

ACCIÓ DE LA INSULINA
SOBRE EL SISTEMA A DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS
EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC:
ESTUDI DE MECANISMES TRANSDUCTORS
I REGULADORS

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I FISIOLOGIA
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

ACCIÓ DE LA INSULINA
SOBRE EL SISTEMA A DE TRANSPORT D'AMINOÀCIDS
EN EL MÚSCUL ESQUELÈTIC:

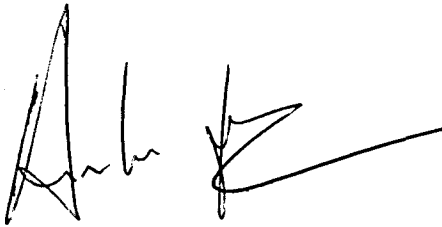
ESTUDI DE MECANISMES TRANSDUCTORS
I REGULADORS

MEMORIA PER A OPTAR AL GRAU DE
DOCTOR EN BIOLOGIA
presentada per na

ANNA MARIA GUMÀ i GARCIA

Barcelona, Juliol de 1991

VIST I PLAU DELS DIRECTORS:

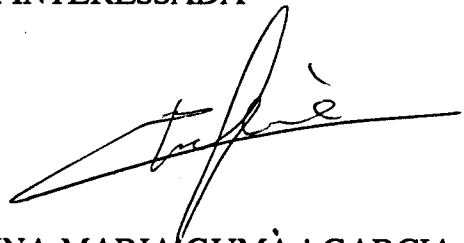


Dr. ANTONIO ZORZANO OLARTE
Professor Titular
de Bioquímica i
Biologia Molecular



Dr. XAVIER TESTAR I YMBERT
Professor Titular
de Bioquímica i
Biologia Molecular

LA INTERESSADA



ANNA MARIA GUMÀ i GARCIA

Agraïments.

Vull deixar constància del meu agraïment als professors, doctorands i tesinands de la Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Biologia, per tantes estones compartides, per tantes experiències viscudes, perquè m'heu fet descobrir tot un món.

En primer lloc faré esment dels meus directors de Tesi, els doctors Antonio Zorzano i Xavier Testar; ells han participat en el dia a dia d'aquest treball, per la qual cosa els hi vull agrair la seva dedicació, paciència i visió crítica que tant m'han ajudat. No voldria deixar-me al doctor Manuel Palacín, que també ha participat activament en aquest projecte amb les seves reflexions i crítiques.

Als meus companys de laboratori i d'objectius de recerca els haig d'agrair les múltiples col.laboracions que han contribuït a millorar substancialment aquest treball; així agraeixo a la Marta Camps el seu ajut en els estudis amb els receptors de la insulina; a la Puri Muñoz i al Francesc Viñals per haver treballat conjuntament en els estudis amb músculs incubats i haver participat en projectes de recerca comuns; a l'Anna Castelló per la seva col.laboració, absolutament indispensable, en els estudis amb hepatòcits; al Joan Bertran pels estudis de transport en vesícules de membrana de fetge; i a la resta de companys de grup, Emilià, Angela, Tomàs, Contxita, Merche, Marc i ara també al Josep, tot i que alguns han seguit altres camins, els hi vull agrair el seu companyerisme i tota la paciència que cal tenir quan en un espai limitat som tants a sucra-hi.

També vull agrair al doctor Francesc Lopez tantes vegades com s'ha ofert a ajudar-me, quan he necessitat quelcom, quan em calia ser sentida a la recerca d'un consell o simplement per ordenar les meves idees i per ser la persona que em va cedir bona part del seu material quan tot just jo començava a treballar al laboratori i ell finalitzava la seva Tesi. A la Concepció Soler, amb qui he realitzat de manera paral.lela la Tesi i amb la que he conviscut en un pis d'estudiants, per haver pogut compartir amb ella les pujades i baixades d'ànim que ens anaven succeïnt a ella o a mi en diferents moments d'aquest llarg camí. Igualment a la resta de companys de la "mampara" (i visitants asidus) vull agrair la seva amistat feta a base de compartir moltes estones.

Igualment agraeixo al doctor Miquel Llobera el haver-me cedit el seu temps i el seu equip informàtic per tal que aquesta Tesi tingués una bona presentació. També agraeixo a la Montgrony Perarnau la correcció ortogràfica de la memòria que tot seguit serà presentada.

Finalment vull fer esment dels meus pares doncs a ells els hi dec tot el que han fet per mi, tot el que he rebut d'ells; la seva estimació i donació no pot ser mesurada. Desitjaria que l'esforç que han hagut de fer, vagi donant els seus fruits.

Gràcies a tots.

**Al José Antonio,
pel seu amor,
per la seva comprensió.**

La vida és veritablement tenebra quan no és impuls,
I tot impuls és cec quan no és coneixement,
I tot coneixement és inútil quan no és treball,
I tot treball és buit si no és amor.

(Kahlil Gibran)

Índex General

A. Presentació i objectius.....	1
B. Acció de la insulina sobre el sistema A de transport d'aminoàcids a múscul esquelètic.....	5
B.1. El múscul esquelètic, teixit diana de l'acció de la insulina.....	6
B.2. Caracterització de l'efecte de la insulina sobre l'activitat de transport de glucosa i d'aminoàcids en el múscul esquelètic.	
B.2.1. Transport de glucosa.....	12
B.2.2. Transport d'aminoàcids.....	18
B.3. Transducció de l'acció de la insulina sobre l'activitat de transport del sistema A.	
B.3.1. El receptor de la insulina.....	35
B.3.2. Els missatgers de la insulina:	
B.3.2.1. Els fosfo-oligosacàrids.....	48
B.3.2.2. El diacilglicerol i la proteïna quinasa C.....	53
B.3.2.3. Les proteïnes G.....	62
B.3.3. Elements transductors de l'acció de la insulina sobre l'activitat de transport del sistema A en múscul esquelètic.....	68
B.4. Mecanismes de regulació de l'acció de la insulina.....	71
B.4.1. La proteïna quinasa C.....	72
B.4.2. La proteïna quinasa dependent de cAMP.....	80
B.4.3. Altres serina quinases.....	94
B.4.4. Paper regulador dels glucocorticòids.....	95
B.5. Índex de figures i taules.....	98
B.6. Bibliografia.....	100
C. Publicacions i manuscrits dels treballs que conformen la present Tesi Doctoral.....	125
D. Conclusions.....	132
E. Apèndix: Protocols experimentals.....	135
Abreviatures emprades.....	137

A. Presentació i objectius.

La insulina és una hormona que genera fenòmens de caràcter anabòlic en teixits perifèrics tals com el múscul o el teixit adipós. La manera com indueix un ventall tan ampli de respostes per part de la cèl.lula és en l'actualitat, tema d'estudi per a un ampli grup d'investigadors. Més concretament, la insulina es capaç d'estimular el transport de glucosa i d'aminoàcids en aquests teixits. S'ha avançat més en l'estudi dels mecanismes pels quals la insulina estimula el transport de glucosa, la qual cosa ha estat motivada pel fet que en el seu moment es varen desenvolupar tècniques que permeteren la quantificació de transportadors de glucosa, i a que en l'actualitat els diferents transportadors de glucosa que s'expressen en mamífers es troben clonats i seqüenciats. En aquest sentit, es coneix que la insulina provoca en adipòcits de rata, la ràpida translocació d'una població de transportadors de glucosa sensibles a la insulina, des d'un locus intracel.lular fins a la membrana plasmàtica.

La primera referència bibliogràfica que tenim de l'acció estimuladora de la insulina sobre el transport d'aminoàcids a múscul apareix a l'any 1958. David M. Kipnis i Matthew W. Noall descriuen que la insulina provoca l'activació de la captació de l'anàleg aminoacídic no metabolitzable, àcid α -aminoisobutíric (AIB), en preparacions de diafragma de rata incubat. Utilitzant l'AIB, estimaven l'activitat de transport a través de dos sistemes, el sistema A i l'ASC, ambdós Na^+ -dependents. Avuí sabem que l'àcid α -(metil)aminoisobutíric (MeAIB) és un substrat específic del sistema A, atès que el sistema ASC exclou aminoàcids N-metilats.

El mecanisme pel qual la insulina estimula l'activitat del sistema A en múscul esquètic es desconeix, així com també es desconeix l'estructura del propi transportador que constitueix el sistema A.

Situats en aquest context empenrem la tasca d'estudiar quina era l'acció de la insulina sobre el transport de MeAIB a múscul esquelètic de rata, per a seguidament realitzar una aproximació als seus mecanismes d'acció, així com a la seva regulació. En alguns casos hem investigat, de manera comparada, la regulació del transport de glucosa, i això ha estat motivat pel fet que en una varietat de situacions s'ha descrit un paralelisme en múscul esquelètic entre l'activitat de transport de glucosa i la del sistema A (Zorzano et al., 1985; Zorzano et al., 1986a).

Entre els nostres objectius teníem investigar la possible participació en els

mecanismes d'acció de la insulina estimulants el sistema A, dels següents elements:

- L'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina.
- Les proteïnes G.
- Els diacilglicerols i/o la proteïna quinasa C.

En estudis preliminars observarem que l'efecte de la insulina tot i ser independent de síntesi proteica, provocava increments en la V_{max} del transport de MeAIB en múscul esquelètic. Així un altre dels nostres objectius va ser estudiar el possible requeriment per a l'acció de la insulina d'una adequada activitat de microtúbuls i de microfilaments en aquest teixit, i per tant intentar determinar si processos de translocació de transportadors participen en aquest efecte, tal i com ha estat descrit a adipòcits.

Els mecanismes d'acció de la insulina han d'estar sotmesos a una regulació negativa que aturi el senyal que ja ha estat emès per la unió d'aquesta hormona al receptor. El nostre darrer objectiu fou estudiar la possible participació en la regulació de l'acció de la insulina sobre el sistema A de serines/treonines quinases, com la proteïna quinasa C o la proteïna quinasa A, mitjançant la utilització de conegudes substàncies que podien induir modulacions en l'activitat d'aquestes.

Els nostres estudis han permès constatar que a múscul esquelètic la insulina regula l'activitat del sistema A de manera ràpida i independent del gradient electroquímic de Na^+ . Aquesta acció, que és portada a terme a través del receptor de la insulina, requereix d'una intacta activitat tirosina quinasa del receptor. Aquesta activitat no sembla modular segons missatgers com proteïnes G o proteïna quinasa C en la via d'estimulació del sistema A. Tot i que la cinètica d'estimulació del sistema A presenta increments en la V_{max} , no semblen produir-se fenòmens de translocació de transportadors cap a la membrana plasmàtica, a través de microtúbuls o de microfilaments, a diferència del que succeeix quan l'estimulació del transport implica processos de síntesi proteica. Finalment hem observat que aquesta acció de la insulina podria trobar-se parcialment regulada per la proteïna quinasa C però no per la proteïna quinasa A.

La memòria que es presenta tot seguit, s'estructura de la següent manera: en primer lloc, es revisa l'estat actual del tema objecte d'estudi, en capítols monogràfics dels diferents aspectes tractats, on s'incorporen els resultats propis

obtinguts al llarg de la realització d'aquest treball, amb les taules i figures que pel seu interès o representativitat han estat escollides. Simultàniament, es discuteixen aquests resultats, en el seu context bibliogràfic.

Seguidament s'hi troben els articles (publicats o manuscrits en revisió) que s'han originat a partir de la realització d'aquest projecte. A continuació es presenten les conclusions globals i finalment i a manera d'apèndix s'inclouen els protocols experimentals emprats al llarg d'aquest treball.

**B. Acció de la insulina sobre el sistema A
de transport d'aminoàcids a múscul esquelètic.**

B.1. El múscul esquelètic, teixit diana de l'acció de la insulina.

La unitat estructural del múscul de fibra estriada, és a dir, la que correspon a cor i a múscul esquelètic, és la fibra muscular, sinciti multinucleat, delimitat per la membrana plasmàtica (sarcolema) i que conté en el seu citoplasma (sarcoplasma), un gran reticle endoplàsmic llis (reticle sarcoplàsmic), aparell de Golgi, mitocòndries (sarcosomes), poliribosomes, glicogen, lípids i mioglobina; però la major part del citoplasma està ocupat per filaments contràctils (miofilaments) formats per cadenes constituïdes bàsicament per dos tipus de proteïnes, actina i miosina, que interactuen entre elles per tal de donar lloc a un moviment unidireccional (la contracció). Els miofilaments es troben agrupats formant feixos anomenats miofibrilles. En el cas de la fibra estriada (Figura-1), aquestes miofibrilles presenten al microscopi electrònic zones birefringents, anisotròpiques (fosques) que alternen amb altres isotròpiques (clares). En el centre de les zones isotròpiques (banda I) es localitza una línia densa (línia Z) que delimita l'entitat del sarcòmer, i on es troben els túbuls transversals (túbuls T). La zona anisotròpica (banda A) presenta una àrea més clara (disc H) dividida en dues parts per una línia fosca (línia M). A grans trets, la correspondència estructural d'aquestes bandes és la següent:

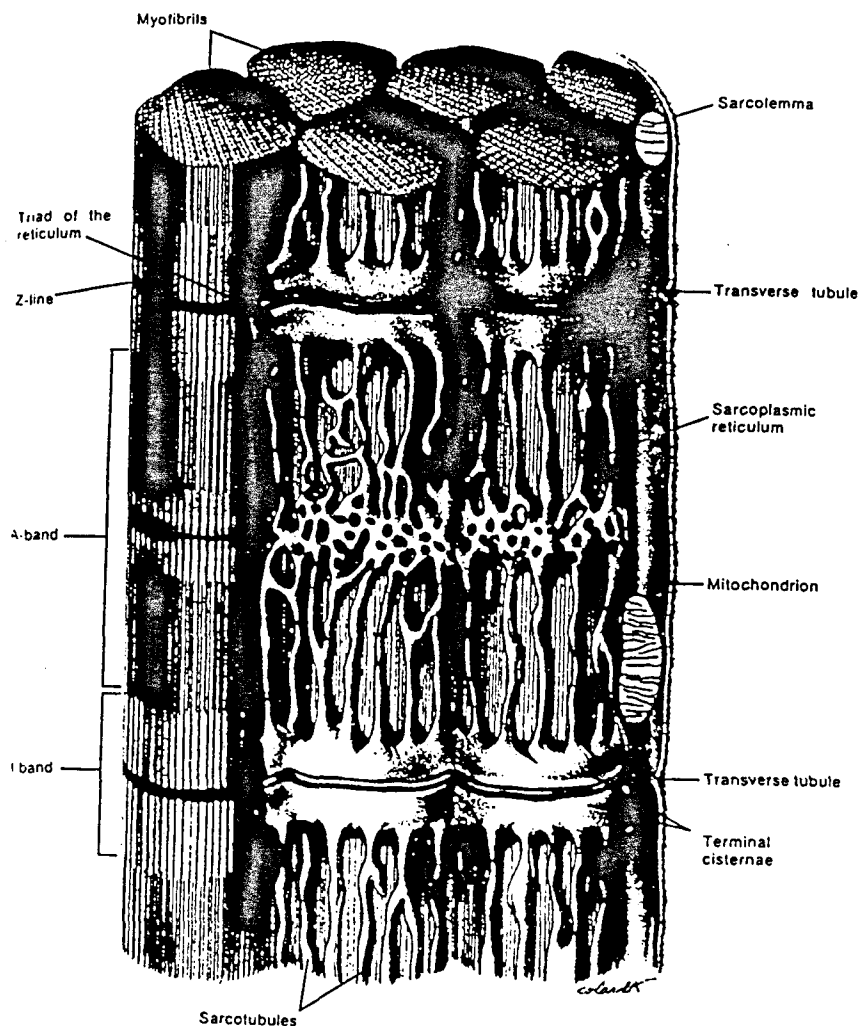
Els miofilaments són de dos tipus, gruixuts, formats per miosina i fins, formats per actina, tropomiosina i troponinas; en funció del grau de contracció, aquests filaments estaran més o menys superposats. En estat de relaxació tenim,

banda I, filaments únicament fins,

banda H, filaments únicament gruixuts,

banda A, filaments fins i gruixuts superposats.

FIGURA-1: Estructura del sarcòmer



(Extret de: Kessel i Kardon, 1979).

L'arribada d'un impuls nerviós provoca una ona de despolarització del sarcolemma que en el túbul T, on el sarcolemma es troba molt proper a les cisternes terminals del reticle sarcoplàsmic, indueix l'alliberament d'ions Ca^{2+} provinents de l'interior del reticle, els quals en reaccionar amb la troponina desencadenaran els processos que donaran lloc a la contracció. Durant la relaxació, els ions Ca^{2+} són ràpidament recapturats per les bombes de calci que hi ha a la membrana del reticle.

Des d'un punt de vista metabòlic, el múscul oscil·la entre períodes de repòs, en els que la despesa energètica és molt baixa, i períodes d'activitat en els que té lloc

una gran dissipació d'energia. En qualsevol cas, la seva capacitat de realitzar treball depèn del manteniment dels nivells d'ATP. Per aconseguir de manera ràpida aquest nucleòtid, el múscul emmagatzema, malgrat que de manera limitada, creatina fosfat, compost caracteritzat per una energia lliure estàndard d'hidròlisi molt negativa, de manera que pot acoplar-se amb l'ADP per sintetitzar ATP, mitjançant la creatina quinasa. Aquest compost, però, sols representa una font transitòria d'energia, i així en cas d'una forta demanda energètica aquesta haurà de provenir d'altres substrats.

En estat de repòs el múscul capta poca glucosa, la qual contribueix en una petita proporció al total del metabolisme oxidatiu muscular, però cal tenir en compte que des d'un punt de vista quantitatiu, el múscul és el principal teixit en el que la insulina augmenta la captació de glucosa durant l'estat absortiu. El mateix efecte s'observa en situació d'exercici, però així com la glucosa captada per acció de la insulina té com a principal destí la formació de glicogen, la captada en situació d'exercici essencialment és metabolitzada fins a l'obtenció de piruvat. Aquest últim pot ésser alliberat, prèvia conversió a alanina o a lactat, o bé descarboxilat i oxidat per a la síntesi d'acetil-CoA i posterior metabolització en el cicle de l'àcid cítric. Després d'un dejuni de 12 hores, els principals substrats oxidatius en el múscul en repòs són els àcids grassos lliures (FFA) procedents dels triglicèrids del teixit adipós. El múscul també té capacitat enzimàtica per a oxidar cossos cetònics (acetoacetat i β -hidroxibutirat). Per això, en situacions en les que el teixit adipós allibera grans quantitats de FFA i, en conseqüència, el fetge sintetitza cossos cetònics, el múscul els consumeix també en més quantitat. En aquests casos s'alenteix la glucòlisi, la qual cosa permet estalviar glucosa. L'acumulació de triglicèrids en el múscul és limitada i es localitza en forma de gotetes de greix, a prop de les mitocondries. Aquests compostos constitueixen també una font d'acetil-CoA, important en situacions de poca disponibilitat de glucosa.

Respecte al metabolisme dels aminoàcids, si bé el múscul té poca capacitat per a oxidar alguns d'ells en estat post-absortiu, els allibera contínuament a la circulació. Alanina i glutamina són els alliberats en més proporció, arribant a representar, en conjunt, més del 50% del total del recanvi de nitrogen α -amínic corporal. Mentre que el múscul en repòs allibera aminoàcids, durant l'exercici es converteix en un teixit captador d'aquests, amb excepció de l'alanina que continua essent alliberada. D'altra banda, els teixits esplàncics alliberen grans quantitats

d'aminoàcids ramificats. Durant l'exercici s'ha observat que la velocitat de captació d'aminoàcids ramificats en el múscul és igual a la d'alliberació d'alanina, suggerint que els aminoàcids ramificats podrien proveir de nitrogen α -amínic per a la formació d'alanina. De totes maneres, els aminoàcids ramificats sols contribueixen en un 5% al total del metabolisme oxidatiu del múscul durant l'exercici.

Classicament els músculs han estat classificats en funció del seu color, músculs vermells i músculs blancs, o de les seves propietats contràctils, músculs de contracció lenta o de contracció ràpida. Les fibres de múscul vermell poden ser tant de contracció lenta com de contracció ràpida, mentre que els músculs de fibra blanca tan sols són de contracció ràpida. Els diferents músculs esquelètics estan formats per una barreja d'aquests tres tipus de fibres. Els músculs de fibra vermella de contracció lenta (tipus I) es caracteritzen per tenir una capacitat oxidativa superior a la dels músculs de fibra vermella de contracció ràpida (tipus IIA), així com una més gran reserva de triglicèrids, però tenen menor capacitat glucolítica i menor quantitat de creatina-fosfat. Aquestes fibres permeten el treball perllongat d'intensitat moderada o elevada, durant el qual la velocitat de consum d'ATP és igual a la velocitat amb que és sintetitzat mitjançant la fosforilació oxidativa. D'altra banda, les fibres vermelles de contracció ràpida presenten alta capacitat per a la generació tant aeròbica com anaeròbica de l'ATP. Quant a les fibres blanques (tipus IIB), presenten una menor densitat capil·lar que les vermelles, així com unes menors reserves de triglicèrids. La seva capacitat oxidativa també és menor, però presenten una més gran taxa glucolítica, així com concentracions més elevades de creatina-fosfat que les de tipus I. Aquestes fibres estan especialitzades en exercicis curts però molt intensos, que no permeten una síntesi aeròbica de l'ATP, sinó que aquest s'obté, un cop les reserves de creatina fosfat han desaparegut, d'un major ritme glicolític, a partir de la degradació del glicogen.

La insulina, a la qual ja hem fet esment en aquest capítol, afecta tant al metabolisme glucídic com proteic del múscul. La insulina incrementa la taxa d'utilització de glucosa en múscul esquelètic i cardíac, realitzant aquest efecte tant sobre el transport en la membrana plasmàtica, com sobre la glucòlisi i la síntesi de glicogen. L'efecte sobre el transport de membrana és degut a un increment en la V_{max} del procés de transport, amb un petit, o inexistent, efecte sobre la K_m . Una bona part de la glucosa que és captada pel múscul es dirigeix cap a la formació de glicogen,

degut a un increment en l'activitat de la glicogen sintasa (Villar-Palasi i Lerner, 1970); la insulina incrementa la proporció d'enzim desfosforilat, forma en la qual és actiu, i això seria degut a una activació de la proteïna fosfatasa-I. Respecte al metabolisme proteic, la insulina estimula el transport d'aminoàcids a través del sistema A. Paral·lelament, la insulina també produeix un increment en la taxa de síntesi proteica, així com un decrement en la taxa de proteòlisi (Morgan et al. 1971).

A més d'aquests efectes la insulina produeix un decrement en la taxa de lipòlisi endògena en el cor i en fibres de tipus I i IIA, però els mecanismes pels quals ho fa així com la seva importància fisiològica no estan clars.

Tot estudi dirigit a investigar aspectes relatius al múscul esquelètic carrega amb dificultats addicionals com és la inassequibilitat d'un model cel·lular metodològicament similar al múscul in vivo. Així doncs, hem de treballar amb el feix muscular sencer, cosa que comporta una sèrie d'avantatges i desavantatges. Entre els primers figura que l'entitat cel·lular es troba en el seu context estructural i fisiològic; així la tècnica de perfusió de les extremitats (habitualment del quart posterior de l'animal) in situ, tot i tenir la interferència d'un seguit de senyals nerviosos o hormonals generats pel propi animal, és la que manté el teixit més proper al seu context, alhora que utilitza la xarxa capil·lar pròpia del teixit per perfundir els compostos objecte de l'estudi (Ruderman et al. 1971).

Per tal d'evitar les interferències fisiològiques a les que es feien referència, hom pot procedir a extreure un múscul complet de l'animal i realitzar el seu estudi in vitro. El desavantatge que presenta aquesta tècnica és la diferent assequibilitat que tenen les fibres del feix als diferents substrats, en funció que es trobin localitzades més cap al nucli del feix. Per tant aquesta tècnica requereix de la utilització de músculs poc gruixuts per tal de minimitzar aquest problema i per evitar la possible formació d'un nucli anòxic. Els músculs comunment més utilitzats són el soleus, l'extensor digitorum longus i el diafragma. En el cas de la rata, s'aprofiten animals joves (40-70 g de pes corporal) per a l'obtenció d'aquests músculs per quant els teixits són menors; tanmateix, però, si el model experimental requereix la utilització d'animals adults, hi ha la possibilitat de fer tires longitudinals d'un múscul concret, o la utilització de músculs poc gruixuts com l'epitroclearis.

La utilització d'aquesta tècnica està condicionada a la comprovació prèvia

que els nivells de creatina fosfat, així com els d'ATP romanen inalterats; també és mostra d'un adequat estat del múscul, el manteniment dels nivells de glicogen. Com ja s'ha fet esment anteriorment, l'obtenció de miòcits en cultius primaris no és assequible, tot i que en aquest sentit alguns autors han posat a punt tècniques d'obtenció de mioblasts de músculs embrionaris (Reiss i Korohoda, 1988).

Una altra tècnica d'aproximació a l'estudi del múscul són els cultius de línies cel·lulars establertes, d'origen miocític. Predomina la utilització de dues d'aquestes línies, la L6 (Klip i Pâquet, 1990) i la BC3H-1 (Farese et al., 1986). Aquest model, tot i resoldre alguns dels principals problemes dels models anteriors, presenta l'inconvenient de treballar amb cèl·lules completament desconnectades d'una entitat fisiològica i a més modificades per presentar les típiques característiques d'immortalitat que requereixen els cultius cel·lulars establerts. A més, aquestes línies cel·lulars presenten una molt baixa concentració de glicogen, baixa taxa de síntesi de glicogen i una elevada producció de lactat (Ruderman i Zorzano, dades no publicades). En definitiva, es tracta de models cel·lulars que metabòlicament es comporten de manera diferent a com ho fa una fibra muscular in vivo.

Els estudis que precisen d'un subfraccionament cel·lular de la fibra muscular es veuen dificultats també per l'existència de les miofibrilles al citoplasma, ja que en processos d'homogeneïtzació del teixit, la membrana plasmàtica es queda adherida a elles, fent molt ineficient el procés (Charuk et al., 1989).

Degut als problemes metodològics que comporta treballar amb la fibra muscular, els estudis sobre l'acció de la insulina han estat més desenvolupats en teixit adipós, doncs la tècnica d'obtenció i incubació d'adipòcits no presenta dificultats de consideració. Així els resultats obtinguts en aquest teixit han servit per proposar models sobre els mecanismes d'acció de la insulina, que encara estan per ser demostrats en el múscul.

B.2. Caracterització de l'efecte de la insulina sobre l'activitat de transport de glucosa i d'aminoàcids en múscul esquelètic.

B.2.1. Transport de glucosa.

En estat absortiu, el múscul és el teixit responsable de la major part de la utilització corporal de glucosa; en aquesta situació hi ha una augmentada secreció d'insulina, de manera que aquesta hormona en unir-se a receptors específics de membrana del múscul genera diversos senyals, un dels quals provoca un increment en la captació de glucosa. Precisament la deficiència severa en la secreció de la insulina, o bé la resistència a l'acció d'aquesta hormona que poden presentar els seus teixits diana, genera una malaltia coneguda com a diabetes mellitus.

El transport de D-glucosa esdevé en el múscul per un procés de difusió facilitada, essent la concentració plasmàtica de glucosa d'aproximadament 5 mM, mentre que la intracel·lular és pràcticament nul·la degut a la ràpida acció catalítica de l'hexoquinasa que genera glucosa-6-fosfat. La primera referència que es té d'aquest fenomen de transport de glucosa a través de la membrana apareix l'any 1939 gràcies a uns treballs de Lundsgaard on es parla de l'existència d'un "factor actiu" que es troba en la superfície de la membrana i que resulta estimulat per la insulina. En aquesta línia de treball, diversos autors (Park et al., 1955; Narahara et al., 1960; Morgan et al., 1966) observen que la captació de glucosa en diafragma és saturable i s'incrementa per acció de la insulina. Posteriorment es descriu que la captació de glucosa mediada per transportador és inhibible per la citocalasina-B (LeFevre, 1972). En estudis cinètics de l'acció de la insulina sobre la captació de glucosa s'observa que hi ha un increment en la V_{max} sense que es modifiqui la K_m (Narahara et al., 1963). La captació de glucosa així com la magnitud de l'efecte de la insulina, estan en funció del tipus de fibres que formin el múscul. Així a grans trets, s'ha observat que les fibres de contracció lenta tenen una K_m més baixa per a la captació de glucosa que les de contracció ràpida, mentre que la V_{max} és superior i resulta més estimulada per la insulina en fibres vermelles que en fibres blanques (Klip i Pâquet, 1990). En funció de la composició de

fibres que presenti el múscul, aquest pot tenir estimulacions de la captació de glucosa per part de la insulina que vagin des de 2 fins a 20 vegades, en rata (Klip i Pâquet, 1990). D'altra banda, s'ha observat que la insulina estimula 2 vegades la captació de glucosa en adipòcits humans, mentre que la estimulació és de fins a 30 vegades en adipòcits de rata (Klip i Pâquet, 1990).

