car és bloquejat per l'inhibidor proteic d'aquesta quinasa (204). La inactivació espontània "in vitro" és protagonitzada presumiblement per una fosfatasa inactivable de manera parcial per fluorur sòdic (204).

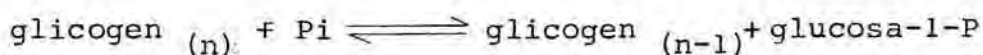
Ambdues formes de la fosforilasa hepàtica necessiten estar en presència de concentracions micromolars de Ca^{2+} per a mostrar llur activitat (204-207). El perfil de dependència del pH per a la forma fosforilada és molt similar (204) al de la corresponent forma de l'enzim muscular (110). El de la forma no fosforilada, en canvi, és totalment diferent de la fosforilasa quinasa b de múscul. El pH òptim de la forma no fosforilada de fetge és 6,0 (204), mentre que la corresponent forma muscular és molt més activa a pH per damunt de 8,0 (110). Al pH fisiològic del fetge (7,4) la forma fosforilada és de 5 a 10 vegades més activa que la no fosforilada.

Com en el cas de l'enzim muscular, la fosforilasa quinasa de fetge pot ser activada per proteolisi parcial causada per tripsina (207).

"In vivo" l'activació de la fosforilasa quinasa hepàtica ha estat observada tant després del tractament amb agents com el glucagó (205, 207, 208) que presumiblement actuen via la fosforilació per proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, com amb agents com la fenilefrina (207) que sembla que actuen incrementant els nivells citosòlics del Ca^{2+} (207, 209-211), estimulador de l'enzim.

1.5. GLICOGEN FOSFORILASA.

La glicogen fosforilasa, o simplement fosforilasa, catalitza la següent reacció:



essent n el nombre de residus glucosílics presents a la molècula de polisacàrid. Malgrat que la reacció és reversible "in vitro", "in vivo" transcorre gairebé enterament en el sentit de la glicogenolisi.

Els estudis sobre les característiques d'aquesta proteïna enzimàtica han estat facilitats pel fet que l'enzim del teixit muscular pot ser obtingut en forma cristal·lina sense grans dificultats. Els coneixements sobre l'enzim procedent d'altres teixits és més limitat que el muscular.

1.5.1. ESTRUCTURA I PROPIETATS DE LA FOSFORILASA DE MÚSCUL ESQUELÈTIC.

La fosforilasa de múscul de conill existeix en dues

formes moleculars (212, 213): la fosforilasa b que és un dímer de pes molecular 200.000 essencialment inactiu en absència d'AMP, i la fosforilasa a, un tetràmer de 400.000 daltons, fosforilada i activa en absència d'efectors.

La conversió de la forma b en a es produeix per fosforilació de l'enzim catalitzada per la fosforilada quinasa (181). La fosforilasa a pot passar a b per acció de la fosforilasa fosfatasa (213-217).

Ambdues formes poden ser dissociades en subunitats monomèriques per tractament amb reactius sulfhidríllics (218-220).

1.5.1.1. Els centres reguladors de l'activitat de l'enzim.

El paper de la fosforilasa com a enzim regulador és ben evident a la vista de la multiplicitat de centres funcionals presents a les subunitats que la constitueixen, essent cadascun d'ells responsable d'algun aspecte de l'activitat de l'enzim o del seu control. Els centres principals són: 1) el catalític, 2) el d'unió a l'activador allostèric AMP, 3) el fosforilable, 4) el que fixa piridoxal fosfat i 5) almenys dos centres d'agregació entre les subunitats per donar les formes dimèriques i tetramèriques respectivament.

El centre catalític o actiu fixa els tres components, glicogen, fosfat inorgànic i glucosa-1 fosfat, de la reacció catalitzada per la fosforilasa i, a més, alguns inhibidors com la glucosa, la gluconolactona o la UDP-glucosa.

El centre que fixa el nucleòtid AMP és el centre de control al·lostèric. L'AMP, que és essencial per l'activitat de la fosforilasa b, muscular es combina amb l'enzim a raó d'una molècula per subunitat de fosforilasa induïnt un canvi conformacional que aparentment redueix la K_m pel glicogen, el fosfat i la glucosa 1-fosfat (221, 222).

La fosforilació d'un sol residu de serina per la fosforilasa quinasa converteix la fosforilasa b en a (181). Totes les formes de fosforilasa estudiades des del punt de vista de la fosforilació, siguin musculars o hepàtiques, presenten seqüències d'aminoàcids molt similars en els corresponents centres fosforilables (223-227) i tenen el residu de serina que fixa fosfat entre dos aminoàcids hidrofòbics situats a la vora d'aminoàcids amb residus de caràcter bàsic; de fet, a aquest centres es troben en una regió de la cadena peptídica de l'enzim marcadament bàsica (228). El centre fosforilable té versemblantment una situació bastant cap a l'exterior de l'estructura de la molècula, car és fàcilment atacable per enzims proteolítics com per exemple la tripsina (224, 229) que dona una forma dímera de la fosforilasa, forma b', que encara és activable per AMP.

La fosforilasa muscular és totalment dependent de piridoxal 5'-fosfat per a ser activa (230). Cada subunitat de fosforilasa, tant de la forma a com de la b, conté una molècula del cofactor fermament fixada a l'estructura proteica (231).

1.5.1.2. Propietats enzimàtiques

L'equilibri de la reacció catalitzada per la fosfori

lasa s'assoleix quan la relació fosfat/glucosa 1-fosfat, a pH 6,8, és igual a 3,6 (232, 233). Malgrat que existeix la possibilitat de síntesi de glicogen per la fosforilasa "in vitro", sembla segur que sota condicions fisiològiques la reacció funciona gairebé enterament en el sentit de la glicogenolisi com ho prova el fet que l'administració d'agents com l'e pinefrina, que activen a la fosforilasa "in vivo", produeix sempre un estímul de la degradació del glicogen (234) i mai de la síntesi.

Han estat trobats molts compostos amb capacitat per afectar l'activitat de la fosforilasa. Ho fan a través del centre al qual s'uneixen, però sovint també per interacció amb els efectes promoguts per l'estimulació d'altres centres de l'enzim (228). Per exemple, l'afinitat de la fosforilasa b per l'AMP és incrementada unes 100 vegades quan augmenta la concentració dels substrats i, inversament, la fixació d'AMP incrementa considerablement l'afinitat de l'enzim per aquells (220, 235, 236).

Cal entendre, doncs, que la regulació al·lostèrica de l'enzim no dependrà únicament de la concentració d'AMP, sino que també estarà afectada en gran part per la concentració particular de cada substrat, de les d'efectors, especialment l'ATP i la glucosa 6-fosfat que es comporten com inhibidors al·lostèrics (237, 238), i de la de certs cations divalents (228).

La glucosa, que ha estat descrita com a modulador de l'activitat de l'enzim, sobre la forma a del qual exerceix un efecte inhibitori clar "in vitro" (221, 232), també ha estat presentada com a estimuladora de la conversió de la forma a en la b catalitzada per la fosforilasa fosfatasa (239) i en

la b' per tripsina (240).

Ara bé, l'operativitat del control al·lostèric en condicions fisiològiques per alguns dels efectors esmentats és discutible. L'activació de la forma b per AMP no sembla factible en la majoria de les situacions metabòliques del múscul esquelètic "in vivo" (241, 242). Els efectes de la glucosa tampoc semblen tenir un valor fisiològic al múscul, car aquest teixit conté molt poca glucosa lliure en condicions normals (243).

1.5.2. INTERCONVERSIÓ ENTRE LES FORMES DE LA FOSFORILASA MUSCULAR.

Tal com ja hem esmentat (seccions 1.4. i 1.5.1.), la conversió de la fosforilasa b en a està catalitzada per la fosforilasa quinas (181) en una reacció irreversible de transferència de fòsfat del MgATP al residu de serina específicament fosforilable de cada subunitat. "In vitro" es poden incorporar fins 4 mols de fòsfat per mol de fosforilasa a (tetramèrica) (183) però la màxima activitat enzimàtica és as solida quan solament han estat incorporats 2 mols de fòsfat. El procés es realitza per passos, amb l'aparició de formes parcialment fosforilades (185).

La reacció de desfosforilació està catalitzada per la fosforilasa a fosfatasa (213-217). Amb la purificació i estudi de fosfoproteïna fosfatases de múscul s'ha trobat que l'activitat fosforilasa a fosfatasa podria estar catalitzada per un enzim responsable igualment de l'activitat glicogen

sintasa fosfatasa (244) o de la glicogen sintasa fosfatasa i de la fosforilasa quinasa a fosfatasa alhora (245,246).

Recentment ha estat descrit un efecte inhibitori de l'acció fosforilasa produït per la subunitat reguladora de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic quan es troba dissociada (247). Aquesta observació, que de moment constitueix un fet aïllat, necessita posterior atenció.

1.5.3. FOSFORILASA DE TEIXIT HEPÀTIC

Tal com succeeix amb altres enzims del metabolisme del glicogen, el nivell de coneixements que hi ha sobre les formes hepàtiques de la fosforilasa és més escàs que el que hi ha sobre les formes del múscul esquelètic.

La fosforilasa hepàtica té diferències notables respecte la muscular. Es presenta en una forma inactiva b que passa a una altra activa a per fosforilació (248) però sense que el fenomen cursi amb l'agregació de subunitats. La forma inactiva de l'enzim és molt poc estimulable per AMP mentre que l'activitat de la forma a és augmentada un 40% pel nucleòtid (248).

L'activitat fosforilasa a fosfatasa hepàtica és protagonitzada per fosfoproteïna fosfatases que tal vegada també actuen sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa quinasa a (249, 250). També ha estat descrita la conversió de la fosforilasa a hepàtica en una forma b' per la tripsina (226).

El pes molecular de la fosforilasa hepàtica de conill (185.000) és inferior al de l'enzim del múscul esquelètic del mateix animal (200.000) (226). En canvi, la seqüència d'aminoàcids del centre fosforilable presenta les mateixes característiques en ambdós casos (226).

Ha estat demostrada la inactivació de la fosforilasa hepàtica per addició de glucosa als extractes (251). La glucosa també té un efecte inhibitori sobre la fosforilasa a, almenys "in vitro", en provocar la disminució de l'afinitat pels seus substrats (252) i també estimulant el pas de la forma a a la b o a la b' per acció de la fosfatasa específica (252, 253) o de la tripsina (254) respectivament. L'AMP, malgrat que estimula poc la fosforilasa b hepàtica, contrarresta aquets efectes de la glucosa (252).

1.6. GLICOGEN SINTASA QUINASES INDEPENDENTS D'AMP CÍCLIC

La introducció de fosfat a la molècula de glicogen - sintasa, enzim regulable per fosforilació (veure secció 1.7.), pot ésser catalitzada per proteïna quinases independents d'AMP cíclic. Aquest fet ha estat posat de manifest en els darrers anys per la identificació, purificació i caracterització de glicogen sintasa quinases independents del nucleòtid i procedents principalment d'extractes de múscul esquelètic de conill (15,17).

En un estudi recent (14) ha estat demostrat que les proteïna quinases independents d'AMP cíclic poden catalitzar la major part de l'activitat glicogen sintasa quinasa a molts teixits. Utilitzant l'inhibidor proteic de les proteïna quinases dependents d'AMP cíclic ha estat calculat (14) que a la rata el 97% de l'activitat glicogen sintasa del ronyó, el 91% de la de fetge, el 87% de la de cervell, el 85% de la de cor i el 38% i el 33%, respectivament, de les del teixit adipós i del múscul esquèlic són independents d'AMP cíclic. L'àmplia distribució i l'elevada concentració d'aquest tipus d'enzims als teixits fan pensar que juguen un paper fisiològic important i que formen part de sistemes de control de la glicogenolisi independents de l'AMP cíclic.

Nimmo i Cohen (15) han caracteritzat la primera glicogen sinta

sa quinasa independent d'AMP cíclic, la glicogen sintasa quinasa-2, que està localitzada de forma relativament específica al complex glicogen-proteïna de les cèl.lules de múscul de conill. L'enzim catalitza, segons aquests autors, la fosforilació de la glicogen sintasa i, en menor escala, la de la fosvitina (255). Es inactiva del tot amb la fosforilasa b, la fosforilasa quinasa b o les histones (255). L'activitat de l'enzim no és afectada per AMP cíclic ni per GMP cíclic, ni tampoc per calci, per EGTA, per glucosa 6-fosfat o per glicogen (15).

Huang i col.laboradors (16) han purificat a partir del múscul esquelètic de conill una glicogen sintasa quinasa amb marcada activitat fosvitina quinasa i que probablement és el mateix enzim que el trobat per Nimmo i Cohen (15). Aquesta quinasa no és capaç de transformar totalment la forma I de la glicogen sintasa en forma D (16, 255). La quantitat de fosfat introduït per cada una de dues glicogen sintasa quinases descrites és d'un mol per mol de subunitat de glicogen sintasa (255,- 258).

Quan la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic actua conjuntament amb cadascuna d'elles, són introduïts dos fosfats per subunitat de sintasa (255) o tres (256 - 258) segons quines siguin les condicions d'assaig utilitzades.

Una glicogen sintasa quinasa independent d'AMP cíclic, amb activitat fosvitina quinasa i amb capacitat per rendir formes de glicogen sintasa totalment dependents de glucosa 6-fosfat, ha estat caracteritzada a partir d'extractes de múscul esquelètic de conill per Itarte i col.laboradors (17). Aquesta nova quinasa pot introduir fins a quatre molècules de fosfat per subunitat de glicogen sintasa, essent les dues primeres les que determinen la qualitat de dependència de gluco-

sa 6-fosfat al substrat. L'actuació combinada amb la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, enzim que és capaç de fixar dues molècules de fosfat a cada subunitat en les condicions d'assaig d'aquests autors, produeix el mateix grau de fosforilació que quan la glicogen sintasa quinasa actua sola (17). Tot i no existir molta evidència directa que els fosfats introduïts per cadascuna d'aquestes quinasas vagin a parar a centres fosforilables específics i diferents entre sí, el cert és que l'efecte de la introducció d'una quantitat determinada de fosfat per subunitat de glicogen sintasa depèn de quin hagi estat l'enzim fosforilant (17). Efectivament, l'increment de la dependència respecte de la glucosa 6-fosfat que produeix la fixació de dos fosfats sobre la glicogen sintasa és dues vegades més gran si el procés ha estat catalitzat per la glicogen sintasa quinasa que si ho ha estat per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (17).

L'avenç dels estudis sobre glicogen sintasa quinasas ha d'aclarir una sèrie important de qüestions referents tant a la natura dels processos de fosforilació de la glicogen sintasa com als mecanismes de control hormonal que són mediatitzats per aquests enzims.

1.7. GLICOGEN SINTASA

La glicogen sintasa catalitza la formació d'enllaços α -1-4 glucosílics entre l'extrem de les branques de la molècula de glicogen i les unitats de glucosa que contribueixen a allargarles, i utilitza com a donador d'unitats glucosíliques la UDP-glucosa. El descobriment de l'enzim (259) va representar la crisi del concepte segons el qual la fosforilasa era responsable tant de la síntesi com de la degradació del glicogen en condicions fisiològiques.

La reacció catalitzada per la glicogen sintasa constitueix la clau del control de la biosíntesi del polímer mercé a les característiques especials de l'enzim. La regulació de la seva activitat es basa en el fet que es presenta en formes cinèticament distintes i convertibles unes en les altres per processos de fosforilació i desfosforilació.

1.7.1. ESTRUCTURA I PROPIETATS DE LA GLICOGEN SINTASA

L'enzim ha estat purificat en diversos graus a partir de nombrosos teixits. El pes molecular de les subunitats

de glicogen sintasa, determinat per electroforesi en gels de poliacrilamida-dodecil sulfat sòdic, oscil·la entre 77.000 i 100.000 segons el teixit d'origen (255, 260-271) essent els valors compresos entre 85.000 i 90.000 els que predominen més. La forma nativa de la glicogen sintasa està constituïda per agregació d'un cert nombre de subunitats. Tot i que hi ha la possibilitat de formació d'agregats inespecífics derivats de la manipulació "in vitro" de l'enzim (271), sembla cert que en condicions fisiològiques la forma fosforilada de l'enzim es pot presentar en trímers (269, 271) i tetràmers (269) al múscul esquelètic de conill, i en trímers i hexàmers al fetge de rata (260). La forma no fosforilada de la glicogen sintasa es presenta en tetràmers (255, 261, 268-270), dímers (261, 269) i possiblement hexàmers (261) i octàmers (255). El significat exacte d'aquestes diferències en l'estat d'agregació és, per ara, desconegut.

El descobriment de l'existència de formes de l'enzim cinèticament diferents (3) derivà d'estudis preliminars sobre l'efecte del tractament del múscul esquelètic amb insulina (272). Poc temps després la glicogen sintasa va ser aïllada en dues formes que presentaven diferències quant a la cinètica i al contingut de fosfat unit covalentment (4), essent establert el concepte de l'existència d'una forma fosforilada que va ser anomenada glicogen sintasa D (dependent) per ser molt poc activa en absència de l'efector al·lostèric glucosa 6-fosfat, i d'una altra, la glicogen sintasa I (independent), activa àdhuc en absència de glucosa 6-fosfat i que no contenia pràcticament gens de fosfat. La forma D es considerà fisiològicament inactiva, mentre que la I seria l'activa "in vivo" (273). La forma D era, a més, altament susceptible a la inhibició per nucleòtids d'adenina i per fosfat.

Sovint la glicogen sintasa és caracteritzada per la relació entre les activitats mesurades en absència i en presència d'una concentració elevada de glucosa 6-fosfat. Aquesta relació, expressada en forma de percentatge, es coneix com "percentatge de forma I". Ara, bé, arran del descobriment de la possibilitat de fosforilació múltiple de l'enzim hom considera actualment que els termes "forma I" i "forma D" de la glicogen sintasa són atorgables únicament a formes teòriques extremes de desfosforilació i fosforilació respectivament. Entre ambdues situacions hi ha cabuda per a nombroses possibilitats de fosforilació parcial de la glicogen sintasa. Tenint en compte aquestes consideracions, i tal com han emfatitzat recentment Roach i Larner (274), el percentatge d'activitat I no ha de ser pres com una mesura de la fracció molar de forma I. Malgrat tot, la caracterització de l'enzim mitjançant aquest paràmetre encara és molt útil perquè hi ha una correlació entre aquest i el grau de fosforilació.

1.7.2. REGULACIÓ AL·LOSTÈRICA DE LA GLICOGEN SINTASA

Pel seu efecte activador sobre qualsevol de les formes de la glicogen sintasa, així com per l'acció contrarrestadora de la inhibició produïda sobre l'enzim per altres metabòlits, la glucosa 6-fosfat es pot considerar l'efector al·lostèric més important de la glicogen sintasa a la majoria dels teixits estudiats (com a revisió vegis les referències 170, 275). Generalment hom considera que tant en el cas de l'enzim del múscul com en el del fetge, l'efecte de la glucosa 6-fosfat consisteix a augmentar l'afinitat de la forma I per la UDP glucosa i, possiblement a incrementar la V_{max} de la forma D augmentant

paral·lelament l'afinitat per la UDP-glucosa (263). Si aquests són els fets certs, l'expressió de l'activitat I indicaria més aviat l'estat d'afinitat pel substrat que no pas l'estat d'activació de l'enzim, segons que fan notar Roach i Lerner (276). Amb tot, cal esperar més dades sobre la cinètica de l'enzim a partir de les seves formes purificadas abans d'arribar a conclusions definitives pel que fa a la natura dels efectes de la glucosa 6-fosfat.

Els nucleòtids, especialment els d'adenina i els d'uridina, així com la creatina-fosfat, són inhibidors tant de les formes fosforilades com de les altres de la glicogen sintasa (277-279). Aquests efectes, amb la possible excepció del causat per l'uridina difosfat, són contrarrestats per la glucosa 6-fosfat, especialment sobre la glicogen sintasa D.

El ion magnesi té un efecte activador clar (3, 251, 280, 281, 111). El manganés té un efecte estimulante sobre la forma D que pot resultar operatiu "in vivo" (282). L'anion -sulfat també es comporta com a activador, especialment de la forma D de l'enzim (283-285) incrementant-ne la V_{max} en presència de glucosa 6-fosfat, efecte amb implicacions fisiològiques desconegudes. L'acció del ion fosfat depèn de les condicions de reacció i de l'estat de fosforilació de l'enzim. Pot actuar tant com a activador (286, 287, 265) que com a inhibidor (265, 280, 288, 289).

1.7.3. INTERCONVERSIÓ DE LES FORMES I i D.

Malgrat que alguns metabolits presents al citoplasma afecten, almenys "in vitro", l'activitat de la glicogen sintasa, la condició més marcadament definitoria de l'estat actiu de l'enzim és el grau de fosforilació que presenta i que és determinant tant de la seva activitat intrínstica com de la susceptibilitat d'aquesta per ser modificada per efectors específics. Qualsevol canvi del grau de fosforilació o, si es vol per fer més ampli el concepte, del grau de "dependència" de glucosa 6-fosfat, mena l'enzim des d'unes formes a d'altres amb activitat diferent. Aquesta conversió, que en condicions fisiològiques està operada per passos específics de fosforilació i desfosforilació, és el fenomen que possibilita bàsicament el control de la velocitat de la reacció catalitzada.

1.7.3.1. Fosforilació covalent.

La primera descripció de la interconversió de formes de la glicogen sintasa per fosforilació covalent al treball de Friedman i Lerner (4) data de fa quinze anys. La introducció de fosfat a la molècula d'enzim provocava la pèrdua d'activitat quan aquesta es mesurava en absència de glucosa 6-fosfat: es produïa la conversió de I a D. D'aleshores ençà, i a la vista de la possibilitat que la fosforilació fos múltiple, és a dir, que s'incorporés més d'un fosfat per subunitat de glicogen sintasa, l'interès d'una bona colla de grups de treball s'ha centrat en l'estudi de l'estequiometria total de la reacció de fosforilació i a discernir quines i quantes són les molècules de fosfat introduïdes per ca

dascuna de les proteïna quinases dependents d'AMP cíclic i glicogen sintasa quinases que han anat essent descrites durant els darrers anys. La determinació dels centres específicament fosforilables per cada quinasa, la transcendència que cada un dels fosfats introduïts té en la modificació de les qualitats de l'enzim, i la funció fisiològica de cada estat de fosforilació, són altres fites cobejadíssimes per a l'avenç del coneixement del sistema glicogen sintasa.

Al treball original de Friedman i Larner (4) l'anàlisi de la incorporació de fosfat radiactiu a la glicogen sintasa purificada a partir de teixit muscular donà un valor de 5 fosfats per subunitat de 85.000 daltons. Al mateix laboratori, analitzant el contingut en fosfat labilitzable per acció d'àlcali, s'ha obtingut el valor de 6 fosfats per subunitat de glicogen sintasa (290). Aquests valors són els més alts trobats per a l'enzim de múscul i fóren observats després d'incubacions molt prolongades a 4°C amb concentracions elevades de MgATP i AMP cíclic les quals rendien productes finals amb activitat glicogen sintasa essencialment nul·la en absència de glucosa 6-fosfat. Amb gran probabilitat eren el resultat de l'acció combinada de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i de glicogen sintasa quinases, desdonegudes encara aleshores, que acompanyaven a aquella en les seves preparacions parcialment purificades. Recentment, aquest grup ha obtingut, en unes condicions de treball diferents, nou preparacions de glicogen sintasa amb continguts de fosfat creixents, essent el valor de 3,5 el més elevat (291, 292).

D'altra banda, utilitzant enzims purificats, Soderling i col.laboradors (268, 293) observaren que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic només introduïa un fosfat per subunitat de glicogen sintasa produïnt un descens simulta-

ni de 0,6 a la relació entre les activitats mesurades en absència i presència de glucosa 6-fosfat (268, 293). El mateix Soderling va observar, però, que utilitzant una concentració de proteïna quinasa molt més elevada es produïa la introducció d'un altre fosfat amb una velocitat notablement inferior a la d'introducció del primer (293). El segon fosfat addicionat menava la relació d'activitats de 0,25 a 0,05. I encara, si la incubació es perllongava algunes hores en presència d'altres concentracions de MgATP, el nombre de fosfats lligats per subunitat de glicogen sintasa era de 5. Ara bé, considerant que qualsevol activitat glicogen sintasa que impurifiqués les preparacions de proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic podria posarse de manifest quan eren utilitzades en concentració elevada, cal pensar que una part substancial dels fosfats introduïts addicionalment en aquestes condicions podia no ser atribuïble a la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Amb glicogen sintasa també de múscul de conill, Nimmo i Cohen (255) obtingueren una incorporació de dos mols de fosfat per subunitat de glicogen sintasa mitjançant l'acció combinada de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i de la glicogen sintasa quinasa-2 per ells descrita (15). Segons aquests autors, cada quinasa introduïa un fosfat i el descens en la relació d'activitats mesurades en absència i en presència de glucosa 6-fosfat era de 0,80 a 0,18 si actuava la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic o de 0,80 a 0,08 si ho feia l'altra, i a 0,01 quan actuaven plegades.

La glicogen sintasa quinasa obtinguda per Huang i col.laboradors (16), probablement la mateixa que la descrita per Nimmo i Cohen (255), també introdueix un sol fosfat per subunitat de glicogen sintasa. En les condicions de treball

d'aquests autors, però, la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic pot introduir dos fosfats en comptes d'un (16, 256). Altres grups de treball han obtingut uns resultats similars (257, 258) amb incorporacions màximes de 3 mols de fosfat quan els dos tipus de quinases actuaven alhora (258).

La glicogen sintasa quinasa descoberta i purificada recentment per Itarte i col.laboradors (17) és capaç d'incorporar per sí sola 4 mols de fosfat per mol de subunitat de glicogen sintasa, conduint-la vers la inactivació total en u nes condicions experimentals en les que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic produeix un descens en la relació d'activitats fins a 0,40 després d'una incorporació màxima de 2 mols de fosfat per mol d'enzim (17).

A la glicogen sintasa procedent d'altres teixits també s'han observat fosforilacions múltiples que transformen formes de l'enzim "independents" en formes més o menys "dependents" (260, 261, 294).

"In vitro", les condicions experimentals de la fosforilació de la glicogen sintasa de múscul esquelètic de conill, que és la més estudiada, són especialment decissives i cal que es tinguin en consideració a l'hora de discutir la disparitat existent entre les observacions sobre l'estequiometria del procés, tant pel que fa a la màxima quantitat de fosfat introduïda com al nombre mínim de fosfats que determinen la transformació total de la forma I en la D. Roach i Larner (276) afirmen que tant l'estequiometria com la cinètica de la fosforilació de la glicogen sintasa semblen principalment dependents del mètode i de l'estat de purificació de la glicogen sintasa utilitzada, de la quantitat i qualitat de proteïna quinasa que catalitza el procés, així com de la temp

peratura i de la concentració de MgATP present al medi d'incubació.

Lluny encara de conclusions definitives sobre el tema, les dades descrites sostenen, si més no, les idees originals sobre la fosforilació covalent múltiple com a mecanisme convertidor de les formes més actives de la glicogen sintasa en les fisiològicament inoperants.

1.7.3.2. Proteolisi limitada

Un mecanisme que transforma la glicogen sintasa I en una forma similar a la dependent de glucosa 6-fosfat és la proteolisi limitada promocionada per tripsina o per un factor proteic dependent de calci (303, 296). L'interés que estimula l'estudi de les característiques que acompanyen aquest procés i les qualitats dels productes resultants rau no pas a les implicacions fisiològiques que puguin tenir, possiblement minces o nul·les, sino a l'orientació que ofereixen sobre l'estructura de la molècula de glicogen sintasa i dels seus centres fosforilables.

Segons Takeda i col.laboradors (291), una preparació de glicogen sintasa amb característiques essencialment "independents" (100% I) i amb un pes molecular de 85.000 per subunitat, rendia per tractament limitat amb tripsina una forma amb pes molecular de 75.000 i amb una activitat I del 20%. El tractament idèntic d'una preparació de glicogen sintasa dependent del tot de glucosa 6-fosfat (4% I) que contenia 3,2 fosfats per subunitat de 85.000 daltons produïa un

polipèptid de 75.000 daltons amb activitat indepent zero i amb un contingut de 2 fosfats. D'això s'en pot deduir que amb dues formes de l'enzim presenten un nucli resistent a la tripsinització el qual conté diversos centres fosforilables i, probablement, el centre d'activació allostèrica per glucosa 6-fosfat car, malgrat el descens a l'activitat I, l'activitat específica en presència de l'activador era similar a la inicial. El fragment separat per acció de la tripsina conté centres de fosforilació i potser també el centre de fixació del substrat UDP-glucosa.

1.7.3.3. Desfosforilació de la glicogen sintasa

La separació del fosfat unit covalentment a la molècula de glicogen sintasa és duta a terme per activitats fosfoproteïna fosfatasa. Zieve i Glinsmann (297) varen isolar a partir de múscul esquelètic de conill una fosfatasa amb activitat sobre la glicogen sintasa fosforilada i, a més, sobre la fosforilasa quinasa a, i ambdós substrats es comportaven com a inhibidors competitiu l'un de l'altre (297).

Certes preparacions de fosfatasa de múscul cardíac boví (244) presenten activitat sobre la glicogen sintasa i sobre la fosforilasa a indicant, juntament amb el resultat de Zieve i Glinsmann (297), que un mateix enzim pot catalitzar més d'una activitat fosfoproteïna fosfatasa (veure secció 1.8.1.).

Recentment Hutson i col.laboradors (300) han estudiat l'efecte d'una fosfatasa de múscul de conill sobre for-

mes de la glicogen sintasa fosforilades de manera diferent amb ^{32}P per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i per la glicogen sintasa quinasa. Tal com havia estat descrit prèviament per Soderling (257 i secció 1.7.4.1.), la localització dels fosfats sobre les subunitats de la sintasa tenia lloc en un centre sensible al tractament amb tripsina preferentment fosforilable per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, i sobre un altre centre que era insensible a la tripsina i que era fosforilat per acció de la glicogen sintasa quinasa o, amb una eficiència menor, per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Les formes de glicogen sintasa estudiades per Hutson i col.laboradors eren tres: una que contenia un fosfat per subunitat de 90.000 daltons situat majoritàriament sobre el centre sensible a la tripsina; una altra amb el mateix contigut de fosfat però situat preferentment sobre el centre insensible a la tripsina; i una tercera amb dues molècules de fosfat per subunitat de 90.000 daltons. La velocitat de desfosforilació de les dues primeres formes era notòriament inferior a la velocitat amb la qual era enretirat el primer fosfat dels dos que contenia la tercera. Una vegada havia estat lliurat el primer fosfat de la tercera forma, aquesta seguia essent desfosforilada per la fosfatasa però molt més lentament, amb una velocitat similar a la de desfosforilació de les altres dues formes. Per anàlisi dels pèptids derivats de la glicogen sintasa tractada amb CNBr es va determinar que durant la fase inicial d'acció ràpida sobre la forma difosforilada de la sintasa, la fosfatasa actuava preferentment sobre el centre insensible a la tripsina. Els autors postulen, arran d'aquestes observacions, que el paper de l'altre centre és l'afavoriment de la desfosforilació de l'insensible a la tripsina, fenomen que conduiria a la glicogen sintasa vers la independència de glucosa 6-fosfat.

L'activitat glicogen sintasa fosfatasa està catalitzada al fetge de conill per enzims que també s'ocupen aparentment de l'activitat fosforilasa a fosfatasa (298, 249) o de les activitats fosforilasa a fosfatasa i fosforilasa quinasa a fosfatasa (250). També han estat descrites, però, proteïna fosfatases que actuen exclusivament sobre la glicogen sintasa (299) i que són molt més làbils en els processos de purificació que les esmentades més amunt (298, 249, 250).

1.7.4. LA FOSFORILACIÓ MÚLTIPLE I LA REGULACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA.

El concepte de dues formes extremes i definides de la glicogen sintasa, les formes I i D, una activa en condicions fisiològiques i l'altra fosforilada i inactiva, ja no pot ser sostingut perquè està ben clar que el procés de fosforilació de l'enzim no té un caràcter de "tot o res" sino que es presenta com una sèrie de fosforilacions parcials i concatenables que dona lloc a la distribució de la glicogen sintasa en múltiples formes l'activitat integrada de les quals pot ser "més o menys D" o "més o menys I".

A una secció prèvia (1.7.3.1.) han estat revisades les principals aproximacions a l'estequiometria de la fosforilació de la glicogen sintasa que han estat realitzades fins el present. Ara sembla el moment d'exposar les consideracions més importants fetes entorn la transcendència fisiològica de la fosforilació múltiple. Abans, però, és necessari un preàmbul que tracti sobre quins són els centres als quals van a

parar de forma específica els fosfats introduïts per les diverses quinasas que poden actuar sobre l'enzim.

1.7.4.1. Centres fosforilables i especificitat de la fosforilació.

L'existència de diverses activitats glicogen sintasa quinasa i de centres fosforilables específicament per elles era intuïble des del moment que hi va haver dades concretes sobre els límits de la capacitat de la proteïna quinas dependent d'AMP cíclic per fosforilar la glicogen sintasa.

Inicialment la fosforilació de la sintasa era relacionada de manera exclusiva amb l'acció de la proteïna quinas dependent d'AMP cíclic. Però es va comprovar que solament uns residus de serina molt concrets, aquells envoltats per certs aminoàcids amb residu de caracter bàsic situats en determinada disposició, es comportaven com punts fosforilables específicament per aquesta quinasa quan la proteïna substrat, en aquest cas la glicogen sintasa, estava en forma nativa i no desnaturalitzada (veure secció 1.3.3.).

El nombre de residus de serina de la glicogen sintasa susceptibles de fosforilació per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, assumint que en conté una proporció similar a la d'altres proteïnes estudiades, ha estat calculat en 11 (276). Si llur distribució a la molècula proteica és normal, probablement només un o dos dels onze punts potencialment fosforilables es troben a la seva superfície externa, a l'abast de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Cal

donar per bons, perquè molt probablement ho són, els resultats obtinguts per diversos grups de treball (16, 17, 256-258, 293,301) que indiquen que aquesta quinasa és responsable de la introducció de, com a màxim, dos dels 3 a 6 fosfats que pot acceptar la glicogen sintasa. Per aconseguir que "in vitro" la proteïna quinasa d'AMP cíclic poqués introduir més fosfats caldria, doncs, que la glicogen sintasa estigués notablement desnaturalitzada, condició que, òbviament, no es donava als experiments sobre fosforilació múltiple de l'enzim.

L'existència d'altres activitats glicogen sintasa quinasa, però, ja està plenament comprovada en molts teixits (14) i algunes d'elles s'ha obtingut en forma purificada (veure secció 1.6.). Les fosforilacions que catalitzen són additives a les dependents d'AMP cíclic.

Tret del nombre, la qüestió és ara conèixer les característiques de cada centre fosforilable i esbrinar quines de les activitats proteïna quinasa són les que afecten a cadascun d'ells i la transcendència que tenen les fosforilacions individuals en la modificació de les característiques cinètiques de la glicogen sintasa.

Les primeres evidències directes de l'existència de centres fosforilables de la glicogen sintasa amb característiques diferents deriven dels estudis del tractament de l'enzim amb tripsina (secció 1.7.3.2.). Soderling i col.laboradors (257) operant "in vitro" amb enzims purificats observaren que la pèrdua total del caracter I de la glicogen sintasa es produïa després de la introducció de dos fosfats per subunitats si el procés estava catalitzat per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, i d'un de sol si ho feia la glicogen sintasa quinasa per ells preparada (257). Deduïren

l'existència de dos tipus de centres fosforilables: un de sensible al tractament per tripsina, poc influent sobre la dependència respecte glucosa 6-fosfat, i un altre que era insensible a la tripsinització i que conferia ben clarament la qualitat de dependència a la glicogen sintasa. Segons aquests autors la glicogen sintasa quinasa dirigeix la seva acció de forma selectiva vers el centre "tripsina resistent", i la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic ho fa preferentment vers el "tripsina sensible" i, amb menys avidesa, vers l'altre.

Huang i col.laboradors (256) han incubat glicogen - sintasa amb proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i $(^{32}\text{P})\text{ATP}$ provocant la incorporació de dos mols de ^{32}P per subunitat de 85.000 daltons. Després de tripsinitzar parcialment el producte fosforilat, no observen pèrdua de fosfat radiactiu lligat a l'enzim. Segons aquests resultats la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic no fosforila centres sensibles a l'acció suau de la tripsina, observació que està en contradicció amb les de Soderling i col.laboradors (270, 257).

Després d'haver-ho anticipat mitjançant anàlisis cinètics, el grup de Nimmo i Cohen (255) ha trobat que "in vitro" la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic i la glicogen sintasa quinasa-2 per ells purificades no fosforilen els mateixos centres. Aquests resultats els obtenen analitzant la seqüència dels pèptids marcats radiactivament que deriven del tractament amb tripsina de la glicogen sintasa fosforilada amb $(^{32}\text{P})\text{ATP}$. Quan l'enzim és fosforilat per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, els pèptids obtinguts per procediment esmentat eren dos i la seqüència d'un d'ells era idèntica a la descrita recentment per Huang i Krebs (302). Dels dos pèptids radiactius derivats del tractament amb glicogen sintasa quinasa-2, un era similar, però no idèntic, a un dels fos-

forilats per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, i l'altre era diferent totalment de qualsevol dels descrits. Aquests autors suggereixen, per tant, l'existència d'almenys quatre centres fosforilables diferents a la subunitat de la glicogen sintasa.

Tal col·lecció de dades, algunes d'elles contradictòries, no respon encara a la majoria de les incògnites plantejades sobre els centres fosforilables de la glicogen sintasa. La visió completa i correcta del tema depèn, en tot cas, de la determinació exacta de l'estequiometria de la fosforilació de la glicogen sintasa i de la clarificació de l'espectre de sintasa quinases que està essent desvelat en aquests darrers anys.

1.7.4.2. Significat fisiològic de la fosforilació múltiple de la glicogen sintasa.

Les recerques sobre la fosforilació múltiple de la glicogen sintasa estan encaminades principalment cap a una fita comú: esbrinar el significat fisiològic exacte del procés i atribuir funcions biològiques concretes a cadascuna de les fosforilacions específiques relacionant els centres fosforilables particulars amb les propietats cinètiques de l'enzim. Recentment han aparegut els primers treballs que s'ocupen d'una forma concreta d'aquestes qüestions.

Roach i col·laboradors (292, 289) han relacionat quantitativament certes propietats cinètiques de la glicogen sintasa amb el contingut de fosfat. Els valors de $M_{0,5}$ per

la glucosa 6-fosfat i de $S_{0,5}$ per la UDP-glucosa variaven exponencialment amb el grau de fosforilació comprés entre valors de 0,27 i 3,5 fosfats per subunitat. La distribució de fosfat entre els diversos centres era, però, desconeguda. També han trobat que la relació entre l'activitat enzimàtica i el grau de fosforilació no era lineal, fenomen que implicaria en molts casos que a petits canvis al contingut en fosfat corresponguessin grans variacions de l'activitat de l'enzim (289). Aquesta observació, interessantíssima, dona significat fisiològic a les petites variacions de percentatge de forma I que usualment es produeixen per tractaments hormo-nals "in vivo". Els valors basals observats, d'altra banda, a molts teixits estudiats (10-40% en termes de percentatge de forma I) corresponen als que "in vitro" presenten les preparacions de glicogen sintasa que contenen de 1,5 a 2,5 fosfats per subunitat (289). Dins aquests marges és on, precisament, variacions tan petites com del 5-10% de la forma I representen variacions àmplies a l'activitat de l'enzim (289).

Recentment també Brown i col.laboradors (258) han estudiat cinèticament les formes de la glicogen sintasa obtingudes deprés de ser incubada amb les proteïna quinases dependent i independent d'AMP cíclic. La preparació enzimàtica de glicogen sintasa contenia originalment una quantitat no significativa de fosfat unit covalentment; la relació d'activitats en absència i en presència de glucosa 6-fosfat era de 0,7 i 1 $A_{0,5}$ per aquest efector era de 15-25 μM . La fosforilació de la glicogen sintasa per la subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic donava com resultat la incorporació de 2 mols de fosfat per subunitat i l'increment fins a 250 μM de 1 $A_{0,5}$ per la glucosa 6-fosfat. Una proteïna quinasa independent d'AMP cíclic purificada per aquests autors podia introduir només 1 fosfat per subunitat,

però la forma de glicogen sintasa resultant era més poc activa que l'obtinguda per acció de la dependent d'AMP cíclic: presentava una $A_{0,5}$ d'aproximadament 500 μM . Finalment, quan l'enzim era tractat amb les dues quinases alhora, es produïa la incorporació de tres fosfats per subunitat, la qual cosa suggeria l'existència d'almenys tres centres de fosforilació diferents. L' $A_{0,5}$ per glucosa 6-fosfat sofria un increment progressiu que atenyia un valor d'aproximadament 1.800 μM , mentre que la relació d'activitats en absència i en presència - de l'efector al·lostèric disminuïa fins el valor mínim de 0,02. Es molt probable que ambdues quinases actuïn "in vivo" i que combinades produeixin un efecte inactivador màxim sobre la glicogen sintasa.

Com que diversos estímuls reguladors de la glicogen sintasa, especialment els hormonals, actuen, segons que es creu, modificant simultàniament l'activitat de diverses proteïna quinases i fosfatases, Roach i Larner (276) suggereixen que el resultat d'aquests estímuls és la distribució de la glicogen sintasa en una munió d'espècies diferenciades pel grau de fosforilació i per la situació dels fosfats sobre els distints centres fosforilables. Cada distribució particular tindria una susceptibilitat determinada a les condicions metabòliques locals (concentració de substrats, efectors al·lostèrics positius o negatius, etc.) i expressaria una activitat que seria la integral de les activitats de totes les formes de l'enzim que la componen. Així, de la contemplació de la glicogen sintasa com un model enzimàtic amb dues formes moleculars, fosforilada i no fosforilada, hom ha anat evolucionant fins considerar-la un model multidimensional format per tot un espectre de graus de fosforilació múltiple diferents. Els autors esmentats postulen (276) un esquema regulador que permet una integració altament complexa dels nombrosos senyals

que controlen l'expressió de l'activitat de la glicogen sintasa i subseqüentment la síntesi del polímer de reserva amb un règim precisament establert.

1.8. FOSFOPROTEÏNA FOSFATASES AL METABOLISME DEL GLICOGEN

Mentre que ha estat duta a terme una extensa labor d'estudi de les proteïna quinases que intervenen a la fosforilació d'enzims interconvertibles, els més importants dels quals estan involucrats al metabolisme del glicogen, l'atenció fixada fins no fa gaire temps sobre les fosfoproteïna fosfatases que catalitzen les reaccions recíproques de desfosforilació ha estat bastant limitada. Darrerament, però, s'ha progressat de manera notable en la purificació i estudi de l'especificitat i de la regulació d'aquesta classe d'enzims.

1.8.1. PROPIETATS I ESPECIFICITAT DE LES PROTEÏNA FOSFATASES

Un dels factors que ha limitat l'avenç de l'estudi de les proteïna fosfatases ha estat la dificultat trobada per purificar-les. Per tant, els progressos obtinguts a la seva purificació han representat, en aquest cas més que en altres, empenyes molt apreciables al coneixement de llurs propietats.

Hurd i col.laboradors (304) van lograr obtenir per primera vegada una proteïna fosfatasa a partir de múscul esquelètic de conill. Tenia activitat fosforilasa fosfatasa però no era molecularment homogènia sino que mostrava nombroses bandes després de ser sotmesa a electroforesi en gels de poliacrilamida.

El següent pas significatiu sobre el coneixement de les proteïna fosfatases de múscul esquelètic va ser el donat fa pocs anys per Kato i Bishop (305) els quals purificaren una fosfatasa tot estabilitzant-la amb ion Mn^{2+} . Zieve i Glinsman (297) isolaren l'enzim seguint el mètode anterior i en van estudiar l'especificitat per substrats fosforilats amb ^{32}P . La fosfatasa obtinguda presentava activitat sobre la fosforilasa quinasa i sobre la glicogen sintasa. Van demostrar que la fosforilasa quinasa fosforilada, però no la desfosforilada i inactiva, es comportava com inhibidor competitiu de l'activitat glicogen sintasa fosfatasa (297).

Nakai i Thomas (244) han aplicat el mètode de Kato i Bishop a la purificació de l'enzim de múscul cardíac boví. La preparació obtinguda té activitat fosfatasa, tant sobre la fosforilasa a com sobre la glicogen sintasa, la histona i la caseïna. Les quatre activitats coincideixen quant a comportament cromatogràfic i a l'electroenfocament, i cadascun dels substrats desfosforilables és un inhibidor competitiu dels altres. Les dades de Kato i Bishop (305), Zieve i Glinsmann (297) i Nakai i Thomas (244) semblen indicar que diferents activitats fosfatasa poden radicar a una mateixa espècie proteica.

En contra d'això, Antoniow i Cohen (245) recentment han presentat evidència que determinades preparacions de proteïna fosfatasa de múscul esquelètic de conill tenen un elevat grau d'especificitat pel substrat. Examinant l'especificitat de les tres proteïna fosfatases separades al darrer pas del seu procés de purificació, han trobat que la que ells anomenen fosfatasa I és activa sobre histones fosforilades però gairebé no actua sobre altres substrats. La fosfatasa II, que té un pes molecular de 170.000 i és separable mitjançant gel-filtració de la I que pesa 300.000 daltons, té una afinitat elevada per la sub-

unitat α de la fosforilasa quinasa, però molt baixa per altres substrats. La fosfatasa III, finalment, és molt interessant perquè desfosforila activament les subunitats β de la fosforilasa quinasa, la glicogen sintasa fosforilada tant per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic com per la glicogen sintasa quinasa-2, i la fosforilasa ensembla (245). La fosfatasa III pot presentar-se amb un pes molecular de 75.000 (III A) o de 45.000 (III B) (245). Cohen i col.laboradors (246) suggereixen que la major part de l'activitat fosfatàsica que actua sobre la glicogen sintasa està catalitzada pel mateix enzim que és responsable de les activitats fosforilasa quinasa fosfatasa i fosforilasa fosfatasa, la fosfatasa III. Es basen no solament en l'esmentada coincidència d'activitats en una mateixa proteïna enzimàtica sino també en el fet que les tres activitats són afectades d'igual manera per un mateix inhibidor específic (veure secció 1.8.2.). És probable que la proteïna fosfatasa III de Cohen i col.laboradors es tracti de la mateixa fosfatasa isolada en unes condicions diferents per altres laboratoris (244, 297, 305).

La fosfoproteïna fosfatasa de fetge de conill ha estat purificada fins a l'homogeneïtat i caracteritzada per Brandt i col.laboradors (298). L'enzim es presenta en forma de monòmer de 34.000 daltons i actua sobre la glicogen sintasa y sobre la fosforilasa. Amb dos substrats es comporten com inhibidors competitiu l'un de l'altre (249). Les velocitats relatives de desfosforilació de la glicogen sintasa i de la fosforilasa per aquesta fosfatasa, han estat estimades respectivament en 1 i 5 (249). Aquesta observació resulta suggestiva perquè és correlacionable amb les diferències de velocitat observades entre la inactivació de la fosforilasa i l'activació de la glicogen sintasa de fetge.

Per la seva banda, Khandelwal i col.laboradors (250) han isolat dues proteïna fosfatases de fetge a les quals han anomenat I i II. Aparentment també es trobem en forma de monòmers de 35.000 daltons que actuen sobre la glicogen sintasa, la fosforilasa, la fosforilasa kinasa, histones, caseïna i altres substrats fosforilats. Tots els substrats són competidors per ambdues formes de fosfatasa. El grau de purificació d'aquestes formes era, però, notòriament inferior a l'obtingut per Brandt i col.laboradors. (298).

La conclusió comú de molts d'aquests resultats és que una sola espècie enzimàtica pot catalitzar la desfosforilació de distintes fosfoproteïnes al fetge. No manquen, d'altra banda, evidències experimentals que donguin suport al fet contrari, és a dir, que les activitats fosfatasa diferents corresponguin a enzims independents. Per exemple, al fetge l'activitat glicogen sintasa fosfatasa és molt més làbil en diverses condicions experimentals que la fosforilasa fosfatasa (306, 307). També hi ha diferències al desenvolupament ontogènic d'ambdues activitats (308). I Kikuchi i col.laboradors (299) purificant proteïna fosfatases hepàtiques han trobat que l'activitat glicogen sintasa fosfatasa es pot resoldre cromatogràficament en dos pics dels quals només el segon actua també sobre la fosforilasa. El primer pic era molt làbil, mentre que l'activitat fosforilasa fosfatasa del segon tendia a augmentar durant certes fases del procés de purificació. A la vista d'aquests resultats, els autors han suggerit que quan es troba una sola proteïna fosfatasa al fetge, és molt probable que se'n hagin perdut d'altres per inactivació en el transcurs del procés de purificació.

1.8.2. CONTROL DE L'ACTIVITAT DE LES PROTEÏNA FOSFATASES.

1.8.2.1. Inhibidors Proteics.

Les troballes recents sobre l'associació de les proteïna fosfatases amb altres proteïnes que regulen llur activitat han estat importants per la comprensió de la bioquímica i de la regulació d'aquests enzims. L'efecte regulador d'aquestes proteïnes es basa en inhibir l'activitat de les fosfatases amb les quals s'associen.

La primera manifestació de la presència d'un inhibidor de fosfatases es va produir estudiant certs aspectes anòmals del metabolisme del glicogen a cèl·lules de carcinoma d'asciti d'Ehrlich (309). L'activitat glicogen sintasa d'aquestes cèl·lules es trobava inhibida per un factor separable per centrifugació dels extractes crus. Aquest factor no era dialitzable, era sensible a la tripsina i resistia la calefacció a 100°C

Gairebé simultàniament, i de forma independent, va ser descrita la presència d'un inhibidor de fosfatases als extractes de fetge i de múscul esquelètic i cardíac. (310, 311). A aquestes extractes l'activitat fosfatasa estava inicialment inhibida i durant el procés de purificació s'anava recuperant. Es va trobar finalment que allò que inactivava l'enzim era una proteïna associada que es perdia durant el procés de purificació. Els complexes inactius fosfatasa-inhibidor que es van obtenir eren heterogenis quant a tamany i pes moleculars, i es podien produir "in vitro" posant fosfatasa purificada, de pes molecular 34.000, en presència de preparacions de l'inhibidor. Les activitats fosfatasa afectades eren la fosforilasa i glicogen sintasa fosfatases (310, 311).

Huang i Glinsmann (312) han esbrinat un nou mecanisme de regulació enzimàtica que podria estar implicat en el control hormonal de la proteïna fosfatasa. Els resultats d'aquests autors indicaven que la inactivació de la fosforilasa fosfatasa de múscul esquelètic de conill resultava de la fosforilació d'una subunitat reguladora o inhibidor-1, per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. L'inhibidor-1 o subunitat reguladora, solament si estava fosforilat es comportava com a inhibidor actiu de la fosfatasa, essent dissociable d'aquesta en determinades condicions experimentals (312). La introducció de fosfat a la subunitat reguladora té lloc, com ha estat comprovat recentment (313), sobre un residu de treonina a la vora del qual es troba una poc freqüent seqüència de quatre arginines.

Huang i Glinsmann (314,315) també han descrit l'existència d'un segon inhibidor proteic de les fosfatases al múscul esquelètic. Com l'anteriorment descrit, aquest nou inhibidor, o inhibidor-2 és estable al tractament tèrmic, però és atacable per tripsina. La seva activitat no és afectable per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Cohen i col.laboradors (246) han purificat a partir d'extractes de teixit muscular un inhibidor de les fosfoproteïna fosfatases que no és activable per fosforilació. Versemblantment es tracta del que descriuen Huang i Glinsmann (314, 315). La seva acció és altament específica car només interacciona amb la fosfatasa III descrita pels mateixos autors (246).

Darrerament el grup de Cohen (316) també ha purificat i caracteritzat l'inhibidor-1 descobert per Huang i Glinsmann (312), assenyalant que té poca estructura terciària. Mantenen que la desfosforilació d'aquest inhibidor (317) depèn

principalment de l'activitat proteïna fosfatasa III (245), és a dir, que l'activitat fosfatasa III regula la de l'inhibidor-1 i al seu torn és regulada per aquesta.

Khandelwal i Zinman (318) han purificat fins a l'homogenitat un altre inhibidor proteic termoestable de la fosforilasa fosfatasa de fetge de conill que exerceix el seu efecte també sobre la fosforilasa fosfatasa de diversos teixits de rata. Inversament, utilitzant la proteïna quinasa purificada per aquests autors (250) s'ha pogut detectar la presència de l'inhibidor a molts teixits (318).

El mecanisme bioquímic de l'acció dels inhibidors proteics termoestables de les fosfatases i llur relevància fisiològica són extrems desconeguts per ara. Es pot dir, finalment que interactuen amb les fosfatases i no amb els seus substrats fosfoproteics, és a dir, que actuen com a veritables subunitats reguladores que inhibeixen l'activitat fosfatàsica de les subunitats catalítiques.

1.8.2.2. Acció d'efectors de baix pes molecular.

L'acció de les proteïna fosfatases pot ser modulada per la presència d'efectors tals como els nucleòtids d'adenina, la glucosa, la glucosa 6-fosfat, el glicogen i certs cations. En molts casos, l'acció d'aquest elements es basa en canviar la susceptibilitat dels substrats fosfoproteics de ser desfosforilats. Així, la desfosforilació de la glicogen sintasa és inhibida per glicogen (319) i la de la fosforilasa per AMP (320). Aquests efectors modifiquen l'estructura del substrat fent-lo més apte o menys per l'acció de la fosfatasa, fenomen que garanteix la regulació independent de les activitats fosfatàsiques fins i tot en aquells casos que estiguin catalitzades per un mateix enzim.

Determinats nucleòtids d'adenina i d'uridina tenen un efecte important sobre l'activitat de les fosfoproteïna fosfatases tant als extractes crus que les contenen com a les preparacions purificades.

Un exemple el constitueix la inhibició de la fosforilasa fosfatasa per AMP (320) a través de la interacció del nucleòtid amb el substrat fosforilasa a (253), però no amb la pròpia fosfatasa.

L'activació per la glucosa del pas de fosforilasa a a b ha estat demostrat amb diferents tipus de preparacions hepàtiques (253) i s'ha arribat a la conclusió que la base de l'efecte rau en un canvi conformacional de la fosforilasa a la qual esdevé un substrat més idòni per la fosforilasa fosfatasa (253). També ha estat demostrat que la glucosa estimula la desfosforilació de la fosforilasa a als extractes de múscul esquelètic (239), però aquest efecte probablement té poca transcendència fisiològica perquè el nivell de glucosa lliure al múscul és molt baix (253). L'activitat glicogen sintasa fosfatasa també és estimulable via interacció de la glucosa amb el substrat (269).

La glucosa 6-fosfat també interactua amb les reaccions de desfosforilació al múscul esquelètic de forma similar a com ho fa la glucosa amb les hepàtiques, estimulant la fosforilasa fosfatasa per modificació de la proteïna substrat (321) i contrarrestant l'efecte inhibitori de concentracions fisiològiques d'AMP sobre l'enzim (328). L'activitat glicogen sintasa fosfatasa tant de fetge (249) com de múscul esquelètic (305, 244, 323), de teixit adipòs (324) o de leucòcits polimorfonuclears (325), és estimulable per glucosa 6-fosfat. Els resultats d'algun d'aquests treballs (305, 244) suggereixen que l'efecte

de la glucosa 6-fosfat tampoc no es produeix per acció directa sobre la fosfatasa, sino per interacció amb el substrat.

Les dades existents sobre el paper del glicogen com a efector de les fosfatases són contradictòries. Diversos autors han descrit efectes bifàsics del glicogen sobre les activitats glicogen sintasa fosfatasa i fosforilasa fosfatasa al fetge (253, 326), i sobre l'activitat glicogen sintasa fosfatasa muscular (319, 327): a concentracions baixes el glicogen es comportaria com a activador i a concentracions altes, com inhibidor.

Finalment, han estat descrits nombrosos efectes de cations sobre fosfoproteïna fosfatases, però encara hi ha molta confusió sobre aquesta àrea de coneixement. Les diferències d'estabilitat entre distintes preparacions de proteïna fosfatasa i l'heterogeneïtat molecular que presenten, així com la dels substrats fosfoproteïcs utilitzats per estudiarles, han fet difícils les extrapolacions d'un estudi a un altre.

1.8.2.3. Influència del grau de fosforilació del substrat.

A la secció anterior han estat descrites diverses observacions sobre la modulació d'activitats fosfatasa per modificacions dels respectius substrats produïdes per determinats metabolist i alguns ions. De manera anàloga, la pròpia fosforilació de certs centres dels substrats proteïcs multifosforilables pot influenciar l'acció de les fosfatases que sobre ells actuen. Aquest mecanisme de regulació ja està postulat per a la fosforilasa quinasa fosfatasa i per a la glicogen sintasa fosfatasa.

Cohen i Antoniow (refèrència 195 i secció 1.4.2.1.),

postulen que les subunitats α de la fosforilasa quinasa de múscul de conill en ser fosforilades no incrementen l'activitat de l'enzim sino que, ben al contrari, afavoreixen la desfosforilació de les subunitats β , de la qual cosa en resulta la inactivació de la fosforilasa quinasa. La fosfatasa que opera sobre les subunitats β de la fosforilasa quinasa i que és modulada d'aquesta manera és la "fosfatasa III", aïllada per aquests autors a partir d'extractes de múscul de conill i activa també sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa (referències 284, 285 i secció 1.8.1.).

Les recents observacions de Hutson i col.laboradors (ref. 300 i secció 1.7.3.3.) sobre la desfosforilació de la glicogen sintasa guarden un cert paralel·lisme amb les de Cohen i Antoniow. Postulen que una proteïna fosfatasa de múscul esquelètic de conill que ells han purificat i que és activa sobre la glicogen sintasa, la fosforilasa i les fosfohistones, té especificitat pel centre fosforilable insensible a la tripsina de la glicogen sintasa (300), el qual regula la dependència de glucosa 6-fosfat d'aquest enzim (257). L'especificitat de la fosfatasa i l'acció intensa sobre aquest centre només es fan evidents si també està fosforilat el centre sensible a la tripsina, el qual, segons els autors, no té gairebé influència sobre la dependència de glucosa 6-fosfat de la glicogen sintasa (257).

1.9. EFECTES HORMONALS SOBRE EL METABOLISME HEPÀTIC DEL GLICOGEN.

En les anteriors seccions hem anat passant revista als principals elements que poden intervenir en els mecanismes d'acció de les hormones que afecten al metabolisme del glicogen. La revisió que hem fet ha estat alhora àmplia i limitada. Àmplia per raó del nombre d'elements involucrats en el mecanisme d'acció de les hormones. I també limitada a) perquè només ha contemplat elements implicats de manera immediata en aquells mecanismes, però no pas altres que només els poden afectar indirectament, b) perquè no ha profunditzat en alguns aspectes massa concrets d'aquests elements com, per exemple, llur estructura molecular detallada o les característiques catalítiques o cinètiques de les reaccions en les quals intervenen, aspectes que no constitueixen exactament l'objectiu del nostre estudi, i c) perquè en molts casos el coneixement existent sobre les qüestions que ens interessaven es difumina aviat en un mar de resultats contradictoris i d'hipòtesis poc comprovades, o àdhuc topa simplement amb l'incògnit.

En les pàgines que ens ocupen intentarem exposar de manera sumarytada els coneixements sobre el control hormonal del metabolisme hepàtic del glicogen que serviren per fornir la base sobre la qual ha estat realitzat el nostre treball.

1.9.1. ESTIMULACIÓ HORMONAL DE LA GLICOGENOLISI HEPÀTICA.

L'estimulació ràpida de la glicogenolisi pot ser duta a terme al fetge pel glucagó i les catecolamines (epinefrina) (326, 328-331, 208, 13, 18) i també la vasopressina (332-334), l'oxitocina (335), l'angiotensina II (332, 333) i l'hormona paratiroidea (336, 337).

El coneixement que hom té sobre la manera com el glucagó modifica el metabolisme del glicogen parteix dels excel·lents treballs de Sutherland i col·laboradors (328) en els quals es demostrava que l'hormona causava la producció d'un factor termoestable, més tard identificat com adenosina monofosfat cíclic, el qual promovia l'activació de la fosforilasa. Paradoxalment, els detalls de l'acció d'aquesta hormona sobre la cèl·lula hepàtica a través de l'increment d'AMP cíclic es coneixen amb menys exactitud que els de l'acció hormonal mediatitzada per AMP cíclic al múscul esquelètic malgrat que el fetge va ser d'antuvi el teixit més estudiat pel que fa referència a aquestes qüestions. Al múscul esquelètic hom ha anat esbrinant una seqüència de reaccions que enllacen les modificacions del nivell d'AMP cíclic amb els canvis de les vies metabòliques del glicogen (secció 1.1. i esquema IV). L'existència d'una cascada glicogenolítica similar en el fetge és un fet assumit però demostrat solament de manera parcial (34, 13, 163, 338).

L'epinefrina causa al fetge un efecte glicogenolític clar (326, 328, 329). Sobre la membrana de la cèl·lula hepàtica hi ha una població de receptors per les catecolamines dividits en dos grups que per conveniència han estat anomenats alfa i beta adenèrgics (339). Els de tipus alfa-adenèrgic són aquells en els quals l'epinefrina hi és un agonista molt més potent que l'isoproterenol i poden ser bloquejats per fentolamina, fenoxibenzamina o derivats ergòtics. Els efectes que

d'ells depenen no estan mediatitzats per cap mecanisme relacionat amb l'AMP cíclic (340). Els receptors beta-adrenèrgics estan relacionats amb l'adenil ciclase a la qual poden activar. Són estimulables més per isoproterenol que per epinefrina i llurs efectes poden ser bloquejats específicament per propranolol o practolol. El fet que l'acció del glucagó sobre l'adenil ciclase no sigui bloquejable per antagonistes beta-adrenèrgics (23, 341), i la diferent activació de l'adenil ciclase per glucagó i epinefrina suggereixen l'existència de receptors de membrana separats i diferents per cadascuna d'aquestes hormones.

Totes les hormones glicogenolítiques estimulen aquest procés al fetge produint simultàneament un increment estable de l'activitat fosforilasa a. Tal activació de la fosforilasa està mediatitzada presumiblement per l'acció de proteïna quinase i/o fosfatases, elements essencials del mecanisme utilitzat per regular el metabolisme del glicogen.

En el cas del glucagó hom assumeix que l'increment de l'activitat fosforilasa a pot ésser mediatitzat per l'AMP cíclic, per la proteïna quinasa dependent d'aquest nucleòtid i per la fosforilasa quinasa (342, 343), com a esglaons fonamentals però no únics. També la nucleòtid cíclic fosfodiesterasa de baixa Km (344, 345, 68), les fosfoproteïna fosfatases (346) i potser altres elements cel·lulars poden estar involucrats en el mecanisme d'acció del glucagó. D'altra banda, l'observació d'efectes glicogenolítics causats per concentracions baixes de glucagó que no produeixen increments detectables d'AMP cíclic (347) ha fet pensar en la possibilitat d'altres mecanismes per l'actuació de l'hormona (348). Per ara no hi ha cap evidència que confirmi aquest darrer punt.

A la bibliografia recent han aparegut diversos treballs centrats sobre el problema de l'acció de les catecolamines, i concretament de l'epinefrina, sobre el fetge (349, 350, 340, 12, 13). El punt d'interés bàsic d'aquests treballs és el fet que l'acció glicogenolítica de l'epinefrina cursa amb increments d'AMP cíclic modestíssims si hom els compara amb els resultants de concentracions de glucagó amb efectes glicogenolítics equivalents als de l'epinefrina. Encara més, l'efecte glicogenolític de les catecolamines es mostra gairebé inalterable pel bloqueig, mitjaçant antagonistes apropiats, dels receptors beta-adrenèrgics dels quals depèn l'activació de l'adenil ciclase i la producció d'AMP cíclic per part de les catecolamines (13, 351). Aquesta desconcertant i notabilíssima troballa implica forçosament l'existència d'una via que, ben independentment de l'AMP cíclic, impulsi la glicogenolisi a mercé del govern per catecolamines.

Tret del glucagó, en general totes les hormones que estimulen la glicogenolisis al fetge ho fan de manera similar a l'epinefrina, sense incrementar el nivell d'AMP cíclic a dins la cèl.lula. Tal fet ha estat demostrat per a la vasopressina (334), l'angiotensina II (332) i l'oxitocina (335). Ni l'epinefrina (338) ni l'angiotensina II (352) ni la vasopressina (353) incrementen l'activitat proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica. Cap d'elles tampoc sembla exercir efectes dependents del guanosina monofosfat cíclic.

Sobre la base de les evidències actuals la possibilitat més versemblant per explicar el mecanisme d'acció de les hormones glicogenolítiques no relacionades amb l'AMP cíclic és la que involucra a certs cations. Recentment el calci ha estat essenyalat com a protagonista important de l'acció alfa-adrenèrgica de l'epinefrina (208-210). També ha estat indicada la possibilitat d'un paper per al calci i, en menor grau,

per al potasi en l'acció de la vasopressina (333). De fet, l'acció de la vasopressina i de l'angiotensina II sobre la sortida de glucosa dels hepatòcits al medi (333) o l'activació de la fosforilasa (333, 209) és totalment absent en medis desprovistos de calci. El mateix fenomen és observable amb l'epinefrina (208, 209). Presumiblement aquestes hormones potencien l'entrada de calci als hepatòcits i l'increment de calci al seu interior hi estimula al·lostèricament la fosforilasa quinasa. Recolzant aquesta hipòtesi ha estat demostrat que la fosforilasa és activable pel tractament de cèl·lules hepàtiques amb el compost amb caràcter ionofor A23187 (353, 210, 209) que altera el transport de calci entre el medi i l'hepatòcit, provocant l'increment de la concentració intracel·lular de cation (211). També ha pogut ésser comprovada l'entrada de calci als hepatòcits en resposta a l'estímul per efectors alfa-adrenèrgics amb acció glicogenolítica (211).

Malgrat que el glucagó pot impulsar moviments de calci entre la cèl·lula hepàtica i el medi (209, 211, 354), l'absència del ion en el medi no determina el bloqueig de l'efecte glicogenolític de l'hormona (210).

El mecanisme d'acció hepàtica de les catecolamines i el d'altres agents glicogenolítics diferents del glucagó resta, doncs, fonamentalment desconegut en el moment actual.

1.9.2. L'OBSCURA ACCIÓ DE LA INSULINA.

De totes les hormones que afecten el metabolisme del glicogen, aquella a l'entorn de la qual hi ha sens dubte les controvèrsies més dures i el desconeixement més gran, especialment pel que fa referència a les seves accions i al seu mecanisme d'actuació, és la insulina. Hom la presenta com a una

hormona amb efectes múltiples sobre els teixits que li són sensibles, que són la majoria dels fonamentals. Part dels seus efectes, aquells que es fan patents a termini mig o llarg, es deuen a interaccions amb els processos d'expressió genètica i de síntesi proteica. Aquests efectes no són probablement els que s'atenen als detalls quantitativs de les conveniències de la cèl.lula car no s'ocupen del control immediat i ajustat de les vies metabòliques regulables per l'hormona. Per contra, hom engloba sota l'apel·latiu d'efectes a curt termini de la insulina a tots aquells que contribueixen en cada moment a conduir el metabolisme bàsic de la cèl.lula de manera totalment ajustada.