La cinètica del transport facilitat de glucosa va ésser estudiada per primera vegada en eritròcits humans, on es descriu que és saturable i estereospecífic amb una Km de 5-10 mM per a l'entrada de D-glucosa (Jung, 1975; Naftalin et al., 1977). El transport de D-glucosa en eritròcits era específicament inhibït per citocalasina-B (Taverna et al., 1973). Mitjançant cromatografies d'intercanvi iònic es va aconseguir purificar el transportador de glucosa, a partir de "fantasmes" d'eritròcits pre-tractats amb un detergent. Durant la purificació es comprovava l'activitat del transportador per reconstitució en liposomes i mesures del grau d'inhibició de la captació de (3H)-D-glucosa amb citocalasina-B (Zoccoli et al., 1978; Kasahara et al., 1977). La molècula purificada era una glicoproteïna que tenia un pes molecular d'uns 55.000. El transportador de glucosa d'eritròcit humà presenta una glicosilació heterogènia, la qual cosa és la causa de la formació d'una banda difosa quan corre en gels de SDS-poliacrilamida. La citocalasina-B també ha estat utilitzada com a marcador del transportador de glucosa i com a eina per a la quantificació del nombre de transportadors en diferents fraccions subcel·lulars. Quan s'incuben membranes que contenen transportadors de glucosa amb citocalasina-B marcada radiactivament, i seguidament és irradiada la mostra amb llum UV, es produeix un enllaç covalent entre aquestes dues molècules, de manera que els transportadors de glucosa podran ésser detectats per fluorografia o per comptatge radiactiu de trossos del gel on s'ha realitzat l'electroforesi en SDS-poliacrilamida. Els transportadors de glucosa també poden ser detectats amb anticossos policlonals i monoclonals, els quals han servit, juntament amb les tècniques de fotoafinitat de la citocalasina-B, per a identificar els transportadors de glucosa en diferents teixits i espècies i per clonar cDNA que codifica per al transportador de glucosa de l'eritròcit. Amb anticossos contra transportadors de glucosa d'eritròcits es va rastrejar una llibreria de cDNA en el vector d'expressió λ -gt11, procedent de l'hepatoma HepG2, per fags que expressessin determinants antigènics de transportador de glucosa (Mueckler et al., 1985); el cDNA que codificava

pel transportador de glucosa d'HepG2 fou designat GLUT-1. Utilitzant el GLUT-1 com a sonda es va detectar la presència de mRNA de transportadors de glucosa en cervell, en teixit adipós i en múscul (Birnbaum et al., 1986; Mueckler et al., 1985; Flier et al., 1987).

Cushman i Kono al 1980 (Cushman i Wardzala, 1980; Suzuki i Kono, 1980), independentment, descriuen l'existència d'un pool intracel·lular de transportadors de glucosa a adipòcits de rata. Cushman va quantificar els transportadors de glucosa per assaigs d'unió de citocalasina-B a fraccions subcel·lulars de membrana, mentre que Kono va reconstituir l'activitat de transport de glucosa en liposomes. Varen observar que la insulina provocava un reclutament dels transportadors de glucosa intracel·lulars, a la membrana plasmàtica. Aquesta observació fou posteriorment confirmada amb la utilització d'antisèrum contra transportador de glucosa d'eritròcit humà, en assaigs d'immunoblots (Wheeler, T.J. et al., 1982; Lienhard, G.E. et al., 1982). Aquest increment de transportadors de glucosa en la membrana plasmàtica sembla ser, en bona part, el responsable de la incrementada taxa de transport de glucosa per acció de la insulina. Aquest procés de translocació ha estat observat també a adipòcits humans (Karnieli, E. et al., 1986; Matthaei, S. et al. 1987), diafragma de rata (Wardzala, L.J. et al., 1981), cor (Watanabe, T. et al., 1984) i músculs del quart posterior (Klip, A. et al., 1987).

Una sòlida evidència de l'existència de diferents tipus de transportadors de glucosa, fou assolida gràcies a l'obtenció d'un anticòs monoclonal preparat contra microsomes de baixa densitat procedents d'adipòcits de rata. Aquest anticòs, anomenat 1F8, reaccionava fortament amb una proteïna de 43.000 de pes molecular dels microsomes de baixa densitat procedents d'adipòcits en situació basal. Quan els adipòcits eren estimulats amb insulina, la proteïna de 43.000 es localitzava preferentment en les fraccions de membrana plasmàtica, mentre que minvava la seva presència en les fraccions de microsomes de baixa densitat (James et al., 1988). A més, l'anticòs 1F8 immunoprecipitava el complex proteïna-citocalasina-B(³H) previament generat per fotoafinitat donant així consistència al fet que es tractava d'un transportador de glucosa. Aquest transportador respon a estimulacions agudes per part de la insulina. El cDNA d'aquest transportador ha estat recentment clonat i seqüenciat en adipòcits de rata (James, D.E. et al., 1989). Idèntics cDNA foren clonats de llibreries de múscul

esquelètic de rata (Charron et al. 1989; Birnbaum, 1989), d'adipòcits 3T3-L1 de ratolí (Kaestner et al., 1989) i de múscul esquelètic humà (Fukumoto et al., 1989). Aquest cDNA, així com la proteïna per a la qual codifica, reben el nom de GLUT-4. Altres cDNA per a transportadors de glucosa han estat clonats; així, el de fetge rep el nom de GLUT-2 (Fukumoto et al., 1988; Thorens et al., 1988), el de cervell, GLUT-3 (Kayano et al., 1988) i un altre expressat en l'intestí prim, GLUT-5 (Kayano et al., 1990). L'homologia existent entre aquestes molècules arriba a ser fins del 65%; els fragments de transmembrana són els que guarden una més gran homologia, mentre que els extrems C- i N-terminals són els més variables (Klip i Pâquet, 1990). Conseqüència d'aquest fet és que els anticossos específics per a cada un d'ells, que reconeixen epítops externs dels transportadors, presenten poca reactivitat creuada.

Al múscul esquelètic humà s'observen quantitats detectables de mRNA de GLUT-1 (Flier et al., 1987), mentre que el mRNA de GLUT-4 es troba en aquells teixits que poden respondre a estimulacions agudes per part de la insulina com són els teixit adipós o el múscul (James et al., 1989a; Charron et al., 1989; Birnbaum, 1989; Kaestner et al., 1989; Fukumoto et al., 1989). S'ha proposat una hipòtesi que indica que en els teixits diana de la insulina, GLUT-1 seria el responsable de la captació basal de glucosa, localitzant-se preferentment a la membrana plasmàtica, mentre que GLUT-4, que es troba en membranes intracel·lulars, seria el responsable de l'increment de transport de glucosa després de l'estimulació per insulina, per un procés de translocació d'aquests transportadors cap a la membrana plasmàtica (James et al., 1988).

En múscul esquelètic, el sarcolema presenta heterogeneïtat quant a la densitat de transportadors de glucosa, i concretament a nivell del tubul T s'ha descrit una més elevada concentració de transportadors (Burdett et al., 1986). Per contrarestar aquesta deficiència, el múscul presenta en el sarcolema corresponent a la zona del tubul T una més gran concentració de transportadors de glucosa (Burdett et al., 1986). Encara no ha estat definit si l'activitat d'aquests transportadors és diferent a la dels de la resta del sarcolema. En condicions on hi ha un increment del transport de glucosa per part del sarcòmer, podria succeir que els transportadors procedents dels túbuls T fossin traslladats a altres zones amb més assequibilitat per a la glucosa, o bé que el teixit es modifiqués per incrementar la grandària del lumen que forma el tubul T.

Aquesta última observació ha estat feta quan el múscul és sotmès a estimulació per part de l'hormona tiroidea (Dulhunty et al., 1986). Seria interessant saber si la insulina o bé l'exercici generen un procés similar.

Una altra dada interessant es va obtenir amb estudis amb vesícules obtingudes a partir de sarcolema de múscul esquelètic. Malgrat que aquestes vesícules contenien receptors d'insulina i transportadors de glucosa, la insulina no generava un increment de la captació de glucosa en aquestes vesícules, suggerint-se així el concepte que es requereix de la maquinària cel.lular per tal de produir el seu efecte (Klip, 1987; Cheng et al., 1978; Sternlicht et al., 1988).

En diferents tipus de músculs es corrobora el fet que la insulina produeix un increment en el nombre de transportadors en el sarcolema; així, mitjançant assaigs d'unió amb citocalasina-B i posterior fraccionament subcel.lular, s'ha observat aquest fenomen a diafragma (Wardzala et al., 1983), a paquets musculars del quart posterior de l'animal (Klip et al., 1987), a una combinació de quadriiceps i gastrocnemius (Sternlicht et al. 1988) i a múscul cardíac (Zaninetti et al., 1988). En tots aquest teixits es constata que la insulina genera un increment de dues vegades el nombre de transportadors de glucosa (detectats per citocalasina-B) al sarcolema. Alhora això comporta una desaparició de transportadors de membranes intracel.lulars que ja es posa de manifest als 30 min d'iniciar-se l'estimulació amb insulina (la qual és perfundida al quart posterior de la rata i posteriorment es procedeix a aïllar el múscul) (Klip et al., 1990). El tractament agut amb insulina (20 min) no modifica el nombre de transportadors de glucosa en preparacions de membrana total, el que suggereix la no participació de síntesi proteica en aquesta acció de la insulina, la qual cosa seria consistent amb observacions realitzades en adipòcits de rata (Cushman, S.W. et al., 1980; Wardzala, L.J. et al., 1978). Això comportaria l'existència d'un pool de transportadors en algun locus intracel.lular, a l'igual que ja s'havia observat en adipòcits, tot i que aquesta localització podria ser molt diferent per ambdós tipus de cèl.lules. En adipòcits, el pool de transportadors intracel.lulars és al menys 4 vegades superior al de membrana plasmàtica, mentre que en el sarcòmer, la concentració de transportadors intracel.lulars ve a ser del mateix ordre que la de transportadors del sarcolema (Fushiki et al., 1989; Klip et al., 1987), segons assaigs d'unió a citocalasina-B.

Hi ha, però, una discordància entre les dades fisiològiques i les moleculars; així com l'increment en el nombre de transportadors en el sarcolema és de dues vegades, l'observat en la captació de glucosa és de 5 vegades en paquets del quart posterior (Klip et al., 1987), 3 vegades en gastrocnemius blanc i 8 vegades en gastrocnemius vermell (Plough et al., 1987). És a dir, l'increment en el nombre de transportadors no explicaria totalment aquest increment en la captació de glucosa per acció de la insulina.

En adipòcits de rata, la insulina provoca la translocació tant de GLUT-1 com de GLUT-4 (Oka et al., 1988), tot i que aquests transportadors es localitzen en diferents compartiments intracel·lulars (Zorzano et al., 1989); de totes maneres el GLUT-4 és el transportador sotmès a una més important mobilització per acció de la insulina i de fet és el responsable de l'increment en el transport de glucosa induït per la insulina. Aquest aspecte sembla estar més subjecte a una característica específica del teixit que a una particularitat del GLUT-4.

En múscul, hi ha molt poca informació respecte a la localització subcel·lular de GLUT-1 i GLUT-4. No obstant, s'ha descrit l'elevada presència de GLUT-4 en membranes properes a o en el tubul T (Friedman et al., 1991). A més s'ha observat que la insulina provoca la translocació de GLUT-4 cap al sarcolema, però no la de GLUT-1 (Mitsumoto et al., 1991).

L'efecte de la insulina estimulants el transport de glucosa (Taula-1) no queda blocat en múscul esquelètic de rata en presència de colquicina (disruptor dels microtúbuls) o bé en presència de citocalasina-D (disruptor dels microfilaments).

TAULA-1: Efecte de la colquicina i la citocalasina-D sobre la captació de 3-O metilglucosa en músculs EDL.

	Basal	Insulina
	(nmols MeGlu / g múscul x 30 min)	
Control	7.8 ± 0.5	17.6 ± 1.0
Colquicina, 5µM, 3h	8.7 ± 1.1	17.7 ± 1.0
Citocalasina D, 50 µM, 3h	8.6 ± 0.9	16.3 ± 1.9

(Extret de: Gumà et al., E).

Els resultats indiquen que l'efecte de la insulina estimulants el transport de glucosa no requereix ni d'activitat de microtúbuls ni de microfilaments. En conseqüència, si la translocació de transportadors de glucosa és un element essencial en l'acció de la insulina, aquesta no requereix ni de microtúbuls ni de microfilaments. Aquest fet podria explicar-se si les vesícules intracel·lulars riques en transportadors de glucosa estiguessen, ja en estat basal, molt properes a la superfície cel·lular. En aquest sentit resulta interessant apuntar que en el teixit adipós, on com ja hem comentat, hi ha un clar efecte de la insulina translocant transportadors de glucosa a la membrana plasmàtica, la colquicina tampoc aconseguix inhibir aquesta acció (Håring et al., 1979).

B.2.2. Transport d'aminoàcids.

El transport d'aminoàcids en teixits animals és portat a terme per diferents sistemes de transport localitzats en la membrana plasmàtica, cada un dels quals presenta una especificitat característica per als diferents aminoàcids. Tan sols un d'aquests sistemes ha estat purificat a cèl·lules d'Ehrlich (McCormick i Johnstone, 1988) pel que fa a eucariotes, mentre que a procarïotes, l'anomenat sistema L ha estat purificat a partir d'E.coli (Oxender, D.L., 1972). Aquests sistemes de transport clàssicament s'han diferenciat per l'especificitat de substrats transportats, per la possibilitat de realitzar un co-transport amb Na^+ i pels factors que els regulen.

El sistema A i L foren inicialment descrits per Oxender i Christensen al 1963 (Oxender i Christensen, 1963) en cèl·lules de Ehrlich. El sistema ASC fou descrit dos anys més tard en la mateixa línia cel·lular per Winter i Christensen (Winter i Christensen, 1965). Aquests sistemes es localitzen en la majoria de tipus cel·lulars (el sistema A tan sols no s'ha trobat en eritròcits o reticulòcits). El sistema Gly és una variant del sistema A, que no sembla estar sotmès a cap tipus de regulació ni és sensible a baixades de pH. Fou descrit a eritròcits de porc al 1975 per Christensen (Christensen, 1975); també ha estat trobat a hepatòcits de conill i a cèl·lules HTC. El sistema N tan sols ha estat localitzat en hepatòcits de rata, on va ser descrit per Kilberg l'any 1980 (Kilberg et al., 1980). El sistema y+, que ja fou descrit l'any 1964 en cèl·lules de Ehrlich per Christensen (Christensen, 1964), sembla ser també específic

de cèl.lules hepàtiques, tot i que s'ha descrit la seva presència a cèl.lules renals (Ullrich 1979); el seu substrat específic és l'àcid 4-amino-1-guanilpiperidina-4 carboxílic (GPA) (Christensen et al., 1971). L'abans anomenat sistema GLU i que avui dia s'ha vist que comprén diferents sistemes de transport, es localitza tant a ronyó com a cervell, essent capaç de transportar GABA en aquest darrer teixit (Peterson et al., 1972). A la Taula-2 es dóna referència dels darrers coneixements que es tenen d'aquests sistemes de transport i d'altres dels quals la seva importància fisiològica encara no és ben coneguda (veure Christensen, 1990).

TAULA-2: Sistemes de transport d'aminoàcids.

Sistemes per aminoàcids dipolars:

1. Sistemes Na⁺-dependents.

Sistema Gly:

Transporta Gly i Sar (sarcosina, derivat metilat de la Gly).
Està ampliament distribuït en els diferents teixits.
Sistemes anàlegs: Imino, iminoglicina i epitelials.

Sistema A:

Transporta la major part d'aminoàcids dipolars.
Localització ubíqua.
Està sotmés a diversos tipus de regulació:
- Regulació adaptativa.
- Regulació hormonal.
- Transinhibició.
- Modulació per oscil.lacions de pH.

Aquests dos sistemes poden transportar grups N-metilats (excepcionalment el N-(metil)aminoisobutíric, MeAIB, no és transportat pel sistema Gly).

Sistema ASC:

No transporta aminoàcids N-metilats, però pot transportar Pro; accepta anàlegs aniònics d'aminoàcids. Pot transportar Arg de manera Na⁺-independent.
Localització ubíqua, amb variacions en l'extensió.
Regulació:
- Trans-estimulació.
Sistemes anàlegs: en eritròcits s'han trobat sistemes asc, independents de Na⁺.

Sistema B⁺:

Accepta aminoàcids catiónics i bicíclics, tot i la seva grandària. És un sistema molt extès a oocits, blastòcits, i probablement a la regió de "raspall" (Brush border) de cèl.lules renals i intestinals.

Sistemes anàlegs: b⁺, és un sistema trobat a blastòcits preimplantats de ratolí, que no és dependent de Na⁺ i que es troba més limitat per la posició de la ramificació del substrat transportat.

Sistema N:

Transporta Gln, Asn i His; pot co-transportar Li⁺.

Està restringit a hepatòcits.

Regulació:

- Regulació adaptativa.

- Inhibible per baixades de pH.

Sistemes anàlegs: N^m, transportadors de Gln del múscul.

Sistema β (β-System):

Transporta β-Ala, Tau i 4-aminobutirat.

Sistemes anàlegs: hi ha un sistema específic per 4-aminobutirat.

2. Sistemes Na⁺-independents:**Sistema L:**

Transporta aminoàcids bicíclics; tolera substrats amb cadenes grans i ramificades; té una elevada capacitat per a realitzar intercanvi d'aminoàcids.

Té un substrat específic, el 2-amino-norborà-2-àcid carboxílic (BCH).

Localització ubíqua.

Regulació:

- Transestimulació.

Sistemes anàlegs: s'han diferenciat dos tipus de sistemes L (L₁ i L₂); el primer transporta essencialment histidina, mentre que el segon transporta leucina. En incubacions d'hepatòcits apareix un anàleg de baixa Km.

Sistema T:

Té preferència pels aminoàcids amb grups benzé (Trp i Phe).

S'ha localitzat a eritròcits i hepatòcits.

Sistemes anàlegs: sistema t, en lisosomes de fibroblasts.

Sistemes per aminoàcids catiònics:
(Na⁺-dependents)

Sistema y⁺:

Transporta Arg, Orn, Lys i His; no discrimina entre Arg i Lys (i homòlegs). Substrat específic: GPA.
Localització ubíqua.
Sistemes anàlegs: variants en lisosomes i en blastòcits de ratolí no accepten homoser + Na⁺.

Sistemes per aminàcids aniònics:

1. Sistemes Na⁺-dependents (abans sistema GLU):

Sistema X_{AG}:

Presenta reactivitats similars per Asp⁻ i per Glu⁻.
Localització ubíqua, fins i tot a les neurones.

Sistema X_A:

Forma protonada de l'ASC; exclou Glu⁻ i anàlegs més grans.

2. Sistemes Na⁺-independents:

Sistema x_G:

Transporta Glu⁻ i anàlegs però exclou Asp⁻ i anàlegs curts.

Sistema x_C:

La cistina competeix i s'intercanvia amb Glu⁻, i en ocasions provoca un bloqueig d'aquest intercanvi.

La utilització de substrats no metabolitzables ha resultat d'interès per a la caracterització cinètica dels diferents sistemes de transport. Així els sistemes A i ASC que poden transportar l'anàleg aminoacídic no metabolitzable, àcid α-aminoisobutíric (AIB), varen ser diferenciats per la capacitat que tenia el primer de transportar derivats N-metilats dels seus substrats; amb la introducció de l'àcid α-(metil)aminoisobutíric (MeAIB) (Christensen et al., 1967) es varen poder realitzar estudis de caracterització cinètica de cadascun d'ells, ja que el sistema A s'ha descrit com un sistema Na⁺-dependent que transporta alanina i és inhibible per la presència de MeAIB.

El sistema A és un dels sistemes més sensibles a les variacions de pH; en

preparacions de vesícules de fetge humà s'observa que la caiguda de pH des de 7.5 fins a 6.5 inhibeix el transport un 75% mentre que la pujada de pH des de 7.5 fins a 8 l'inhibeix un 90% (Mailliard i Kilberg, 1990).

Tanmateix, s'ha descrit que el sistema A s'adapta a l'estat de creixement cel·lular. Així s'ha observat que respon a factors de creixement (Riggs, 1970), a canvis en la densitat cel·lular (Foster i Pardee, 1969; Robinson, 1976; Borghetti et al., 1980) i a fenòmens de transformació (Parnes i Isselbacher, 1978; Foster i Pardee, 1969; Borghetti et al., 1980), en diferents tipus cel·lulars. En cultius de cèl·lules MDCK, en arribar a l'estat de confluència s'incrementa la concentració d'aminoàcids intracel·lulars; aquests inhibeixen el sistema A per un procés dependent de la síntesi de RNA i de proteïna (Handlogten i Kilberg, 1984); s'ha especulat que aquest efecte podria tenir lloc a través d'una proteïna (TIP, Transport Inactivating Protein), que s'origina per un mRNA sense cua de poli-A i que interactua a nivell transcripcional (Handlogten i Kilberg, 1984).

Igualment en estudis de regeneració hepàtica s'ha observat que posteriorment a l'hepatectomia parcial en rates, hi ha un marcat increment en l'activitat del sistema A (Dolais-Kitabgi et al., 1981).

Tanmateix, la transformació cel·lular també afecta l'activitat de transport del sistema A; així en cultius de cèl·lules MDCK-T₁, l'estat basal de captació, respecte a controls de cultius de cèl·lules MDCK no tumorals, és de 3 a 7 vegades superiors (Saier et al., 1988).

A continuació descriurem alguns dels principals mecanismes que regulen el sistema A de transport d'aminoàcids:

- TRANSINHIBICIÓ:

Els propis substrats transportats són capaços d'exercir un control negatiu sobre el seu transportador, des de l'interior cel·lular. Els mecanismes pels quals realitzen aquest efecte, inicialment s'han atribuït a una acció directa sobre el transportador sense participació de processos de síntesi protèica o de transcripció gènica.

- REGULACIÓ ADAPTATIVA:

És la capacitat que té el sistema de regular la seva taxa de transport en funció de l'assequibilitat de substrats dels quals disposa. Així en medis carents d'aminoàcids, hi ha un increment en l'activitat de transport, que ha estat observat *in vivo* (Fehlmann et al. 1979a) i *in vitro*, en incubacions de diferents teixits (Riggs i Pan, 1972; Smith et al., 1973; Reynolds i Segal, 1976) i en cultius cel·lulars (Peck et al. 1976; Hume i Lamb, 1976; Guidotti et al. 1975).

Estudis sobre les característiques cinètiques de la regulació adaptativa demostren que la carència d'aminoàcids indueix generalment un increment en V_{max} , mentre que la K_m en segons quins estudis no presenta variacions, però en segons quins altres, disminueix. Així, Fehlmann i col. (Fehlmann et al., 1979a), descriuen que en situació de carència d'aminoàcids apareixen transportadors d'alta afinitat en cultius d'hepatòcits de fetge de rata; segons els autors, aquests transportadors presenten les característiques d'un sistema A "pur". L'aparició d'una forma de transportador d'alta afinitat, no sempre caracteritza aquest fenomen. Així en úter (Riggs i Pan, 1972), en cèl·lules de cor d'embrió de pollastre (Gazzola et al., 1972), talls de còrtex de ronyó (Reynolds i Segal, 1976) i cultius primaris d'hepatòcits (Kelley i Potter, 1978), la regulació adaptativa implica un increment en la V_{max} , mentre que en la K_m no observen variacions. Altrament, estudis en placenta humana (Smith et al., 1973), en cèl·lules HeLa (Hume i Lamb, 1976) i cèl·lules L6 (Logan et al. 1982), expliquen la regulació adaptativa per un increment en la V_{max} i una disminució en la K_m .

Aquesta forma de control implica la participació de processos de síntesi de RNA i de proteïnes (Gazzola et al. 1972 i 1981; Shotwell et al. 1983). L'increment de la transcripció esdevé dintre del marge de 30 min des de l'inici de la deplecció d'aminoàcids del medi, en fibroblasts humans en cultiu (Gazzola et al. 1981); l'actinomicina-D, inhibidor de la síntesi de mRNA, no és funcional en la prevenció de l'increment del transport quan és afegit 90 min després d'iniciar-se el dejuni aminoacídic, però l'addició de cicloheximida, inhibidor de la traducció, a partir del minut 90, produeix un bloqueig de l'increment en el transport. Si els mecanismes de regulació adaptativa impliquen canvis en la transcripció del gen que codifica pel sistema A, el mRNA resultant hauria d'ésser força estable, donada la sensibilitat que presenta el fenomen a l'acció de la cicloheximida després de 90 min d'haver-se

estimulat. Alternativament, els canvis transcripcionals podrien implicar l'expressió d'un gen que codifiqui per a una "proteïna modificadora" del sistema A; en aquest cas no cal postular una marcada estabilitat del mRNA perquè la proteïna produïda seria d'esperar molt més estable que el mRNA. Experiments amb tunicamicina (Barber et al., 1983; Kilberg, 1986), inhibidor de la N-glicosilació de proteïnes, resulten en una inhibició de la regulació adaptativa en hepatòcits de rata, per la qual cosa s'ha proposat la hipòtesi que aquesta "proteïna modificadora" podria tractar-se d'una glicoproteïna.

Aquest fenomen seria el de "des-repressió" en el marc més ampli de la regulació adaptativa, ja que existeix el fenomen contrari de "repressió". Aquest últim esdevé amb la reparació de determinats aminoàcids en el medi extracel·lular. Aquests aminoàcids són els substrats del sistema A, incloent l'AIB (Gazzola et al., 1972; Felhmann et al., 1979a) i el MeAIB (Shotwell et al., 1981). També aquests substrats generen el fenomen de transinhibició sobre l'activitat del sistema A (Jacquez, 1975; Kelley i Potter, 1978; Gazzola et al. 1980) el qual interferiria en la quantificació del fenomen de "repressió".

De tota manera, no tots els substrats del sistema A són capaços de reprimir individualment la síntesi del sistema A, en absència de la resta de substrats, segons estudis realitzats en cèl·lules CHO (Moffet i Englesberg, 1986) i MDCK (Boerner i Saier, 1985). Fins i tot, aminoàcids que no eren substrats d'aquest sistema podien inhibir la desrepressió (β -alanina, histidina i hidroxiprolina) (Englesberg i Moffet, 1986). Alhora, el fet que tant el MeAIB com l'AIB foren inductors de la repressió, demostrava que la metabolització del substrat transportat no era requerida per a aquesta inducció (Saier et al., 1988).

L'estudi del grau de repressió que generaven els diferents aminoàcids sobre el sistema A, no es correlacionava amb la taxa de transport del mateix (Boerner i Saier, 1985). Aquests resultats, juntament amb els de Moffet i Englesberg, 1986, no estaven d'acord amb el model proposat per Gazzola i col. (1981) en el sentit que els substrats del sistema A el reprimirien o inactivarien directament a través de la seva unió al sistema.

La repressió del sistema A és un procés dependent de la síntesi de mRNA i de proteïnes, segons estudis amb cultius de fibroblasts d'embrió de pollastre (Franchi-

Gazzola et al., 1973) i humans (Guidotti et al., 1978).

Els requeriments de la síntesi de mRNA pel procés de desrepressió en el context de la regulació adaptativa, s'ha estudiat amb detall utilitzant inhibidors específics de la polimerasa poli(A), cordicepina i adenina-9- β -D-arabinopiranosid. Ambdós inhibidors produeixen un blocatge complet de la desrepressió, sense afectar la repressió del sistema A (Kilberg, 1986). Aquestes observacions permeten suggerir dos postulats:

- a) el mRNA que codifica per a la glicoproteïna associada al sistema A, la qual es requeriria per a incrementar el transport en resposta a la carència d'aminoàcids, posseiria una cua de poli-A.
- b) el mRNA que codifica per a la proteïna responsable de la repressió dependent d'aminoàcids podria pertànyer a una petita classe de mRNA que no tenen cues de poli(A); entre els membres d'aquesta classe estan els d'histones lligades a DNA, que es troben implicades, directa o indirectament, en la regulació de l'expressió gènica.

En funció de les dades de què es disposen, actualment coexisteixen dos models (Figura-2) que intenten explicar els fenòmens de regulació adaptativa (Kilberg, 1986):

A. Model de Kilberg (per a la regulació adaptativa del sistema A en fetge de rata).

Repressió: Els aminoàcids, a nivell intracel·lular, activarien la transcripció d'un gen que codificaria per a una proteïna reguladora de l'expressió gènica, que específicament inhibiria la transcripció del gen (o del conjunt de gens), l'expressió dels quals donaria lloc a un sistema A actiu.

Desrepressió: Tant la manca d'aminoàcids, com l'acció de diverses hormones, produirien una activació de la síntesi del complex A actiu.