En principi cadascun dels elements revisats en les anteriors seccions és potencialment un punt d'acció de la insulina. Discernir amb exactitud quins són els efectes concrets de la insulina és, però, una labor difícil, sobretot al fetge tant per la subtileza de les modificacions impulsades per la insulina com per la presència simultània de l'acció sobreposada d'altres efectors amb sentit fisiològic igual o contrari al seu.

L'hormona que estem tractant té en general una acció de caràcter anabòlic. La sentència anterior, extremadament simplista, serveix, si més no, per introduir la idea del sentit bàsicament glicogènic o antiglicogenolític dels efectes de la insulina. Aquest caràcter es manifesta de manera clara en tots els teixits estudiats, àdhuc l'hepàtic (355-357). Ara bé, no ha estat possible per ara fer totalment acceptable l'existència d'efectes directes de la insulina sobre el metabolisme de glicogen al fetge. La controvèrsia està mantinguda entre la possibilitat d'efectes directes sobre elements intracel·lu·lars i la simple potenciació de la síntesi de glicogen mitjançant l'estímul de l'entrada de glucosa a l'hepatòcit i l'efec

te d'acció de masses subseqüent (358-361). La clau per acceptar l'existència d'efectes directes de la insulina rau en postular i demostrar la modificació de l'activitat dels enzims directament implicats en les reaccions de síntesi i degradació del glicogen. Partint d'aquesta base, i assumint que la insulina no penetra a l'interior de la cèl.lula sino que l'estimula des de fora, hom podrà començar a cercar els punts específics que configuren tot el mecanisme d'acció de l'hormona.

Hom accepta que la insulina incrementa la proporció de forma I de la glicogen sintasa a teixits com l'adipós i el muscular (170, 362, 363), és a dir, que d'alguna manera promou la desfosforilació de l'enzim. Aquest efecte directe és discutit al fetge perquè és molt difícil d'observar "in vitro" i, per tant, està poc documentat (364). L'existència de varies observacions negatives al respecte (365, 366) i el fet que per combinació d'insulina i glucosa (237, 367-369) es pot detectar la potenciació de l'efecte glucogènic que la glucosa exerceix per ella mateixa (365, 366, 368, 370) fan decantar a certs autors a admetre únicament una acció indirecta de la insulina.

L'observació d'efectes directes de la insulina sobre el nivell intracel.lular d'AMP cíclic correlacionats aparentment amb almenys alguns dels efectes biològics de l'hormona al fetge (29, 371-374), recolza la possibilitat contrària a l'esmentada en el paràgraf anterior. Efectivament, en estudis sobre el control hormonal de la glicogènesi i gluconeogènesi al fetge (169, 354, 342, 375) es podia observar que l'acció de la insulina es contraposava a la del glucagó y alhora atenuava l'increment d'AMP cíclic causat per aquest. La troballa, que bàsicament suggereix l'existència d'interaccions directes de la insulina amb els ressorts que governen el metabolisme del glicogen, implica un mecanisme d'enllaç entre l'estímul que arriba a la membrana plasmàtica i la síntesi i/o la degradació

de l'adenosina monofosfat cíclic.

Diversos laboratoris han reeixit en l'estudi de la relació de la insulina amb l'activitat adenil ciclase hepàtica (376-378). El receptor de l'hormona, el qual és detectable a las membranes de cèl.lules hepàtiques (379-382), ha estat purificat i caracteritzat pel grup de Cuatrecasas (383). Ha estat demostrat que la unió de la insulina al receptor comporta la inactivació de l'adenil ciclase hepàtica (376-378). Aquest pas endavant, però, està lluny d'explicar la manera com és activada l'adenil ciclase car no hi ha cap evidència d'interacció directa entre el receptor estimulat i l'enzim. L'existència de tal interacció aclararia el mecanisme d'acció de la insulina sobre la cèl.lula hepàtica. I també cal deixar clar que la demostració d'un efecte directe de la insulina sobre l'activitat adenil ciclase no constituïria la prova de que aquesta fos la base fonamental de l'acció de l'hormona. Efectivament, l'observació d'altres efectes de la insulina com, per exemple, l'activació de la fosfodiesterasa de baixa Km (344, 345, 68), posa de manifest un mecanisme d'acció altament complex. En aquest sentit, Cuatrecasas (384) ha postulat la possibilitat d'almenys tres alternatives de mecanisme d'acció de la insulina de les quals, però, cap no pot encara ser acceptada com la certa. La primera, que la insulina inhibeix l'adenil ciclase per interacció molecular directa entre el receptor de l'hormona i l'enzim. Aquest efecte directe, cert segons que sembla per altres hormones (glucagó al fetge), es difícil d'imaginar que pugui mediatitzar per sí sol tantes accions com la insulina exerceix sobre la cèl.lula. Però aquesta objecció no pot ésser considerada una prova concloent de la inviabilitat de l'alternativa de l'acció directe car de l'adenil ciclase solament en coneixem la seva habilitat per sintetitzar AMP cíclic, però no està demostrat que no pugui exercir altres accions com, potser, una modificació general dels fenòmens de membrana.

La segona alternativa proposada és la producció d'un missatger secundari específic de la insulina. Aquest missatge intracel·lular modificaria independentment diversos processos entre els quals l'activitat adenil ciclase, o la fosfodiesterasa o la d'altres enzims relacionats amb el metabolisme del glicogen. En aquest cas només una part dels efectes de la insulina serien atribuïbles a canvis en el metabolisme de l'AMP cíclic. Malgrat que aquesta teoria és força atractiva no hi ha encara cap evidència sobre l'hipotètic missatger.

En tercer lloc Cuatrecasas proposa que la insulina pot induir un ampli canvi conformacional de la membrana cel·lular, el qual podria alterar simultàniament diferents processos físicament distants i funcionalment deslligats entre sí. No és possible sobre la base de l'evidència obtinguda fins al present distingir quin d'aquests tres conceptes s'adapta millor a la realitat del mecanisme d'acció de la insulina, una qüestió tan fonamental, complexa i contradictòria àdhuc.

2. MATERIALS

I

MÈTODES

2.1. ANIMALS UTILITZATS

Per la realització d'aquest treball varen ser utilitzades rates Wistar adultes de 180-280 g de pes i de 8-14 setmanes d'edat, alimentades amb dieta ordinària de laboratori (Sanders i Panlab).

Els animals eren mantinguts en una cambra amb temperatura controlada i estaven sotmesos al ritme normal de llum-obscuritat.

Tot i que el sexe dels animals no afectava aparentment els sistemes estudiats, en la majoria de les fases experimentals, i com a criteri d'uniformitat, s'optà per la utilització de mascles perquè llur anatomia interna permetia un maneig més còmode en el procés d'isolament d'hepatòcits a que havien de ser sotmesos.

Tots els experiments es realitzaren a partir d'animals sacrificats entre les 9 i les 11 hores del matí per tal de reduir al mínim les diferències entre experiments degudes a la incidència de ritmes circadians sobre els processos estudiats.

Aquells animals destinats a experiències que requere-

rien dejuni eren mantiguts en gàbies apart i únicament s'els subministrava aigua.

2.2. ISOLAMENT DE CÈL.LULES DE PARÈNQUIMA HEPÀTIC

Les cèl.lules del parènuima hepàtic, que han estat les utilitzades en aquest estudi, estan arranades al fetge en una sèrie de monocapes perforades que s'anastomosen i es ramifiquen formant un laberinte per entremig del qual hi transcorren els sinusoides o capilars fenestrats (385). Cada cèl.lula està fermament unida a les del voltant per formacions de membrana denominades desmosomes {"macula adherens", segons (386)}. Tot l'òrgan està recorregut per un esquelet de teixit ficroconectiu compost per fibres de colagen que formen una fina trama a l'interior de cada lòbul. Unions desmosomals i trama de colagen constitueixen, doncs, els principals sosteniments de l'estructura del parènuima hepàtic.

Fins fa uns pocs anys gairebé totes les temptatives per isolar cèl.lules del parènuima hepàtic (387-391) feien servir mètodes que incloïen procediments mecànics de separació els quals conduïen inevitablement al damnatge de la membrana cel.lular, a canvis notables de la ultraestructura (392) i a alteracions metabòliques importants quan les cèl.lules eren resuspeses en els medis extracel.lulars usuals (393, 394).

Howard i cols. (395, 396) han descrit la primera tècnica enzimàtica per a isolament d'aquestes cèl.lules. Con

sisteix en la incubació de talls de fetge de rata en una solució que conté colagenasa i hialuronidasa i que està desprovista de calci. Els enzims digereixen la trama de colagen i l'absència de calci provoca la separació de les cèl·lules entre sí per dissociació dels desmosomes. Les cèl·lules preparades d'aquesta manera tenen la membrana aparentment intacta i presenten activitat respiratòria quan estan en suspensió en un medi adient. El rendiment del mètode de Howard, però, és molt baix (5%).

Berry i Friend (397) han introduït la tècnica que, amb diverses modificacions, és la utilitzada més correntment en l'actualitat. Consisteix en la perfusió recirculant del fetge sencer amb una solució similar a l'emprada per Howard i cols. (395). Les modificacions més notables de la tècnica de Berry i Fried es deuen a Ingebretsen i Wagle (398, 399) i a Christoffersen i Berg (400) que l'han simplificat utilitzant únicament la colagenasa com a enzim disgregant, escurçant el temps de perfusió i operant amb el fetge separat de l'animal.

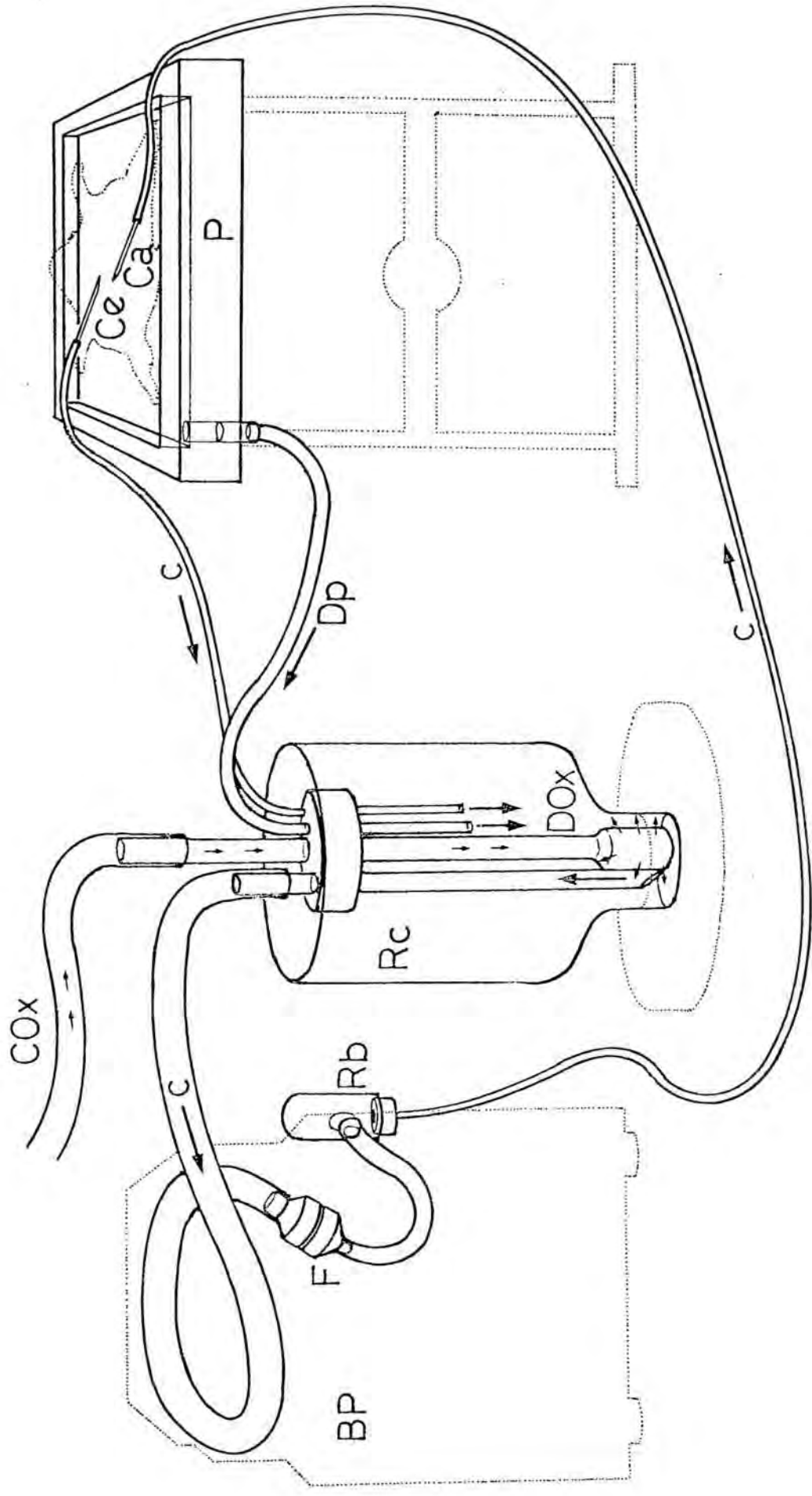
El mètode d'obtenció d'hepatòcits utilitzat per nosaltres consisteix en la perfusió del fetge de rata "in situ" amb una solució de colagenasa, i és el resultat de la combinació i modificació de les tècniques de perfusió esmentades més amunt.

Les rates eren anestesiades per injecció intraperitoneal d'àcid feniletilbarbitúric (Luminal de Bayer) a una dosi de 200 mg/kg de pes corporal. Tot el procés de perfusió es duia a terme en una cambra atemperada per aire a 38,5°C. L'abdomen de l'animal era obert i la vena porta era encanulada amb un trocar de 12 dècimes de mm. que es fixava amb una lligada. Per aquesta via s'hi introduïa el medi de perfusió que

ESQUEMA VI: APARELL PER A LA PERFUSIÓ RECIRCULANT DE FETGE DE RATA

BP bomba peristàltica
 c circuit de perfusió
 Ca cànula aferent
 Ce cànula eferent
 COx conducció d'oxígen
 DOx difusor d'oxígen

Dp drenatge platina
 F filtre
 P platina de suport de l'animal
 Rb retenció de bombolles de gas
 Rc recipient central
 —→ circulació de líquid
 →→ circulació d'oxígen



en aquesta primera fase es deixava fluir lliurament amb sortida per la vena cava inferior que era seccionada en la part baixa de la cavitat abdominal. El medi de perfusió era el descrit per Hanks (401) exempt de calci, amb la següent composició: NaCl 137,0 mM/KCl 5,4 mM/Na₂HPO₄ 6,7 mM/KH₂PO₄ 8,8 mM / MgSO₄ 8,1 mM. Aquest medi estava addicionat amb glucosa 5 mM i ajustat a pH 7,4. Prèviament el medi era atemperat a 38,5°C i gasejat intensament amb oxígen saturat d'aigua.

Immediatament després d'encanular la vena porta obriem la caixa toràcica i la vena cava inferior era ecanulada via aurícula dreta amb tub de plàstic semirrígid de 15 dècimes de mm que era fixat amb una lligada. Tot seguit era lligava la vena cava inferior justament per damunt del nivell de les venes renals amb la qual cosa el perfusat abandonava el fetge per la part alta de la cava inferior. La perfusió era impulsada per una bomba peristàltica (Gilson, model Minipuls II amb capçal per a fluxes alts) i la velocitat de fluxe es fixava en 45 ml/min durant aquesta primera fase. Tant el perfusat que abandonava el fetge com el que drenava a través de les seves parets i que anava eliminant les darreres restes de sang, eren despreciats (uns 250-300 ml en total).

Quan el volum total del líquid al reservori i al circuit de perfusió quedava reduït a uns 75 ml, el perfusat que sortia del fetge i el drenatge que era recollit per la platina que sostenia l'animal es feien retornar al reservori central. A partir d'aquest instant la perfusió esdevenia recirculant. S'afegien al medi colagenasa i albúmina bovina (fracció V) disoltes en 25 ml de solució de Hanks i a unes concentracions finals de 0,4 i 15 mg/ml respectivament. Transcorreguts dos minuts de perfusió amb colagenasa la velocitat de fluxe era incrementada fins a 60 ml/minut. El pas de colagenasa pel

fetge es feia durar entre 12 i 16 minuts al termini dels quals la perfusió era cessada i el fetge enretirat curosament de l'animal i suaument disgregat, amb l'ajut d'unes tisores, dins d'un vas de plàstic que contenia 50 ml de medi de Hanks exempt de calci, addicionat amb glucosa (5 mM) i amb albúmina bovina (15 mg/ml) i ajustat a pH 7,4. El recipient era gasejat amb O_2 durant un o dos minuts i tapat. Els trossos de teixit s'anaven acabant de disgregar per agitació manual molt suau del recipient durant uns 15 minuts.

La suspensió que contenia cèl.lules isolades intactes i alterades, partícules de teixit parenquimàtic no disgregat i restes d'altres teixits, era filtrada a través d'una tela de niló amb entramat de 150 micres de separació entre les fibres. La suspensió cel.lular resultant era centrifugada a $75 \times g$ durant 90 segons (Janetzki, model T32c) i el sobrenedant era descartat. El sediment era resuspès en medi de Hanks oxigenat i el cicle de centrifugació i resuspensió era repetit per dues vegades més eliminant així les cèl.lules parenquimàtiques damnades, les cèl.lules de Kupffer i els eritròcits que encara contaminaven la suspensió. Aquests processos de disgregació, centrifugació i resuspensió es feien a temperatura ambient.

La darrera resuspensió es feia amb el medi bicarbonatat preparat segons Krebs-Ringer que contenia: NaCl 118,5 mM/KCl 4,8 mM/ $CaCl_2$ 2,5 mM/ $NaHCO_3$ 25mM/ KH_2PO_4 1,2mM/MgSO 1,2 mM amb una osmolaritat de 300 mOsm. Aquest medi era gasejat amb O_2/CO_2 19:1 durant 30 minuts abans de ser utilitzat, amb la qual cosa el pH restava fixat a 7,4. La concentració final de cèl.lules a la suspensió era de 5 a 10×10^6 cèl.lules/ml.

A partir de fetges de 8-9 g s'obtenien en condicions

Óptimes 3,0 a 3,5 g de cèl.lules parenquimàtiques (pes humit). Per comptatge al microscopi en cambra de Thoma es va estimar que 1 g d'aquestes cèl.lules en conté aproximadament $1,2 \times 10^8$. Assumint que 1 g de teixit hepàtic conté $2,3 \times 10^8$ cèl.lules tal com ha estat deduït del contingut en DNA (402) i que entre el 50 i el 60% del total de cèl.lules del fetge normal són cèl.lules parenquimàtiques (18, 19), es calcula que el rendiment de la tècnica descrita és aproximadament del 50% sobre el nombre original de cèl.lules parenquimàtiques presents als fetges, resultat que coincidia amb els més elevats dels descrits a la bibliografia (403, 404).

La viabilitat d'aquestes cèl.lules era del 85-95% estimada pel criteri de la exclusió del Blau de tripà (396) segons el qual les cèl.lules viables no es tenyeixen després d'haver estat incubades 30 minuts amb una solució al 0,2% del colorant. Aquestes cèl.lules també eren perfectament sensibles a les hormones tal com ho demostren els experiments realitzats amb elles.

Per obtenir rendiments satisfactoris quant a nombre i viabilitat de les cèl.lules parenquimàtiques de fetge considerem necessària l'observació de les següents condicions principals:

- a) rapidesa en la preparació quirúrgica del animal, que no s'ha de perllongar més de 5 minuts.
- b) oxigenar intensament el medi de perfusió.
- c) operar amb una velocitat de fluxe elevada que afavoreixi tant l'oxigenació del teixit perfós (405) com la penetració de la solució enzimàtica.

d) utilitzar un medi de perfusió exempt de calci.

L'absència de calci al medi i el rentat del que es troba als espais intercel·lulars provoca la dissociació irreversible dels desmosomes o punts d'unió intercel·lular (397, 406). Alguns autors han fet servir EDTA en el medi de perfusió com a segrestant enèrgic del calci (397, 407) mentre que d'altres recomanen la introducció d'aquest catió al medi després de la primera fase de la perfusió (406, 408, 409). Cap d'aquestes dues modificacions es va considerar oportuna per a la tècnica utilitzada en el present treball. D'altra banda la petita quantitat de calci necessària com a cofactor de la colagenasa (410) ja acompanya l'enzim procedent de font comercial que la dóna fortament fixada a la seva molécula (410).

e) limitació del període d'actuació de la colagenasa entre 12 i 16 minuts. Períodes de temps més curts provocarien digestions dels fetges molt incompletes, mentre que la prolongació excessiva del procés aniria en detriment de la viabilitat de les cèl·lules i del rendiment. La concentració d'enzim necessària per a l'obtenció de rendiments òptims (0,4 mg/ml) era independent de l'activitat específica dels lots de colagenasa utilitzats (de 120 a 160 mU/mg).

Per donar la viscositat desitjada al medi de perfusió i per a protegir tant les cèl·lules com la colagenasa, la proteïna afegida al medi de Hanks va ser l'albúmina bovina (fracció V) l'us de la qual es va preferir al de la gelatina utilitzada per alguns autors (411, 412) car aquesta presenta impureses importants (NH_4^+ , Ca^{2+} , etc) que cal eliminar per un procés de diàlisi d'aplicació difícil (413).

2.3. INCUBACIÓ DELS HEPATÒCITS

Les cèl.lules suspeses en el medi bicarbonatat de Krebs-Ringer es repartien ràpidament en vials de plàstic de 30 ml amb tap de rosca. El maneig i la dosificació de la suspensió cel.lular es feia amb una pipeta automàtica de plàstic i de boca ampla (model Macro-Set d'Oxford Laboratories) o amb pipetes normals de plàstic (Nalgene) amb la punta retallada, per tal de no damnar els hepatòcits.

El volum màxim de suspensió cel.lular per vial era de 4,5 ml a fi d'obtenir les relacions entre superfície de fase líquida i volum de fase líquida i entre volum de fase líquida i volum de fase gasosa més adients.

La fase gasosa era barreja d'O₂ i CO₂ amb una proporció de 19:1. Els vials eren gasejats en posar-hi la suspensió cel.lular i cada cop que eren destapats per tal d'addicionar-hi solucions d'assaig. Les incubacions eren fetes en un bany d'aigua a 37 °C amb platina d'agitació. La intensitat de l'agitació (100 oscil.lacions per minut) era la suficient per mantenir les cèl.lules en suspensió sense que sedimentessin.

L'addició d'hormones i d'altres efectors a la suspensió cel.lular era feta en volums tan petits com el mètode per-

mitia (10-50 μ l). Els controls d'incubació d'hepatòcits que duiem dins de cada experiment eren addicionats amb volums de solució de NaCl al 0,9% equivalents als volums d'addició dels efectors que assajavem. Quan experimentaven amb hormones peptídiques (glucagó i insulina) per les quals el solvent era HCl 3 mN, els controls eren addicionals amb aquest solvent en comptes de solució de NaCl.

Al final de les incubacions el contingut de cada vial era centrifugat (3.000 x g, 30 s) i el sediment era homogeneïtzat amb 175-250 μ l de medi enfredat a 0-4°C que contenia KF 150 mM EDTA 15 mM (pH 7,0) en un homogeneïtzador de Potter-Elvehjem amb pistil de teflon. L'ion fluorur d'aquest medi tenia la finalitat d'inhibir les proteïna fosfatases que actuen sobre els enzims interconvertibles per fosforilació, i l'EDTA la de segrestar el magnesi necessari per les reaccions de fosforilació d'aquests mateixos enzims, assegurant l'estabilització de llur activitat als homogeneïtzats.

Els homogeneïtzats eren centrifugats a 10.000 x g a 0-4 °C durant 15 minuts (Sorvall model RC2-B amb rotor angular SM-24). En els sobrenedants obtinguts s'hi determinaven les activitats enzimàtiques. Quan es desitjava determinar el contingut de certs metabolits a les cèl.lules (AMP cíclic intracel.lular, etc.), la suspensió era tractada directament al final de les incubacions amb solució al 5% d'àcid tricloracètic. Les proteïnes precipitades eren separades per centrifugació (3.000 x g, 5 minuts) i les determinacions de metabolits eren fetes a partir del sobrenedant àcid.

2.4. TÈCNIQUES DETERMINATIVES

2.4.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGEN SINTASA

Les activitats glicogen sintasa fóren mesurades sempre per la incorporació de (^{14}C)-glucosa al glicogen a partir d'uridina difosfo (^{14}C)-glucosa {UDP (^{14}C) glucosa}, seguint la metodologia descrita per Thomas i cols. (414).

La solució d'assaig contenia UDP (^{14}C)-glucosa 6,67 mM/ glicogen 10 mg/ml/ KF 25 mM/EDTA 20 mM/ Tris 50 mM a pH 7,8. La radiactivitat específica de la UDP(^{14}C) glucosa era 150.000 c.p.m./ μmol quan es volia mesurar la forma I de l'enzim o 40.000 c.p.m./ μmol si es mesurava la glicogen sintasa total. En aquest darrer cas la solució contenia, a més, glucosa 6-fosfat 10,8 mM. El glicogen utilitzat era passat previamente a través d'una resina captadora d'ions (Bio Rad Labs., tipus AG 501-X8), precipitat amb etanol al 66% i assecat a l'aire.

L'assaig era aplicat als sobrenedants de 10.000 x g descrits a l'apartat 2.3., seguint l'esquema operatiu següent:

Es disposaven 60 μl de la solució d'assaig en un tub i es dei

xaven atemperar durant uns minuts en un bany a 30°C. Tot seguit s'hi afegien 30 µl de la solució enzimàtica a valorar i la mescla es deixava en incubació a 30°C durant el període de temps que s'estimava necessari per que es transformés com a màxim el 15% del substrat present.

Per aturar la reacció es prenen 75 µl de la dita mescla i es dipositaven sobre un quadrat de 2 x 2 cm de paper de filtre (Whatman, tipus 31ET) que tot seguit era submergit en etanol al 66% fred. El glicogen, que precipita en etanol al 66%, restava atrapat a dins de la trama de paper mentre que els altres components de la mescla de reacció eren eliminats per rentats successius de 10, 30 i 30 minuts amb etanol al 66%. El paper es submergia finalment en acetona que en facilitava l'assecat que es duia a terme sota l'acció de radiació infrarroja.

El paper ben sec era introduït en un vial que contenia toluè amb PPO al 0,5% i es mesurava la radiactivitat que presentava amb un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300).

2.4.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GLICOGEN FOSFORILASA

L'activitat glicogen fosforilasa era mesurada per la incorporació de (^{14}C)-glucosa al glicogen a partir de (^{14}C) glucosa 1-fosfat, segons el mètode descrit per Gilboe i cols. (415).

La solució d'assaig contenia D-(^{14}C)-glucosa 1-fos-

fat 100 mM amb una radiactivitat específica de 4.000 c.p.m./ μ mol, KF 200 mM i glicogen 10mg/ml i estava ajustada a pH 6,3.

L'assaig s'aplicava als sobrenedants de 10.000 x g descrits a l'apartat 2.3., seguint el mateix esquema operatiu que en el cas de la determinació de l'activitat glicogen sintasa.

2.4.3. DETERMINACIÓ DE L'ESTAT DE DISSOCIACIÓ DE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC.

L'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic era determinat pel mètode desenvolupat per Guinovart i cols. (416) que es basa en la capacitat fixadora de (3 H)AMP cíclic per bandes de proteïnes cel·lulars específiques separades per electroforesi en gels de poliacrilamida.

La preparació dels gels per a l'electroforesi i el desenvolupament d'aquesta estaven basats en la tècnica de Davis (417).

Per obtenir els gels de poliacrilamida al 7% (p/v) es partia de les tres solucions següents:

- a) solució amortidora de pH: Tris HCl 3 M ajustada a pH 8,9, que contenia 0,23 ml/100 ml de N, N, N', N'-tetrametiletillendiamida (TEMED).
- b) acrilamida 28 g/100 ml, bisacrilamida 0,735 g/100 ml.

c) solució extemporània de persulfat amònic 112 mg/100 ml.

Es mesclaven 1 part de (a), 2 parts de (b) i 5 parts de (c) desairejant la solució per aplicació del buit amb agitació simultània. Els tubs que havien de contenir els gels eren de vidre Pyrex de 5 mm de diàmetre intern i de 10 cm de longitud. Calia que estessin totalment nets i per tal motiu eren previament bullits amb mescla cròmica, esbandits i assecats. Els tubs disposats en posició vertical en un suport adient s'omplien ràpidament fins a un nivell de 2 cm per dessor de llur extrem superior amb la mescla acabada de preparar, abans que aquesta comencés a polimeritzar. Sobre la superfície del líquid dins dels tubs s'hi dipositava finalment una capa d'aigua per tal d'evitar que els extrems dels gels fossin còncaus per efectes de menisc. La gelificació es completava en el termini d'unes hores. Els gels amb bombolles d'aire a l'interior de llur massa eren descartats.

L'electroforesi es realitzava en un aparell refrigerable i apte per contenir simultàniament 12 gels (Medical Research Apparatus). Mitjançant la refrigeració per aigua, els gels eren mantinguts a l'interior de l'aparell a una temperatura de 2-4°C.

Abans d'utilitzar els gels per a l'electroforesi de les mostres a analitza s'els aplicava un procés electroforètic d'eliminació dels residus de TEMED i de persulfat amònic que restaven inclosos a dins de la massa de poliacrilamida. La solució amortidora de pH que es dipositava a les cubetes dels electrodos era Tris/Tris HCl 375 mM ajustada a pH 8,9. S'aplicaven 2 mA per gel durant 30-45 minuts al termini dels quals el procés es donava per finalitzar i tant l'aparell com la superfície dels gels eren curosament esbandits

amb aigua.

La mostra que s'aplicava a cada gel contenia: 50 μ l del sobrenedant de 10.000 x g que s'havia d'analitzar i que era obtingut segons que es descriu en l'apartat 2.3., 50 μ l de glicerol i 5 μ l de blau de bromofenol al 0,05%. Les mostres així preparades eren dipositades curosament sobre l'extrem superior dels gels, formant una capa que no s'havia de barrejar amb la solució que els cobria. En el procés d'electroforesi la solució dipositava a les cubetes dels electrodos contenia tris 5 mM i estava ajustada a pH 8,3 amb glicina (aminoàcid lliure). S'aplicaven 2 mA per gel i el procés es perllongava fins que el front assenyalat pel colorant li mancava aproximadament 1 cm de recorregut per arribar a l'altre extrem del gel.

Després de finalitzada l'electroforesi cada gel era extret del tub que el contenia, se li marcava el front amb una tinta no difonible (xinesa negra) i s'equilibrava amb solució de fosfats (K^+) 300 mM ajustada a pH 7,1 per immersió en ella durant tres períodes de 15 minuts, canviant la solució de fosfat al final de cada període. Aquest tractament es feia en un tub d'assaig adient instal·lat en un bany a 0-4°C.

Per a la reacció de fixació de (3H)AMP cíclic, que era aplicada immediatament després del darrer bany en solució de fosfats, cada gel era submergit en una solució de (3H)AMP cíclic 0,04 μ M amb una activitat específica de 40 mCi/ μ mol i fosfats (K^+) 30 mM ajustada a pH 7,1 dins un tub instal·lat en un bany a 0-4°C. Aquest tractament es feia durar 90 minuts. Tot seguir els gels eren rentats durant tres períodes consecutius de 15 minuts, 5 hores i 15 minuts amb un volum de 100 a 200 ml per gel de solució de fosfats (K^+) 30 mM a pH 7,1. La

solució de rentat era prèviament enfredada a 0-4°C i el recipient de rentat estava instal·lat en un bany a la mateixa temperatura. Amb aquests rentats era eliminat tot el (^3H)AMP cíclic no fixat específicament a les proteïnes contingudes als gels.

A continuació, els gels eren congelats per contacte amb una superfície de CO_2 sòlid i eren tallats en seccions transversals d'un mil·límetre de gruix. Cada una d'aquestes seccions era digerida a l'interior d'un vial de plàstic amb 0,3 ml de H_2O_2 al 30% amb calefacció a 60 °C durant 90 minuts. Aquest tractament alliberava al medi aquós de l'interior del vial la radiactivitat corresponent al (^3H)AMP cíclic fixat per cada secció del gel.

Finalment s'afegien a cada vial 4 ml de la mescla d'escintil·lació que contenia 66% de tolué, 33% de tritó X-100 i 0,5% de PPO. La radiactivitat era mesurava amb un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300) i a partir de les dades obtingudes es representava el perfil d'incorporació de (^3H)AMP cíclic dels gels.

2.4.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PROTEÏNA QUINASA

La determinació de l'activitat proteïna quinasa fou feta segons el mètode de Hirsh i cols. (418) que permet detectar diferents formes de proteïna quinasa i distingir les formes dependents d'AMP cíclic de les independents. Es basa en la incorporació de ^{32}P a un substrat proteic (protamina) a partir de ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP per acció de les activitats quinàsiques

separades per efectroforesi en gels de poliacrilamida.

La preparació dels gels i de les mostres, així com el desenvolupament del procés electroforètic foren fetes en la forma descrita a l'apartat 2.4.3. Finalitzada l'electroforesi, els gels eren extrets dels tubs que els contenien, s'els marcava el front amb un colorant no difonible i eren equilibrats a 0-4°C amb una solució de fosfats (K^+) 300 mM ajustada a pH 7,1, durant tres períodes de 15 minuts, canviant la solució de fosfat al final de cada període.

Els gels es transferien a una solució que contenia 5 mg/ml de protamina, 300 mM de fosfats (K^+) i que estava ajustada a pH 7,1, i s'hi incubaven durant 30 minuts a 4-5°C. Temperatures d'incubació més baixes no són aconsellables car provoquen la precipitació de la protamina. En aquest procés la massa dels gels es carregava de proteïna fosforilable.

Tot seguit cada gel era col·locat dins d'un tub amb solució previamente atemperada a 30°C. Aquesta solució contenia protamina 1,25 mg/ml/fosfats (K^+) 50 mM a pH 7,1/ (γ - ^{32}P) ATP 50 μ M amb una activitat específica de 250-300 μ Ci/ μ mol/ $MgCl_2$ 0,2 mM/ $MgSO_4$ 15 mM/ ditiotreitòl 2 mM. Si interessava revelar l'activitat proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, la solució anterior contenia, a més, AMP cíclic 0,4 μ M. La incubació a 30°C amb solució d'assaig durava 15 minuts al termini dels quals cada gel era submergit en 10 ml d'àcid tricloracètic al 10% a 0-4°C durant 10 minuts. Amb això s'aconseguia que el producte de la reacció, la (^{32}P)protamina, precipités i restés retintut dins de la trama del gel, en aquells punts on s'havia format i acumulat. A continuació els gels eren passats a un volum de 100-200 ml/gel de solució d'àcid tricloracètic al 5% i fosfats (K^+) 50 mM, rentant-s'hi amb agitació suau du

rant 30 minuts. La solució era canviada seguidament i es realitzaven dos rentats addicionals d'una nit i de 30 minuts de durada respectivament.

Els gels eren finalment esbandits amb aigua, congelats per contacte amb una superfície de CO_2 sòlid i tallats en seccions transversals d'un mil·límetre de gruix. Cada una de les seccions es disposava en un vial amb 2,5 ml de mescla d'escintil·lació que contenia 66% de tolué, 33% de tritó X-100 i 0,5% de PPO. La radiactivitat era mesurada en un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300).

2.4.5. DETERMINACIÓ DE PESOS MOLECULARS DE PROTEÏNES

El mètode utilitzat per a estimar el pes molecular de proteïnes, així com per a distingir proteïnes isomèriques amb distinta càrrega o amb estats de polimerització diferents, és el descrit per Hedrick i Smith (419). Consisteix en aplicar a les mostres un procés d'electroforesi en gels de diferent concentració d'acrilamida i representar després el logaritme de la movilitat relativa d'una proteïna determinada envers la concentració d'acrilamida del gel. Les proteïnes amb igual càrrega però diferent massa (p.e. els polímers que la seroalbúmina bovina forma espontàniament en ser dissolta) donen una família de línies no paral·leles que conflueixen en un punt comú (veure a l'apartat 3.1.6.), mentre que els isòmers amb diferent càrrega però amb la mateixa massa (p.e. els isoenzims de la làctic deshidrogenasa) donen línies paral·leles.

El pendent de cadascuna de les línies està relacionat amb el pes molecular de la proteïna que la protagonitza. Donada una proteïna de pes molecular desconegut, aquest pot ésser estimar a partir de la relació pendents-pesos moleculars obtinguda prèviament amb proteïnes de pes molecular conegut.

Els gels per l'electroforesi es prepararen segons que es descriu a l'apartat 2.4.3. operant amb diverses dilucions de la solució d'acrilamida-bisacrilamida per tal d'obtenir concentracions de gels que anéssin del 5% al 10% (p/v). La preparació de les mostres i el desenvolupament de l'electroforesi també es féren tal com es descriu en l'apartat 2.4.3.

Finalitzada l'electroforesi, les bandes de proteïna es posaven de manifest revelant-les segons Wreber i cols.(420) per tinció amb una solució que contenia blau de Coomassie 1,25 g/l. metanol 45% i àcid acètic 9%, i posterior eliminació del colorant no fixat a la proteïna per tractament a 60 °C amb una solució de metanol 5% àcid acètic 7,5%. Per a revelar una determinada proteïna d'entre una barreja múltiple es recorria a revelats específics (veure l'apartat 3.1.6.).

2.4.6. DETERMINACIÓ D'ACTIVITAT INSULÍNICA

Les preparacions d'albúmina bovina purificada que són utilitzades en els medis d'isolament i incubació de cèl·lules poden presentar una certa activitat insulínica residual que constituiria un destorb especialment en els experiments

sobre efectes hormonal (421, 422).

Aquest fet ens creà la necessitat d'establir un control que permetés descartar aquelles preparacions d'albúmina amb activitat insulínica evident.

La insulina estimula el cicle de les pentoses a la cèl.lula adiposa (423, 424) i, per tant, incrementa la descarboxilació del fosfogluconat en el carboni en posició 1 i el despreniment d'aquest en forma de CO_2 . La magnitud d'aquest despreniment constitueix, doncs, un bon criteri de valoració de l'activitat insulínica present a un medi.

El mètode que s'adoptà per la valoració de l'activitat insulínica de l'albúmina que s'havia de utilitzar va ser el descrit per Czech i cols. (425) basat en la detecció del $^{14}\text{CO}_2$ que es desprén d'una suspensió d'adipòcits incubats amb α , D-(1- ^{14}C)-glucosa en presència de l'albúmina a valorar.

L'obtenció de cèl.lules adiposes isolades va ser feta segons la tècnica de Rodbell (426). Es partia de greix epìdidimal de rata mascle jove (rates Wistar de 130-150 g de pes i 4-6 setmanes d'edat, amb 0,5-1,0 g de greix epididimal per animal) que era esmicolat i introduït en un tub ample de plàstic que contenia, en una proporció de 3 ml/g de teixit, solució preparada segons Krebs-Ringer amb el pH mantingut per un sistema de fosfat: NaCl 128,0 mM/ KCl 5,2 mM/ CaCl_2 1,4 mM/ MgSO_4 1,4 mM i $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM ajustada a pH 7,4. Aquesta solució contenia, a més, l'albúmina per a valorar (30 mg/ml) i colagenasa (1 mg/ml) i el pH era reajustat a 7,4 després d'efectuar aquestes addicions.

L'isolament dels adipòcits s'acomplia després d'un

període de 60 minuts de incubació a 37°C amb agitació (100 oscil·lacions/min). La suspensió de cèl·lules es portava a un volum més gran amb solució de Krebs-Ringer amb albúmina a 37°C i era passada a través d'una doble tela de gassa per tal d'eliminar les restes de teixit no disgregat. El filtrat era centrifugat (400 x g, 1 min.) i el líquid sobre el qual suraven les cèl·lules era eliminat per succió. Les cèl·lules eren resuspeses amb 6 ml de la solució de Krebs-Ringer amb albúmina (30 mg/ml) a 37°C i el procés de centrifugació i resuspensió era repetit dues vegades més. La darrera resuspensió es feia a raó de 40 ml per gram de teixit de partida.

La suspensió d'adipòcits era repartida en tubs de plàstic, a raó de 1ml/tub. A cada tub se l'hi afegia 10 µl de solució d' α ,D-(I- 14 C)-glucosa 300 µM amb una activitat específica de 9 µCi/µM. Cada tub era tapat hermèticament amb un tap de goma que duia acoblada una peça de plàstic (Kontes Glass Co., K-882310-0000 (taps) i K-882320-0000) que quedava suspesa a l'interior del tub i en la qual s'hi disposava una peça de 2 x 6 cm de paper de filtre (Whatman tipus 31 ET). La incubació es duia a terme en un bany a 37°C, amb agitació (140 oscil·lacions/min).

Al final d'aquest període s'injectava sobre el paper, i a través del tap de goma, 0,1 ml de fenetilamina que captava el CO₂ produït. Inmediatament s'injectaven sobre el medi d'incubació 0,2 ml de H₂SO₄ 0,1 N que matava els adipòcits i ensem alliberava el CO₂ retingut en la solució.

Els tubs es deixaven tapats uns 20 minuts per tal que tot el CO₂ fós captat. Finalment el con de plàstic i el paper que contenia eren introduïts en un vial amb toluè al 0,5% en PPO, i la radiactivitat del 14 CO₂ era mesurada en un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap

/300).

Als valors en c.p.m. obtinguts en els tubs incubats durant 60 minuts es restaven els valors corresponents a tubs que s'havien tractat amb H_2SO_4 al temps zero de incubació. S'obtenia al cocient entre els valors corresponents a cèl.lules incubades solament amb l'albúmina i a cèl.lules a les quals s'havia afegit, a més, 10 μl d'insulina $10^{-9} M$ a l'inici de la incubació. Es consideraren acceptables totes aquelles preparacions d'albúmina el cocient de valors de les quals era similar al d'una albúmina de referència sense activitat insulínica.

2.4.7. DETERMINACIÓ DE L'AMP CÍCLIC

El mètode seguit va ser el descrit per Gilman (427) basat en la competència entre l'AMP cíclic de la mostra i (3H)-AMP cíclic exògen per fixar-se a una proteïna que s'uneix específicament al nucleòtid. Aquesta proteïna, que presumiblement és la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, va ser purificada prèviament en aquest laboratori (428, 429) seguint les indicacions de Gilman (427).

La mostra a determinar procedia del tractament del material biològic (hepatòcits) amb 1,0 ml d'àcid tricloracètic fred i a una concentració final de 5% (veure l'apartat 2.3.). Al sobrenedant obtingut després de separar la proteïna precipitada per centrifugació se li afegien 10 μl de HCl 10 N que desplaçava al tricloracètic el qual era eliminat mitjançant quatre extraccions amb 5 ml d'èter saturat d'aigua.

Si la nostra contenia una concentració alta de sals (com en el cas que es valorés AMP cíclic alliberat al medi d'incubació) calia tractarla amb una resina captadora d'anions (Bio Rad, tipus AG 1-X2) i a tal fi la mostra era neutralitzada amb NaOH i es feia passar a través de la columna que contenia la resina en estat neutre. Tot seguit la columna es rentava amb 20 ml d'aigua i era tractada amb 6 ml de HCl a pH 2,6 i finalment amb 4 ml de HCl a pH 1,2 que eluïa l'AMP cíclic.

En qualsevol cas, la mostra era finalment liofilitzada (Cryobloc) i el residu sec era redissolt en 50-200 μ l de solució amortidora de pH a base d'acetats (Na^+) 50 mM ajustada a pH 4,5.

La recuperació d'AMP cíclic després de tots els tractaments esmentats era controlada mitjançant l'addició d'una quantitat petita i determinada de (^3H)-AMP cíclic en el moment de la precipitació amb l'àcid tricloracètic i comptatge final d'una alíquota de la solució del producte liofilitzat.

La mescla d'assaig contenia 5 μ l de solució amortidora d'acetat (Na^+) 0,5 M ajustada a pH 4,0, 5 μ l de (^3H) AMP cíclic 0,4 μ M amb una activitat específica de 40 mCi/ μ mol i 20 μ l de mostra. S'hi afegien 20 μ l de la preparació de proteïna enllaçadora d'AMP cíclic diluïda amb solució d'albúmina (0,75 mg/ml) per tal que la quantitat de proteïna que s'introduïa a l'assaig no fixés més del 30% de l'AMP cíclic present. La barreja es deixava incubar a 0°C durant 60 minuts a la fi dels quals era diluïda amb 1,0 ml de solució amortidora de fosfats (K^+) 20 mM ajustada a pH 6,0 i freda, i passada a través d'un filtre de cel.lulosa (Millipore, tipus HA) prèviament reblanit en la mateixa solució de fosfats i col.locat sobre un su-

port enfredat. Després de passar-hi la mostra, el filtre era rentat dues vegades amb 4 ml de la solució de fosfats i, tot seguit, introduït en un vial i dissolt amb 1,5 ml de etilenglicol monometileter.

Finalment s'afegien al vial 4,5 ml de toluè amb 0,5% de PPO i la radiactivitat era mesurada en un comptador de centelleig líquid (Nuclear Chicago, model Isocap/300).

La radiactivitat detectada era inversament proporcional a la quantitat d'AMP cíclic present a la mostra. En cada procés de determinació s'operava amb una sèrie de concentracions conegudes d'AMP cíclic valorades espectrofotomètricament.

2.4.8. DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA

S'aplicava a proteïna en solució segons el mètode descrit per Layne (430) basat en el de Gornall i cols. (431). Les proteïnes en solució formaven un complex colorat quan es posaven en contacte durant 30 minuts amb 4 volums d'una solució que contenia CuSO_4 6mM, tartrat Na-K 20 mM, NaOH 0,75 M. La lectura d'extinció es feia a 550 nm en un espectrofotòmetre (Spectronic model 88 o Beckman model DB-GT) i es comparaven amb solucions de concentració coneguda d'albúmina. Quan la concentració de proteïna era inferior a 2,5 mg/ml s'aplicava el mètode de Lowry i cols. (432). Es barrejaven 0,1 ml de mostra amb 1,0 ml de solució de tartrat sòdic 1,0 mM/ CuSO_4 0,4 mM/ Na_2CO_3 0,2 M/ NaOH 0,1 M. Al cap de 10 minuts s'afegia, tot agitant, 0,1 ml de reactiu de Folin i l'extinció del complex colorat que es formava es llegia al cap de 30 minuts a 750 nm.

500 nm.

2.4.9. DETERMINACIÓ DEL GLICOGEN

El glicogen era extret de les mostres per homogenització d'aquestes en presència de KOH al 30% i calefacció del líquid resultant durant 30 minuts a 100°C. Després d'enfredar aquest digerit a 4°C s'hi afegia etanol fins una concentració final del 66%, i el glicogen es deixava precipitar en fred durant unes hores. El glicogen era separat per centrifugació (3.000 x g, 20 min) i redissolt en aigua.

La quantitat de polisacàrid es mesurava pel mètode de Carroll i cols. (433) afegint en fred 2,5 ml de reactiu d'antrona (antrona 0,05%/tiourea 1%/H₂SO₄ 72%) a 0,5 ml de la solució de glicogen. La barreja es mantenia 10 minuts a 100°C, es refredava i l'extinció del cromògen que es formava era mesurada a 620 nm. El resultat era comparat al d'una sèrie de solucions patró preparades amb quantitats conegudes de glicogen.

2.4.10. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFORILASA QUINASA HEPÀTICA

El mètode que es va posar a punt per determinar l'activitat fosforilasa b kinasa va ser una combinació d'altres mètodes descrits a la bibliografia recent (434, 435, 285, 205,

207) i es basava en provocar la fosforilació del substrat, fosforilasa b, i mesurar seguidament l'activitat fosforilasa a que s'havia format.

L'assaig era aplicat a sobrenedants de 10.000 x g (Sorvall model RC2-B amb rotor angular SM-24, 15 minuts a 0-4 °C) procedents de l'homogeneïtzació del teixit amb 4 parts (p/v) de solució que contenia KF 150 mM, i EDTA 15 mM ajustada a pH 7,0.

Primerament es posaven en un tub d'assaig:

- a) 40 µl de solució amortidora ajustada a pH 7,0 i que contenia β-glicerofosfat sòdic 50 mM i KF 100 mM.
- b) 40 µl de solució de substrat: fosforilasa b 110 U/ml/β-glicerofosfat sòdic 50 mM/KF 100 mM/ditiotreitol 1 mM, ajustada a pH 7,0.
- c) 25 µl de solució d'ATP disòdic 13,3 mM i MgCl₂ 53,3 mM, ajustada a pH 7,0.

La mescla es deixava atemperar a 30°C durant 5 minuts i tot seguit s'iniciava la reacció introduint-hi 25 µl de la mostra. Al cap de 5 minuts es parava la reacció per dilució en una solució d'EDTA 20 mM que segrestava el magnesi, KF 100 mM i ditiotreitol 1 mM ajustada a pH 6,8. Finalment, en una alíquota d'aquesta solució s'hi determinava l'activitat glicogen fosforilasa a pel mètode descrit en l'apartat 2.4.2.

2.5. REACTIUS I PRODUCTES UTILITZATS

Els reactius utilitzats en aquest treball i la firma comercial de procedència son els següents:

2.5.1. REACTIUS GENERALS

"Sigma Chemical Co.":

ATP, sal disòdica (de múscul equí)
AMP cíclic, àcid
albúmina bovina, fracció V
blau de bromofenol
dibutiril AMP cíclic, sal monosòdica
ditiotreitòl
EDTA disòdic
d-(-)-3-fostoglicèrat, sal triciclohexilamònica
glicogen (de fetge de conill)
glucosa 1-fosfat, sal dipotàssica
glucosa 6-fosfat, sal monosòdica
glucosa 1,6-difosfat, sal tetraciclohexilamònica
L-histidina, clorhidrat
protamina (grau I, de salmó)

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)
 tris-hidroximetil-aminometã
 UDPG, sal disòdica (de llevat)
 UTP, sal sòdica (de muscle equí)

"Merck":

antrona	β -glicerofosfat sòdic
clorur magnèsic	L-glicina
clorur sòdic	piridina
carbonat sòdic	sulfat cúpric
EDTA disòdic (Titri- plex III ^R)	sulfat magnèsic
fluorur potàsic	tartrat sòdic-potàsic
reactiu de fenol Fonil- -Ciocalteus	tiourea
fosfat monopotàsic	tris-hidroximetil-aminometã

"Carlo Erba":

acetat sòdic	fosfat disòdic
bicarbonat sòdic	glicerol
clorur càlcic	α -D-glucosa
clorur potàsic	etilenglicolmonometileter
clorur sòdic	blau de tripã

"Bio Rad Labs.":

acrilamida
 N.N'dimetil-bis -acrilamida
 blau de Coomossie R-250

"Baker": àcid acètic

"New England Nuclear": fenetilamina

"Koch-Light": albúmina bovina, fracció V
2,5-difenil oxazol (PPO)

"Eastman Kodak Co.": β -mercaptoetanol

"Aldrich Chemical Co.": 1-metil, 3-isobutil xantina (MIX)

2.5.2. PREPARACIONS ENZIMÀTIQUES

"Sigma Chemical Co.":

fosfatasa alcalina (tipus III, de E. coli)
3-fosfogliorat fosfoquinasa (tipus X, de llevat, --
sense sulfat)
fosfoglucomutasa (de múscul de conill)
fosforilasa p (de múscul de conill)
gliceraldèhid fosfat deshidrogenasa (exempta de sull
fat, de llevat)
hexoquinasa (de llevat)
pirofosfatasa inorgànica (tipus III, de llevat)
UDPG-pirofosforilasa (tipus X, de llevat)

"Worthington Biochemical Corp.": colagenasa (tipus I, de Clostridium histolytium)

2.5.3. PRODUCTES D'ACCIÓ HORMONAL I FARMACOLÒGICA

"Sigma Chemical Co.":

l-(-)-epinefrina, bitartrat
l-(-)-fenilefrina, clorhidrat
dl-(±)-propanolol, clorhidrat
 glucagó

"Eli Lilly Co.": insulina

"Smith, Kline & French, Labs.": fenoxibenzamina, clorhidrat

"CIBA" : fentolamina, metansulfonat (Regitina^R)

2.5.4. PRODUCTES RADIACTIUS

"New England Nuclear".:

UDP-(U-¹⁴C)-glucosa
 (U-¹⁴C)-glucosa-1-fosfat
 (³H) AMP cíclic

"Radiochemical Center, Amersham":

UDP-(U-¹⁴C)-glucosa
 α -D-(U-¹⁴C)-glucosa
 α -D-(1-¹⁴C)-glucosa
 àcid ³²P ortofosfòric

2.5.5. REACTIUS PER CROMATOGRAFIA

"Pharmacia Fine Chemicals": Sephadex G-50 Fine

"Bio Rad Labs": AG 501-X8
 AG 1-X2

2.5.6. BIOSÍNTESI D'UDP-(¹⁴C)-GLUCOSA

La uridina difosfo (U-¹⁴C)-glucosa que inicialment era adquirida a diverses firmes comercials (veure apartat 2.5.4.) va ser obtinguda posteriorment pel procés biosintètic descrit per Thomas i cols. (414) a partir d' α -D-(U-¹⁴C)-glucosa. Aquest procés comprenia el pas de glucosa a glucosa 6-fosfat per acció de l'hexoquinasa, el de glucosa 6-fosfat a glucosa 1-fosfat per la fosfoglucosimerasa i el de glucosa 1-fosfat a UDPglucosa per l'acció combinada de la UDPG-pirofosforilasa i de la pirofosfatasa inorgànica.

La mescla de reacció contenia tris/tris acetat 10 mM ajustat a pH 7,7/ UTP 10 mM/ acetat magnèsic 15 mM/ gluco-

sa 1,6-difosfat 10 μ M/ L-histidina 25 mM/ hexoquinasa 6 U/ml/ fosfoglucomutasa 35 U/ml/ UDPG-pirofosforilasa 10 U/ml/pirofosfatasa inorgànica 15 U/ml i el substrat, (U- 14 C)-glucosa, tot en un volum de 0,5-1,0 ml.

Després d'incubar la mescla a 37°C durant 60-90 minuts el tub que la contenia es col·locava durant 1 minut en un bany a 100°C, i els enzims floculats eren eliminats per centrifugació (3.000 x g, 15 min). Per cada ml de sobrenedant s'afegien, tot seguit, 30 μ l de solució de Tris base 0,5 M i 2 U de fosfatasa alcalina, i la nova mescla era incubada 30 minuts a 37°C. Per últim, s'aplicava a la mostra un procés d'electroforesi d'alt voltatge sobre paper (Whatman, tipus 3 Chroma) a pH 4,4 (piridina 50 mM/àcid acètic) amb una intensitat de 200-220 mA (Pherograph-Frankfurt, model 64). Mitjançant aquest procés la UDP-(U- 14 C)-glucosa formada era separada de la (U- 14 C)-glucosa no transformada. Finalment el producte era extret del paper per cromatografia ascendent amb aigua al 3% en etanol.

2.5.7. BIOSÍNTESI DEL (γ - 32 P) ATP

El (γ - 32 P) ATP, que era un producte que es va utilitzar en experiments sobre activitats quinàsiques, va ser biosintetitzat utilitzant una modificació (436) del mètode de Glynn i Chappell (437). El procés biosintètic es basa en l'acoblament i establiment d'un equilibri entre les reaccions de la gliceraldehid-fosfat deshidrogenasa i de la fosfogliceratquinasa. El γ -fosfat de l'ATP present en el medi es va enriquir en 32 P pel procés continu de cessió i recuperació a

a que resta sotmés quan es crea l'equilibri. La mescla de reacció contenia tris/tris clorhidrat 50 mM ajustat a pH 8,0/ MgCl_2 6 mM/NaOH 10 mM/ mercaptoetanol 0,4 $\mu\text{l/ml}$ /ATP 3 mM/àcid 3-fosfoglicèric 1 mM/ gliceraldehid fosfat deshidrogenasa 20 U/ml/ NAD^+ 0,2 μM / fosfogliceratquinasa 40 U/ml i ^{32}P en forma d'àcid ortofosfòric que s'afegia en darrer lloc i que iniciava la reacció. S'operava amb un volum total de 5 ml i a temperatura ambient.

La incorporació de ^{32}P a l'ATP era avaluada tractant alíquotes de mescla reactiva amb carbó actiu que adsorbeix l'ATP per ser un nucleòtid d'adenina. Quan la radiactivitat fixada al carbó actiu era superior al 50% de la total, el procés es donava per finalitzat i s'aturava per calefacció a 100 °C durant 30-60 segons.

El (γ - ^{32}P)ATP format era separat dels altres components mitjançant el pas per una columna d'intercanvi iònic (Bio Rad, tipus AG 1-X2). La resina (2 grams) era tractada previament amb successius volums de 20 ml d'acetona, NaOH 1 N, acetona i HCl 1 N, i amb rentats amb 20 ml d'aigua entre cadascun d'aquests tractaments. Finalment s'hi passava 2 ml de Tris base 1 M i aigua fins que l'eluït tenia pH neutre.

La mescla que contenia l'ATP era introduïda a la columna i tot seguit s'hi passaven 30 ml de NH_4Cl 20 mM/HCl 20 mM que eluïen el fosfat i l'ADP residuals, després 30 ml d'aigua que arrossegava el NH_4^+ , i finalment HCl 250 mM en dues fraccions de 10 i 30 ml respectivament. Aquestes últimes, que eluïen el (γ - ^{32}P)ATP, eren recollides sobre un bany a 0-4 °C i addicionades amb 1 ml de Tris base 1 M i s'acabaven de neutralitzar amb KOH 1 M.

La radiactivitat específica del producte obtingut era determinada per comptatge d'una alíquota en tolué-0,5% PPO i per la valoració espectrofotomètrica de la concentració d'ATP present a la solució.

3. RESULTS

3.1. PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC HEPÀTICA

Una part del treball està centrada en l'estudi detallat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica. Aquest enzim constitueix un esglaó fonamental en la cadena que transmet l'estímul glicogenolític de les hormones que interacc_on_oten amb receptors lligats a l'adenil ciclase. Les formes d'aquest enzim presents al fetge, concretament als hepatòcits, estan poc estudiades tant pel que fa a característiques moleculars com a resposta a estímuls hormonals.

Potencialment les hormones glicogenolítiques poden dur a terme llur efecte estimulant la producció d'AMP cíclic per l'adenil ciclase, la qual cosa provocaria l'activació per dissociació de la proteïna quinasa. Si no succeeix així vol dir que l'acció hormonal transcorre per mecanismes intracel·lulars independents de tal sistema. Resulta, doncs, imprescindible poder interrelacionar l'estat d'activació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic amb la resta dels esdeveniments derivats de la presència d'una hormona determinada a l'entorn cel·lular per tal de conèixer el seu mecanisme d'actuació.

L'estudi de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic d'hepatòcits ha estat emprés utilitzant la tècnica que Guinovart i col·laboradors (416) posaren a punt per estudiar els sistemes d'adipòcits i de diafragma.

3.1.1. IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES FIXADORES DE ^3H 'AMPc.

0,4 g d'hepatòcits fören homogeneïtzats amb 2 ml de KF 150 mM/EDTA 15 nM (pH 7,0). L'homogeneïtzat va ser centrifugat durant 15 minuts a 10.000 x g, i el sobrenedant preparat per a l'electroforesi en gels de poliacrilamida que va ser aplicada tal com es descriu a Mètodes.

Revelant els gels apareixien tres pics principals de fixació de ^3H -AMP cíclic (FIGURA 1). Aquests pics corresponien a uns valors de Rf de 0,22 (pic 1), 0,30 (pic 2) i 0,34 (pic 3) respecte al front electroforètic marcat pel colorant aniònic. Els valors de Rf eren molt reproduïbles d'experiment a experiment (variacions màximes de $\pm 0,02$ al pic 1 i de $\pm 0,01$ als pics 2 i 3). Així mateix, el perfil d'incorporació representat a la figura va ser el repetidament obtingut en nombrosos experiments. Dels tres pics, el més prominent era el 1, mentre que el pic 3 ho era molt poc, tant que la seva existència podia assegurar-se més per la seva reproduïbilitat que per la seva magnitud.

El revelat de gels corresponents a extractes cel·lulars incubats durant 60 minuts a 0°C amb AMP cíclic $1\ \mu\text{M}$ donava un perfil ben diferent del corresponent a mostres control incubades en les mateixes condicions però en absència d'AMP cíclic. Malgrat presentar tres pics amb valors de Rf idèntics als de les mostres control, els extractes incubats amb el nucleòti de tenien un pic 1 gairebé inexistent, mentre que el 3 era, aleshores, el més notable (FIGURA 2). El pic 2 romanía inalterat després del tractament amb AMP cíclic a la concentració descrita.

La desaparició de radiactivitat al pic 1 i l'aparició simultània al pic 3 no era un fenomen quantitatiu sino que

FIGURA 1 PERFIL D'INCORPORACIÓ DE ^3H -AMP CÍCLIC DESPRÉS D'ELECTROFORESI D'EXTRACTES CRUS D'HEPATÒCITS DE RATA EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

I - Les mostres procedien d'hepatòcits incubats sense hormones.

Els extractes crus d'aquests hepatòcits tampoc foren incubats amb cap efector.

Després de l'electroforesi i revelat amb ^3H -AMP cíclic apareixien un pic principal (R_f 0,22) i dos de menors (R_f 0,30 i R_f 0,34).

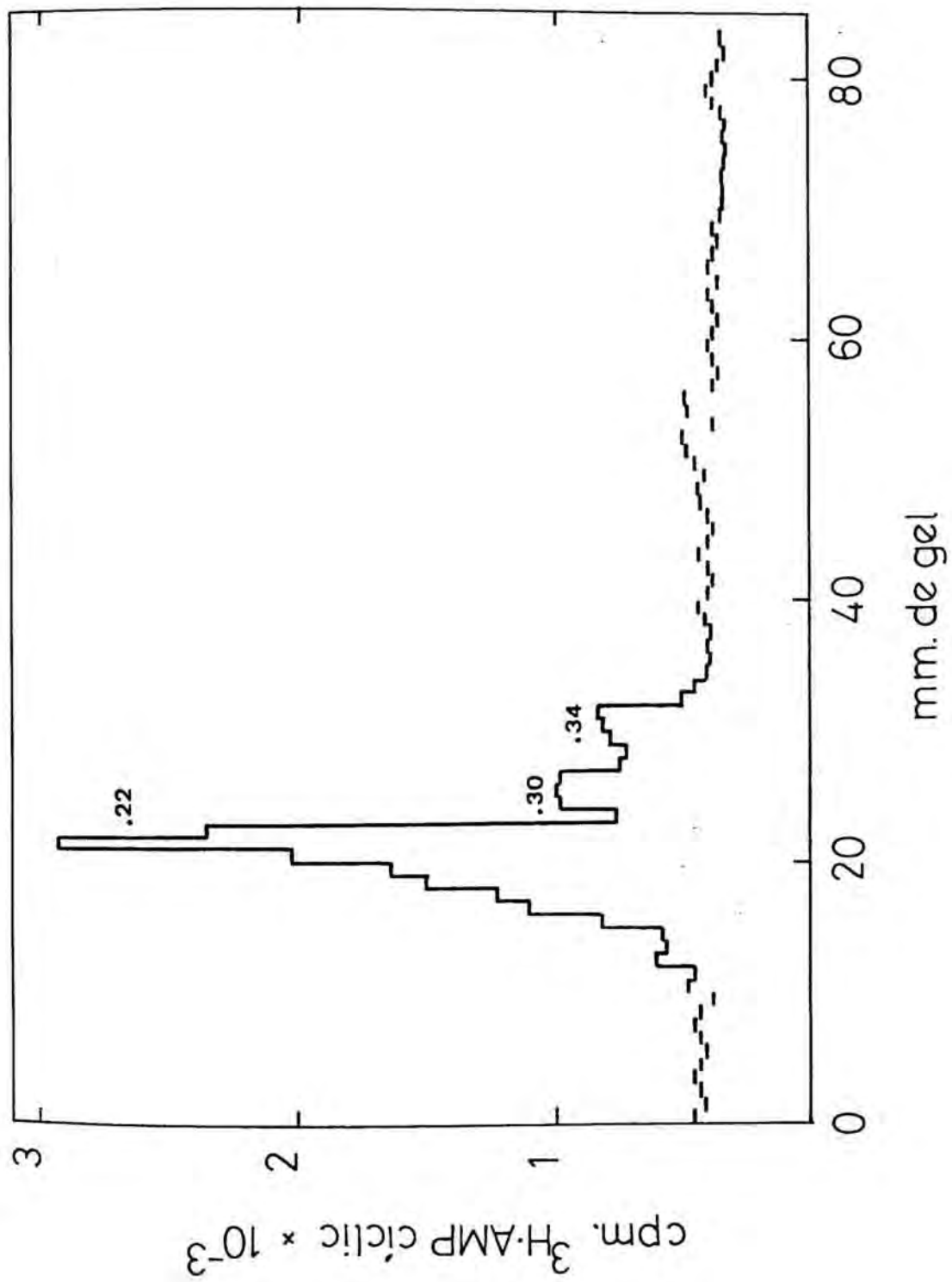
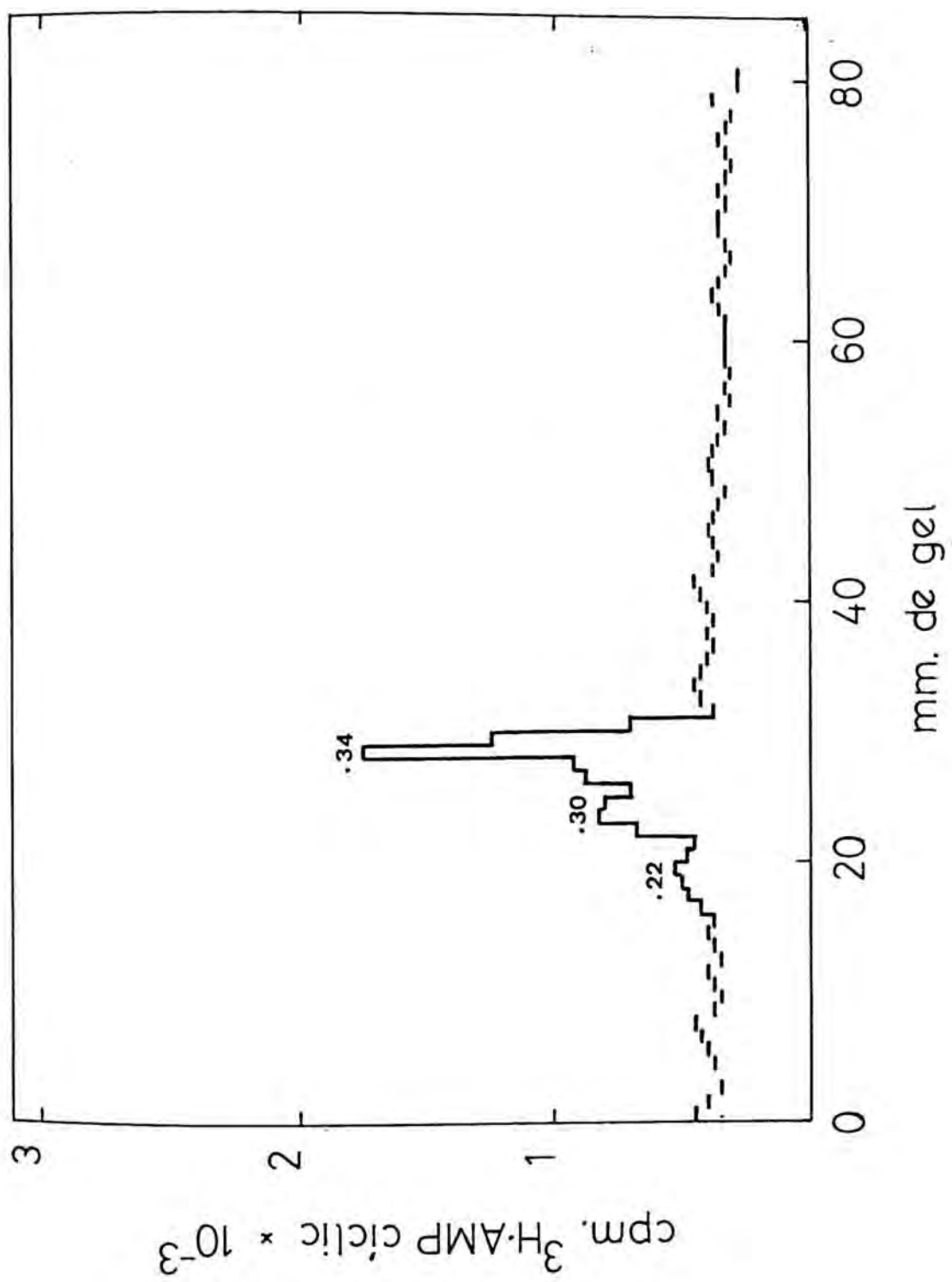


FIGURA 2 PERFIL D'INCORPORACIÓ DE ^3H -AMP CÍCLIC DESPRÉS D'ELECTROFORESI D'EXTRACTES CRUS D'HEPATÒCITS DE RATA EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

II - Extractes incubats amb AMP cíclic.

Extractes crus procedents d'hepatòcits no tractats amb hormones, foren incubats amb AMP cíclic 10^{-6} M durant 60 minuts a 0°C .

Després de l'electroforesi i revelat apareixien un pic principal (R_f 0,34) i dos de menors (R_f 0,22 i R_f 0,30).



el valor de l'àrea d'aquest darrer era aproximadament la meitat del valor de l'àrea del pic 1 corresponent en el control no tractat.

Aquests resultats suggerien la presència d'una forma holoenzimàtica principal que en els gels corresponia a la posició de R_f 0,22 (pic 1). En ser holoenzimàtica i, per tant, posseir subunitats reguladores, es revelava per l'AMP cíclic triat que fixaven aquestes subunitats. Aquesta forma era fàcilment dissociable per incubació amb AMP cíclic i donava subunitats reguladores lliures que, als gels, corrien amb un R_f de 0,34 (pic 3). Aquestes subunitats eren revelables per intercanvi entre l'AMP cíclic que duien fixat des d'abans d'entrar al gel i el ^3H .AMP cíclic present al medi de revelat. Una forma que probablement corresponia a un segon estat holoenzimàtic més difícilment dissociable per AMP cíclic també era present als extractes d'hepatòcits (pic 2).

Un tercer tipus d'experiment va ser dut a terme introduint ^3H .AMP cíclic a les mostres abans del tractament electroforètic. Les mostres foren incubades durant 60 minuts a 0°C amb ^3H .AMP cíclic $0,4\ \mu\text{M}$ amb una radiactivitat específica de $40\ \text{mCi}/\mu\text{mol}$. Finalitzada l'electroforesi, els gels no eren sotmesos a cap tractament de revelat sino que eren tallats i comptats directament. La radiactivitat apareixia acumulada gairebé en un sol pic molt definit, amb un valor de R_f de 0,34 (FIGURA 3). La presència d'un petit pic amb R_f de 0,30 era dubtosa a molts dels gels.

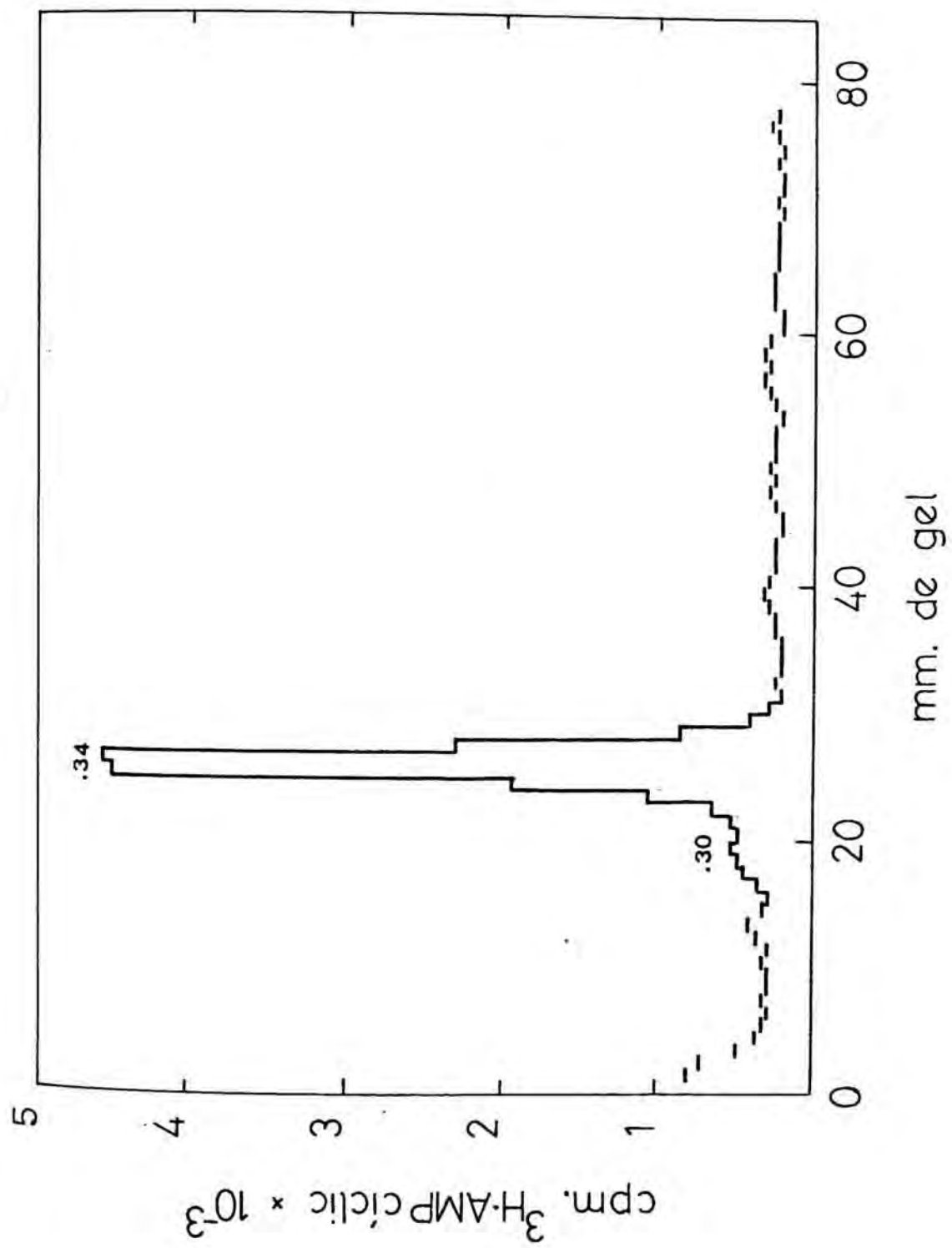
3.1.2. CORRELACIÓ DE L'ACTIVITAT PROTEÏNA QUINASA AMB LA FIXACIÓ DE ^3H .AMP CÍCLIC.

Per tal de caracteritzar totalment els pics fixadors

FIGURA 3 LOCALITZACIÓ DE LA RADIATIVITAT DESPRÉS DE L'ELECTROFORESI EN GEL D'EXTRACTES INCUBATS AMB ^3H -AMP CÍCLIC.

Els extractes d'hepatòcits foren incubats durant 60 minuts a 0°C en presència de ^3H -AMP cíclic $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ (40 Ci/mmol).

Després de l'electroforesi apareixia un pic molt evident (R_f 0,34) d'incorporació de radiactivitat i un altre molt petit i poc reproduïble.



de ^3H .AMP cíclic del perfil electroforètic intentàrem correlacionar-los amb activitats proteïna quinasa.

Cada mostra, obtinguda d'igual manera que per a la identificació de proteïnes fixadores de ^3H .AMP cíclic, era aplicada a uns quants gels i sotmesa a electroforesi. Una part dels gels era seguidament destinada al revelat d'activitat proteïna quinasa incubant amb protamina, ^{32}P .ATP i Mg^{2+} i eventualment amb AMP cíclic si es desitjava mesurar l'activitat en presència del nucleòtid. La resta dels gels era destinada al revelat de fixació de ^3H .AMP cíclic.

Quan fóren estudiats extractes cel.lulars corresponents a hepatòcits control incubats sense hormones es varen obtenir els perfils exposats a la FIGURA 4.

En el perfil d'incorporació de ^{32}P corresponent al revelat en absència d'AMP cíclic d'aquests extractes apareixien dos pics principals amb Rf respectius de 0,12 i 0,18, i dos més molt poc evidents en uns casos o inexistents del tot en altres amb Rf de 0,22 i 0,30 respectivament. Quan el revelat de l'activitat quinasa als gels es feia en presència d'AMP cíclic s'obtenia un perfil d'incorporació de ^{32}P que presentava dos pics, a Rf de 0,12 i 0,18, de la mateixa magnitud que els presents amb aquests Rf als gels revelats sense AMP cíclic. En canvi, la presència del nucleòtid al medi de revelat feia molt evident el pic amb Rf de 0,22, gairebé inexistent al primer perfil descrit. L'increment de la magnitud del pic amb Rf de 0,30 era bastant dubtós. La posició d'aquests dos pics d'activitat protamina quinasa corresponia amb la posició dels pics 1 i 2 del perfil de revelat per fixació de ^3H .AMP cíclic.

Al pic 3 d'aquest darrer perfil no li corresponia cap mena d'activitat protamina quinasa ni en presència ni en absèn-

cia d'AMP cíclic al medi de revelat d'aquesta activitat.

Ens uns altres experiments es va operar amb extractes procedents d'hepatòcits que havien estat incubats durant 2 minuts amb una dosi elevada, 10^{-7} M, de glucagó. El perfil de incorporació de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic corresponent a aquests extractes (FIGURA 5) tenia un aspecte molt similar al de la FIGURA 2: el pic de Rf 0,34 molt prominent i el de Rf 0,22 molt deprimat, mentre que el de Rf 0,30 romania gairebé inalterat respecte als controls. El perfil d'activitat protamina quinasa revelada sense AMP cíclic i el de la revelada en presència del nucleòtid eren sensiblement equivalents. Apareixien activitats quinàsiques independents d'AMP cíclic amb Rf de 0,12 i 0,18 respectivament, tal com succeïa als perfils corresponents a cèl·lules control. Aquestes dues activitats eren precedides per algunes altres (Rf 0,9 i 0,14) poc reproduïbles. Amb Rf de 0,22 i 0,30 apareixien dos pics molt petits, gairebé no estimulables per AMP cíclic.

Aquests resultats mostraven, d'una banda, la presència d'importantes activitats proteïna quinasa independents d'AMP cíclic als hepatòcits. D'una altra, i pel que fa a les activitats dependents d'AMP cíclic, demostraven que els pics 1 i 2 dels perfils de fixació de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic corresponien, tal com s'havia suposat, a dues formes holoenzimàtiques de les quals la més activa era la del pic 1 o holoenzim 1 (H_1). Ambdues formes es presentaven únicament residuals als gels corresponents a hepatòcits tractats amb glucagó. En aquests darrers gels, malgrat haver-hi un fort pic 3 de fixació de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic, no apareixia cap mena d'activitat quinasa en aquesta posició la qual cosa volia dir que, efectivament, el pic 3 corresponia a les subunitats reguladores lliures, (R).

A la FIGURA 6 es comparen els perfils d'activitat

FIGURA 4 LOCALITZACIÓ D'ACTIVITATS PROTEÏNA QUINASA DESPRÉS D'ELECTROFORESI D'EXTRACTES D'HEPATÒCITS EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

I - Hepatòcits incubats sense hormones.

L'activitat proteïna quinasa als gels fou revelada en absència (o) o en presència (●) d'AMP cíclic.

El perfil ombrejat correspon al revelat per fixació de ^3H . AMP cíclic en gels duplicats.

Apareixien dues activitats proteïna quinasa independents d'AMP cíclic i dues més de dependents.

Aquestes darreres tenien el mateix R_f que els dos primers pics del revelat amb ^3H .AMP cíclic.

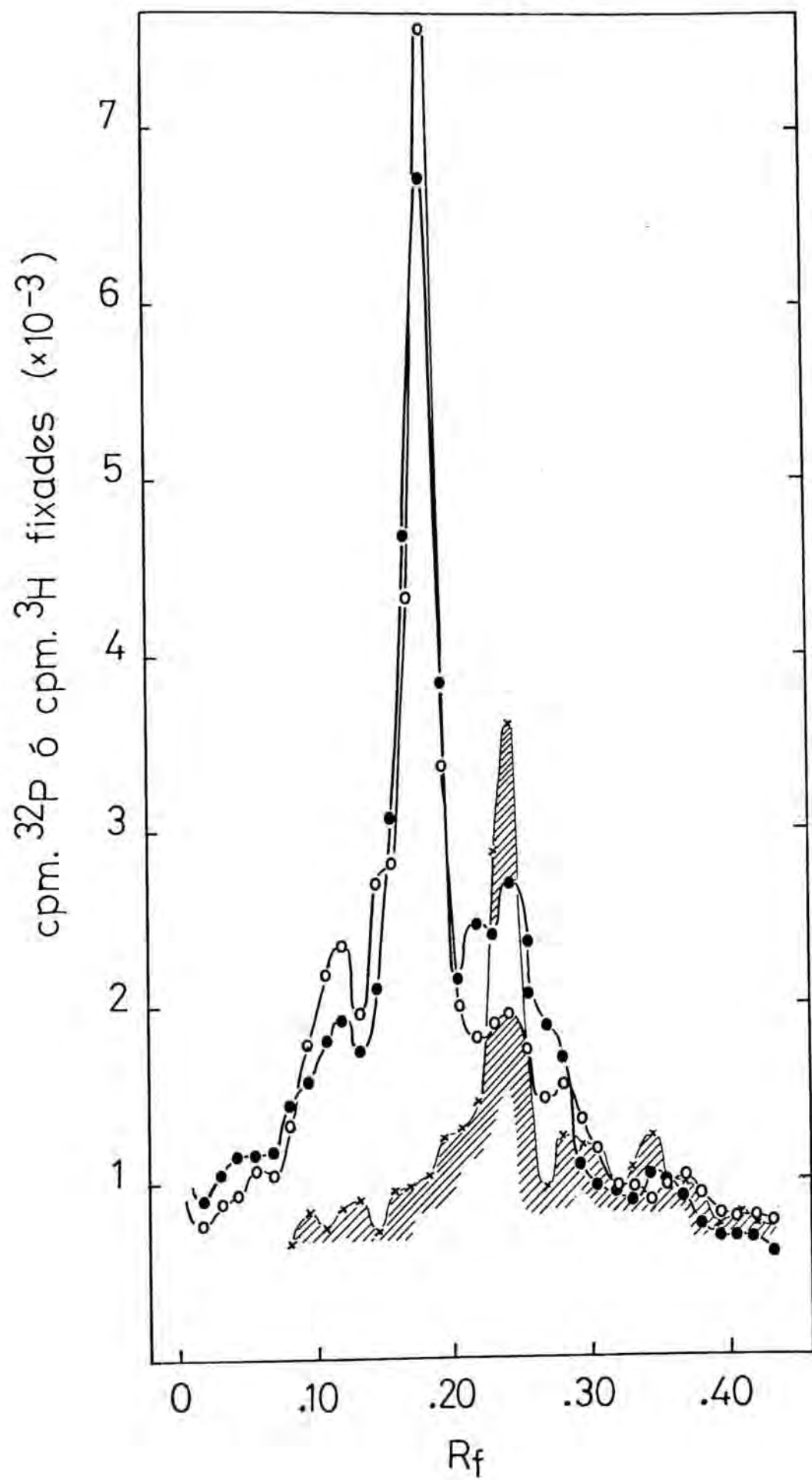


FIGURA 5 LOCALITZACIÓ D'ACTIVITATS PROTEÏNA QUINASA DESPRÉS D'ELECTROFORESI D'EXTRACTES D'HEPATÒCITS EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

II - Hepatòcits tractats durant 2 minuts amb glucagó $10^{-7}M$.

L'activitat proteïna quinasa als gels fou revelada en absència (○) o en presència (●) d'AMP cíclic.

A la gràfica hi ha sobreposat el perfil de fixació de 3H -AMP cíclic corresponent.

Apareixien les mateixes activitats proteïna quinasa independents d'AMP cíclic que a la Figura 4, però no es detectava cap activitat dependent del nucleòtid.

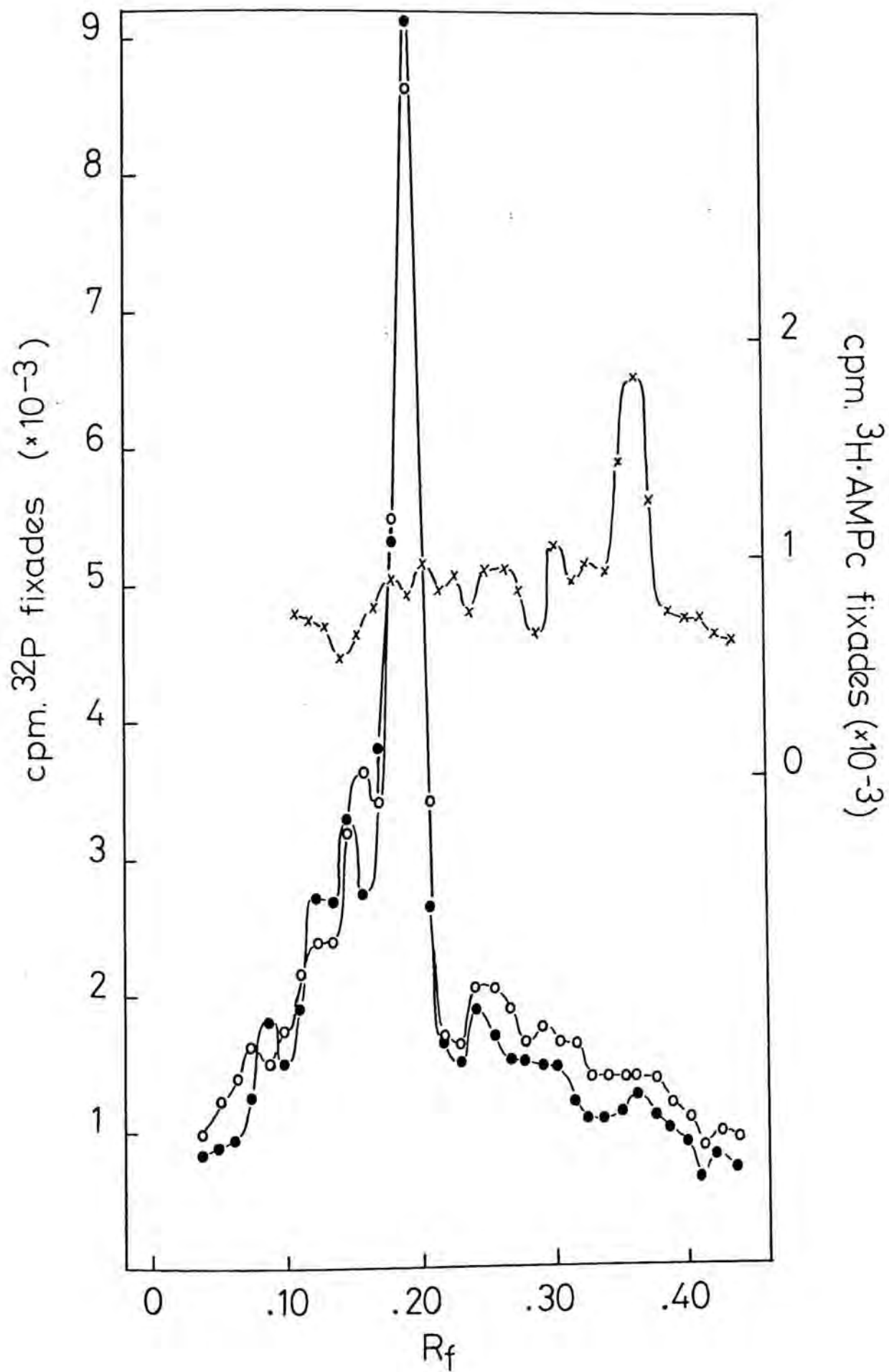
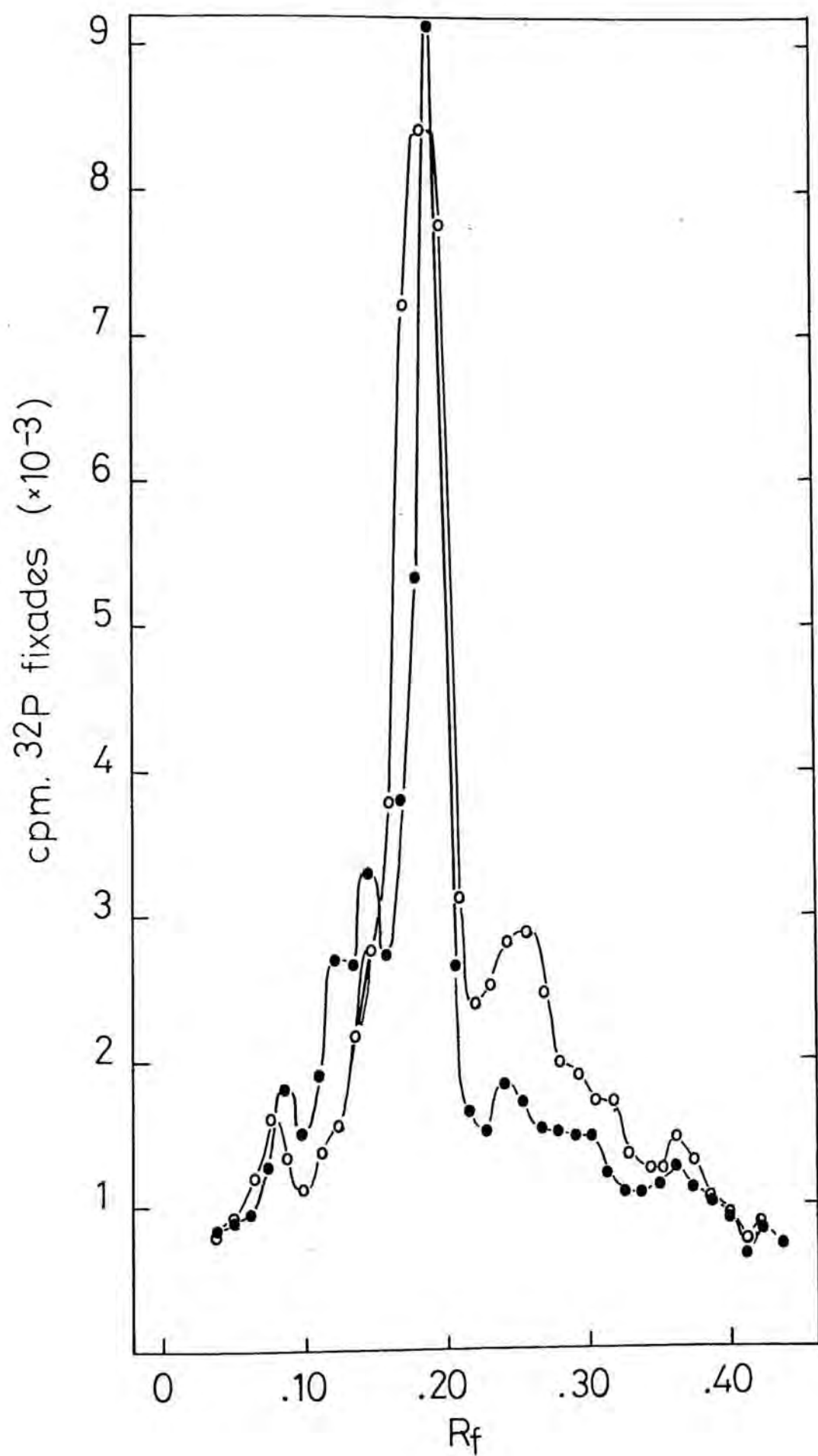


FIGURA 6 PERFILS D'ACTIVITAT PROTEÏNA QUINASA REVELADA EN PRESÈNCIA D'AMP CÍCLIC DESPRÉS DE L'ELECTROFORESI D'EXTRACTES DE CÈL·LULES TRACTADES AMB GLUCAGÓ.

Són comparats els perfils d'activitat proteïna quinasa corresponents a cèl·lules control incubades sense hormones (○) i cèl·lules incubades 2 minuts amb glucagó 10^{-7} M (●). El glucagó determinava l'extinció gairebé total de les activitats proteïna quinasa dependents d'AMP cíclic (Rf 0,22 i Rf 0,30), però no modificava les altres activitats.



quinasa mesurada en presència d'AMP cíclic corresponents a cèl·lules incubades sense hormones i a cèl·lules incubades durant 2 minuts amb glucagó 10^{-7} M. Les activitats quinàsiques independents d'AMP cíclic que apareixien als gels no eren modificades per l'acció hormonal. Aquesta, en canvi, determinava la quasi total desaparició de les dues formes amb activitat quinasa dependent d'AMP cíclic.

3.1.3. ESTUDI DE LA DISSOCIACIÓ DE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC PER ACCIÓ DEL NUCLEÒTID "IN VITRO".

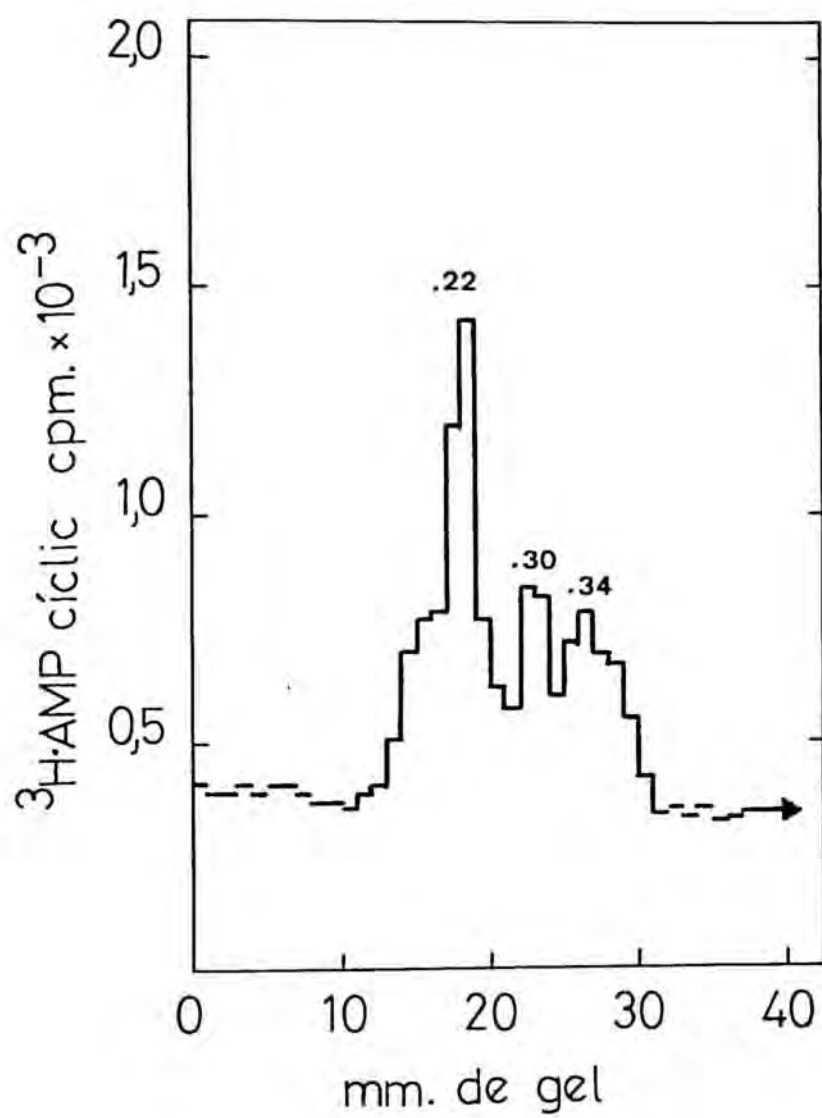
Comparant les FIGURES 1 i 2 s'observà que el pic de Rf 0,30 (holoenzim H_2) romanía gairebé inalterat per la incubació dels extractes cel·lulars amb AMP cíclic $1 \mu\text{M}$ durant 60 minuts, condicions suficients per a produir la desaparició gairebé total, per dissociació, del pic de Rf 0,22 (holoenzim H_1). Per tal d'investigar la possibilitat que els holoenzims H_1 i H_2 presentessin una sensibilitat diferent a la dissociació per AMP cíclic, mostres d'extractes cel·lulars fóren incubades amb concentracions creixents d'AMP cíclic.

A fi d'evitar la destrucció de l'AMP cíclic introduït a aquestes mostres, les incubacions es féren en presència de 1-metil,3-isobutil xantina (MIX), un conegut inhibidor de l'activitat nucleòtid cíclic fosfodiesterasa, a una concentració de 0,6 mM. Previ als assajos amb AMP cíclic es va voler conèixer l'efecte que el MIX tenia "per se" sobre l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Els perfils de fixació de ^3H -AMP cíclic corresponents a cèl·lules control incubades a 0°C durant 45 minuts a la indicada concentració de MIX (FIGURA 7) mostraven un cert grau de dissociació de H_1 si hom els comparava amb els corresponents a cèl·lules control incubades sense MIX (p.e., FIGURA 1). Aquest efecte era degut proba-

FIGURA 7 PERFIL DE FIXACIÓ DE ^3H -AMP CÍCLIC DESPRÉS D'ELECTROFORESI D'EXTRACTES CRUS INCUBATS AMB 1-METIL, 3-ISOBUTIL XANTINA.

Extractes de cèl.lules no tractades amb hormones foren incubats durant 45 minuts a 0 °C amb 1-metil, 3 isobutil xantina 6×10^{-7} M.

Apareixia un descens relatiu de les cpm. de l'holoenzim H_1 (R_f 0,22) i un increment en les de la subunitat R (R_f 0,34).



blement a que la MIX evitava la hidròlisi de petites quantitats d'AMP cíclic que certes proteïnes que el duïen fixat l'anaven alliberant al medi durant el període d'incubació.

Per a dur a terme els experiments sobre dissociació de la proteïna quinasa per AMP cíclic "in vitro", 0,5 g de cèl·lules foren homogenitzats amb 1,0 ml de KF 150 mM/EDTA 15 mM (pH 7,0) i el resultant centrifugat a 10.000 x g durant 15 minuts. El sobrenedant es repartí en tubs d'assaig que foren incubats durant 45 minuts amb concentracions d'AMP cíclic compreses entre 0,01 μ M i 5 μ M, en presència de MIX 0,6 mM. Seguidament les mostres foren sotmeses a electroforesi en gel i revelades per fixació d'AMP cíclic.

A la FIGURA 8 es mostra com una concentració d'AMP cíclic de 0,1 μ M causava la gairebé total desaparició del pic corresponent a l'holoenzim H_1 , mentre que el corresponent a l'holoenzim H_2 romania no significativament alterat. El pic corresponent a les subunitats reguladores R també assolía gairebé el màxim canvi en magnitud a una concentració de 0,1 μ M d'AMP cíclic. Concentracions superiors no modificaven sensiblement més el pic corresponent a H_1 que, d'altra banda, ja era mínim. El pic corresponent a R experimentava encara un lleuger increment en magnitud, i el de H_2 no començava a variar de manera significativa fins que les concentracions d'AMP cíclic al medi no eren superiors a 1 μ M.

L'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic enfronta la concentració del nucleòtid dissociador en l'experiment anterior es presenta a la FIGURA 9. El paràmetre que utilitzem com a definitori de l'estat de dissociació és el cocient entre les cpm. al pic de la subunitat reguladora i les presents al de l'holoenzim H_1 .

FIGURA 8 EFECTE DE L'AMP CÍCLIC SOBRE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AQUEST NUCLEÒTID.

Extractes d'hepatòcits foren incubats amb diverses concentracions d'AMP cíclic. Les incubacions (45 minuts a 0 °C) foren fetes en presència de MIX 6×10^{-7} M.

- (●) cpm. corresponents a l'holoenzim H_1 (R_f 0,22)
- (○) id. holoenzim H_2 (R_f 0,30)
- (▲) id. subunitat R (R_f 0,34)

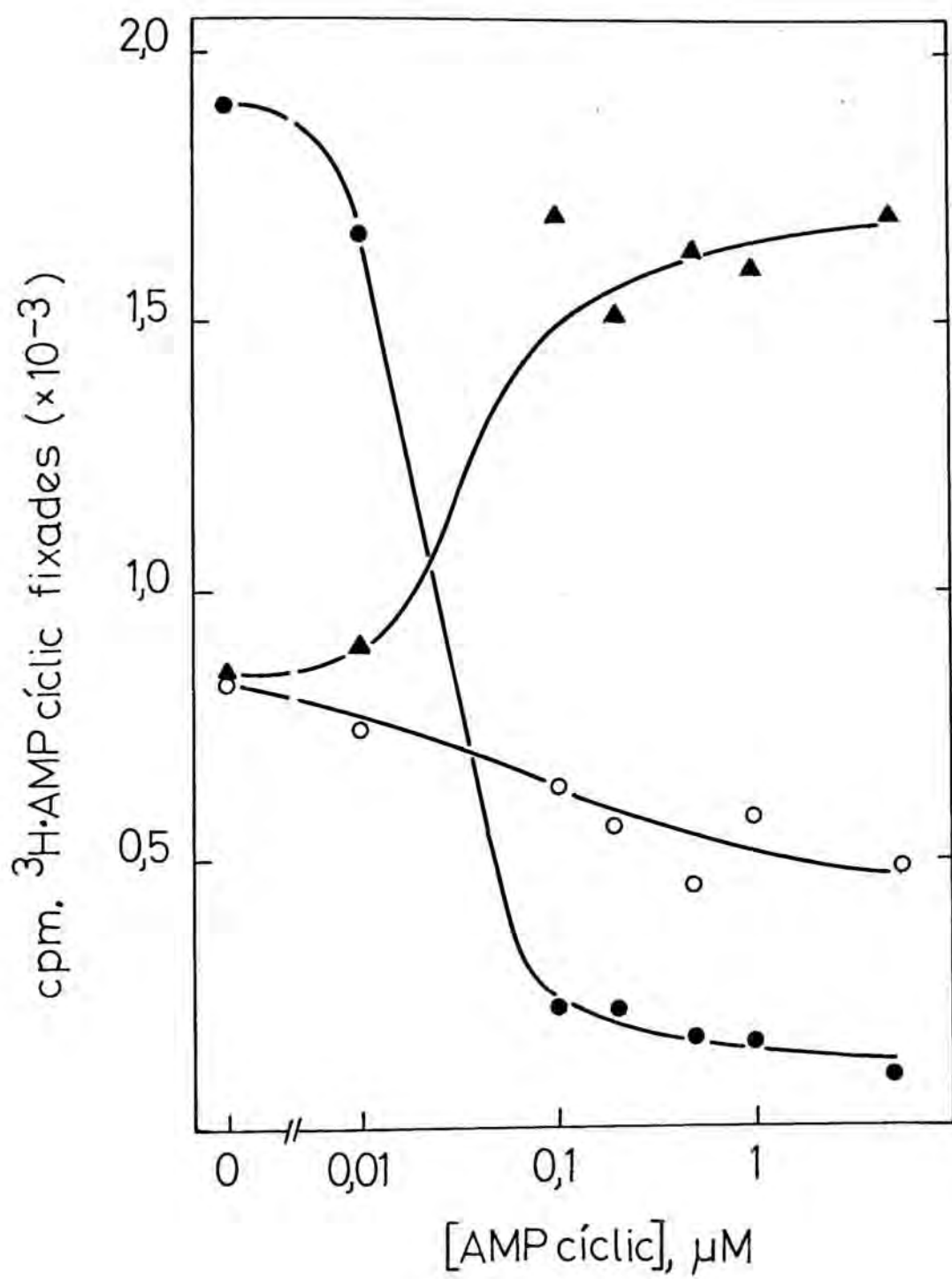
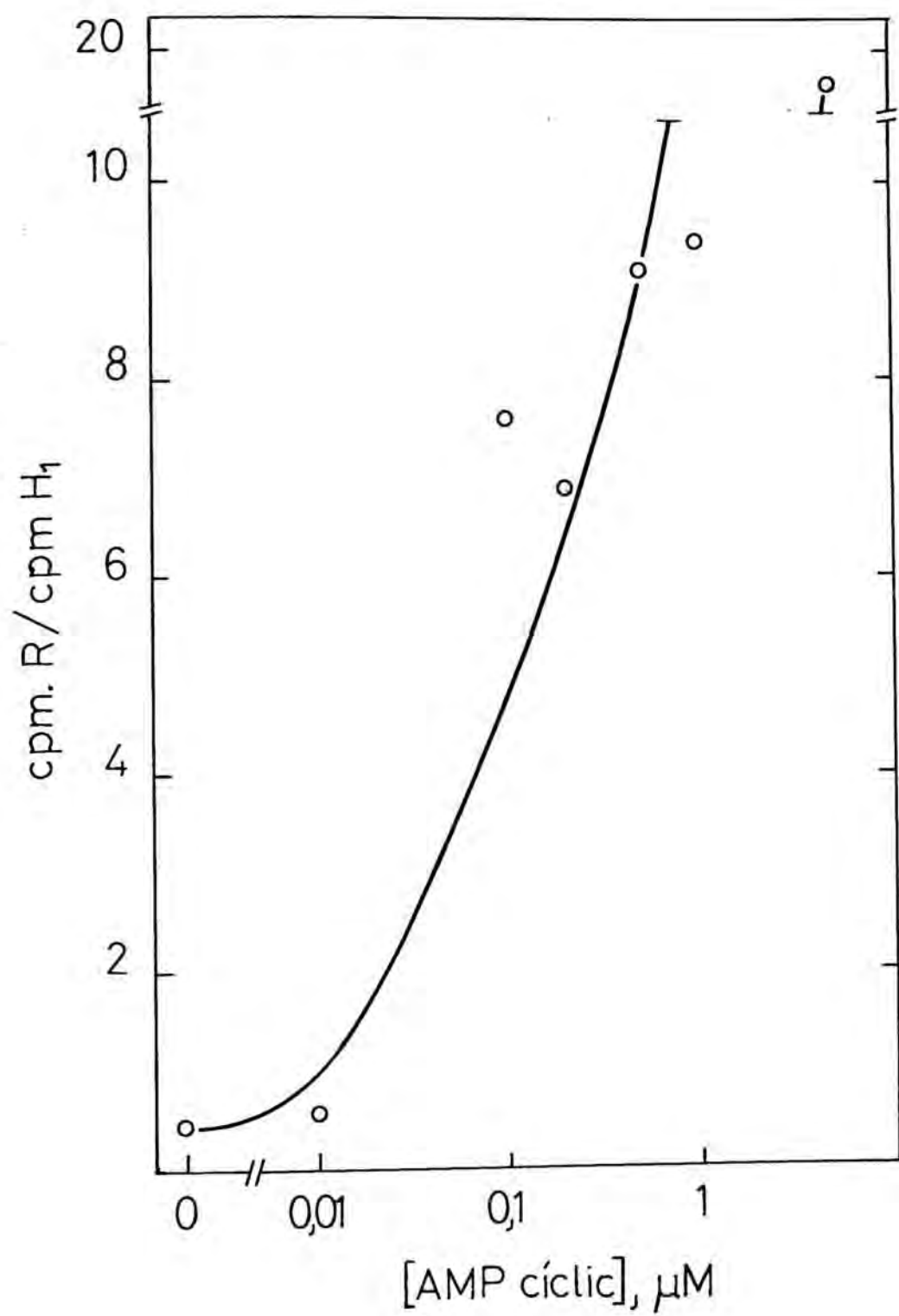


FIGURA 9 REPRESENTACIÓ DEL GRAU DE DISSOCIACIÓ DE L'HOLoenzim H_1 DE LA PRoTEÍNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC VERSUS LA CONCENTRACIÓ D'AMP CÍCLIC AFEGIT ALS EXTRACTES DE CÈL.LULES HEPÀTIQUES.

Les condiciones experimentals fóren les descrites a la Figura 8.



3.1.4. DISSOCIACIÓ DE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC "IN VIVO" PER ACCIÓ DEL GLUCAGÓ.

La modificació de l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic per acció del glucagó quan els hepatòcits eren incubats amb aquesta hormona ja ha estat descrita, de passada si més no, a l'apartat 3.2.2. i representa da a la FIGURA 5. El glucagó era totalment efectiu com a agent dissociador de l'enzim "in vivo" de la mateixa manera que l'AMP cíclic ho era "in vitro" per acció sobre els extractes cel.lulars.

A fi d'esbrinar quins eren els límits de la modificació de l'estat de dissociació de l'enzim per acció del glucagó fôren portats a terme experiments consistents a incubar hepatòcits amb diverses dosis de l'hormona i mesurar les variacions que es produïen a cadascun dels pics fixadors de ^3H -AMP cíclic als gels d'electroforesi.

Per realitzar aquests experiments, alíquotes de suspensió cel.lular (3,5 ml, concentració de la suspensió 10^7 cèl.lules/ml) fôren preincubades durant 10 minuts a 37°C i tot seguit adicionades amb concentracions de glucagó compreses entre 10^{-11} M i 10^{-6} M. Les incubacions amb glucagó es feren durar 3 minuts al final dels quals les cèl.lules fôren homogeneïtzades amb 0,250 ml de KF 150 mM/EDTA 15 mM (pH 7,0), i les mostres sotmeses a processos d'electroforesi i revelat tal com ja ha estat indicat. Paral.lelament s'operà amb controls de cèl.lules incubades sense glucagó. Es va observar que la mínima concentració d'hormona que causava un efecte significatiu sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic en aquestes condicions era 10^{-8} M glucagó (FIGURA 10). Aquesta concentració causava una disminució notable a la radiactivitat fixada per l'holoenzim H_1 i una sensible elevació a la fixada per la subunitat R. La desa

FIGURA 10 EFECTE DE LA INCUBACIÓ AMB DIVERSES CONCENTRACIONS DE GLUCAGÓ SOBRE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC D'HEPATÒCITS DE RATA.

Els hepatòcits foren incubats amb glucagó durant 3 minuts i l'estat de dissociació de la proteïna quinasa determinat tot seguit per electroforesi en gel de poliacrilamida i revelat per fixació de ^3H -AMP cíclic.

(●) cpm. corresponents a l'holoenzim H_1 (R_f 0,22)

(○) id. holoenzim H_2 (R_f 0,30)

(▲) id. subunitat R (R_f 0,34)

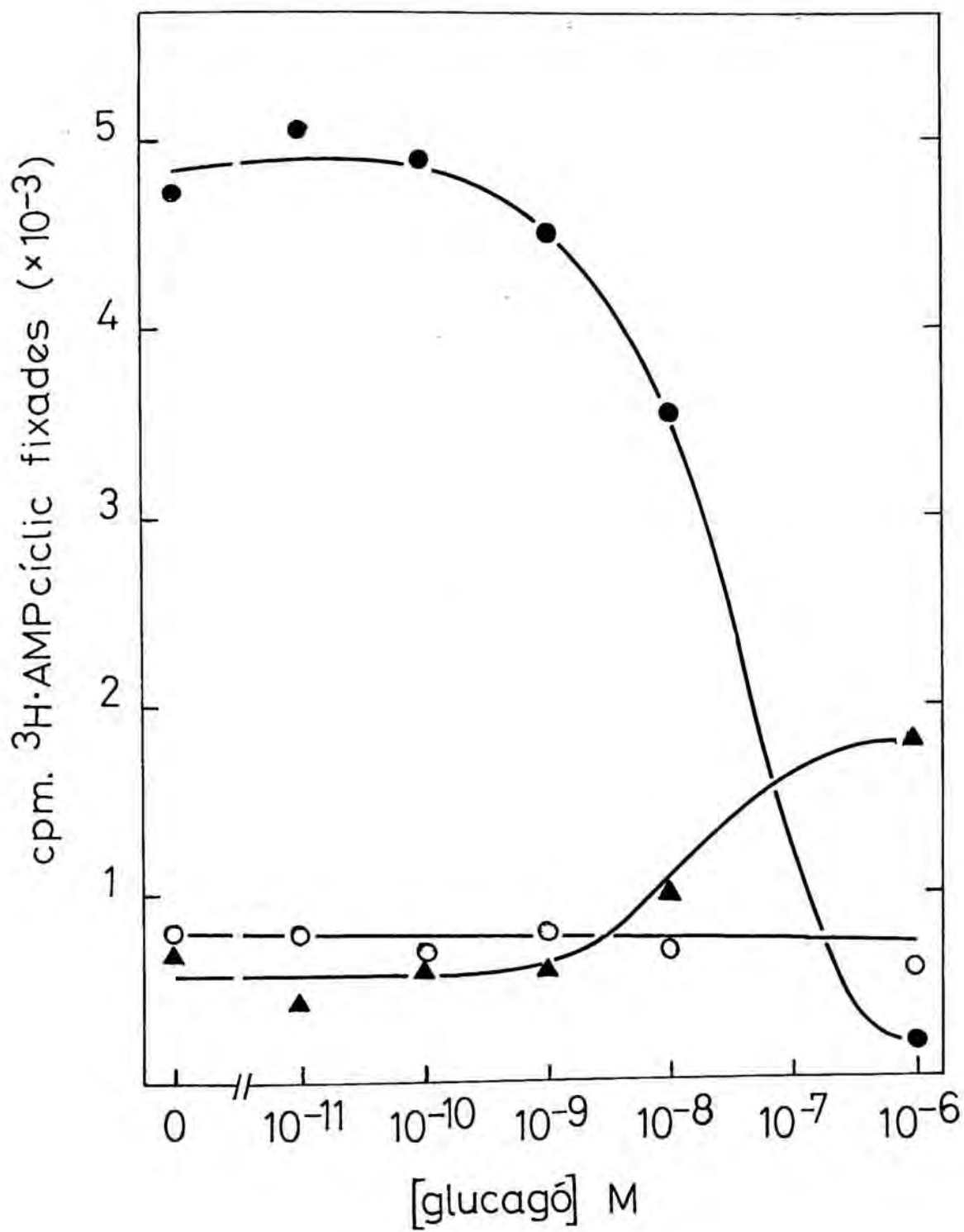
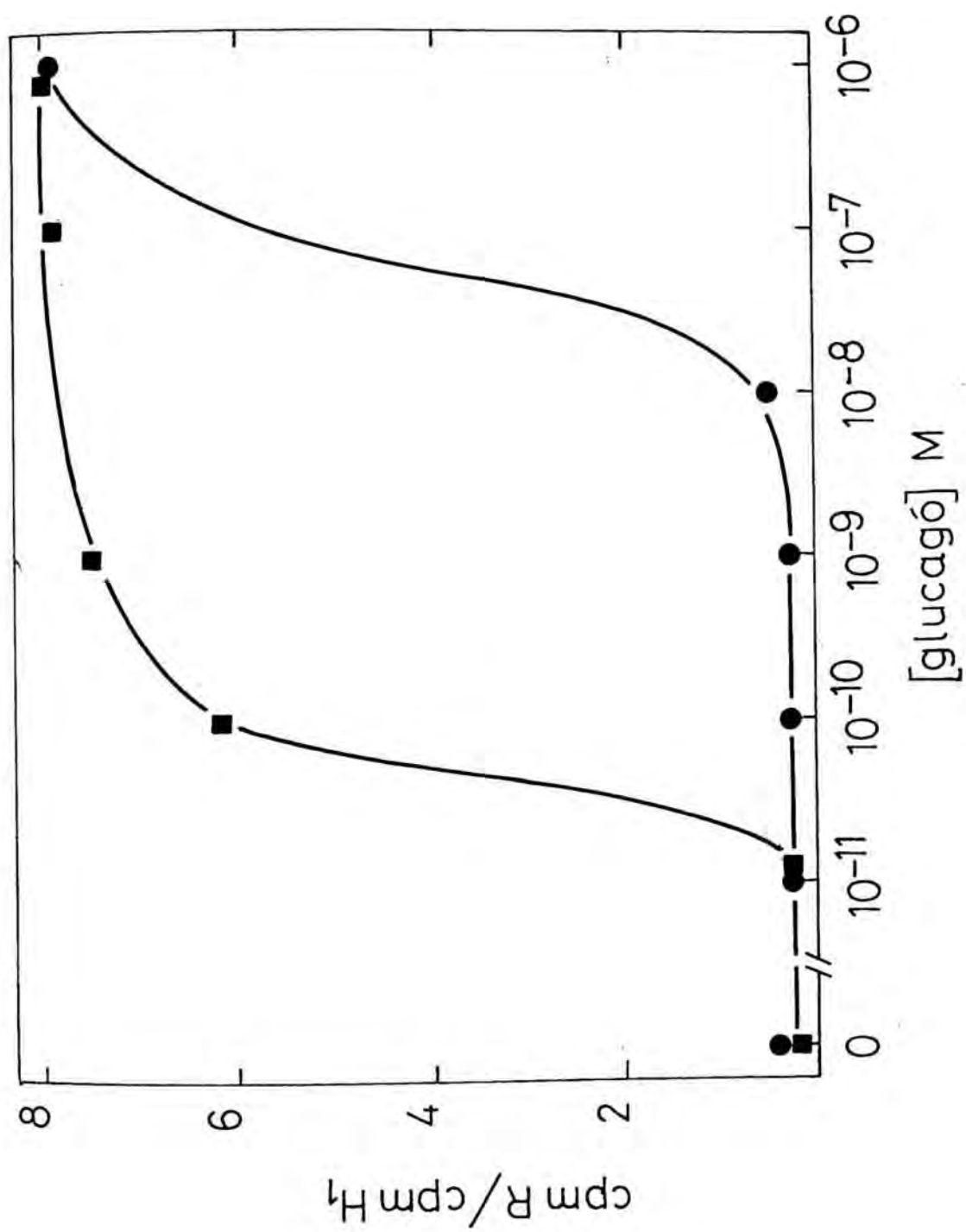


FIGURA 11 REPRESENTACIÓ DEL GRAU DE DISSOCIACIÓ DE LA PROTEÏNA QUI-
NASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC VERSUS LA CONCENTRACIÓ DE GLU-
CAGÓ AL MEDI D'INCUBACIÓ DE LES CÈL·LULES HEPÀTIQUES.

*La incubació amb glucagó durà 45 segons () o 3 minuts ().
L'efecte del glucagó a concentracions actives inferiors
a 10^{-8} M ja es trobava revertit als 3 minuts d'incubació.*



parició total del pic corresponent a H_1 es produïa a concentracions de glucagó al voltant de 10^{-6} M, a les quals es manifestava una elevació màxima del pic corresponent a les subunitats R. Al glucagó a una concentració de 10^{-6} M produïa un lleuger descens en el pic corresponent a l'holoenzim H_2 (FIGURA 10). Aquest era l'únic efecte observable de l'hormona sobre l'holoenzim H_2 .

Quan es va repetir l'experiment anterior, però incubant els hepatòcits durant períodes de 45 segons, l'efecte del glucagó era manifest a dosis més baixes que a 3 minuts. La representació de l'estat de dissociació (cpm R/cpm H_1) enfront la concentració d'hormona (FIGURA 11) mostra com la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic estava dissociada al cap de 45 segons d'actuació del glucagó a concentracions de 10^{-10} M i superiors. A la mateixa figura es representa l'estat de dissociació de la proteïna quinasa quan l'actuació del glucagó durava 3 minuts. De la gràfica s'en pot deduir que l'acció del glucagó sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic es revertia abans d'arribar als 3 minuts d'actuació de l'hormona si la seva concentració era inferior a 10^{-8} M.

3.1.5. REASSOCIACIÓ DE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC "IN VITRO".

Un altre aspecte del comportant "in vitro" de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic que va ser estudiat fou el de la possible reassociació de les seves subunitats quan del medi era llevat l'AMP cíclic que les havia dissociat. Aquest estudi volia il·lustrar, a més, fins a quin punt la desaparició espontània de l'AMP cíclic, causada per factors com l'activitat fosfodiesterasa endògena, podia provocar alteracions a l'estat de dissociació de la proteïna quinasa.

Es va operar amb tres alíquotes de suspensió d'hepatòcits (7,0 ml, 10^7 cèl.lules/ml). Les dues primeres foren incubades a 37°C durant 12 minuts en absència d'hormones i tot seguit centrifugades ($2.000 \times g$, 30 s) i els sediments cel.lulars corresponents homogeneïtzats amb 1,0 de la solució usual. La tercera alíquota va ser incubada 10 minuts a 37°C i 2 minuts més amb glucagó a una concentració de 10^{-7} M. Al final de la incubació amb l'hormona, les cèl.lules foren centrifugades i homogeneïtzades com en els casos anteriors. Després de centrifugar els homogeneïtzats a $10.000 \times g$ durant 15 minuts, els sobrenedants foren incubats a 0°C durant 45 minuts. La incubació del sobrenedant procedent d'una de les alíquotes no tractades amb glucagó es va fer en presència de $1 \mu\text{M}$ AMP cíclic. Teniem, doncs, extractes control procedents de cèl.lules no tractades amb glucagó, extractes procedents de les mateixes cèl.lules però incubats amb AMP cíclic, i extractes procedents de cèl.lules que sí que havien estat tractades amb glucagó.

Tot seguit, cadascún dels extractes fou dividit en dues parts. A una de les parts de cada parella li fou aplicat un tractament d'eliminació d'AMP cíclic consistent a passarles per una columna de gel filtració (Sephadex G-50 Fine) de 1×8 cm. L'eficiència d'aquest tractament, comprovada amb una solució de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic, era pràcticament absoluta (radiactivitat exclosa: 99,95%).

Finalment fou analitzat el contingut d'AMP cíclic i l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic a cada mostra (TAULA I).

Als extractes control, no passats per Sephadex, el contingut d'AMP cíclic era de $0,8 \mu\text{M}$. Malgrat que aquesta concentració era superior a la mínima concentració d'AMP cíclic exògen necessària per dissociar a la proteïna quinasa, l'enzim

TAULA I. EFECTE DE L'ELIMINACIÓ DE L'AMP CÍCLIC DEL MEDI SOBRE L'ESTAT DE DISSOCIACIÓ DE
LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC

Mostres	Incubació cèl.lules	Incubació extractes crus	Pas per Sephadex G-50	{AMPC} μ M final	c.p.m. als pics H_1 R	Estat de dissociació (H_1/R)
1	sense hormones	sense AMPC exògen	-	0,80	1950 $\pm$ 120 300 $\pm$ 20	baix (0,15)
2	id.	id.	+	0,75	1635 $\pm$ 25 275 $\pm$ 5	baix (0,17)
3	id.	addició AMPC 1 μ M	-	1,70	110 $\pm$ 15 1400 $\pm$ 90	alt (12,7)
4	id.	id.	+	0,75	100 $\pm$ 20 1240 $\pm$ 40	alt (12,4)
5	glycagó 10 $^{-7}$ M 2min	sense AMPC exògen	-	17,15	145 $\pm$ 20 355 $\pm$ 20	alt (5,9)
6	id.	id.	+	0,90	280 $\pm$ 70 1170 $\pm$ 80	alt (4,2)

es mantenia en estat associat. Als extractes corresponents tractats amb Sephadex apareixien la mateixa concentració d'AMP cíclic i el mateix estat de la proteïna quinasa.

Als extractes tractats amb AMP cíclic exògen la proteïna quinasa apareixia totalment dissociada. Si aquests extractes eren passats per Sephadex es produïa l'eliminació d'una part de l'AMP cíclic que equivalia a la quantitat introduïda. En restava ineliminable una part idèntica a l'observada als extractes control. La proteïna quinasa dels extractes incubats amb AMP cíclic i passats per Sephadex, però, es servava encara dissociada del tot.

Als extractes de cèl.lules tractades amb glucagó fou observat un fort increment del contingut d'AMP cíclic mentre que la proteïna quinasa estava dissociada intensament. Però si els extractes eren passats per Sephadex la proteïna quinasa seguia dissociada tot i que el contingut en AMP cíclic havia estat reduït al dels extractes control.

3.1.6. ESTIMACIÓ DELS PESOS MOLECULARS DELS HOLOENZIMS I SUBUNITATS DE LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC.

L'estudi detallat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic va ser completat amb la determinació dels pesos moleculars de cada una de les formes holoenzimàtiques trobades i els de la subunitat reguladora i catalítica.

Fou aplicat un mètode basat en la movilitat relativa de les proteïnes en gels de poliacrilamida de diferent concentració. El mètode i la seva base teòrica estan descrits detalladament a la secció 2.4.5.

Primerament fou estudiat el comportament de les proteïnes que havien de ser utilitzades com patrons de pesos moleculars coneguts. Fou escollida la seroalbúmina bovina que presenta monòmers de 68.000 daltons (438). Aquesta proteïna en ser dissolta dona espontàniament agregats dimèrics, trimèrics i tetramèrics, a part els monòmers lliures. Així doncs, obteniem un perfecte esgraonat de pesos moleculars entre 68.000 i 272.000.

La solució d'albumina fou aplicada a gels amb concentracions d'acrilamida del 5%, 6%, 7% i 8%. Hi havia tres gels de cada concentració per tal de treballar en triplicat i amb quantitats diferents de proteïna per gel (25, 50 i 100 μ g, respectivament). Després de l'electroforesi la movilitat de les bandes d'albumina era idèntica entre els triplicats de cada concentració de gel. Al representar la movilitat de cada una de les bandes (monòmer, dímer, trímer i tetràmer), expresada en forma de logaritme de R_f , versus la concentració d'acrilamida, s'obtingué una família de línies rectes confluents en un punt comú (FIGURA 12).

Per tal de comprovar la bondad del mètode, aquest va ser aplicat també a una proteïna de pes molecular conegut, la làctic deshidrogenasa de múscul esquelètic de conill. La representació gràfica de les movilitats versus la concentració d'acrilamida també resultava en una línia recta (FIGURA 12).

Si el pendent de cadascuna de les rectes determinades pels oligòmers de seroalbúmina en la representació gràfica de la darrera figura era representat versus el pes molecular corresponent (FIGURA 13) obteniem una altra recta que era la directriu per a determinar pesos moleculars de proteïnes desconeguts.

Introduint a l'equació de la recta de la FIGURA 13 el valor del pendent corresponent a la làctic deshidrogenasa fou

FIGURA 12 REPRESENTACIÓ DEL LOGARITME DE LA MOVILITAT ELECTROFORÈTICA (R_f) DE LA SEROALBÚMINA BOVINA I DE LA LACTAT DESHIDROGENASA VERSUS LA CONCENTRACIÓ DE POLIACRILAMIDA DELS GELS.

(BSA)₁; monòmer de la seroalbúmina bovina, (BSA)₂; dímer,
(BSA)₃; trímer, (BSA)₄; tetràmer,
(LDH): lactat deshidrogenasa.

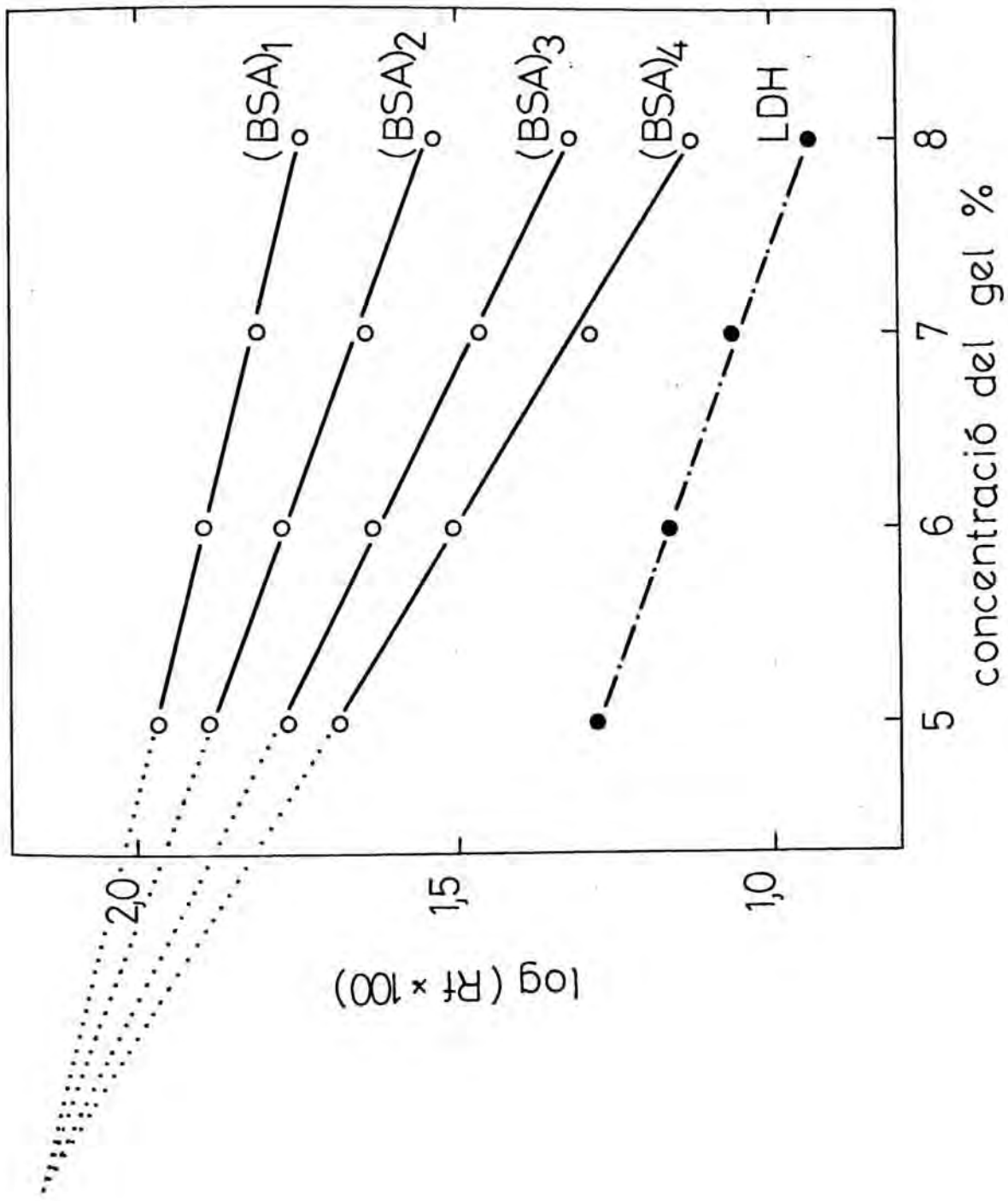
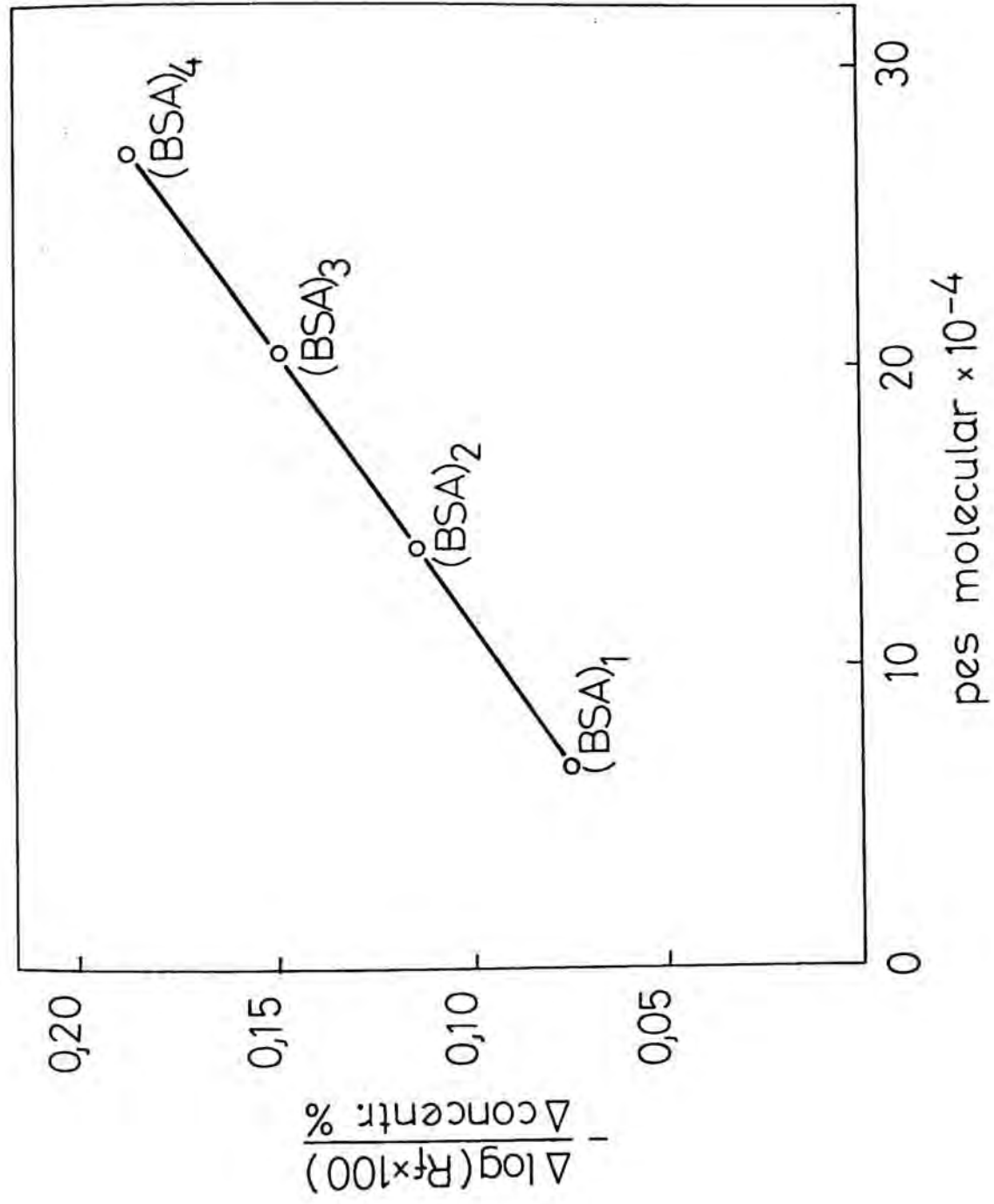


FIGURA 13 RECTA DIRECTRIU PER A LA DETERMINACIÓ DE PESOS MOLECULARS DE PROTEÏNES PER ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA.