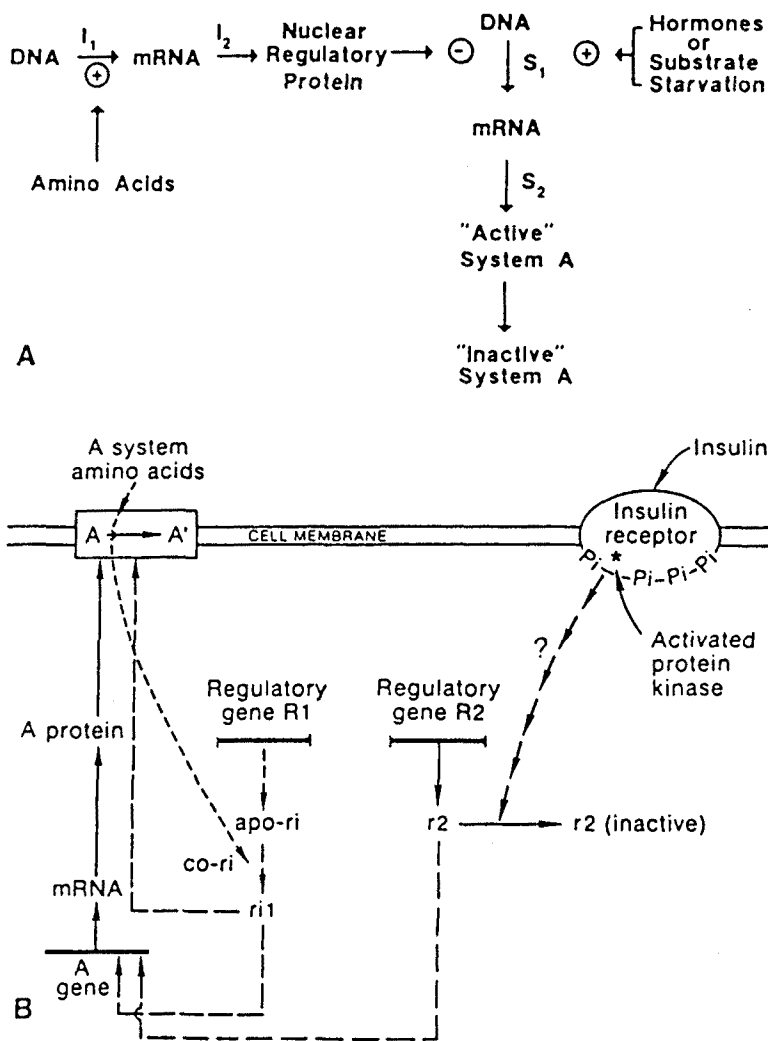
B. Model de Englesberg (per a la regulació adaptativa del sistema A en cèl·lules CHO.K1).

Repressió: Existirien dos gens reguladors (R_1 i R_2) que controlarien la síntesi del sistema A; el primer codificaria per a un apo-repressor/inactivador (apo-ri) i es trobaria en equilibri amb un repressor/inactivador (ri1). Diversos aminoàcids podrien funcionar com a co-repressors o co-inactivadors dels dos productes (co-ris). La unió d'un co-ri a un apo-ri decantaria l'equilibri cap a la forma ri1. ri1 s'uniria a una regió controladora del gen estructural del sistema A, inhibint la seva transcripció.

El gen R_2 produiria un repressor constitutiu (r_2). r_2 i ri_1 regularien l'expressió del gen que codificaria pel sistema A. La insulina seria capaç de neutralitzar r_2 .

Desrepressió: La manca d'aminoàcids induiria que l'equilibri entre apo- ri i ri_1 es decantés cap a apo- ri , alliberant així el gen estructural del sistema A del control negatiu al qual estava sotmès.

FIGURA-2: Models que expliquen els fenòmens de regulació adaptativa.



(Extret de: Saier et al., 1988).

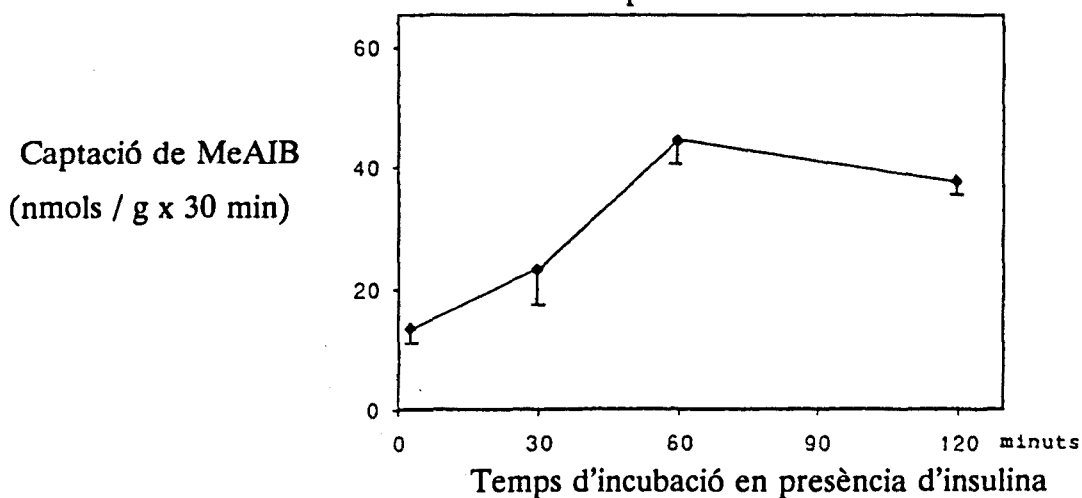
-REGULACIÓ HORMONAL: efectes de la INSULINA.

S'ha observat que el sistema A és sensible a diferents hormones entre les que destaquem la insulina (Kipnis i Noall, 1958), el glucagó (Fehlmann, 1972), el factor epidermal de creixement -EGF- (Moule, 1987), l'adrenalina (Scott et al. 1972) i els glucocorticoïds (Fuller i Baker, 1975), a teixits tals com el múscul, el fetge o el teixit adipós. Estudis amb vesícules de fibroblasts 3T3, implicaven el cAMP i la proteïna quinasa dependent de cAMP (PQ-A) com a reguladors negatius del sistema A (Nilson-Hamilton i Hamilton, 1979). Contràriament, l'acció del glucagó sobre el sistema A és estimuladora en hepatòcits (Kilberg i Neuhaus, 1977); el glucagó, que també estimula la producció del AMPc, s'ha suggerit la hipòtesi que exerceix la seva acció sobre el sistema A mitjançant la mobilització de Ca^{2+} intracel.lular (Kelley et al., 1980).

Els primers treballs on es detecten efectes de la insulina sobre la captació d'aminoàcids (Kipnis i Noall, 1958), descriuen una acció estimuladora de la insulina sobre la captació d'AIB en preparacions de diafragma incubat, que ja es comença a manifestar als 30 min d'acció de la insulina.

En estudis preliminars que portàrem a terme en músculs extensor digitorum longus, EDL, incubats (Gumà et al., 1988, A), vàrem observar que l'acció de la insulina sobre la captació de MeAIB, 0.1 mM (concentració inferior a la de la seva Km), era ràpida (apreciable als 30 min, i assolía estimulacions màximes als 60 min -increments de dues vegades la captació basal-) (Figura-3).

FIGURA-3: Efecte de la insulina sobre la captació de MeAIB.



(Extret de: Gumà et al., 1988, A)

Aquests resultats estan d'acord amb els d'altres autors que descrivien que l'acció de la insulina era independent de síntesi proteica o de RNA per la insensibilitat que presentava a la cicloheximida, a la puromicina i a la actinomicida-D, en cèl.lules de cor de pollastre (Elsas, et al. 1975).

Aquestes dades les vàrem confirmar en EDL on observàrem que l'efecte de la insulina sobre la captació de MeAIB era independent de la síntesi protèica atès que no es veia alterat per l'acció de la cicloheximida (Gumà et al., 1988, A) (Taula-3).

TAULA-3: Efecte de la cicloheximida sobre l'acció de la insulina estimulant la captació de MeAIB a músculs EDL.

	Basal	Insulina, 200nM, 60 min
	(nmols MeAIB / g x 30 min)	
Control	17.9 ± 0.7	29.9 ± 1.8
Cicloheximida, 0.1 mM, 90 min	17.1 ± 1.9	27.2 ± 2.5

En miòcits de cor de pollastre en cultiu i en diafragma aïllat de rata, la cinètica indicava un increment en la Vmax del component saturable de la captació d'AIB (Elsas et al. 1975; Manchester et al. 1971). D'acord amb aquestes dades, la caracterització cinètica de la captació de MeAIB basal i estimulada per la insulina en músculs EDL, ens indicava un increment (del doble) de la Vmax sense modificacions en la Km (Gumà et al., 1988, A).

Recentment aquestes dades han estat qüestionades pel grup de Maroni i col. (1990) que en incubacions de músculs epitroclearis de rates adultes, observen una apreciable disminució de la Km, sense canvis aparents en la Vmax (Maroni et al., 1990).

En hepatòcits aïllats de rata (Fehlmann et al. 1979b), on l'efecte de la insulina es manifestava a més llarg temps (2 h), la cinètica indicava un efecte estimulador de la Vmax sense canvis en la Km i l'acció de la insulina era inhibible per la cicloheximida, el que implicava la participació de processos de síntesi proteica.

Addicionalment, el grup de Jeanrenaud (Prentki et al., 1981) observa una

inhibició (80%) de l'acció de la insulina sobre la captació d'AIB en hepatòcits aïllats de rata, per efecte de la colquicina, disruptor del moviment microtubular.

Estudis que realitzàrem amb hepatòcits aïllats de rata (Taula-5) ens corroboraren les dades de Jeanrenaud, en obtenir inhibicions de fins al 75% de la captació de MeAIB estimulada per la insulina. En canvi ni la colquicina ni la citocalasina-D (disruptor dels filaments d'actina) no afectaven l'acció de la insulina estimulants la captació de MeAIB en músculs EDL (Gumà et al., E) (Taula-4).

TAULA-4: Efectes de la colquicina i de la citocalasina-D sobre l'acció de la insulina estimulants la captació de MeAIB a EDL.

	Basal (nmols MeAIB / g x 30 min)	Insulina, 100 nM, 1 h	% d'acció
Control	27.5 ± 2.2	41.9 ± 3.5	52%
Colquicina, 5 µM, 120 min	20.8 ± 2.6	37.7 ± 4.3	81%
Citocalasina D, 50 µM, 180 min	23.6 ± 2.5	36.2 ± 1.7	53%

TAULA-5: Efecte de la colquicina sobre l'acció de la insulina estimulants la captació de MeAIB en hepatòcits.

	Basal (nmols MeAIB / 10 ⁶ cèl.lules x 10 min)	Insulina, 100 nM, 1h	% d'acció
Control	1.22 ± 0.18	2.54 ± 0.13	108%
Colquicina, 0.5 µM, 120 min	1.39 ± 0.22	1.78 ± 0.07	28%

Efectivament, el model d'acció de la insulina era diferent per ambdós tipus cel.lulars.

És un fet conegut que la insulina provoca l'hiperpolarització de la membrana plasmàtica de múscul esquelètic (Zierler, 1951 i 1960), on s'ha observat (músculs soleus) que la sortida de ²²Na es duplica per efecte de la insulina (Clausen, 1975), alhora que s'estimula l'entrada de K⁺ (músculs EDL) (Zierler, 1964). Així

mateix ha estat descrit que la insulina provoca l'activació de la bomba Na^+/K^+ en limfòcits (Hadden et al., 1972) i que produeix un blocatge de la inhibició d'aquesta activitat per cAMP en membranes de fetge de rata (Luly et al., 1972), tot i que en aquests sentit Zierler i col. no varen trobar cap efecte de la insulina sobre aquesta activitat, en múscul esquelètic (Rogus, et al., 1969). Donats aquests precedents, resultava interessant investigar la possible participació de l'hiperpolarització de la membrana plasmàtica en l'acció de la insulina activant el sistema A, el qual com ja s'ha fet esment, realitza un co-transport cap a l'interior cel.lular, dels aminoàcids amb Na^+ , en una relació 1:1 (Lever et al., 1984).

En estudis amb múscul perfundit (Zorzano et al., 1986) es va observar que la ouabaïna, inhibidor de la ATPasa Na^+/K^+ , inhibia la captació basal d'AIB fins a un 80% després de 30 min d'acció. Malgrat aquest efecte, el percentatge d'acció de la insulina resultava inalterat. Amb un altre model experimental, en incubacions de músculs EDL vàrem intentar corroborar aquestes dades, estudiant la captació de MeAIB. Ni ouabaïna per si sola, ni amb combinació amb gramicidina-D, ionòfor amb el qual anulavem el gradient electroquímic de Na^+ , aconseguien afectar l'acció estimuladora de la insulina, tot i malmetre considerablement la captació basal (Gumà et al., 1988, A) (Taula-6).

TAULA-6: Efecte de l'ouabaïna i de la Gramicidina D sobre l'acció de la insulina estimulant la captació de MeAIB en músculs EDL.

	Basal	Insulina, 200 nM, 1 h
	(nmols MeAIB / g x 30 min)	
Control	15.2 ± 1.2	30.7 ± 0.7
Ouabaïna (1mM, 60 min)	7.7 ± 0.4	13.0 ± 0.4
Gramicidina-D (25 µg/ml, 30 min)	7.0 ± 0.8	18.3 ± 2.1
Ouabaïna+Gramicidina-D	4.6 ± 0.6	11.0 ± 1.8

Resumint, ja hem vist que la insulina estimula al voltant d'un 100% la captació de MeAIB. Aquest procés té lloc a curt termini (60 min), i és independent de síntesi proteica (Gumà et al., 1988, A). L'estimulació de la captació de MeAIB no

requereix d'una activitat microtubular, el que induiria a pensar en la no participació d'un procés de translocació de transportadors ja sintetitzats des d'un locus intracel·lular cap a la membrana plasmàtica, a menys que els esmentats transportadors ja estiguessin localitzats tan a prop de la membrana que no precisessin d'aquests mecanismes per a la seva translocació. A més, processos com la regulació adaptativa (Gumà et al., 1988, A) o l'acció estimuladora de la insulina sobre el transport de MeAIB en hepatòcits aïllats de rata, ambdós dependents de síntesi proteica, sí que són sensibles a l'acció de la colquicina (Gumà et al., E).

Les caracteritzacions cinètiques en múscul no ens aclareixen els mecanismes d'acció de la insulina; alguns l'atribueixen a un increment en la V_{max} , mentre que d'altres impliquen la disminució de la K_m en l'acció de la insulina sobre el sistema A. Aquesta variabilitat cinètica observada en resposta a la insulina pot ser deguda a diversos factors, a saber, diferents músculs podrien presentar una diferent resposta en funció del tipus de fibres que els conformarien, i en un mateix tipus de múscul, el grau de desenvolupament del teixit pot comportar una diferent resposta del sistema A vers la insulina.

Pel que fa a les dades cinètiques que més directament entren en contradicció amb les nostres observacions (Maroni et al., 1990), convindrà tenir en compte que mentre aquest autors treballen amb múscul epitroclearis, el qual curiosament tan sols és present en un 20% dels humans tot i que en rates sempre existeix (Greene, 1963), provinent de rates adultes, els nostres treballs han estat realitzats amb múscul EDL de rates recent deslletades, de 21 a 25 dies d'edat. Els músculs epitroclearis estan en la seva major part (80%) formats per fibres blanques de contracció ràpida, i la resta per fibres vermelles de contracció ràpida i de contracció lenta, en iguals proporcions, mentre que els EDL estan formats en un 60% per fibra blanca de contracció ràpida i la resta, per fibra vermella de contracció ràpida.

En base a les nostres dades, no creiem que hi hagi un efecte de la insulina sobre l'afinitat del MeAIB vers el sistema A, tot i que no es pot descartar un possible efecte sobre la K_m del Na^+ pel transportador, ja que aquest estudi no ha estat portat a terme.

L'increment en la V_{max} que observem pot ésser degut a un augment en el

nombre de transportadors a la membrana, i/o a una més elevada activitat intrínseca del transportador. Tenint en compte que alguns autors han descrit que la insulina estimula el transport de glucosa per una inducció de la translocació de transportadors des de l'interior cel.lular fins a la membrana plasmàtica en múscul (Klip et al., 1987a), a l'igual que previament ja havia estat suggerit pel teixit adipòs (Cushman i Wardzala, 1980; Suzuki i Kono, 1980), cal tenir en consideració que la insulina pugui estar realitzant un efecte similar pel que fa a l'estimulació del sistema A. En aquest sentit, les observacions que hem realitzat ens permeten concloure que l'efecte de la insulina sobre el sistema A, així com sobre el transport de glucosa, no resulta inhibit per la disrupció de microtubuls ni de microfilaments en músculs EDL, tot i que aquest fet no permet descartar el fenomen de la translocació de transportadors, ja que a teixit adipós, on s'hi que està ben comprovada l'existència d'aquest fenomen, tampoc la disrupció dels microtúbuls implica una inhibició de l'estimulació del transport de glucosa per la insulina (Häring et al., 1979). En tot cas, les nostres dades permeten suggerir que aquest procés de translocació podria no dependre d'una adequada funció microtubular.

Finalment, hem descrit que l'acció de la insulina incrementant el gradient electroquímic de Na^+ , no és la causant de l'augment de la captació de MeAIB per acció d'aquesta hormona. Si la insulina és capaç de modificar la velocitat del transport, ho ha de fer per altres mecanismes. Posats a especular sabem que la insulina, a través del seu receptor, genera una cascada de fosforilacions i desfosforilacions de diverses proteïnes intracel.lulars; desconexim si l'acció de la insulina implicaria una modificació de l'estat de fosforilació del sistema A, ja que aquests estudis no es podran portar a terme fins que disposem d'eines per a treballar amb la propia molècula que constitueix el sistema A de transport d'aminoàcids.

Annex a l'apartat B.2.2: L'estat de la qüestió sobre els treballs orientats a la purificació del sistema A.

Diverses estratègies han estat utilitzades per assolir la purificació del sistema A de transport d'aminoàcids. Ressenyarem les següents per ser les que actualment s'estan utilitzant:

- a. Reconstitució de proteïnes de membrana en liposomes (McCormick et al., 1984).
- b. Expressió de l'activitat de transport del sistema A després de la injecció de mRNA en oòcits de *Xenopus laevis*, procedent de cèl.lules amb elevada activitat del sistema A (Palacín et al., 1990; Tarnuzzer et al., 1990).
- c. Utilització de modificadors de proteïnes, amb l'objectiu de disposar d'un compost que presenti elevada afinitat pel transportador (Pola et al. 1990; Bertran et al., 1991).

Amb les tècniques de reconstitució, McCormick i Johnstone al 1988 obtenen la purificació d'un pèptid de 120.000-130.000 de pes molecular que és identificat com el component quantitativament més important dels transportadors d'aminoàcids Na⁺-dependents en les cèl.lules ascítiques d'Ehrlich; en aquest tipus cel.lular és on va ser identificat el sistema A al 1963 per Oxender i Christensen. Sols han estat descrits tres sistemes de transport funcionals en aquestes cèl.lules: el sistema A, ASC i el sistema Na⁺-independent L (Oxender i Christensen, 1963; Christensen et al., 1967). Segons unes proves realitzades al nostre laboratori, l'anticòs que reconeix aquest component no immunoprecipita amb cap dels peptids procedents de membrana de fetge de rata (M.Camps, J.Bertran i A. Roca, resultats no publicats).

Hi ha evidències que el sistema A és una glicoproteïna (Barber et al. 1983; Kilberg et al, 1985) que presenta afinitat a la concanavalina A (Quesada i McGivan, 1988). També ha estat identificat un pèptid de 20.000 de pes molecular com a un component indispensable pels transportadors d'alanina (A i ASC) en membrana plasmàtica de fetge de rata (Hayes i McGivan, 1983).

Les tècniques de microinjecció de mRNA en oòcits de *Xenopus* han aportat informació sobre el mRNA que codifica per a l'activitat de transport d'aminoàcids del sistema A (Palacín et al., 1990; Tarnuzzer et al., 1990). Els oòcits de *Xenopus* tenen una activitat basal de transport d'aminoàcids baixa i que pel cas dels aminoàcids neutres ja ha estat descrita (Campa i Kilberg, 1989). És doncs un bon sistema per a

expressar mRNA procedent d'altres tipus cel.lulars que presenten una elevada activitat del sistema A atribuïda a un més gran nombre de transportadors funcionals, com és el cas de la línia de cèl.lules d'ovari de hámster xinès (CHO.K1), així com determinats mutants de la mateixa línia cel.lular (ala⁴-H3.9), o teixits com la placenta o el fetge de rata que presenten una expressió constitutiva del transport d'aminoàcids mediat pel sistema A. En altres casos aquesta elevada expressió pot ser induïda per acció hormonal. Microinjectant mRNA poli(A⁺) procedent de fetge de rata estimulat amb glucagó, de placenta humana i de les dues línies de cèl.lules CHO ja comentades, s'ha observat que la fracció de mRNA de 2-2.5 kilobases, és la que presenta associada l'activitat de transport d'aminoàcids atribuïble al sistema A (Tarnuzzer et al. 1990; Palacín et al., 1990).

Les tècniques d'utilització de modificadors de proteïna ens han donat informació addicional sobre les característiques estructurals del transportador; així amb la utilització de modificadors de grups tiol, com la N-etilmaleimida (NEM) o la iodoacetamida (IA), en preparacions de vesícules de membrana plasmàtica de fetge, ha permés detectar la presència de residus de cisteïna crítics per a l'activitat funcional del sistema A i ASC. A més s'han observat diferències en la localització topològica dels grups tiol en els transportadors A i ASC (Pola et al., 1990). Igualment utilitzant dietilpirocarbonat (DEPC), reactiu que modifica específicament els residus d'histidina, s'ha suggerit la participació d'alguns d'aquests residus del sistema A en la dependència que aquest presenta a les variacions de pH (Bertran et al. 1991).

Donat l'esforç investigador que s'està realitzant en l'actualitat en aquesta àrea, és d'esperar que aviat puguem disposar de dades més concretes sobre les característiques estructurals del sistema A, a partir de la seva purificació i clonatge.

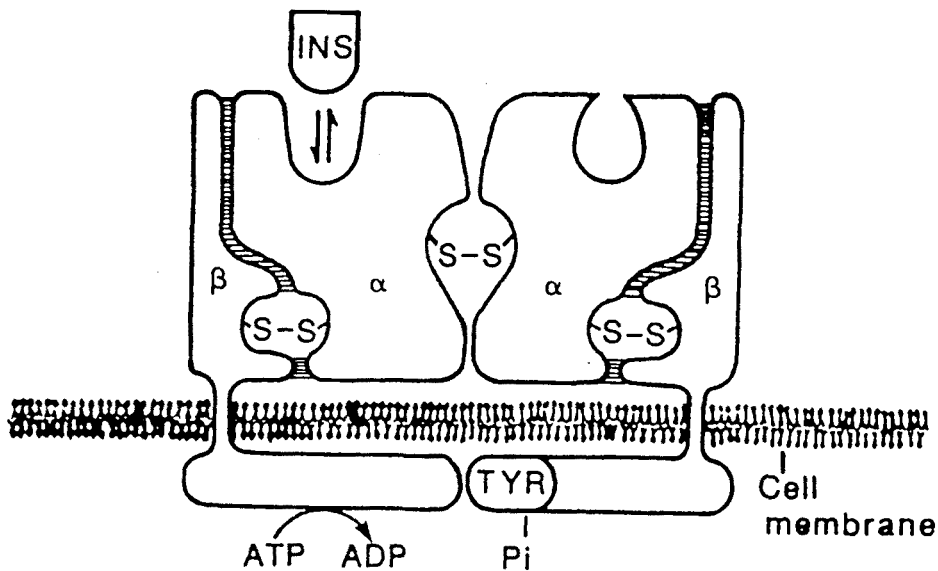
B.3. Transducció de l'acció de la insulina sobre l'activitat de transport del sistema A.

B.3.1. El receptor de la insulina.

El receptor de la insulina (Figura-4) és una glicoproteïna de membrana, heterotetramèrica, que es localitza, d'una manera quantitativament més important, al teixit adipós, al fetge i al múscul de la major part dels vertebrats, mantenint un elevat grau de conservació en tots ells.

Consta de dues subunitats anomenades α i dues anomenades β ; les primeres es localitzen a nivell extracel.lular i es troben unides a les subunitats β ($\alpha\beta$) per enllaços disulfur. Les subunitats β presenten un domini extracel.lular, un domini intramembrana i un domini intracel.lular.

FIGURA-4: Estructura del receptor de la insulina.



(Extret de: Pilch, P.F. et al., en *Insulin Action and Diabetes*, eds, Goven, H.J. et al., 74, Raven, N.Y., 1988)

El receptor de la insulina es caracteritza per tenir la capacitat d'unir-se específicament a la insulina, a través d'un locus de la subunitat α ric en cisteïnes, que es troba a l'extrem N-terminal (Wilden et al., 1986; Yip et al., 1988). Aquest fet sembla ser el causant d'un seguit de canvis en el propi receptor que, en un principi, generaria l'adquisició d'activitat tirosina quinasa per part de la subunitat β . Aquesta activitat aniria inicialment dirigida contra la pròpia subunitat β del receptor, fenomen que ha estat denominat com "autofosforilació". La conseqüència d'aquesta fosforilació seria l'adquisició de la capacitat de fosforilar en residus de tirosina altres proteïnes cel·lulars. S'ha especulat amb la possibilitat que aquesta fóra una de les principals vies de transducció del senyal per part de la insulina en la generació de les seves múltiples accions a nivell cel·lular.

Per estudis inicials de "cross-linking" en preparacions altament purificades de receptor d'insulina, amb insulina marcada radiactivament amb Iode-125 (^{125}I), i posterior correguda de les mostres obtingudes en un gel de SDS-poliacrilamida, es varen conèixer els pesos moleculars aproximats del receptor de la insulina sencer i de cadascuna de les seves subunitats. En condicions no reductores, obtingueren una banda d'un pes molecular de 300.000 (receptor sencer), mentre que en condicions reductores obtingueren dues bandes amb diferent mobilitat; la que presentava un marcatge radiactiu més important, identificada com a subunitat α , tenia un pes molecular aproximat de 130.000, mentre que l'altra (β) era d'uns 90.000 (Pilch i Czech, 1979; Yip et al., 1978; Pilch et al., 1980; Jacobs et al., 1980; Siegel et al., 1981).

Totes dues subunitats tenen enllaçats oligosacàrids (Jacobs et al., 1980), constituïnt aquestes fraccions el 25% del pes total de la molècula (Duronio et al., 1986).

Les unions de monomers ($\alpha\beta$), de tipus electrostàtic o covalent, poden donar lloc a diferents tipus de receptors; en base a aquest fet s'han descrit tres formes de receptors de la insulina:

a) Formes oligomèriques,

són agregats de 8-10 molècules $\alpha_2\beta_2$; tenen més activitat tirosina quinasa però menys capacitat d'unió a l'hormona (Fujita-Yamaguchi et al., 1989); són els menys importants des d'un punt de vista quantitatiu.

b) Formes dimèriques, $\alpha_2\beta_2$,

són les més nombroses i les que presenten una més alta capacitat d'unió a la insulina, tot i que la seva activitat tirosina quinasa és menor que la de les formes oligomèriques.

c) Formes monomèriques, $\alpha\beta$,

sembla ser la mínima unitat funcional pel que fa a l'activitat d'unió a l'hormona, però la seva activitat tirosina quinasa és molt baixa, a no ser que s'uneixi en formes $(\alpha\beta)(\alpha\beta)$, les quals tenen més activitat quinàsica que les $\alpha_2\beta_2$ (Fujita-Yamaguchi et al., 1989). Dades aparegudes recentment indiquen que quan les formes dimèriques són reduïdes amb DTT, els monomers resultats presenten idèntica activitat tirosina quinasa que els dimers d'on provenen, mentre que les formes monomèriques que han estat purificades com a tals, presenten la ja esmentada manca d'activitat tirosina quinasa (Mortensen et al., 1991).

La unió de la insulina amb el seu receptor dóna lloc a una representació Scatchard curvilínia (Kahn et al., 1974). S'han proposat dos models per a explicar aquest fet:

I. Hi ha més d'un lloc d'unió per a la insulina que diferirien en la seva afinitat per l'hormona (Pollet et al., 1982).

Aquest model es basaria en la diferent afinitat que poden presentar les formes oligomèriques de receptors respecte a les formes $\alpha_2\beta_2$, alhora que suggereixen que la insulina tan sols s'uniria a una de les dues subunitats α del heterotetràmer (Sweet et al., 1987). Altres proposen la possibilitat que la insulina s'uneixi a les dues subunitats α del receptor però amb diferent afinitat per a cadascuna d'elles (Pang i Shafer, 1984). Finalment hi ha qui proposa l'existència de diferents formes de receptors, amb diferent afinitat per a la insulina i diferent susceptibilitat a ser degradats per proteases (Lipson et al., 1986).

II. La unió hormona-receptor genera un efecte de cooperativitat negativa sobre successives unions (DeMeyts et al., 1975, 1976 i 1978).

Aquest model proposa dos mecanismes de cooperativitat negativa:

IIa. La unió de la insulina a una de les subunitats α del heterotetràmer genera dificultats, estèriques o alostèriques, per a la unió a l'altra subunitat α .