Expressió gràfica de la relació entre el pes molecular i el pendent de les línies obtingudes a la Figura 12.

(BSA)₁, (BSA)₂, (BSA)₃ i (BSA)₄: monòmer, dímer, trímer i tetràmer, respectivament, de la seroalbúmina bovina.



obtingut un valor de 145.000 per al pes molecular d'aquesta proteïna, valor que coincidia exactament amb els donats a la bibliografia (439-441). Aquest resultat testimoniava la bondat del mètode de determinació de pesos moleculars escollit.

Malgrat que existien altres mètodes electroforètics per determinar pesos moleculars de proteïnes, com per exemple, el de gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS) (442), s'optà pel mètode indicat per dues qüestions bàsiques. Primer, perquè l'electroforesi amb SDS tendeix a dissociar els sistemes d'agregació proteïca com el que existeix entre les formes holoenzimàtiques de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. I segon, perquè nosaltres localitzàvem aquesta proteïna quinasa als gels d'electroforesi mitjançant un revelat per fixació de ^3H -AMP cíclic que requeria la integritat molecular de l'enzim, cosa que, per desnaturalització proteica, no s'obtenia en la tècnica del SDS.

L'anàlisi de la movilitat electroforètica de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic va ser aplicat a extractes d'hepatòcits no tractats i a extractes incubats durant 45 minuts a 0°C amb AMP cíclic $0,5\ \mu\text{M}$. Els primers foren destinats a l'obtenció de dades per al pes molecular del holoenzims H_1 i H_2 , i els altres per al pes molecular de la subunitat reguladora. Els valors de movilitat relativa d'aquestes entitats proteïques en sis concentracions diferents d'acrilamida compreses entre el 4% i el 9% estan indicades a la TAULA II. Cada família de punts representada gràficament versus la concentració dels gels, donà una recta de regressió altament definida. Introduint el valor dels pendents d'aquestes rectes a l'ecuació corresponent a la línia de la FIGURA 13 es va observar que ambdues formes holoenzimàtiques H_1 i H_2 tenien un pes molecular idèntic de 108.000, i que el de la subunitat R era de 72.000.

TAULA II. ESTIMACIÓ DELS PESOS MOLECULARS DE LES FORMES DE LA PROTEÏNA QUINASA
DEPENDENT D'AMP CÍCLIC HEPÀTICA

	concentració d'acrilamida als gels					Δ log(Rf x 100) vs. Δ concent. %		pes molecular estimat
	4%	5%	6%	7%	8%	9%	r	
H ₁	1,66	1,56	1,45	1,34	1,27	1,17	0,99800	108.000
H ₂	1,77	1,66	1,59	1,49	1,38	1,27	0,99829	108.000
R	1,82	1,74	1,66	1,59	1,50	1,43	0,99962	72.000

Per diferència entre el pes molecular de les formes holoenzimàtiques i el de la subunitat R s'assumia un valor aproximat de 36.000 daltons per a la subunitat catalítica d'aquestes proteïnes quinases dependents d'AMP cíclic.

3.2. ESTUDI DELS MECANISMES MOLECULARS INVOLUCRATS A L'ACCIÓ DEL GLUCAGÓ SOBRE CÈL·LULES PARENQUIMÀTIQUES DE FETGE.

3.2.1. RESPOSTA AL GLUCAGÓ DELS HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES ALIMENTADES.

Aquesta sèrie d'experiències va ser duta a terme utilitzant animals que no havien patit cap tipus de limitació a la dieta. Els animals ingerien el principal volum d'aliment durant les hores nocturnes. Els experiments que seguidament es descriuen eren iniciats entre les 9 hores i les 10,30 hores del matí, moment en el qual els animals es trobaven en l'estadi postprandial més important de llur cicle diari.

3.2.1.1. Efecte sobre la fosforilasa.

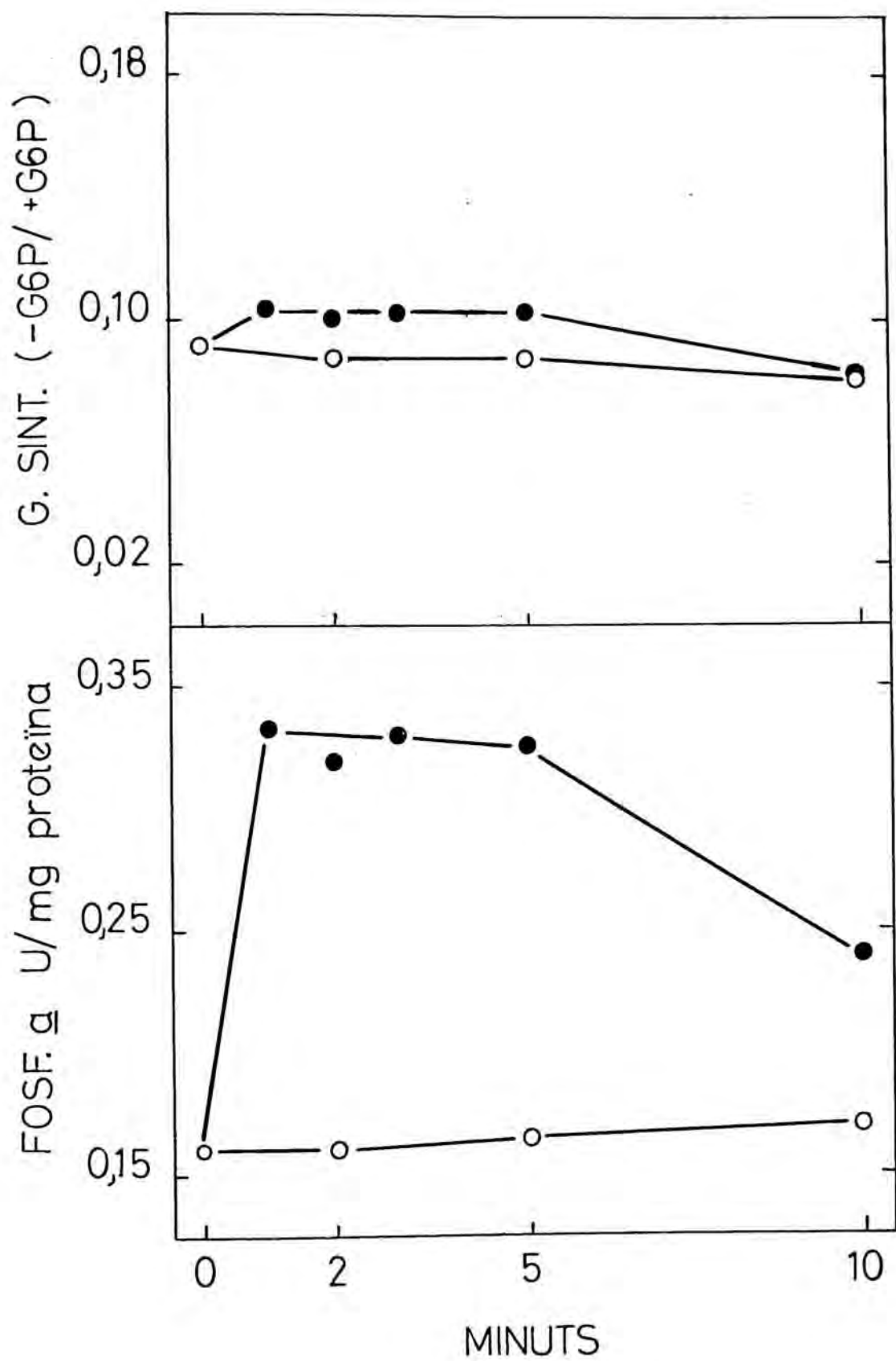
Quan als hepatòcits preincubats 10 minuts a 37°C s'els addicionava glucagó a una concentració de 10^{-7} M es produïa una intensa activació de la fosforilasa que d'una activitat $\bar{a}$ de 0,160 U/mg prot. passava a 0,340 U/mg prot. A la FIGURA 14 s'expressa la relació temps-resposta de l'activació de la fosforilasa, la qual ja era màxima al temps de mesura més curt (1 minut) i encara era marcadament significativa als 10 minuts.

FIGURA 14 ACCIÓ DE GLUCAGÓ SOBRE ELS HEPATÒCITS AÏLLATS A PARTIR DE RATES ALIMENTADES

I - Efecte sobre les activitats de la glicogen sintasa i de la fosforilasa.

Després d'incubar els hepatòcits durant 10 minuts a 37°C els fou afegit glucagó 10^{-7}M (●) o solució salina isotònica (○) i les incubacions continuaren els períodes de temps indicats. Finalment la relació d'activitats de la glicogen sintasa en absència i en presència de glucosa 6-fosfat (requadre superior) i l'activitat de la fosforilasa (requadre inferior) foren mesurades.

L'activitat glicogen sintasa total (+ glucosa 6-fosfat) romanía inalterada.



3.2.1.2. Efecte sobre la glicogen sintasa.

Simultàniament fou estudiada l'evolució de l'activitat glicogen sintasa (relació d'activitats en absència i en presència de glucosa 6-fosfat). En presència de glucagó 10^{-7} M no fou observat cap canvi significatiu en comparació amb hepatòcits control incubats sense hormona els quals tenien un valor de relació d'activitats de 0,10 constant al llarg del període d'incubació.

3.2.1.3. Efecte sobre l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

En els mateixos experiments que acabem de descriure foren mesurades les variacions de l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

A la FIGURA 15 es mostra l'efecte del glucagó 10^{-7} M sobre l'estat de dissociació expressat en forma de relació entre les cpm. presents al pic corresponent a la subunitat reguladora i les corresponents al pic de l'holoenzim quan els extractes cel·lulars eren sotmesos a electroforesi en gels de poliacrilamida i revelats per fixació de ^3H -AMP cíclic tal com està descrit a "Mètodes". Per efecte del glucagó, l'holoenzim H_1 experimentava una ràpida i intensa dissociació que es mantenia en un nivell màxim entre els minuts 1 i 5 d'actuació de l'hormona, mentre que romania en estat inalteradament associat en els controls incubats sense glucagó.

Un cop iniciada, la reassociació de les subunitats de la proteïna quinasa es produïa també de manera ràpida. El seu acompliment coincidia amb l'inici del retorn de l'activitat fosforilasa a al valor basal després de l'activació per glucagó.

FIGURA 15 ACCIO DEL GLUCAGÓ SOBRE HEPATÒCITS AÏLLATS A PARTIR DE RATES ALIMENTADES

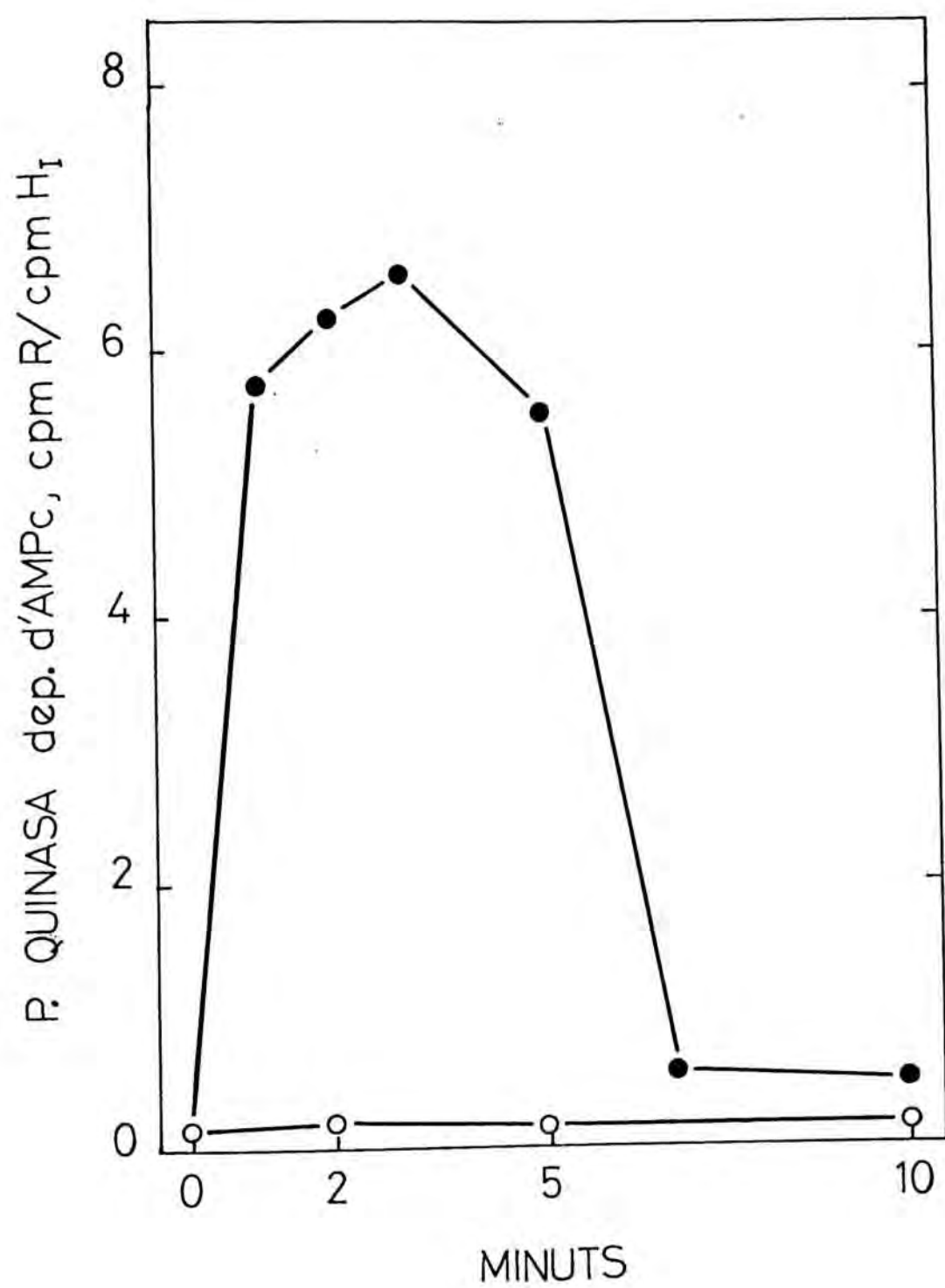
II - Efecte sobre l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Les condicions experimentals són les de la Figura 14.

(●) cèl.lules incubades amb glucagó 10^{-7} M

(○) cèl.lules control incubades sense glucagó

cpm R/cmp H_1 : relació entre el pic corresponent a la subunitat R de la proteïna quinasa i el corresponent a l'holoenzím H_1 , després del revelat dels gels d'electroforesi per fixació de 3H -AMP cíclic.



En cap moment de l'actuació del glucagó en aquestes condicions no fôren observades variacions al pic corresponent a l'holoenzim H_2 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic en els gels d'electroforesi.

3.2.2. RESPOSTA DELS HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES MANTINGUDES EN DEJUNI AL GLUCAGÓ.

L'estudi de l'efecte del dejuni sobre la resposta dels hepatòcits al glucagó va ser dut a terme utilitzant animals que havien estat privats de menjar des de 24 hores abans del procés d'isolament dels hepatòcits. Les cèl.lules, que únicament havien estat en presència de glucosa durant la fase de perfusió del fetge (glucosa 5,0 mM al medi de perfusió), no contenien, un cop isolades, glicogen precipitable amb etanol del 60%. La viabilitat i supervivència d'aquestes cèl.lules era equivalent a la de les obtingudes a partir de rates alimentades normalment.

3.2.2.1. Efecte sobre els nivells intracel.lulars d'AMP cíclic.

El contingut intracel.lular d'AMP cíclic era incrementat pel glucagó de manera immediata a l'aparició de l'hormona en el medi d'incubació dels hepatòcits. (FIGURA 16). El valor basal del contingut del nucleòtid era 2,2 0,3 pmols per milió de cèl.lules.

La concentració de glucagó més alta que es va assajar, 10^{-7} M, elevava el contingut d'AMP cíclic fins gairebé 80 pmols per milió de cèl.lules i, després d'una caiguda intensa a partir dels 4 minuts, els valors d'AMP cíclic encara es trobaven elevats als 10 minuts d'incubació amb l'hormona.

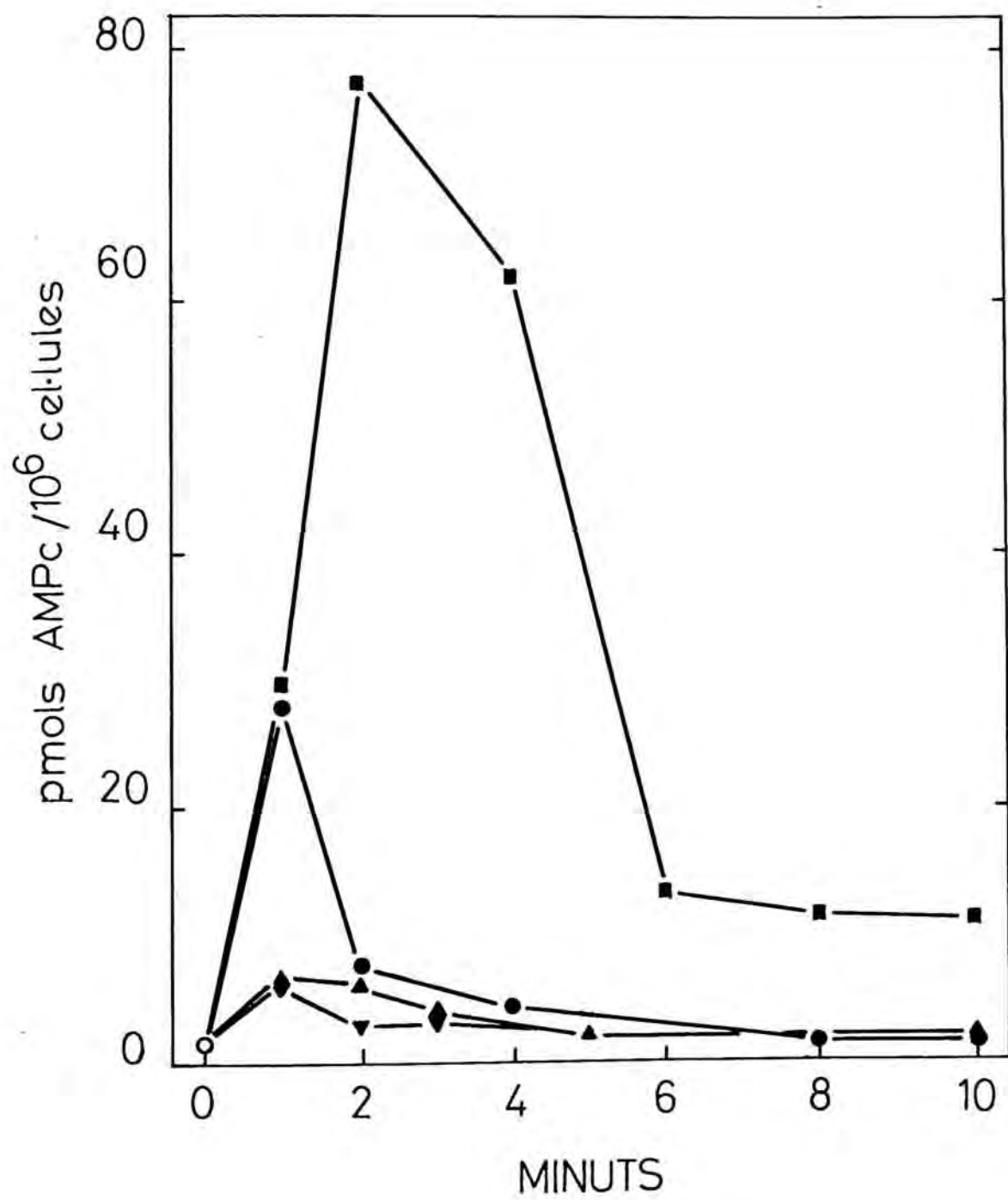
FIGURA 16 ACCIÓ DE GLUCAGÓ SOBRE HEPATÒCITS AÏLLATS A PARTIR DE RATES DEJUNES.

I - Efecte sobre el nivell intracel·lular d'AMP cíclic.

Hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni durant les 24 horas prèvies als experiments foren preincubats 10 minuts a 37°C i tot seguit addicionats amb les concentracions de glucagó següents:

(■) 10^{-7} M, (●) 3×10^{-9} M, (▲) 10^9 M, (▼) 3×10^{-10} M.

Les incubacions foren perllongades els períodes de temps indicats. Finalment fou mesurat el contingut intracel·lular d'AMP cíclic. Els controls incubats sense glucagó presentaven un valor basal ($2,2 \pm 0,3$ pmols/ 10^6 cèl·lules) - que romania constant al llarg dels experiments.



Concentracions de glucagó inferiors produïen respostes més dèbils tant en amplitud com en durada. La mínima concentració que causava un efecte significatiu era 3×10^{-10} M i produïa una elevació de, aproximadament, tres vegades sobre el valor basal esmentat el qual era restablert 2 minuts després de l'addició de l'hormona.

3.2.2.2. Efecte sobre l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

De manera immediata a l'increment de la concentració d'AMP cíclic intracel·lular produït pel glucagó, era observable una forta dissociació de l'holoenzim H_1 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

L'efecte del glucagó sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic dels hepatòcits procedents d'animals mantinguts en dejuni va ser estudiat amb concentracions d'hormona compreses entre 3×10^{-10} M i 10^{-7} M.

Les concentracions de glucagó mes baixes (10^{-10} M i 3×10^{-10} M) amb efectes significatius sobre altres paràmetres (veure seccions 3.3.2.3. i 3.3.2.4.) no causaven modificacions detectables sobre la proteïna quinasa.

La dissociació de l'holoenzim H_1 en les seves subunitats era ja molt intensa al temps de mesura més curt (minut 1, FIGURA 17). En el primer minut de llur actuació totes les concentracions de glucagó assajades produïen un efecte equivalent. A partir del primer minut, però, l'efecte de les concentracions més baixes (10^{-9} M i 3×10^{-9} M) desapareixia de forma ràpida: la proteïna quinasa recuperava l'estat associat inicial entre els 2 i els 3 minuts d'actuació del glucagó.

FIGURA 17 ACCIÓ DEL GLUCAGÓ SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DE JONES.

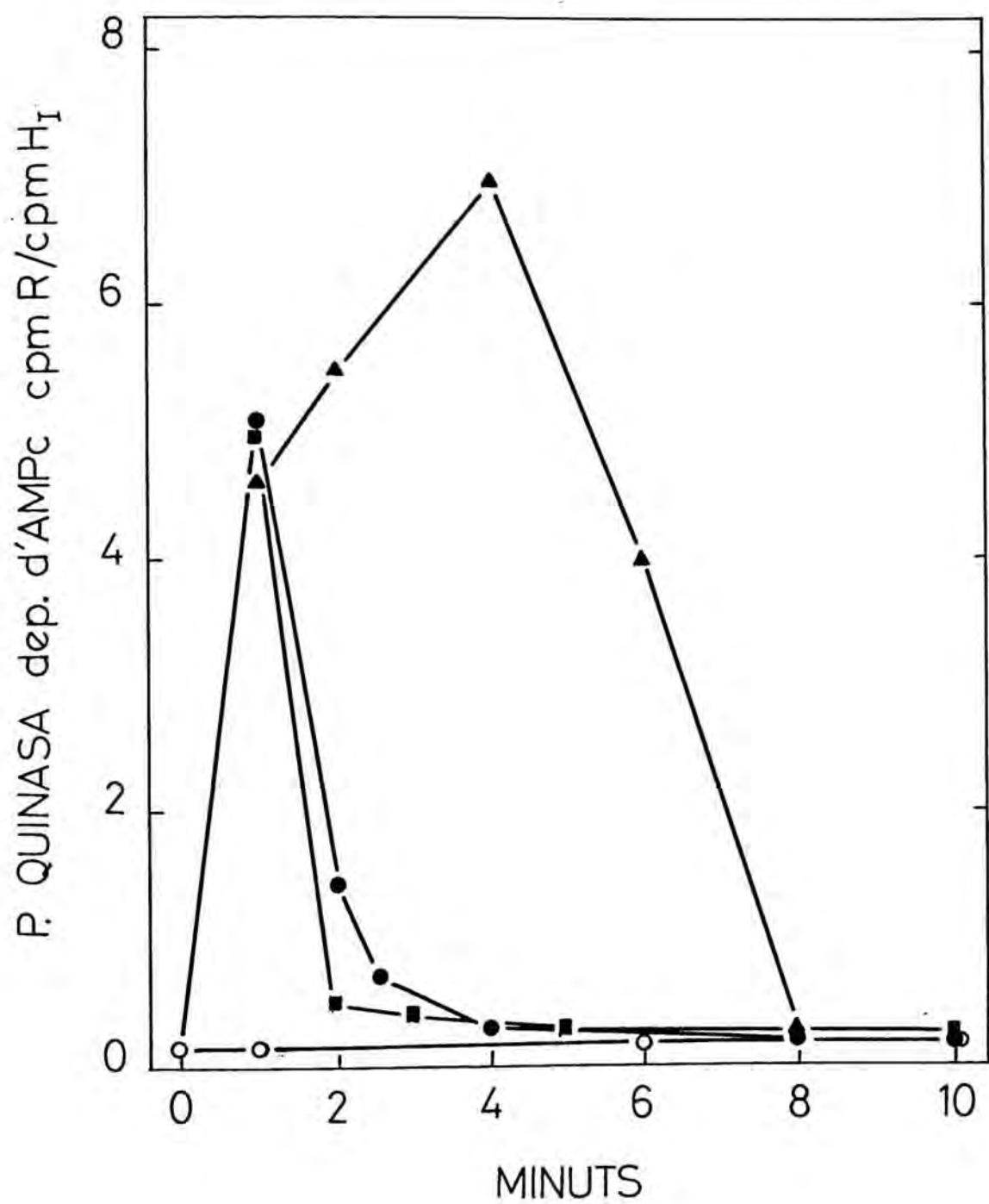
II - Efecte sobre l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Les condicions experimentals foren les de la Figura 16.

(▲) glucagó 10^{-7} M, (●) 3×10^{-9} M, (■) 10^{-9} M

(○) solució salina isotònica

L'estat de dissociació es representa per la relació entre les cpm corresponents al pic de la subunitat R i les del corresponent a l'holozim H_1 després del revelat dels gels d'electroforesi per fixació de 3H -AMP cíclic.



A una concentració de 10^{-7} M l'hormona mantenia dissociat l'holoenzim H_1 durant 6 minuts aproximadament. El retorn a l'estat inicial es produïa de manera ràpida a partir dels 5 minuts, essent total als 8 minuts.

De manera similar al que succeïa als hepatòcits procedents de rata alimentada (apartat 3.3.1.3.), cap de les concentracions de glucagó assajades produïa modificacions detectables de l'estat molecular de l'holoenzim H_2 de la proteïna quinasa als hepatòcits de rata dejuna.

3.2.2.3. Efecte sobre la fosforilasa.

L'elevació del nivell intracel.lular d'AMP cíclic i la dissociació de l'holoenzim H_1 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic causats pel glucagó estaven acompanyats per una forta activació de la fosforilasa.

L'efecte del glucagó sobre la fosforilasa també era dosi-dependent (FIGURA 18). Per acció del glucagó a una concentració de 10^{-7} M, l'activitat fosforilasa a passava d'un valor basal de 0,160 U/mg prot. a un valor màxim de 0,315 U/mg prot. assolit als 2 minuts d'incubació en presència de l'hormona. La mínima concentració efectiva de glucagó era 10^{-10} M i elevava l'activitat fosforilasa a fins 0,195 U/mg prot. durant un curt període (2 minuts). Concentracions d'hormona de 10^{-9} M i de 3×10^{-10} M produïen activacions de la fosforilasa intermèdies a les causades per les concentracions esmentades, tant pel que fa a l'amplitud de l'efecte com a la seva extensió.

3.2.2.4. Efecte sobre la glicogen sintasa.

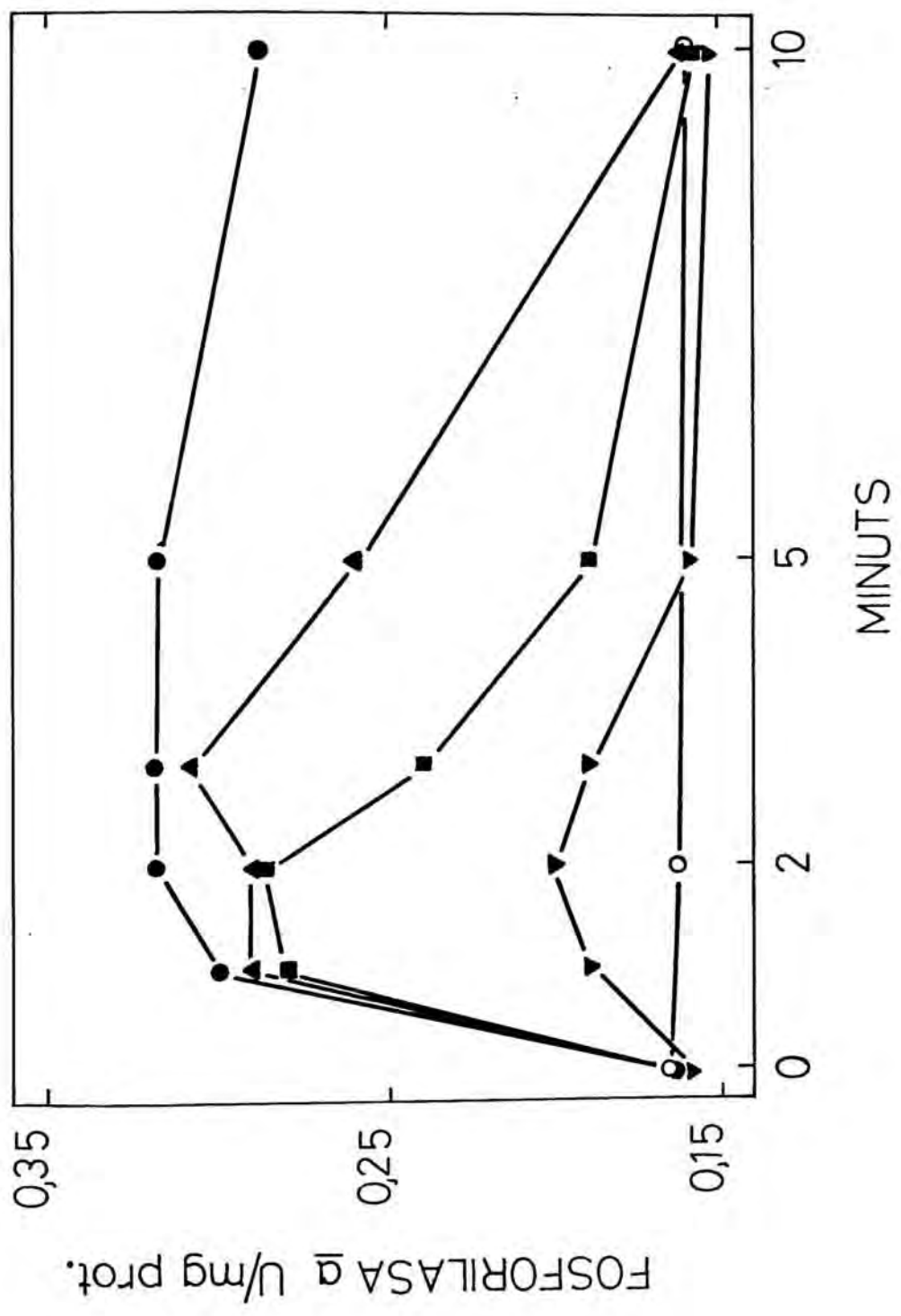
La glicogen sintasa d'hepatòcits procedents d'animals

FIGURA 18 ACCIÓ DEL GLUCAGÓ SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DEJUNES.

III - Efecte sobre l'activitat fosforilasa a.

Les condicions experimentals foren les de la Figura 16.

(●) glucagó 10^{-7} M, (▲) 10^{-9} M, (■) 3×10^{-10} M, (▼) 10^{-10} M
(○) sol. salina isotònica.



mantinguts en dejuni durant les 24 hores prèvies als experiments presentava un valor d'activitat independent de glucosa 6-fosfat notablement més alt que el corresponent a hepatòcits de rates alimentades (relació d'activitats en absència i presència de glucosa 6-fosfat de $0,21 \pm 0,03$ als primers i de $0,10 \pm 0,02$ als segons).

L'activitat glicogen sintasa independent de glucosa 6-fosfat era disminuïda de manera intensa per efecte del glucagó sobre els hepatòcits de rata dejuna. Després de 10 minuts d'incubació en presència de l'hormona a una concentració de 10^{-7} M, el valor d'aquesta activitat enzimàtica havia estat disminuït fins el 35% del valor inicial (FIGURA 19). Concentracions de glucagó de l'ordre de 10^{-10} M produïen encara descensos significatius de l'activitat glicogen sintasa I.

Als controls incubats sense glucagó les activitats glicogen sintasa dependent i independent de glucosa 6-fosfat romanien constants en el transcurs del experiment.

L'activitat dependent a les cèl.lules tractades amb glucagó no era modificada per l'hormona en cap de les condicions assajades.

3.2.2.5. Asincronia entre els efectes màxims del glucagó sobre la glicogen fosforilasa i la glicogen sintasa.

Al realitzar l'estudi detallat dels efectes del glucagó sobre els punts de la cascada glicogenolítica es va observar que les variacions màximes dels paràmetres mesurats no es produïen de manera simultània sino que estaven subjectes a una seqüència temporal definida.

FIGURA 19 ACCIÓ DEL GLUCAGÓ SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DE-
JUNES

IV - Efecte sobre la glicogen sintasa.

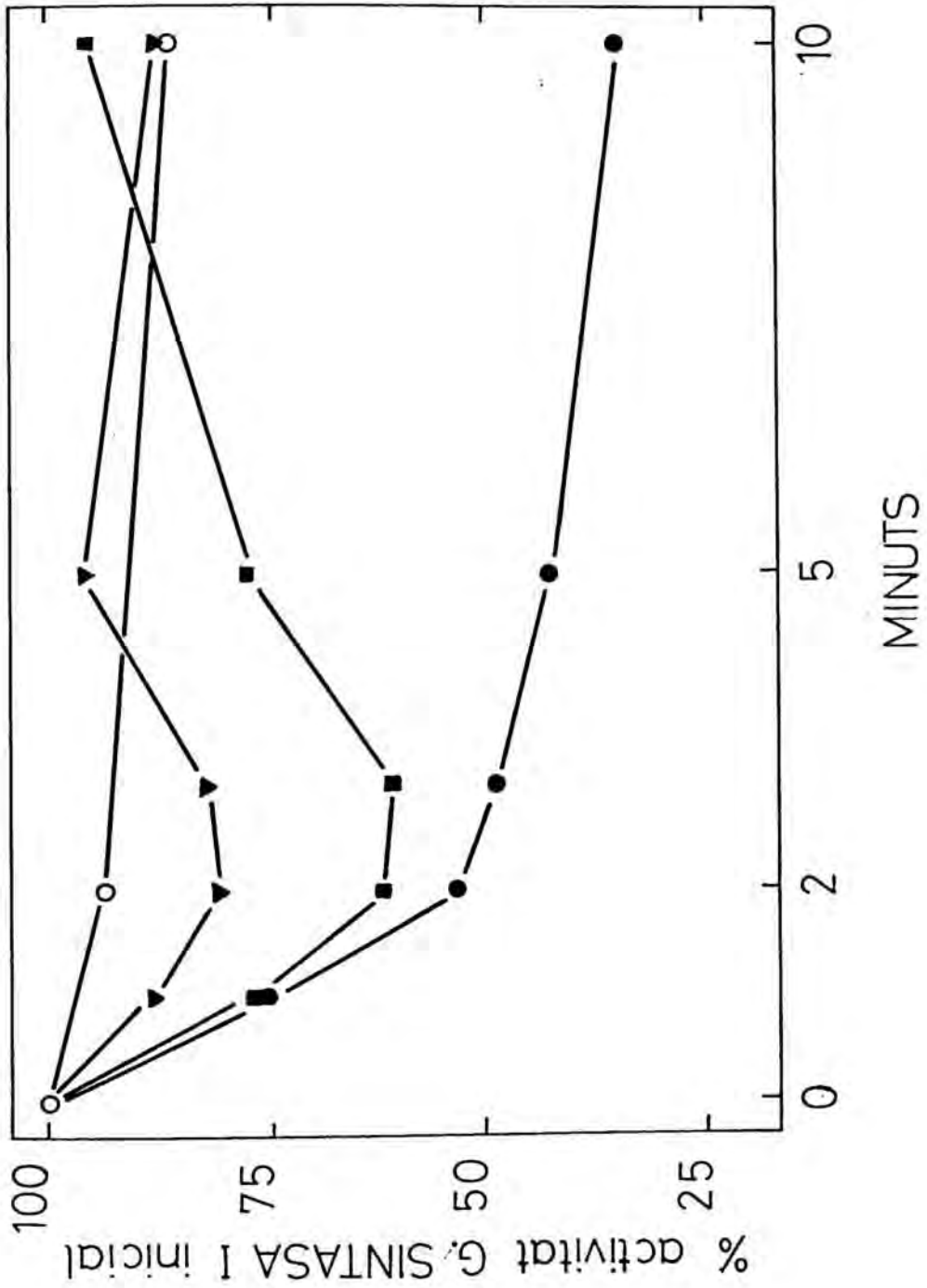
Les condicions experimentals foren les descrites a la Fi-
gura 16.

(●) glucagó 10^{-7} M, (■) 3×10^{-10} M, (▼) 10^{-10} M

(○) sol. salina sisotònica

Es representa la relació d'activitats glicogen sintasa me-
surades en absència i en presència de glucosa 6-fosfat.

L'activitat glicogen sintasa total era constant al llarg
dels experiments.



A la FIGURA 20 es representa l'aparició d'aquest fenomen quan la concentració de glucagó assajada era 10^{-7} M. Amb aquesta concentració, o amb qualsevol altra, els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic eren els primers d'arribar al valor de màxim increment. Tot seguit era l'efecte sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic el qui assolía la màxima intensitat. La fosforilasa arribava a la màxima activació aproximadament al mateix temps que la proteïna quinasa però es mantenia activada durant un període més perllongat que aquesta.

La disminució de l'activitat glicogen sintasa I era notablement més lenta que la producció dels altres efectes. La màxima inactivació era assolida quan el nivell d'AMP cíclic i l'estat de la proteïna quinasa ja havien retornat gairebé del tot al valor original.

3.2.3. RESPOSTA DELS HEPATÒCITS AL DIBUTIRIL AMP CÍCLIC.

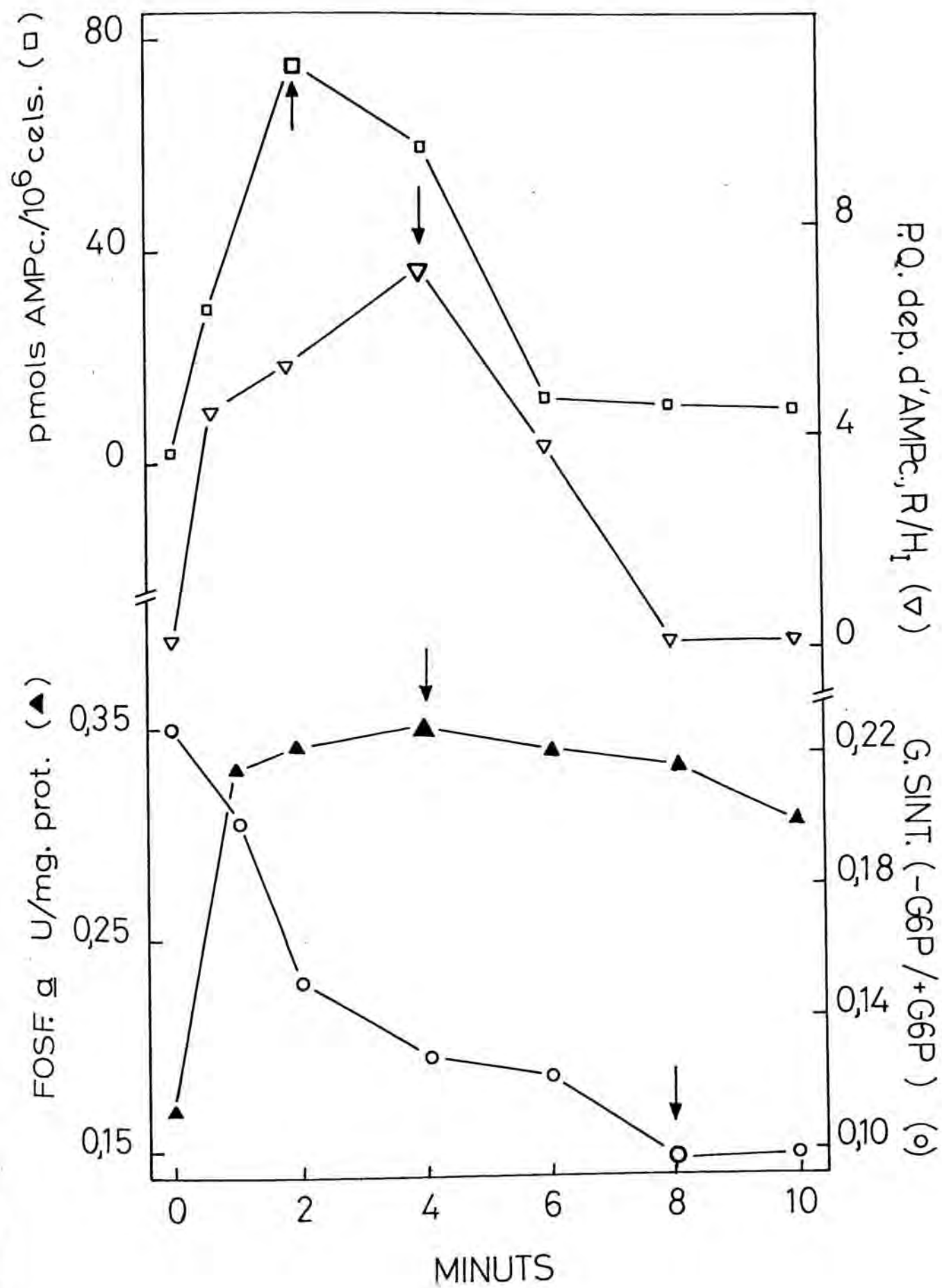
Els experiments descrits a la secció 3.3.2. mostren com el glucagó pot causar l'elevació del nivell intracel·lular d'AMP cíclic, d'una banda, i l'activació de la fosforilasa i la inactivació de la glicogen sintasa, de l'altra. A fi de comprovar que una elevació prèvia de l'AMP cíclic intracel·lular era la causa, i no un simple efecte simultani però sense relació, de la modificació de les dues activitats enzimàtiques esmentades, varem fer experiments consistents a introduir AMP cíclic dins de les cèl·lules hepàtiques isolades i mesurar les activitats de la fosforilasa i de la glicogen sintasa tot seguit.

Els experiments fóren duts a terme amb hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni de 24 hores. Les cèl·lules fóren incubades durant temps diferents amb diverses concentracions d'AMP cíclic en forma de dibutiril derivat que atra

FIGURA 20 ACCIÓ DEL GLUCAGÓ SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES
DEJUNES

V - Asincronia entre els efectes màxims del glucagó sobre l'AMP cíclic ($\square$), l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (∇), l'activitat fosforilasa a ($\blacktriangle$) i l'activitat glicogen sintasa (-/+ glucosa 6-fosfat) ($\circ$).

La resposta correspon a una concentració de glucagó de 10^{-7} M.
Les fletxes assenyalen els punts de màxim efecte.



vessa bé la membrana cel.lular.

3.2.3.1. Efecte sobre la fosforilasa.

El dibutiril AMP cíclic incrementava intensament l'activitat fosforilasa a als hepatòcits (FIGURA 21). Partint d'una activitat basal de 0,175 U/mg prot. una concentració de 3×10^{-5} M de l'efector produïa l'activació de l'enzim fins a 0,400 U/mg prot. La mínima concentració de dibutiril AMP cíclic que produïa un efecte significatiu era 3×10^{-7} M.

L'efecte del dibutiril AMP cíclic sobre la fosforilasa, arribava a la màxima intensitat de forma més leta que l'efecte derivat de la presència de glucagó al medi (FIGURES 14 i 18). El valor d'activitat a assolit per la concentració màximament efectiva de dibutiril AMP cíclic (0,400 U/mg prot. amb 3×10^{-5} M DBAMPC) era, però, més elevat que l'assolit pel glucagó a concentració saturant (0,315 U/mg prot. amb 10^{-7} M glucagó).

3.2.3.2. Efecte sobre la glicogen sintasa.

Als mateixos experiments va ser mesurada l'activitat glicogen sintasa. El dibutiril AMP cíclic causava la inactivació de l'enzim disminuint la relació d'activats mesurades en absència i presència de glucosa 6-fosfat (FIGURA 22).

Una concentració determinada del producte era relativament més eficient inactivant la glicogen sintasa que no pas activant la fosforilasa. Concentracions superiors a 3×10^{-6} M ja es comportaven com màximament efectives per a la primera activitat esmentada.

Com en el cas de l'activació de la fosforilasa, l'efecte del dibutiril AMP cíclic sobre la glicogen sintasa es produïa de manera més lenta que el causat pel glucagó. A les concentracions més baixes de l'efector s'observà, àdhuc, un període de latència previ a la inactivació de l'enzim.

FIGURA 21 EFECTE DEL DIBUTIRIL AMP CÍCLIC SOBRE L'ACTIVITAT FOSFORILASA D'HEPATÒCITS AÏLLATS DE RATES DEJUNES.

Després de 10 minuts d'incubació a 37°C, les cèl.lules foren addicionades amb les concentracions de dibutiril AMP cíclic indicades. Les incubacions es perllongaren durant períodes de temps al final dels quals fou mesurada l'activitat fosforilasa a.

- (●) DbAMP cíclic 3×10^{-5} M, (▲) 3×10^{-6} M, (▼) 10^{-6} M,
 (■) 3×10^{-7} M
 (○) sol. salina isotònica

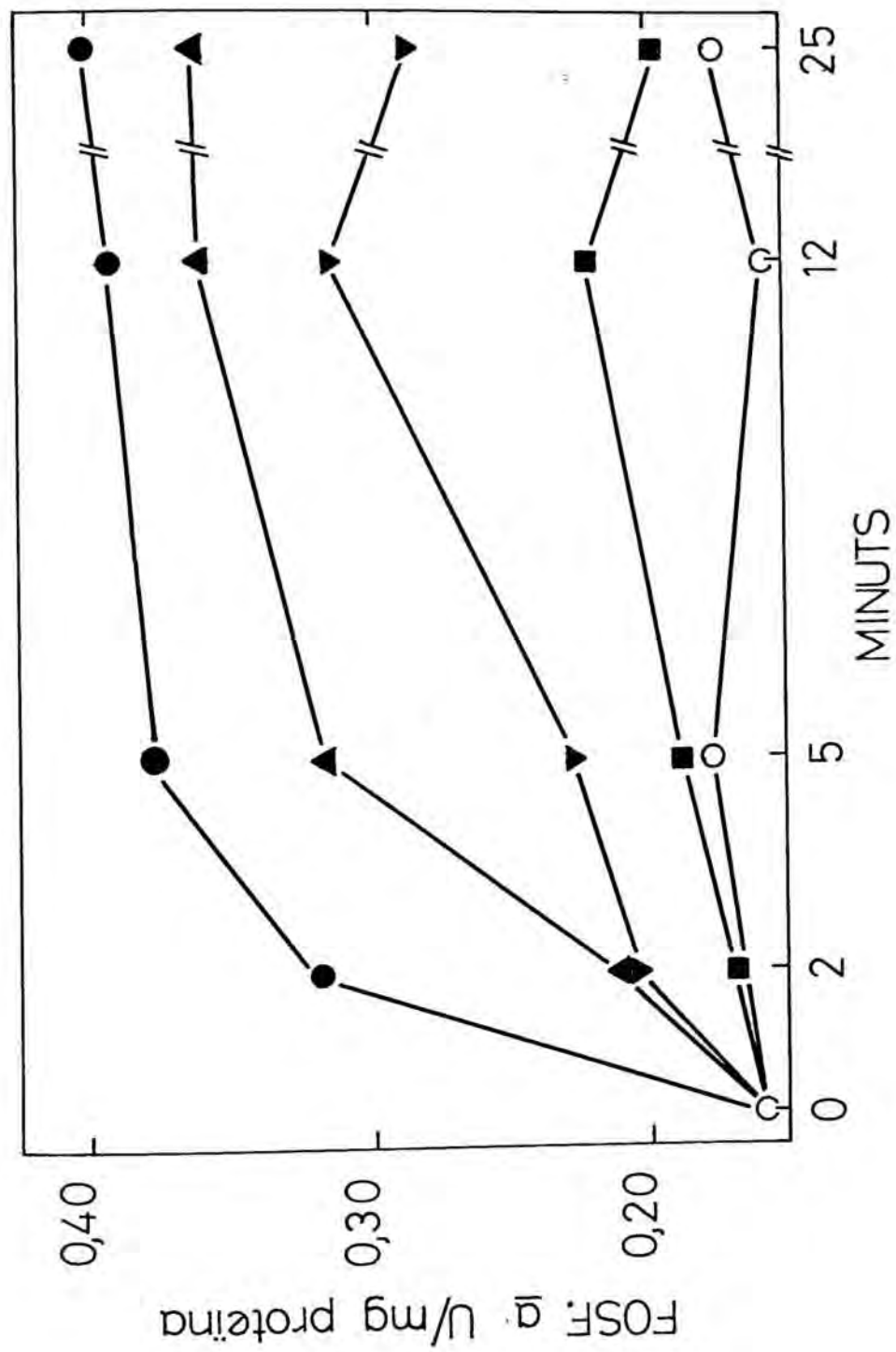


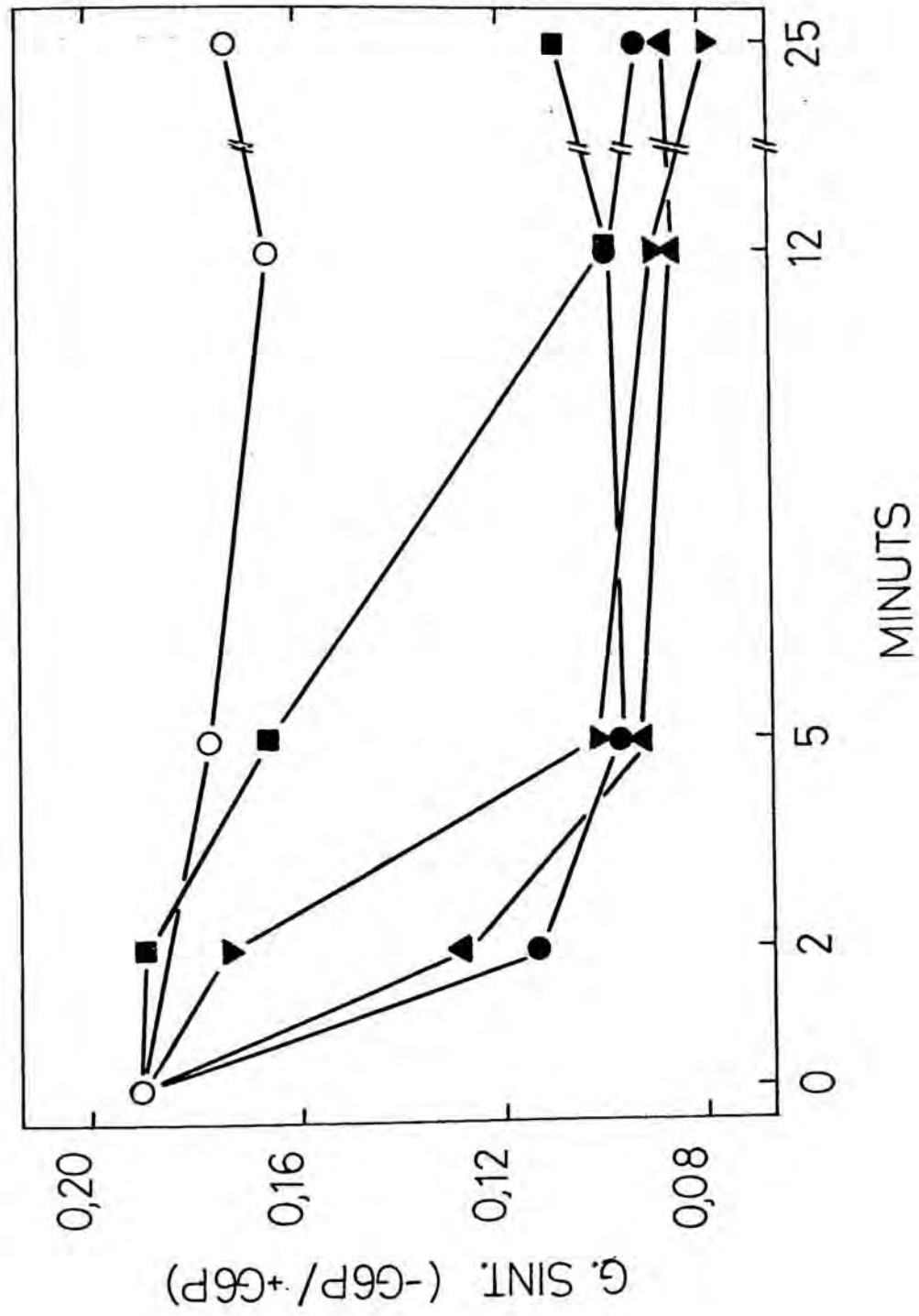
FIGURA 22 EFECTE DEL DIBUTIRIL AMP CÍCLIC SOBRE L'ACTIVITAT GLICOGEN SINTASA D'HEPATÒCITS AÏLLATS DE RATES DEJUNES.

Les condicions experimentals foren les descrites a la Figura 21, mesurant l'activitat glicogen sintasa en absència i en presència de glucosa 6-fosfat al final de la incubació amb dibutiril AMP cíclic.

(●) DnAMP cíclic 3×10^{-5} M, (▲) 3×10^{-6} M, (▼) 10^{-6} M, (■) 3×10^{-7} M

(○) sol. salina isotònica

L'activitat glicogen sintasa total ($7,6 \pm 0,6$ mU/mg prot., + glucosa 6-fosfat) roman constant en totes les condicions assajades.



3.3. ESTUDI DE CONTROL HORMONAL DEL METABOLISME DEL GLICOGEN ALS HEPATÒCITS PER CATECOLAMINES I AGENTS RELACIONATS.

3.3.1. RESPOSTA DELS HEPATÒCITS A L'EPINEFRINA.

L'estudi de la resposta dels hepatòcits a l'epinefrina va seguir inicialment una sistemàtica experimental similar a la utilitzada per estudiar els efectes del glucagó. De primer fòren analitzats els efectes de l'hormona sobre l'activitat dels enzims fosforilasa i glicogen sintasa, i tot seguit fou determinada la participació que en aquests efectes havien tingut els mecanismes d'acció hormonal derivats de l'estímul de l'adenil ciclase.

3.3.1.1. Efecte sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa d'hepatòcits procedents de rates dejunes.

Quan fòren incubats amb epinefrina hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni durant les 24 hores prèvies als experiments es va observar que l'hormona causava l'activació de la fosforilasa i la inactivació de la glicogen sintasa.

A la FIGURA 23 es representa la relació temps-resposta de la fosforilasa a una sèrie de concentracions d'epinefrina. La concentració més baixa que produïa un efecte significatiu sobre

FIGURA 23 ACCIÓ DE L'EPINEFRINA SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DEJUNES

1 - Efecte sobre l'activitat fosforilasa a

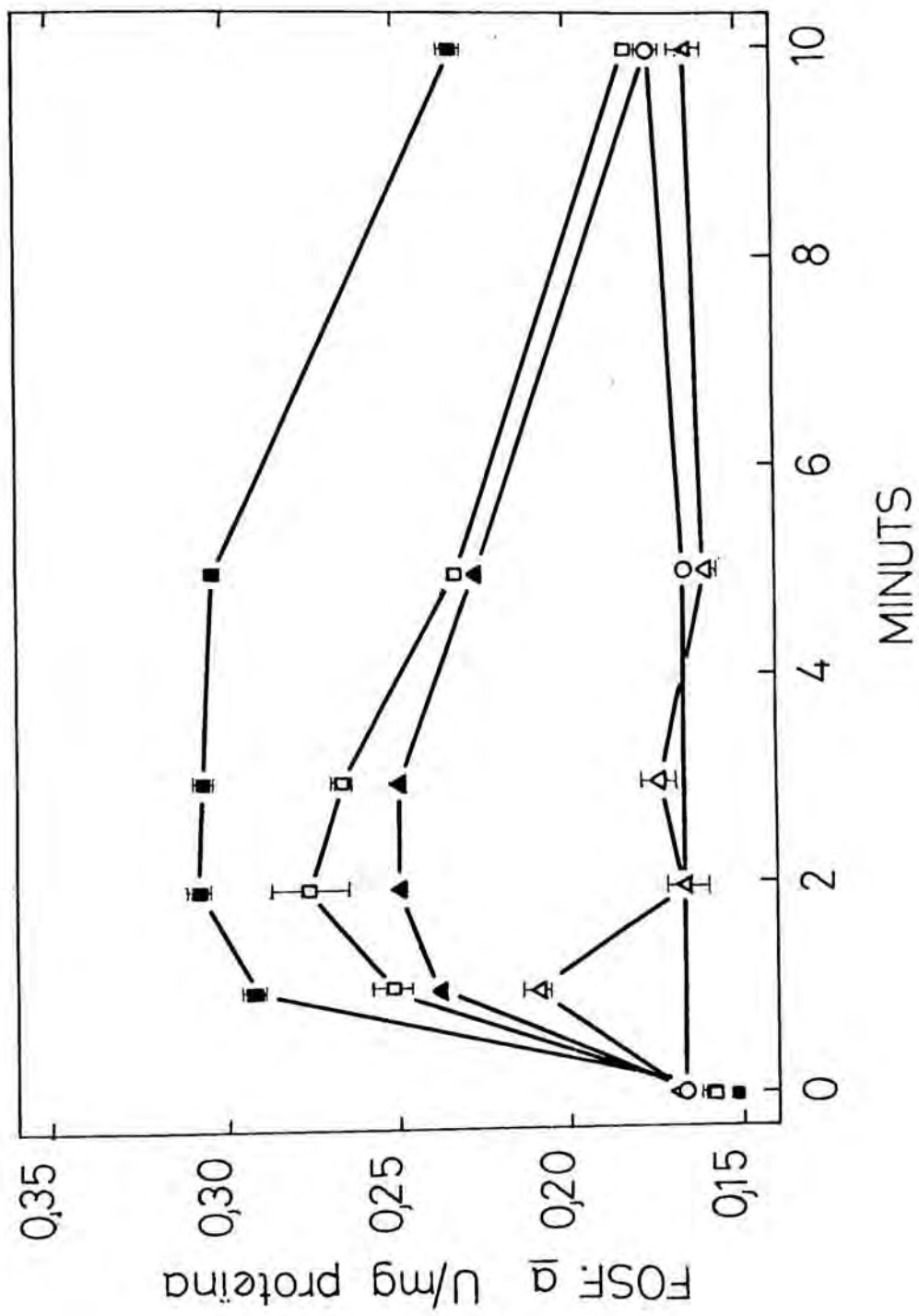
Hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni les 24 hores prèvies als experiments foren preincubats durant 10 minuts a 37 °C i tot seguit addicionats amb les següents concentracions d'epinefrina;

(■) 10^{-5} M, (□) 10^{-7} M, (▲) 6×10^{-8} M, (Δ) 10^{-8} M,

(○) sol. salina isotònica

Les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats i finalment fou mesurada l'activitat fosforilasa a.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de tres experiments realitzats en dies diferents (excepte per epinefrina 6×10^{-8} M).



l'activitat a era 10^{-8} M epinefrina. Una concentració de 10^{-5} M elevava ràpidament l'activitat de la fosforilasa a al doble del valor que tenia als controls incubats sense hormona. Concentracions superiors d'epinefrina no incrementaven aquest efecte. El retorn als valors inicials d'activitat fosforilasa a començava pocs minuts després d'haver estat assolit el valor màxim. Per les concentracions d'epinefrina intermedies entre la més alta i la més baixa de les efectives, el retorn al valor basal es completava aproximadament al cap de 10 minuts d'incubació.

Als mateixos hepatòcits l'efecte de l'epinefrina sobre la glicogen sintasa era clar a partir d'una concentració de 6×10^{-9} M. Aquest efecte consistia en la disminució de l'activitat sintasa mesurada en absència de glucosa 6-fosfat (FIGURA 24). El canvi més gran d'activitat glicogen sintasa es produïa amb concentracions d'epinefrina iguals o superiors a 10^{-5} M que la reduïen a la quarta part del valor que presentaven les cèl·lules control incubades en absència d'hormona.

3.3.1.2. Efecte sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa d'hepatòcits procedents de rates alimentades.

L'epinefrina també causava l'increment de l'activitat fosforilasa a als hepatòcits obtinguts a partir de rates no sotmeses a limitacions de dieta. La magnitud de l'activació produïda per una concentració d'epinefrina de 10^{-6} M (FIGURA 25) era del mateix ordre que l'observable als hepatòcits de rates mantingudes en dejuni de 24 hores abans dels experiments.

L'activitat glicogen sintasa d'hepatòcits de rates alimentades no era inactivada per concentracions elevades d'epinefrina. El valor basal de l'activitat independent de glucosa 6-fosfat, que era inferior al dels hepatòcits de rates de

FIGURA 24 ACCIÓ DE L'EPINEFRINA SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DEJUNES.

II - Efecte sobre la glicogen sintasa

Les condicions experimentals fören les descrites a la Figura 23.

(■) epinefrina 10^{-5} M, (□) 10^{-7} M, (▲) 6×10^{-8} M, (Δ) 10^{-8} M
(●) 6×10^{-9} M

(○) sol. salina isotònica

Les activitats glicogen sintasa en absència i en presència de glucosa 6-fosfat fören determinades al final dels períodes indicats.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de tres experiments realitzats en dies diferents (excepte epinefrina 10^{-5} M).

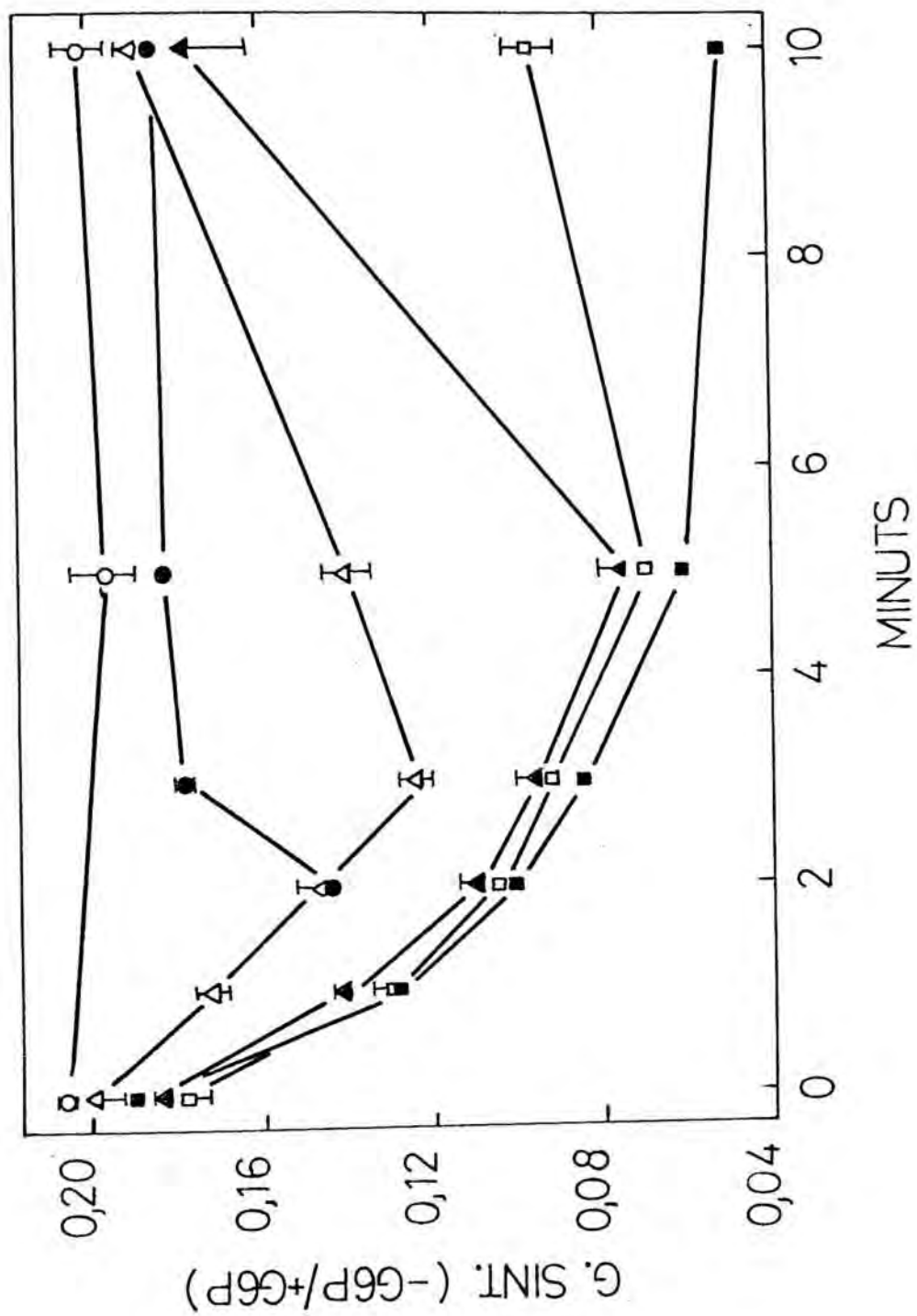
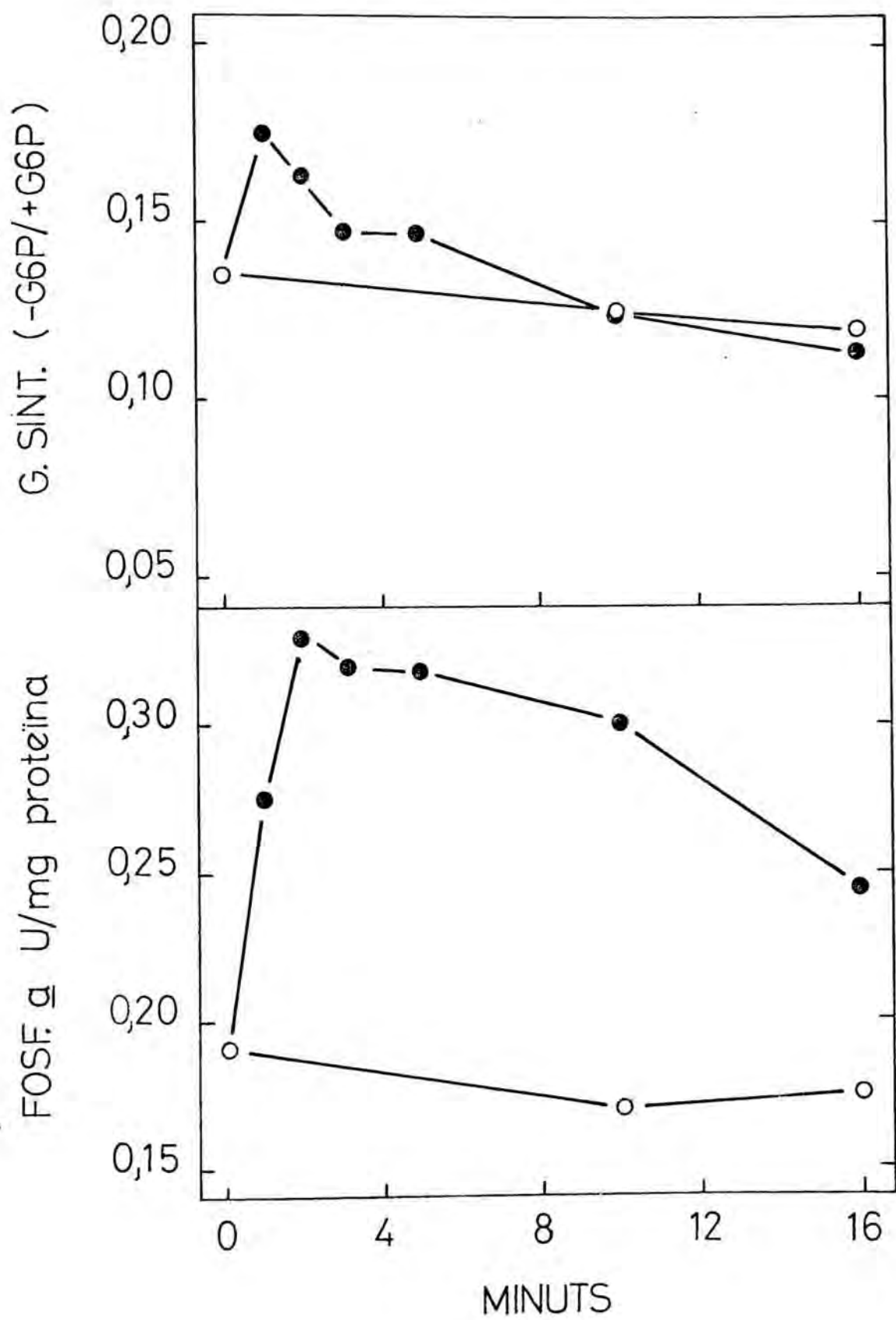


FIGURA 25 ACCIÓ DE L'EPINEFRINA SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES ALIMENTADES NORMALMENT.

Efecte sobre les activitats de la fosforilasa i de la glicogen sintasa

Després d'una preincubació de 10 minuts a 37 °C, els hepatòcits foren addicionats amb epinefrina 10^{-6} M (●) o amb solució salina isotònica (○) i les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats.

Al quadre superior està representada la relació d'activitats de la glicogen sintasa (-/+ glucosa 6-fosfat) en aquestes cèl·lules al final de la incubació amb epinefrina. A l'inferior, l'activitat fosforilasa a



junes, sofria, per contra, una moderada elevació durant els dos primers minuts de presència de l'epinefrina al medi d'incubació (FIGURA 25). Tot seguit l'activitat enzimàtica retornava al valor original.

3.3.1.3. Efecte sobre el nivell intracel·lular d'AMP cíclic i sobre la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Després d'observar uns efectes de l'epinefrina sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa molt similars als causats pel glucagó sobre aquestes mateixes activitats enzimàtiques, vàrem voler esbrinar fins a quin punt l'acció de l'epinefrina estava també relacionada amb increments del nivell intracel·lular d'AMP cíclic i amb la dissociació dels holoenzims de la proteïna quinasa dependent d'aquest nucleòtid.

A la FIGURA 26 són mostrats efectes de l'epinefrina i també els d'un agonista de caràcter gairebé exclusivament alfa-adrenèrgic, la fenilefrina, els resultats de l'estudi del qual s'ofereixen de forma detallada a la secció 3.3.3.

L'activació de la fosforilasa per 10^{-6} M epinefrina cursava amb una lleugera elevació del contingut intracel·lular d'AMP cíclic. Aquesta elevació era molt petita comparada amb la produïda pel glucagó (FIGURA 16).

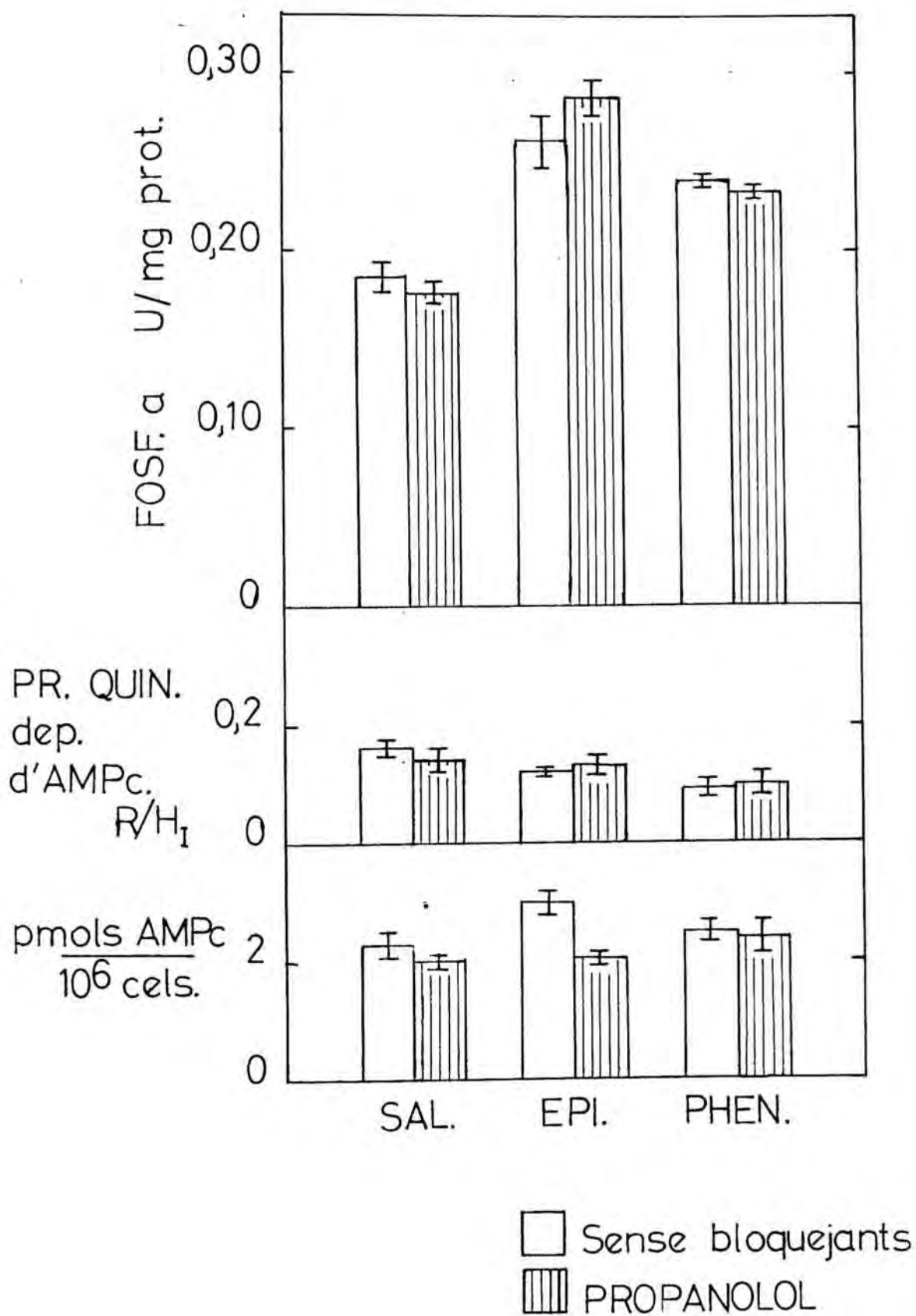
L'increment d'AMP cíclic derivat de la presència d'epinefrina al medi d'incubació dels hepatòcits no causava, però, cap canvi detectable en l'estat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic la qual es mantenia tot hora en l'estat holoenzimàtic.

Si els hepatòcits eren tractats previament amb el

FIGURA 26 ACCIÓ DE L'EPINEFRINA I DE LA FENILEFRINA SOBRE HEPATÒCITS
PROCEDENTS DE RATES DEJUNES.

Efectes sobre el contingut intracel·lular d'AMP cíclic i sobre l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic, comparat amb l'efecte sobre l'activitat fosforilasa a.

Els paràmetres esmentats foren mesurats després d'un minut d'incubació amb epinefrina 10^{-6} M o amb fenilefrina 10^{-5} M. Abans de l'addició d'aquests efectors, les cèl·lules foren incubades 10 minuts a 37 °C en presència de DL-propanolol 2×10^{-5} M o en absència del bloquejant beta-adrenèrgic. Les dades són el promig de dos valors.



bloquejant beta-adrenèrgic propanolol (preincubació de 10 minuts a 37°C amb 2×10^{-5} M DL-propanolol), l'addició d'epinefrina no causava cap increment mesurable d'AMP cíclic. En canvi, aquest tractament no disminuïa l'efectivitat de l'epinefrina per activar la fosforilasa. El comportament de la fenilefrina sobre l'AMP cíclic, la proteïna quinasa i la fosforilasa era idèntic al de l'epinefrina en presència de propanolol.

L'increment d'AMP cíclic causat per una concentració de 10^{-5} M epinefrina retornava al valor basal als 5 minuts d'incubació amb l'hormona. En les mateixes cèl.lules les activitats fosforilasa a i glicogen sintasa independent encara es trobaven ampliament modificades als 10 minuts d'incubació (dades no mostrades).

3.3.2. ESTUDI DELS EFECTES DE L'EPINEFRINA SOBRE LA FOSFORILASA I LA GLICOGEN SINTASA EN PRESENCIA DE BLOQUEJANTS ADRENÈRGICS.

Els resultats que acabem de descriure apuntaven vers un caracter gairebé exclusivament alfa-adrenèrgic de l'actuació de l'epinefrina sobre el metabolisme del glicogen als hepatòcits. Si l'epinefrina modifiqués les activitats fosforilasa i glicogen sintasa per una via independent de la seqüència adenil ciclase-AMP cíclic-proteïna quinasa dependent implicaria l'existència de mecanismes d'acció hormonal glicogenolítica al fetge diferents dels coneguts fins ara.

Per tal de determinar exactament la via sobre la qual operava l'epinefrina per a modificar la fosforilasa i la glicogen sintasa hepàtiques, varen ser plantejats i duts a terme uns experiments en els quals eren bloquejats selectivament els receptors adrenèrgics de caràcter alfa o els de caràcter

beta abans d'introduir al medi la catecolamina.

3.3.2.1. Resposta de la glicogen sintasa i de la fosforilasa a l'epinefrina en presència del bloquejant beta - adrenèrgic propanolol.

El L-propanolol bloqueja els receptors adrenèrgics del tipus beta evitant l'activació de l'adenil ciclase i la producció d'AMP cíclic derivades de l'estímul hormonal d'aquests receptors (FIGURA 26).

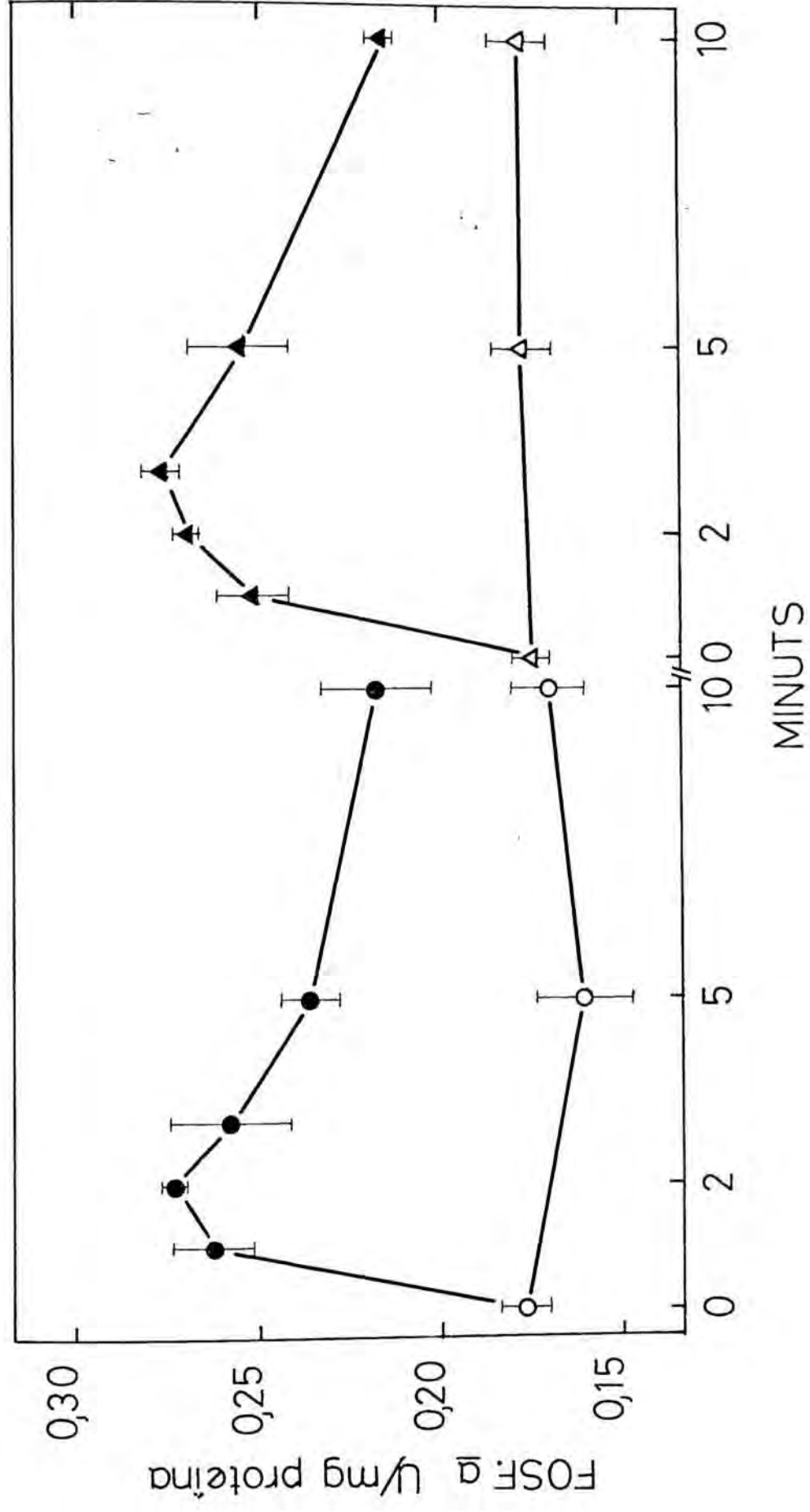
Hepatòcits isolats a partir de rates mantingudes en dejuni durant les 24 hores anteriors als experiments foren in cubats durant 10 minuts a 37°C en presència de 2×10^{-5} M DL-propanolol. Una altra sèrie d'hepatòcits obtinguts a partir dels mateixos animals foren incubats durant el mateix període de temps, però en absència de propanolol. Seguidament a tots ells, amb excepció d'uns controls, s'els adicionà epinefrina fins una concentració de 10^{-7} M i les incubacions es perllongaren durant diferents períodes de temps després dels quals les cèl.lules eren homogeneïtzades i les activitats glicogen sintasa i fosforilasa determinades.

La corba de temps-resposta de la fosforilasa a l'epinefrina no era modificada pel propanolol de manera significativa, (FIGURA 27). A partir d'una activitat basal que en ambdós casos era de 0,175 U de fosforilasa a per mg de proteïna, es produïa una activació que es feia màxima sempre en tre el segon i el tercer minut d'incubació amb la catecolamina, assolint un valor que en els dos casos va ser de 0,270 U/mg prot. aproximadament. El retorn a l'activitat basal també es realitzava a la mateixa velocitat en les dues sèries de cèl.lules. L'activitat fosforilasa a dels controls romanía unifor

FIGURA 27 EFECTE DEL BLOQUEJANT BETA-ADRENÈRGIC DL-PROPANOLOL SOBRE L'ACCIÓ DE L'EPINEFRINA ALS HEPATÒCITS DE RATES DEJUNES.

Hepatòcits procedents de rates dejunes foren incubats durant 10 minuts a 37 °C en presència de DL-propanolol 2×10^{-5} M ($\blacktriangle, \Delta$) o en absència de DL-propanolol ($\bullet, \circ$). Tot seguit fou addicionada epinefrina 10^{-7} M ($\blacktriangle, \bullet$) o solució salina isotònica ($\Delta, \circ$) i l'activitat fosforilasa a fou mesurada al final dels períodes indicats.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de dos experiments realitzats en dies diferents.



me al llarg de tot el període de l'experiment. No fôren observades diferències entre els valors basals d'una i altra sèrie d'hepatòcits.

L'efecte de l'epinefrina sobre la glicogen sintasa, estudiat en els mateixos experiments, tampoc no era modificat per la incubació prèvia amb el bloquejant beta adrenèrgic (FIGURA 28).

La relació d'activitats glicogen sintasa mesurades en absència i en presència de glucosa 6-fosfat era disminuïda per efecte de l'epinefrina fins un valor de 0,07 tant a les cèl.lules tractades amb propranolol com a les no tractades.

Aquest valor mínim apareixia als 5 minuts d'incubació amb l'hormona i es mantenia fins els 10 minuts aproximadament. La relació d'activitats a les cèl.lules control no tractades ni amb propranolol ni amb epinefrina era de 0,17 i es mantenia constant al llarg de l'experiment. El valor basal d'aquesta relació en el cas dels controls tractats previament amb propranolol era, però, sensiblement més baix que el dels no tractats (relació d'activitats als controls amb propranolol: 0,13). Els experiments fets per valorar l'efecte del DL-propranolol "per se" evidenciaven, efectivament, una inactivació parcial de la glicogen sintasa que depenia del temps d'incubació amb aquest producte (FIGURA 29).

3.3.2.2. Resposta de la glicogen sintasa i de la fosforilasa a l'epinefrina en presència de bloquejants alfa - adrenèrgics.

La fenoxibenzamina i la fentolamina son dos productes que bloquejen l'acció de les catecolamines i compostos re

FIGURA 28 EFECTE DEL BLOQUEJANT BETA-ADRENÈRGIC DL-PROPANOLOL SOBRE L'ACCIÓ DE L'EPINEFRINA ALS HEPATÒCITS DE RATES DEJUNES.

II - Efecte sobre la glicogen sintasa.

Les condicions experimentals foren les de la Figura 27, mesurant l'activitat glicogen sintasa (-/+ glucosa 6-fosfat). Preincubació de 10 minuts sense propanolol seguida d'incubació amb epinefrina 10^{-7} (●), o amb solució salina isotònica (○).

Preincubació de 10 minuts amb DL-propanolol 2×10^{-5} M seguida d'incubació amb epinefrina 10^{-7} M (▲), o de solució salina isotònica (△).

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de dos experiments realitzats en dies diferents.

L'activitat glicogen sintasa total (8,5 mU/mg prot., + glucosa 6-fosfat) es mantenia constant al llarg dels experiments.

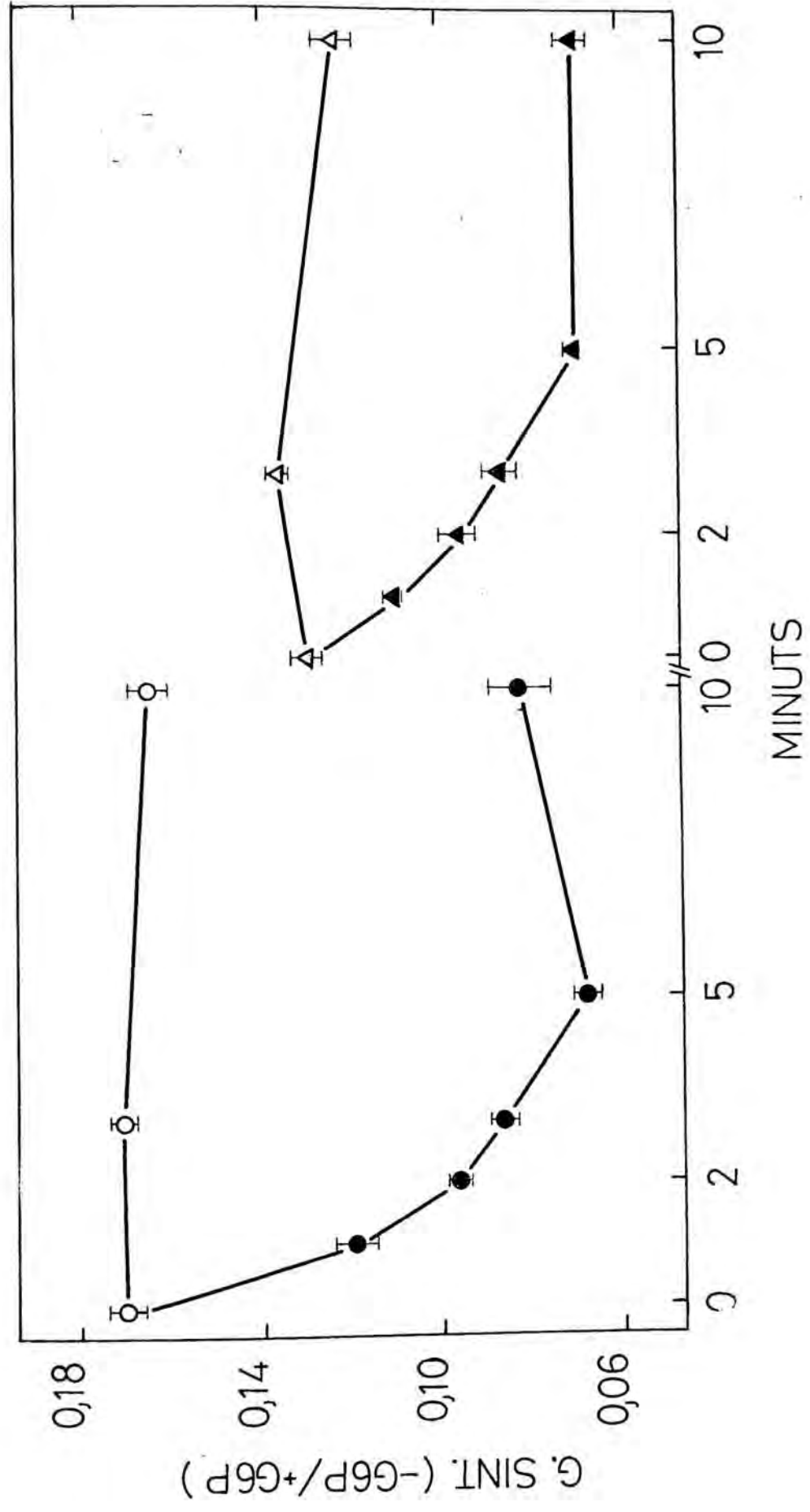
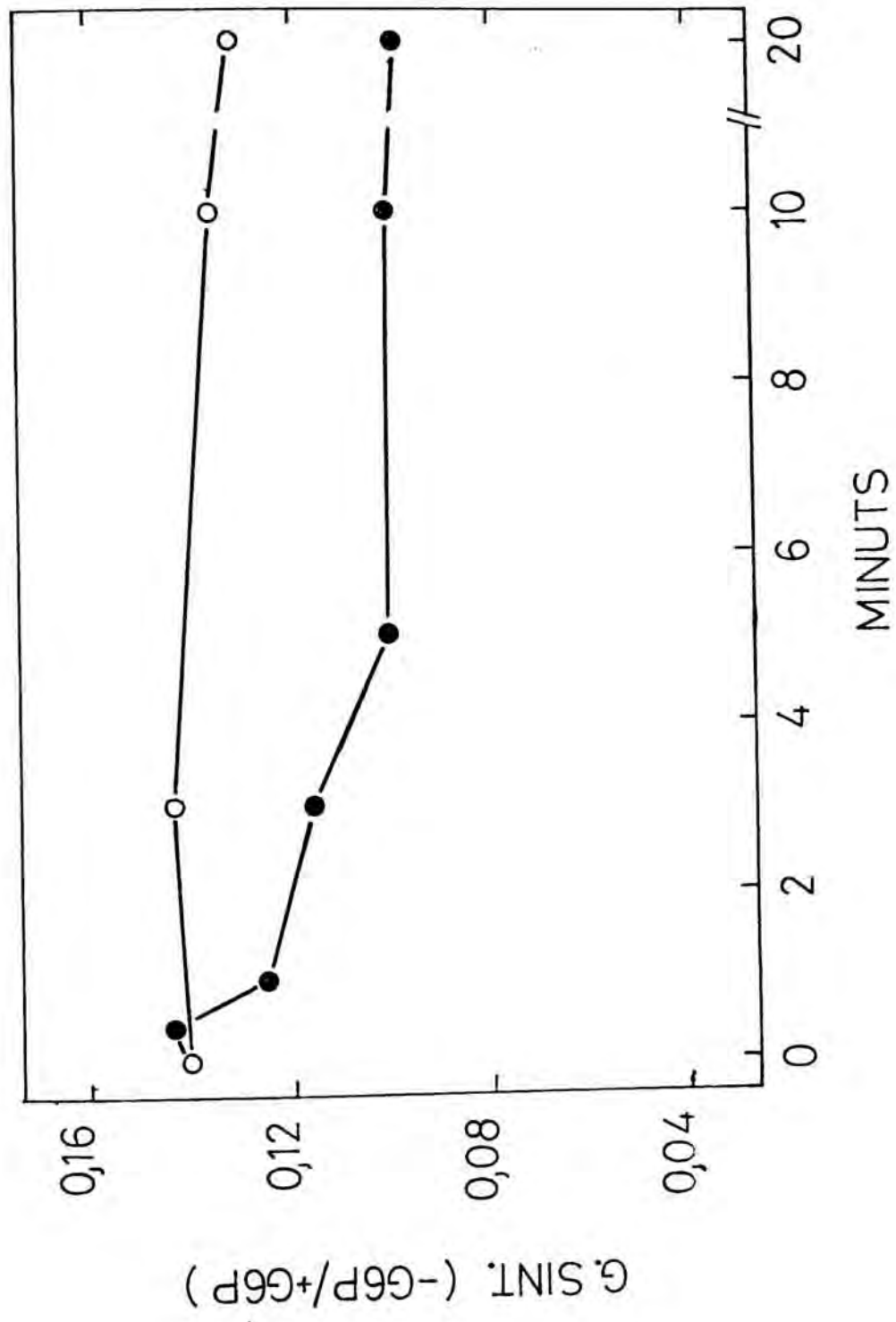


FIGURA 29 EFECTE DEL DL-PROPANOLOL SOBRE LA RELACIÓ D'ACTIVITATS DE LA GLICOGEN SINTASA (-/+ GLUCOSA 6-FOSFAT) ALS HEPATÒCITS AÏLLATS DE RATES DEJUNES.

Després de 10 minuts de preincubació a 37 °C, les cèl·lules foren addicionades amb DL-propanolol 2×10^{-5} M (●) o amb solució salina isotònica (○). Les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats i al final fou mesurada l'activitat de la glicogen sintasa.



lacionats quan aquesta acció està mediatitzada per receptors alfa-adrenèrgics de la membrana cel·lular.

Hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni durant 24 hores foren utilitzats per estudiar l'efecte que la presència de la fenoxibenzamina, una haloalquilamina, exercia sobre l'acció glicogenolítica de l'epinefrina. El planteig dels experiments era el mateix que en el cas dels estudis amb propanolol: tractament simultani de dues sèries paral·leles d'hepatòcits una de les quals era incubada prèviament amb fenoxibenzamina (10^{-5} M) durant 10 minuts.

L'activació de la fosforilasa causada per l'epinefrina a una concentració elevada (10^{-6} M) era gairebé inexistent a les cèl·lules tractades amb el bloquejant (FIGURA 30). L'activitat fosforilasa a, que havia assolit valors de 0,260 U/mg prot. a partir de basals de 0,170 U/mg prot. per efecte de l'epinefrina a les cèl·lules normals, va arribar escassament a 0,190 U/mg prot. a les tractades amb fenoxibenzamina en un efecte que desapareixia després de tres minuts d'incubació.

La relació de les activitats glicogen sintasa mesurades en absència i en presència de glucosa 6-fosfat, que per efecte de l'epinefrina sola descendia de 0,20 a 0,08, coincidia invariablement amb la de les cèl·lules control si el tractament dels hepatòcits amb epinefrina anava precedit pel de fenoxibenzamina (FIGURA 31).

El fenomen del bloqueig dels efectes de l'epinefrina sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa per antagonistes alfa-adrenèrgics va ser revisat també amb un altre producte d'aquest tipus: la fentolamina, del grup de les imidazolines substituïdes en la posició 2.

FIGURA 30 EFECTE DEL BLOQUEJANT ALFA-ADRENÈRGIC FENOXIBENZAMINA SOBRE L'ACCIÓ DE L'EPINEFRINA ALS HEPATÒCITS DE RATES DEJUNES

I - Efecte sobre l'activitat fosforilasa a.

Hepatòcits procedents de rates dejunes foren incubats durant 10 minuts a 37 °C en presència de fenoxibenzamina 10^{-5} M ($\blacktriangle, \Delta$) o en absència d'aquest producte ($\bullet, \circ$). Tot seguit fou addicionada epinefrina 10^{-7} M ($\blacktriangle, \bullet$) o solució salina isotònica ($\Delta, \circ$). Al final dels períodes indicats fou mesurada l'activitat fosforilasa a.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de dos experiments realitzats en dies diferents.

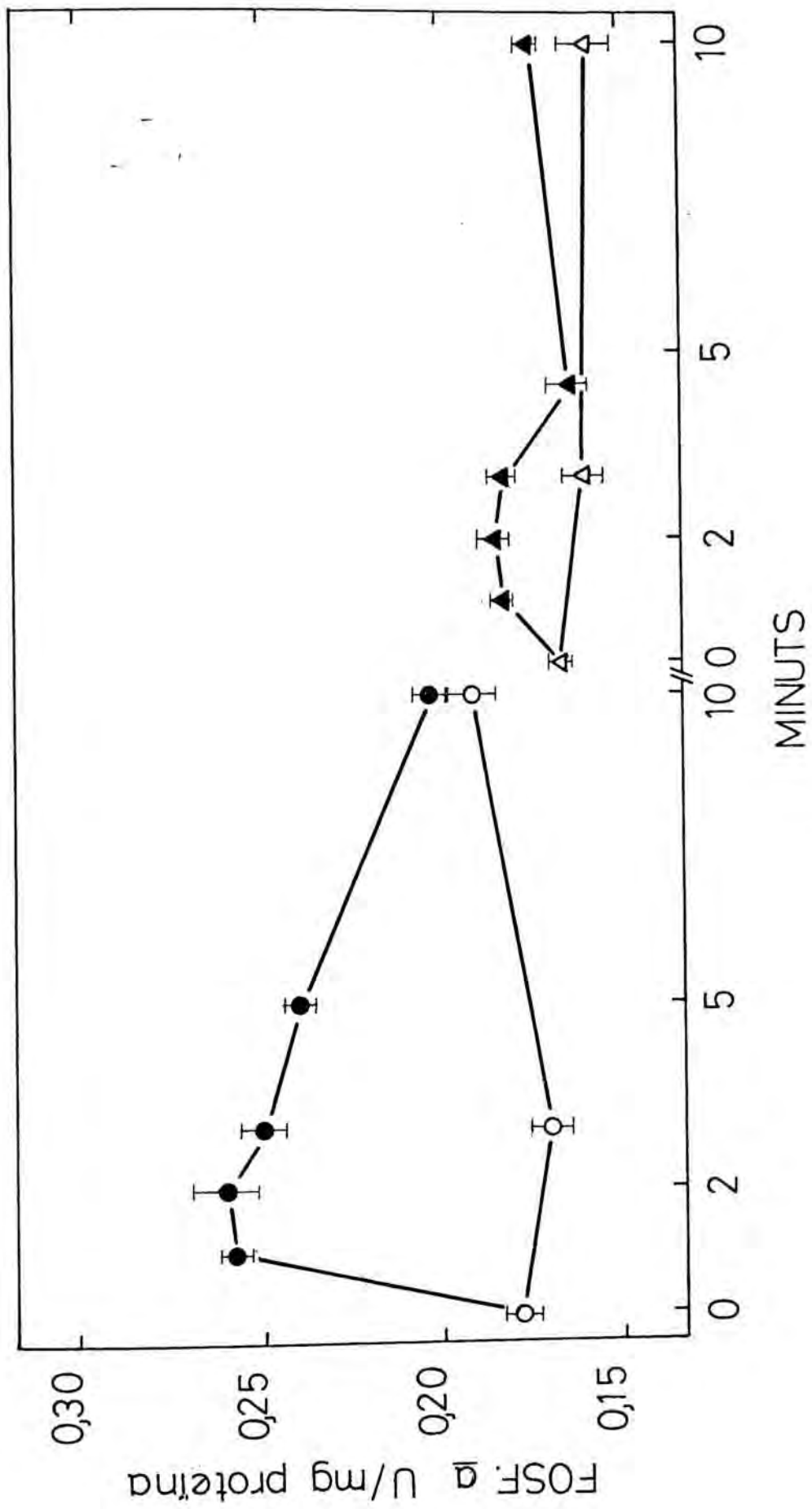


FIGURE 31 EFECTE DEL BLOQUEJANT ALFA-ADRENÈRGIC FENOXIBENZAMINA SOBRE L'ACCIÓ DE L'EPINEFRINA ALS HEPATÒCITS DE RATES DEJUNES.

II - Efecte sobre la glicogen sintasa

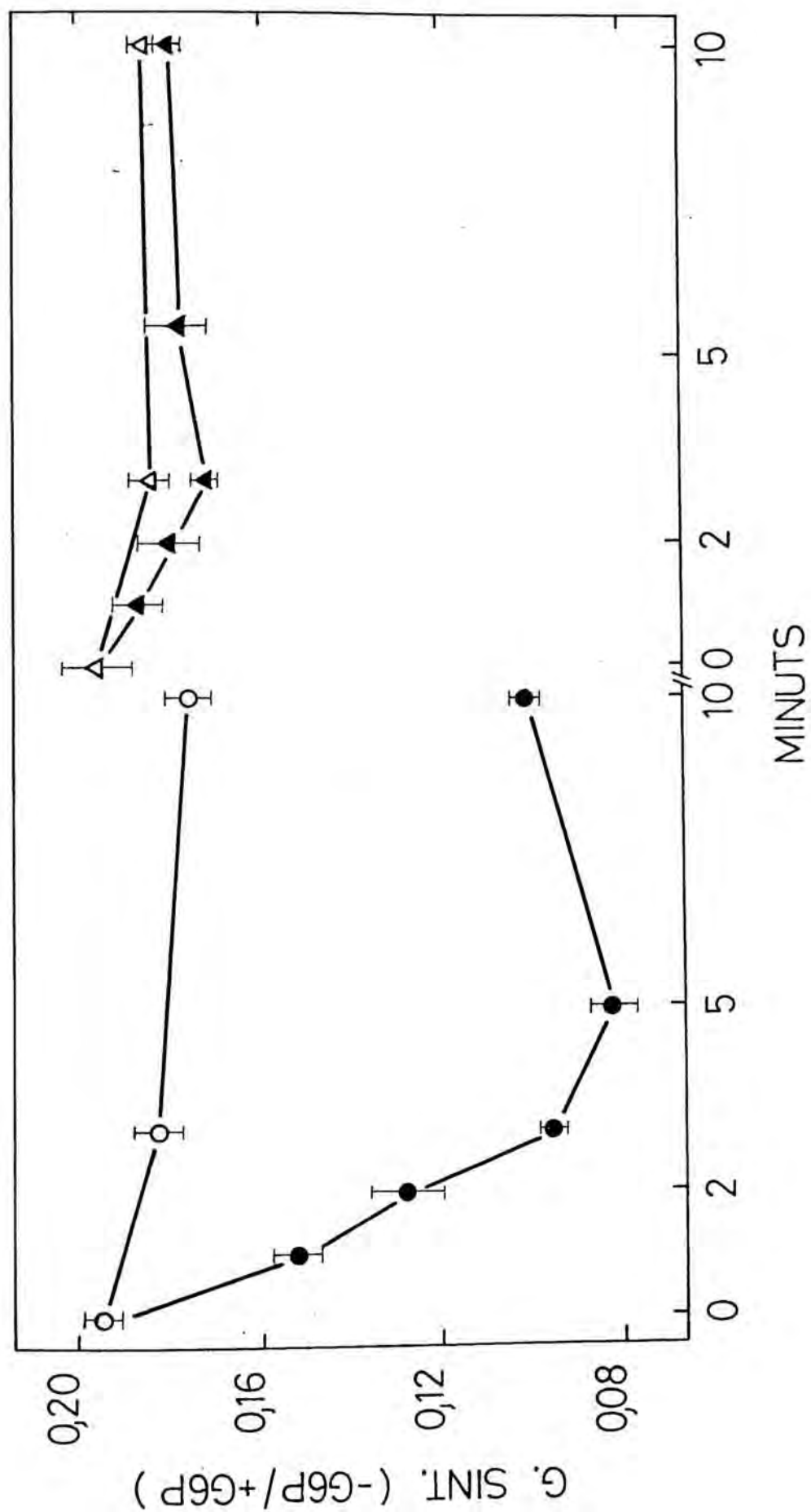
Les condicions experimentals són les de la Figura 30, mesurant l'activitat glicogen sintasa en absència i en presència de glucosa 6-fosfat.

Preincubació de 10 minuts sense fenoxibenzamina seguida d'incubació amb epinefrina 10^{-7} (●) o amb solució salina isotònica (○).

Preincubació de 10 minuts amb fenoxibenzamina 10^{-5} M seguida d'incubació amb epinefrina 10^{-7} M (▲) o de solució salina isotònica (Δ).

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de dos experiments realitzats en dies diferents.

L'activitat glicogen sintasa total es mantenia constant en el transcurs dels experiments, amb un valor promig de 8,35 mU/mg prot.



A hepatòcits isolats a partir de rates dejunes els fou addicionada fentolamina (3×10^{-4} M) i, al cap de 30 segons, epinefrina (10^{-7} M). La incubació es perllongà dos minuts i mig més al final dels quals les cèl.lules foren homogeneïtzades i les activitats glicogen sintasa i fosforilasa determinades (FIGURA 32). La glicogen sintasa presentava un estat d'activació no significativament diferent del d'hepatòcits control incubats sense epinefrina, tractats o no amb fentolamina.

En cèl.lules incubades amb epinefrina sola l'activitat fosforilasa a presentava un valor de 0,259 U/mg prot., notablement superior al de les cèl.lules control (0,187 U/mg prot.). La inclusió de fentolamina al medi 30 segons abans de l'epinefrina evitava també l'activació de la fosforilasa per l'hormona.

3.3.3. RESPOSTA A LA FENILEFRINA, UN AGONISTA ALFA-ADRENÈRGIC.

La fenilefrina és un agent ben conegut pel seu caràcter d'agonista adrenèrgic que selectivament interactua amb receptors del tipus alfa.

La seva acció sobre els receptors beta-adrenèrgics dels hepatòcits era aparentment nul·la (FIGURA 26). La presència en el medi d'incubació d'una concentració relativament alta (10^{-5} M) de fenilefrina no produïa canvis ni en el nivell intracel·lular d'AMP cíclic ni en l'estat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Utilitzant aquest efector com a inductor prototípic de fenomens mediatitzats per receptors alfa-adrenèrgics, fou

FIGURA 32 EFECTE DEL BLOQUEJANT ALFA-ADRENÈRGIC FENTOLAMINA SOBRE LA MODIFICACIÓ DE L'ACTIVITAT DE LA GLICOGEN SINTASA I DE LA FOSFORILASA CAUSADA PER L'EPINEFRINA.

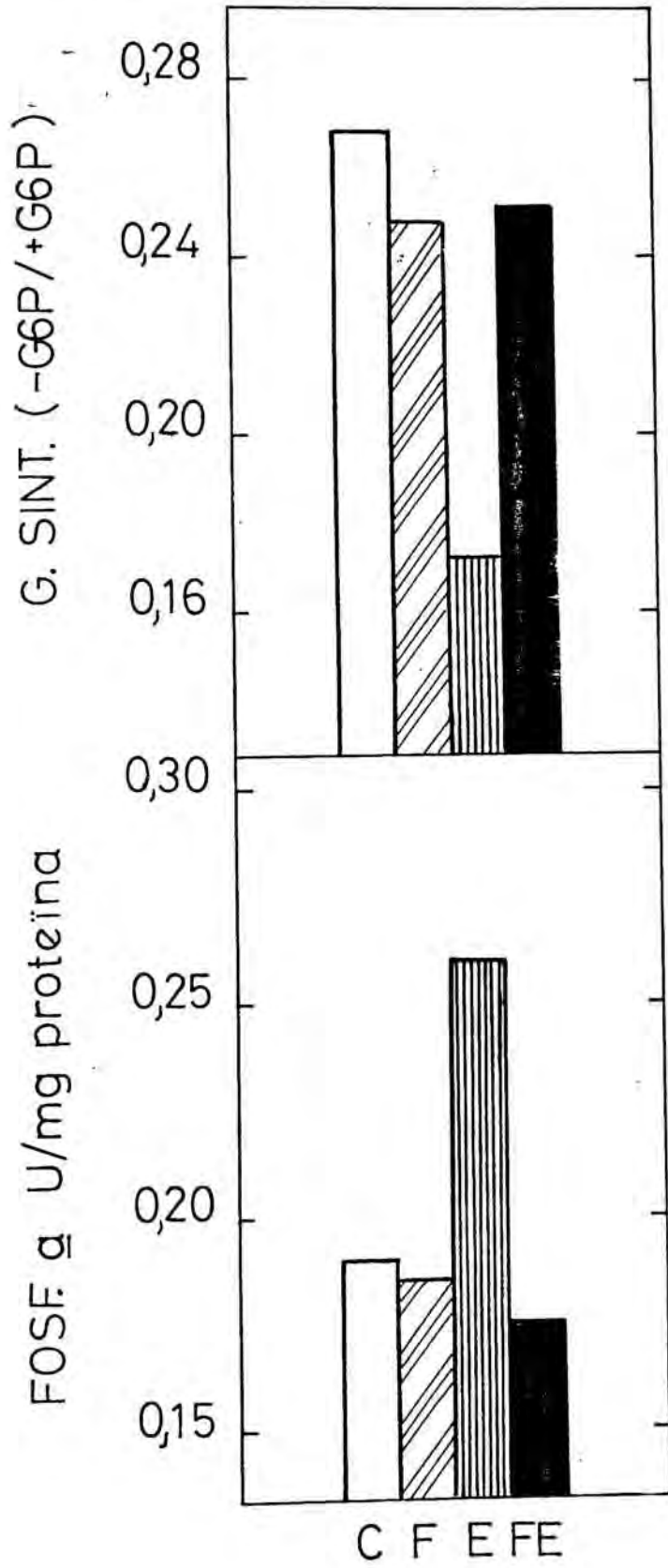
Hepatòcits de rates dejunes foren preincubats durant 10 minuts a 37 °C. Al final d'aquest període, a alguns d'ells els fou afegida fentolamina 3×10^{-4} M. 30 segons més tard foren addicionats amb epinefrina 10^{-7} M i les activitats de la glicogen sintasa i de la fosforilasa al cap de 150 minuts foren comparades amb les dels controls als quals no ha via estat afegida hormona.

C: control (sol.salina isotònica)

E: Epinefrina 10^{-7} M

F: Fentolamina 3×10^{-4} M (+ sol.salina isotònica)

FE: Fentolamina 3×10^{-4} M + epinefrina 10^{-7} M



completat l'estudi de les modificacions que per aquesta via es podien produir sobre les activitats fosforilasa i glicogen sintasa.

3.3.3.1. Efecte sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa d'hepatòcits aïllats a partir d'animals en dejuni.

La fenilefrina era totalment efectiva com a inactivador de la glicogen sintasa i activador de la fosforilasa als hepatòcits isolats de rates mantingudes en dejuni durant les 24 hores prèvies als experiments.

A la FIGURA 33 s'expressa la relació temps-resposta del cocient d'activitats de la glicogen sintasa. Fôren assajades diverses concentracions de l'efector. El valor del cocient d'activitats, que en els controls no tractats amb fenilefrina es mantenia a 0,20, descendia fins a 0,08 per efecte de concentracions de l'efector de 10^{-5} M o superiors. A aquestes concentracions l'efecte màxim era assolit als 5 minuts d'incubació i es mantenia almenys fins els 10 minuts. Una concentració de 3×10^{-7} M encara produïa un efecte clar, però 10^{-7} M ja era aparentment inefectiva.

L'efecte de la fenilefrina sobre la fosforilasa (FIGURA 34) també era similar al causat per l'epinefrina. L'activitat fosforilasa a era ràpidament elevada des del valor basal de 0,165 U/mg prot. fins 0,290 U/mg prot. per fenilefrina 10^{-5} M. La màxima activitat fosforilasa a apareixia als dos minuts d'incubació i a partir d'aquest moment comença va a davallar.

FIGURA 33 ACCIÓ DE LA FENILEFRINA SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DEJUNES

I - Efecte sobre l'activitat glicogen sintasa.

Hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni durant les 24 hores prèvies als experiments foren preincubats 10 minuts a 37 °C. i tot seguit addicionats amb les següents concentracions de fenilefrina:

(●) fenilefrina 10^{-4} M, (■) 10^{-5} M, (□) 3×10^{-6} M, (▲) 10^{-6} M, (Δ) 3×10^{-7} M, (▼) 10^{-7} M

(○) sol. salina isotònica (control)

Les activitats glicogen sintasa en absència i en presència de glucosa 6-fosfat foren determinades al final dels períodes indicats.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de dos (●, ■, Δ), de quatre (□) o de vuit experiments (▲, ○) realitzats en dies diferents.

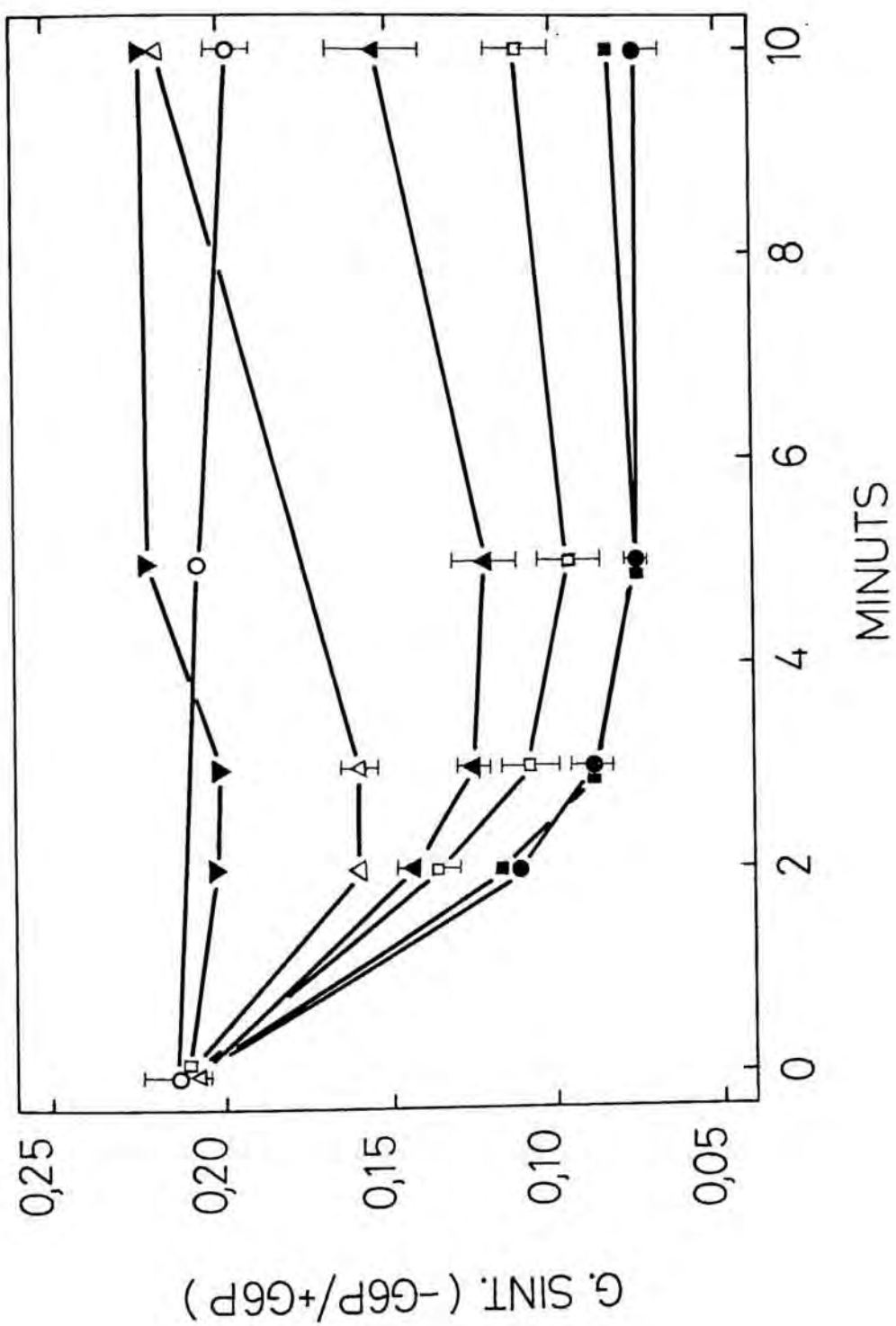


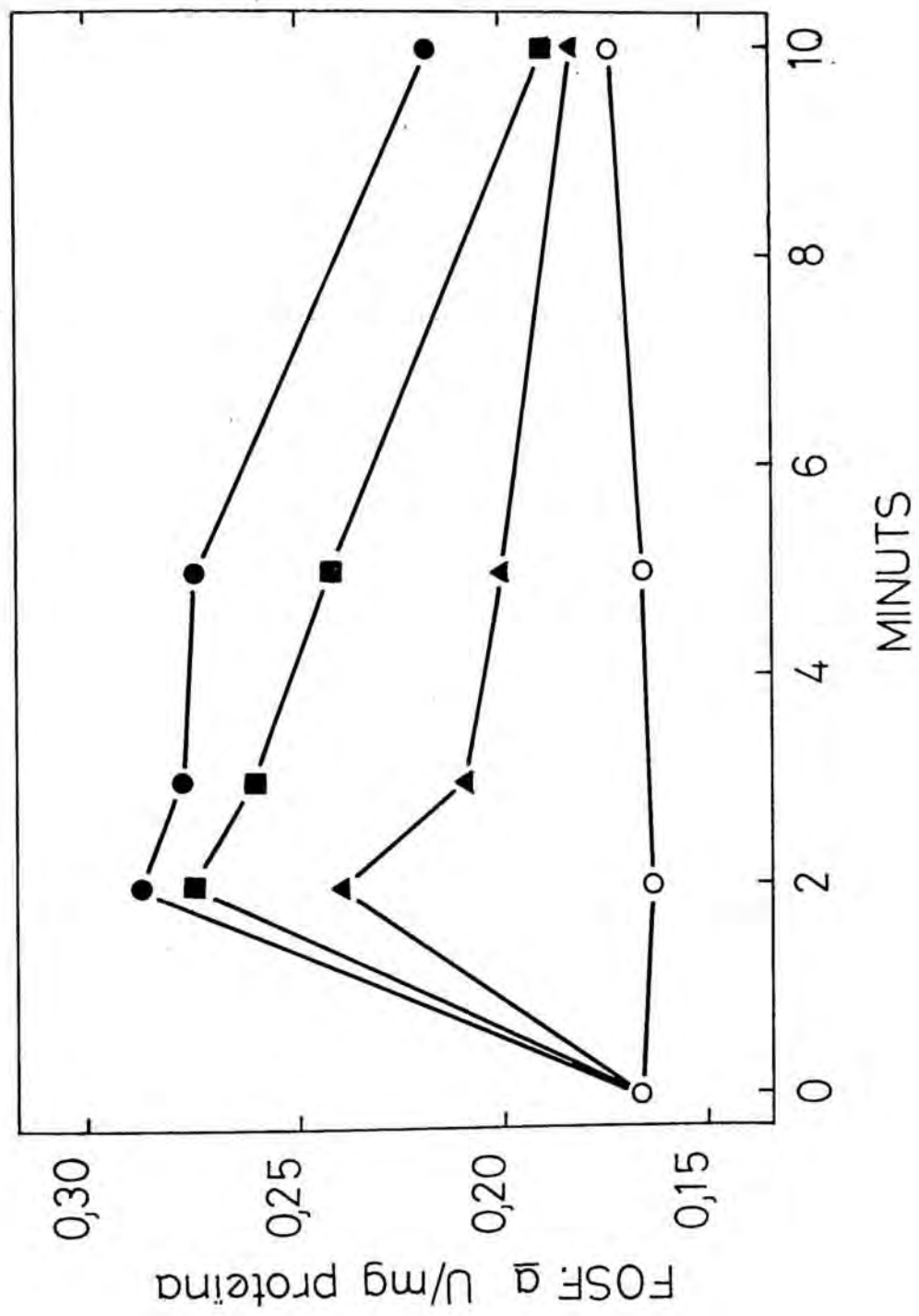
FIGURA 34 ACCIÓ DE LA FENILEFRINA SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DEJUNES

II - Efecte sobre l'activitat fosforilasa a

Les condicions experimentals foren les descrites a la Figura 33, mesurant l'activitat fosforilasa a.

(●) fenilefrina 10^{-5} M, (■) 3×10^{-6} M, (▲) 10^{-6} M

(○) solució salina isotònica (control)



3.3.3.2. Efectes sobre hepatòcits de rates alimentades.

La fenilefrina tenia igualment capacitat per incrementar l'activitat fosforilasa a als hepatòcits de rates alimentades (FIGURA 35). L'efecte de la concentració 10^{-5} M de l'efector sobre l'enzim era equivalent a l'observat en el cas dels hepatòcits de rates dejunes.

L'activitat glicogen sintasa independent, als hepatòcits que eren isolats unes poques hores després que els animals efectuassin l'ingesta principal, no era disminuïble per la fenilefrina, ans al contrari, i de manera idèntica al que succeïa amb l'epinefrina, l'addició de l'efector al medi d'incubació produïa un lleuger increment de l'activitat enzimàtica durant els primers minuts per retornar tot seguit al valor de les cèl.lules incubades sense fenilefrina (FIGURA 35).

3.3.4. ASINCRONIA ENTRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA I L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PER EPINEFRINA I FENILEFRINA.

L'activació de la fosforilasa i la inactivació de la glicogen sintasa, ambdues resultants de la presència d'epinefrina o de fenilefrina al medi que contenia els hepatòcits, no es produïen de manera totalment sincrònica. Els canvis de l'activitat fosforilasa precedien sistemàticament als canvis corresponents a l'activitat glicogen sintasa, tant pel que feia a llur iniciació, com a l'assoliment de llur valor màxim i, finalment, a llur reversió total.

Aquest fenomen es presenta, pel cas de l'epinefrina, racionalitzat gràficament a la FIGURA 36, on "inactivació de la glicogen sintasa independent" equival numèricament al co-

FIGURA 35 ACCIÓ DE LA FENILEFRINA SOBRE HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES ALIMENTADES NORMALMENT.

Efecte sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa.

Després d'una preincubació de 10 minuts a 37 °C, els hepatòcits foren addicionats amb fenilefrina 10^{-5} M (●) o amb solució salina isotònica (○) i les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats.

Al requadre superior es representa la relació d'activitats (-/+ glucosa 6-fosfat) de la glicogen sintasa en aquestes cèl·lules al final de la incubació amb fenilefrina. A l'inferior, l'activitat fosforilasa a.

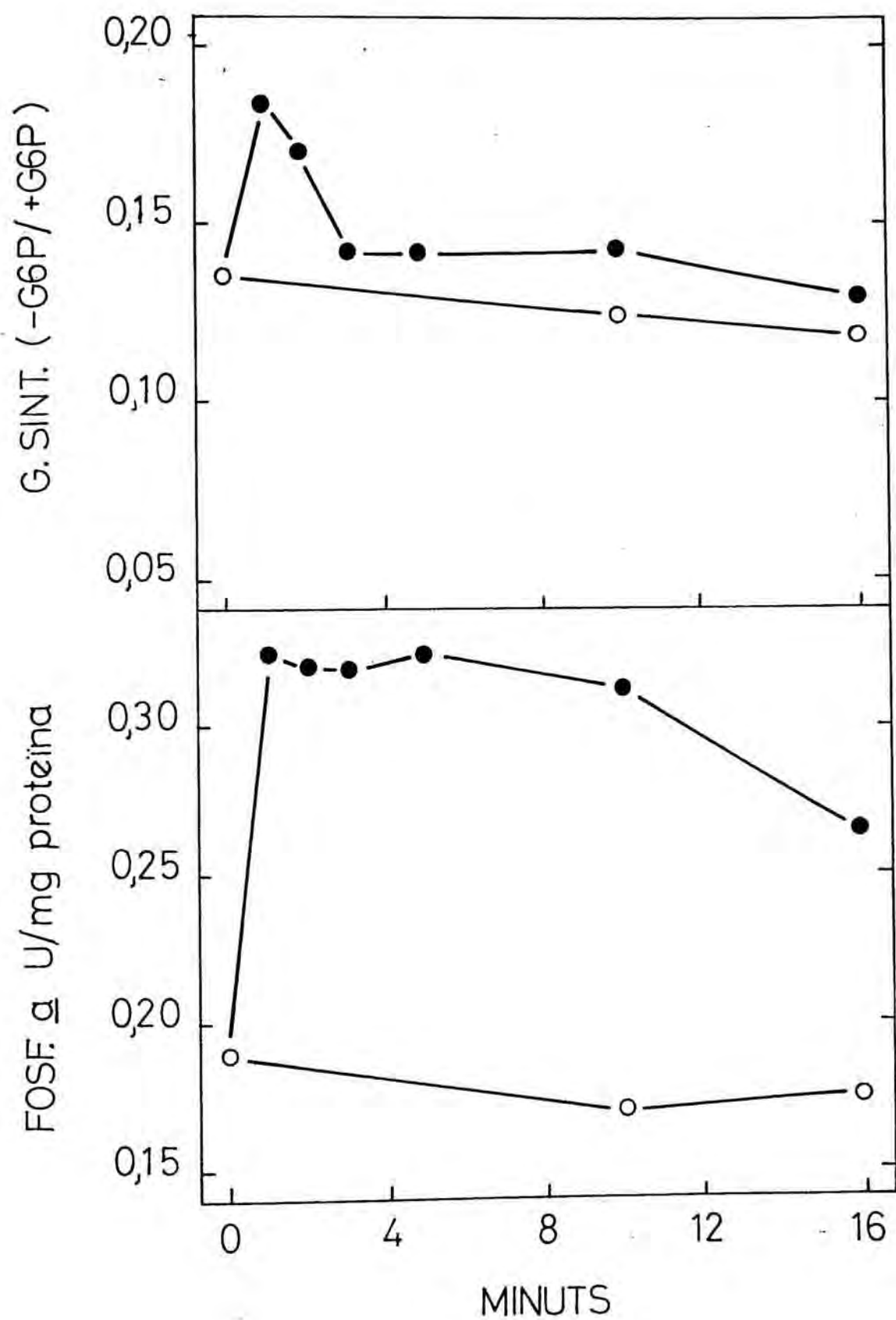
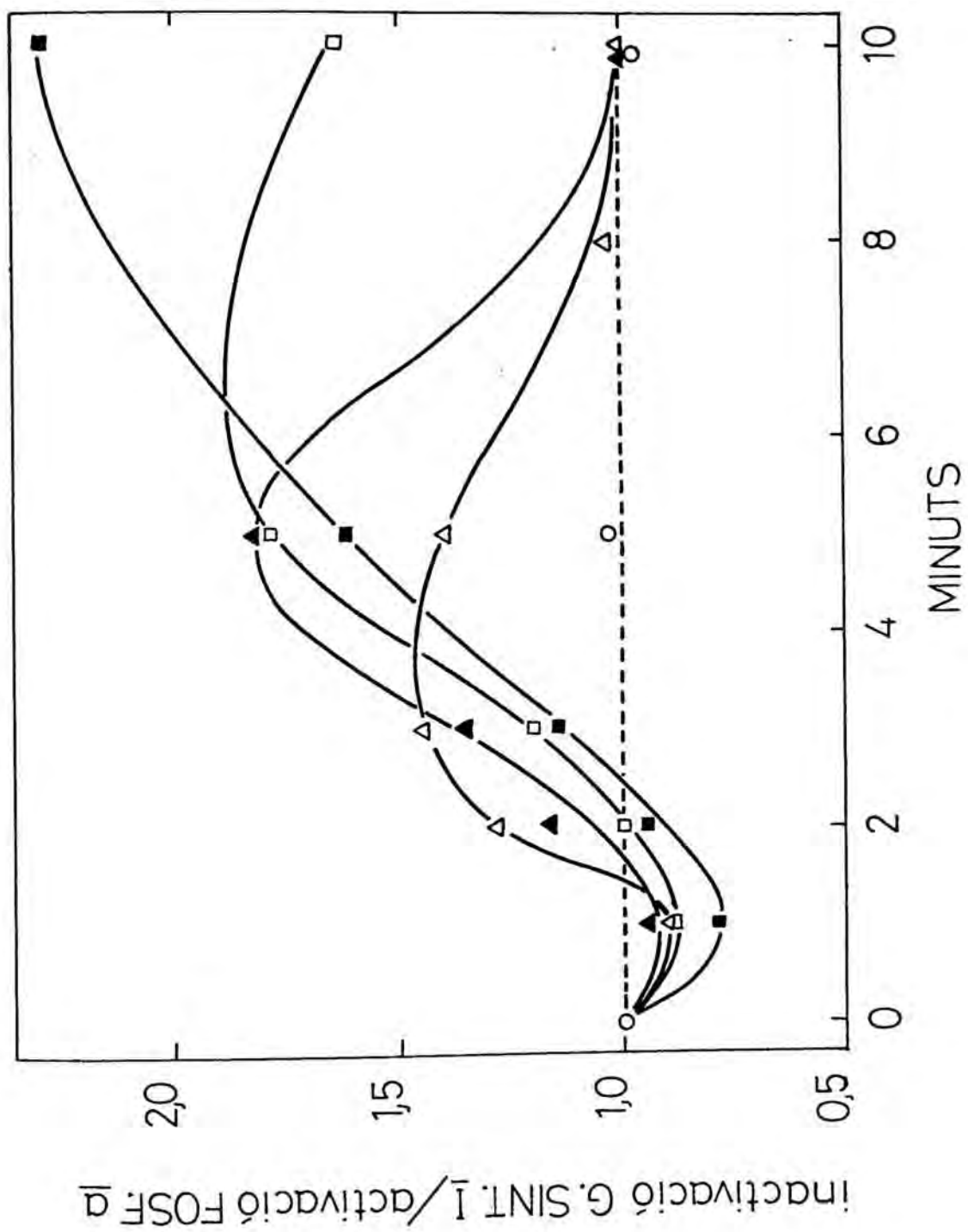


FIGURA 36 REPRESENTACIÓ GRÀFICA DE L'ASINCRONIA ENTRE ELS EFECTES DE L'EPINEFRINA SOBRE LA FOSFORILASA I SOBRE LA GLICOGEN SINTASA

El fenomen està representat segons que s'indica en el text.

(■) epinefrina 10^{-5} M, (□) 10^{-6} M, (▲) 6×10^{-8} M, (Δ) 10^{-8} M
(○) control



cient (valor basal/valor amb hormona) i "activació de la fosfolisa a", al cocient (valor amb hormona/valor basal). Tret de quan l'actuació es trobava en el temps 0 o de quan els efectes de l'hormona ja havien finalitzat, la relació "inactivació sintasa/activació fosforilasa" prenia el valor d'1,0 únicament en un moment concret de l'actuació hormonal. El període d'actuació restava així dividit en dues estapes. A la primera, que era la compresa entre el temps 0 i el d'equivalència d'efectes (valor 1,0), hi prevalia l'activació de la fosforilasa i la racionalització "inactivació sintasa/activació fosforilasa" prenia valors inferiors a la unitat. A la segona succeïa la inversa: hi prevalia l'activació de la glicogen sintasa i la relació es feia superior a 1,0. Aquesta segona etapa es mantenia fins al final de l'actuació hormonal.

La mateixa racionalització aplicada a diferents concentracions de fenilefrina donava lloc a una expressió gràfica equivalent (FIGURA 37).