Iib. La unió de la insulina al receptor generaria l'agrupació de receptors formant els oligòmers ja esmentats de baixa afinitat per la insulina.

Tanmateix, ha estat observat que les formes $\alpha\beta$ presenten una Scatchard linial (Sweet et al., 1987), a diferència de la descrita per a les formes $\alpha_2\beta_2$ (Swanson i Pessin, 1989).

Els mecanismes d'acció de la insulina sobre el metabolisme cel.lular són en gran mesura desconeguts. El descobriment d'una activitat tirosina quinasa intrínseca al propi receptor (Kasuga et al., 1982), inicià tot un seguit de treballs encaminats a demostrar la participació d'aquesta activitat com a element transductor de l'acció de la insulina. Abans de passar a descriure aquests treballs, repassarem breument els estudis que han caracteritzat l'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina.

L'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina es produeix a través de dos locus de la subunitat β , la regió d'unió a l'ATP i la regió amb activitat quinàsica. La primera es localitza a uns 50 residus del domini transmembrana i conté una seqüència *consensus* Gly-X-Gly-X-X-Gly-(X)₁₅₋₂₀-Lys, conservada en totes les tirosines quinases conegudes (Yarden i Ullrich, 1988). La Lys és important tant per a la unió de l'ATP com per a l'activitat quinàsica, doncs dirigeix el tercer grup fosfat de l'ATP cap al substrat que s'ha de fosforilar (Ebina et al., 1987; Chou et al., 1987; Srivastava i Chiasson, 1989).

La regió d'activitat catalítica conté un locus d'unió per als substrats susceptibles de ser fosforilats, el qual es trobaria espacialment proper a les tirosines que són fosforilables en el procés d'autofosforilació (Shoelson i Kahn, 1989); en aquest sentit s'ha observat que la presència prèvia d'aquests substrats impedeix l'autofosforilació (Shoelson i Kahn, 1989).

L'autofosforilació és un procés activat per la insulina, incrementant la V_{max} de la reacció, i per cations divalents, essent el més específic el Mn^{2+} , disminuint la K_m per l'ATP (White et al., 1984; Pike et al., 1984).

Experiments *in vitro* indicaven que l'autofosforilació requeria de concentracions elevades d'insulina, 100 nM, per a dur-se a terme (White et al., 1984). Posteriorment es va descriure que la unió de l'ATP al seu locus de la subunitat β induïa una més elevada afinitat de la subunitat α per la insulina, de tal manera que a concentracions

fisiològiques igualment es produïa l'autofosforilació (Ridge et al., 1988).

Aquesta demostració fou important per provar la participació de l'autofosforilació en la transducció de l'acció de la insulina.

La subunitat β és una quinasa constitutivament activada que està sotmesa a un control negatiu per part de la subunitat α ; concretament el locus d'unió a la insulina seria el que exerciria aquest control, de manera que en unir-se la insulina a aquest, el desactivaria (Shoelsen et al., 1988; Hsuan et al., 1989; Shoelsen i Kahn, 1989; Ellis et al., 1986).

Encara no està prou clar si l'autofosforilació es produeix sobre el propi receptor o sobre receptors propers; el que es coneix és que tan sols té lloc en formes $\alpha_2\beta_2$, i no en formes $\alpha\beta$ (Boni-Schnetzler et al., 1986; Le Marchand-Brustel et al., 1989). De tota manera alguns estudis indiquen que les dues reaccions, inter- i intra-catenària podrien esdevenir (Boni-Schnetzler i Pilch, 1987).

Els residus que són susceptibles de ser fosforilats corresponen al domini catalític de la subunitat β , Tyr 1146, 1150 i 1151, i a l'extrem carboxi-terminal, Tyr 1316 i 1322 (Tornqvist et al., 1987; White et al., 1988). Així com les fosforilacions del domini catalític produïrien un canvi conformacional en la molècula que podria provocar un apropament del locus d'unió del substrat exògen a la regió catalítica (White et al., 1988; Shoelson i Kahn, 1989), les de l'extrem carboxi-terminal s'especula que poguessin tenir un paper modulador negatiu de l'activitat tirosina quinasa, en interferir en l'apropament del substrat, tal i com s'ha descrit pel receptor de l'EGF (Ullrich i Schlessinger, 1990; Thies, et al., 1989).

La conseqüència directa de l'autofosforilació és l'adquisició d'activitat tirosina quinasa per a substrats exògens (Rosen et al., 1983), i la independència d'aquesta activitat respecte a la presència d'insulina (Klein et al., 1986; Yu et al., 1986). L'autofosforilació estimula l'activitat tirosina quinasa per a substrats exògens augmentant la V_{max} de la reacció entre dues i sis vegades, sense canvis aparents en la K_m per a aquests substrats; requereix de la presència de Mn^{2+} i de Mg^{2+} com a cofactors i d'ATP com a donador del grup fosfat.

L'acció directa de l'activitat del receptor, tan sols ha estat demostrada per a alguns substrats cel·lulars, molts dels quals encara no han estat caracteritzats.

La insulina pot provocar 3 tipus d'efectes sobre l'estat de fosforilació d'algunes proteïnes cel·lulars:

a. Fosforilació en Ser i Thr.

La presència d'insulina indueix la fosforilació de l'acetil CoA-carboxilasa, l'ATP-citrat liasa, la proteïna ribosomal S6 (Maller et al., 1986), una proteïna de 170.000 de pes molecular que es pot unir a la calmodulina (McDonald i Lawrence, 1989) i una de les fosfodiesterases de cAMP en adipòcits de rata (Degerman et al., 1990) entre d'altres. Aquestes accions no són atribuïbles directament al receptor de la insulina.

b. Desfosforilacions.

Algunes de les molècules que són modulades per aquest mecanisme són la glicogen sintasa, la piruvat deshidrogenasa o la lipasa sensible a les hormones. Aquesta acció, però, tampoc no és atribuïble al propi receptor.

c. Fosforilació en Tyr.

Són proteïnes majoritàriament no caracteritzades, de les quals tan sols es coneix el seu pes molecular, el qual els hi dóna nom. En aquests casos s'especula un efecte directe del receptor com a quinasa. Són les següents,

pp120 (120000 de pes molecular), procedent de membranes de fetge de rata. Recentment ha estat caracteritzada tractant-se d'una ATPasa dependent de Ca^{2+} (Margolis et al., 1990).

pp185, proteïna citosòlica que es fosforila en cèl·lules CHO transfectades i d'hepatoma FAO (White et al., 1985).

pp15, en adipòcits 3T3-L1, que podria estar implicada en l'estimulació del transport de glucosa (Bernier et al., 1987).

pp175, a cèl·lules FRTL5 (cèl·lules tiroïdals de rata), que es trobaria associada al citoesquelet (Condorelli et al., 1989).

pp167, associada a membranes microsomals d'adipòcits de rata (Del Vecchio i Pilch, 1989).

De les proteïnes conegudes estan les lipocortines 1 i 2 (Karasik et al., 1988) que es troben en la interfase entre la membrana plasmàtica i el citoplasma i que tindrien la funció d'impedir la hidròlisi dels fosfolípids per part de la fosfolipasa C i la

fosfolipasa A2. Una altra seria la calmodulina (Colca et al., 1987), on la fosforilació en tirosines li provocaria una modificació en la seva interacció amb el Ca^{2+} (Sacks et al., 1989).

A més, hi ha la fosfatidilinositol-bisfosfat quinasa, la qual és fosforilada en tirosines com a conseqüència de l'acció de la insulina, però no pel propi receptor (Endemann et al., 1990).

Per a conèixer la importància de l'activitat tirosina quinasa transduint les diferents accions de la insulina, s'han utilitzat una varietat d'aproximacions experimentals, com l'obtenció de receptors mutants, la utilització d'anticossos contra la subunitat β o α , l'estudi de situacions patològiques de resistència a la insulina o la utilització d'inhibidors, naturals o sintètics de l'esmentada activitat del receptor.

La mutació dirigida del receptor de la insulina va permetre la substitució de residus clau per a l'activitat quinàsica intrínseca; així la substitució de la Lys 1018 en receptors expressats en cèl.lules CHO, els quals podien unir la insulina normalment però havien perdut l'activitat tirosina quinasa, afectava les accions de la insulina sobre la captació de glucosa, la síntesi de glicogen o la incorporació de timidina al DNA (Chou et al., 1987; Ebina et al., 1987); la substitució de les Tyr 1150 i 1151, que impedia l'autofosforilació i posterior activitat quinàsica per a substrats exògens, també afectaven l'acció de la insulina sobre el transport de glucosa, però no sobre la incorporació de timidina al DNA (Ellis et al., 1986; Debant et al., 1988); la substitució de la Tyr 1146, que inhibeix fins a un 80% l'activitat quinàsica, no afectava l'estimulació de la síntesi de glicogen però no s'estimulava la incorporació de la timidina al DNA (Wilden et al., 1990).

L'obtenció d'anticossos contra la subunitat β va generar estudis que per una banda perseguen la inhibició de l'activitat tirosina quinasa, mentre que d'altres buscaven una mimetització de l'acció de la insulina.

A partir d'anticossos monoclonals que inhibien l'activitat tirosina quinasa, es va comprovar que en cèl.lules CHO, en hepatoma humà o en adipòcits de rata, s'inhibien les accions de la insulina sobre la captació de glucosa, la síntesi de glicogen o la fosforilació de la proteïna ribosomal S6 (Morgan i Roth, 1987).

Amb anticossos que mimetitzen l'acció de la insulina, els resultats han estat

contradictoris a l'hora de valorar la possible participació de l'activitat tirosina quinasa en l'acció de la insulina; així, mentre alguns afirmen que l'autofosforilació no és imprescindible per a accions de la insulina tals com l'estimulació del transport de glucosa, la fosforilació de diferents proteïnes intracel·lulars o l'estimulació de la lipogènesi (Simpson i Hedo, 1984; Zick et al., 1984), altres dedueixen l'essencialitat d'aquesta activitat per a estimular el transport de glucosa i la incorporació de timidina al DNA (Gherzi et al., 1987).

Amb diferents anticossos monoclonals dirigits contra la subunitat α que inhibien la unió de la insulina, sense estimular l'activitat tirosina quinasa del receptor, s'obtenien efectes mimètics als de l'hormona sobre els següents paràmetres:

- transport de glucosa en adipòcits humans (Forsayeth et al., 1987).
- transport d'aminoàcids en cèl·lules d'hepatoma de rata (HCT) que expressen el receptor de la insulina humana (Hawley et al., 1989).
- fosforilació de la proteïna ribosomal S6 (Sung et al., 1989).
- transport de glucosa i d'aminoàcids en fibroblasts de ratolí 3T3 que també expressaven el receptor de la insulina humana (Brunetti et al., 1989).

Davant aquestes dades els autors proposen dues alternatives que d'alguna manera es complementen, l'autofosforilació no és indispensable per a la transmissió del senyal sobre aquestes accions de la insulina o bé la unió de l'anticòs provoca un canvi conformacional del receptor donant lloc a una forma capaç de transduir el senyal sense requerir la participació de l'activitat quinàsica.

Posteriorment, realitzant assaigs més acurats de l'activitat tirosina quinasa del receptor (Steele-Perkins i Roth, 1990) observen, per acció dels mateixos anticossos contra la subunitat α , l'existència d'autofosforilació i d'activitat quinàsica per a substrats exògens, tot i que aquestes activitats són inferiors a les generades per la insulina. Els efectes d'aquests anticossos sobre algunes de les activitats biològiques sensibles a la insulina varen ser en alguns casos més grans àdhuc, als generats per la pròpia hormona. Així els autors també proposen la participació d'altres mecanismes transductors, a més d'aquesta activitat enzimàtica, com podrien ser els generats per un increment en l'agregació de receptors o en l'endocitosi.

Altres estudis amb anticossos policlonals contra la subunitat β (Caron et al.,

1989) que estimulen la seva activitat quinàsica, estimulen també el transport de glucosa i la lipogènesi en adipòcits de rata i la síntesi de glicogen en cèl.lules d'hepatoma (ZHC).

Amb anticossos policlonals dirigits contra diferents epítops del lloc d'unió de la insulina (Ponzio et al., 1988) que indueixen una autofosforilació parcial però no una activitat quinàsica per a substrats exògens, in vitro, i que in vivo no s'observa cap d'aquestes activitats, activen el transport de glucosa i d'aminoàcids però fallen en l'estimulació de la síntesi del DNA, en cèl.lules FAO (d'hepatoma de rata).

Com a conclusió dels diversos treballs portats a terme s'ha postulat que el receptor de la insulina podria estar donant lloc a dos senyals transductors, per una banda, l'activitat quinàsica del receptor, que canalitzaria la major part de les accions de la insulina, i d'altra banda, el possible senyal generat per un canvi conformacional del receptor com a conseqüència de la unió de la insulina al seu locus, que podria ser total o parcialment independent del canvi induït per l'autofosforilació, i que canalitzaria altres accions de la insulina, en principi independents de l'activitat tirosina quinasa del receptor.

Estudis de models patològics com són la diabetes mellitus no-dependent de la insulina (Grunberger et al., 1984) o l'obesitat (Le Marchand-Brustel et al., 1985; Hurrell et al., 1989), correlacionen la resistència que aquests models presenten a l'acció de la insulina, amb una menor activitat tirosina quinasa del receptor en teixits tals com múscul i fetge.

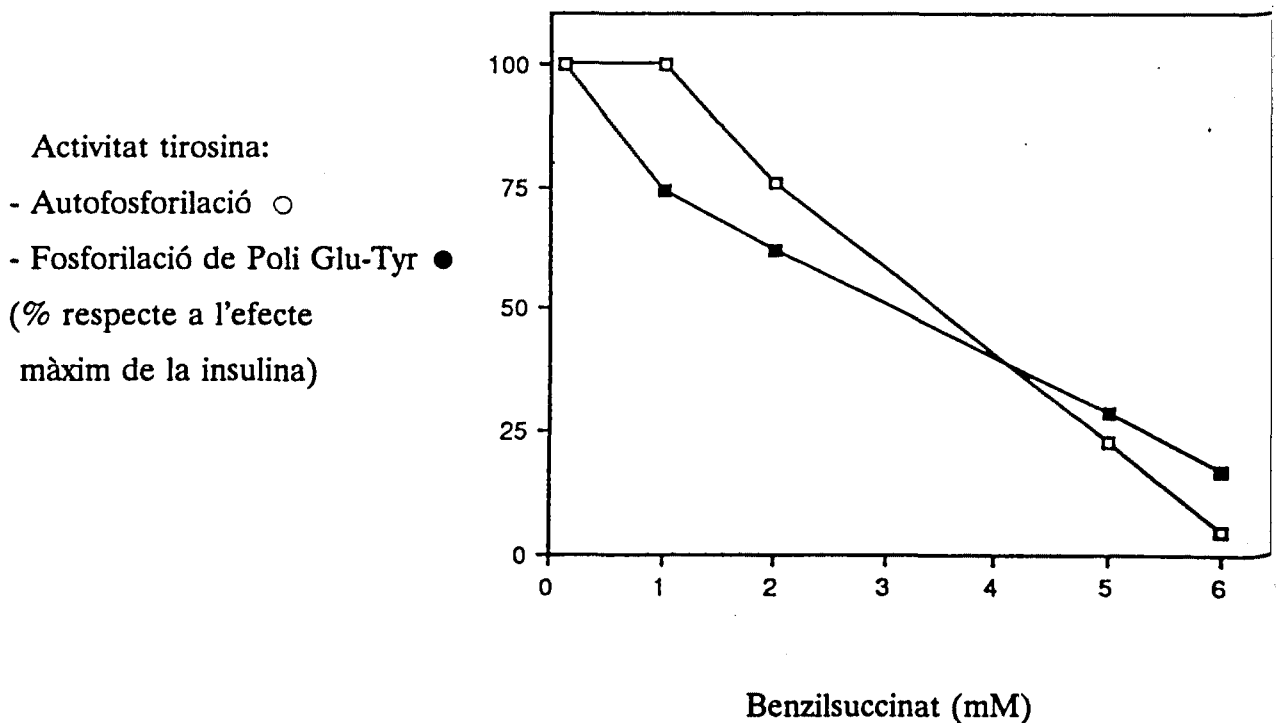
També s'han utilitzat inhibidors de l'activitat tirosina quinasa per a correlacionar aquest mecanisme transductor amb les accions de la insulina. D'aquests inhibidors n'hi ha de dos tipus, naturals i sintètics. Els primers generalment inhibeixen per competència amb l'ATP, la qual cosa els fa força inespecífics doncs poden afectar altres quinases cel.lulars, a més de tenir efectes citotòxics importants.

Posteriorment, amb l'obtenció d'inhibidors sintètics, que ja no competien amb l'ATP sinó amb el substrat fosforilable i que a més no afectaven les Ser/Thr-quinases, es realitzaren estudis més específics pel receptor de la insulina. Així amb un inhibidor (Saperstein et al., 1989) que afecta aminoàcids estratègics del receptor com la Lys,

ahora que interacciona amb el Mg^{2+} , inhibeix l'autofosforilació, així com l'estimulació del transport de glucosa o l'oxidació d'aquesta. Finalment s'han obtingut inhibidors que estructuralment simulen una tirosina amb els quals han observat una inhibició de l'activitat quinàsica del receptor que es correlaciona amb una inhibició de l'estimulació generada per la insulina de la lipogènesi i dels efectes antilipolítics en adipòcits de rata (Schechter et al., 1989).

Utilitzant un inhibidor sintètic, el benzilsuccinat, observarem inhibicions de l'activitat quinàsica del receptor, *in vitro* (Figura-5), les quals es correlacionaven amb inhibicions de l'acció de la insulina sobre el transport d'aminoàcids (Taula-7), de la taxa glucolítica i del transport de glucosa en múscul esquelètic (Gumà et al., C).

FIGURA-5: Efectes inhibidors del benzilsuccinat sobre l'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina.



TAULA-7: Efecte del benzilsuccinat (BZS) sobre la captació de MeAIB estimulada per la insulina, a soleus i EDL.

	Basal	Insulina, 100 nM, 60 min
	(nmols MeAIB / g x 30 min)	
Soleus:		
Control	46.1 ± 2.3	76.6 ± 3.9
BZS, 2 mM, 120 min	33.5 ± 5.9	43.4 ± 2.0
EDL:		
Control	22.2 ± 0.9	40.8 ± 2.1
BZS, 2 mM, 120 min	15.1 ± 0.7	21.3 ± 1.5

Pel que fa a la regulació de l'activitat del receptor de la insulina, amb posterioritat a la seva interacció amb la insulina, s'ha postulat l'existència d'almenys 3 mecanismes:

I. La internalització del receptor.

A conseqüència de la unió de la insulina amb el seu receptor, es produeix el fenomen d'"Internalització" del complex insulina-recetor en vesícules generades per la pròpia membrana plasmàtica que en unir-se, intracel.lularment, a endosomes que presenten una alta concentració de bombes de H⁺, acidifiquen l'interior vesicular, alliberant-se així la insulina del receptor. Posteriorment la insulina serà degradada en els lisosomes (Carpentier et al., 1979), mentre que la major part del receptor internalitzat serà reciclat cap a la membrana plasmàtica (Fehlmann et al., 1982).

S'ha proposat la hipòtesi que aquest seria un dels principals mecanismes de "down-regulation" del receptor de la insulina, tot i que certes dades indiquen que alhora la internalització permetria al receptor activat assolir certs locus intracel.lulars on exerciria la seva activitat quinàsica; en aquest sentit s'ha observat que els receptors d'origen endosòmic presenten una activitat tirosina quinasa superior a la dels receptors de la membrana plasmàtica (Kahn et al., 1988).

II. La fosforilació del receptor en serines (i treonines).

Estudis inicials amb el receptor de la insulina descriuen una ràpida acció de la

insulina en limfòcits humans en cultiu, en presència d'àcid fosfòric marcat radiactivament, activant la fosforilació en residus de Ser i Thr del propi receptor (Kasuga et al., 1982b). Tot i que no era sorprenent aquest efecte, doncs ja havia estat descrit per a altres molècules cel·lulars, era la primera vegada que detectaven també fosforilació en residus de Tyr del receptor. Posteriorment s'adjudicà l'activitat tirosina quinasa al propi receptor, com ja ha estat esmentat, mentre que l'activitat Ser/Thr-quinasa s'atribuïa a altres enzims independents del receptor de la insulina. La fosforilació en Ser i Thr tindria lloc posteriorment a la fosforilació en Tyr (Pang et al., 1985), alhora que requeriria d'una adequada activitat tirosina quinasa del receptor a fi que es desencadenessin les fosforilacions en residus de Ser i Thr (Russell et al., 1987).

Aquesta fosforilació del receptor provoca una disminució de la seva activitat tirosina quinasa, alhora que el fa menys susceptible a l'activació per autofosforilació (Stadtmauer i Rosen, 1986).

Diversos autors atribueixen la fosforilació en Ser i Thr del receptor de la insulina a enzims tals com la proteïna quinasa C (Takayama et al., 1984; Häring et al., 1986; Bollag et al., 1986) o la proteïna quinasa dependent de cAMP (Stadtmauer i Rosen, 1986; Roth i Beaoudin, 1987). En situació de dejuni ha estat descrita una disminuïda activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina on hi ha un increment en la fosforilació del receptor en residus de Ser i Thr, havent-se correlacionat aquest fet amb un augment de l'activitat de la proteïna quinasa C (Karasik et al., 1990). Una informació més extensa sobre aquestes proteïnes quinases serà donada en el capítol B.4.

Altrament, s'ha aconseguit copurificar amb el receptor una serina quinasa que, *in vitro*, fosforilaria el receptor de la mateixa manera que té lloc *in vivo* (Balloti et al., 1986; Smith et al., 1988; Lewis et al., 1990); aquesta serina quinasa no ha estat reconeguda entre les que actualment es coneixen.

III. La desfosforilació del receptor.

De la mateixa manera que la fosforilació en Ser i Thr constituiria un mecanisme ràpid de desactivació del receptor, la desfosforilació dels residus tirosina fosforilats per acció de la insulina, contribuiria a la fase primerenca de "down-regulation" del receptor

de la insulina.

La desfosforilació és un procés ràpid que en condicions fisiològiques no és atribuïble a un fenomen de reversió de la reacció catalitzada per la quinasa del receptor, atés que les concentracions cel·lulars d'ATP, d'uns 3 mM, són molt superiors als valors descrits per al receptor de K_m de l'ATP, en condicions d'estimulació per insulina, 30-150 μ M. Tampoc no s'ha trobat una possible activitat fosfatasa del propi receptor in vivo, tot i que aquesta pot ser induïda in vitro (Kole et al., 1988). Mentre que el procés de fosforilació en residus tirosina ja és del 50% als 30 s de l'addició de l'hormona, i és màxim als 10 min (White et al., 1984), la desfosforilació esdevé ja en els primers 30 s, produint-se un equilibri dinàmic entre fosforilació-desfosforilació, segons experiments amb adipòcits permeabilitzats amb digitonina (Mooney i Anderson, 1989).

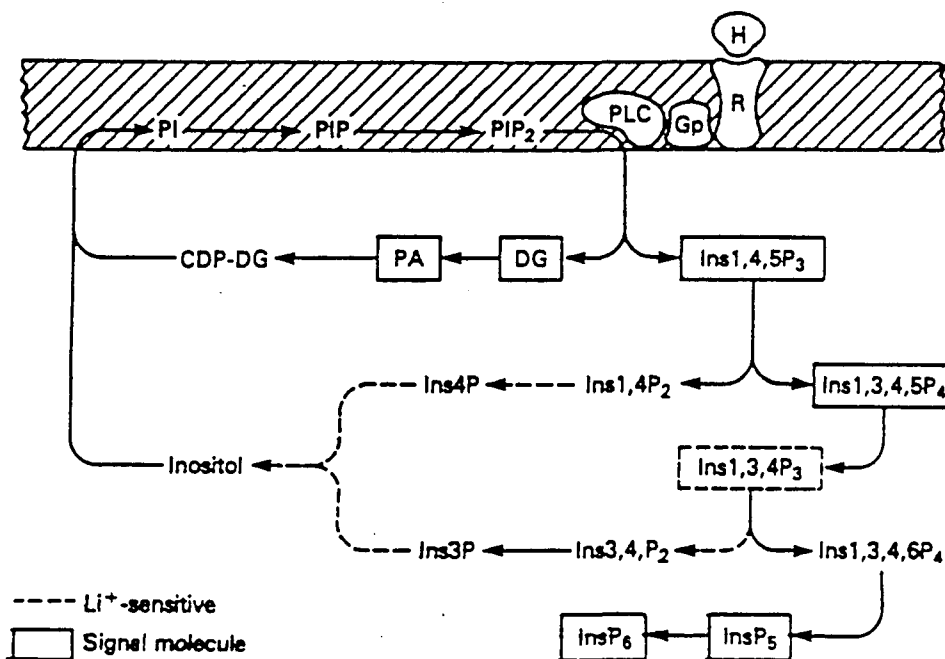
Encara no s'ha descrit quina o quines fosfatases podrien estar realitzant aquesta funció desfosforiladora del receptor in vivo.

B.3.2. Els missatgers de la insulina.

B.3.2.1. Els fosfo-oligosacàrids.

El descobriment inicial d'hormones que cursaven els seus efectes mitjançant la metabolització de fosfatidils inositols fou realitzat per Hokin & Hokin (1953, 1955). El metabolisme dels fosfatidils inositols era sensible a l'acció de determinades hormones i neurotransmissors que cursaven les seves accions a través d'increments en les concentracions citosòliques de Ca^{2+} , en cèl.lules caracteritzades per la seva funció secretora. Però no va ser fins als anys 80' quan es va descobrir que els receptors d'aquests agonistes activant una fosfodiesterasa (fosfolipasa C de fosfatidils-inositols) produïen el trencament de PIP_2 (fosfatidil inositol 4,5-fosfat), donant lloc a diacilglicerol (DAG) i IP_3 (Inositol 1,4,5-trisfosfat), el qual és metabolitzat a IP_2 (Inositol 1,4-bisfosfat) i IP_1 (Inositol 4-fosfat) (Figura-6). L'augment d' IP_3 condueix a l'augment de la concentració de Ca^{2+} citosòlic lliure, com a conseqüència del seu alliberament de dipòsits intracel.lulars (Berridge, M.J., 1984).

FIGURA-6: El metabolisme dels fosfolípids en la transducció de senyals hormonals.



(Extret de: Cat i Balla, 1989)

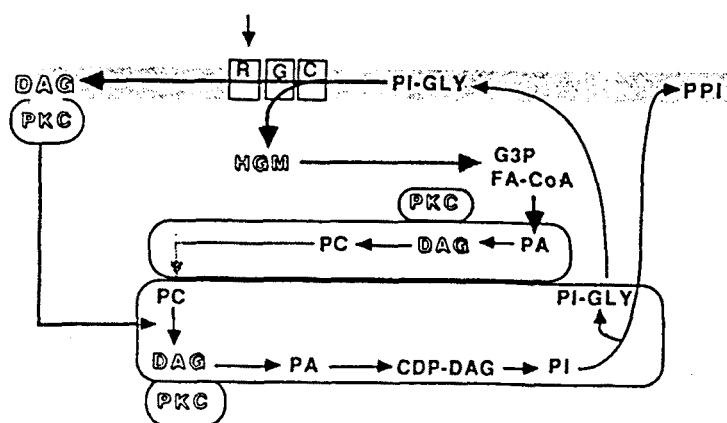
Al 1979, Larner descriu l'existència d'una substància sensible a la insulina, en múscul esquelètic, que podia modular l'activitat de la glicogen sintasa in vitro, reproduint l'acció de la insulina (Larner et al., 1979).

Treballs posteriors confirmen l'existència d'aquest mediador en altres teixits sensibles a la insulina, com són el teixit adipós (Kiechle et al., 1980) o el fetge (Parker et al., 1982; Saltiel et al., 1983; Suzuki et al., 1984) mimetitzant diferents accions de la insulina.

La recerca fou, aleshores, dirigida cap a la determinació molecular d'aquest mediador. Es tractava de substàncies hidrofíliques, de baix pes molecular, que contenien grups fosfat. Posteriorment es determinà l'existència d'inositol en la seva estructura, la qual cosa va fer pensar en la possible participació de la metabolització de fosfolípids com a generadors d'aquest mediador (revisió del tema: Saltiel i Cuatrecasas, 1988).

Estudis respecte l'acció de la insulina sobre el metabolisme dels fosfatidils inositols (Figura-7), varen mostrar que mentre la insulina podia provocar un increment en la síntesi de fosfatidil inositols (PIP₂, PIP i PI), no generava un increment ràpid en la síntesi d'inositols fosfat (IP₃, IP₂ i IP) ni en els nivells de Ca²⁺ citosòlic, en adipòcits i en la línia miocítica BC3H-1 (Farese et al., 1982, 1984 i 1985).

FIGURA-7: Intervenció del metabolisme dels fosfolípids en els mecanismes d'acció de la insulina.



PI-GLY = fosfatidil inositol glicà, HGM = "Head Group Mediator", PPI = PIP + PIP₂
(Extret de: Farese, 1988).

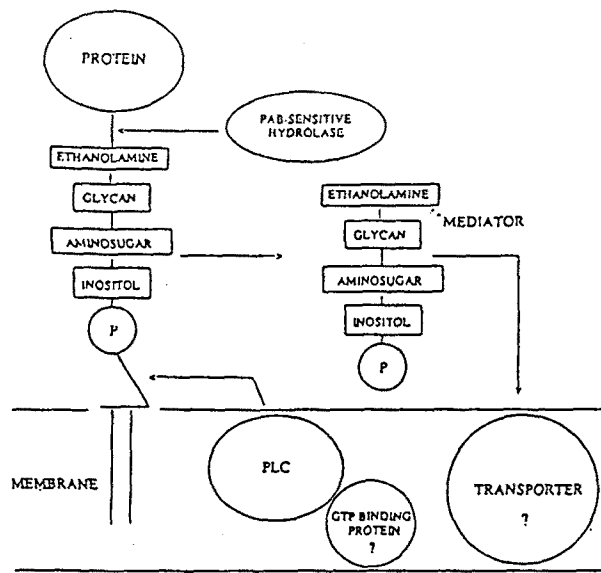
La fosfolipasa C és un enzim encara no ben conegut però del què han estat descrites diferents formes, en funció de l'especificitat i l'afinitat vers els seus substrats, de la seva sensibilitat al Ca^{2+} , la qual sembla estar en funció del pH, i de la seva localització intracel·lular, doncs s'han descrit formes solubles al citosol i formes ancorades a la membrana plasmàtica, sense saber encara si les formes plenament actives hagessin d'estar necessàriament translocades a la membrana o si cada isoenzim té un locus específic, diferent, de màxima activitat.

Els agonistes que generen canvis citosòlics de Ca^{2+} activen una fosfolipasa C específica de fosfatidil inositols, la qual no sembla estar activada per la insulina en BC3H-1. Alternativament, es pensa que l'enzim activat per la insulina seria una fosfolipasa C específica de fosfatidils colina i/o una fosfolipasa D, que lliura àc. fosfatídic i colina, que contribuirien a la síntesi de fosfatidils inositols (Farese et al., 1987; Farese, 1988). Alhora una forma diferent de fosfolipasa C, independent del Ca^{2+} , també estaria activada per la insulina, la qual hidrolitzaria un tipus diferent de fosfatidil inositols: els fosfatidil inositol glicans, donant lloc a una alliberació ràpida (en segons) de DAG i del compost que havia estat descrit com a mediador de l'acció de la insulina, l'inositol glicà (Veure revisió de Farese, 1988).

S'han descrit dos tipus d'inositols glicans (o de fosfo-oligosacàrids, POS, segons anomenen altres autors) derivats de fosfolípids.

El primer que es va descriure (Low et al., 1986; Larner et al., 1988) té la funció d'ancorar proteïnes a la membrana plasmàtica (ex. Lipoproteïna lipasa, LPL). En l'extrem carboxi-terminal d'aquestes proteïnes s'estableix un enllaç amida amb una etanolamina, la qual mitjançant un enllaç fosfodièster s'uneix a un oligosacàrid que posseeix una hexosamina no-N-acetilada, glucosídicament lligada a un anell d'inositol d'un fosfatidil inositol (Figura-8). L'alliberació d'aquestes proteïnes esdevé per acció d'una fosfolipasa C de fosfatidil inositols (Low i Saltiel, 1988).

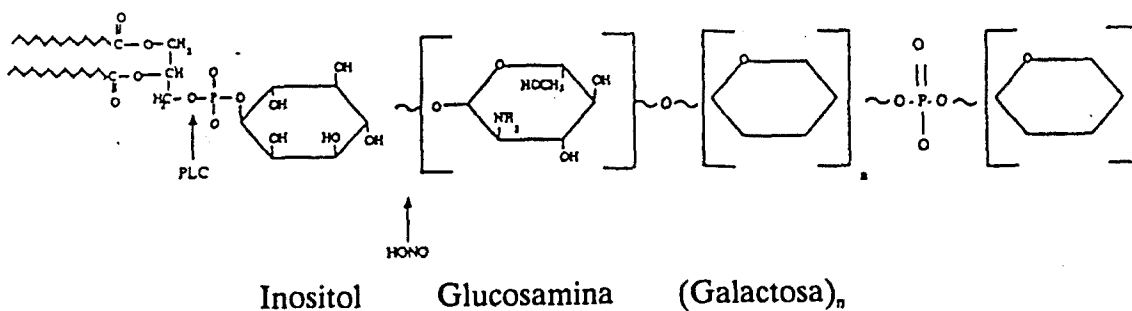
FIGURA-8: Inositol glicà que intervén en l'ancoratge de proteïnes extracel·lulars a la membrana plasmàtica.



(Extret de: Larner et al., 1988).

Quan s'utilitza la fosfolipasa C específica de fosfatidils inositols en preparacions de membrana de fetge, apareixen uns fosfo-oligosacàrids que també tenen efectes insulín-mimètics (Saltiel i Cuatrecasas, 1986; Saltiel et al., 1987). Aquests fosfo-oligosacàrids (POS) tenen inositol, glucosamina no-acetilada i una regió glicà variable; són més petits que els que intervenen en l'ancoratge de proteïnes (Figura-9). A partir d'hepatòcits de rata s'han obtingut formes de POS que difereixen en el seu contingut en grups fosfats; aquestes contenen inositol-fosfat lligat a glucosamina no-N-acetilada, quatre residus de galactosa i dos fosfats addicionals no lligats a l'inositol (Mérida et al., 1988).

FIGURA-9: Estructura del fosfo-oligosacàrid, POS, procedent de fosfolípids que no ancoren proteïnes a la membrana.



(Extret de: Saltiel et al., 1988).

En cèl.lules BC3H-1 s'ha observat que la insulina produeix l'alliberament de POS de manera dosi-dependent, assolint els efectes màxims entre 1 i 10 nM (Saltiel et al., 1988a). Aquesta acció de la insulina requereix d'una adequada activitat tirosina quinasa del seu receptor i resulta de 10 a 20 vegades superior en presència d'ATP-Mn²⁺ (Suzuki et al., 1987).

El POS s'ha aconseguit purificar a partir de diversos tipus cel.lulars:

- BC3H-1 (Saltiel et al., 1986)
- Hepatoma H-35 i fetge (Mato et al., 1987)
- Limfòcits T de ratolí (Gaulton et al., 1988).

Utilitzant POS purificat addicionat a cèl.lules intactes o bé incorporant al medi fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol, s'han estudiat les accions regulades per la insulina on aquests mediadors podrien tenir algun paper transductor.

Els efectes de la insulina reproduïbles pel POS (Taula-8) tenen en comú que són ràpids; efectes a més llarg temps no han estat reproduïts a excepció dels efectes insulín-mimètics que presenten sobre la captació d'aminoàcids a fetge (procés que esdevé a partir de 2-3 hores d'incubació amb insulina i que requereix de síntesi proteica).

TAULA-8: Efectes insulín-mimètics del fosfo-oligosacàric, POS.

EFFECTES	TEIXIT	REFERENCIA
† fosfodiesterasa de cAMP	BC3H-1	Saltiel et al., 1986
↓ fosforilació induïda per isoproterenol de fosfolípid metiltransferasa	Adipòcits	Kelly et al., 1987
↓ Lipòlisi	Adipòcits	Kelly et al., 1987
† Lipogènesi	Adipòcits	Saltiel i Sorbara, 1987
† Piruvat deshidrogenasa	Adipòcits	Gottschalk et al., 1988
† Piruvat quinasa	Hepatòcits	Alvarez et al., 1987
↓ cAMP	Hepatòcits	"
↓ Glicogen fosforilasa	Hepatòcits	"
† captació d'AIB	Hepatòcits	Varela et al., 1990

El POS es també capaç de reproduir la patró de fosforilacions/desfosforilacions de diferents proteïnes (ATP citrat liasa, lipasa sensible a les hormones, glicogen fosforilasa i fosfoproteïnes de pes molecular 65.000 i 50.000) a l'igual que ho fa la insulina (Alemany et al., 1987).

Però hi ha un efecte que el POS no ha estat capaç de reproduir, i és l'estimulació de la captació de glucosa en adipòcits (Kelly et al., 1987; Saltiel i Sorbara-Cazan, 1987).

La localització topològica del POS a la membrana plasmàtica no es coneix encara, tot i que s'ha observat que la seva alliberació es produeix essencialment a la cara externa de la cèl.lula (Alvarez et al., 1988; Romero et al., 1988). Recentment ha estat descrit un sistema de transport saturable i específic pel POS (Alvarez et. al., 1991).

Aquest aspecte fa difícil explicar que el POS pugui actuar com a mediador de l'acció de la insulina en efectes que esdevenen pocs segons després de que l'hormona interactuï amb el seu receptor, però alternativament, permet postular un possible paper d'aquest mediador en la producció d'efectes paracrins en cèl.lules limítrofes a la que ha resultat estimulada per la insulina.

En definitiva, la importància fisiològica d'aquests "mediadors" de la insulina no està gens clara. Tot i això, es pot concloure que si el POS és un element transductor de l'acció de la insulina, no és responsable de tots els efectes que genera aquesta hormona.

B.3.2.2. El diacilglicerol i la proteïna quinasa C.

Com ja em vist, la insulina per produir l'inositol glicà, ha d'induir el trencament de certs pools de fosfolípids de la membrana plasmàtica, amb la consegüent producció simultània de diacilglicerol, DAG. En l'apartat anterior em revisat el paper del POS en l'acció de la insulina. A continuació centrarem l'atenció en la possible participació del DAG en l'acció transductora de la insulina.

Hi ha evidències de què la insulina provoca un increment en la concentració

cel·lular de DAG en miòcits BC3H-1 (Farese et al., 1984; Farese et al., 1985; Cooper, et al., 1987), en teixit adipòs (Farese et al., 1985; Augert i Exton, 1988; Perhadsingh et al., 1987) i en múscul esquelètic (Ishizuka et al., 1990). Aquest DAG prové de l'àcid fosfatídic (Farese et al., 1987; Farese et al., 1988) i de la hidròlisi de fosfolípids, entre els que es troba el fosfatidil inositol glicà (Saltiel et al., 1986; Saltiel et al., 1987) i la fosfatidil colina (Farese et al., 1988; Nair et al., 1988), però no el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat (Farese et al., 1985).

El DAG produït per acció de la insulina pot tenir diverses funcions:

la formació de fosfatidil colina, la qual en ser hidrolitzada per una fosfolipasa D dona lloc a àc. fosfatídic (Farese et al., 1987) i posteriorment a DAG, renovant així els pools d'aquest compost,

la formació de fosfatidils inositols (Farese et al., 1988), entre els que es trobaria el que allibera el POS,

i l'activació de la proteïna quinasa C, enzim que participa en la regulació metabòlica per la seva capacitat de fosforilar els seus substrats en serines i treonines, modulant així la seva activitat.

El DAG i la proteïna quinasa C, PQ-C, semblen estar implicats en l'acció de la insulina estimulant la captació de glucosa en adipòcits (Kirsch et al., 1985; Cherqui et al., 1986; Christensen et al., 1987) i en BC3H-1 (Farese et al., 1985; Standaert et al., 1988), mentre que en múscul esquelètic les dades són contradictòries (Ishizuka et al., 1990; Sowell et al., 1988).

Posteriorment ampliarem la informació de que disposem per tal de conèixer el possible paper que juga la proteïna quinasa C en el marc dels mecanismes d'acció de la insulina; abans farem una revisió sobre les característiques estructurals i funcionals d'aquest enzim.

La proteïna quinasa C no és un enzim únic sinò que engloba un grup de proteïnes que es relacionen per la seva activitat quinàsica i pel tipus de regulació a que estan sotmeses (Bell i Burns, 1991). S'han clonat nou dels membres d'aquesta família de proteïnes (Farago i Nishizuka, 1990) dels quals s'ha observat que no són estrictament isoenzims sinò que presenten funcions que poden ser diferenciades.

La proteïna quinasa C es localitza al citosol on roman inactiva, i en general, es

considera que en ser traslocada a la membrana, fenomen que podria ser induït pel Ca^{2+} (Wolf et al., 1985), i ancorada a la mateixa per la seva unió a la fosfatidil serina, seria definitivament activada per unió del DAG al seu locus regulador.

S'han seqüenciat 3 tipus de proteïna quinasa C al cervell: (Huang et al., 1988)

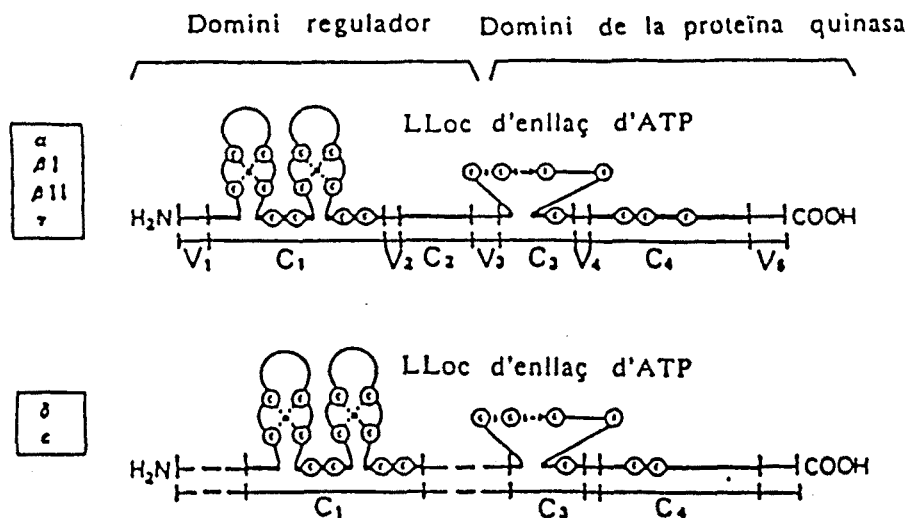
Tipus I.- Està codificat a partir de la seqüència γ de cDNA. És poc sensible al DAG però activable a baixes concentracions d'àcid araquidònic.

Tipus II.- Està codificat a partir de les seqüències β -I i β -II de cDNA. Té elevada activitat a concentracions basals de Ca^{2+} i respon al DAG i a l'àcid araquidònic de manera similar.

Tipus III.- Està codificat a partir de la seqüència α de cDNA. És el més sensible a l'1-estearoil-2-araquidonilglicerol (l'especie majoritaria de DAG derivada de fosfatidils inositols). Poden ser activats a elevades concentracions de Ca^{2+} per elevades concentracions d'àcid araquidònic, en absència de fosfolípids.

L'estructura primària dels membres de la família de les proteïnes quinases C, deduïda a partir de la seqüència del cDNA (Figura-10), està formada per quatre regions conservades i cinc regions variables (Nishizuka, 1989; Bacher et al., 1991).

FIGURA-10: Estructura de les subespècies de PQ-C.



(Extret de: Nishizuka, 1988)

El domini regulador (V_1 - C_2) conté,
una seqüència semblant a la dels substrats de la proteïna quinasa C, per la qual cosa se la denomina "pseudosubstrat" (House i Kemp, 1990),
una o dues regions riques en cisteïnes, similars a les de les estructures de dits de Zn (Bell, 1986; Parker et al., 1989),
el locus d'unió pels ésters de forbol,
el locus d'unió al DAG, i
segments que interaccionen amb els fosfolípids, de manera dependent o independent de Ca^{2+} ; la regió C_2 sembla conferir la dependència al Ca^{2+} als subtipus α , βI , βII i γ (Ono et al., 1989), mentre que la seva absència en els subtipus δ , ϵ , ζ , η i L determinaria la independència al Ca^{2+} .

El domini catalític té el locus d'unió a l'ATP i als substrats susceptibles de ser fosforilats.

Es conèixen diversos inhibidors de la proteïna quinasa C que interaccionen tant amb el domini catalític (ex. H-7 o estaurosporina) com amb el domini regulador (ex. Polimixina-B o esfingosina), tot i que l'ús d'aquests compostos és limitat degut a la seva elevada inespecificitat, com comentarem més endavant.

En situació d'inactivitat de la proteïna quinasa C, el pseudosubstrat es trobaria unit al locus d'unió dels substrats del domini catalític (House i Kemp, 1990). Això succeiria quan l'enzim estigués soluble al citoplasma o quan estigués unit a la membrana a través dels fosfolípids que li són cofactors, de manera dependent o independent de calci. La unió del DAG a l'enzim, provocaria canvis conformacionals en ell resultant en el desplaçament del pseudosubstrat del lloc d'unió dels substrats, i consegüentment en l'activació de la proteïna quinasa C, tot i que aquest procés encara presenta punts foscos, doncs també sembla intervenir un procés d'autofosforilació (Flint et al., 1990). Tanmateix s'ha observat que la unió del DAG a la proteïna quinasa C produïx un increment en l'afinitat de l'enzim pel Ca^{2+} de l'ordre de 10^{-7} M, concentracions a les que es troba fisiològicament aquest ió sense necessitat que sigui alliberat dels seus locus intracel·lulars (Yamanishi et al., 1983).

L'activació de la proteïna quinasa C pot ser induïda per la incorporació d'esters de forbol o de mono-acil derivats del DAG, en cèl·lules intactes (Nishizuka, 1984). De

fet, la proteïna quinasa C sembla ser el receptor natural dels ésters de forbol (Castagna et al., 1982).

Els esters de forbol són una família de compostos caracteritzats per ser promotors tumorals, alguns dels quals tenen la capacitat d'activar la proteïna quinasa C (ex. el 12-O-tetradecanoil- β -forbol 13-acetat, TPA, o el 4 β -forbol 12, 13-dibutirat, PDBu), mentre que d'altres no la tenen (ex. 4 β -forbol 13 α -monoacetat, MA).

Els diferents isoenzims de la proteïna quinasa C es localitzen a molt diversos tipus cel·lulars, des de les plaquetes que són els que presenten activitats més elevades, seguides de diversos tipus cel·lulars del cervell i disminuint en quantitat, estan els hepatòcits, els adipòcits i el múscul esquelètic, el qual conté aproximadament un 1% de l'activitat localitzada a les plaquetes (Minakuchi et al., 1981).

Alguns autors han detectat un increment en l'activitat de la proteïna quinasa C de diafragma, per acció de la insulina (Walaas et al., 1987), tot i que no sembla anar acompanyat d'una inducció de la translocació de l'enzim cap a la membrana, sinó que l'increment d'activitat, pel que fa a cèl·lules BC3H-1, es manifesta en els dos locus (Cooper et al., 1987).

Ha estat molt discutida l'essencialitat de la PQ-C en l'acció de la insulina estimulant el transport de glucosa. Recordem que aquest era un dels efectes pels quals el POS era incapaç de realitzar una funció transductora, i en aquest sentit, a més ha estat observat que la fosfolipasa C de fosfatidils inositols obtinguda de *Staphylococcus aureus*, la qual es capaç de generar el POS, no estimula el transport de glucosa (Standaert et al., 1988). Des d'aquest conèixement, l'interès per determinar el paper del DAG i/o de la PQ-C va ser manifest a través de diversos treballs. En estudis on s'utilitzaven els esters de forbol com a activadors de la PQ-C, es varen veure efectes insulín-mimètics sobre el transport de glucosa, tot i que la magnitud d'aquests efectes estava en funció dels tipus de teixit on es realitzava l'assaig. Així mentre que en cèl·lules BC3H-1 (Cooper et al., 1989) i en cèl·lules CHO (Cherqui et al., 1990) els ésters de forbol estimulaven el transport de glucosa fins i tot més que la pròpia insulina, en adipòcits (Kirsch et al., 1985; Cherqui et al., 1986, 1987 i 1989; Ishizuka et al., 1990; Egan et al., 1990; Mühlbacher et al., 1988) en múscul esquelètic (Sowell et al., 1988; Ishizuka et al., 1990; Henriksen et al., 1989; Tanti et al., 1989; Gumà et

al., 1990) i en cèl.lules L6 (Klip i Ramlal, 1987) els esters de forbol sols mimetitzaven parcialment l'acció de la insulina (segons dades pròpies aprox. 25% de l'efecte estimulador de la insulina era mimetitzat pel TPA en incubacions de músculs EDL)(Gumà et al., 1990, B).

Per explicar aquests resultats alguns autors aleguen que en cada teixit coexistirien uns determinats subtipus de PQ-C que en funció de la seva sensibilitat vers els esters de forbol, donarien lloc a uns diferents graus d'estimulació del transport de glucosa; mentre que en cèl.lules BC3H-1 i CHO els subtipus predominants presentarien una elevada afinitat pels esters de forbol, en adipòcits i múscul esquelètic hi hauria poca afinitat pels esters de forbol. Per aquest motiu diversos autors (Farese, 1988; Cherqui et al., 1990) han qüestionat les conclusions a que s'arriben en assumir l'existència d'una adequada activació de la proteïna quinasa C per efecte dels esters de forbol. En contra d'aquesta opinió, hi ha la d'altres autors els quals han observat en músculs epitroclearis que mentre la presència de fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, la qual produeix DAG a partir de qualsevol tipus de fosfolípids, indueix una activació de la proteïna quinasa C associada a la membrana i una estimulació del transport de glucosa del 80% respecte al produït per la insulina, aquesta hormona no altera l'activitat de la proteïna quinasa C (Henriksen et al., 1989).

En el sentit d'aquest darrer treball hi ha unes dades posteriors que atorguen un paper al DAG més important del que podria tenir la proteïna quinasa C en els mecanismes transductors de la insulina. S'ha observat que mentre la formació de miristoil-DAG per acció de la insulina, podria intervenir de manera important en la estimulació del transport de glucosa, l'activació de la proteïna quinasa C, mesurada com a grau de fosforilació de la proteïna de membrana de 40.000 de pes molecular, la qual és substrat d'aquesta quinasa, tan sols estaria parcialment implicada en aquest efecte, en cèl.lules CHO (Cherqui et al., 1990). És interessant resenyar que en aquest treball han observat una absoluta dependència dels residus de tirosina 1162 i 1163 del receptor de la insulina, els quals eren susceptibles de ser fosforilats en el procés d'autofosforilació, en l'efecte de la insulina sobre la formació del miristoil-DAG i l'estimulació del transport de glucosa, en cèl.lules CHO transfectades amb receptors mutants o amb receptors normals (Cherqui et al., 1990), mentre que treballs previs

descriuen efectes inalterats de la insulina sobre la proteïna quinasa S6 i sobre la mitogènesis (Debant et al., 1988) utilitzant la mateixa aproximació experimental.

La utilització d'inhibidors de la proteïna quinasa C ha tingut la finalitat de comprovar la participació d'aquest enzim en alguns dels efectes descrits per als esters de forbol. En estudis *in vivo*, s'ha observat que la polimixina B (PMXB) inhibeix l'hipoglucèmia induïda per l'administració d'insulina a ratolins (Amir i Shechter, 1985) i a rates (Amir et al., 1987); aquest efecte és degut a un bloqueig de l'acció estimuladora de la insulina sobre el transport de glucosa en teixit adipós i en múscul esquelètic; altres efectes de la insulina, com la inhibició de la lipòlisis a adipòcits o la síntesis de DNA a múscul, no són inhibits per la PMXB.

Estudis *in vitro* de l'efecte de la PMXB en incubacions de músculs soleus de ratolí (Grémeaux et al., 1987) indicaven una inhibició de l'acció de la insulina estimulante tant el transport de 2-deoxiglucosa com el transport d'AIB (anàleg aminoacídic, àc. α -aminoisobutíric), sense afectar els basals del transport, ni les activitats de "binding" de la insulina o la capacitat fosforilativa del receptor. L'activació de la glicogen sintasa per efecte de la insulina, no era bloquejada per la PMXB. Aquestes dades feien concloure als autors que l'efecte de la PMXB tenia lloc en algun pas posterior a l'activació del receptor de la insulina.

Els darrers treballs estan en la línia d'implicar a la proteïna quinasa C en la via d'acció de la insulina, en un pas posterior al propi receptor de l'hormona. Tot i això, aquests resultats són de difícil explicació ja que es coneix que els esters de forbol, presuntament activant la proteïna quinasa C, poden induir la fosforilació del receptor de la insulina en residus de serina, produïnt una inhibició de l'acció de la insulina en cèl·lules d'hepatoma o en adipòcits (Häring et al., 1986; Takamaya et al., 1984).

A més, estudis que portàrem a terme amb diferents inhibidors de la proteïna quinasa C, com la PMXB, l'H-7 (Gumà et al., 1990, B) i l'estaurosporina (Gumà et al., 1991d) en estudis sobre la captació de MeAIB en músculs EDL, indicaven que no aconseguïen revertir l'acció dels esters de forbol, el que implicava l'existència d'efectes inespecífics importants per part d'aquests compostos. Per tant, les conclusions a que varen arribar Grémeaux i col. a l'atribuir-li un paper a la proteïna quinasa C en base a la utilització de PMXB, podrien anar desencaminades.

En resum, mentre que els treballs realitzats als miòcits BC3H-1 apunten a assignar un paper a la proteïna quinasa C en la via d'acció de la insulina estimulant el transport de glucosa, les dades obtingudes a múscul esquelètic no corroboren aquesta hipòtesi. La línia miocítica BC3H-1 podria no ser un bon model per estudiar els mecanismes d'acció de la insulina en múscul, doncs aquesta línia presenta nombroses característiques de múscul llis (Schubert et al., 1974). D'altra banda respecte els arguments que utilitzava, entre d'altres el propi Farese (Farese, 1988), sobre la diferent sensibilitat de la proteïna quinasa C vers els esters de forbol, Holloszy (Henriksen et al., 1989) indica que els efectes del TPA sobre el transport de glucosa en músculs epitroclearis, són similars (2-3 vegades) als obtinguts per Farese en BC3H-1, però aquest darrer presenta unes accions de la insulina molt més baixes (2 vegades) a les observades en músculs incubats (5-10 vegades). En aquest sentit es interessant comentar unes dades de recent aparició del grup d'Amira Klip que indiquen que la línia BC3H-1 no expressa GLUT-4, el qual com ja s'ha vist en capítols anteriors, és el transportador de glucosa que està sotmés a l'acció de la insulina en teixit muscular (Mitsumoto et al., 1991).

Respecte a d'altres efectes de la insulina que podrien estar mediat per l'activació de la proteïna quinasa C gràcies a la producció de DAG, en estudis menys exhaustius que els realitzats pel transport de glucosa, tindriem els següents (estudis amb esters de forbol),

- augment de la lipogènesi (Van De Werve et al., 1985)
- activació de l'acetil-CoA carboxilasa (Vaartjes et al., 1987)
- activació de l'ATPasa Na^+/H^+ (Vara et al., 1985)
- increment en l'oxidació de glucosa (Farese et al., 1985)
- activació de la piruvat deshidrogenasa (Farese et al., 1985)
- augment de la mitogènesi (Farese et al., 1985)
- fosforilació de la proteïna ribosomal S6 (Trevillyan et al., 1985)
- activació del transport d'aminoàcids (Farese et al., 1985).

Pel que fa al transport d'aminoàcids, els experiments als que es fa referència (Farese et al., 1985) es realitzaren amb l'anàleg AIB en cèl.lules BC3H-1. Dades pròpies obtingudes per incubacions de músculs EDL on es mesurava la captació de

l'anàleg MeAIB (Gumà et al., 1990, B), no confirmaven l'existència d'efectes insulín-mimètics dels esters de forbol (TPA); no vàrem obtenir diferències significatives entre els grups control i els tractats.

La situació d'exercici sí que sembla requerir de DAG i de proteïna quinasa C per activar la captació de glucosa a nivell del metabolisme muscular. L'exercici indueix la translocació de la proteïna quinasa C (Richter et al., 1987), així com la producció de DAG i d'àc. fosfatídic en múscul esquelètic in vivo (Cleland et al., 1989). Tractaments llargs (12 h) amb esters de forbol, provoquen la deplecció de proteïna quinasa C, alhora que la contracció perd la seva capacitat per estimular el transport de glucosa en músculs soleus aïllats (Cleland et al., 1990).

Per finalitzar aquest capítol s'haurien de tenir en compte dades que indiquen que tot i que els esters de forbol semblen tenir efectes insulín-mimètics, alguns d'aquests efectes cursen per vies diferents als de la insulina. En la línia Reuber H35 de cèl.lules d'hepatoma de rata s'observa aquesta divergència en la inducció d'ornitina descarboxilasa per efecte dels esters de forbol i de la insulina (Goodman et al., 1988). També ha estat observat que els esters de forbol fosforilen els transportadors de glucosa, a diferència de la insulina (Gibbs et al., 1986; Joost et al., 1987). En aquest sentit hem observat que els esters de forbol tenen efectes additius amb els de la insulina pel que respecte a l'alliberament de lactat per músculs EDL incubats (Gumà et al., 1990, B).