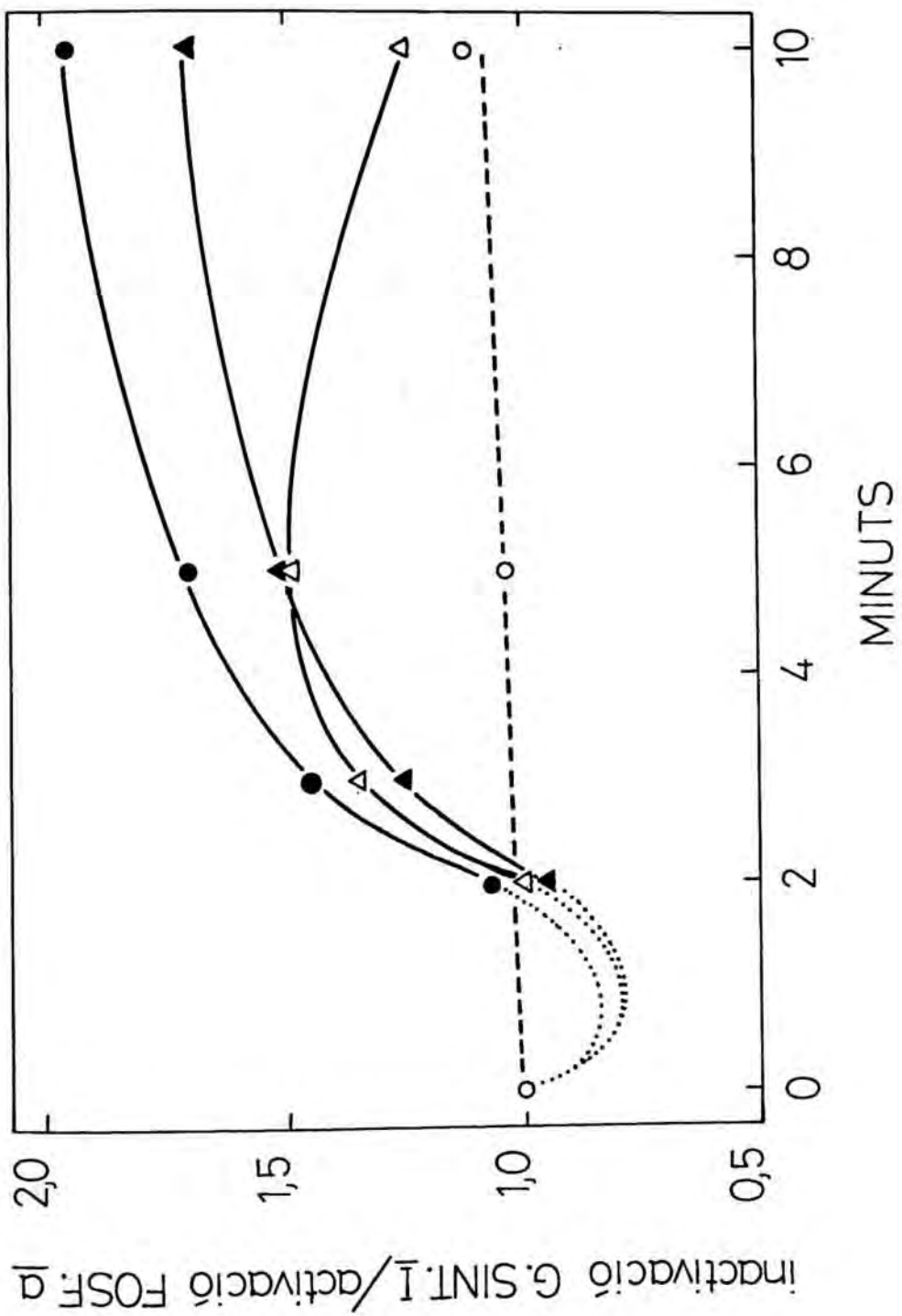
3.3.5. EFECTE COMBINAT DE LA FENILEFRINA, EL GLUCAGÓ I EL DIBUTIRIL AMP CÍCLIC SOBRE LA FOSFORILASA I LA GLICOGEN SINTASA.

A fi d'aclarir quina era la màxima activació que la fosforilasa de les cèl·lules del parènquima hepàtic podia experimentar per efecte dels agents glicogenolítics assajats en les nostres condicions de treball, foren duts a terme uns experiments en els quals s'estudià l'acció combinada d'aquests agents, en especial la dels que presumiblement exercien llurs efectes a través de mecanismes diferents.

Hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni les 24 hores prèvies a l'experiment foren addicionats amb di-

FIGURA 37 REPRESENTACIÓ GRÀFICA DE L'ASINCRONIA ENTRE ELS EFECTES DE LA FENILERINA SOBRE LA FOSFORILASA I LA GLICOGEN SINTASA.

El fenomen està representat segons que s'indica en el text
(●) fenilefrina 10^{-5} M, (▲) 3×10^{-6} M, (Δ) 10^{-6} M
(○) control



butiril AMP cíclic a una concentració de 3×10^{-5} M. Aquesta concentració era la que produïa el màxim efecte sobre la fosforilasa (FIGURA 21), superior a l'efecte corresponent a qualsevol dels altres agents assajats. Els vials que contenien hepatòcits en incubació amb dibutiril AMP cíclic foren dividits en quatre sèries. Als cinc minuts d'incubació, la primera sèrie de vials fou addicionada amb una concentració màximament efectiva de fenilefrina (10^{-5} M) i les incubacions d'aquests vials es perllongaren durant uns determinats períodes de temps. La segona i tercera sèries foren addicionades, respectivament, amb una concentració saturant de glucagó (2×10^{-7} M) i amb una segona dosi de dibutiril AMP cíclic 3×10^{-5} M i sotmeses també a diferents temps d'incubació. Finalment, la quarta sèrie no sofrí cap nova addició i jugà el paper de control incubat solament amb la concentració inicial de dibutiril AMP cíclic.

La FIGURA 38 mostra els efectes que les anteriors addicions tingueren sobre l'activitat fosforilasa a dels hepatòcits. Als cinc minuts d'incubació amb dibutiril AMP cíclic sol, l'activitat ja havia assolit el valor màxim per a aquest agent. Una addició de més dibutiril AMP cíclic en aquest moment no produïa increments majors. Les addicions de fenilefrina o de glucagó tampoc causaven increments sobre l'activitat present a les cèl·lules tractades amb la dosi única de dibutiril AMP cíclic.

Es volia saber, igualment, quina era la màxima inactivació que la glicogen sintasa d'aquestes cèl·lules podia presentar a conseqüència dels tractaments esmentats. Als mateixos experiments fou determinada la relació d'activitats glicogen sintasa independent i dependent de glucosa 6-fosfat. El fenomen observat va ser, essencialment, el mateix que amb l'activitat fosforilasa a. El canvi màxim d'activitat, assolit

als cinc minuts d'incubació amb dibutiril AMP cíclic (FIGURA 39), no era augmentat per cap de les addicions realitzades en aquest punt.

FIGURA 38 EFECTE COMBINAT DEL DIBUTIRIL AMP CÍCLIC, EL GLUCAGÓ I LA FENILEFRINA SOBRE LA FOSFORILASA D'HEPATÒCITS PROCEDENTS DE RATES DEJUNES.

La fletxa assenyala el punt en el qual a les cèl·lules in cubades amb dibutiril AMP cíclic 3×10^{-5} M (○) els fou addicionat glucagó 2×10^{-7} M (■) fenilefrina 10^{-5} M (▲) o una segona dosi de dibutiril AMP cíclic 3×10^{-5} M (●).

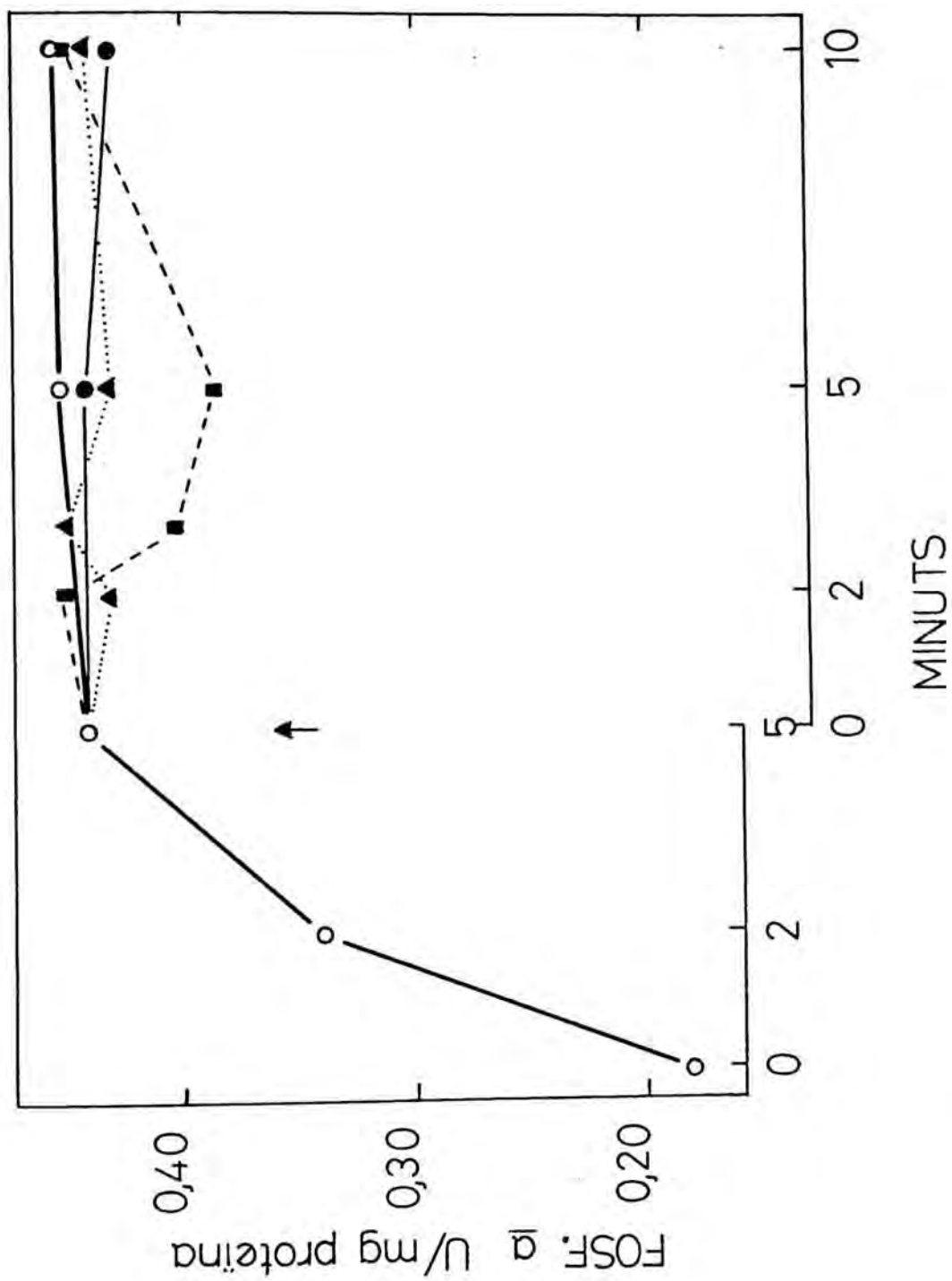
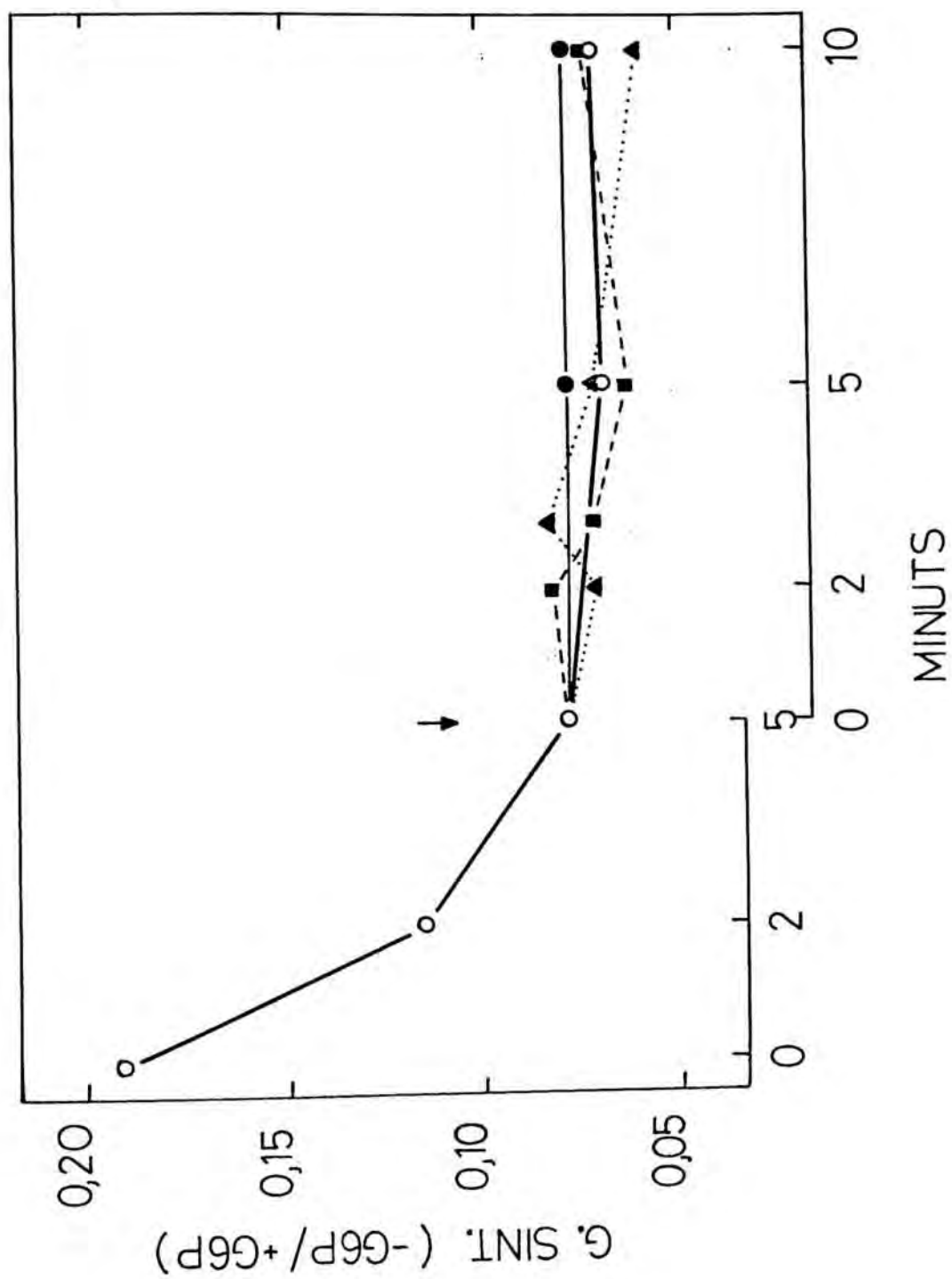


FIGURA 39 EFECTE COMBINAT DEL DIBUTIRIL AMP CÍCLIC, EL GLUCAGÓ I LA FENILEFRINA SOBRE LA RELACIÓ D'ACTIVITATS (-/+ GLUCOSA 6-FOSFAT) DE LA GLICOGEN SINTASA ALS HEPATÒCITS DE RATES DE JUNES.

Les condicions d'experimentació i les addicions d'efectors glicogenolítics foren les mateixes que les indicades a la Figura 38.



3.4. ACCIONS DE LA INSULINA EN HEPATÒCITS EN ABSÈNCIA DE GLUCOSA.

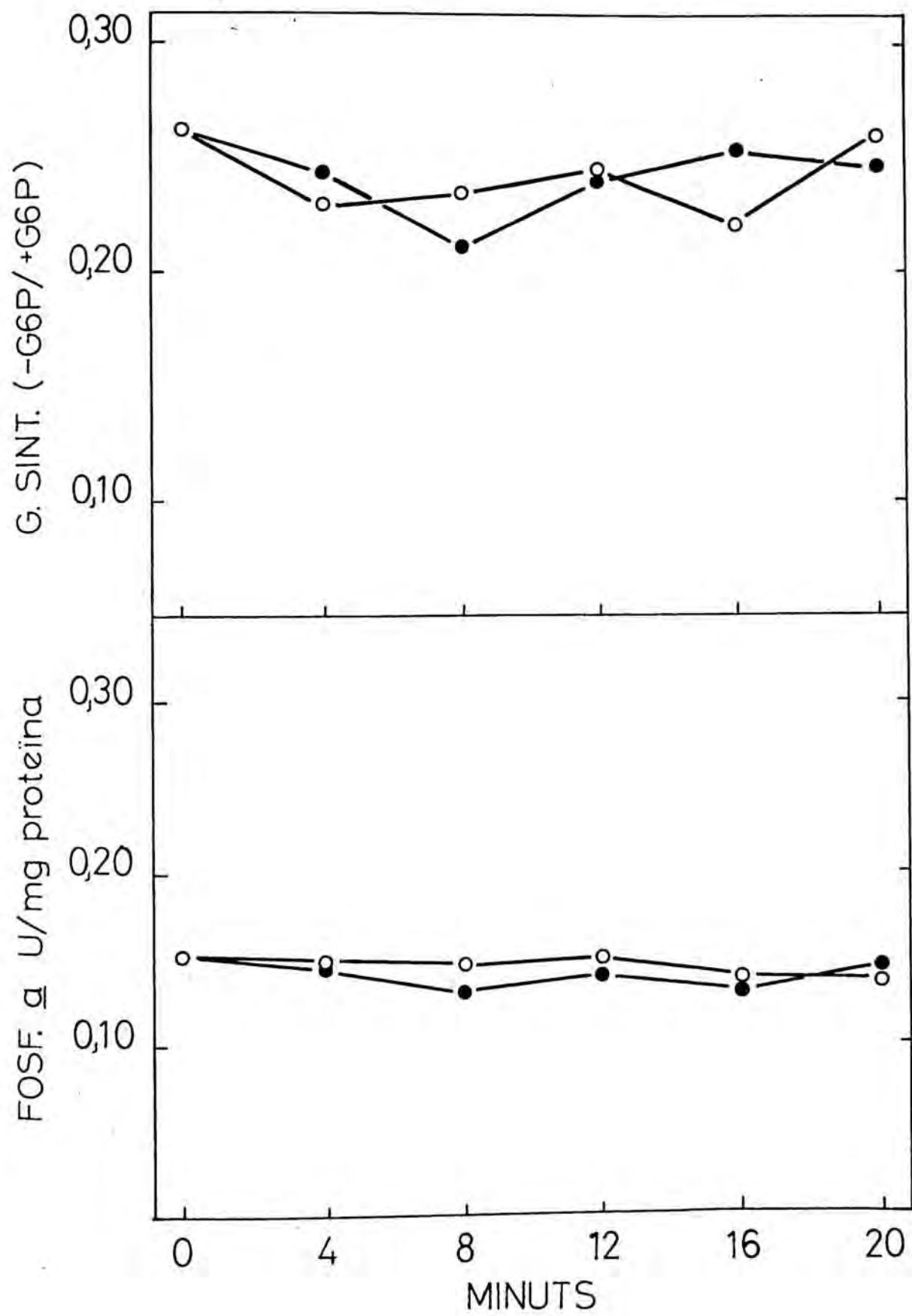
L'estudi dels efectes de la insulina sobre hepatòcits aïllats fou dut a terme amb cèl.lules procedents d'animals mantinguts en dejuni durant les 24 hores prèvies als experiments. Aquestes cèl.lules, que no contenien glicogen precipitable amb etanol del 66%, eren incubades sempre en un medi que no contenia glucosa (veure secció 2.3.) ni cap altra substància nutritiva.

3.4.1. EFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA GLICOGEN SINTASA I LA FOSFORILASA.

La incubació dels hepatòcits durant 20 minuts amb insulina a una concentració 10^{-8} M que per altres efectes de l'hormona era saturant, no produïa cap alteració observable sobre l'activitat glicogen sintasa independent de glucosa 6-fosfat (FIGURA 40) ni en l'activitat dependent. L'activitat fosforilasa a també es mantenia invariable sota aquest tractament amb insulina (FIGURA 40).

FIGURA 40 ACCIÓ DE LA INSULINA SOBRE LES ACTIVITATS DE LA GLICOGEN SINTASA I DE LA FOSFORILASA D'HEPATÒCITS ISOLATS A PARTIR DE RATES DEJUNES

Les cèl.lules foren incubades 10 minuts a 37 °C abans d'afegir-hi insulina 10^{-8} M (●) o solució salina isotònica (○) i de mesurar les activitats enzimàtiques al final dels períodes indicats.



3.4.2. DISMINUCIÓ DE LA RESPOSTA DELS HEPATÒCITS AL GLUCAGÓ PER LA INSULINA.

Malgrat la seva aparent inefectivitat sobre les activitats glicogen sintasa i fosforilasa en absència de glucosa, la insulina era capaç de limitar els efectes del glucagó sobre els hepatòcits en aquestes condicions.

3.4.2.1. Limitació de l'efecte del glucagó sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa.

Després d'una preincubació dels hepatòcits que durava 10 minuts i que es feia en absència d'insulina, el glucagó a una concentració de 3×10^{-10} M, produïa un marcat descens de l'activitat glicogen sintasa independent (FIGURA 41). Al tercer minut d'incubació amb glucagó la inactivació era màxi-ma. L'activitat glicogen sintasa inicial (0,26 $\pm$ glucosa 6-fosfat) havia estat disminuïda en un 40% aproximadament. Als 10 minuts d'incubació l'activitat havia retornat gairebé al valor inicial.

La resposta a la mateixa concentració de glucagó en cèl.lules que des del període de preincubació havien estat en presència d'insulina 8×10^{-9} M. era significativament menor que la de les cèl.lules no tractades amb insulina. A les incu-bades amb aquesta hormona l'efecte del glucagó començava a desaparèixer a partir del segon minut d'incubació, després d'ha-ver-se produït un màxim descens d'activitat del 25% respecte del valor inicial.

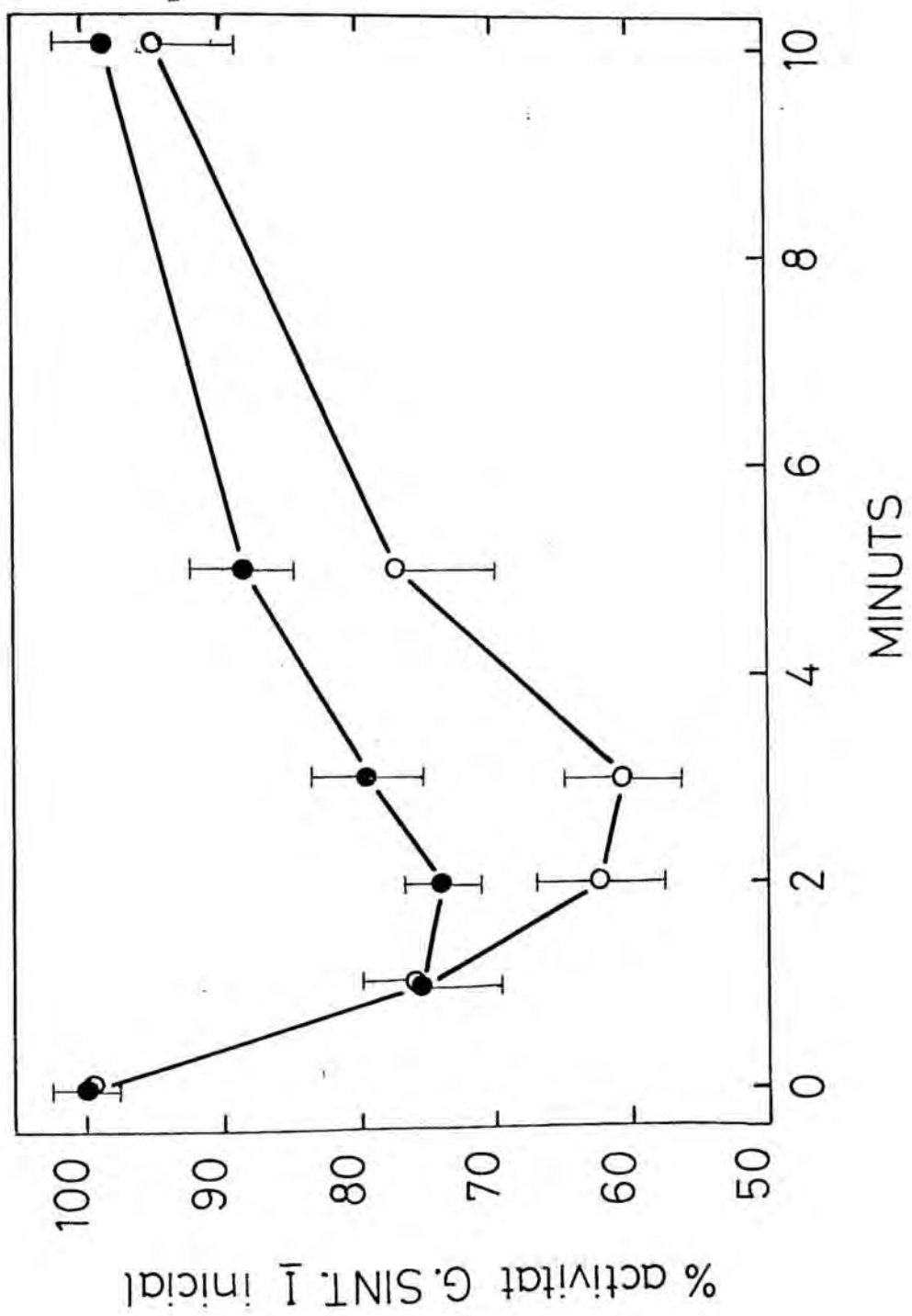
Als mateixos experiments fou seguida l'evolució de la fosforilasa. L'activitat basal de la forma a de l'enzim era 0,170 U/mg prot. Per efecte de l'esmentada concentració

FIGURA 41 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA PER GLUCAGÓ.

Hepatòcits de rates dejunes foren preincubats durant 10 minuts amb insulina 8×10^{-9} M (●) o amb solució salina isotònica (○). Tot seguit els fou addicionat glucagó 3×10^{-10} M i les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats. Finalment fou mesurada l'activitat glicogen sintasa.

L'activitat glicogen sintasa total (5,85 mU/mg prot., + glucosa 6-fosfat) no va ser modificada significativament en cap condició.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de tres experiments realitzats en dies diferents.



de glucagó aquest valor s'incrementava ràpidament fins 0,285 U/mg prot. (FIGURA 42), i començava a disminuir a partir del segon minut d'incubació. Quan el glucagó era afegit a cèl.lules que previament havien estat tractades amb insulina, l'amplitud del seu efecte sobre l'activitat fosforilasa a era aproximadament la meitat de l'observat amb glucagó sol. El re torn de l'activitat enzimàtica al valor original era, però, poc modificada per la insulina.

L'efecte de la insulina era dosi-dependent. Els hepatòcits foren incubats amb diverses concentracions d'insulina durant 10 minuts. Al final d'aquest temps els fou afegit glucagó (3×10^{-10} M) i les incubacions seguïren aquells períodes que, a la sèrie d'experiments anterior, havien presentat les majors diferències entre les activitats de les cèl.lules tractades amb insulina i les no tractades. Aquests períodes eren de tres minuts quan era estudiat l'efecte sobre la glicogen sintasa i d'un minut i mig quan ho era el de la fosforilasa. La FIGURA 43 mostra la dosi-dependència de la insulina contrarrestant els efectes del glucagó.

Pel que feia a la glicogen sintasa, mentre la concentració més baixa d'insulina a la qual s'observava un efecte era 10^{-9} M, una concentració de 10^{-7} M abolia gairebé del tot l'acció del glucagó sobre aquesta activitat enzimàtica. A una concentració de 3×10^{-10} M, la insulina ja mostrava efecte sobre la fosforilasa activada pel glucagó. L'efecte de la insulina era màxim a una concentració de 3×10^{-9} M.

L'acció de la insulina també depenia del temps que els hepatòcits havien estat en contacte amb ella abans de ser-los-hi addicionat el glucagó. En uns experiments preliminars per estudiar les condicions experimentals òptimes fou observat que per produir una màxima disminució de l'efecte del

FIGURA 42 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PER GLUCAGÓ.

Les condicions experimentals fóren les mateixes que les de la Figura 41, mesurant l'activitat fosforilasa a al final de la incubació amb glucagó.

(●) preincubació amb insulina 8×10^{-9} M

(○) preincubació amb solució salina isotònica

L'activitat fosforilasa a d'hepatòcits control incubats sen se glucagó es mantenia constant durant el període dels experiments.

Les dades són el promig + E.E. de cinc experiments realitzats en dies diferents.

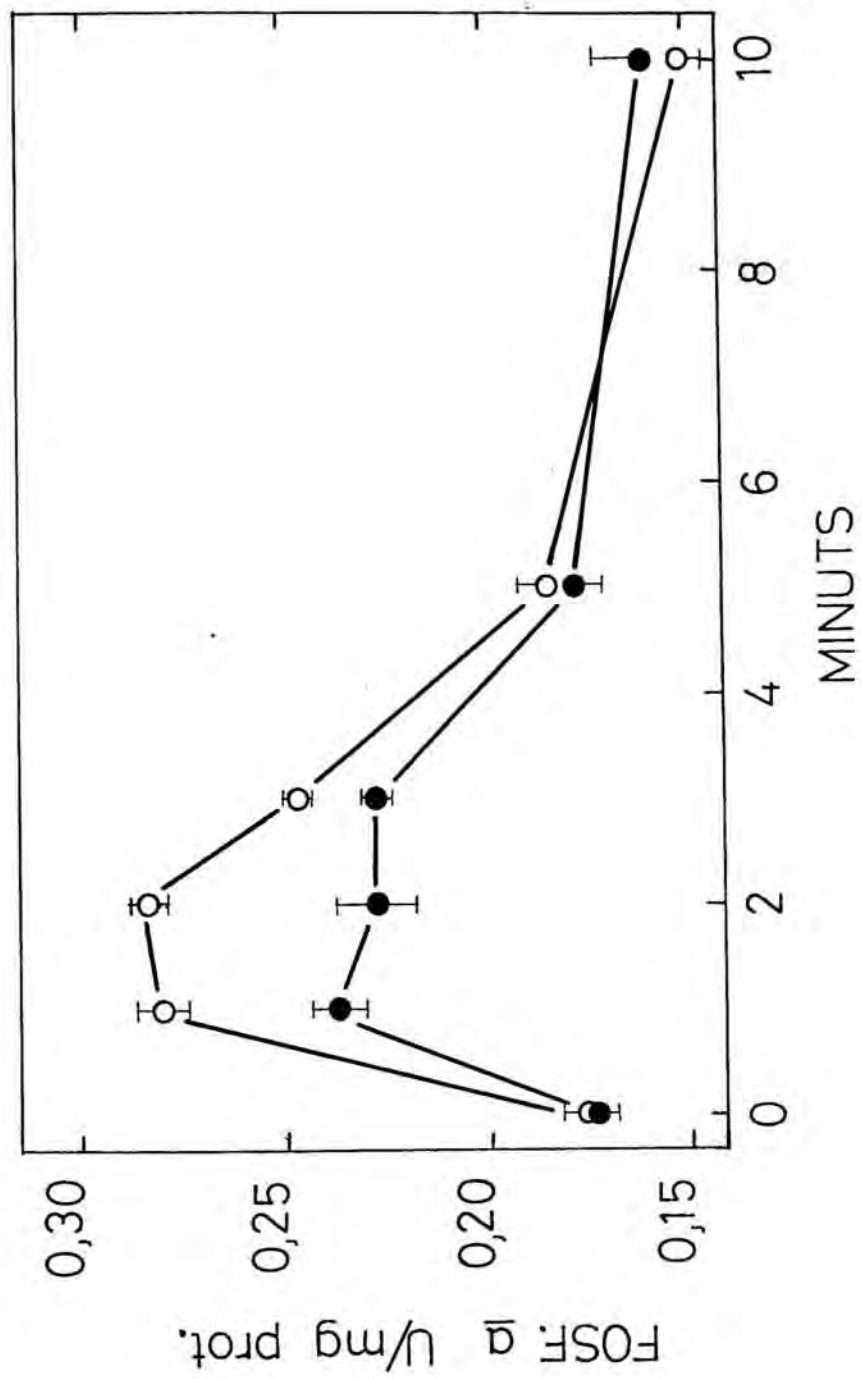
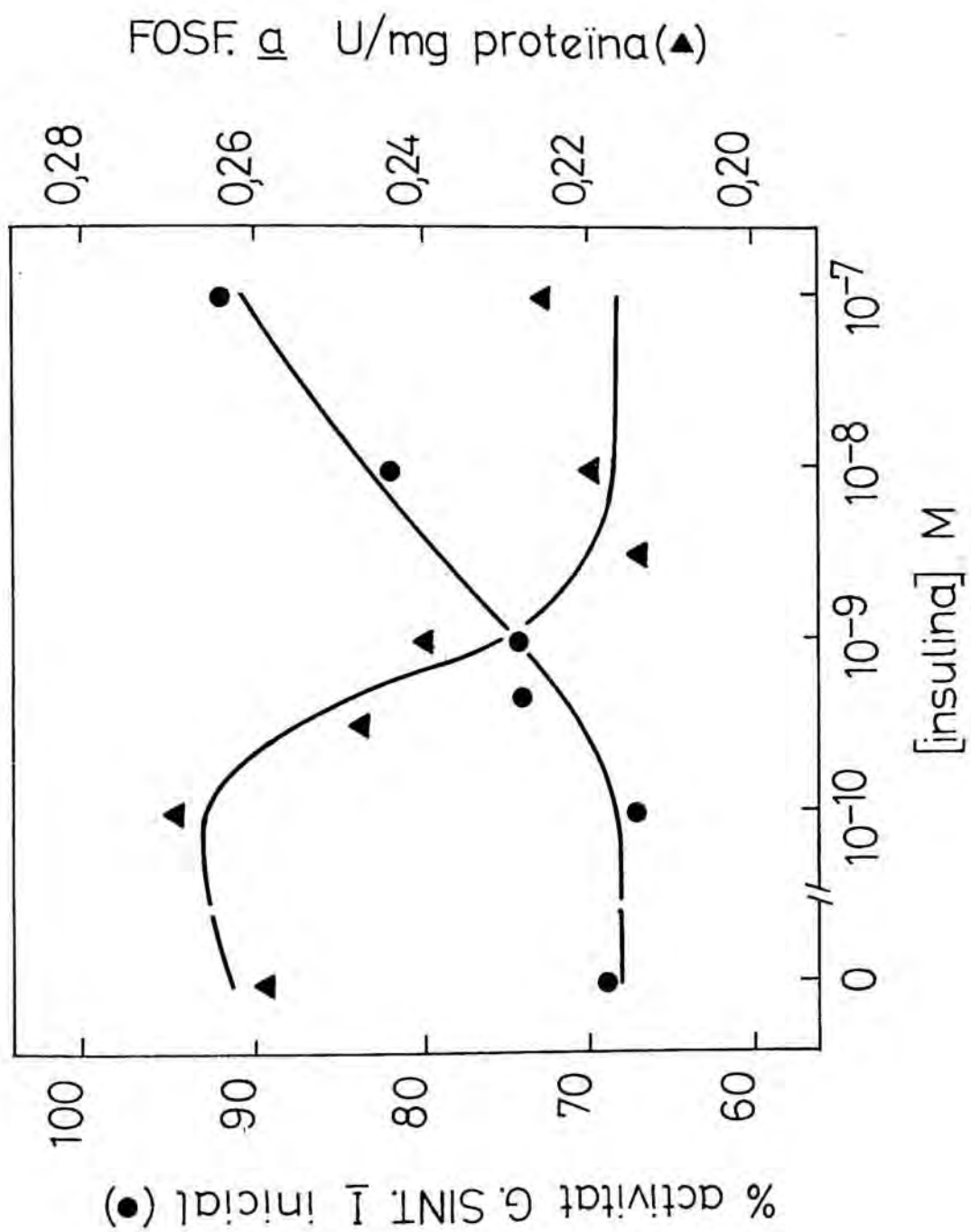


FIGURA 43 RELACIÓ DOSI-RESPOSTA DE L'EFFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA I L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA CAUSADES PEL GLUCAGÓ

Hepatòcits isolats a partir de rates dejunes foren incubats durant 10 minuts amb les concentracions indicades d'insulina. Tot seguit els fou addicionat glucagó 3×10^{-10} M. Finalment foren determinades les activitats de la glicogen sintasa I i de la fosforilasa a al cap de 3 i de 1,5 minuts d'incubació amb glucagó respectivament.



glucagó per la insulina era necessària una preincubació d'aproximadament 10 minuts amb aquesta hormona, període que posteriorment fou aplicat als experiments acabats de descriure.

3.4.2.2. Limitació de l'increment del contingut intracel·lular d'AMP cíclic causat pel glucagó.

Una de les possibilitats d'interferència de la insulina amb l'acció del glucagó era al nivell de la formació d'AMP cíclic.

Els efectes del glucagó a la concentració de 3×10^{-10} M, sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa cursaven amb una elevació, breu però significativa, del contingut intracel·lular d'AMP cíclic. (FIGURA 44). El valor basal de concentració del nucleòtid era $2,1 \pm 0,1$ pmols/ 10^6 cèl·lules. Aquest valor es trobava triplicat al cap d'un minut d'incubació amb l'hormona, moment a partir del qual descendia per assolir de nou la concentració inicial al tercer minut d'incubació. A les cèl·lules tractades 10 minuts amb insulina 8×10^{-9} M, l'elevació d'AMP que hi produïa el glucagó era aproximadament la meitat de la que produïa a les no tractades.

L'efecte de la insulina sobre l'increment de l'AMP cíclic intracel·lular causat pel glucagó també era observable a concentracions més elevades de la segona hormona. Una concentració de 10^{-9} M de glucagó produïa una elevació fins a 6,8 pmols/ 10^6 cèl·lules en hepatòcits que presentaven una concentració basal de 1,7 pmols d'AMP cíclic/ 10^6 cèl·lules (FIGURA 45). L'efecte era encara significatiu (4,0 pmols/ 10^6 cèl·lules) als tres minuts d'incubació.

FIGURA 44 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'INCREMENT d'AMP CÍCLIC INTRA
CEL·LULAR CAUSAT PEL GLUCAGÓ.

Les condicions experimentals fóren les mateixes que les descrites a la Figura 41, mesurant el contingut intracel·lular d'AMP cíclic al final de la incubació amb glucagó.

(●) preincubació amb insulina 8×10^{-9} M

(○) preincubació amb solució salina isotònica.

No fóren observades variacions del contingut d'AMP cíclic a cèl·lules control incubades sense hormones.

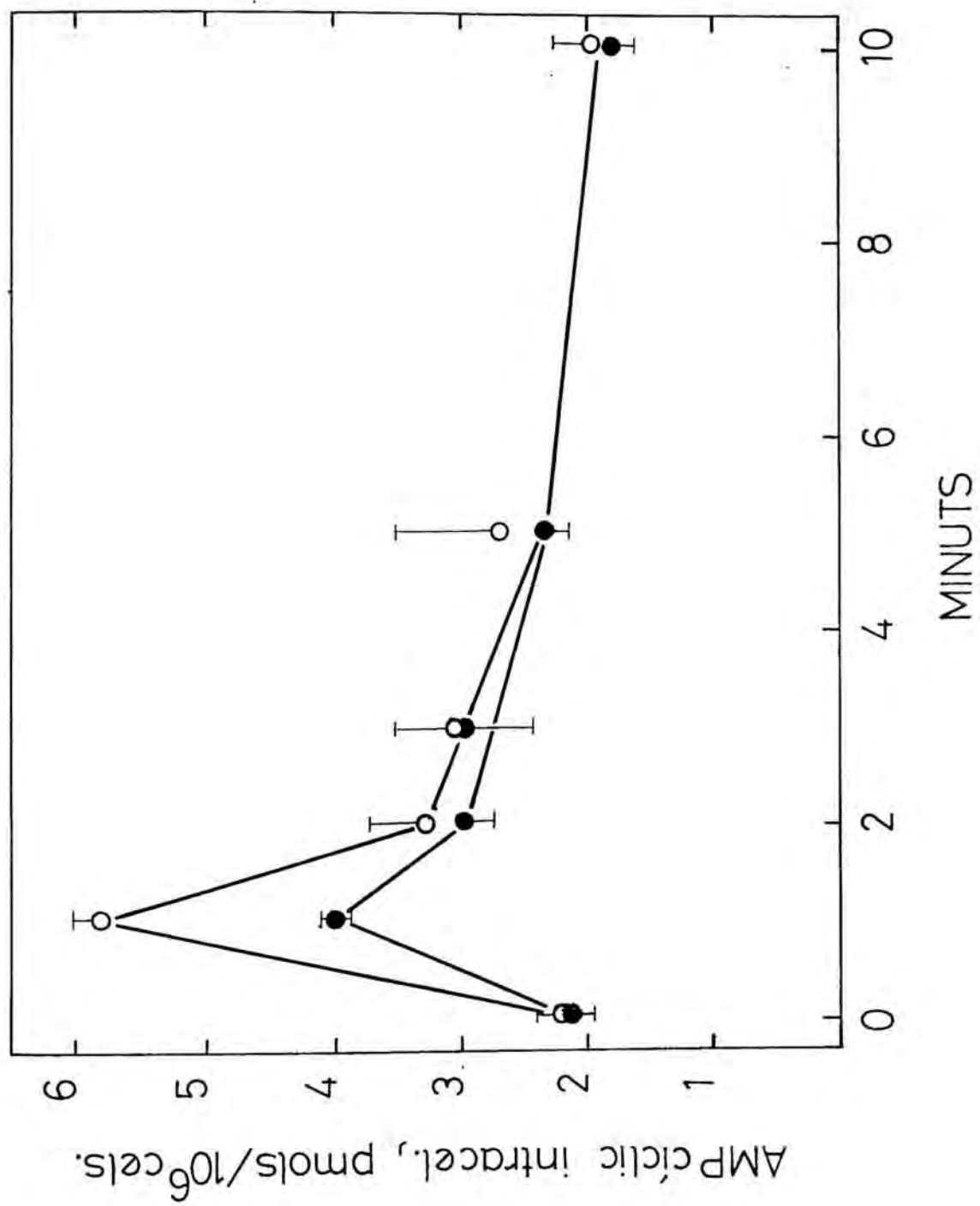
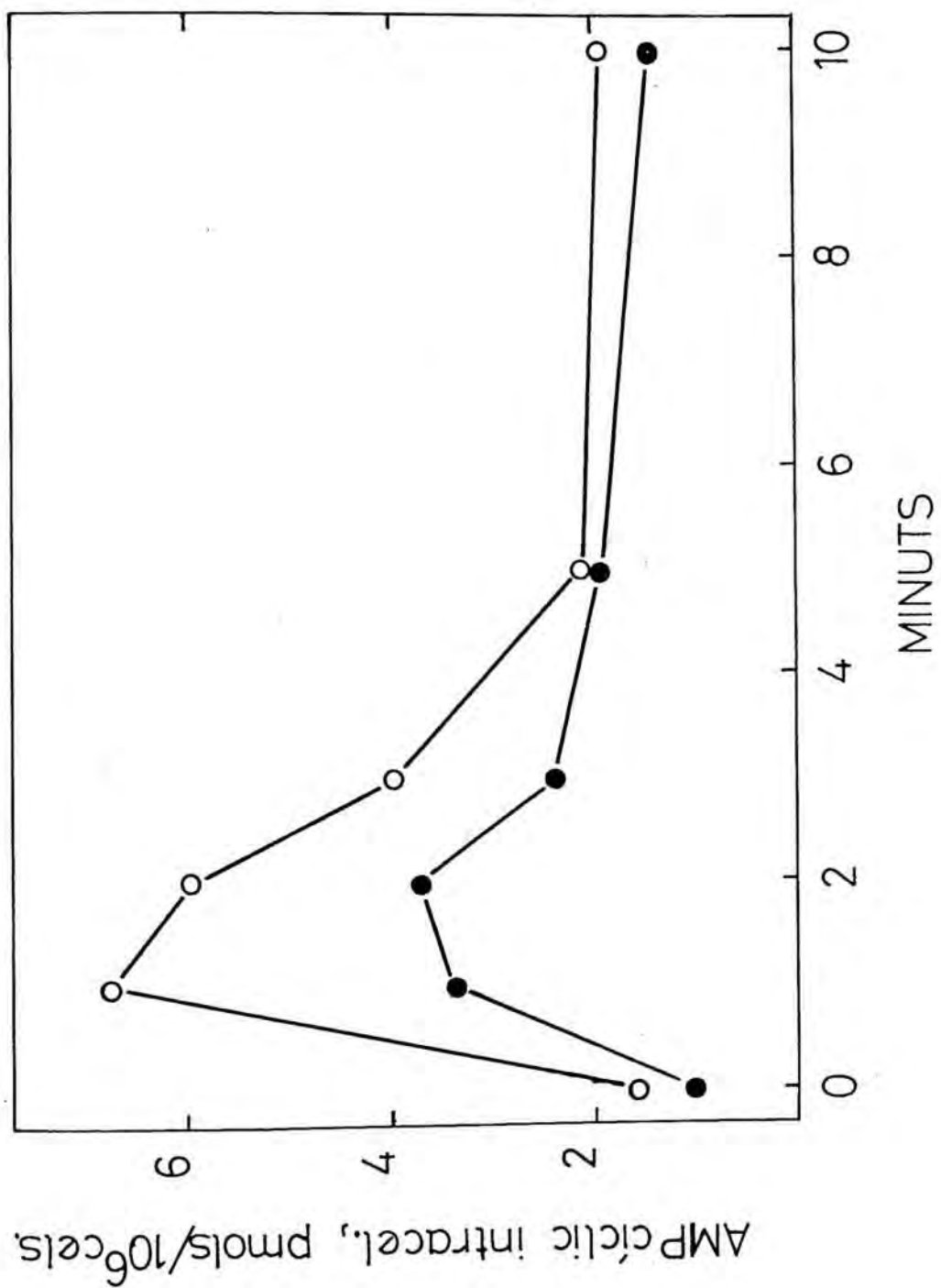


FIGURA 45 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'INCREMENT D'AMP CÍCLIC IN-
TRACEL·LULAR CAUSAT PEL GLUCAGÓ.

A hepatòcits de rates dejunes incubats durant 10 minuts amb insulina 10^{-8} M (●) o amb solució salina isotònica (○) els fou addicionat glucagó 10^{-9} M.

Les incubacions es perllongaren els períodes de temps indi
cats i finalment fou analitzat el contingut intracel·lular
d'AMP cíclic.

Cèl·lules control incubades sense hormones no presentaven
variacions significatives d'AMP cíclic.



A les cèl.lules tractades previament amb 10^{-8} M insulina el glucagó hi produïa una elevació de la concentració d'AMP cíclic fins, com a màxim, $3,8 \text{ pmols}/10^6$ cèl.lules. En aquest cas l'efecte del glucagó estava pràcticament revertit al tercer minut.

3.4.3. DISMINUCIÓ DE LA RESPOSTA DELS HEPATÒCITS A ESTÍMULS ALFA ADRENÈRGICS.

La fenilefrina, que tal com hem esmentat anteriorment és un agonista alfa adrenèrgic pur, i l'epinefrina, sola o en presència de bloquejants beta-adrenèrgics, s'havien mostrat completament efectives com a agents inactivadors de la glicogen sintasa i activadors de la fosforilasa (apartat 3.4.). A continuació són descrits els efectes que el tractament dels hepatòcits amb insulina exercia sobre aquestes accions de la fenilefrina i de l'epinefrina.

3.4.3.1. Efecte sobre la inactivació de la glicogen sintasa i l'activació de la fosforilasa per fenilefrina.

La insulina contrarrestava els efectes de la fenilefrina sobre les activitats glicogen sintasa independent i fosforilasa a. Tal com ha estat descrit abans, als hepatòcits aïllats a partir de rates dejunes la incubació amb fenilefrina hi provocava un ràpid descens de l'activitat glicogen sintasa independent (FIGURA 46). A partir d'un valor inicial de 0,20 en la relació d'activitats $-/+$ glucosa 6-fosfat, s'arribava a un valor mínim de 0,10 quan les cèl.lules eren incubades amb 10^{-6} M fenilefrina. L'efecte d'aquest agent sobre la glicogen sintasa era significatiu fins els 16-20 minuts, en que la relació d'activitats es feia igual al valor inicial.

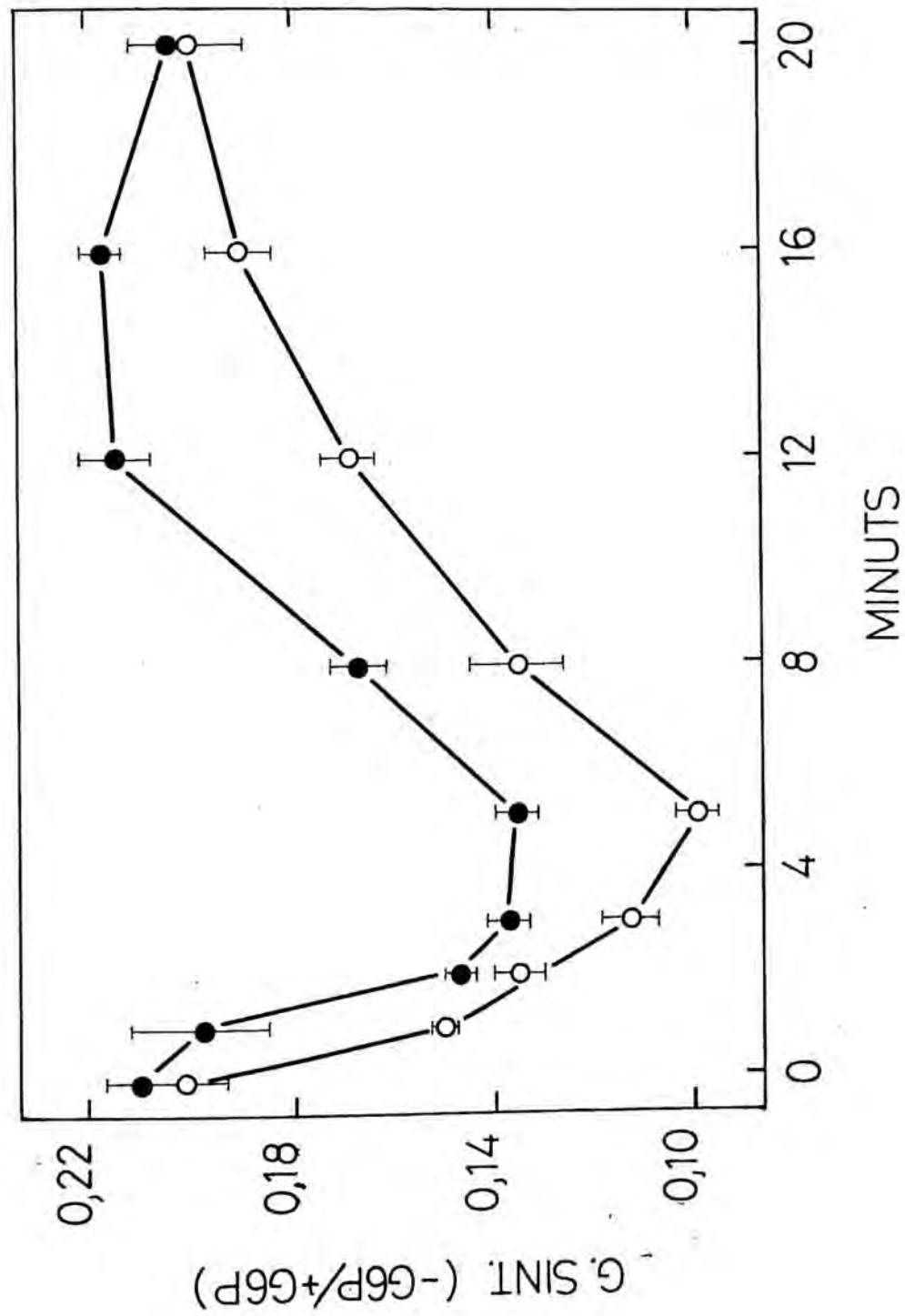
FIGURA 46 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA PER FENILERINA

Hepatòcits de rates dejunes foren incubats 10 minuts amb in sulina 10^{-8} M (●) o amb solució salina isotònica (○). Tot se guit els fou addicionada fenilefrina 10^{-6} M i les incuba- cions es perllongaren els períodes de temps indicats.

Finalment fou mesurada l'activitat de la glicogen sintasa en absència i en presència de glucosa 6-fosfat.

L'activitat glicogen sintasa total ($17,65 \pm 0,24$ mU/mg prot., + glucosa 6-fosfat) no variava significativament en cap de les condicions d'assaig.

Les dades són el promig $\pm$ D.E. de tres experiments.



Si les cèl.lules havien estat sotmeses prèviament a un tractament d'incubació amb insulina 10^{-8} M durant 10 minuts, l'efecte de la fenilefrina sobre la glicogen sintasa era menor que en absència d'insulina. El màxim descens en la relació d'activitats de la sintasa causat per fenilefrina 10^{-6} M en les cèl.lules tractades amb insulina arribava a un valor de 0,14. L'efecte de l'agonista alfa-adrenèrgic estava totalment superat als 12 minuts d'incubació dels hepatòcits en presència d'insulina.

L'activació de la fosforilasa per una concentració de 2×10^{-6} M de fenilefrina significava el pas d'una activitat basal de la forma a de 0,160 U/mg prot. a un valor màxim de 0,230 U/mg prot. que apareixia als 2 minuts d'incubació d'hepatòcits normals amb l'efector (FIGURA 47). A partir del tercer minut l'activació descendia i als 10 minuts d'incubació solament era residual.

La resposta de la fosforilasa a a la mateixa concentració de fenilefrina en cèl.lules que havien rebut un tractament previ de preincubació amb insulina 10^{-8} M durant 10 minuts, era sensiblement més dèbil que la corresponent a cèl.lules preincubades sense insulina. Partint d'un valor basal d'activitat fosforilasa a idèntic al d'aquestes, l'activació causada per la fenilefrina en les cèl.lules incubades amb insulina prenia uns valors màxims al voltant de 0,200 U/mg prot. que descendien tornant al valor inicial abans dels 10 minuts d'incubació.

A la FIGURA 48 estan expressades les corbes de dosi-dependència dels efectes de la insulina sobre la inactivació de la glicogen sintasa i l'activació de la fosforilasa per la fenilefrina. La corba corresponent a l'efecte sobre la glicogen sintasa està obtinguda a partir de les activitats que pre-

FIGURA 47 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PER FENILEFRINA.

Les condicions experimentals foren les descrites a la Figura 47, mesurant l'activitat fosforilasa a al final de la incubació amb fenilefrina la concentració de la qual era 2×10^{-6} M.

(●) preincubació amb insulina 10^{-8} M

(○) preincubació amb solució salina isotònica

L'activitat fosforilasa a d'hepatòcits control incubats sen se hormones no variava durant el període dels experiments.

Les dades són el promig $\pm$ E.E. de quatre experiments.

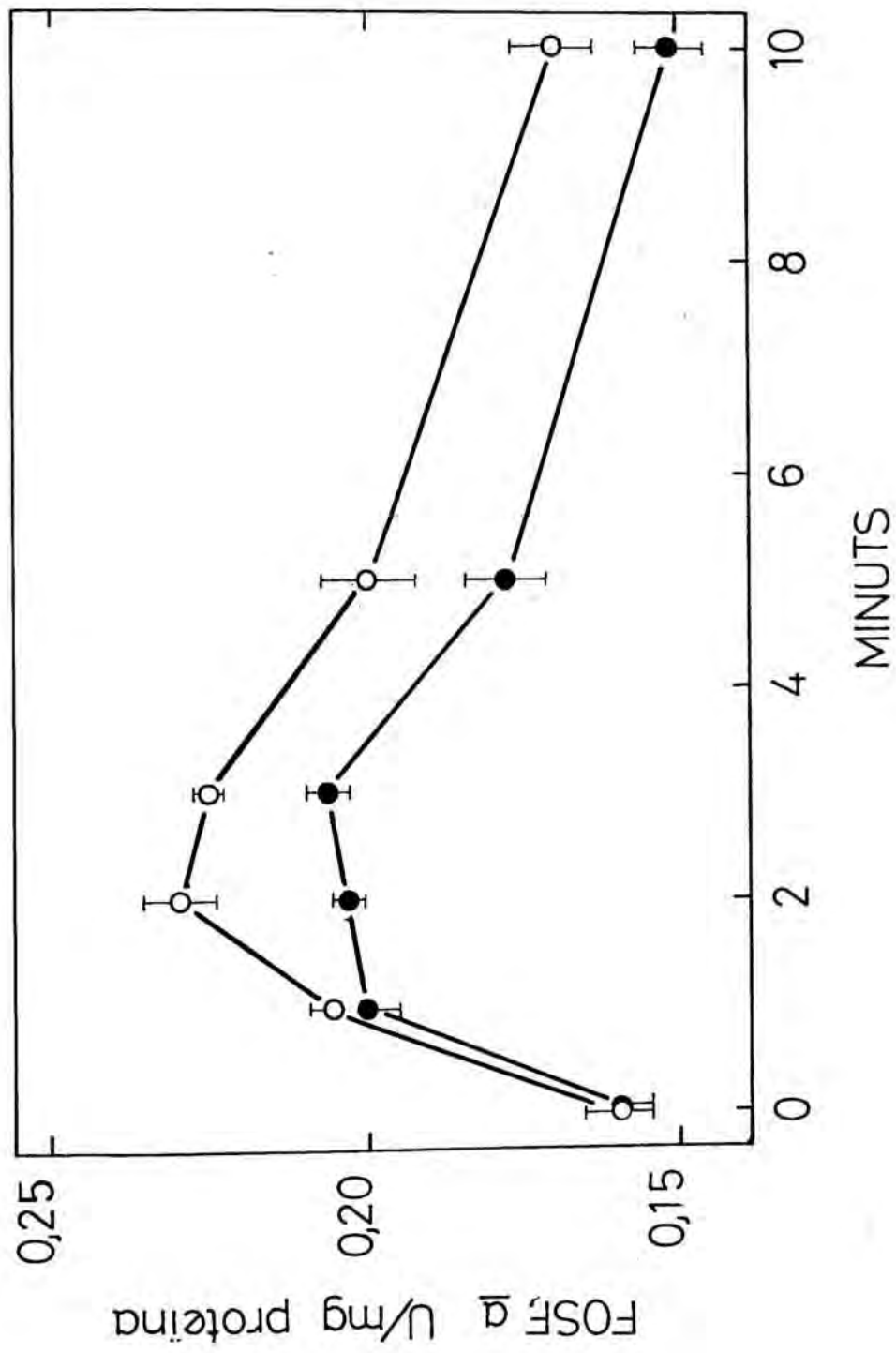
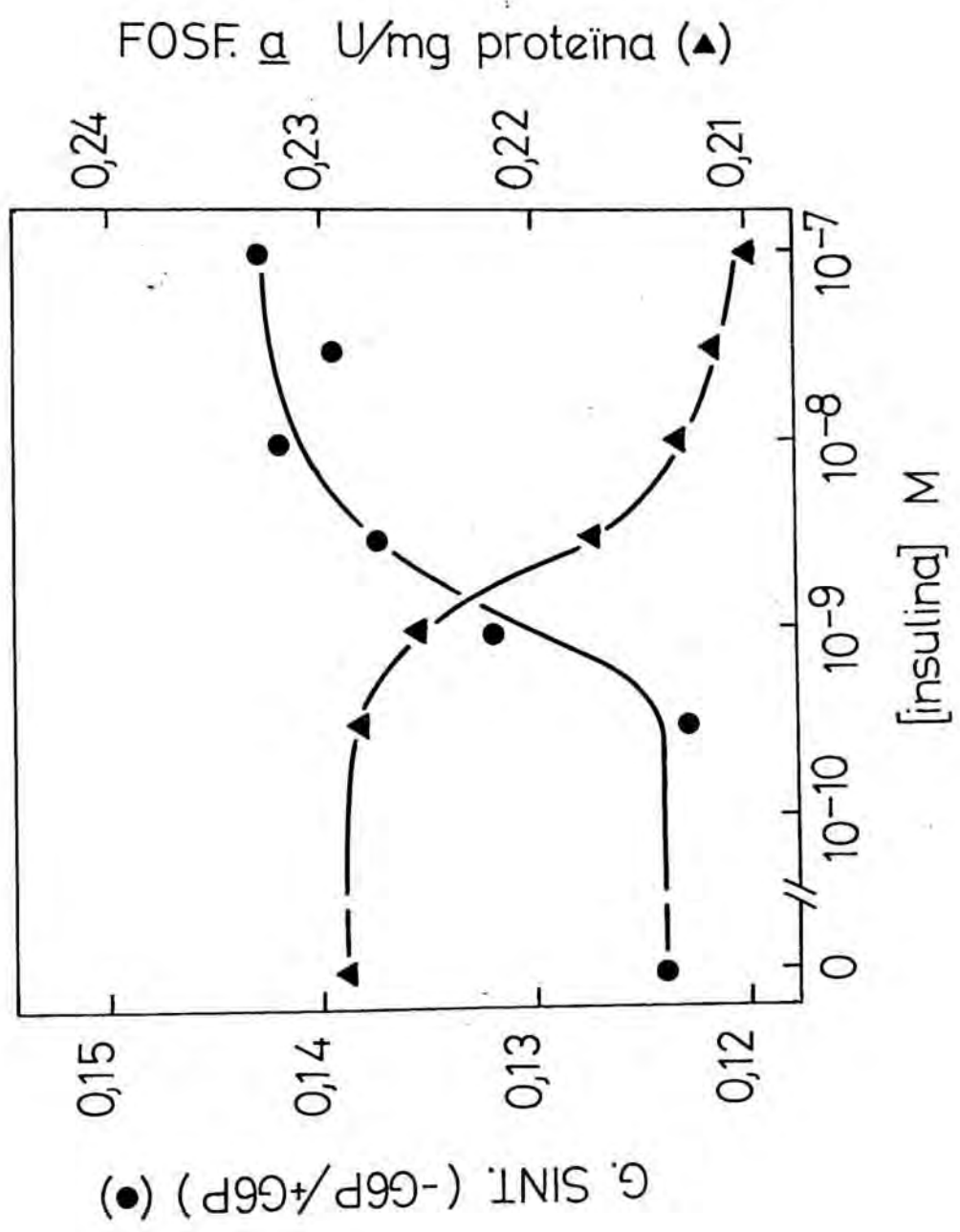


FIGURA 48 RELACIÓ DOSI-RESPOSTA DE L'EFFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA I L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA CAUSADES PER LA FENILEFRINA.

Hepatòcits isolats a partir de rates dejunes foren incubats durant 10 minuts amb les concentracions d'insulina indicades. Les incubacions es perllongaren 5 minuts més en presència de fenilefrina 10^{-6} M (efecte sobre la glicogen sintasa), o 2 minuts més amb fenilefrina 2×10^{-6} M (efecte sobre la fosforilasa).

Les dades són el promig de dos experiments realitzats en dies diferents.



sentaven els hepatòcits després d'un tractament de 5 minuts amb fenilefrina a una concentració de 10^{-6} M quan prèviament havien estat incubats amb concentracions creixents d'insulina. La concentració d'insulina més baixa amb un efecte clar sobre la glicogen sintasa inactivada per la fenilefrina era 10^{-9} M. A partir de 10^{-7} M la insulina es comportava com a saturant per aquest efecte.

Per a la fosforilasa, la valoració fou essencialment igual excepte que el temps d'incubació amb fenilefrina fōren 2 minuts i la concentració d'aquesta 2×10^{-6} M. Les concentracions màximament i mínima efectives d'insulina sobre aquest altre efecte de la fenilefrina coincidien amb les de l'efecte sobre la glicogen sintasa.

3.4.3.2. Efecte sobre la inactivació de la glicogen sintasa i de la fosforilasa per epinefrina en absència o presència de propanolol.

El tractament dels hepatòcits amb insulina reduïa llur capacitat de resposta a l'epinefrina pel que feia a les activitats glicogen sintasa i fosforilasa.

La inactivació de la glicogen sintasa que produïa una concentració d'epinefrina de 10^{-8} M sobre cèl.lules preincubades amb 10^{-8} M insulina (FIGURA 49) fou significativament diferent de l'efecte produït per la mateixa concentració d'epinefrina sobre la glicogen sintasa de cèl.lules preincubades sense insulina.

L'efecte de la preincubació amb insulina fou més patent sobre l'activació de la fosforilasa causada per l'epinefrina a una concentració de 2×10^{-8} M. (FIGURA 50). Aquesta

FIGURA 49 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA PER EPINEFRINA

Hepatòcits de rates dejunes foren incubats amb insulina 10^{-8} M (●) o amb solució salina isotònica (○). Tot seguit els fou addicionada epinefrina 10^{-8} M i les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats. Finalment fou mesurada l'activitat glicogen sintasa.

L'activitat glicogen sintasa total ($7,75 \pm 0,30$ mU/mg prot. glucosa 6-fosfat) no variava significativament en cap de les condicions assajades.

Les dades són el promig $\pm$ E.E. de sis experiments fets en dies diferents.