D'altra banda falten interpretar dades com les que indiquen que l'activació de l'ATPasa Na^+/H^+ per insulina no implica una activació de la proteïna quinasa C (Vara et al., 1985) o que en adipòcits, els esters de forbol tenen efectes lipolítics, contràriament als de la insulina (Andersen et al., 1988).

No és podria descartar, malgrat totes aquestes dades, que hi hagi una via d'acció de la insulina que cursi a través de la proteïna quinasa C. D'entrada no coneixem encara si la insulina pot induir la producció selectiva de determinats DAG, i si aquests alhora poden presentar una especificitat diferencial vers els diferents isoenzims de proteïna quinasa C. Més encara, desconeixem quins isoenzims són els majoritaris als teixits diana de la insulina, i si aquests presenten una diferent afinitat vers els esters de forbol. Cherqui i col. apunten fins i tot, la possibilitat que la insulina

pugui realitzar l'estimulació del transport de glucosa per diferents vies a adipòcits, una dependent de proteïna quinasa C i que implicaria un increment en la V_{max} del transport, i una altra independent de proteïna quinasa C que implicaria tant un increment en la V_{max} , com un decrement en la K_m (Cherqui et al., 1989). La caracterització dels diferents isoenzims de la proteïna quinasa C, que actualment s'està portant a terme, sens dubta contribuirà a aclarir el panorama de la importància d'aquest enzim transduint algunes de les accions de la insulina.

B.3.2.3. Les proteïnes G.

Des del descobriment del cAMP (Rall et al., 1957), molts estudis cercaren informació sobre l'enzim que catalitza la formació d'aquest compost, l'adenilat ciclase. Inicialment es va observar que era activable per hormones, en presència de GTP (Rodbell et al., 1971). Tot un seguit de treballs culminaren en la purificació d'una proteïna transductora del senyal hormonal, que tenia capacitat per unir nucleòtids de guanina (Northup et al., 1980). En situació de tenir unit a ella el GTP, interaccionava amb l'adenilat ciclase activant-la. Aquesta proteïna va rebre el nom de proteïna G (inicialment anomenada N) i concretament va ser catalogada com a Gs a conseqüència de la purificació d'una altra proteïna G que intervenia en l'acció hormonal tot desactivant l'adenilat ciclase, per la qual cosa rebé el nom de Gi (Bokoch et al., 1983).

Les proteïnes G són heterotrímers formats per les subunitats α , β i γ , en ordre decreixent de pes molecular. Però aquestes no són més que un grup de proteïnes que lliguen GTP, doncs sota aquesta característica s'inclouen factors que controlen la síntesi proteica així com el grup de proteïnes monomèriques que presenten homologia estructural amb les proteïnes codificades pels oncogens ras (superfamília ras).

Totes aquestes proteïnes que tenen afinitat pels nucleòtids de guanina tenen en comú el domini d'unió del GTP, que es troba altament conservat, però les proteïnes G es diferencien de la resta en què la subunitat α , que és la que té activitat catalítica GTPasa, pot ser regulada pel complex $\beta\gamma$ en unir-se a ell, mentre que les altres proteïnes no tenen capacitat per formar oligòmers heteròlegs. A més les proteïnes G

tenen una activitat GTPasa basal extremadament baixa, que pot ser regulada directament pels efectors que elles mateixes controlen (McCormick, 1989). Les proteïnes G s'activen per la unió de Mg^{2+} i subsegüent unió de GTP. Això provoca la separació de la subunitat α de les subunitats $\beta\gamma$, de manera que la primera pot accedir a l'adenilat ciclasa per modular la seva activitat, mentre que les subunitats $\beta\gamma$ podrien tenir una funció reguladora vers altres proteïnes G al estar en disposició d'unir-se a subunitats α lliures. Alhora, els receptors hormonals que han generat el trencament de la proteïna G perden afinitat pels seus agonistes. Quan la subunitat α genera $GDP+Pi$ perd afinitat per l'adenilat ciclasa i torna a unir-se al complex $\beta\gamma$, mentre que els receptors hormonals als que es troba acoblada, recuperen l'afinitat pels seus agonistes. El GDP seguirà unit a la subunitat α fins que de nou un receptor hormonal acoblat sigui activat pel seu agonista i generi l'alliberament del GDP de la proteïna G, reiniciant-se el cicle (Birnbaumer et al., 1984).

Les proteïnes G es classifiquen per les seves subunitats α . S'han identificat 9 gens que codifiquen per subunitats α i es conèixen 12 polipèptids que són productes d'aquests gens. Cada subunitat α conté:

- locus d'unió d'alta afinitat als nucleòtids de guanina, amb activitat GTPasa,
- locus d'unió d'alta afinitat al Mg^{2+} ; aquest ió també sembla interaccionar amb un locus de baixa afinitat en l'estat inactiu en el qual el GDP es troba unit a l'oligòmer, de manera que l'afinitat per a aquest locus és modulada per la unió de l'agonista al receptor,
- "loci" susceptibles de ser modificats covalentment per toxines bacterianes que catalitzen la reacció ADP-ribosiltransferasa dependent de NAD^+ . Les G_s i G_t (també coneguda com a transducina) són substrats de la toxina colèrica, que provoca una activació persistent de les corresponents subunitats α . Les G_i i les G_o són substrat de la toxina pertussis, que provoca una interferència en la interacció entre la proteïna G i els receptors (Freissmuth et al., 1989).

Les G_o i G_i contenen miristat N-lligat (Buss et al., 1987), però el significat d'aquesta modificació covalent encara no està clar.

Les proteïnes G clàssicament s'han conegut com a mediadores de les accions dels receptors adrenèrgics. Mentre que els receptors β -adrenèrgics utilitzen

essencialment les Gs com a elements transductors induint activacions de l'adenilat ciclase, els receptors α_2 -adrenèrgics utilitzen més específicament les Gi i Go inhibint l'esmentat enzim. D'altra banda els receptors α_1 -adrenèrgics, sembla que també a través d'una proteïna G, induirien l'activació d'una fosfolipasa C que donaria lloc a inositols fosfats i DAG (Birnbaumer et al., 1987; Freissmuth et al., 1989).

Al menys 3 subtipus de proteïna G poden estimular la fosfolipasa C: (veure la revisió de Sato, 1989)

G_p, que no és substrat ni de toxina colèrica ni de toxina pertussis,

G sensible a toxina pertussis, acoblada als receptors α_1 -adrenèrgics en adipòcits,

G sensible a toxina colèrica.

S'ha volgut implicar a les proteïnes G en algunes de les accions de la insulina a partir d'estudis que demostren que la toxina pertussis, en 3T3-L1 i adipòcits (Elks et al., 1987; Goren et al., 1985), en BC3H-1 (Luttrell et al., 1988 i 1990) i en hepatòcits (Heyworth et al., 1986) o anticossos contra la proteïna d'unió a GTP "ras p21", en oòcits de *Xenopus laevis* (Deshpande et al., 1987; Korn et al., 1987), poden blocar determinades accions de la insulina.

La toxina pertussis pot blocar la producció dependent d'insulina de la fracció de diacilglicerols que conté miristat (Luttrell et al., 1988), així com l'acumulació en el medi extracel·lular de l'inositol glicà (Romero et al., 1988), en cèl·lules BC3H-1. Accions biològiques de la insulina com són l'estimulació del transport de glucosa o la incorporació de timidina tritiada, es troben inhibides de manera important (70 i 60%, respectivament) per tractaments amb toxina pertussis en cèl·lules BC3H-1 (Luttrell et al., 1988).

Estudis en aquest mateix tipus cel·lular implicaven la participació d'una fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol glicà en els mecanismes d'acció de la insulina (Saltiel et al., 1987; Low i Saltiel, 1988). Treballs amb toxines i amb anticossos específics de proteïna G indiquen que l'activació d'aquesta fosfolipasa C induïda per insulina pot ser mediada per proteïna G (Elks et al., 1987; Heyworth et al., 1985; Korn et al., 1987; Luttrell i Rogol, 1987).

En adipòcits, la situació sembla diferent a partir de dades que indiquen que la toxina pertussis no inhibeix la captació de glucosa estimulada per insulina, tot i que

fosfolipasa C exògena i $AlCl_3$, aquest darrer utilitzat com a activador de proteïnes G, mimetitzen parcialment aquest efecte de la insulina (Obermaier-Kusser et al., 1988). En aquest mateix sentit apunten els resultats d'altres autors que observen que la toxina pertussis no bloca l'acció de la insulina sobre l'oxidació de la glucosa en adipòcits, tot i provocar reduccions considerables en les taxes basals i estimulades, però sí que inhibeix l'acció anti-lipolítica de la insulina, en adipòcits tractats amb catecolamines (Goren et al., 1985). Pel que respecte a les reduccions en les taxes d'oxidació de la glucosa, hi ha dades que indiquen que els nucleòtids de guanina poden modular l'activitat dels transportadors de glucosa d'adipòcits (Schürmann et al., 1989).

Contràriament a les dades acabades de referir, s'han realitzat observacions on sí que es detecten inhibicions parcials de l'acció de la insulina estimulants la captació de glucosa per efecte de la toxina pertussis en adipòcits (Ciaraldi i Maisel, 1989), alhora que es detecten reduccions en la taxa d'unió de la insulina al seu recetor (40%) i en la sensibilitat de l'estimulació del transport de glucosa vers la insulina, indicant l'existència d'un desacoblament entre el receptor i les accions posteriors a ell, i per tant la possible participació d'una proteïna G sensible a toxina pertussis en adipòcits.

Recolzant el concepte de la participació d'una proteïna G en la via d'acció de la insulina estimulants la captació de glucosa, s'ha observat que en adipòcits permeabilitzats, alguns anàlegs del GTP, com el $GTP\gamma S$, provoquen la translocació de GLUT-4 des de l'interior cel·lular cap a la membrana plasmàtica (Baldini et al., 1991), efecte que no es dona quan s'utilitzen adipòcits no permeabilitzats.

La insulina incrementa l'activitat de la fosfodiesterasa de cAMP de baixa K_m , tant en hepatòcits com en adipòcits (Francis i Kono, 1982; Houslay, et al., 1983; Thompson i Strada, 1978). En aquest sentit s'ha observat que la toxina pertussis inhibeix la capacitat de la insulina d'activar la fosfodiesterasa de cAMP de baixa K_m en adipòcits 3T3-L1 (Elks et al., 1983).

Pel que fa als hepatòcits, la fosfodiesterasa sensible a la insulina és activada per un increment en el seu estat de fosforilació (Marchmon i Houslay, 1981), en residus de serina. Aquesta acció de la insulina pot ser reproduïda per nucleòtids de guanina i per anàlegs d'aquests, així com per la toxina colèrica (Heyworth et al., 1983).

Altament, el tractament d'hepatòcits amb toxina pertussis provoca un bloqueig

en la capacitat de la insulina per inhibir l'adenilat ciclase (Heyworth et al., 1986). Aquestes observacions han contribuït a proposar l'existència de proteïnes G en els mecanismes d'acció de la insulina en fetge.

Certes proteïnes G poden ser bons substrats per a la quinasa del receptor de la insulina in vitro (Kamata et al., 1987; O'Brien et al., 1987; Zick et al., 1988). Encara que la fosforilació directa de la proteïna G en residus de tirosina en resposta a la insulina no ha estat observada in vivo, les dades in vitro suggereixen almenys, la possibilitat d'una interacció d'elevada afinitat entre determinades proteïnes G i el receptor. En aquest sentit, s'ha especulat que proteïnes G que participarien en l'activació de la fosfolipasa C per acció de la insulina, podrien ser fosforilades en tirosines pel receptor de la insulina (Walaas i Walaas, 1988).

En membranes plasmàtiques de fetge i de teixit adipós, s'ha observat que la insulina provoca una inhibició de l'ADP-ribosilació, catalitzada per la toxina pertussis, de Gi. Aquest fet podria indicar que la insulina afecta d'alguna manera la proteïna Gi en el procés de transducció, tot i que in vivo no provoca la fosforilació en tirosines de les Gi per acció del seu receptor (Rothenberg i Kahn, 1988).

En liposomes que contenen receptor d'insulina purificat i diverses proteïnes G (Krupinski et al., 1988), s'ha observat que la insulina promou la fosforilació d'almenys dues proteïnes G, la Go i la Gi; la Gt no és un bon substrat i la Gs no és fosforilada. La fosforilació de la Go i la Gi afecta a la subunitat α en residus de tirosina de manera que cada receptor $\alpha_2\beta_2$ fosforila una subunitat α de la proteïna G. Quan la proteïna G reté GDP és quan actua com a millor substrat pel receptor de la insulina. En aquest sistema també s'ha observat que les proteïnes Gi i Go faciliten l'estimulació per part de la insulina, de l'autofosforilació del seu receptor (Krupinski et al., 1988).

En miòcits cardíacs aïllats, la toxina colèrica inhibeix un 50% l'acció de la insulina sobre el transport de 3-O metilglucosa, mentre que la toxina pertussis no produïx cap efecte. En animals diabètics els transportadors de glucosa no són sensibles a toxina colèrica, el que correlaciona amb decrement del 85% de l'expressió dels transportadors de glucosa regulables per la insulina. El transport basal no es veu afectat per cap de les toxines. L'isoproterenol incrementa la captació de glucosa en un 63% després de 30 min d'acció, efecte que pot ser completament blocat per toxina

colèrica. Aquests resultats fan proposar als autors la participació d'una proteïna G sensible a toxina colèrica i propera als transportadors de glucosa sensibles a la insulina, que pot mediar les accions de la insulina i de l'isoproterenol estimulant la captació de glucosa (Eckel et al., 1990).

Estudis realitzats a músculs soleus amb AIF_α, conegut activador de proteïnes G, indicaren una inhibició total de l'acció de la insulina estimulant el transport de MeAIB. Estudis posteriors han explicat aquest resultat, el qual és degut a una acció inhibidora del F sobre l'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina (Viñals, F.; Tesina de Llicenciatura, 1991).

Donat que el tema d'una possible participació de la proteïna G en l'acció de la insulina, no estava tractat pel que fa al múscul esquelètic, tret d'estudis en línies cel·lulars establertes, ens plantejarem realitzar treballs amb toxina pertussis en incubacions de músculs soleus. Aquests indiquen que l'esmentada toxina no inhibeix l'acció de la insulina estimulant la captació de glucosa ni la de MeAIB (Gumà et al., F).

Altrament, tampoc observarem inhibicions de la captació basal de glucosa per efecte de la toxina pertussis (Taula-9), tal i com havia estat descrit per alguns autors a adipòcits.

TAULA-9: Efectes de la toxina pertussis (TP) sobre la captació de glucosa en soleus.

	Basal	Insulina, 100 nM, 60 min
	(nmols 3-O MeGlu / g x 30 min)	
Control	7.39 ± 1.2	16.84 ± 2.27
TP, 100 ng/ml, 90 min	10.39 ± 2.27	16.29 ± 2.79
Propranolol, 10µM 150 min+TP	11.14 ± 0.92	--

(Propranolol, blocador β-adrenèrgic).

En aquest sentit també cal apuntar que en experiments on músculs EDL eren incubats en presència de toxina colèrica, no vàrem observar modificacions de les

captacions basals de MeAIB ni de les estimulades per la insulina (Gumà et al., F).

En conclusió, la informació que podem extreure indica que les proteïnes G podrien participar en els mecanismes d'acció de la insulina en determinats teixits diana d'aquesta hormona, com són el fetge, el teixit adipòs i el múscul cardíac. A més en cada teixit semblen participar diferents proteïnes G en l'acció de la insulina, algunes sensibles a toxina colèrica com pel que fa a algunes de les accions de la insulina en fetge o en múscul cardíac, i d'altres sensibles a toxina pertussis com ha estat descrit també per al fetge, i per als adipòcits i cèl·lules BC3H-1. Fins i tot ha estat suggerit que pel que fa als efectes de la insulina sobre el transport de glucosa, proteïnes G sensibles a toxina pertussis podrien estar implicades en la regulació del transport tot modulant el receptor de la insulina o la producció de mediadors primers, mentre que proteïnes G sensibles a toxina colèrica podrien regular directament els transportadors de glucosa sensibles a la insulina, potser induïnt una alteració en el seu estat de fosforilació (Eckel et al., 1990).

Tot i que els estudis en múscul esquelètic requereixen d'una recerca més extensa i acurada, inicialment podem dir que proteïnes G sensibles a toxina pertussis o a toxina colèrica, no semblen participar en els mecanismes d'acció de la insulina estimulants la captació de glucosa o de MeAIB.

B.3.3. Elements transductors de l'acció de la insulina sobre l'activitat de transport del sistema A en el múscul esquelètic.

Aquest capítol, a manera de resum, serà un recull d'informació ja comentada que tractarà específicament dels principals aspectes coneguts en relació als mecanismes d'acció de la insulina presuntament implicats en l'estimulació del sistema A de transport d'aminoàcids en múscul esquelètic. La recerca en aquesta àrea encara resulta força indirecta al no disposar d'eines per identificar els transportadors que engloba l'anomenat sistema A, tot i que el clonatge i seqüenciació de diferents transportadors d'aminoàcids d'eucariotes ja s'està portant a terme en diferents laboratoris.

La informació de que disposem al voltant d'aquest tema és la següent,

1. L'acció de la insulina estimulant el sistema A de múscul esquelètic és conseqüència de la unió de l'hormona a receptors de insulina (Zorzano et al., 1985; James et al., 1986).
2. Aquesta acció de la insulina depén d'una intacta activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina (Gumà et al., B; Viñals et al., en preparació).
3. En la via de transducció del senyal que condueix a l'estimulació del sistema A en resposta a la insulina, no es troben ni isoformes de proteïna quinasa C sensibles als esters de forbol, ni proteïnes G substrat de toxina pertussis o toxina colèrica (Gumà et al., 1990, B; Gumà et al., F).
4. El sistema A s'activa per acció de la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (Gumà et al., F; Sowell et al., 1991). El mecanisme pel qual es produeix aquest efecte no està relacionat amb canvis en els nivells de Ca^{2+} intracel·lulars (Gumà et al., F).
5. L'acció de la insulina sobre el sistema A és ràpida i independent de la síntesis de mRNA i de proteïnes, a múscul esquelètic (Elsas et al., 1968; Gumà et al., 1988, B).
6. La caracterització cinètica d'aquesta acció de la insulina presenta increments de la V_{max} del transport, sense alteracions apreciables de la K_m (Elsas et al., 1975; Guidotti et al., 1978; Le Marchand-Brustel et al., 1982; Gumà et al., 1988, A).
7. La insulina estimula l'ATPasa Na^+/K^+ (Clausen i Kohn, 1977; Grinstein i Erlj, 1974; Rosic et al., 1985; Zierler et al., 1981). El sistema A co-transporta amb cada aminoàcid, un ió Na^+ , però l'acció de la insulina estimulant el sistema A no depén d'una intacta activitat de la ATPasa Na^+/K^+ (Zorzano et al., 1986; Gumà et al., 1988, A) ni del gradient electroquímic de Na^+ (Gumà et al., 1988, A) en múscul esquelètic.

8. La insulina no provoca l'alcalinització del pH intracel.lular en múscul soleus, i l'estimulació induïda sobre el sistema A no es bloca per inhibidors (etil-isopropilamilorida, EIPA) de l'intercanviador Na^+/H^+ (Muñoz et al., 1991).
9. El vanadat té efectes insulin-mimètics sobre el sistema A en múscul. Tot i això, a diferència del que s'observa per a la insulina, aquest efectes del vanadat semblen estar relacionats amb l'alcalinització que produeix en el pH intracel.lular (Muñoz et al., 1991).
10. L'estimulació del sistema A en múscul induïda per la insulina no depèn d'una intacta activitat de microtúbuls ni de microfilaments (Gumà et al., E), en contra del que succeeix a hepatòcits on aquesta estimulació és dependent de síntesi proteica (Prentki et al., 1981). Tanmateix al múscul, la regulació adaptativa, que comporta l'estimulació del sistema A per un mecanisme dependent de síntesi proteica, també requereix d'una adequada funció dels microtúbuls (Gumà et al., E).
11. La denervació provoca una disminució en l'activitat de transport del sistema A però no inhibeix la seva estimulació per la insulina (Sowell et al., 1989).

B.4. Mecanismes de regulació de l'acció de la insulina.

La insulina en unir-se al seu receptor genera tot un seguit de senyals, alguns d'ells ràpids i d'altres d'expressió més tardana, que donaran lloc als seus efectes biològics, tal i com hem vist al capítol B.3. Aquests efectes no modulen el metabolisme cel·lular indefinidament sinó que comencen a minvar quan el senyal generat per la insulina desapareix. Podríem pensar que la insulina no sols genera senyals inductors dels seus efectes, sinó també i de manera simultània, senyals que modularan, potenciant o inhibint, els primers. Fins i tot es podria fer la hipòtesi per la qual els mateixos senyals inductors poden realitzar funcions transductores de l'acció de la insulina i alhora retroinhibir el senyal que els ha activat a ells.

La insulina provoca un ràpid increment en la fosforilació dels residus de tirosina del seu receptor en cèl·lules intactes. Aquest assoleix el màxim en 1 min i sembla anar seguit per un increment en la fosforilació en serines al voltant dels següents 10 min (Pang et al., 1985; White et al., 1985; Ballotti et al., 1987). La fosforilació en residus de serina del receptor de la insulina sembla impedir qualsevol subsegüent fosforilació en residus de tirosina en resposta a la insulina (Pang et al., 1985; Ballotti et al., 1987). S'ha especulat que aquest pugui ser un mecanisme d'inhibició de l'activitat del receptor. Aquesta fosforilació en serines esdevé posteriorment a la fosforilació de les tirosines, però no sembla ser produïda pel propi receptor doncs en preparacions purificades de receptors tan sols s'ha observat fosforilació en residus de tirosina (Shoelson i Kahn, 1989).

En cèl·lules CHO.T transfectades amb cDNA del receptor de la insulina, s'ha descrit que la insulina provoca la fosforilació del receptor no sols en serines sinó també en treonines i que el domini que és fosforilat en treonines és diferent del domini que és fosforilat en tirosines i serines (Tavaré et al., 1988). A més, en cèl·lules NIH 3T3 HIR3.5 que també varen ser transfectades amb el cDNA del receptor de la insulina es va descriure que la fosforilació en serines del receptor era transitoria (Tavaré et al., 1988).

No coneixem encara quina/-es de les Ser/Thr quinases cel·lulars són les responsables d'aquesta fosforilació del receptor de la insulina. Més endavant detallarem els estudis realitzats al voltant de les Ser/Thr quinases més conegudes, la

proteïna quinasa dependent de Ca^{2+} i fosfolípids (PQ-C) i la proteïna quinasa dependent de cAMP (PQ-A), en el seu possible paper regulador de l'acció de la insulina. També s'han trobat algunes Ser-quinases cel·lulars que no tenen els trets característics de la PQ-C o de la PQ-A però que són sensibles a l'acció de la insulina i podrien tenir un paper en la modulació del receptor.

Analitzarem també els treballs que ens indiquen l'existència de possibles modulacions de l'acció de la insulina a nivell post-receptor.

Altrament, s'ha observat que les hormones que originen accions catabòliques en els seus teixits diana, com les catecolamines o els glucocorticoids, també produeixen interferències en l'acció d'hormones amb efectes anabòlics, com la insulina. Aquests efectes de "cross-talk" entre les vies de transducció de diferents hormones seran breument tractats pel que comporta a una regulació de l'acció de la insulina.

Passem tot seguit a descriure les dades que destacarem referents a aquests temes.

B.4.1. La proteïna quinasa C.

Des de principis de la dècada del 80', diversos autors han estudiat el possible paper de la proteïna quinasa C en la regulació de l'acció de la insulina, des que aquesta serina quinasa podria estar modulant algun dels senyals que genera aquesta hormona.

La major part d'aquests treballs s'han portat a terme emprant esters de forbol com el 12-O-tetradecanoil- β -forbol 13-acetat, TPA (= 4 β -forbol 12-miristat 13-acetat, PMA) o el 4 β -forbol 12,13-dibutirat, PDB (=PDBu), potents promotors tumorals que s'extreuen d'una Euforbiàcia (*Croton tiglium*). Aquests esters de forbol són capaços d'activar la proteïna quinasa C (Castagna et al., 1982) tot induint la seva translocació a la membrana (veure l'apartat B.3.2.2.).

Els estudis de la possible participació de la proteïna quinasa C regulant l'acció de la insulina a nivell del receptor, comprenen dos punts: els que cerquen alteracions en la unió de la insulina al seu receptor, i els que cerquen modificacions en l'activitat tirosina quinasa del receptor.

Quant al primer punt, estudis inicials portats a terme incubant diversos tipus cel·lulars d'origen tumoral amb esters de forbol, descriuen una inhibició de la unió de la insulina al seu receptor (Salomon, 1981; Thomopoulos, 1982). Pel que fa a estudis en adipòcits, mentre alguns autors han vist efectes inhibidors dels esters de forbol sobre la unió de la insulina al seu receptor (Kirsch et al., 1985), altres no han confirmat aquestes observacions (Van De Werve et al., 1985). Estudis que portarem a terme en incubacions de músculs EDL indicaven que els esters de forbol no inhibien la unió de la insulina al seu receptor (Gumà et al., 1990, B).

Aquests estudis també s'han realitzat en sistemes in vitro, a partir d'incubacions prèvies del teixit amb esters de forbol i posterior purificació dels receptors de la insulina. Així mentre que en receptors d'adipòcits s'ha observat una inhibició de la unió de la insulina al receptor (Häring et al., 1986), en receptors de músculs EDL, no s'han observat efectes inhibidors (Gumà et al., 1990, B), confirmant en cada cas les observacions realitzades en sistemes in vivo.

Diversos autors han observat que la proteïna quinasa C, en estudis in vitro, o els esters de forbol, en estudis in vivo, provoquen una fosforilació en serines del receptor de la insulina (Jacobs et al., 1983; Takayama et al., 1984; Bollag et al., 1986; Takayama et al., 1988). Estudis in vitro on els receptors de la insulina s'incubaven en presència de proteïna quinasa C, indiquen que tot i que aquest enzim fosforila en residus de serina la subunitat β del receptor de la insulina, aquesta fosforilació no afecta a la unió de la insulina al receptor (Bollag et al., 1986), però sí que s'observa un decrement important en l'activitat tirosina quinasa d'aquest.

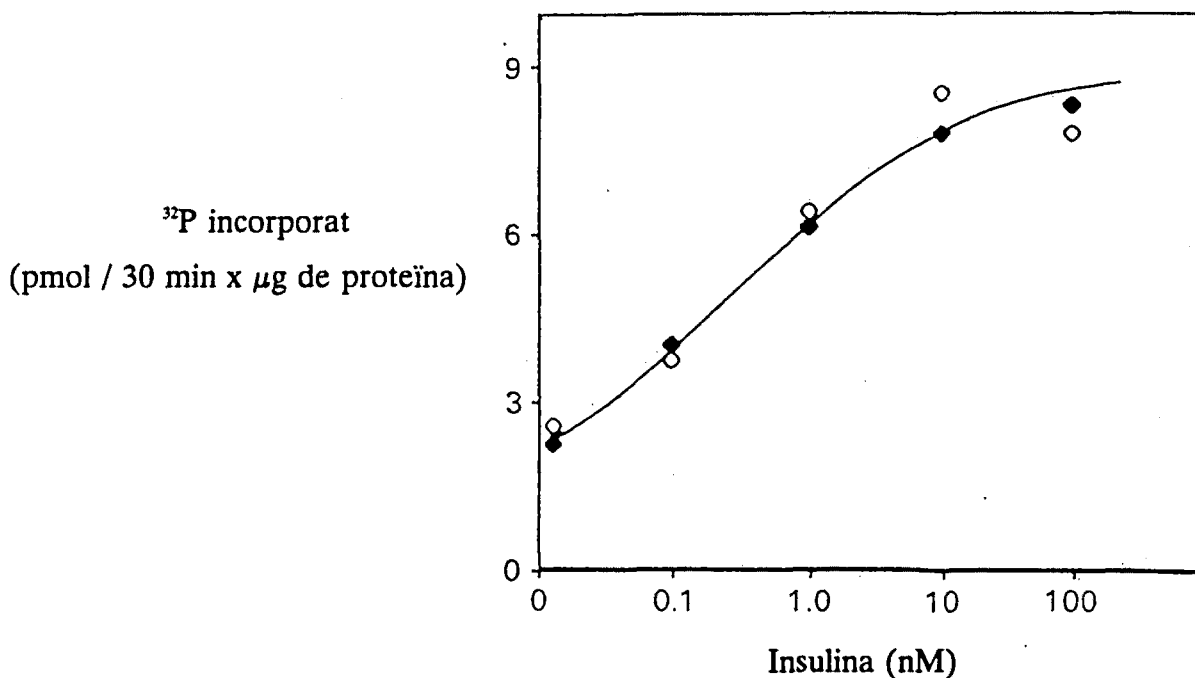
Pel que fa a adipòcits pre-tractats amb ésters de forbol, els receptors de la insulina purificats presenten una disminució en els nivells d'autofosforilació i en l'activitat tirosina quinasa vers a substrats exògens, que són presuntament atribuïbles a un increment en la K_m de l'ATP pel receptor (Häring et al., 1986). El mateix efecte s'observa a partir de cèl·lules del hepatoma FAO, tot i que en aquest cas la disminució de l'activitat tirosina quinasa és atribuïda a un decrement en la V_{max} , ja que la K_m per l'ATP també està lleugerament disminuïda (Takayama et al., 1988); aquests efectes poden ser revertits quan la incubació prèvia de les cèl·lules es realitza en presència de fosfatasa alcalina.