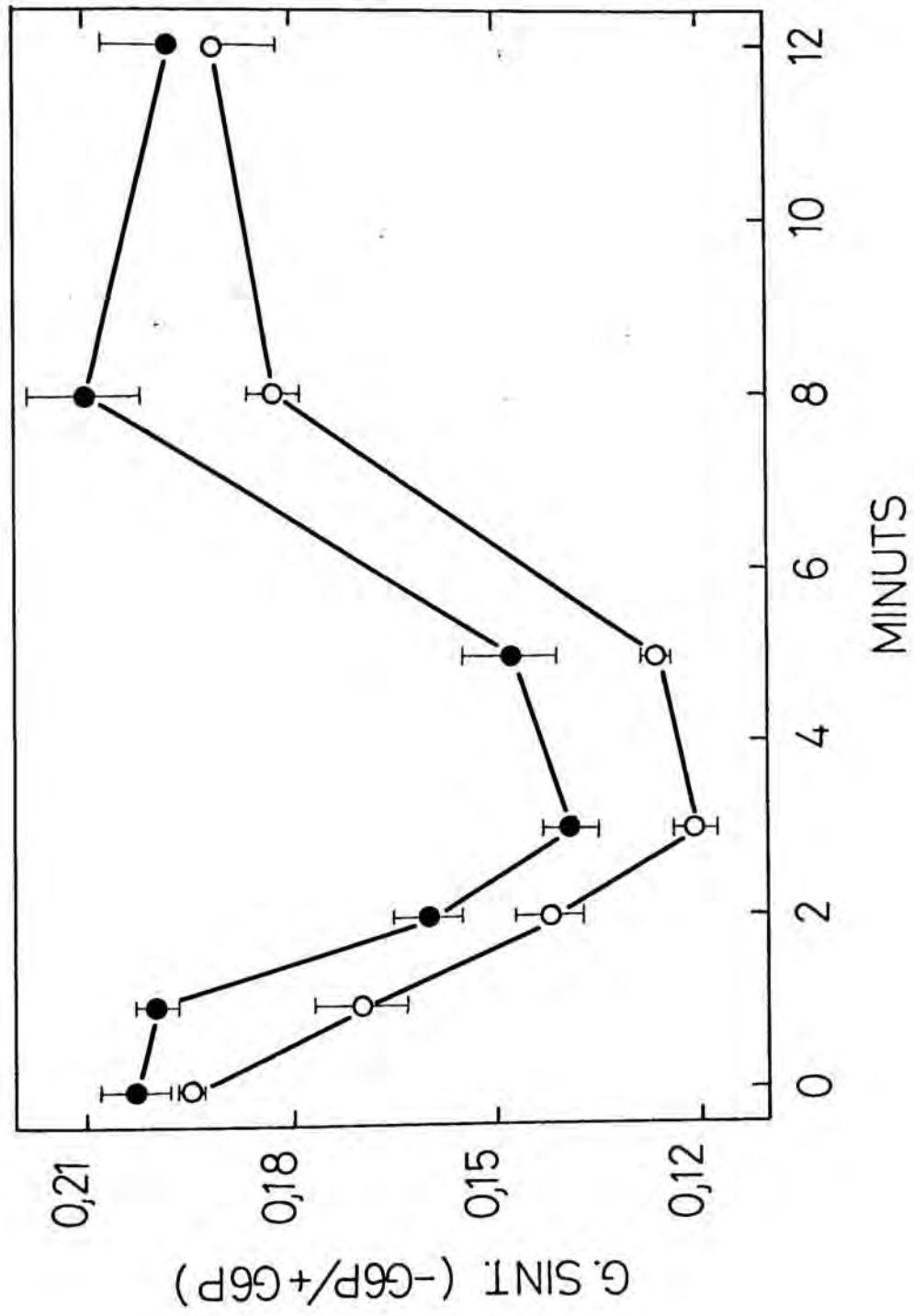


FIGURA 50 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE L'ACTIVACIÓ DE LA FOSFORILASA PER EPINEFRINA

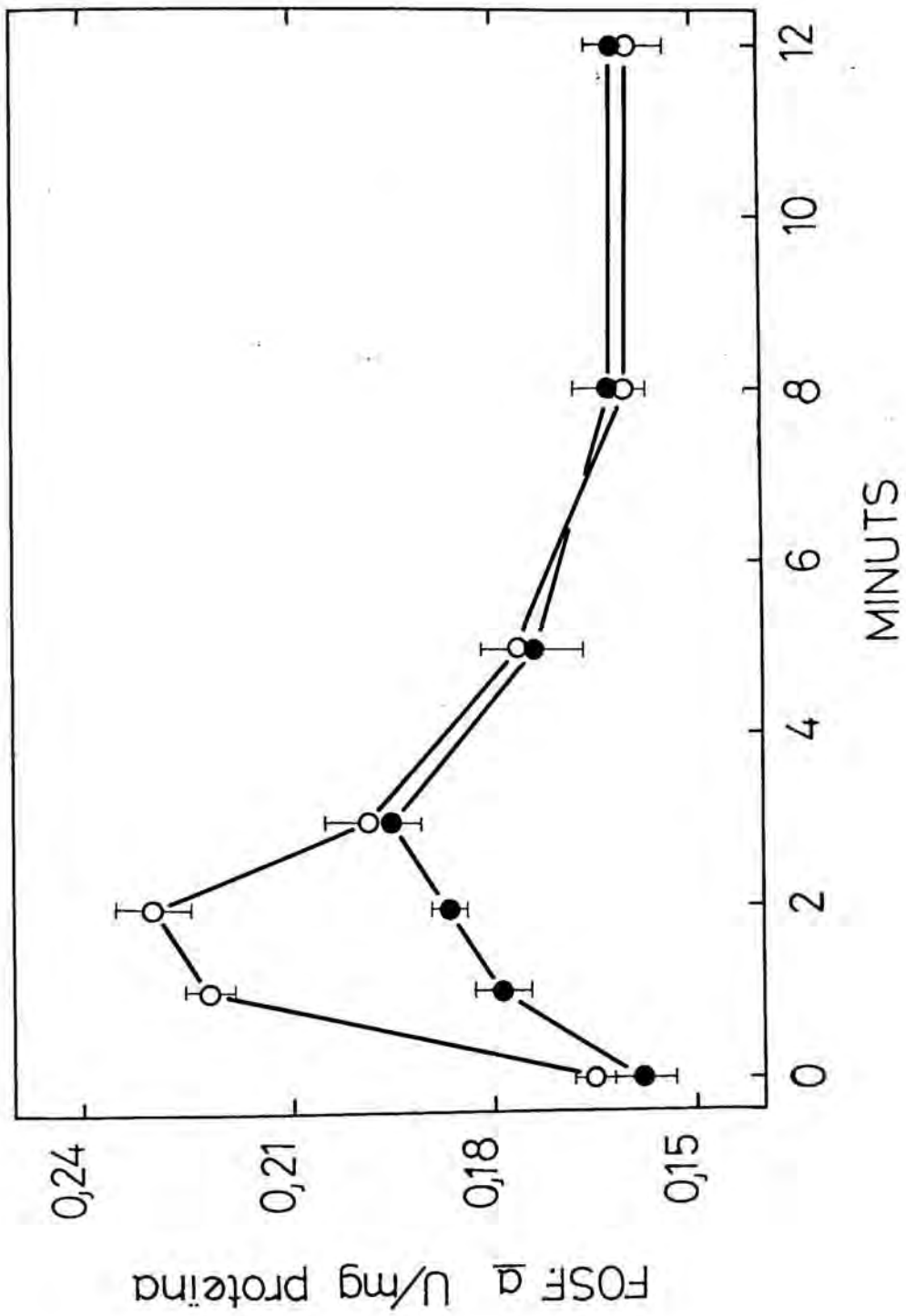
Les condicions experimentals foren les mateixes que les descrites a la Figura 49, mesurant l'activitat fosforilasa a al final de la incubació amb epinefrina.

La concentració d'epinefrina era 2×10^{-8} M.

(●) preincubació amb insulina 10^{-8} M

(○) preincubació amb solució salina isotònica

L'activitat fosforilasa a de cèl.lules control incubades sense hormona no variava durant el període dels experiments. Les dades són el promig $\pm$ D.E. de dos experiments realitzats en dies diferents.



concentració d'hormona elevava ràpidament l'activitat de la forma a de la fosforilasa des de 0,160 U/mg prot. fins a 0,230 U/mg prot.

Si les cèl.lules havien estat preincubades amb insulina (10^{-8} M, 10 minuts) l'activació de la fosforilasa per epinefrina es produïa de manera més lenta i assolïa un valor màxim considerablement més baix (0,192 U/mg prot.) que en les cèl.lules no tractades.

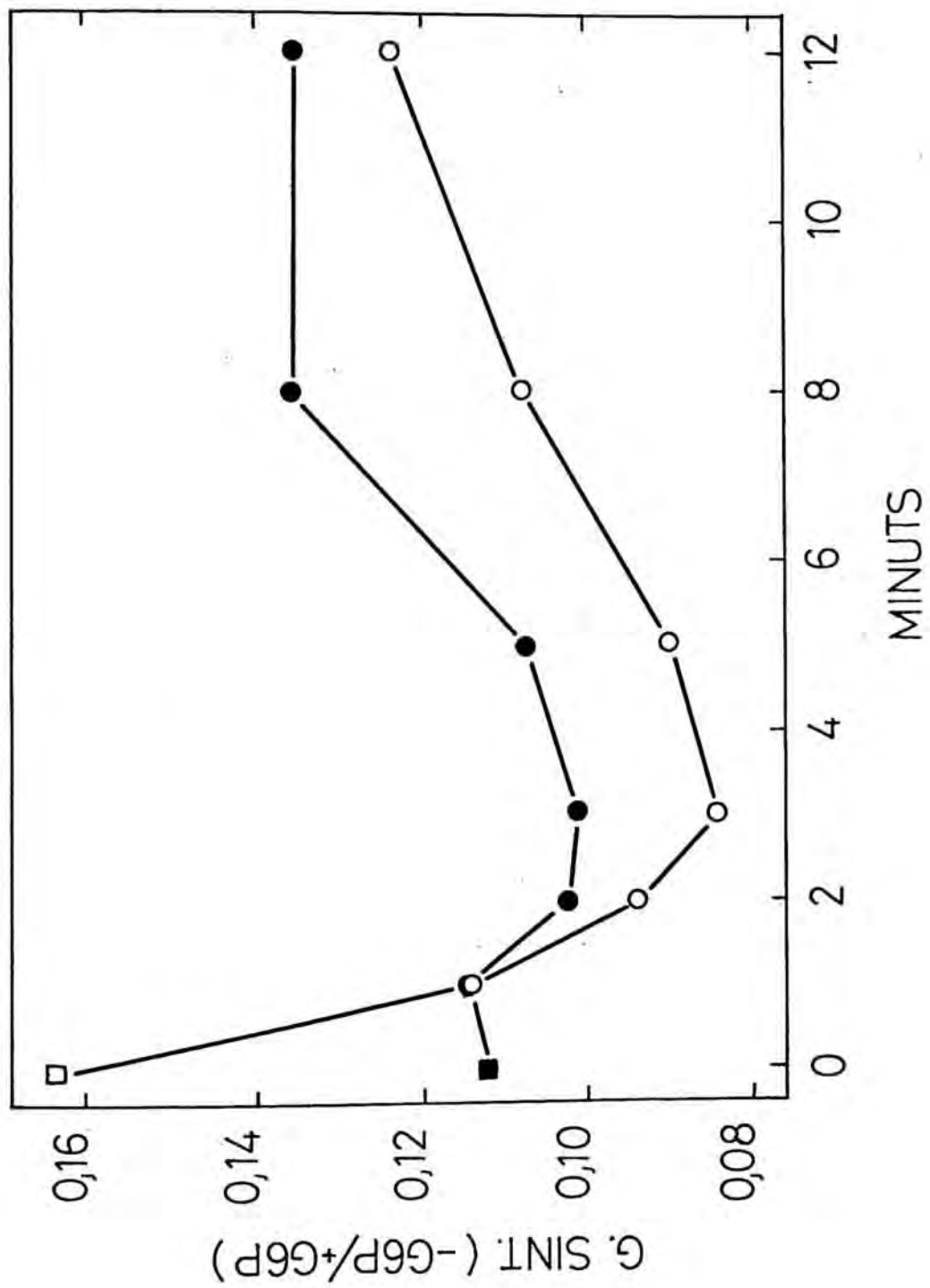
L'acció de l'epinefrina era igualment contrarrestada per insulina quan al medi hi havia un bloquejant beta-adrenèrgic, que impedia qualsevol efecte de l'epinefrina a través d'aquesta via.

Hepatòcits incubats amb DL-propanolol a una concentració 2×10^{-5} M durant 10 minuts eren sotmesos a la presència d'epinefrina 10^{-8} M. L'activitat glicogen sintasa independent descendia immediatament fins un valor mínim de 0,08 en la relació d'activitats -/+ glucosa 6-fosfat (FIGURA 51). A partir de minut tercer d'incubació amb epinefrina, l'activitat glicogen sintasa independent iniciava la recuperació estabilitzant-se aproximadament al minut 12 d'incubació.

La preincubació durant 10 minuts dels hepatòcits amb insulina 10^{-8} M simultània amb la de propanolol provocava que la inactivació que l'epinefrina 10^{-8} M causava sobre l'activitat glicogen sintasa al ser afegida al medi fós menor que en l'altra sèrie de cèl.lules, i que als 8 minuts d'incubació estés ja superada.

FIGURA 51 EFECTE DE LA INSULINA SOBRE LA INACTIVACIÓ DE LA GLICOGEN SINTASA CAUSADA PER EPINEFRINA EN PRESENCIA DE PROPRANOLOL.

Hepatòcits de rates dejunes foren incubats 10 minuts amb insulina 10^{-8} M acompanyada de DL-propranolol 2×10^{-5} M ($\bullet$, $\blacksquare$), amb DL-propranolol 2×10^{-5} M ($\circ$) o amb solució salina isotònica ($\square$). Tot seguit els fou addicionada epinefrina 10^{-8} M i les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats. Finalment fou mesurada l'activitat glicogen sintasa (-/+ glucosa 6-fosfat).



4. DISCUSSIÓ

4.1. ELS HEPATÒCITS ISOLATS COM A MATERIAL D'ESTUDI.

L'estudi del control del metabolisme hepàtic del glicogen mitjançant la perfusió de fetge de rata sencer ha estat extensiu i raonablement exitós (12, 334, 340, 364, 370, 443-445). Aquesta tècnica experimental presenta, però, alguns inconvenients importants que limiten el seu ús. Primerament, el fetge sencer no està constituït per una població homogènia de cèl.lules parenquimàtiques, sino que el 30% de les cèl.lules que conté són de tipus reticulendotelial (446). Segon, que la tècnica és difícil i limita el nombre de variables que poden ser estudiades simultàniament. Tercer, que els valors basals dels paràmetres que es mesuren poden variar d'animal a animal i que per tal d'obtenir resultats estadísticament fiables cal operar sempre amb uns quants individus per cada condició experimental concreta.

Els talls de fetge podrien constituir un sistema alternatiu d'estudi que evitaria alguns dels inconvenients esmenats per al fetge perfós. Si més no, solucionaria el problema de l'heterogeneïtat cel.lular i oferiria la possibilitat d'ope^rar amb diverses mostres procedents d'un mateix animal. Ara bé, aquestes preparacions presenten el problema important de ser sistemes complexos i poc uniformes en els quals la difusió de gassos i de soluts del medi fins a les cèl.lules més internes és limitada, a part que les cèl.lules de la superfície es-

tan damnades pel tractament mecànic de l'obtenció dels talls.

Les preparacions homogènies de cèl.lules parenquimàtiques acceptablement intactes i isolades a partir d'un sol animal permeten l'estudi de moltes variables alhora, proporcionant simultàniament controls experimentals interns i evitant molts dels desavantatges dels altres sistemes. Cal deixar clar, però, que malgrat llur enorme conveniència tècnica, els experiments amb cèl.lules parenquimàtiques aïllades no poden substituir completament el treball amb teixit hepàtic intacte car tant l'estructura com l'heterogeneïtat d'aquest són factors que també configuren la seva funció. A més, per suau i controlat que sigui el procés d'aïllament dels hepatòcits, sempre es corre el risc de damnar certes estructures de membrana com, per exemple, receptors hormonals o sistemes transportadors de metabolits i ions, alteracions perilloses perquè són difícilment mesurables. Malgrat tot, l'acceptació amplíssima i l'avenç de coneixements que ha suposat aquesta tècnica en el curt període des que està descrita diuen molt de les seves qualitats positives.

4.2. CONTROL HORMONAL DE LA GLICOGENOLISI HEPÀTICA. MECANISME D'ACCIÓ DEL GLUCAGÓ.

A les cèl.lules parenquimàtiques del fetge el metabolisme del glicogen, governat en darrera instància per l'enzim sintetitzant, glicogen sintasa, i pel degradant, fosforilasa, és afectat espectacularment pel tractament amb hormones com el glucagó, l'epinefrina i la fenilefrina, i com la insulina.

Els resultats presentats proven l'eficiència glicogenolítica del glucagó, l'epinefrina i la fenilefrina. Efectivament, sota llur influència l'activitat glicogen sintasa independent es redueix de manera intensa i la via de síntesi del polisacàrid es consegüentment deprimida. De forma simultània, l'increment enèrgic de l'activitat enzimàtica de la fosforilasa produeix l'obertura de la via de degradació. El resultat és, doncs, la disposició de tot el sistema metabòlic per a la utilització del glicogen.

L'observació del caràcter glicogenolític del glucagó, l'epinefrina o la fenilefrina sobre hepatòcits no és un fet sorprenent, ans al contrari, coincideix amb la realitzada sobre altres tipus de preparacions hepàtiques (326, 328, 329, 18) o amb observacions preliminars, no excessivament desenvolupades, sobre els propis hepatòcits aïllats (208, 330, 331, 13). La

qüestió a resoldre ara és quins mecanismes moleculars són els que condueixen, amplifiquen i dirigeixen l'estímul de cadascuna de les hormones des de que apareix sobre la membrana cel·lular fins que es tradueix en les conseqüències metabòliques dites.

Segons els resultats obtinguts per nosaltres, el glucagó desencadena a la cèlula del parènquima hepàtic uns esdeveniments molt semblants als que resulten de l'acció de l'epinefrina sobre el múscul esquelètic i que s'articulen en cadena (6, 7) per a impel·lir la glicogenolisi. Així doncs, el mecanisme d'acció postulable per al glucagó a la cèl·lula del parènquima hepàtic de rata és el següent: estímul de l'adenil ciclasa que incrementa el nivell intracel·lular d'AMP cíclic el qual activa a la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic que per raó d'aquesta activació fosforila a la glicogen sintasa convertint-la en la forma inactiva i a la fosforilasa quinasa convertint-la en la forma activa, la qual, al seu torn, transforma la fosforilasa donant-li capacitat per actuar.

4.2.1. ACCIÓ DEL GLUCAGÓ SOBRE L'AMP CÍCLIC INTRACEL·LULAR.

L'increment de la concentració intracel·lular d'AMP cíclic mostrat a la FIGURA 16 és perfectament explicable per la coneguda acció del glucagó sobre l'adenil ciclasa hepàtica (447, 37). Els estudis sobre adenil ciclasa hepàtica realitzats amb preparacions de membrana plasmàtica (37) han mostrat que aquest enzim és sensible al glucagó sobre un interval de concentracions d'hormona entre 10^{-10} M i 10^{-7} M, el qual és essencialment idèntic a l'interval de concentracions que pro-

mou acúmul d'AMP cíclic als nostres estudis (FIGURA 16). L'efecte de l'epinefrina sobre aquestes preparacions de membrana era, en canvi, molt débil (37) la qual cosa està d'acord també amb les nostres observacions (FIGURA 26).

Els resultats sobre els increments d'AMP cíclic confirmen per al nostre sistema d'estudi les observacions fetes sobre fetges sencers perfosos o hepatòcits isolats (342, 349, 400, 448, 449). Després de l'elevació sobtada del contingut intracel·lular d'AMP cíclic causada pel glucagó s'observa una recuperació també molt ràpida dels valors de concentració basal (FIGURA 16). El descens tan sobtat del contingut d'AMP cíclic potser és atribuïble, almenys parcialment, a l'activitat nucleòtid cíclic fosfodiesterasa de dins la cèl·lula la qual és estimulable per les concentracions elevades del nucleòtid (72, 343, 450) ó, segons que ha estat descrit fa poc, pel mateix glucagó. (68). També és cert que l'AMP cíclic és extravasat al medi de perfusió de preparacions de fetge (373, 451-453), o al medi d'incubació de pannicle adipós epididimal (371), de cèl·lules adiposes (29, 454) i cèl·lules hepàtiques aïllades (354), de plaquetes (455) o de talls de cervell (456) i que la seva presència hi és quantitativament important després d'haver estat incrementat dins de la cèl·lula. Bé que, tal com ha estat suggerit pel cas dels adipòcits (457), la sortida d'AMP cíclic podria ser una conseqüència del damnatge de la membrana cel·lular, aquesta explicació és vàlida per justificar solament petites extravasacions del producte. Per tractament amb probenecida les cèl·lules hepàtiques alliberen al medi quantitats molt menors d'AMP cíclic (354) la qual cosa apunta vers l'existència d'un sistema de transport del nucleòtid.

4.2.2. LA PROTEÏNA QUINASA DEPENDENT D'AMP CÍCLIC HEPÀTICA.

Concomitant a l'elevació del contingut intracel.lular d'AMP cíclic hem observat la dissociació intensa de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (FIGURES 5, 10, 11, 15 i 17). Les observacions que presentem suporten fermament la hipòtesi de la dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic via l'elevació del contingut intracel.lular de nucleòtid per acció del glucagó sobre les cèl.lules parenquimàtiques del fetge.

Els efectes del glucagó sobre aquesta proteïna quinasa hepàtica no es troben totalment estudiats en la bibliografia actual. D'antuvi, admesa la possibilitat de l'existència al fetge d'una cascada glicogenolítica similar a la del múscul esquelètic, encara no s'havia arribat a investigar de manera sistemàtica la correlació dels efectes sobre aquest enzim amb les variacions d'AMP cíclic i, alhora, els canvis per interconversió de la glicogen sintasa i fosforilasa operats als hepatòcits per efecte del glucagó. Després, coneguda l'existència de més d'una forma holoenzimàtica al fetge (124) es tenen poques dades sobre el comportament particular de cada una d'elles enfront a l'estímul hormonal.

A una altre secció (1.3.1.) hem dit que per pas d'extractes crus a través de DEAE-cel.lulosa s'obtenen dues formes holoenzimàtiques, I i II, presents en diferents proporcions a la majoria dels teixits estudiats (123,124). El fetge conté una determinada quantitat de forma I i quelcom menys de forma II (124). Els estudis cromatogràfics amb DEAE-cel.lulosa són molt útils per a caracteritzar aquestes formes "in vitro". Ara bé, l'aplicabilitat d'aquesta tècnica a l'estudi de les modificacions del grau d'activació o de dissociació de la proteïna quinasa "in vivo" és més limitada perquè la metodologia

és complexa i la reproductibilitat no és òptima.

La tècnica electroforètica amb revelat de fixació d'AMP cíclic (estat de dissociació) (416) permet superar aquests inconvenients. També és preferible a la tècnica electroforètica amb revelat d'activitat proteïna quinasa (418) per fixació de ^{32}P , car evita problemes inherents al treball amb aquest isòtop.

Aplicant la tècnica a extractes crus d'hepatòcits no tractats amb hormones es revelen tres bandes o pics de fixació de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic (FIGURA 1). La desaparició del pic 1 i el gran increment del pic 3 observats després d'incubar els extractes amb AMP cíclic (FIGURA 2) o les cèl.lules amb glucagó (FIGURA 5) suggereixen que el primer és una forma holoenzimàtica i que l'altre és la subunitat reguladora corresponent a aquest holoenzim. A més, si els extractes són incubats amb $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic i sotmesos a electroforesi sense revelat posterior, l'única posició en la qual es detecta radiactivitat és la corresponent al pic 3 (FIGURA 3) indicant que, efectivament aquesta posició correspon a les subunitats R.

D'altra banda, la fixació de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic a les posicions 1 i 2 és perfectament correlacionable amb la presència d'activitat proteïna quinasa estimable per AMP cíclic (FIGURA 4). Si els extractes procedien de cèl.lules tractades amb glucagó la presència d'activitat proteïna quinasa a aquestes era residual o nul.la (FIGURES 5 i 6). A la posició 3 no li corresponia cap mena d'activitat proteïna quinasa, ni tan sols quan el pic de fixació de $^3\text{H}\cdot\text{AMP}$ cíclic a aquesta posició era notable (FIGURA 5). D'aquests resultats s'en desprén inequívocament que el pic 1 és un holoenzim de la proteïna quinasa (holoenzim H_1) i que el pic 3 és la subunitat reguladora d'aquest holoenzim. La identitat del pic 2 és més difícilment

assegurable. Amb gran probabilitat d'encert, però, cal pensar que es tracta d'una altra forma holoenzimàtica (holoenzim H_2) que és dissociada parcialment per concentracions elevades d'AMP cíclic (veure FIGURA 8).

Els pesos moleculars dels holoenzims H_1 i H_2 eren similars entre sí i d'aproximadament 108.000 i el de la subunitat reguladora, 72.000 (TAULA 2). Aquests valor fôren obtinguts amb un mètode electroforètic (419) l'exactitud del qual fou previament comprovada amb una proteïna de pes molecular conegut. Per diferència entre el pes molecular dels holoenzims i el de la subunitat reguladora es pot assumir un valor aproximat de 36.000 daltons per a la subunitat catalítica, molt proper al de les subunitats catalítiques dels enzims de múscul de conill o de cor de bou que són els més ben estudiats quant a propietats moleculars (130, 131). Els pesos moleculars determinats per nosaltres per a les formes holoenzimàtiques són una mica inferiors als dels enzims dels teixits citats, mentre que el de la subunitat reguladora és quelcom superior (126, 130, 131).

El fet de la no identificació de cap activitat proteïna quinasa atribuïble a la subunitat catalítica d'aquest enzim representa una limitació de la tècnica. La subunitat catalítica, cas de mantenir-se estable, no penetra als gels d'electroforesi, ja sigui per raó de càrrega elèctrica insuficient o bé perquè pot restar agregada a la fracció particulada dels extractes cel·lulars (458).

L'estudi de la modificació dels estats de dissociació o d'activació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic als teixits presenta algunes fonts potencials d'error. Primerament cal pensar en canvis derivats del procés d'homogeneïtzació del teixit que es vol estudiar. L'equilibri de dissociació

de l'enzim podria ser decantat instantàniament per efecte de l'alliberament d'AMP cíclic que fins al moment de l'homogeneïtzació restés segrestat per alguna estructura cel·lular. Efectivament, ha estat descrita per diversos autors l'existència de certes quantitats d'AMP cíclic en una forma segrestada (169, 170, 371, 457) o compartimentalitzada (171) dins de la cèl·lula, les quals no es troben, en condicions normals, a l'abast de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. Nosaltres mateixos hem comprovat que als extractes d'hepatòcits hi ha una quantitat determinada d'AMP cíclic ineliminable per gel filtració (TAULA I). Aquestes quantitats d'AMP cíclic si estiguessin en solució donarien una concentració aproximadament 10^{-6} M dins la cèl·lula (169, 448) la qual és suficient (FIGURES 8 i 9) per mantenir l'enzim permanentment dissociat. En tot cas, però, el fet que l'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic als extractes procedents d'hepatòcits incubats sense hormones fós escàs (FIGURES 1 i 4) treu qualsevol importància a la possibilitat d'error per dissociació espontània de la proteïna quinasa en el moment de l'homogeneïtzació. També cal tenir present la possibilitat de reassociació de les subunitats de l'enzim en aquelles mostres que, per un efecte hormonal o per incubació amb AMP cíclic, presenten la proteïna quinasa en forma dissociada. La reassociació espontània podria produir-se en els extractes crus al llarg del temps. Aquesta segona possibilitat d'error sembla improbable en el sistema estudiat per nosaltres perquè a les mostres procedents de cèl·lules tractades amb glucagó la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic seguia intensament dissociada després de períodes de 45 ó 60 minuts (TAULA I). Més encara, l'eliminació de l'AMP cíclic present en solució a aquestes mostres no conduïa a cap canvi significatiu de l'estat de dissociació de la proteïna quinasa estudiada (TAULA I).

La inclusió de 1-metil, 3-isobutil xantina als ex-

tractes incubats amb AMP cíclic durant els estudis sobre dissociació de l'enzim pel nucleòtid "in vitro" bloquejava l'activitat nucleòtid cíclic fosfodiesterasa present a aquells extractes assegurant l'estabilitat de les condicions d'incubació. Alguns extractes control incubats amb la simple addició de la 1-metil, 3-isobutil xantina presentaven un lleuger grau de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (FIGURA 7) en comparació amb controls incubats solament amb aigua (FIGURA 1). Aquesta dissociació parcial podia estar causada per l'alliberament d'alguna porció de l'AMP cíclic segregat, efecte compensable als extractes incubats sense metil isobutil xantina.

L'holoenzim H_1 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica es dissocia per incubació amb el nucleòtid en un interval de concentracions de 10^{-8} a 10^{-6} M (FIGURES 8 i 9). L'holoenzim H_2 és més difícilment dissociable (FIGURA 8). Hi ha un paral·lelisme entre aquestes observacions i les realitzades amb les formes que s'obtenen per tractament amb DEAE-cel·lulosa. D'aquestes, la forma I purificada a partir de múscul cardíac és més fàcilment dissociable que la forma II procedent del teixit adipós (124, 459). L'holoenzim H_1 detectat per electroforesi també s'assembla a la forma I per la capacitat de restar dissociat després de l'eliminació de l'AMP cíclic del medi (124). La forma II, en canvi, solament roman dissociada després d'aquest tractament si hi ha una gran força iònica (NaCl 0,5 M) al medi (124, 459). Malgrat l'existència d'aquestes similituds i la presència d'holoenzims H_1 i H_2 en una proporció similar a la de formes I i II als hepatòcits (124) no és possible encara assegurar la correspondència exacta entre les formes detectades per electroforesi i les detectades per cromatografia.

El glucagó produïa en les nostres condicions de tre

ball la dissociació de l'holoenzim H_1 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic entre uns intervals de concentració de 10^{-10} M i 10^{-7} M en el medi d'incubació dels hepatòcits (FIGURA 11). Aquestes concentracions de glucagó són també les efectives sobre l'activitat adenil ciclase. Bé que increments de 2-4 vegades sobre el valor basal del contingut intracel·lular d'AMP cíclic ja són suficients per dissociar completament aquest holoenzim (FIGURES 16 i 17), els increments d'AMP cíclic produïts pel glucagó podien arribar a ser de 40 o més vegades (FIGURA 16). La raó de tan alta producció d'AMP cíclic dins de la cèl·lula podria ser la de mantenir l'efecte del glucagó mitjançant la producció d'un excés d'AMP cíclic, la catabolització completa del qual es faria en un període expressament prolongat. Sense desestimar aquesta possibilitat hom pot pensar també que els increments molt alts d'AMP cíclic són els destinats a dissociar i activar l'holoenzim H_2 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica. Les concentracions més elevades de glucagó (FIGURA 10) o d'AMP cíclic en els experiments "in vitro" (FIGURA 8) eren les úniques que modificaven l'estat d'aquest holoenzim, bé que solament de manera parcial. Aquest efecte diferencial del glucagó sobre les activitats proteïna quinasa dependents d'AMP cíclic podria constituir una altra manera de modular l'acció de l'hormona. En contra d'aquest suggeriment hi ha el fet de que les concentracions de glucagó efectives sobre la dissociació d' H_2 són molt superiors a les assumides com a fisiològiques. De fet, l'activació diferencial de les formes cromatogràfiques I i II de l'enzim ha estat descrita en el fetge de rates tractades amb glucagó (460) en el qual la forma II, que és la menys sensible a la dissociació per AMP cíclic (124, 459) es presenta activa durant un període de temps molt més curt que la forma I. En contrast amb el que succeeix "in vitro", la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic recupera ràpidament l'estat reassociat inicial quan és dissociada "in vivo" pel glucagó (FIGURES 11

i 17). A les concentracions més elevades de glucagó és observable la reassociació de la proteïna quinasa fins i tot abans que el nivell intracel·lular d'AMP cíclic retorni al valor basal. Aquest fenomen insinua la possibilitat que "in vivo" la proteïna quinasa no estigui governada únicament per l'AMP cíclic sino que hom pot imaginar algun mecanisme addicional de control de l'activitat de l'enzim. Els descens d'AMP cíclic simplement coadjuvaria el procés de reassociació sense ser-ne probablement el responsable únic. L'exactitud d'aquest plantejament cal mantenir-la amb moltes reserves car les condicions en les que es troba l'enzim "in vitro" són molt diferents de les "in vivo" i, per tant, el seu comportament en un cas no és forçosament extrapolable per a l'altre.

4.2.3. CONTROL DE LES ACTIVITATS FOSFORILASA I GLICOGEN SINTASA.

El glucagó produeix l'activació de la fosforilasa a. Quan l'hormona era afegida al medi d'incubació dels hepatòcits la proporció de la fosforilasa en forma a s'incrementava de manera ràpida i intensa (FIGURES 14 i 18, refs. 13, 208, 351). Aquest efecte, que representa l'obertura de la via de degradació del glicogen, es produïa poc després que l'hormona hagués incrementat l'AMP cíclic i hagués activat per dissociació la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (FIGURA 20). Les concentracions de glucagó que activaven la fosforilasa eren les mateixes que produïen els efectes concomitants esmentats i coincidien amb les que a la bibliografia es descriuen com a efectives sobre aquest sistema (13, 208, 351) i sobre la gluconeogènesi (461) o l'activació de la piruvat quinasa (462).

Totes aquestes evidències indiquen que el mecanisme

d'activació de la fosforilasa hepàtica pel glucagó involucra una cascada glicogenolítica similar a l'existent al múscul esquelètic (6,7). L'activació de la fosforilasa reflexa l'activació prèvia de la fosforilasa quinasa a càrrec de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. L'activació de la fosforilasa quinasa d'hepatòcits s'ha demostrat, efectivament, induïble per glucagó (207, 208).

La inactivació de la glicogen sintasa per acció del glucagó sobre els hepatòcits procedents de rates mantingudes en dejuni (FIGURA 19) pot ben raonablement ser atribuïda, almenys en part, a la fosforilació de l'enzim per la subunitat catalítica de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. La fosforilació i pas de la glicogen sintasa a formes més inactives per acció d'aquesta quinasa està ben comprovada en el cas del múscul esquelètic (113, 145).

Que a les cèl.lules del parènquima hepàtic de rata els efectes sobre glicogen sintasa i fosforilasa causats pel glucagó estan mediatitzats per l'increment d'AMP cíclic originat per l'hormona, i que aquest increment no és un efecte simultani, però sense relació, amb aquells canvis, ho proven els experiments realitzats amb dibutiril AMP cíclic. L'acció intensíssima d'aquest compost sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa és del mateix signe i característiques que la del glucagó (FIGURES 21 i 22). El retard en assolir l'efecte màxim, especialment sobre l'activitat fosforilasa observat en comparar l'acció del dibutiril AMP cíclic amb la del glucagó concorda amb la necessitat que el dibutiril AMP cíclic difongui prèviament cap a l'interior dels hepatòcits en comptes d'actuar de forma immediata a l'entrar en contacte amb la membrana cel.lular tal com ho fa l'hormona.

També hi ha la possibilitat del control hormonal de

la glicogenolisi per interacció amb les fosfoproteïna fosfatases del metabolisme del glicogen. "In vivo" acaba de ser observat l'efecte del glucagó, però no de l'epinefrina, sobre l'activitat glicogen sintasa fosfatasa hepàtica de rata (297). L'efecte del glucagó consisteix en produir una forma de glicogen sintasa fosfatasa que és més intensament inhibible per EDTA "in vitro" que la procedent de fetges control no tractats amb l'hormona (297). Aquest canvi apunta vers la producció de formes estables de fosfatasa menys actives "in vivo" a conseqüència d'una acció del glucagó. Ha estat suggerida (297) la intervenció de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic en el procés de transformació de la fosfatasa esmentada. Si això fos cert estaria explicada també l'absència de l'efecte després del tractament amb epinefrina. D'altra banda, la hipotètica funció de la proteïna quinasa podria consistir en la fosforilació de subunitats reguladores (inhibidores) de la fosfatasa hepàtica activables per fosforilació cas que al fetge hi existeixin subunitats d'aquest tipus tal com sembla que succeeix al múscul esquelètic de conill (312, 317). La possible regulació "in vivo" de les fosfoproteïna fosfatases tant per hormones com per metabolits no ha estat estudiada extensivament. Per tant no es pot descartar altres efectes del glucagó o efectes de les catecolamines i altres hormones sobre la glicogen sintasa fosfatasa o sobre les fosfatases de la fosforilasa i fosforilasa quinasa.

Cal destacar que la màxima amplitud de l'efecte del glucagó sobre la glicogen sintasa no apareix fins al cap d'uns minuts d'haver estat assolit el canvi màxim d'activitat fosforilasa (FIGURA 20). Aquest fenomen és igualment observable en els hepatòcits tractats amb epinefrina o fenilefrina (FIGURES 36 i 37) i constitueix una característica no solament de l'acció d'aquestes hormones sino també del tractament amb glucosa tant del fetge "in vivo" (463, 464) com dels mateixos he

patòcits (13, 370). El grup de Hers ha mantingut repetidament (370, 464-467), que el fenomen es produeix perquè la interconversió de la glicogen sintasa està governada per la fosforila a que exerceix un efecte inhibidor sobre la glicogen sinta a fosfatasa. Segons els autors esmentats, l'activació de la glicogen sintasa seria sempre secundària a la transformació de la forma a de la fosforilasa en forma b.

Aquesta teoria però, no sembla sostenible. D'una banda, perquè el glucagó pot actuar directament sobre la glicògen sintasa a través de l'activació de la proteïna quinas dependent d'AMP cíclic. Tot i que no està clar encara el mecanisme mitjançant el qual les catecolamines poden actuar sobre la glicògen sintasa hepàtica, és prou fàcil pensar en l'existència d'accions directes sobre l'enzim similars a la del glucagó. D'altra banda, coneixem accions de certs monosacàrids sobre adipòcits (324) i hepatòcits (468) que cursen amb increments de l'activitat glicògen sintasa independent sense estar acompanyats de descensos de l'activitat fosforilasa a. Àdhuc la glucosa pot causar aquest efecte en certs tractament "in vivo" (469). Encara més, l'activació de la glicogen sintasa d'hepatòcits per efecte de la fructosa cursa amb una intensa activació paral·lela de la fosforilasa (468). El retard observat en la modificació de la glicogen sintasa en relació amb la de la fosforilasa es tribuïble més aviat a característiques intrínseques del seus propis sistemes d'interconversió.

Els hepatòcits procedents de rates alimentades normalment i sacrificades a les poques hores de la ingesta principal, presenten un sistema glicogen sintasa que no és aparentment inactivable per cap dels agents glicogenolítics assajats. (FIGURES 14, 25 i 35, i ref. 13). Comparada amb la dels hepatòcits de rata dejuna, l'activitat basal glicogen sintasa independent és molt baixa. Aquesta observació coincideix amb la

d'altri (13, 470). Existeix, a més, un paral·lelisme clar entre el contingut intracel·lular de glicogen i el grau d'activació de la glicogen sintasa. Segons observacions pròpies i d'altres autors (13, 470) a baixes activitats glicogen sintasa corresponen continguts elevats de glicogen, i viceversa. Aquesta interrelació és explicable pel fet demostrat que el glicogen a concentracions elevades és un inhibidor al·lostèric de la glicogen sintasa fosfatasa (253, 326, 305) i a baixes concentracions sembla que es comporta com activador d'aquest enzim (253, 326). Segons aquests raonaments, els hepatòcits de rates alimentades, és a dir, aquells amb contingut elevat de glicogen, presentarien un sistema glicogen sintasa fosfatasa inhibint el qual mantindria la glicogen sintasa en un estat de fosforilació intensa no incrementable ja per les hormones glicogenolítiques. Així mateix, els hepatòcits isolats a partir de rates privades de menjar contenen quantitats gairebé nul·les de glicogen: segons el mateix raonament l'activitat glicogen sintasa fosfatasa, desinhibida en aquesta circumstància, mantindria la glicogen sintasa només parcialment fosforilada i apte per a ser fosforilada del tot per acció de les hormones esmentades. Malgrat la versemblança d'aquesta exposició, cal no descartar la possibilitat d'existència d'altres factors que bloquegin l'acció del glucagó i de les catecolamines sobre la glicogen sintasa al fetge d'animals alimentats. Per exemple, l'existència d'alguna modificació de la pròpia glicogen sintasa que la faci menys susceptible a la fosforilació per proteïna quinases, o bé l'acció d'algun metabolit diferent del glicògen sobre els sistemes d'interconversió de l'enzim.

4.3. EL CARÀCTER ALFA-ADRENÈRGIC DE LES CATECOLAMINES.

Els resultats obtinguts amb l'epinefrina i la fenilefrina, estan relacionats amb els d'una sèrie recent d'estudis que demostren que les catecolamines poden activar la glicogenolisi al fetge de rata sense incrementar l'AMP cíclic ni activar de manera estable la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic o la fosforilasa quinasa (12, 13, 338, 340, 351, 208). L'epinefrina activava enèrgicament la fosforilasa a les cèl·lules parenquimàtiques de fetge de rata (FIGURES 23 i 25) i, si aquestes procedien d'animals mantinguts en dejuni, també hi inactivava marcadament la glicogen sintasa (FIGURA 24). Tant el caràcter com la seqüència temporal d'aquestes modificacions, però, no llur intensitat, coincidien amb les derivades de l'acció del glucagó sobre els hepatòcits (FIGURES 14, 18 i 19). Sobre una base molar, l'epinefrina era 50 a 100 vegades menys efectiva glicogenolíticament que el glucagó (veure intervals de concentracions efectives d'ambdues hormones en les figures que acabem de referir). La concentració de glucagó màximament efectiva sobre l'activitat fosforilasa a (10^{-7} M) causava un increment del nivell d'AMP cíclic d'unes 40 vegades sobre el valor basal (FIGURA 16) mentre que una concentració d'epinefrina que activava la fosforilasa de forma equivalent (10^{-5} M) causava un increment màxim d'AMP cíclic de 2 ó 3 vegades. Més encara: en cap cas fou observat que l'epinefrina modifiqués significativament la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic

(FIGURA 26). Totes aquestes evidències assenyalaven grans diferències entre el control de la glicogenolisi hepàtica per epinefrina i el control per glucagó.

Direm que el tipus d'interacció entre l'epinefrina i la membrana plasmàtica de l'hepatòcit de rata és predominantment alfa adrenèrgic, i que és certa la desvinculació entre els receptors alfa-adrenèrgics i l'adenil ciclasa i mecanismes d'acció hormonal dependents d'adenil ciclasa. Primer, perquè l'acció de l'epinefrina sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa no era afectada per tractament dels hepatòcits amb l'antagonista beta-adrenèrgic propranolol (FIGURES 27 i 28), tot i que aquest tractament bloquejava l'elevació d'AMP cíclic causada pel caràcter dèbilment beta-adrenèrgic de l'epinefrina (FIGURA 26). Segon, els antagonistes alfa-adrenèrgics fenoxibenzamina i fentolamina bloquejaven acusadament l'activació de la fosforilasa i la inactivació de la glicogen sintasa produïdes per l'epinefrina (FIGURES 30, 31 i 32). Tercer, l'increment de l'activitat fosforilasa i la inactivació de la glicogen sintasa independent persistien molt més temps que l'elevació d'AMP cíclic causada per l'epinefrina (apartat 3.3.1.3.). Quart, la fenilefrina, un compost d'estructura anàloga a la de l'epinefrina i amb caràcter exclusivament alfa-adrenèrgic al fetge, era plenament capaç d'activar la fosforilasa i d'inactivar la glicogen sintasa als hepatòcits (FIGURES 33, 34 i 35) i la seva acció no estava acompanyada per increments detectables d'AMP cíclic o per dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic (FIGURA 26). L'epinefrina mateixa, malgrat que estimulava els receptors beta-adrenèrgics i que produïa increments d'AMP cíclic, no afectava significativament la proteïna dependent d'AMP cíclic (FIGURA 26 i 338).

Tot això equival a dir que el mecanisme mitjançant el qual les catecolamines estimulen la glicogenolisi als hepa-

tòcits de rata és distint totalment de l'involucrat en l'acció del mateix tipus causada pel glucagó. Hom podria argüir que la fenilefrina o que l'epinefrina fins i tot en presència de propranolol, causaven un increment important d'AMP cíclic i d'activitat proteïna quinasa en algun petit compartiment intracel·lular i que aquests canvis, responsables de l'acció glicogenolítica, no serien detectables en mesurar l'AMP cíclic o la dissociació de la proteïna quinasa totals. Contra aquesta suposició es pot objectar que la fosforilasa i la glicogen sintasa, agregades als grànuls de glicogen, es troben distribuïdes ubíquament pel citosol (471) i que no sembla possible modificar llur activitat sense incrementar significativament l'AMP cíclic total. Una altra possibilitat és que la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic fos estimulada pel algun activador desconegut, format per acció de l'epinefrina o de la fenilefrina, l'efecte del qual es perdés per dilució en el medi d'homogeneïtzació i assaig. No ha estat observat, però, que la dissociabilitat de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic estigui alterada després del tractament dels hepatòcits amb agonistes alfa-adrenèrgics (338) ni que l'activitat de l'enzim, independentment del seu grau de dissociació, estigui modificada de manera sensible per l'efecte d'aquests agonistes (351, 338).

Cal concloure, doncs, que a les cèl·lules hepàtiques estudiades, l'epinefrina, i, per extensió les catecolamines, hi actuen predominantment per via alfa-adrenèrgica la qual no involucra canvis ni d'AMP cíclic ni d'activitat proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.

Malgrat el paper predominant dels receptors alfa-adrenèrgics a l'acció de les catecolamines al fetge de rata, no resta exclosa la possibilitat que en altres espècies animals els receptors beta-adrenèrgics juguin un paper quantitativament més important que aquí. Per exemple, ha estat assenyalat que l'iso-

proterenol, un efector beta-adrenèrgic, és més efectiu que l'epinefrina o la norepinefrina com a activador de la fosforilasa i de la glicogenolisi al fetge de conill, de gat o de gos (472-474).

Si hom assumeix que ni els receptors alfa-adrenèrgics que estan localitzats a la membrana plasmàtica, ni els agonistes alfa-adrenèrgics no interactuen directament amb els enzims del metabolisme del glicogen, cal postular l'existència d'un missatger secundari intracel·lular per a aquestes accions hormonals. Desestimada la funció de l'AMP cíclic en tal sentit hom podria pensar en un altre nucleòtid cíclic. Ha estat descrit que els agonistes alfa-adrenèrgics incrementen el nivell intracel·lular de guanosina 3':5' monofosfat cíclic (GMP cíclic) en plaquetes humanes (475) en glàndula paròtida de rata (476) i també als hepatòcits isolats de rata (353), i que el GMP cíclic estimula la glicogenolisi i la gluconeogènesi en el fetge de rata perfós (372, 477, 478). La possibilitat que el GMP cíclic estigui involucrat en l'acció de les catecolamines sembla però, improbable. D'una banda perquè les concentracions de nucleòtid necessàries per causar efectes sobre la glicogenolisi i la gluconeogènesi són 1.000 a 10.000 vegades més elevades que els nivells intracel·lulars observats. (479-481). De l'altra, perquè també es produeixen increments de GMP cíclic en l'acció de la insulina o de la carbamilcolina sobre hepatòcits de rata (353) i sobre altres preparacions hepàtiques (481, 482) i aquests compostos no estimulen ni la glicogenolisi ni la gluconeogènesi.

Estudis recents han presentat varies evidències que assenyalen a l'ion calci com a protagonista important de l'acció dels efectors alfa-adrenèrgics i, de manera concreta, de llur efecte activador de la fosforilasa als hepatòcits de rata (208, 209, 210). L'activació d'aquest enzim per la fenile

frina no estava acompanyada per una activació estable de la fosforilasa quinasa cosa que sí succeïa per efecte del glucagó (208-210). Aquesta observació concordava amb la suposició que la fenilefrina activava la fosforilasa quinasa de forma solament al·lostèrica i que aquesta activació es perdia en homogeneïtzar les cèl·lules i diluir llur contingut citoplasmàtic. En els mateixos estudis s'observa que l'acció de la fenilefrina sobre la fosforilasa desapareix si hom lleva el calci del medi d'incubació dels hepatòcits. En treballs sobre els hepatòcits incubats en un medi amb ^{45}Ca es pot observar que els agonistes alfa-adrenèrgics fenilefrina i epinefrina més propranolol estimulen la incorporació de l'isòtop a les cèl·lules (211). Aquest efecte pot ser conseqüència bé de l'activació del transport de Ca^{2+} cap a l'interior de la cèl·lula, bé de l'inhibició de la seva sortida al medi o bé de l'acúmul de l'ion a orgànuls subcel·lulars com les mitocondries o de la capacitat de fixació del calci per part d'estructures membranoses de la cèl·lula. A més, hi ha el fet que el ionofor A23187 que incrementa el pas de calci cap a l'interior dels hepatòcits (211) produeix l'estímul de la fosforilasa solament si el cation és present al medi d'incubació (209,210,353); aquest efecte no va acompanyat de cap alteració al nivell d'AMP cíclic.

Tant si el calci és el missatger intracel·lular dels agonistes alfa-adrenèrgics (209) com si el seu increment a la cèl·lula és provocat per un missatger encara desconegut, és possible explicar que la glicogenolisi sigui impulsada mitjançant simplement l'increment de la concentració intracel·lular de l'ion perquè hi cap la possibilitat de l'activació al·lostèrica de la fosforilasa quinasa per calci (208,210,338). De manera similar a la fosforilasa quinasa muscular (191,199,200,202) o a la de pannicle adipós (483), les formes de l'enzim de fetge són activables "in vitro" per concentracions micromo-

lars de calci (veure secció 1.4.3.). Tenint en compte això, l'acúmul de calci dins de la cèl.lula, provocat per un efector alfa-adrenèrgic, arribaria a estimular la fosforilasa quinasa i, a través d'ella, a activar la fosforilasa i la glicogenolisi en general.

Malgrat la versemblança de l'anterior explicació no poden ser desestimats altres mecanismes d'acció alfa-adrenèrgica; més tenint en compte que l'activitat de la fosforilasa quinasa b en presència de Ca^{2+} segueix essent bastant baixa "in vitro". Sobre la possibilitat de fosforilació de la fosforilasa quinasa per vies independents d'AMP cíclic cal dir que al múscul esquelètic acaba de ser descoberta una proteïna quinasa independent d'AMP cíclic i activable per modulador proteic dependent de calci (veure secció 1.4.2.3.). Aquesta proteïna quinasa actua sobre la fosforilasa quinasa b i la passa a la forma activa (87). També acaba de ser descrita una proteïna quinasa present al teixit cerebral que es produeix a partir d'una forma proenzimàtica per proteolisi dependent de calci (196 i secció 1.4.2.1.). Aquesta nova proteïna quinasa catalitza la fosforilació de les subunitats de la fosforilasa quinasa muscular i també és independent de l'AMP cíclic (196). Ara bé, el paper que les esmentades activitats quinàsiques dependents de calci poden jugar en l'acció alfa-adrenèrgica al fetge no el sabem. D'una banda encara no ha estat provada l'existència d'aquestes quinases al fetge, ni tampoc és coneguda la possibilitat de llur transcendència fisiològica la qual és dubtosa especialment en el cas de la proteïna quinasa activable per proteolisi perquè el procés de la seva activació és essencialment irreversible (196) i es realitza en presència de concentracions elevades de Ca^{2+} (196). I per altra part, si proteïna quinases d'aquest tipus mediatitzessin l'acció dels agonistes alfa-adrenèrgics als hepatòcits, haurien de ser trobades modificacions estables, per fosforilació, de la fosfori-

lasa quinasa d'aquestes cèl.lules, cosa que no ha estat descrita per ara. Encara que l'activació de la fosforilasa quinasa hepàtica alostèricament per calci o covalentment per proteïna quinases governables per via alfa-adrenèrgica fós operativa "in vivo" aquest efecte no podria ser l'explicació total dels efectes glicogenolítics alfa-adrenèrgics. En efecte, si admetem que la fosforilasa quinasa no pot actuar sobre la glicogen sintasa (186) cal seguir pensant en altres mecanismes d'acció, dependents o independents de calci, que impulsin l'inactivació estable d'aquest enzim i que actuïn a mercé dels estímuls alfa-adrenèrgics. Ja hem parlat del gran potencial glicogen sintasa quinasa independent d'AMP cíclic present al fetge (ref. 14 i secció 1.6.). Intensíssimes activitats protamina quinasa independents d'AMP cíclic també han estat observades per nosaltres als extractes d'hepatòcits (FIGURES 4, 5 i 6). Malgrat no ésser coneguda l'activació per hormones de cap de les glicogen sintasa quinases caracteritzades fins al moment, aquesta possibilitat no pot ser desestimada. Clarament cal molt de treball encara per determinar el paper, cas que el tinguin, d'aquestes proteïna quinases independents d'AMP cíclic en el control hormonal, i concretament alfa-adrenèrgic, del metabolisme del glicogen.

Pel que fa referència al calci cal dir finalment que el contingut intracel.lular de l'ion, hipotètic objectiu immediat dels estímuls alfa-adrenèrgics, també pot ser modificat per glucagó. Aquesta hormona estimula, segons alguns autors, l'entrada de ⁴⁵Ca als hepàtics (209,210,354). Altres no han pogut observar aquest efecte (211), però, en canvi, han trobat que estimula la sortida de l'ion al medi si aquest és pobre en calci (211). L'efecte del calci sobre l'acció glicogenolítica del glucagó no és clar: mentre uns han observat disminucions notables d'aquesta acció en cèl.lules incubades en la seva absència (209), d'altres troben que la glicogenolisi causada pel glucagó

no és gens afectada en aquestes condicions (210,483).

Malgrat l'òbvia necessitat de més dades sobre els moviments de calci a la cèl.lula, la tasca d'interpretació del seu paper esdevé difícil donat el desconeixement existent sobre la concentració de les seves formes bioquímicament actives dins la cèl.lula i especialment dins de cada compartiment sub-cel.lular. Futurs estudis han de resoldre aquesta qüestió determinant quins són els mitjants que disposa la cèl.lula per governar els moviments de l'ion i, alhora, clarificant el dilema de si el calci és controlat per hormones específiques o si, inversament, és ell qui permet a certes hormones dur a terme llurs efectes biològics.

4.4. APROXIMACIÓ AL MECANISME D'ACCIÓ DE LA INSULINA.

La demostració del control de la glicogenolisi hepàtica per glucosa i algunes comunicacions negatives (365,366) referents a l'efecte de la insulina sobre la glicogen sintasa hepàtica havien contribuït plegades a fer del paper de la insulina com a reguladora de la síntesi de glicogen al fetge de mamífers una qüestió controvertida. Els resultats que presentem recolzen fermament la possibilitat que el metabolisme hepàtic del glicogen sigui controlat directament per la insulina, tal com havia indicat Larner basant-se en estudis "in vivo" (329) o en fetge perfós (364,484). Els nostres resultats demostren que la insulina contrarresta els efectes del glucagó i de les catecolamines sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa (FIGURES 41 a 43 i 46 a 51) i que ho fa de manera independent d'altres efectors, concretament de la glucosa.

Els efectes de la insulina sobre el metabolisme del glicogen al fetge que fins ara es trobaven descrits a la bibliografia, havien estat obtinguts en presència de glucosa al medi d'incubació. Per exemple, l'activació de la glicogen sintasa per insulina en presència d'elevades concentracions de glucosa ha estat observada en hepatòcits incubats en medis complexes que contenen aminoàcids (367-369). La capacitat de la insulina per contrarrestar l'efecte del glucagó sobre la fosforilasa en cèl.lules hepàtiques en presència de glucosa també

ha estat descrit recentment (208). La glucosa, però, és capaç per ella mateixa d'activar la glicogen sintasa i de inactivar la fosforilasa (365, 366, 368, 370). La insulina, l'acció de la qual també es tradueix en efectes glicogènics, té un efecte ben conegut i demostrat d'afavoriment de l'entrada de glucosa cap a l'interior de cèl.lula hepàtica (358-360). L'efecte glicogènic de la insulina (355-357) o els seus efectes concrets sobre la glicogen sintasa (367-369) i la fosforilasa (208) observats "in vivo" en presència de glucosa, hom pot sentir-se inclinat a atribuir-los a l'efecte d'acció de masses de l'entrada massiva de monosacàrid a la cèl.lula i també a efectes al·lostèrcis de la glucosa o, més propiament, dels seus metabolits sobre els enzims esmentats. Partint d'aquest punt hom podria dubtar d'efectes de la insulina, directes i independents de l'entrada de glucosa, sobre els sistemes reguladors del metabolisme del glicogen.

Els efectes de la insulina que hem observat en absència de glucosa proven que l'hormona pot controlar al fetge la interconversió de la glicogen sintasa i de la fosforilasa i que ho fa decantant el sistema vers l'afavoriment de la síntesi del glicogen. El manteniment de les cèl.lules hepàtiques en absència de glucosa consistia, segons que hem descrit, en resuspendre-les en un medi que no contenia ni glucosa ni cap substrat gluconeogènic, sino que únicament estava constituït a base de cations i anions minerals. Les cèl.lules utilitzades no contien quantitats apreciables de glicogen car procedien d'animals mantinguts en dejuni les 24 hores prèvies als experiments. Per tant, no era possible l'aparició de glucosa al medi per activitat glicogenolítica de les cèl.lules.

S'ens podria objectar que una certa quantitat de glucosa podria fer aparició per efecte de l'activitat gluconeogènica dels hepatòcits o, si més no, procedent de les cèl.lules

que al llarg del període d'incubació sofreixen algun danyatge i vessen llur contingut al medi. S'ens podria dir que la glucosa així present podria ser capaç "per se" d'activar la glicogen sintasa i de inactivar la fosforilasa i que aquest efecte, potenciat per la insulina, no seria en realitat la conseqüència directa de l'acció d'aquesta hormona. Certament que hi havia glucosa al medi que contenia els hepatòcits en els nostres experiments amb insulina. Concentracions al voltant de 0,1 mM eren detectables al final de les preincubacions amb insulina i s'incrementaven fins a un màxim de 0,3 mM durant els períodes d'incubació que seguien. Ara bé, ni la glucosa sola actuant sobre hepatòcits control incubats sense hormones, ni la glucosa en presència d'insulina sola tenien cap efecte detectable sobre la glicogen sintasa o la fosforilasa (FIGURA 40). Això prova que lleus contaminacions amb glucosa no tenen cap efecte significatiu sobre el sistema estudiat.

La disminució per la insulina dels efectes del glucagó i dels agonistes alfa-adrenèrgics sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa té una amplitud limitada. Això, però, no li treu la possibilitat de ser fisiològicament efectiva. La insulina, fins i tot a concentracions elevades, solament era efectiva contra concentracions moderades de les hormones glicogenolítiques. Resultats similars han estat obtinguts en l'estudi de l'acció d'aquestes hormones sobre la gluconeogènesi en fetge perfós (373, 485). Cal dir que les concentracions de glucagó i catecolamines que no responen a la insulina estan notablement per damunt de l'interval de concentracions fisiològiques que presumiblement tenen lloc a la sang portal i que són de 10^{-10} M a 10^{-9} M pel glucagó (486, 487) i al voltant de 10^{-9} M per l'epinefrina (488). D'altra banda, l'efecte màxim de la insulina sobre les accions del glucagó i dels agonistes alfa-adrenèrgics era observable quan les concentracions de les hormones glicogenolítiques (glucagó 3×10^{-10} M i epinefrina 10^{-8} M) es-

taven compreses en l'interval fisiològic de concentracions.

Les relativament petites modificacions de les activitats glicogen sintasa i fosforilasa causades per la insulina en hepatòcits incubats amb efectors glicogenolítics poden representar canvis importants d'activitat enzimàtica en condicions fisiològiques. Aquesta aseveració es recolza en estudis (289,290) sobre la relació fosforilació/activitat realitzats sobre la glicogen sintasa, l'activitat de la qual és la que experimenta aparentment les variacions més petites per acció de la insulina en les nostres condicions.

La interpretació de canvis modestos de la proporció de forma independent seria difícil de fer sobre la base d'un model de glicogen sintasa consistent en dues formes, la fosforilada i inactiva, i la desfosforilada i activa, interconvertibles per processos de tipus tot-o-res. La fosforilació múltiple de la glicogen sintasa, en canvi, determina l'aparició de relacions activitat enzimàtica/grau de fosforilació que no són lineals sinó sigmoidees (289) de manera que en situacions extremes de fosforilació o desfosforilació de la glicogen sintasa l'activitat de l'enzim varia poc quan hi ha modificacions petites del grau de fosforilació. En canvi, en les situacions de contingut de fòsfat intermedi ($2,0 \pm 0,5$ fòsfats per subunitat de sintasa en el cas del múscul esquelètic) l'activitat de l'enzim és àmpliament modificable per petits canvis en la proporció de fosforilació o, si es vol, de glicogen sintasa independent. La hipòtesi (289,274) fornida a base de les prediccions derivades d'aquests fets dona relleu als efectes generalment força modestos que les hormones exerceixen sobre la glicogen sintasa dels teixits de mamífer.

Si el glucagó i els efectors alfa-adrenèrgics actuen per mecanismes no relacionats, resulta difícil de pensar que la

insulina contrarresti llurs efectes per un mecanisme comú i és molt poc probable que l'acció de la insulina vagi dirigida a interactuar amb un únic punt determinat de les seqüències d'esdeveniments impulsades per aquells agents glicogenolítics a la cèl.lula del parènquima hepàtic.

Una manera com la insulina disminueix l'efecte del glucagó es pot explicar, d'antuvi, per la interacció amb el nivell intracel.lular d'AMP cíclic. Durant la investigació de l'acció de la insulina observàrem que l'acumul d'AMP cíclic causat pel glucagó era molt menor si hi havia insulina al medi (FIGURES 44 i 45). Aquest fet estava ja descrit en treballs sobre el fetge perfós (169,375) o sobre els propis hepatòcits de rata isolats (289) i són possibles diverses explicacions teòriques que el justifiquin. La insulina podria interactuar bé amb l'adenil ciclase, bé amb la nucleòtid cíclic fosfodiesterasa. L'existència de resultats positius i de negatius sobre cada una d'aquestes possibilitats ha fet el tema controvertit. Ha estat descrit per diferents laboratoris (376-378) que la insulina inhibeix l'activitat adenil ciclase quan aquesta és estimulada pel glucagó a les membranes de cèl.lules hepàtiques. Aquesta troballa no ha pogut ser confirmada per altres grups (37, 489-492). Juntament amb treballs que neguen l'efecte de la insulina sobre la fosfodiesterasa hepàtica (354,493), n'hi ha d'altres (38,344,345) que indiquen que la insulina estimula l'activitat de la forma de baixa Km de l'enzim. L'efecte hormonal sobre la fosfodiesterasa no sembla relacionat amb la intervenció del modulador proteic, dependent de calci, de la fosfodiesterasa (75,78) car aquest no afecta a la forma enzimàtica activable per insulina (68). Aquesta mateixa fosfodiesterasa pot ser estimulada, en certes condicions, pel glucagó (68) i aquest efecte és relacionable amb l'increment d'AMP cíclic causat per l'hormona. Resulta obvi que per al cas de la insulina l'increment d'AMP cíclic no pot ser el responsable

d'aquest efecte sobre la fosfodiesterasa . Resumint, el mecanisme mitjançant el qual la insulina activa la fosfodiesterasa o inactiva l'adenil ciclasa resta desconegut.

Una tercera possibilitat de interferència de la insulina amb l'acció del glucagó és a nivell de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic. No ens estem referint ara a la menor activació d'aquesta quinasa quan la producció d'AMP cíclic per glucagó es més baixa degut a la presència d'insulina (459), sinó al possible efecte directe de l'hormona sobre la sensibilitat de la proteïna quinasa a l'AMP cíclic, o dit d'una altra manera, a l'efectivitat d'aquest compost per dissociar l'enzim. En aquest sentit ha estat descrita la inactivació de la proteïna quinasa després del tractament amb insulina (364,494,495). L'existència d'un inhibidor hipotètic d'aquest enzim que apareixeria a la cèl.lula sota l'efecte de la insulina ha estat suggerit per Larner (495,496).

També ha estat indicada una acció de la insulina sobre les fosfatases hepàtiques (497,498). Altres estudis assenyalen que la insulina no produeix modificacions estables de la proteïna (glicogen sintasa) fosfatasa (346), la qual cosa, no exclou la possibilitat que l'acció de l'hormona sobre aquest enzim es basi en potenciar l'acció al·lostèrica d'algun metabolit com la glucosa i la glucosa 6-fosfat que "in vitro" estimulen les activitats sintasa fosfatasa (269,249) i fosforilasa fosfatasa (253,321).

Amb la predicció i àdhuc amb la comprovació de certs efectes de la insulina sobre el mecanisme d'acció del glucagó i, més concretament, sobre l'elevació d'AMP cíclic als hepatòcits, no és possible explicar d'una manera completa el mecanisme de control del metabolisme hepàtic del glicogen per la insulina tenint en compte que aquesta hormona també disminueix

l'efecte dels agonistes alfa-adrenèrgics (FIGURES 46 a 51), i que el mecanisme d'acció d'aquests és com hem explicat, independent dels increments d'AMP cíclic.

De les hipòtesis sobre el mecanisme d'acció alfa-adrenèrgica, la que involucra canvis en la concentració intracel·lular de calci és la més versemblant, almenys per a explicar l'efecte sobre la fosforilasa (208-210). L'hipòtesi es basa de manera precisa en l'observació d'increments de la concentració de calci al citoplasma per l'estímul de l'entrada de l'ion als hepatòcits (211). Si la interferència de la insulina amb els agonistes alfa-adrenèrgics es realitza a nivell de les concentracions de calci, sembla molt difícil pensar que això es faci a través també d'increments del seu nivell citoplasmàtic.

La hipòtesi de l'acció de la insulina mediatitzada per l'increment citoplasmàtic del calci (499-505) basada en que l'hormona estimula la seva aparició al medi a partir d'adipòcits i múscul soleus de rata (356) ha de ser, doncs, desestimada. Malgrat això, sembla clar que la insulina pot induir modificacions en la distribució intracel·lular del calci als hepatòcits (512) i a altres cèl·lules (506-508). La redistribució del calci dins de les cèl·lules és un component esencial de moltes de llurs respostes metabòliques i fisiològiques (509), tant, que hom ha suggerit que el calci és el missatger secundari de la insulina (507, 508, 510). Aquesta afirmació, però, no és sostenible experimentalment (506-508). Tenint en compte els efectes esmentats sobre la distribució intracel·lular del calci i d'interacció de la insulina amb l'efecte d'altres hormones sobre el transport de l'ion (211) cal admetre però, l'existència d'alguna mecanisme o missatger intracel·lular que enllaci l'estímul de recepció de la insulina amb les claus que governen els moviments de l'ion dins de la cèl·lula.

I, al capdevall, els canvis de distribució del calci poden modificar l'activitat dels enzims que hi són sensibles. Per tant, ha semblat oportú (508) postular que el calci forma part d'un sistema missatger terciari de l'acció hormonal de la insulina.

L'espècie del calci bioquímicament "activa" és la ionitzada i representa solament una petita porció del contingut total de calci (511) la qual cosa afegeix una complexitat addicional considerable a l'estudi de les accions en les quals intervé. El caràcter i el significat del moviment intracel·lular de calci originat per la insulina serà durant bastant temps matèria de discussió en la qual nosaltres ara no hi hem d'entrar en profunditat perquè no l'hem estudiat directament. Els nostres resultats, ben entès que no indiquen necessàriament que la insulina actua rebaixant el calci citosòlic, constitueixen, això sí, un seriós argument en contra d'aquelles teories que sostenen que l'hormona actua incrementant el calci citosòlic (499-505).

En sumari, el glucagó impulsa la glicogenolisi al fetge per una cadena de reaccions similar a l'evidenciada al múscul esquelètic per l'epinefrina, i la insulina el contrasta, en absència de glucosa, interactuant almenys amb l'increment d'AMP cíclic. L'estímul de la glicogenolisi per les catecolamines als hepatòcits de rata, que té caràcter essencialment alfa-adrenèrgic i que no involucra els mecanismes intermedis de l'acció del glucagó, també és disminuït per la insulina, que en aquest cas potser actua modificant el metabolisme intracel·lular del calci. La possibilitat d'un mecanisme d'acció immediata de la insulina que no involucri ni l'AMP cíclic ni el calci, ni tampoc efectes al·lostèrics per metabolits, no pot ser deixada de banda.

La reevaluació global dels mecanismes que intervenen

en la regulació hormonal del metabolisme hepàtic del glicògen, tan complexa, resulta oportuna, i àdhuc inajornable.

5. CONCLUSIONS

★ Les preparacions homogènies de cèl.lules parenquimàtiques de fetge intactes i isolades a partir d'un sol animal per meten estudiar moltes variables alhora en un mateix fetge proporcionant simultàniament controls experimentals interns. Per tal motiu constitueixen un sistema extremadament adequat per l'estudi de respostes hormonals i metabòliques al fetge.

★ La tècnica utilitzada per l'isolament de cèl.lules parenquimàtiques de fetge de rata, la qual és combinació i modificació d'altres tècniques descrites a la bibliografia, resulta altament satisfactòria car:

- Es troba entre les de major rendiment quant a proporció de cèl.lules recuperades.
- Una proporció molt elevada dels hepatòcits isolats és metabòlicament viable. Aquestes cèl.lules conserven la sensibilitat als efectors que han de passar del medi a llur interior (dibutiril AMP cíclic, etc) i als produïts que interactuen amb receptors específics de la membrana plasmàtica (hormones, agonistes i antagonistes adrenèrgics, etc.).
- Durant el període de realització de cada experiment els valors basals dels paràmetres objecte d'estudi (activitats enzimàtiques, nivells d'AMP cíclic, etc.) es mantenen sense canvis significatius en les cèl.lu les control.