Alguns autors han atribuït un paper a la proteïna quinasa C en situacions

de resistència a la insulina com la que es genera en rates després de 3 dies de dejuni; en aquests animals s'ha observat que el fetge presenta activitats més elevades de la proteïna quinasa C, respecte als controls alimentats, i que els receptors de la insulina tenen una menor capacitat d'autofosforilar-se; quan aquests receptors són tractats amb fosfatasa alcalina o bé se'ls hi elimina l'extrem C-terminal, recuperen els seus nivells d'autofosforilació (Karasik et al., 1990), de manera que s'especula que en aquest teixit la proteïna quinasa C fosforili alguna Ser de l'extrem C-terminal que produeixi una inhibició en l'activitat tirosina quinasa del receptor.

Pel que fa a estudis que realitzàrem a partir de músculs EDL pre-tractats amb esters de forbol (Figura-11), no observàrem cap inhibició en l'activitat tirosina quinasa dels receptors procedents d'aquests músculs (Gumà et al., 1990, B), a diferència del que havia estat descrit per a adipòcits i fetge.

FIGURA-11: Activitat tirosina quinasa de receptors de la insulina de músculs EDL controls i pre-tractats amb esters de forbol.



Controls ●

TPA ○

(Extret de: Gumà et al., 1990, B).

Aquesta manca d'efecte dels esters de forbol inhibint l'activitat del receptor de la insulina en múscul, ja havia estat descrita per altres autors (Sowell et al., 1988); en preparacions de receptors parcialment purificats, procedents d'hemidiafragma pretractat amb esters de forbol, no s'observaven alteracions ni en la unió de la insulina al receptor ni en l'activitat tirosina quinasa d'aquest.

Una altra qüestió és saber si la insulina pot activar la proteïna quinasa C, per la qual cosa s'han realitzat estudis de l'activitat d'aquest enzim a citosol i a membrana plasmàtica com a mesura de la translocació d'aquest enzim, procés que com ja hem comentat, va associat a la seva activació.

Mentre que aquesta translocació s'ha vist que és induïda pels esters de forbol a múscul (Van de Werve et al., 1987; Walaas et al., 1987; Henriksen et al., 1989; Klip i Ramlal, 1987; Tanti et al., 1989), a hepatòcits (Vaartjes et al., 1986) i per diacilglicerol, DAG, a adipòcits (Ishizuka et al., 1990), la insulina no indueix la translocació de la proteïna quinasa C a múscul (Walaas et al., 1987; Henriksen et al., 1989; Klip i Ramlal, 1987) ni a hepatòcits (Vaartjes et al., 1986), tot i que a adipòcits sí que s'han descrit efectes de la insulina estimulants la translocació (Ishizuka et al., 1990). Malgrat aquesta manca d'efecte de la insulina a múscul, s'ha descrit que aquesta hormona indueix una activació de la proteïna quinasa C associada a la membrana en aquest teixit (Walaas et al., 1987).

Pel que fa als efectes dels esters de forbol sobre accions biològiques de la insulina, s'han realitzats estudis que sobre tot impliquen al transport de glucosa.

La captació basal de glucosa, en general, s'ha observat que resulta estimulada per efecte dels esters de forbol. Així a múscul esquelètic s'han realitzat les següents observacions: a músculs epitroclearis s'han trobat estimulacions d'un 20% respecte a l'estimulació per insulina (Henriksen et al., 1989), a EDL, d'un 25% (Gumà et al., 1990, B), i pel que fa a soleus i hemidiafragma, mentre que alguns no observen cap efecte estimulador (Sowell et al., 1988), altres veuen escassos efectes en hemidiafragma mentre que en soleus les estimulacions són del 70% respecte a les assolides per la insulina (Ishizuka et al., 1990). A cor perfundit també s'han observat estimulacions de la captació de glucosa per efecte dels esters de forbol (Vaartjes et al., 1986), a l'igual que a limfòcits (Klip et al., 1984), mentre que a hepatòcits unes observacions indiquen que hi ha una menor activitat de la glicogen sintasa (Vaartjes et al., 1986).

A adipòcits els esters de forbol estimulen la captació de glucosa (Kirsch et al., 1985; Saltis et al., 1991), sembla ser que a conseqüència d'un increment en la translocació dels transportadors GLUT-1 cap a la membrana (Saltis et al., 1991). A més d'aquest efecte sobre la translocació, els esters de forbol provoquen la fosforilació de GLUT-1, la qual cosa pot ser responsable també d'una diferent activitat del transportador (Allard et al., 1987; Gibbs et al., 1986; Joost et al., 1987; Witters et al., 1985).

Si la proteïna quinasa C participa en la regulació de l'acció de la insulina, els esters de forbol haurien d'estar modulant negativament les accions biològiques induïdes per aquesta hormona. Pel que fa al transport de glucosa, en múscul esquelètic no s'observen alteracions de l'activitat estimuladora de la insulina, per efecte dels esters de forbol (Sowell et al., 1988; Gumà et al., 1990, B). En línies cel·lulars miocítiques com la L6 (Klip i Ramlal, 1987) o la BC3H-1 (Farese et al., 1985), tampoc s'observen alteracions de l'acció de la insulina. En canvi, a cor perfundit sí que s'observen inhibicions de l'acció de la insulina (Vaartjes et al., 1986). D'altra banda, alguns autors han observat efectes estimuladors dels esters de forbol sobre la captació de glucosa induïda per la insulina en soleus de ratolí, tot i que les estimulacions no són additives (Tanti et al., 1989).

Pel que fa als adipòcits, les dades de què es disposa són contradictòries; mentre que uns afirmen l'existència de lleugers efectes inhibidors dels esters de forbol sobre la captació de glucosa estimulada per la insulina (Kirsch et al., 1985), altres observen efectes additius entre la insulina i els esters de forbol (Saltis et al., 1991). A adipòcits també s'ha descrit que els esters de forbol inhibeixen la lipogènesi estimulada per la insulina tot i que estimulen les taxes basals (Van De Werve et al., 1985).

Pel que respecte al sistema A de transport d'aminoàcids, mentre que la captació basal de MeAIB no es veu afectada pels esters de forbol en múscul EDL (Gumà et al., 1990, B), en BC3H-1 altres autors descriuen l'existència d'efectes estimuladors (Farese et al., 1985); hi ha indicis que apunten a que aquesta línia cel·lular presenta característiques més properes al múscul llis que a l'estriat (Henriksen et al., 1989; Mitsumoto et al., 1991) i per tant podria no ser un bon model per l'estudi del múscul esquelètic. Altrament, l'acció dels esters de forbol sobre els efectes de la insulina estimulants la captació de MeAIB en músculs EDL (Taula-10), és inhibidora (Gumà et al., 1990, B).

TAULA-10: Efecte dels esters de forbol sobre la captació de MeAIB basal i estimulada per la insulina en músculs EDL.

	Captació de MeAIB (nmols MeAIB / g x 30 min)	% d'acció
Basal	19.2 ± 1.7	
Insulina, 100 nM, 60 min	33.2 ± 2.9	68%
Insulina + TPA, 500 nM, 90 min	23.3 ± 2.0	21%

Donat que aquests efectes dels esters de forbol no comportaven alteracions ni en la capacitat d'unió de la insulina al seu receptor, ni en l'activitat tirosina quinasa d'aquest, proposarem la hipòtesi de que la proteïna quinasa C regulava l'acció de la insulina en un pas posterior a l'activació del receptor que afectava a la via transductora que modula el sistema A (Gumà et al., 1990, B).

En el cas del transport de glucosa, la situació és diferent. Els esters de forbol, a menys pel que fa a múscul esquelètic, no inhibeixen l'estimulació induïda per la insulina, el que implica que la proteïna quinasa C no participa en la regulació de la via d'acció de la insulina que modula la captació de glucosa. En aquest sentit alguns autors han observat en cèl.lules L6, que en tractaments llargs amb esters de forbol que provoquen la deplecció de proteïna quinasa C, tant la captació de glucosa basal com la estimulada per la insulina, romanen inalterades (Klip i Ramlal, 1987).

Els esters de forbol no han estat les úniques substàncies emprades per activar la proteïna quinasa C. Un altre apropament experimental ha consistit en utilitzar fosfolipasa C exògena per tal d'obtenir DAG de la pròpia cèl.lula, el qual com és conegut, activaria la proteïna quinasa C (veure l'apartat B.3.2.2.). Així s'ha observat que la fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*, tipus IX i XIV, que té com a substrat qualsevol dels fosfolípids de la membrana, provoca estimulacions de la captació de glucosa en soleus, EDL, epitroclearis i hemidiafragma (Ishizuka et al., 1990; Henriksen et al., 1989; Sowell et al., 1991; Gumà et al., F), però no afecta la captació estimulada per la insulina (Henriksen et al., 1989; Sowell et al., 1991; Gumà et al., F).

La fosfolipasa C provoca increments en l'activitat de la proteïna quinasa C de la membrana equivalents a la que indueixen els esters de forbol, però no afecta a la proteïna quinasa C del citosol, en músculs epitroclearis (Henriksen et al., 1989).

En músculs soleus i EDL s'han realitzat estudis dels efectes de la fosfolipasa C sobre la captació de MeAIB. En músculs soleus s'ha descrit que la fosfolipasa C no afecta la captació basal però que totalment bloca la inducció produïda per la insulina (Sowell et al., 1991). Experiments que vàrem dur a terme amb músculs EDL ens indicaven l'existència d'estimulacions significatives de la captació basal de MeAIB per efecte de la fosfolipasa C mentre que aquest enzim inhibia totalment, a l'igual que en soleus, la captació induïda per la insulina (Gumà et al., F).

Alguns autors han observat que aquestes accions de la fosfolipasa C depenen d'una adequada aportació d'ions Ca^{2+} del reticle en músculs epitroclearis (Henriksen et al., 1989), mentre que d'altres indiquen que la dependència correspon als ions Ca^{2+} d'origen extracel·lular en músculs soleus (Sowell et al., 1991). En experiments portats a terme amb blocadors dels canals de Ca^{2+} del reticle (Dantrolene) o de la membrana plasmàtica (Verapamil), no observàrem cap inhibició de l'acció de la fosfolipasa C sobre la captació de MeAIB (Gumà et al., F), ni tampoc vàrem observar que l'acció de la insulina es veiés afectada. En absència de Ca^{2+} extracel·lular alguns autors havien observat inhibicions del 20% de l'acció de la insulina sobre el transport de glucosa (Sowell et al., 1991).

Podríem concloure que aquests efectes de la fosfolipasa C estimulants la captació basal de glucosa puguin ser parcialment deguts a la producció de DAG i consegüent activació de la proteïna quinasa C, el que estaria d'acord amb les observacions realitzades utilitzant esters de forbol. També resulten similars els resultats obtinguts per a la captació de glucosa estimulada per la insulina, pel que fa a l'acció de la fosfolipasa C i dels esters de forbol en múscul esquelètic. Cal, però, notar que l'acció estimuladora de la fosfolipasa C és més potent que la dels esters de forbol el que estaria d'acord amb la hipòtesi formulada per alguns autors en el sentit que les diferents isoformes de proteïna quinasa C que es troben en cada teixit, poden presentar una diferent sensibilitat vers els esters de forbol (Farese et al., 1988), mentre que algun dels DAG que previsiblement són generats per la fosfolipasa C podria estar manifestant una afinitat més gran vers la proteïna quinasa C, i per tant produir efectes

més considerables.

En canvi, pel que fa a l'acció de la fosfolipasa C sobre la captació de MeAIB, aquesta és diferent a la dels esters de forbol, tant pel que fa a les captacions basals (els esters no les modifiquen mentre que la fosfolipasa C les incrementen considerablement) com pel que fa a les captacions estimulades per la insulina (la fosfolipasa C té efectes inhibidors més potents que els portats a terme pels esters de forbol). Davant d'aquests resultats podem especular que aquestes diferències són degudes també a una acció més important del DAG respecte a la dels esters de forbol en les isoformes de proteïna quinasa C de múscul esquelètic, a l'igual que el que hem argumentat per les accions sobre el transport de glucosa, tot i que no tenim elements per descartar la hipòtesi que implica l'existència de mecanismes d'acció diferents per als esters de forbol i per a la fosfolipasa C. És més, l'acció de la fosfolipasa C podria ser altament inespecífica ja que els seus efectes poden comportar una disgregació important dels fosfolípids de la membrana. Les concentracions de fosfolipasa C a les que es treballa, en principi no comporten alteracions dels espais extracel·lulars en els músculs incubats, però amb tot, la seva acció podria comportar modificacions en les propietats de les proteïnes que romanen ancorades en el si de la membrana.

En resum, tot i que la proteïna quinasa C podria estar implicada en la regulació de l'acció de la insulina estimulants la captació d'aminoàcids, no sembla participar en la regulació de l'estimulació del transport de glucosa. Aquest fet recolza les dades que indiquen la no-existència d'efectes reguladors sobre el propi receptor de la insulina, l'activació del qual sembla ser requerida tant per estimular la captació de glucosa com la de MeAIB. En canvi, si l'acció de la proteïna quinasa C regula un pas posterior al receptor, que està en la via d'acció de la insulina activant el sistema A, però no en la via que implica una estimulació del transport de glucosa, les diferents accions dels esters de forbol i de la fosfolipasa C sobre ambdós paràmetres podrien tenir en aquest fet la seva explicació.

B.4.2. La proteïna quinasa dependent de cAMP.

Hormones que estimulen la producció de cAMP poden crear situacions de resistència a la insulina en els teixits diana d'aquesta (Diebert i DeFronzo, 1980).

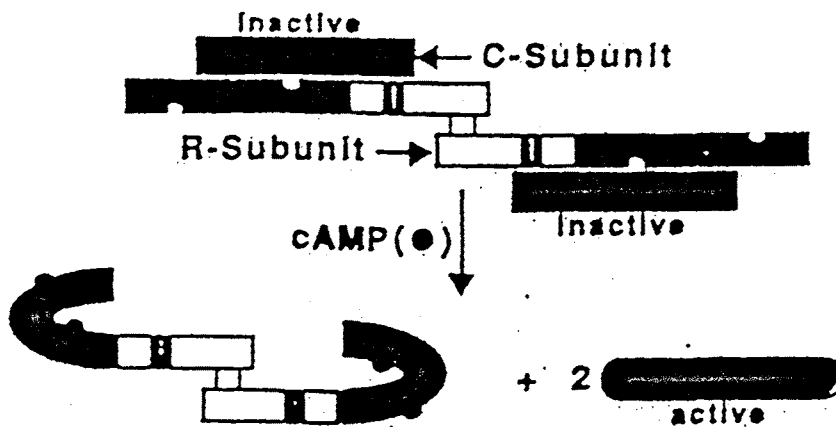
És ben conegut el mecanisme pel qual actuen aquestes hormones (Birnbaumer et al., 1984; Exton, 1985; Levitzki, 1988). Els seus receptors estan connectats a l'adenilat ciclase a través d'un tipus de proteïna G (Gs). En unir-se l'hormona al receptor, aquest darrer provoca la dissociació de la Gs, amb l'obtenció de la subunitat catalíticament activa (α) i d'un dímer regulador de la primera ($\beta\gamma$) (Veure el capítol B.3.2.3). La subunitat α activa l'adenilat ciclase, el que comporta l'obtenció de cAMP.

El cAMP és l'activador d'una serina/treonina proteïna quinasa, la proteïna quinasa A. Diversos autors han estudiat el possible paper d'aquesta quinasa en la regulació de l'acció de la insulina. Però la proteïna quinasa A no sembla ser l'única quinasa dependent de cAMP; hi ha cada vegada més evidències de l'existència d'altres quinases que presenten aquesta característica i que encara no han estat identificades (Stadtmauer i Rosen, 1987), però que podrien participar en la regulació de l'acció de la insulina.

Abans de passar a comentar la informació de la qual disposem sobre la possible participació de la proteïna quinasa A en la regulació de l'acció de la insulina, descriurem breument les característiques d'aquest enzim.

La proteïna quinasa A és un enzim polimèric format per quatre subunitats, dues subunitats reguladores (R) i dues subunitats catalítiques (C) (Figura-12). La subunitat C té activitat serina/treonina quinasa, mentre que la subunitat R inhibeix l'activitat de C mentre es manté unida a ella. La dissociació de l'holoenzim es produeix en presència de cAMP (0.2-0.7 μ M), el qual pot unir-se a dos dominis de R (locus A i locus B), que són diferents entre si però que presenten cooperativitat positiva entre un i altre locus per la unió del cAMP, dintre d'un mateix protòmer. Quan el cAMP s'uneix a R, disminueix l'afinitat de R per C en unes 10.000 vegades. A conseqüència d'aquesta dissociació s'obté un dímer R-R (units per ponts di-sulfur), que conté 4 molècules de cAMP associades, i dues subunitats C actives independents.

FIGURA-12: Estructura de la proteïna quinasa A.



(Extret de: Taylor, 1989).

S'han clonat dues formes diferents de C (C_{α} i C_{β}), i s'ha obtingut un vector d'expressió a bacteris a partir de cDNA de C_{α} (Uhler i McKnight, 1987; Olsen i Uhler, 1989). Respecte a les subunitats R s'han trobat 3 formes que provenen de 3 gens diferents, tot i presentar una gran homologia (R_I , $R_{II\alpha}$ i $R_{II\beta}$). L'existència de les formes R_I i R_{II} dona lloc a dos grans classes d'holoenzims, el tipus I i el tipus II. El primer es caracteritza per presentar llocs d'alta afinitat pel ATP-Mg, mentre que el segon pot autofosforilar la subunitat R. Les formes α semblen expressar-se constitutivament a la majoria de teixits, mentre que les formes β tenen una diferent regulació i expressió del mRNA respecte a les primeres. Les proporcions d'holoenzims del tipus I i del tipus II són variables en les cèl·lules depenent del teixit i de l'espècie.

Al múscul esquelètic hi ha 2 isoenzims amb idèntiques subunitats catalítiques (40.000 de pes molecular) i diferents subunitats reguladores (R_I , de 49.000 de pes molecular i R_{II} , de 51-56.000 de pes molecular). L'isoenzim I pot autofosforilar tan sols la subunitat C mentre que el II autofosforila C i R; ambdós tenen una K_m pel ATP idèntica (3-15 μM). El tipus I ha estat purificat fins a l'homogeneïtat (el tipus II

procedent de múscul cardíac també ha estat purificat).

A la major part de teixits de mamífers, aquest enzim és citoplasmàtic, i conté àcid mirístic a l'extrem N-terminal de la subunitat C (que no resulta indispensable per a la seva activitat). Sols a cervell, hipòfisi, ronyó, cor i a llevat hi ha una fracció d'aquest enzim unida a la membrana.

La subunitat C presenta proper a l'extrem N-terminal, el lloc d'unió per l'ATP-Mg (primer s'ha de produir la unió entre l'ATP i el Mg), mentre que a l'extrem C-terminal es troben els dominis catalítics i de reconeixement del substrat. La subunitat R conté els 2 locus d'unió al cAMP, ja esmentats, que es localitzen a la regió C-terminal, mentre que a l'extrem N-terminal hi ha un domini proteolíticament sensible que presenta diverses funcions; d'una banda és essencial per a interaccionar amb la subunitat C, però també hi ha evidències que mentre C i R es troben units, en aquest domini hi ha un pseudo-substrat que protegeix el lloc catalític de C, i finalment és sensible a ser autofosforilat.

El cAMP pot competir pel lloc d'unió de l'ATP amb una $K_i = 210 \mu\text{M}$; quan s'assoleix aquesta concentració de cAMP i mentre la concentració d'ATP fos inferior a $5\text{-}10 \mu\text{M}$, el cAMP inhibiria la proteïna quinasa A. És curiós observar que les concentracions habituals de cAMP (de l'ordre de $0.1\text{-}1 \text{ nm per g de teixit fresc}$) es troben de 10 a 100 vegades per damunt dels valors de K_a de l'enzim, valorat *in vitro*. Això implica que o bé el cAMP coexisteix amb l'enzim però en diferents compartiments cel·lulars, o bé aquest compost es troba segregat havent-n'hi molt poc de lliure, ja que si no fos així no s'explicaria el paper regulador que aquest compost presenta *in vivo*.

(Aquesta breu revisió del tema ha estat extreta de:

Arró, 1989; Taylor, 1989).

Entre els receptors hormonals que estan acoblats a un sistema proteïna G - Adenilat ciclase, destacarem els de les catecolamines. Aquests receptors poden ser de tipus β -adrenèrgic, els quals actuen a través d'una G_s , o bé de tipus α -adrenèrgics, els quals actuen a través d'una G_i en el cas del subtipus α_2 , o bé a través d'un sistema proteïna G - fosfolipasa C en el cas del subtipus α_1 .

La secreció de catecolamines augmenta durant l'estress i l'exercici. La seva acció fomenta el metabolisme catabòlic a molts diversos tipus cel·lulars, acció

clarament oposada a la induïda per la insulina. En aquest sentit s'ha observat que les catecolamines activen la sortida de glucosa hepàtica i la glicogenòlisi a teixits perifèrics, tot i que inhibeixen la utilització de glucosa en aquests darrers teixits (Deibert i DeFronzo, 1980; Rizza et al., 1980; James et al., 1986) mentre que a teixit adipós activen la lipòlisi (Steinfelder i Joost, 1982). També s'ha observat que tenen efectes inhibidors sobre la secreció d'insulina (Robertson i Porte, 1973).

En múscul esquelètic, aquestes hormones estimulen la glicogenòlisi (Dietz et al., 1980; Juhlin-Dannfelt, 1982), via l'activació de la glicogen fosforilasa per un mecanisme que implica a la proteïna quinasa A (Soderling i Park, 1974). Aquesta activació té lloc a través d'un receptor β -adrenèrgic (Moran, 1975; Soderling i Park, 1974).

L'efecte de les catecolamines sobre el transport de glucosa no està ben definit. Hi ha dades contradictòries sobre si l'adrenalina inhibeix (Walaas i Walaas, 1950; Sloan et al., 1978; Bihler et al., 1978) o estimula (Chiasson et al., 1981; Richter et al., 1982) el transport de glucosa en el múscul i si aquest efecte és mediat per receptors β -adrenèrgics (Sloan et al., 1978; Bihler et al., 1978; Chiasson et al., 1981) o α -adrenèrgics (Saitoh et al., 1974; Richter et al., 1982). Aquestes opinions contradictòries semblen conseqüència de diferències metodològiques en les aproximacions experimentals de cadascun dels laboratoris. D'aquestes destaca la utilització o no d'albumina, doncs la seva presència correlaciona amb una activació del transport de glucosa per part de l'adrenalina, mentre que en la seva absència l'efecte obtingut és inhibitori (Wallberg-Henriksson, 1987). Altrament, alguns autors observen que l'acció inhibidora de l'adrenalina sobre el transport de glucosa va associada a la incubació del múscul en un tampó fosfat (Bouman i Dermen, 1960; Herman i Ramey, 1960; Walaas, 1955; Ui, 1965), però quan la incubació es fa amb un tampó bicarbonat, de característiques més fisiològiques, no s'obtenen aquests efectes (Herman i Ramey, 1960; Ui, 1965). També s'ha determinat la variabilitat de la resposta en funció de les dosis d'adrenalina emprades (Bihler et al., 1978); així s'observa que entre 10 nM i 10 μ M, l'adrenalina inhibeix la captació de 3-O metilglucosa en diafragma i en soleus, mentre que entre 100 μ M i 1 mM, l'adrenalina estimula el transport d'hexoses en diafragma però no en soleus.

Respecte als efectes de les catecolamines en la regulació de l'acció de la

insulina, originalment Walaas descriu que l'adrenalina inhibeix la captació de glucosa estimulada per la insulina en diafragma (Walaas, 1955). Contràriament, altres autors no observen cap efecte de l'adrenalina inhibint les captacions de 2-deoxiglucosa (Kipnis i Cori, 1959) i de xilosa (Newsholme i Randle, 1961) estimulades per la insulina en diafragma, però sí inhibint la fosforilació del sucre (Kipnis i Cori, 1959).

Estudis de perfusions del quart posterior de rata indiquen que les catecolamines estimulen la captació basal i inhibeixen la captació estimulada per la insulina, via receptors β -adrenèrgics (Chiasson et al., 1981). L'acció de l'adrenalina no sembla estar a nivell d'inhibir directament el transport sinó d'inhibir la fosforilació de les hexoses que ja han estat transportades; aquesta inhibició és conseqüència que l'adrenalina té activada la degradació de glicogen, la qual cosa dona lloc a elevades concentracions d'hexoses-fosfat, que inhibeixen l'hexoquinasa (Chiasson et al., 1981).

En adipòcits també s'ha observat aquesta aparent contradicció respecte als efectes de les catecolamines sobre el transport de glucosa. Així, mentre alguns observen efectes inhibidors (Taylor et al., 1976; Taylor i Halperin, 1979), altres descriuen efectes estimuladors (Ludvigsen et al., 1980; Kashiwagi i Foley, 1982), tant en adipòcits humans (Kashiwagi i Foley, 1982) com de rata (Taylor et al., 1976; Taylor i Halperin, 1979; Ludvigsen et al., 1980). Aquests inesperats efectes estimuladors semblen anar associats a la presència d'adenosina en el medi d'incubació, la qual és produïda pels mateixos adipòcits (Arch i Newsholme, 1978) i alliberada ja a partir dels primers minuts d'incubació. Quan s'addiciona adenosina deaminasa (ADA), enzim que converteix l'adenosina en un metabolit inactiu, la inosina, es recuperen els efectes inhibidors de les catecolamines sobre la captació de glucosa (Taylor i Haperin, 1979; Green, 1983; Kashiwagi et al., 1983).

L'isoproterenol, un agonista β -adrenèrgic, inhibeix un 60% la captació de 3-O metilglucosa en adipòcits quan la incubació es realitza en presència d'ADA (Smith et al., 1984). Un anàleg del cAMP, el dibutiril-cAMP per si sol també produeix inhibicions del mateix ordre (Smith et al., 1984). Estudis amb citocalasina-B indiquen que no hi ha un decrement en la concentració de transportadors de glucosa en la membrana plasmàtica per acció d'aquests compostos. L'isoproterenol, en presència d'ADA, inhibeix un 75% l'acció de la insulina estimulants la captació de glucosa, a l'igual que el dibutiril-cAMP. La concentració de transportadors de glucosa en la

membrana sols disminueix un 45%. Cinèticament les accions d'aquests compostos es caracteritzen per alterar exclusivament la V_{max} . Aquestes observacions s'explicarien per una reversió en la translocació dels transportadors respecte a la induïda per la insulina i/o per un canvi en l'activitat intrínseca d'un nombre constant de transportadors. En tot cas, l'efecte de les catecolamines sobre l'acció estimuladora de la insulina, sembla cursar, tan sols de manera parcial, modulant la translocació de transportadors (Smith et al., 1984).

En condicions en les que s'evita l'acumulació d'àcids grassos en el medi d'incubació dels adipòcits, les catecolamines inhibeixen la captació de glucosa sense afectar la quantitat de transportadors inhibibles per citocalasina-B a la membrana plasmàtica, i per tant els canvis en la V_{max} s'expliquen per una inhibició de l'activitat intrínseca del transportador (Kuroda et al., 1984; Joost et al., 1986).

Posteriorment s'estudia la relació entre els efectes de l'isoproterenol i els nivells de cAMP. Els mateixos autors corretgeixen observacions anteriors a l'indicar que no hi ha cap acció inhibidora de l'isoproterenol sobre la captació de 3-O metilglucosa, en adipòcits incubats en presència d'adenosina (Kuroda et al., 1987), tot i que aquests presenten activitats de proteïna quinasa A superiors als controls. En absència d'adenosina, s'observen els efectes inhibidors de l'isoproterenol; tot i això es suggereix que aquest efecte és independent dels nivells de cAMP.

També en adipòcits s'ha observat que el glucagó antagonitza l'efecte de la insulina estimulant el transport de glucosa en presència d'ADA (Green, 1983).

Altres autors han buscat la causa de la inhibició de l'acció de la insulina per les catecolamines, en alteracions del receptor de la insulina induïdes per aquestes.

Els efectes de resistència a la insulina per acció de les catecolamines en adipòcits, semblen tenir lloc a dos nivells, inhibint el "binding" d'insulina i afectant l'activitat tirosina quinasa del receptor (Kirsch et al., 1983a i b). Des que en cèl·lules intactes s'havia observat fosforilació del receptor de la insulina en tirosines, però també en serines (Kasuga et al., 1982b; Gazzano et al., 1983; Häring et al., 1984b), es va pensar que aquest receptor podia ser substrat d'alguna serina quinasa. Contràriament a les observacions darrerament comentades, alguns autors descriuen que les catecolamines inhibeixen la captació de glucosa estimulada per la insulina a través de mecanismes dependents de cAMP (Kirsch et al., 1983a), i per tant indirectament

impliquen la participació de la proteïna quinasa A.