- ★ Per a l'obtenció de rendiments satisfactoris quant a nombre i viabilitat dels hepatòcits, i estabilitat metabòlica i de resposta als efectors extracel·lulars, és necessària l'observació de les següents condicions en la tècnica d'isolament:
- Rapidesa en la preparació quirúrgica dels animals.
 - Oxigenació intensa del medi de perfusió hepàtica i aplicació de fluxes de perfusió elevats.
 - L'extensió del període de perfusió dels fetges amb colagenasa cal que obeeixi a un compromís entre els temps massa breus que fan incompleta la digestió de la trama de colagen hepàtica, i les exposicions massa perllongades que poden ocasionar danys a les estructures cel·lulars exposades a l'exterior.
- ★ La proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic hepàtica es presenta almenys en dues formes holoenzimàtiques (H_1 i H_2) que són revelables després d'electroforesi en gels de poliacrilamida. Es fan evidents en aquests gels tant per fixació d'AMP cíclic com per llur capacitat de fosforilació de proteïnes amb $(\gamma^{32}\text{P})\text{ATP}$. Presenten les següents característiques:
- Els pesos moleculars dels dos holoenzims tenen un valor aproximat de 108.000 daltons. El de la subunitat R té un valor d'aproximadament 72.000 daltons. El pes molecular de la subunitat catalítica és estimat en 36.000 daltons.

- Aparentment la forma H_1 és la més abundosa i la més fàcilment dissociable tant "in vitro" per AMP cíclic com en els hepatòcits per efecte del glucagó.
 - L'eliminació per gel-filtració de l'AMP cíclic present en forma lliure als extractes crus dels hepatòcits de rata no provoca la reassociació de les subunitats de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic quan aquestes es troben dissociades "in vitro". Al mateix temps la gel-filtració permet observar que aquests extractes contenen una certa quantitat d'AMP cíclic lligada a estructures macromoleculares.
- ★ Les fonts potencials d'error inherents a l'estudi de les proteïna quinases dependents d'AMP cíclic no afecten al mètode experimental utilitzat car:
- L'estat de dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic als extractes procedents d'hepatòcits incubats sense hormones és molt baix. Aquest fet treu qualsevol importància a la possibilitat de dissociació de la proteïna quinasa durant el procés d'homo^{geneïtzació} per alliberament de l'AMP cíclic que es pugui trobar segregat per alguna estructura macromolecular de la cèl.lula fins a aquell moment.
 - Si la proteïna quinasa és dissociada per tractament específics "in vivo" o "in vitro" es manté inalteradament en aquest estat en els extractes crus durant períodes prolongats, àdhuc després d'eliminar per gel-filtració l'AMP cíclic lliure d'aquests extractes.

Això fa molt improbable la possibilitat d'errors derivats de la reassociació espontània de les subunitats de la proteïna quinasa en els extractes.

- ★ Als extractes d'hepatòcits de rata hi existeixen almenys dues proteïna quinases l'activitat de les quals no és afectable per AMP cíclic "in vitro" ni aparentment per hormones que, com el glucagó, incrementen el contingut intracel·lular d'AMP cíclic. L'activitat d'aquestes proteïna quinases independents d'AMP cíclic sobre protamina és molt més important quantitativament que la corresponent a les dues formes dependents d'AMP cíclic.

- ★ El glucagó impulsa la glicogenolisi al fetge per una cadena de reaccions similar a l'evidenciada per l'acció de l'epinefrina al múscul esquelètic. Hem identificat els següents esglaons:
 - El glucagó indueix un fort increment de la concentració intracel·lular d'AMP cíclic als hepatòcits isolats de rata. L'interval de concentracions de glucagó efectives sobre l'acumulació d'AMP cíclic coincideix amb el descrit com a efectiu en l'estimulació de l'adenil ciclasa hepàtica (10^{-10} M a 10^{-7} M).
 - El glucagó causa la dissociació de l'holoenzim H_1 de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic de les cèl·lules parenquimàtiques de fetge via l'elevació del

contingut intracel.lular del nucleòtid.

- A les cèl.lules parenquimàtiques de fetge de rata el glucagó hi activa la fosforilasa, incrementant-ne la forma a, immediatament després d'augmentar el contingut d'AMP cíclic i de dissociar la proteïna quinasa dependent d'aquest nucleòtid. Aquest efecte és independent de l'estat nutricional dels animals dels quals procedeixen els hepatòcits.
- El glucagó produeix la inactivació de la glicogen sintasa als hepatòcits procedents d'animals mantinguts en dejuni les 24 hores prèvies als experiments. La inactivació de la glicogen sintasa per acció del glucagó és dosi-dependent i és atribuïble a la fosforilació per la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic.
- Els hepatòcits procedents de rates alimentades normalment i sacrificades en període postprandial presenten un sistema glicogen sintasa que aparentment no és inactivable pel glucagó ni pels altres agents glicogenolítics assajats (epinefrina i fenilefrina).
- La màxima amplitud de l'efecte del glucagó i dels altres agents glicogenolítics assajats, sobre la glicogen sintasa apareix amb posterioritat a la màxima amplitud de l'efecte sobre la fosforilasa.
- L'acció del dibutiril AMP cíclic sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa és del mateix signe i característiques que la del glucagó. Els experiments amb dibutiril AMP cíclic constitueixen una prova addicional de que l'AMP cíclic incrementat pel glucagó és plenament apte per mediatitzar la seva acció sobre els enzims es

mentats.

- ★ L'epinefrina activa enèrgicament, i d'una manera dosi-dependent, a la fosforilasa de cèl.lules parenquimàtiques de fetge de rata i, si aquestes procedeixen d'animals mantinguts en dejuni, també hi inactiva la glicogen sintasa. Tant el caràcter com la seqüència temporal d'aquestes modificacions coincideixen amb les derivades de l'acció del glucagó.

- ★ Malgrat la coincidència de llurs efectes sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa, l'actuació del glucagó i la de l'epinefrina presenten diferències fonamentals:
 - Sobre una base molar l'epinefrina és 50 a 100 vegades menys efectiva glicogenolíticament que el glucagó.
 - L'increment d'AMP cíclic causat per una concentració d'epinefrina màximament efectiva sobre la fosforilasa és unes 20 vegades menor que l'observat amb la concentració de glucagó que activa a la fosforilasa de forma equivalent.
 - L'epinefrina no provoca la dissociació de la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic ni tan sols quan l'hormona es troba en concentracions elevades que incrementen significativament l'AMP cíclic intracel.lular.

- ★ El mecanisme d'acció de l'epinefrina sobre el metabolisme del glicogen a l'hepatòcits de rata és predominantment mediatitzat per la seva interacció amb els receptors alfa-adrenèrgics, i està pràcticament desvinculat de l'activació de l'adenil ciclasa i dels fenòmens que s'en deriven directament perquè:
- L'increment d'activitat fosforilasa o la disminució de l'activitat glicogen sintasa produïts per l'epinefrina són molt més persistents que les dèbils elevacions d'AMP cíclic causades per les concentracions altes de l'hormona.
 - L'acció de l'epinefrina sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa no és afectada per tractament dels hepatòcits amb l'antagonista beta-adrenèrgic propranolol, tot i que aquest tractament bloqueja l'elevació d'AMP cíclic causada pel caràcter dèbilment beta-adrenèrgic de l'epinefrina.
 - Els antagonistes alfa-adrenèrgics fenoxibenzamina i fentolamina bloquejen acusadament l'activació de la fosforilasa i la inactivació de la glicogen sintasa causades per l'epinefrina.
 - La fenilefrina, un agonista alfa-adrenèrgic al fetge, és clarament capaç d'activar la fosforilasa i d'inactivar la glicogen sintasa de cèl·lules parenquimàtiques de fetge de rata. La seva acció no està acompanyada per increments detectables d'AMP cíclic ni per la dissociació de la proteïna quinasa dependent d'aquest nucleòtid.

- ★ Els resultats que presentem recolzen fermament la possibilitat que el metabolisme del glicogen al fetge sigui controlat de manera directa per la insulina car:
 - La insulina contrarresta d'una manera dosi-dependent els efectes del glucagó i dels agonistes alfa-adrenèrgics sobre la glicogen sintasa i la fosforilasa de cèl.lules parenquimàtiques de fetge.
 - L'acció de la insulina observada es produeix en absència de glucosa i, per tant, no és deguda a la potenciació, per part de la insulina, dels efectes d'aquest monosacàrid sobre les activitats dels enzims esmentats.

- ★ L'acció de la insulina contraposada a la del glucagó pot ésser explicada, almenys en part, pel fet que la insulina disminueix el nivell intracel.lular d'AMP cíclic incrementat pel glucagó.

- ★ Com que el glucagó i els agonistes alfa-adrenèrgics actuen sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa per mecanismes diferents, i donat que al mecanisme d'acció dels efectors alfa-adrenèrgics no hi intervé l'AMP cíclic, cal dir que la insulina disminueix les accions d'aquests compostos per un mecanisme diferent del basat en rebaixar el nivell d'AMP cíclic incrementat per una hormona glicogenolítica.

- ★ Els resultats referents a la disminució de l'efecte dels agonistes alfa-adrenèrgics sobre la fosforilasa i la glicogen sintasa per la insulina constitueixen un seriós argument en contra d'aquelles teories que sostenen que la insulina actua incrementant el contingut citosòlic de calci. Efectivament, resulta molt difícil que els agonistes alfa-adrenèrgics, que incrementen clarament el contingut intracel.lular de calci, i la insulina, responsables d'efectes contraposats, actuïn a través del mateix mecanisme.

6. BIBLIOGRAFIA

1. RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1957) J. Biol. Chem. 232, 1065-1076.
2. SUTHERLAND, E.W. i RALL, T.W. (1957) J. Biol. Chem. 232, 1077-1091.
3. ROSELL PÉREZ, M., VILLAR PALASÍ, C. i LARNER J. (1962) Biochemistry 1, 763-768.
4. FRIEDMAN, D.L. i LARNER, J. (1963) Biochemistry 2, 669-675.
5. WALSH, D.A., PERKINS, J.P. i KREBS, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 3763-3765.
6. BROSTROM, M.A., REIMAN, E.M., WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1970) Adv. in Enz. Regulat. 8, 191-203.
7. WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1973) The Enzymes, 3 ed. (P. Boyer editor) Academic Press, NY., pp. 555-581.
8. STADTMAN E.R., CHOCK, P.B. i ADLER, S.P. (1976) "Metabolic Interconversion of Enzymes 1975" (S. Shaltiel, editor), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 221-233.
9. NIMMO, H.G. i COHEN, P. (1977) "Advances in Cyc. Nucl. Res." vol 8 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 146-265.
10. ADLER, S.P., MANGUM, J.H., MAGNI, G. i STADTMAN, E.R. (1974) "Metabolic Interconversion of Enzymes 1973" (E.H. Fisher, E.G. Krebs, H. Neurath i E.R. Stadtman editors) Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 221-233.
11. COHEN P. (1976) "The Control of Enzyme Activity" Chapman i Hall, London.
12. EXTON, J.H. i HARPAR, J.C. (1975) "Advances in Cicl. Nucl. Res." vol. 5 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY. pp. 519-532.
13. HUTSON , N.J. BRUMLEY, F.T., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C. i EXTON, J.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 5200-5208.
14. SCHLENDER, K.K. i REIMANN, E.H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2384-2389.
15. NIMMO, H.G. i COHEN, P. (1974) FEBS Lett. 47, 162-166.

16. HUANG, K.P., HUANG, F.L., GLINSMANN, W.H. i ROBINSON, J.C. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 1163-1169.
17. ITARTE, E., ROBINSON, J.C. i HUANG, K.P. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1231-1234.
18. ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. i SUTHERLAND, E.W. (1971) "Cyclic AMP" Academic Press, NY.
19. KUO, J.F. i GREENGARD, D.P. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64, 1349-1355.
20. KREBS, E.G. (1972) "Curr. Top. Cell. Regulat." (B.L. Horecker i E.R. Stadtman editors) vol. 5, pp. 99-133.
21. SUTHERLAND, E.W., RALL, T.W. i MENON, T. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1220-1227.
22. RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1228-1232.
23. MURAD, F. CHI, Y.M., RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1233-1238.
24. SUTHERLAND, E.W. i RALL, T.W. (1960) Pharm. Rev. 12, 265-299.
25. RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1961) Cold Spring Harbor Symp. on Quantit. Biol. 26, 347-354.
26. SUTHERLAND, E.W., ØYE, I. i BUTCHER, R.W. (1965) Recent Prog. in Horm. Res. 21, 623-646.
27. PERKINS, J.P. (1973) "Adv. in Cycl. Nucl. Res." (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., vol. 3, pp. 1-64.
28. ROBISON, G.A., BUTCHER, R.W. i SUTHERLAND, E.W. (1967) Ann. NY Acad. Sci. 139, 703-723.
29. BUTCHER, R.W., BAIRD, C.E. i SUTHERLAND, E.W. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1705-1712.
30. BÄR, H.P. i HECHTER, O. (1969) Proc. Ntl. Acad. Sci. USA. 63, 350-356.
31. BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. i RODBELL, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3468-3476.
32. BIRNBAUMER, L. i RODBELL, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3477-3482.

33. RODBELL, M., BIRNBAUMER, L. i POHL, S.L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 718-722.
34. WINCEK, T.J., HUPKA, A.L. i SWEAT, F.W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8863-8873.
35. LEVEY, G.S. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 86-92.
36. MARCUS, R. i AURBACH, G.D. (1971) Biochim. Biophys. Acta 242, 410-421.
37. POHL, S.L., BIRNBAUMER, L. i RODBELL, M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1849-1856,
38. LEVEY, G.S. (1971) Biochem, Biophys. Res. Cmmun. 43, 108-113.
39. LEVEY, G.S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7405-7407.
40. LEVEY, G.S. i KLEIN, I. (1972) J. Clin. Invest. 51, 1578-1582.
41. RODBELL, M. (1972) "Current Topics in Biochemistry" Acad. Press, NY.
42. LONDOS, C. i PRESTON, M.S. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5957-5961.
43. WILLIAMS, L.T., MULLIKIN, D. i LEFKOWITZ, R.J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2984-2989.
44. BROSTROM, C.O., HUANG, Y.C., BRECKENRIDGE, B.McL. i WOLFF, D.J. (1975) Proc. Ntl. Acad. Sci. USA. 72, 64-68.
45. CHEUNG, W.Y., BRADHAM, L.S., LYNCH, Y.M. i TALLANT, E.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1055-1062.
46. RODBELL, M., KRAMS, H.M., POHL, S.L. i BIRNBAUMER, L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1861-1871.
47. RODBELL, M., KRAMS, H.M., POHL, S.L. i BIRNBAUMER, L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1872-1876.
48. RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. i KRAMS, H.M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1877-1882.
49. RODBELL, M., LIN, M.C. i SALOMON, Y. (1974) J. Biol. Chem. J. Biol. Chem. 249, 59-65.
50. LAD, P.M. WELTON, A.F. i RODBELL, M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5942-5946.

51. RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L. i SUNBY, F. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 909-913.
52. KUEHL, F.A. i HUMES, J.L. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 480-484.
53. LEFKOWITZ, R.J., ROTH, J., PRICER, W. i PASTAN, I. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 65, 745-752.
54. WELLS, J.M. i HARDMAN, J.G. (1977) "Adv. Cycl. Nucl. Res." vol. 8 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY. pp. 119-143.
55. THOMSON, W.J. i APPLEMAN, M.M. (1971) Biochemistry. 10, 311-316.
56. BUCHTER, R.W. i SUTHERLAND, E.W. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1244-1250.
57. HRAPCHAK, R.J. i RASMUSSEN, H. (1972) Biochemistry 11, 4458-4465.
58. GOREN, E.N. i ROSEN, O.M. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 153, 384-397.
59. HO, H.C., WIRCH, E. STEVENS, F.C. i WANG, J.H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 43-50.
60. MIKI, N. i YOSHIDA, H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 268, 166-174.
61. BROSTROM, C.O. i WOLFF, D.J. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 301-311.
62. WELLS, J.N., WU, Y.J.? BAIRD, C.E. i HARDMAN, J.G. (1975) Mol. Pharmacol. 11, 775-783.
63. HO, H.C., TEO, T.S., DESAI, R. i WANG, J.H. (1976) Biochem. Biophys. Acta 429, 461-473.
64. RUSSELL, T.R., TERASAKI, W.L. i APPLEMAN, M.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1334-1340.
65. LINDL, T. i CHAPMAN, G. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1273-1282.
66. MARCUS, R. (1975) Endocrinology 96, 400-408.
67. ADACHI, K. LEVINA, V., HALPRIN, K.M., ITZUKA, H. i YOSHIKAWA, K. (1976) Biochem. Biophys. Acta 429, 498-507.

68. LOTEN, E.G., ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D., EXTON, J.H.
i PARK, C.R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 746-757.
69. BEAVO, J.A., HARDMAN, J.G. i SUTHERLAND, E.W. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 5649-5655.
70. BEAVO, J.A., HARDMAN, J.G. i SUTHERLAND, E.W. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 3841-3846.
71. FRANKS, D.J. i MAC MANUS, J.P. (1971) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 42, 844-849.
72. MANGANIELLO, V. i VAUGHAN, H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci.
69, 269-273.
73. TERASAKI, W.L. i APPLEMAN, M.M. (1975) Metabolism 24, 311-
319.
74. PATTERSON, W.D., HARDMAN, J.G. i SUTHERLAND, E.W. (1976)
Mol. Cell. Endocrinol. 5, 51-66.
75. CHEUNG, W.Y. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 29,
478-483.
76. CHEUNG, W.Y. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 38,
533-538.
77. CHEUNG, W.Y. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2859-2869.
78. KAKIUCHI, S., YAMAZAKI, R. i NAKAJIMA, H. (1970) Proc.
Jap. Acad. 46, 587-592.
79. KAKIUCHI, S. i YAMAZAKI, R. (1970) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 41, 1104-1110.
80. KAKIUCHI, S., YAMAZAKI, R. i TESHIMA, Y. (1971) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 42, 968-974.
81. TEO, T.S. i WANG, J.H. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5950-
5955.
82. TEO, T.S., WANG, T.H. i WANG, J.H. (1973) J. Biol. Chem.
248, 588-595.
83. WATTERSON, D.M., HARRELSON, W.G., jr., KELLER, P.M.,
SHARIEF, F. i VANAMAN, T.C. (1976) J. Biol. Chem. 251,
4501-4513.
84. LIN, Y.M., LIU, Y.P. i CHEUNG, W.Y. (1974) J. Biol. Chem.
249, 4943-4954.

85. GOPINATH, R.M. i VICENZI, F.F. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1203-1209.
86. JARRET, H.W. i PENNISTON, J.T. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 1210-1216.
87. WAISMAN, D.M., SINGH, T.J. i WANG, J.H. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3387-3390.
88. UZUNOV, P. i WEISS, B. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 284 220-226.
89. TESHIMA, Y. i KAKIUCHI, S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 489-495.
90. WANG, J.H., TEO, T.S., HO, H.C. i STEVENS, F.C. (1975) "Adv. in Cicl. Nucl. Res." vol. 5 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 179-194.
91. LYNCH, T.J., TALLANT, E.A. i CHEUNG, W.Y. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 616-625.
92. WANG, J.H. i DESAI, R. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 926-932.
93. WANG, J.H. i DESAI, R. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4175-4184.
94. DUMLER, I.L. i ETINGOF, F.N. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 429, 461-474.
95. SHARMA, R.K., WIRCH, E. i WANG, J.H. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3575-3580.
96. LOTEN, E.G. i SNEYD, J.G.T. (1970) *Biochem. J.* 120, 187-193.
97. THOMPSON, W.J., LITTLE, S.A. i WILLIAMS, R.H. (1973) *Biochemistry* 12, 1889-1894.
98. MANGANIELLO, V. i VAUGHAM, M. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7164-7170.
99. ZINMAN, B. i HOLLENBERG, C.H. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2182-2187.
100. KONO, T., ROBINSON, F.W. i SARVER, J.A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7826-7835.
101. PAWLSON, L.G., LOVELL-SMITH, C.J., MANGANIELLO, V. i VAUGHAM, M. (1974) *Proc. Nalt. Acad. Sci. USA.* 71, 1639-1642.

102. ALLAN, E.H. i SNEYD, J.G.T. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 62, 594-601.
103. CHEUNG, W.Y. (1967) *Biochemistry* 6, 1079-1087.
104. HUANG, Y.C. i KEMP, R.C. (1971) *Biochemistry* 10, 2278-2283.
105. APPLEMAN, M.M. i KEMP, G. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 564-568.
106. DALTON, C., QUINN, J.B., BURGHARDT, C.R. i SHEPPARD, H. (1970) *J. Pharm. Exptl. Theor.* 173, 270-276.
107. KUMON, A., YAMAMURA, H. i NISHIZUKA, Y. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1290-1297.
108. TAO, M. SALAS, M.L. i LIPMANN, F. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 67, 408-414.
109. GILL, G.N. i GARREN, L.D. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 786-790.
110. KREBS, E.G., GRAVES, D.J. i FISHER, E.H. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 2867-2873.
111. ROSELL PÉREZ, M. i LARNER, J. (1964) *Biochemistry* 3, 81-88.
112. APPLEMAN, M.M., BIRNBAUMER, L. i TORRES, H.N. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 39-43.
113. SODERLING, T.B., HICKENBOTTOM, J.P., REIMAN, E.H., HUNKELER F.L. WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1970) *J. Biol. Chem.* 245. 6317-6328.
114. LANGAN, T.A. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64, 1276-1283.
115. CORBIN, J.D. i KREBS, E.G. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 328-336.
116. MIYAMOTO, E., KUO, J.F. i GREENGARD, P. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 305-312.
117. KOU, J.F. i GREENGARD, P. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64, 1349-1355.
118. CHEN, L.J. i WALSH, D.A. (1971) *Biochemistry* 10, 3614-3620.

119. MAENO, H., JOHNSON, E.M. i GREENGARD, P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 134-142.
120. LEMAIRE, S. PELLETIER, G. i LABRIE, F. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7303-7310.
121. FORTE, L.R., CHAO, W.T.H., WALKENBACK, R.J. i BYINGTON, K.H. (1972) Biochem, Biophys. Res. Commun. 49, 1510-1517.
122. WRAY, H.L., GRAY, R.R. i OLSSON, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1469-1498.
123. HOFMANN, F., BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J. i KREBS, E.W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7795-7801.
124. CORBIN, J.D., KEELEY, S.L. i PARK, C.R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 218-225.
125. BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J. i KREBS, E.G. (1974) "Methods in Enzymology" vol. 38 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 299-308.
126. RUBIN, C.S., ERLICHMAN, J. i ROSEN, O.M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 36-44.
127. RUBIN, C.S., ERLICHMAN, J. i ROSEN, O.M. (1974) "Methods in Enzymology" vol. 38 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY., pp. 308-315.
128. ROSEN, O.M., RUBIN, C.S. i ERLICHMAN, J. (1973) "Miami.. Winter Simposia" vol. 5 (F. Huijing i E.Y.C. Lee editors) Academic Press, NY.,
129. CORBIN, J.D., SUDGEN, P.H., West, L. FLOCKHART, D.A., LINCOLN, T.M. i MCCARTHY, D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 3997-4003.
130. BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J. i KREBS, E.G. (1975) "Adv. in Ciel. Nucl. Res." vol. 5 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 241-251.
131. ERLICHMAN, J., RUBIN, C.S. i ROSEN, O.M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7607-7609.
132. ROSEN, O.M..i ERLICHMAN, J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7786-7794.
133. ERLICHMAN, J., ROSENFELD, R. i ROSEN, O.M. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5000-5003.

134. SHIZUTA, Y., BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J., HOFMANN, F. i KREBS, E.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6891-6896.
135. YAMAMURA, N., KUMON, A., NISHIYAMA, K., TAKEDA, M. i NISHIZUTA, Y. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1560-1566.
136. KUMON, A., NISHIYAMA, K., YAMAMURA, H. i NISHIZUTA, Y. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3726-3735.
137. GRANNER, D. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 165, 359-368.
138. EIL, C. i WOOL, I.G. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1001-1009.
139. YAMAMURA, M., NISHIYAMA, K. SHIMOMURA, R. i NISHIZUTA, Y. (1973) Biochemistry 12, 856-862.
140. CORBIN, J.D. i BROSTROM, C.O. (1971) Fed. Proc. 30 :1089.
141. BECHTEL, P.J., BEAVO, J.A., HOFMANN, F., DILLS, W.L. i KREBS, E.G. (1976) Fed. Proc. 34:617.
142. FLEISCHER, N., ROSEN, O.M. i REICHLIN, M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 54-58.
143. LANGAN, T.A. (1968) Science 162, 579-581.
144. MIYAMOTO, E., KUO, G.F. i GREENGARD, P. (1969) Science 163, 63-65.
145. SCHLENDER, K.K., WEI, S.H. i VILLAR PALASÍ, C. (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 272-278.
146. LANGAN, T.A. (1973) "Adv. in Cycl. Nucl. Res." vol. 3 (P. Greengar i G.A. Robison editors) Raven Press, NY. pp. 99-153.
147. COHEN, P., WATSON, D.C. i DIXON, G.H. (1975) Eur. J. Biochem. 51, 79-92.
148. BYLUND, S. i KREBS, E.G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6355-6361.
149. HUMBLE, E., BEGLUND, L., TITANJI, V., LJUNGSTROM, O., EDLUND, B., ZETTERQVIST, O. i ENGSTROM, L. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 614-621.
150. DAILE, P. i CARNEGIE, P.R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 852-858.

152. LANGAN, T.A. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 64, 1276-1283.
153. LANGAN, T.A. (1971) *Ann NY Acad. Sci.* 185, 166-180.
153. YEAMAN, S.J. i COHEN, P. (1975) *Eur. J. Biochem.* 51, 93-104.
154. KEMP, B.E., BYLUND, D.B., HUANG, T.-S. i KREBS, E.G. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 3448-3452.
155. HJELMQVIST, G., ANDERSON, J. EDLUND, B. i ENGSTROM, L. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 559-563.
156. EDLUND, B., ANDERSON, J., TITANJI, V., DAHLQVIST, U., EKMAN, P. ZETTERQVIST, O. i ENGSTROM, L. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 1516-1521.
157. DAILE, P., CARNEGIE, P.R. i YOUNG, J.D. (1975) *Nature (London)* 257, 416-418.
158. YEAMAN, S.J., COHEN, P., WATSON, D.C. i DIXON, G. (1977) *Biochem. J.* 162, 411-421.
159. WALSH, D.A., ASHBY, C.D., GONZALEZ, C., CALKINS, D., FISHER, E.H. i KREBS, E.G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1977-1985.
160. SODERLING, T.R., CORBIN, J.D. i PARK, C.R. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1822-1829.
161. MEANS, A.R., MACDOUGALL, E., SODERLING, T.R. i CORBIN, J.D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1231-1238.
162. TAKEDA, M. i OHGA, Y. (1973) *J. Biochem. (Tokyo)* 73, 621-629.
163. SUDILOVSKY, O. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58, 85-91.
164. BYUS, C.V., COSTA, M., SIPES, I.G., BRODIE, B.B. i RUSSELL, D.H. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 1241-1245.
165. RICHARDSON, M.C. i SCHLUSTER, D. (1973) *Biochem. J.* 136, 993-998.
166. COSTA, E., KUROSAWA, A. i GUIDOTTI, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 1058-1062.

167. SPAULING, S.V. i BUROW, G?N. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 386-391.
168. FIELD, J.B., BLOOM, G., KERINS, M.E., CHAYOTH, R. i ZOR, U. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4903-4910.
169. JEFFERSON, L.S., EXTON, J.H., BUCHTER, R.W., SUTHERLAND, E.W. i PARK, C.R. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1031-1038.
170. LARNER, J. i VILLAR PALASÍ, C. (1971) "Curr. Tops. Cell Regul." vol. 3 (B.L. Horecker i E.R. Stadtman editors) Academic Press, NY., pp. 195-236.
171. CORBIN, J.D., SUDGEN, P.H., LINCOLN, T.M. i KEELY, S.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3854-3861.
172. SODERLING, T.R. i PARK, C.R. (1974) "Adv. in Ciel. Nucl. Res." vol. 4 (P.Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 283-333.
173. SWILLENS, S., VAN CAUTER, E. i DUMONT, J.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 364, 250-259.
174. BEAVO, J.A., BECHTEL, P.J. i KREBS, E.G. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 3580-3583.
175. POSNER, J.B., HAMMERMEISTER, K.E., BRATVOLD, G.E. i KREBS, E.G. (1964) *Biochemistry* 3, 1040-1044.
176. WALSH, D.A. i ASHBY, C.D. (1973) *Recent Progr. Horm. Res.* 29, 329-359.
177. ASHBY, C.D. i WALSH, D.A. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6637-6642.
178. ASHBY, C.D. i WALSH, D.A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1255-1261.
179. RANGER-ALDAO, R. i ROSEN, O.M. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3375-3380.
180. RANGER-ALDAO, R. i ROSEN, O.M. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7740-7745.
181. KNIGHT, B.L. (1975) *Biochem. J.* 152, 577-582.
182. KREBS, E.G. i FISHER, E.H. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* 20, 150-157.
183. KREBS, E.G., KENT, A.B. i FISHER, E.H. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 73-83.

184. FISHER, E.H., HURD, S.S., KOH, P.; SEERY, V.L. i TELLER, D.C. (1968) "Control of Glycogen Metabolism" (W.J. Whelan editor) Academic Press, NY.,
185. COHEN, P. (1973) Eur. J. Biochem. 34, 1-14.
186. FRIEDMAN, D.L. i LARNER, J. (1965) Biochemistry 4, 2261-2264.
187. APPLEMAN, M.M., KREBS, E.G. i FISHER, E.H. (1966) Biochemistry 5, 2101-2107.
188. COHEN, P. (1974) Bioch. Soc. Symp. 39, 51-73.
189. JENNISEN, H. P. i HEILMEYER, L.M.G. (1974) FEBS Lett. 42, 77-80.
190. BURCHELL, A. COHEN, P.T.W. i COHEN, P. (1976) FEBS Lett. 67, 17-22.
191. BROSTROM, C.O., HUNKELER, F.L. i KREBS, E.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1961-1967.
192. DE LANGE, R.J., KEMP, R.G., RILEY, W.D., COOPER, R. A. i KREBS, E.G. (1968) J. Biol. Chem. 243, 2200-2208.
193. WALSH, D.A., PERKINS, J.P., BROSTROM, C.O., HO, E. i KREBS, E.G. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1968-1976.
194. HAYAKAWA, T., PERKINS, J.P. i KREBS, E.G. (1973) Biochemistry 12, 574-580.
195. COHEN, P. i ANTONIW, J.F. (1973) FEBS Lett. 34, 43-47.
196. KISHIMOTO, A. Takai, Y. i NISHIZUTA, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7449-7452.
197. INOUE, M. KISHIMOTO, A. TAKAI, Y. i NISHIZUTA, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7610-7616.
198. WANG, J.H., STULL, J.T., HUANG, T.H. i KREBS, E.G. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4521-4527.
199. MEYER, W.L., FISHER, E.H. i KREBS, E.G. (1964) Biochemistry 3, 1033-1039.
200. KREBS, E.G., HUTSON, R.B. i HUNKELER, F.L. (1968) "Adv. in Enz. Regulat." 6, 245-255.
201. HUTSON, R.B. i KREBS, E.G. (1968) Biochemistry 7, 2116-2122.

202. HEILMEYER, L.M.G., MEYER, F., HASCHKE, R.H. i FISHER, E.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6649-6656.
203. ANTONIW, J.F. i COHEN, P. (1976) Eur. J. Biochem. 68, 45-54.
204. VANDENHEEDE, J.R., KEPPENS, S. i DE WULF, H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 481, 463-470.
205. SHIMAZU, T. i AMAKAWA, A. (1975) Biochim. Biophys. Acta 385, 242-256.
206. KHOO, J.C. i STEINBERG, D. (1975) FEBS Lett. 57, 68-72.
207. VANDENHEEDE, J.R., KEPPENS, S. i DE WULF, H. (1976) FEBS Lett. 61, 213-217.
208. VAN DE WERVE, G., HUE, L. i HERS, H.G. (1977) Biochem. J. 162, 135-142.
209. KEPPENS, S. VANDENHEEDE, J.R. i DE WULF, H. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 448-457.
210. ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F.D., BLACKMORE, P.F. i EXTON, J.H. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2662-2669.
211. FODEN, S. i RANDLE, P.J. (1978) Biochem. J. 170, 615-525.
212. GREEN, A.A. i CORI, G.T. (1943) J. Biol. Chem. 151, 21-29.
213. CORI, C.F. i CORI, G.T. (1945) J. Biol. Chem. 158, 341-345.
214. CORI, G.T. i GREEN, A.A. (1943) J. Biol. Chem 151, 31-38.
215. GRAVES, D.J., FISHER, E.H. i KREBS, E.G. (1960) J. Biol. Chem. 235, 805-809.
216. KELLER, P.J. i CORI, G.T. (1953) Biochim, Biophys. Acta 12, 235.
217. KELLER, P.J. i CORI, G.T. (1955) J. Biol. Chem. 214, 127-134.
218. MADSEN, N.B. (1964) Biochim. Biophys. Res. Commun. 15, 390-395.
219. DAMJANOVICH, S. i KLEPPE, K. (1966) Biochim. Biophys. Acta 122, 145.
220. KASTENSCHMIDT, L.L., KASTENSCHMIDT, J. i HELMREICH, E. (1968) Biochemistry 7, 4543.

221. HELMREICH, E., MICHAELIDES, M.C. i CORI, C.F. (1967) Biochemistry 6, 3695-3710.
222. GOLD, A.M., JOHNSON, R.M. i TSENG, J.K. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2564-2572.
223. HUGHES, R.C., YUNIS, A.A., KREBS, E.G. i FISHER, E.H. (1962) J. Biol. Chem. 237, 40.
224. NOLAN, C., NOVOA, W.B. i KREBS, E.G. (1966) Biochemistry 5, 542-551.
225. SEVILLA, C.L. i FISHER, E.H. (1968) Biochemistry 7, 2161.
226. WOLF, D.P., FISHER, E.H. i KREBS, E.G. (1970) Biochemistry 9, 1923-1929.
227. TABATABAI, L.B. i GRAVES, D.J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2196-2203.
228. FISHER, E.H., HEILMEYER, L.M.G. i HASHKE, R.H. (1971) "Curr. Tops. in Cell. Regulat." vol. 4 (B.L. Horecker i E.R. Stadtmen editors) Academic Press, NY., pp. 211-251.
229. FISHER, E.H., GRAVES, D.J., CRITTENDEN, E.R. i KREBS, E.G. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1698-1704.
230. CORI, C.F. i ILLINGWORTH, B. (1957) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 43, 547.
231. ENGERS, H.D. i MADSEN, N.B. (1968) Biochim. Biophys. Res. Commun. 33, 49.
232. CORI, C.F., CORI, G.T. i GREEN, A.A. (1943) J. Biol. Chem. 151, 39-55.
233. CORI, G.T. (1945) J. Biol. Chem. 158, 333.
234. KARPATKIN, S., HELMREICH, E. i CORI, C.F. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3139.
235. HELMREICH, E. i CORI, C.F. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 51, 131-138.
236. LOWRY, H.O., PASSONNEAU, J.V., HASSELBERGER, F.X. i SCHULZ, D.W., (1964) J. Biol. Chem. 239, 18.
237. MADSEN, N.B. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 310.
238. PARMEGGIANI, A. i MORGAN, H.E. (1962) Biochim. Biophys, Res. Commun. 9, 252.

239. HOLMES, P.A. i MANSOUR, T.E. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 156, 275-284.
240. GRAVES, D.J., HUANG, C.Y. i MANN, S.A. (1968) "Control of Glycogen Metabolism" (W.J. Whelan editor) Universitetsforlaget, Oslo, pp. 35-47.
241. HELMREICH, E. i CORI, C.F. (1965) "Adv. in Enz. Regulat." vol. 3, 91.
242. CHILDRESS, C.C. i SACKTOR, B. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2927.
243. KIPNIS, D.H., HELMREICH, E. i CORI, C.F. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 165-170.
244. NAKAI, C. i THOMAS, J.A. (1974) *J. Biol. Chem.* 6459-6467.
245. ANTONIW, J.F., NIMMO, H.G., YEAMAN, S.J. i COHEN, P. (1977) *Bioch. J.* 162, 423-433.
246. COHEN, P., NIMMO, G.A. i ANTONIW, J.F. (1977) *Biochem. J.* 162, 435-444.
247. GEGERLY, P. i BOT, G. (1977) *FEBS Lett.* 82, 269-272.
248. RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1962) "METHODS in Enzymol." vol. 5 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press NY., pp. 337-391.
249. KILLILEA, S.D., BRANDT, H., LEE, E.Y.C. i WHELAN, W.J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2363-2368.
250. KHANDELWAL, R.L., VANDENHEEDE, J.R. i KREBS, E.G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4850-4858.
251. DE WULF, H., STALMANS, W. i HERS, H.G. (1969) *Arch. Intern. Physiol. Biochem.* 77:961.
252. STALMANS, W., LALOUX, M. i HERS, H.G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 49, 415-427.
253. STALMANS, W., DE WULF, H. i HERS, H.G. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 582-597.
254. STALMANS, W., DE WULF, H., LEDERER, B. i HERS, H.G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 15, 9-12.
255. NIMMO, H.G., PROUD, C.G. i COHEN, P. (1976) *Eur. J. Biochem.* 68, 31-44.

256. HUANG, K.P., HUANG, F.L., GLINSMANN, W.H. i ROBINSON, J. C. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 173, 162-170.
257. SODERLING, T.R., JETT, M.F., HUTSON, N.J. i KATHRA, B.S. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7517-7524.
258. BROWN, J.H., THOMPSON, B. i MAYER, S.E. (1977) Biochemistry 16, 5501-5508.
259. LELOIR, L.F. i CARDINI, C.E. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 6340-6341.
260. LIN, D.C. i SEGAL, H.L. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7007-7011.
261. McVERRY, P. i KIM, K.-H. (1974) Biochemistry 13, 3505-3511.
262. HUANG, K.P. i CABIB, E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3851-3857.
263. LIN, D.C., SEGAL, H.L. i MASSARO, E.J. (1972) Biochemistry 11, 4466-4471.
264. ISSA, H.A. i MENDICINO, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 685-696.
265. MILLER, R.E., MILLER, E.A., FREDHOLM, B., YELLIN, J.B., EICHNER, R.D., MAYER, S.E. i STEINBERG, D. (1975) Biochemistry 14, 2481-2488.
266. PASSONNEAU, J.V., SCHWARTZ, J.P. i ROTTENBERG, D.A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 2287-2292.
267. PLESNER, L., PLESNER, I.W. i ESMANN, V. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1119-1125.
268. SODERLING, T.B., HICKENBOTTOM, J.P., REIMANN, E.M., HUNKELER, F.L., WALSH, D.A. i KREBS, E.G. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6317-6328.
269. TAKEDA, Y., BREWER, H.B. i LARNER, J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8943-8950.
270. SODERLING, T.R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4359-4364.
271. BROWN, N.E. i LARNER, J. (1971) Biochim. Biophys. Acta 242, 69-80.
272. VILLAR PALASÍ, C. i LARNER, J. (1960) Biochim. Biophys. Acta 390, 171-173.

273. PIRAS, R., ROTHMAN, L.B. i CABIB, E. (1968) *Biochemistry* 7, 56-66.
274. ROACH, P.J. i LARNAR, J. (1976) *Trends in Bioch. Sci.* 1 110-112,
275. STALMANS, W. i HERS, H.G. (1973) "The Enzymes" 3 ed. vol. (P. Boyer editor) Academic Press, NY., pp. 309-361.
276. ROACH, P.J. i LARNER, J. (1977) *Mol. Cell. Biochem* 15, 179-200.
277. PIRAS, R., ROTHMAN, L.B. i CABIB, E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 54.
278. PIRAS, R., ROTHMAN, L.B. i CABIB, E. (1968) *Biochemistry* 7, 56-66.
279. GOLD, A.H. (1970) *Biochemistry* 9, 946-952.
280. ROSELL PÉREZ, M. i LARNER, J. (1964) *Biochemistry* 3, 74-81.
281. NAKAI, C. i THOMAS, J.A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4081-4086.
282. HUANG, K.P., CHEUNG, C.H.J. i ROBINSON, J.C. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2596-2603.
283. SCHLENDER, K.K. (1969) *Fed. Proc.* 28:875.
284. THOMAS, J.A. i LARNER, J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 62-72.
285. SCHLENDER, K.K. i LARNER, J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 73-83.
286. ROSELL PÉREZ, M. i VILLAR PALASÍ, C. (1964) *Rev. Esp. Fisiol.* 20, 131-140.
287. MERSMAN, H.S. i SEGAL, H.L. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 58, 1688-1695.
288. DE WULF, H., STALMANS, W. i HERS, H.G. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 545-551.
289. ROACH, P.J. i LARNER, J. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1920-1925.
290. SMITH, C.H., BROWN, N.E. i LARNER, J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.*

291. TAKEDA, Y. i LARNER, J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8951-8956.
292. ROACH, P.J., TAKEDA, Y. i LARNER, J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1913-1919.
293. SODERLING, T.R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5407-5412.
294. LARNER, J., VILLAR PALASÍ, C. i BROWN, N.E. (1969) Biochim. Biophys. Acta 178, 470-479.
295. BELOCOPITOW, E., APPLEMAN, M.M. i TORRES, H.N. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3473-3478.
296. BELOCOPITOW, E., FERNÁNDEZ, M.C., BIRNBAUMER, L. i TORRES H.N. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1227-1231.
297. ZIEVE, F.J. i GLINSMANN, W.H. (1973) Biochim. Biophys. Res. Commun. 50, 872-878.
298. BRANDT, H., CAPULONG, Z.L. i LEE, E.Y.C. (1974) Biochim. Biophys. Res. Commun. 61, 548-554.
299. KIKUCHI, K., TAMURA, S., HIRAGA, A. i TSUIKI, S. (1977) Biochim. Biophys. Res. Commun. 75, 29-37.
300. HUTSON, N.J., KATHRA, B.S., i SODERLING, T.R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2540-2545.
301. LEE, E.Y.C., BRANDT, H., CAPULONG, Z.L. i KILLILEA, S.D. (1976) Rec. Adv. in Enzymol. 14, 467-490.
302. HUANG, T.-S. i KREBS, E.G. (1977) Biochim. Biophys. Res. Commun. 75, 643-650.
303. APPLEMAN, M.M., BELOCOPITOW, E. i TORRES, H.N. (1964) Biochim. Biophys. Acta 140, 550-554.
304. HURD, S.S., NOVA, W.B., HICKENBOTTOM, J.P. i FISHER, E.H. (1966) "Methods in Enzymology" vol. 8 (S.P. Colowick i N. O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 546-550.
305. KATO, K. i BISHOP, J.S. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7420-7429.
306. LALOUX, M. i STALMANS, W. (1974) citat per W. Stalmans a "Curr. Tops. in Enz. Regulat." vol.11 (B.L. Horecker i E.R. Stadtman editors) Academic Press, NY. pp. 51-98.
307. MERVELEDE, W., DEFREYN, G., GORIS, G., KALALA, L.R. i ROOSENMONT, J. (1976) Arch. Intern. Physiol. Biochim. 84, 359-423.

308. DEVOS, P. I HERS, H.G. (1974) *Biochem. J.* 140, 331-340.
309. BABA, T. i TSUIKI, S. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 419-430.
310. BRANDT, H., KILLILEA, S.D. i LEE, E.Y.C. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 598-604.
311. BRANDT, H., LEE, E.Y.C. i KILLILEA, S.D. (1975) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 63, 950-956.
312. HUANG, F.L. i GLINSMANN, W.H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 3004-3008.
313. COHEN, P., RILATT, D.B. i NIMMO, G.A. (1977) *FEBS Lett.* 76, 182-186.
314. HUANG, F.L. i GLINSMANN, W.H. (1976) *FEBS Lett.* 62, 326-329.
315. HUANG, F.L. i GLINSMANN, W.H. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 419-426.
316. NIMMO, G.A. i COHEN, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 341-351.
317. NIMMO, G.A. i COHEN, P. (1978) *Eur. J. Biochem.* 87, 353-365.
318. KHANDELWAL, R.L. i ZINMAN, S.M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 560-565.
319. LARNER, J., VILLAR PALASÍ, C., GOLDBERG, N.D., BISHOP, J. S., HUIJING, F., WENGER, J.F., SASKO, H. i BROWN, N.B. (1968) "Control of Glycogen Metabolism" (W.J. Whelan editor) Universitetsforlaget, Oslo,
320. SUTHERLAND, E.W. (1951) "Phosphorous Metabolism" vol.1, (McElroy, W.D. i B. Glass editors) John Hopkins Press, Baltimore, pp. 3
321. MARTENSEN, T.M., BROTHERTON, J.E. i GROVES, D.J. (1973) *J Biol. Chem.* 248, 8329-8336.
322. BOT, G. i DOSA, I. (1971) *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 6, 73-87.
323. HIZURKURI, S. i TAKEDA, Y. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 212, 179-181.

324. LAWRENCE, J.C. i LARNER, J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2104-2113.
325. WANG, P., BANTLE, G. i SORENSEN, N.B. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 436-447.
326. DE WULF, H. i HERS, H.G. (1969) Eur. J. Biochem. 6, 558-564.
327. VILLAR PALASÍ, C., GOLDBERG, N.D., BISHOP, J.S., NUTTALL, F.Q., SCHLENDER, K.K. i LARNER, J. (1970) "Biogenic Amines as Physiol. Regul." (J.J. Blume ed.) pp. 161-180
328. RALL, T.W., SUTHERLAND, E.W. i BERTHED, J. (1957) J. Biol. Chem. 224, 463-475.
329. BISHOP, J.S. i LARNER, J. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1354-1356.
330. WAGLE, S.R. i INGEBRETSEN, W.R., Jr. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 125-129.
331. SEGLEN, P.O. (1973) FEBS Lett. 36, 309-312.
332. HEMS, D.A., RODRIGUES, L.M. i WHITTON, P.D. (1976) Bioch. J. 160, 367-374.
333. STUBBS, M., KIRK, C.J. i HEMS, D.A. (1976) FEBS, Lett. 69 199-202.
334. KIRK, C.J. i HEMS, D.A. (1974) FEBS Lett. 47, 128-131.
335. WHITTON, P.D. i HEMS, D.A. (1976) Biochem. Pharmacol. 25, 405.
336. MOXLEY, M.A., BELL, N.H., WAGLE, S.R., ALLEN, D.O. i ASHMORE, J. (1974) Am. J. Physiol. 227, 1058.
337. HEMS, D.A., HARMON, C.S. i WHITTON, P.D. (1975) FEBS Lett 58, 167-169.
338. CHERRINGTON, A.D., ASSIMACOPOULOS, F.D., HARPER, S.C., CORBIN, J.D., PARK, C.R. i EXTON, J.H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2509-2518.
339. FAIN, J.N. (1973) Pharmacol. Rev. 25, 68-118.
340. SHERLINE, P., LYNCH, A. i GLINSMANN, W.H. (1972) Endocrin 91, 680-690.
341. MAKMAN, M.H., i SUTHERLAND, E.W. (1964) Endocrinol. 75, 127.

342. JOHNSON, M.E.M., DAS, N.M., BUTCHER, F.R. i FAIN, J.N.
(1972) J. Biol. Chem. 247, 3229-3235.
343. BOURNE, H.R., TOMKINS, G.M. i DION, S. (1973) Science
181, 952-954.
344. SENFT, S., SCHULTZ, G., MUNSKE, K. i HOFFMAN, M. (1968)
Diabetologia 4, 322-329.
345. HOUSE, P.D.R., POULIS, P. i WEIDEMANN, M.J. (1971) Eur.
J. Biochem. 24, 429-437.
346. GILBOE, D.P. i NUTTALL, F.Q. (1978) J. Biol. Chem. 253,
4078-4081.
347. OKAJIMA, F. i UI, M. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 175,
549-557.
348. FRIEDMAN, N. (1976) Biocem. Biophys. Acta 428, 495.
349. TOLBERT, M.E.M., BUTCHER, F.R. i FAIN, J.N. (1973) J.
Biol. Chem. 248, 5686-5692.
350. FAIN, J.N., TOLBERT, M.E.M., POINTER, R.H., BUTCHER, F.R.
i ARNOLD, A. (1975) Metabolism 24, 395-407.
351. BIRNBAUM, M.J. i FAIN, J.N. (1977) J. Biol. Chem. 252,
528-535.
352. KEPPENS, S. i DE WULF, H. (1976) FEBS Lett. 68, 279-282.
353. POINTER, R.H., BUTCHER, F.R. i FAIN, J.N. (1976) J. Biol.
Chem. 251, 2987-2992.
354. PILKIS, S.J., CLAUS, T.H., JOHNSON, R.A. i PARK, C.R.
(1975) J. Biol. Chem. 250, 6328-6336.
355. STEINER, D.F., RAUDA, V. i WILLIAMS, R.H. (1961) J. Biol.
Chem. 236, 299-304.
356. GOLD, A.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 903-905.
357. WAGLE, S.R., INGEBRETSEN, W.R. i SAMPSON, L. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 937-943.
358. HAFT, D.E. i MILLER, L.L. (1958) Amer. J. Physiol. 192,
33-42.
359. MORTIMORE, G.E. (1963) Amer. J. Physiol. 204, 699-704.
360. SÖLING, H.D., KNEER, P., DRAGERT, W. i CREUTZFELDT, W.
(1966) Diabetologia 2, 32-44.

361. HEMS, D.A. (1977) Trends in Bioch. Sci. 2, 241-244.
362. KHOO, J.C., STEINBERG, D., THOMPSON, B. i MAYER, S.E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3823-3830.
363. STEINBERG, D. MAYER, S.E., KHOO, J.C., MILLER, E.A., MILLER, R.E., FREDHOLM, B. i EICHNER, R. (1975) "Adv. in Cícl. Nucl. Res." vol. 5 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 549-568.
364. MILLER, T.B. i LARNAR, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3483-3488.
365. GLINSMANN, W.H., PAUK, G. i HERN, E.P. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 774-782.
366. BUSCHIAZZO, H., EXTON, J.H. i PARK, C.R. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 65, 383-387.
367. AKPAN, J.O., GARDNER, R. i WAGLE, S.R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 222-229.
368. WITTERS, L.A., ALBERICO, L. i AVRUCH, J. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 997-1003.
369. WITTERS, L.A. i AVRUCH, J. (1978) Biochemistry 17, 406-410.
370. HUE, L., BONTEMPS, F. i HARS, H.G. (1975) Biochem. J. 152, 105-114.
371. BUCHTER, R.W., SNEYD, J.G.T., PARK, C.R. i SUTHERLAND, E.W. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1651-1653.
372. EXTON, J.H., HARDMAN, J.G., WILLIAMS, T.F., SUTHERLAND, E.W. i PARK, C.R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2658-2664.
373. EXTON, J.H., Lewis, S.B., HO, R.J., ROBISON, G.A. i PARK, C.R. (1971) Ann. NY Acad. Sci, 185, 85-100.
374. JUNGAS, R.L. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56, 757.
375. EXTON, J.H. i PARK, C.R. (1972) "Handbook of Physiology" The Amer. Physiol. Soc., Washington DC., pp. 437-455.
376. ILLIANO, G. i CUATRECASAS, P. (1972) Science 175, 906-908.
377. HEPP, D.K. i RENNER, R. (1972) FEBS Lett. 20, 191-194.
378. KISS, Z. (1978) FEBS Lett. 92, 29-32.

379. HOUSE, P.D.R. i WEIDEMANN, M.J. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 41, 541.
380. CUATRECASAS, P., DEBUSQOIS, B. i KRUG, F. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 333-339.
381. FREYCHET, P., ROTH, J. i NEVILLE, D.H. (1971) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 43, 400-408.
382. FREYCHET, P., ROTH, J. i NEVILLE, D.M. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 1833.
383. JACOBS, S., SHECHTER, Y., BISELL, K. i CUATRECASAS, P. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77, 981-988.
384. CUATRECASAS, P. (1973) *Fed. Proc.* 32, 1838-1846.
385. LEESON, T.S. i LEESON, C.R. (1970) "Histology", W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 332.
386. FAQUMAR, M.G. i PALADE, G.E. (1963) *J. Cell Biol.* 17, 375.
387. ANDERSON, N.G. (1953) *Science* 117, 627.
388. KALTENBACH, J.P. (1954) *Exptl. Cell Res.* 7, 568.
389. LONGMUIR, I.S. i REES, W.A. (1956) *Nature (London)* 117, 997.
390. BRANSTER, M.V. i MORTON, R.K. (1957) *Nature (London)* 180, 1283.
391. JACOB, S.T. i BHARGAVA (1962) *Exptl. Cell Res.* 27, 453.
392. BERRY, M.N. i SIMPSON, F.O. (1962) *J. Cell Biol.* 15, 9.
393. BERRY, M.N. (1962) *J. Cell Biol.* 15, 1.
394. LAWS, J.O. i STICKLAND, L.H. (1956) *Nature (London)* 178, 309.
395. HOWARD, R.B., CHRISTENSEN, A.K., GIBBS, F.A. i PESCH, L.A. (1967) *J. Cell Biol.* 35, 675.
396. HOWARD, R.B. i PESCH, L.A. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3105-3109.
397. BERRY, M.N. i FRIEND, D.S. (1969) *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
398. INGEBRETSEN, W.R., Jr. i WAGLE, S.R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 403-410.
399. WAGLE, S.R. i INGEBRETSEN, W.R., Jr. (1975) "Methods in Enzymol" vol.35 (P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY., pp. 579-594.

400. CHRISTOFFERSEN, T. i BERG, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 338, 408-417.
401. HANKS, J.H. i WALLACE, R.E. (1949) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 196.
402. ZAHLTEN, R.N. i STRATMAN, F.W. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 600-608.
403. WILSON, M.E., STOWELL, R.E., YOKOHAMA, H.O. i TSUBOL, K. K. (1953) *Cancer Res.* 13, 86-92.
404. LINDER, M.C. i MUNRO, H.N. (1973) *Amer. J. Pathol.* 72, 263-282.
405. KESSLER, M. i SCHIBOTZ, R. (1968) "Stoffwechsel der Isoliert Perfundiertenn Lebe" (W. Staib i R. Scholz editors) Springer-Verlag, Berlin, pp. 12-20.
406. SEGLEN, P.O. (1973) *Exptl. Cell Res.* 76, 25.
407. BERRY, M.N. (1974) "Methods in Enzymol." vol.32 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 625-532.
408. SEGLEN, P.O. (1972) *Exptl. Cell Res.* 74, 450.
409. SEGLEN, P.O. (1973) *Exptl. Cell Res.* 82, 391.
410. HENLEY, K.S. i SORENSEN, O. (1959) *Fed. Proc.* 18:245.
411. ZAHLTEN, R.N., STRATMAN, F.W. i LARDY, H.A. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70, 3213-3218.
412. SIESS, E.A. i WIELAND, O.H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 323-330.
413. ELLIOT, K.R.F. (1976) *FEBS Lett.* 64, 62-64.
414. THOMAS, J.A., SCHLENDER, K.K. i LARNAR, J. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 486-499.
415. GILBOE, D.P., LARSON, K.L. i NUTTALL, F.Q. (1972) *Anal. Biochem.* 47, 20-27.
416. GUINOVART, J.J., LAWRENCE, J.C., Jr. i LARNER, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 539, 181-194.
417. DAVIS, B.M. (1964) *Ann. NY. Acad. Sci.* 121, 404.
418. HIRSCH, A. i ROSEN, O.M. (1974) *Anal. Biochem.* 60, 389-394.
419. HEDRICK, J.L. i SMITH, A.J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-164.

420. WREBER, K. i OSBORN, M. (1969) J. Biol. Chem, 244, 4406-4412.
421. FAIN, J.N. (1975) "Methods in Enzymol." vol.35 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 555-561.
422. LAWRENCE, J.C., Jr., GUINOVART, J.J. i LARNER, J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 444-450.
423. WINEGRAD, A.I. i RENOLD, A.E. (1958) J. Biol. Chem. 233, 267-272.
424. KATZ, J., LANDAU, B.R. i BARTSCH, G.E. (1966) J. Biol. Chem. 241, 727-740.
425. CZECH, M.P., LAWRENCE, J.C., Jr. i LYNN, W.S. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1001-1006.
426. RODBELL, M. (1964) J. Biol. Chem. 239, 375-380.
427. GILMAN, A.G. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67, 305-312.
428. ITARTE, E. (1975) Tesi Doctoral, Fac. Farmàcia, Univ. Barcelona
429. CASTIÑEIRAS, M.J. (1976) Tesi Doctoral, Fac Farmàcia, Univ. Barcelona.
430. LAYNE, E. (1957) "Methods in Enzymol." vol.3 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 450.
431. GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.S. i DAVID, H.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751.
432. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. i RANDALL, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
433. CARROLL, N.V., LONGLEY, R.W. i ROE, J.H. (1956) J. Biol. Chem. 220, 583-593.
434. KREBS, E.G., LOVE, D.S., BRATVOLD, G.E., TRAYLER, K.A., MEYER, W.L. i FISHER, E.H. (1964) Biochemistry 3, 1022-1033.
435. KREBS, E.G. (1966) "Methods in Enzymol." vol.8 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 543-546.

436. POST, R.L. i SEN, A.K. (1967) "Methods in Enzymol." vol. 10 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY., pp. 773-776.
437. GLYNN, I.M. i CHAPPEL, J.B. (1964) Biochem. J. 90, 147-149.
438. HUGHES, E.L. i DINTZIS, H.M. (1964) J. Biol. Chem. 239, 845.
439. JAENICKE, R. i KNOF, S. (1968) Eur. J. Biochem. 4, 157-163.
440. PESCE, A., FONDY, T.P., STOLZENBACH, F. i KAPLAN, N.O. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2151-2167.
441. SCHWERT, G.W. i WINER, A.D. (1965) "The Enzymes" vol.7 (P.D. Boyer, H. Lardy i K. Myrbäck editors) Academic Press, NY., pp. 127
442. WREBER, K., PRINGLE, J.R. i OSBORN, M. (1972) "Methods in Enzymol." vol. 26 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY., pp. 3-27.
443. LONGMORE, W.J., NIETHE, L.M. i McDANIEL, M.L. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6451-6457.
444. HÖSTMARK, A.T. (1973) Acta Physiol. Scand, 88, 248-255.
445. MILLER, T.B. (1978) Amer. J. Physiol. 234, E13-E19.
446. DAOUST, R. (1958) "LiverFunction" (R.W. Brauer editor) Amer. Inst. Biol. Sci., Washington DC., p.3.
447. RALL, T.W. i SUTHERLAND, E.W. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1065.
448. EXTON, J.H., ROBISON, G.A., SUTHERLAND, E.W. i PARK, C.R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6166-6177.
449. GARRISON, J.C. i HAYNES, R.C., Jr., (1973) J. Biol. Chem. 248, 5333-5343.
450. D'ARMIENTO, M., JOHNSON, G.S. i PASTAN, I. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 69, 459-462.
451. PILKIS, S.J., EXTON, J.H., JOHNSON, R.A. i PARK, C.R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 343, 250-267.
452. BROADUS, A.E., KAMINSKY, N.I., NORTHCUTT, R.C., HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W. i LIDDLE, G.W. (1970) J. Clin. Invest. 49, 2237-2245.

453. LEWIS, S.B., EXTON, J.H., HO, R.J. i PARK, C.R. (1971) Fed. Proc. 30:1205.
454. MURAD, F., MANGANIELLO, V. i VAUGHAM, H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3352-3360.
455. COLE, B., ROBISON, G.A. i HARTMANN, R.C. (1971) Ann. NY. Acad. Sci. 185, 477-488.
456. KAKIUCHI, S. i RALL, T.W. (1968) Mol. Pharmacol. 4, 367-378.
457. KUO, J.F. i DERENZO, E.C. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2252-2260.
458. KEELEY, S.L., Jr., CORBIN, J.D. i PARK, C.R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 1501-1504.
459. CORBIN, J.D., SODERLING, T.R. i PARK, C.R. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1813-1821.
460. SCHWOCH, G. (1978) Biochem. J. 170, 469-477.
461. EXTON, J.H., MALLETE, L.E., JEFFERSON, L.S., WONG, E.H., FRIEDMANN, N., MILLER, T.B. i PARK, C.R. (1970) Rec. Prog. Horm. Res. 26, 411-461.
462. FELIU, J.E., HUE, L. i HERS, H.G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2762-2766.
463. DE WULF, H. i HERS, H.G. (1967) Eur. J. Biochem. 2, 50-56.
464. STALMANS, W., DE WULF, H., HUE, L. i HERS, H.G. (1974) Eur. J. Biochem. 41, 127-134.
465. HERS, H.G., DE WULF, H. i STALMANS, W. (1970) FEBS Lett. 12, 73-82.
466. HERS, H.G., STALMANS, W. i DE WULF, H. (1973) "Metabolic Interconv. of Enzymes" (Fisher, E.H. editor) Springer-Verlag, Berlin, 89-98.
467. HERS, H.G. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 167-189.
468. CIUDAD, C., MASSAGUÉ, J. i GUINOVART, J.J., observacions no publicades.
469. NUTTALL, F.Q., GANNON, M.C. i LARNAR, J. (1972) Physiol. Chem. Phys. 4, 497-515.
470. GOLDSTEIN, D.E. i CURNOW, R.T. (1978) Metabolism 27, 315-323.

471. TATA, J.R. (1964) *Biochem. J.* 90, 284-292.
472. ELLIS, S. i BECKETT, S.B. (1963) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 142, 318-326.
473. MUHLBACHOVA, E., CHAN, P.S. i ELLIS, S. (1972) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 182, 370-377.
474. NEWTON, N.E. i HORNBROOK, K.R. (1972) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181, 479-488.
475. GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., HARTLE, D.K. i WHITE, J. citat per N.D. Goldberg, R.F. O'Dea i M.K. Haddox (1973) "Adv. in Cicl. Nucl. Res." vol.3 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 155-223.
476. BUTCHER, F.R. citat per J.P. Durham, R. Baserga i F.R. Butcher (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 372, 196-217.
477. GLINSMANN, W.H., HERN, E.P., LINARELLI, L.G. i FARESE, R. V. (1969) *Endocrinology* 85, 711-719.
478. CONN, H.O. i KIPNIS, D.M. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 319-326.
479. GOLDBERG, N.D., DIETZ, S.B. i O'TOOLE, A.G. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4458-4466.
480. STEINER, A.L., PAGLIARA, A.S., CHASE, L.R. i KIPNIS, D.M. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1114-1120.
481. YAMASHITA, K. i FIELD, J.B. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7062-7066.
482. ILLIANO, G., TELL, G.P.E., SIEGEL, M.I. i CUATRECASAS, P. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70, 2443-2447.
483. CHAN, T.H. i EXTON, J.H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8645-8651.
484. MILLER, T.B., HAZEN, R. i LARNER, J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 466-474.
485. EXTON, J.H., LEWIS, S.B., HO, R.J. i PARK, C.R. (1972) "Adv. in Cicl. Nucl. Res." vol.1 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY., pp. 91-101.
486. OHNEDA, A., AGUILAR-PARADA, E., EISENTRAUT, A.M. i UNGER, R.H. (1969) *Diabetes* 18, 1-10.

487. BUCHANAN, K.D., VANCE, J.E., DINSTL, K. i WILLIAMS, R.H. (1969) *Diabetes* 18, 11.
488. GOLDFIEN, A., ZILELI, M.S., DESPOINTES, R.H. i BETHUNE, J.E. (1958) *Endocrinology* 62, 749.
489. CRYER, E.P., JARRET, L. i KIPNIS, M.D. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 177, 586-590.
490. THOMPSON, W.J., WILLIAMS, R.H. i LITTLE, S.A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 302, 329-337.
491. ROSELLIN, G. i FREYCHET, P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 304, 541-551.
492. LERAY, F. CHAMBAUD, A.M., PERRENOUD, M.L i HANOUNE, I. (1973) *Eur. J. Biochem.* 38, 185-193.
493. MENAHAN, L.A., HEPP, K.D. i WIELAND, O. (1969) *Eur. J. Biochem.* 8, 435-443.
494. SHEN, L.C., VILLAR PALASÍ, C. i LARNER, J. (1970) *Physiol. Chem. Phys.* 2, 536-544.
495. WALAAS, O., WALAAS, E. i GRØNNERØD, O. (1973) *Eur. J. Biochem.* 40, 465-477.
495. LARNER, J. i ROACH, P.J. (1976) "The Metabolic Interconversion of Enzymes" (S. Shaltiel editor) Springer-Verlag, Heidelberg.
496. LARNER, J. i ROACH, P.J. (1978) "Advances in Ciel. Nucl. Res." vol.9 (P. Greengard i G.A. Robison editors) Raven Press, NY.
497. BISHOP, J.S. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 208, 208-218.
498. KHANDELWAL, R.L., ZINMAN, S.M. i ZEBROWSKI, E.J. (1977) *Biochem. J.* 168, 541-548.
499. KISSEBAH, A.H., VYDELINGUM, N., TULLOCH, B.R., HOPE-GILL, H. i FRASER, T.R. (1974) *Horm. Metab. Res.* 6, 247-255.
500. KISSEBAH, A.H., TULLOCH, B.R., VYDELINGUM, N., HOPE-GILL, H., CLARKE, P. i FRASER, T.R. (1974) *Horm. Metab. Res.* 6, 357-364.
501. KISSEBAH, A.H., CLARKE, P., VYDELINGUM, N., HOPE-GILL, H., TULLOCH, B. i FRASER, T.R. (1975) *Eur. J. Clin. Invest.* 5, 339-349.

- 502. CLARKE, P., KISSEBAH, A.H., HOPE-GILL, H., VYDELINGUM, N., TULLOCH, B. i FRASER, T.R. (1975) *Eur. J. Clin. Invest.* 5, 351-358.
- 503. HOPE-GILL, H., KISSEBAH, A.H., CLARKE, P., WDELINGUM, N., TULLOCH, B. i FRASER, T.R. (1976) *Horm. Metab. Res.* 8, 184-190.
- 504. CLAUSEN, T., ELBRINK, J. i MARTIN, B.R. (1974) *Acta Endocrinol. (Copenhagen) (Suppl.)* 191, 137-143.
- 505. CLAUSEN, T. i MARTIN, B.R. (1977) *Biochem. J.* 164, 251-255.
- 506. McDONALD, J.M., BRUNS, D.E. i JARETT, L. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 114-121.
- 507. McDONALD, J.M., BRUNS, D.E. i JARETT, L. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 1542-1546.
- 508. McDONALD, J.M., BRUNS, D.E. i JARETT, L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 3504-3508.
- 509. BYGRAVE, F.L. (1978) *Trends in Bioch. Sci.* 3, 175-178.
- 510. KISSEBAH, A.H., HOPE-GILL, H., VYDELINGUM, N., TULLOCH, B. R., CLARKE, P. i FRASER, T.R. (1975) *Lancet* 1, 144-147.
- 511. BORLE, A.B. (1975) "Methods in Enzymol." vol. 39 (S.P. Colowick i N.O. Kaplan editors) Academic Press, NY. pp. 513-573.
- 512. DORMANN, D.M., BARRITT, G.J. i BYGRAVE, F.L. (1975) *Biochem. J.* 150, 389-395.