Cal ressenyar que els experiments portats a terme amb catecolamines a adipòcits han conduït al concepte erroni que aquestes substàncies alteren les accions de la insulina induint un decrement en el "binding" de la insulina al seu receptor (Steinfelder i Joost, 1982; Kirsch et al., 1983; Lönnroth i Smith, 1983; Pessin et al., 1983).

Efectivament, alguns autors havien descrit que en incubacions d'adipòcits aïllats, on el medi d'incubació contenia hepes 25 mM, l'isoproterenol feia disminuir el "binding" d'insulina. A partir de receptors d'insulina parcialment purificats d'adipòcits pre-tractats amb isoproterenol, 10 μ M 30 min, s'observen disminucions en els nivells d'autofosforilació del receptor de la insulina (1/3 part); el "binding" d'insulina en aquests receptors també estava disminuït en un 50-75%. Estudis de la Km de l'ATP pel receptor indiquen un increment de 4 vegades (Häring et al., 1986).

Altres, però, observen que l'acció de les catecolamines (isoproterenol) en adipòcits genera una ràpida producció d'àcids grassos que provoca una alteració del pH del medi d'incubació (de 7.4 passa a 6.9) en incubacions realitzades amb un Krebs-Ringer fosfat, pH 7.4. A l'addicionar hepes 50 mM desapareix aquest efecte sobre el pH (Arsenis i Livingston, 1986), a l'igual que l'acció inhibidora sobre el "binding" d'insulina. A partir de receptors purificats d'adipòcits pre-tractats amb isoproterenol, no s'observa cap alteració de l'activitat tirosina quinasa cap a substrats exògens del receptor, tot i que l'isoproterenol, 0.1 μ M 30 min, produeix decrements en la captació de 2-deoxiglucosa estimulada per la insulina. Aquestes accions de l'isoproterenol no s'expliquen per efectes sobre el receptor i, per tant, la interacció havia d'esdevenir en un pas posterior de la transducció del senyal per la insulina (Arsenis i Livingston, 1986).

En limfoblasts en cultiu IM-9 la forskolina, activador de l'adenilat ciclase, i el 8-Br-cAMP, anàleg del cAMP, produeixen la fosforilació en serines i treonines de la subunitat β del receptor de la insulina. La insulina produeix la fosforilació en tirosines, serines i treonines, i el grau de fosforilació és menor previ tractament amb forskolina, el qual ocasiona una pèrdua del 50% de l'activitat tirosina quinasa del receptor (Stadtmauer i Rosen, 1986).

Els mecanismes pels quals les substàncies que produeixen increments en la

concentració cel·lular de cAMP, indueixen una fosforilació del receptor de la insulina, encara són desconeguts. La participació de la proteïna quinasa A en la fosforilació del receptor de la insulina sembla dubtosa des que la subunitat β del receptor de la insulina humà (Ullrich et al., 1985) no conté llocs clàssicament reconeguts per aquest enzim (Kemp et al., 1977).

A partir de receptors de la insulina purificats de teixit adipós marró de ratolins aclimatats al fred i que per tant presenten elevades concentracions de noradrenalina (Himms-Hagen, 1985; Ricquier i Mori, 1984), Le Marchand-Brustel i col. (Tanti et al., 1987) observen que l'activitat tirosina quinasa del receptor està inhibida respecte als controls. Assaigs *in vitro* amb la subunitat catalítica de la proteïna quinasa A indiquen que mentre aquesta no afecta l'estat de fosforilació del receptor de la insulina en situació basal, inhibeix completament la fosforilació induïda per la insulina en el procés d'autofosforilació i de fosforilació de substrats exògens, tant en receptors parcialment purificats com en receptors altament purificats amb un anti-sèrum d'humans. Aquest efecte també l'observen en receptors obtinguts d'hepatòcits aïllats i de múscul esquelètic. En aquests assaigs *in vitro* els autors comenten que no observen alteracions del binding d'insulina, ni de la K_m per l'ATP des que els efectes de la subunitat catalítica són independents de la concentració d'ATP emprada. Tampoc sembla probable que una hipotètica fosfatasa activada per la subunitat catalítica de la proteïna quinasa A desfosforili el receptor ja que observen els mateixos efectes a partir de receptors altament purificats on no hi ha activitat fosfatasa. Atés que no s'observa una fosforilació apreciable del receptor per acció de la subunitat catalítica de la proteïna quinasa A, els autors indiquen que l'acció inhibidora sobre el receptor podria esdevenir per una interacció física de tipus encara desconegut, que provoqués una inhibició de l'activitat del receptor.

Poc després del treball que acabem de comentar, apareix una nova publicació on sí que constaten una acció fosforiladora *in vitro* de la proteïna quinasa A sobre receptors altament purificats de la insulina a partir de placenta humana; observen que aquesta quinasa fosforila una serina del receptor, cosa que provoca una perduda del 25% de l'activitat quinàsica d'aquest (Roth i Beaudoin, 1987). Atés que els estudis *in vivo* amb agents que estimulen la síntesi de cAMP indicaven efectes inhibidors de l'activitat del receptor del 50%, aquests autors argumenten que podria

existir alguna altra quinasa a més de la proteïna quinasa A, que pogués participar en aquesta acció inhibidora del receptor sota els efectes de les catecolamines.

Treballs publicats recentment realitzats en adipòcits indiquen que l'isoproterenol, 30 min 10 μ M, inhibeix del 30 al 50 % (dependent de l'absència o presència d'adenosina deaminasa) la captació de 3-O metilglucosa estimulada per la insulina, efecte que va acompanyat d'una menor activitat tirosina quinasa del receptor, sense canvis aparents en el "binding" d'insulina (Klein et al., 1991).

En el fetge, tal i com hem constatat al llarg d'aquesta memòria, la situació és ben diferent de l'existent al múscul o al teixit adipós.

Recordem que en aquest teixit la insulina estimula el transport d'aminoàcids de manera dependent de síntesi proteica a diferència del que succeeix al múscul o al teixit adipós. El glucagó (Tews et al., 1975; Kletzien et al., 1976; Pariza et al., 1976; Tews et al., 1970; Chambers et al., 1968; Kilberg i Neuhaus, 1977) i les catecolamines (Tews et al., 1970; Chambers et al., 1968; Pariza et al., 1977) també provoquen increments del transport d'AIB. Tant la insulina com el glucagó activen el transport d'AIB a partir de 2-3 hores d'exposició de manera inhibible per cicloheximida en hepatòcits aïllats. Un derivat del cAMP (el dibutiril-cAMP) mimetitzava els efectes del glucagó, de manera que les estimulacions màximes d'ambdós compostos no són additives; per contra, l'acció de la insulina i del glucagó sí que són additives, a l'igual que la de la insulina i el dibutiril-cAMP (Fehlmann et al., 1979b).

Edmondson i Lumeng (1980) varen analitzar l'estimulació del transport d'alanina per glucagó en hepatòcits aïllats de rata. El glucagó exercia una estimulació transitòria a curt termini que anava seguida per una nova estimulació a llarg termini i inhibible per cicloheximida. Sobre la base d'estudis en fetge perfundit es va observar que aquest efecte a curt termini del glucagó es produïa a través d'una hiperpolarització de la membrana (Friedmann i Dambach, 1973; Petersen, 1974). Altres autors també observaren que el cAMP induïa estimulacions del transport d'alanina en hepatòcits aïllats, que eren independents de síntesi proteica (McGivan et al., 1981), i que cinèticament es caracteritzaven per un increment en la V_{max} (Moule et al., 1987); el cAMP semblava induir una activació de la bomba Na^+/K^+ , doncs l'efecte s'inhibia en presència d'ouabaïna. D'altra banda l'EGF (Epidermal Growth Factor) també provoca una estimulació màxima del transport d'alanina als 30 min d'exposició i que desapareix

després de 90 min (Moule i McGivan, 1987); en estudis de regeneració hepàtica s'ha observat que l'EGF provoca una hiperpolarització de la membrana plasmàtica la qual és conseqüència d'una activació de l'ATPasa Na^+/K^+ (Wondergem i Harder, 1980). Falta veure si aquest efecte a curt termini de l'EGF també té lloc a través de l'hiperpolarització de la membrana.

La presència de concentracions fisiològiques d'aminoàcids, inhibeix tant l'acció de la insulina com la del glucagó estimulant el sistema A en hepatòcits aïllats de rata (Fafournoux et al., 1985) tot i que no provoquen decrements en els nivells de cAMP intracel·lulars.

La forskolina produeix increments en les concentracions intracel·lulars de cAMP molt més grans que les produïdes per isoproterenol, sobretot pel que fa a llargs períodes de temps, els quals corresponen a 1-5 min en estudis de cor perfundit, temps en el que hi ha una progressiva caiguda de l'acció de l'isoproterenol (England i Shahid, 1987). Després de 5 min de perfusió amb forskolina hi ha un increment de 26 vegades en la concentració de cAMP. Aquests increments ja havien estat observats per altres autors (Vegesna i Diamond, 1983; Rodger i Shahid, 1984), i indiquen que l'estimulació de l'adenilat ciclase per forskolina no provoca una desensibilització respecte al que succeeix amb les catecolamines (Sibley i Lefkowitz, 1985). En estudis paral·lels dels nivells de cAMP i de l'activitat de la proteïna quinasa A s'ha observat que l'acció de la forskolina incrementant els nivells de cAMP no correlaciona amb un increment d'activitat de la proteïna quinasa A, a 45 s d'acció de la forskolina (England i Shahid, 1987). Els autors especulen que el cAMP produït per la forskolina s'estigui generant en un compartiment diferent al que es troba la proteïna quinasa A, o que a dosis baixes (menors a $1 \mu\text{M}$), la forskolina activi enzims d'adenilat ciclase diferents als activats per les catecolamines, mentre que a concentracions superiors, pugui activar la fracció d'adenilat ciclase que activen els receptors adrenèrgics.

La forskolina, a més de la seva acció activadora de l'adenilat ciclase, s'ha vist que inhibeix el transport de glucosa de manera que quan desapareix del medi aquest efecte reverteix (Sergeant i Kim, 1985). Aquest efecte ha estat observat a adipòcits (Kashiwagi et al., 1983; Joost i Steinfeldt, 1987) i cardiòcits (Shanahan et al., 1986) de rata, on també s'ha vist que s'inhibeix l'acció de la insulina sobre el transport de glucosa. En eritròcits i plaquetes d'humans també ha estat observat aquest

efecte (Sergeant i Kim, 1985; Kim et al., 1986). En la línia miocítica L6 la forskolina, 100 μ M 15 min, també inhibeix totalment la captació de glucosa mentre hi és present en el medi, però quan s'elimina abans de realitzar l'assaig de transport, es recuperen els valors basals, però no els estimulats per la insulina que es situen a nivell dels basals (Klip et al., 1988). L'efecte d'aquest compost sobre l'acció de la insulina sembla independent dels nivells de cAMP i no té lloc a través d'una inhibició dels "binding" d'insulina. ¿Estaria la forskolina distingint entre diferents isoformes de transportador de glucosa de manera que específicament les sensibles a l'acció de la insulina patirien una modificació més estable per la forskolina, que les formes no sensibles?

Quan aquests darrers treballs foren portats a terme encara no es coneixia l'existència d'anticossos que específicament reconeixien els transportadors de glucosa sensibles a l'acció de la insulina, els GLUT-4 (James et al., 1988); aquesta eina ha estat fonamental per als autors que en l'actualitat estudien els mecanismes d'acció de la insulina sobre el transport de glucosa, i a tres anys vista, pot considerar-se com una de les fites més importants en l'història d'aquesta àrea de la investigació.

En efecte, molts treballs precedents que conclouïen amb preguntes especulatives, comencen ara a trobar una resposta. En adipòcits els transportadors de glucosa sensibles a la insulina (GLUT-4) presenten fins a un 65% d'homologia amb els no sensibles a la insulina (GLUT-1) (Mueckler et al., 1985), trobant-se les diferències presumiblement a dominis intracel·lulars. Aquests dominis contenen seqüències d'aminoàcids que són llocs potencialment fosforilables en els GLUT-4, i que no presenten els GLUT-1 (Mueckler et al., 1985). La insulina provoca una translocació de GLUT-4 des dels microsomes de baixa densitat fins a la membrana plasmàtica, sense afectar l'estat de fosforilació de cap dels pools de transportadors. L'isoproterenol no afecta la translocació de transportadors induïda per la insulina, tot i que inhibeix la seva acció en un 40%, en presència d'adenosina deaminasa (James et al., 1989). Aquest efecte sembla estar relacionat amb un increment en l'estat de fosforilació dels GLUT-4; anàlegs del cAMP també provoquen aquest efecte. Experiments in vitro amb proteïna quinasa A i amb vesícules enriquides amb GLUT-4 demostren que aquest enzim és capaç de fosforilar els transportadors de glucosa. Extrapolant aquests resultats es podria especular que l'acció de l'isoproterenol inhibint parcialment la captació de glucosa estimulada per la insulina en adipòcits, té lloc a través de la

proteïna quinasa A i que implica una acció directa d'aquest enzim sobre els transportadors.

Estudis a nivell de síntesi proteica indiquen que en cèl.lules 3T3-L1 en presència d'anàlegs de cAMP i de teofilina, durant 16 hores, hi ha un increment en l'expressió de mRNA de GLUT-1 de més de 3 vegades respecte als controls i similar al que provoca la insulina, mentre que els nivells de mRNA de GLUT-4 són similars als dels controls i inferiors als que genera la insulina (Chu et al., 1990). Aquests resultats intenten explicar observacions prèvies on β -agonistes o anàlegs de cAMP en estudis a 48 hores d'acció, provocaven un increment en el transport de glucosa que era dependent de síntesi proteica en 3T3-L1 (Van Putten et al., 1985).

En la mateixa línia cel.lular altres autors presenten observacions on toxina colèrica i dibutiril-cAMP estimulen el transport de glucosa de manera màxima a les 12 hores d'acció, i amb un percentatge d'estimulació similar al que genera la insulina amb 30 min (Clancy i Czech, 1990). A les 4 hores d'acció els efectes estimuladors de toxina colèrica i dibutiril-cAMP semblen associats a un procés de translocació de GLUT-1 i GLUT-4 des de microsomes de baixa densitat, cap a la membrana plasmàtica, mentre que a les 12 hores s'observen increments en el contingut cel.lular de GLUT-1 però no de GLUT-4. La insulina a 30 min provoca una sortida de GLUT-1 similar a la que provoca la toxina colèrica a 12 hores (1.6 vegades), però mentre que la insulina provoca de manera més important la translocació de GLUT-4 (2.6 vegades), la toxina colèrica pràcticament no indueix la translocació d'aquesta isoforma. Val a dir que mentre la insulina estimula la sortida de transportadors per a generar els seus efectes estimuladors, a llarg temps la toxina colèrica pot reproduir aquests efectes però amb un menor nombre de transportadors a la membrana, el que implicaria una modificació d'aquests quant a la seva taxa transportadora (Clanzy i Czech, 1990).

En estudis a partir de cardiomiòcits aïllats de rata (Eckel et al., 1990), la toxina colèrica provoca un decrement del 56 % de la captació de 3-O metilglucosa estimulada per la insulina, mentre que la toxina pertussis no l'afecta. La captació basal no es troba modificada per cap de les toxines però l'isoproterenol provoca estimulacions del 63%. Aquest efecte no és mimetitzat pel dibutiril-cAMP i és completament blocat per la toxina colèrica. En animals diabètics per estreptozotocina, es perd l'efecte de l'isoproterenol i de la toxina colèrica, la qual cosa és paral·lela a un considerable

decrement en la síntesi de mRNA de GLUT-4. Els autors especulen amb la possibilitat que als cardiomiòcits el transportador de glucosa estigui funcionalment associat a una proteïna G sensible a toxina colèrica que induiria la regulació del transport tant per efecte de la insulina com de β -agonistes, produint una modificació de l'activitat intrínseca del transportador que pel cas de la insulina s'acompanyaria dels efectes translocadors, segons han suggerit prèviament altres autors (Matthaei et al., 1987).

Pel que fa als estudis que varen ser duts a terme per la nostra part respecte als efectes reguladors de l'acció de la insulina per agents inductors de la producció de cAMP, aquests foren els resultats (Gumà et al., F):

L'isoproterenol, 1 μ M 3 hores, produïa decrements del 40 % de la captació de 3-O metilglucosa, que no eren reproduïts per la toxina colèrica, 5 μ g/ml 3 hores, en incubacions de músculs EDL. Malgrat aquest efecte de l'isoproterenol, els valors de la captació estimulada per la insulina eren idèntics als controls estimulats, el que implicava que la insulina podia revertir l'acció de l'isoproterenol, sense que es veiessin afectats els seus mecanismes d'acció.

Posteriorment ens dedicàrem a estudiar si l'acció de la insulina sobre la captació de MeAIB en múscul esquelètic era regulable per aquests mateixos agents.

A diferència del que havíem observat pel transport de glucosa, l'isoproterenol a les mateixes condicions, no afectava la captació basal ni l'estimulada per la insulina en músculs EDL, ni tan sols en presència de l'antagonista α -adrenèrgic, fentolamina. Quan aquests experiments es realitzaren en presència d'adenosina deaminasa, 1 U/ml 3 hores, obteníem els mateixos resultats. La toxina colèrica no afectava tampoc la captació estimulada per la insulina ni la captació basal. En aquestes circumstàncies vàrem decidir provar l'acció de la forskolina, 50 μ M 90 min, que com ja s'ha vist activa l'adenilat ciclase directament; aquest compost no va ésser provat pel que fa al transport de glucosa, donats els clars efectes inhibidors d'aquest paràmetre que presenta (Klip et al., 1987). Corroborant els resultats precedents, la forskolina tampoc afecta les captacions basals ni estimulades per la insulina de MeAIB.

Per assegurar l'absoluta manca d'interacció entre els sistemes que cursen per una producció de cAMP i l'acció de la insulina sobre la captació de MeAIB, provàrem finalment la toxina pertussis, 100 i 200 ng/ml 2 hores, sense obtenir alteracions ni sobre les captacions basals ni sobre les estimulades per la insulina, en

músculs soleus.

Tots aquest estudis anaren acompanyats de mesures paral·leles dels nivells de glicogen en el múscul i de l'alliberació de lactat per part d'aquest; ambdós paràmetres ens havien de donar constància que intracel·lularment manteníem activada la proteïna quinasa dependent de cAMP, i per tant, que efectivament aquest agents realment estaven activant la producció d'aquest nucleòtid cíclic.

L'acció de l'isoproterenol, de la toxina colèrica i de la forskolina, comportaven una caiguda dels nivells de glicogen del 15-20% en músculs EDL, dades que estan d'acord amb les aparegudes a la bibliografia (Dietz et al., 1980). Atés que aquestes diferències no són gaire considerables, analitzarem també les alliberacions de lactat. L'isoproterenol provocava increments en l'alliberació de lactat del 50%, que passaven a ser del 70% en presència de fentolamina. La toxina colèrica provocava increments del 60%. Pel que fa a la forskolina, no realitzarem aquestes lectures atés que el medi no contenia glucosa, metabòlit energètic pel múscul que habitualment adicionàvem, sinó que en aquesta ocasió i donat l'efecte de la forskolina sobre la captació de glucosa, substituïrem pel piruvat. D'altra banda la toxina pertussis no provocava alliberacions estadísticament diferents respecte als controls en soleus.

Les nostres dades indiquen que la producció intracel·lular de cAMP no provoca una interferència en l'acció de la insulina tant sobre la captació de 3-O metilglucosa com de MeAIB. L'explicació d'aquest fenomen no està encara al nostre abast, tot i que podria estar en la línia del que especulen alguns autors sobre un possible efecte fosforilador de l'isoproterenol sobre els transportadors de glucosa, tot i que mentre s'ha argumentat que serien els transportadors sensibles a la insulina els susceptibles a ser fosforilats per efecte de l'isoproterenol, segons estudis portats a terme en adipòcits (James et al., 1989b), en el nostre cas podríem especular que els transportadors no sensibles a la insulina són els que resulten afectats de manera que l'acció de la insulina resta inalterada. De tota manera, aquests efectes no són reproduïts per la toxina colèrica, el que implicaria, d'una banda, que l'efecte de l'isoproterenol és independent d'un increment en els nivells de cAMP i d'altra banda que en aquest efecte no hi participa una proteïna Gs ni Gi, en contra del que argumentaven altres autors pel que fa als cardiomiòcits (Eckel et al., 1990).

B.4.3. Altres serina quinases.

Fins ara hem vist estudis realitzats per demostrar la possible participació de conegudes serines/treonines quinases en una acció reguladora de l'activitat del receptor de la insulina. Alguns d'aquests estudis han conduït al concepte de l'existència d'altres quinases diferents que encara no s'han caracteritzat i que podrien ser responsables de la fosforilació del receptor de la insulina en serines i treonines.

Alguns autors han buscat alguna serina quinasa entre les glicoproteïnes que co-purifiquen amb el receptor de la insulina de limfòcits IM-9, en els processos de purificació parcial en aglutinina de germen de blat (Ballotti et al., 1986). Efectivament identifiquen una activitat serina quinasa que resulta estimulada per la insulina i que es troba associada al receptor de la insulina, però que no immunoprecipita amb aquest al ser tractada la mostra amb anticossos anti-receptor.

Altres observen que els microsomes d'alta densitat solubilitzats amb tritó X-100, procedents d'adipòcits pre-tractats amb insulina, presenten una més elevada activitat serina/treonina quinasa vers histones exògenes que els procedents d'adipòcits no tractats (Yu, et al., 1987). La quinasa a la que sembla anar associada aquesta activitat, no té capacitat per a unir-se a columnes de lectina i per tant, no sembla ser una glicoproteïna, però sembla ser substrat de l'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina, mentre que se la distingeix d'altres serines-quinases per l'especificitat de substrats que presenta, histona i Kemptide (peptid sintètic: Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) (Yu et al., 1987).

A partir de receptors d'insulina de placenta parcialment purificats en columnes d'aglutinina de germen de blat, també s'ha aconseguit copurificar una activitat serina-quinasa que fosforila al receptor en serines. La inhibició de l'activitat tirosina quinasa del receptor implica també la manca de fosforilació en serines d'aquest. Aquesta activitat serina quinasa no està regulada per cofactors tals com el cAMP, cGMP, Ca^{2+} , Calmodulina, fosfolípids o heparina, i és dependent de Mn^{2+} (Smith i Sale, 1988).

La futura caracterització d'aquests enzims activables per la insulina no sols ens donarà informació dels mecanismes pels quals es pot regular l'activitat del receptor

sinò que molt possiblement també expliqui els efectes de la insulina estimulant la fosforilació en serines de diverses proteïnes cel·lulars tals com l'acetil CoA carboxilasa, l'ATP citrat liasa, la proteïna ribosomal S6, la fosfodiesterasa de cAMP així com d'altres que encara no han estat caracteritzades (Denton et al., 1981; Marchmont i Houslay, 1981; Avruch et al., 1985).

B.4.4. Paper regulador dels glucocorticoïds.

Dosis supra-fisiològiques de glucocorticoïds provoquen resistència a la insulina i intolerància a la glucosa en l'home i en animals experimentals (Plotz et al., 1952; McKiddie et al., 1968; Modigliani et al., 1970; Conn i Fajans, 1956; Pupo et al., 1966; Wajchenberg et al., 1964).

Animals pretractats amb glucocorticoïds presenten decrements en el metabolisme de la glucosa basal i estimulat per la insulina (Munck i Koritz, 1962; Bennet i Cuatrecasas, 1972), així com una menor sensibilitat a la insulina (Riet-Correa et al., 1960). El "binding" de la insulina al seu receptor decrementa en el teixit adipós i hepàtic d'aquests animals (Kahn et al., 1978).

Incubacions d'adipòcits en presència de dexametasona, un glucocorticoïd sintètic, durant varies hores provoca un decrement de la captació basal de glucosa, així com del seu metabolisme (Czech i Fain, 1972), però els efectes que es varen observar in vivo sobre la sensibilitat a la insulina difícilment s'han reproduït in vitro. En 3T3-L1 s'ha observat que la dexametasona provoca decrements en la captació de 2-deoxiglucosa i en el "binding" d'insulina, així com en l'acció de la insulina estimulant la captació de 2-deoxiglucosa (Grunfeld et al., 1981). La caiguda del "binding", no sembla poder explicar totalment aquesta manca de sensibilitat a la insulina, per la qual cosa s'especula que l'efecte de la dexametasona regulant l'acció de la insulina es produèixi a diferents nivells, el primer dels quals seria el propi receptor.

En músculs EDL la corticosterona provoca a dosis farmacològiques (50-100 $\mu\text{g/ml}$), però no a dosis fisiològiques (0.1-1 $\mu\text{g/ml}$), un decrement en la captació de 2-deoxiglucosa i en la taxa de glucòlisi i glicogènesi, sense afectar al "binding" d'insulina (Tan i Bonen, 1984).

En fibroblasts humans s'ha comprovat que la dexametasona provoca una translocació de transportadors de glucosa des de la membrana plasmàtica cap al interior cel·lular, i que aquest efecte pot ésser revertit per la insulina (Horner et al., 1987).

Els glucocorticoides incrementen la transcripció del gen de la PEPCQ (fosfoenolpiruvat carboxiquinasa) que genera un increment en la síntesi de l'enzim i una estimulació de la taxa gluconeogènica hepàtica (Sasaki et al., 1984). La insulina, contràriament, inhibeix la transcripció del gen de la PEPCQ i de la taxa gluconeogènica (Andreone et al., 1982). Quan aquests dos moduladors co-existèixen en el sistema, predomina l'efecte de la insulina (Sasaki et al., 1984). Estudis de la regulació del gen indiquen l'existència d'una regió del DNA precedent al de codificació del gen que conté "cis-acting hormone response elements", des d'on les hormones induïxen els diversos efectes que tenen sobre la seva expressió (Magnuson et al., 1987).

La dexametasona provoca decrements en la taxa de fosforilació del receptor de la insulina induïda per aquesta hormona, en hepatòcits de rates dejunades (Karasik i Kahn, 1988); aquests efectes semblen dependre també d'altres factors doncs en hepatòcits d'animals alimentats no s'observa aquest decrement. El "binding" no es veu afectat però la subunitat β presenta lleugers canvis de mobilitat en electroforesis en gels de SDS (sodium dodecil sulfat). La dexametasona podria induïr una modulació del receptor de la insulina però no es descarta que també afecti algun pas posterior a aquest en la via de transducció de la insulina.

Segons uns estudis que realitzàrem al voltant d'aquest tema (Taula-11), la dexametasona no modifica l'acció de la insulina estimulants la captació de MeAIB en múscul esquelètic (dades no publicades).

Taula 11: Efectes de la dexametasona sobre la captació de MeAIB basal i estimulada per la insulina en músculs EDL.

	Basal	Insulina, 100 nM, 1h
	(nmols MeAIB / g musc. x 30 min)	
Control	14.28 ± 1.54	27.89 ± 1.55
Dexametasona 100 nM, 2h 45min	14.82 ± 1.96	26.71 ± 1.88

(6 dades per grup)

(Dades no publicades).

En resum, la dexametasona afecta algunes, no totes, de les accions de la insulina a diferents nivells de la transducció del senyal, observant-se especificitat d'acció en funció del teixit on interactui amb la insulina.

B.5. Índex de figures.

Figura-1: Estructura del sarcòmer (Pag. 7).

Figura-2: Models que expliquen els fenòmens de regulació adaptativa (Pag. 26).

Figura-3: Efecte de la insulina sobre la captació de MeAIB (Pag. 27).

Figura-4: Estructura del receptor de la insulina (Pag. 35).

Figura-5: Efectes inhibidors del benzilsuccinat, BZS, sobre l'activitat tirosina quinasa del receptor de la insulina (Pag. 44).

Figura-6: El metabolisme dels fosfolípids en la transducció de senyals hormonals (Pag. 48).

Figura-7: Intervenció del metabolisme dels fosfolípids en els mecanismes d'acció de la insulina (Pag. 49).

Figura-8: Inositol glicà que intervé en l'ancoratge de proteïnes extracel.lulars, a la membrana plasmàtica (Pag. 51).

Figura-9: Estructura del fosfo-oligosacàrid (POS) procedent de fosfolípids que no ancoren proteïnes a la membrana (Pag. 51).

Figura-10: Estructura de les subespècies de proteïna quinasa C (Pag. 55).

Figura-11: Activitat tirosina quinasa de receptors de la insulina de músculs EDL controls i pre-tractats amb esters de forbol (Pag. 74).

Figura-12: Estructura de la proteïna quinasa A (Pag. 81).

Índex de taules.

- Taula-1: Efecte de la colquicina i la citocalasina-D sobre la captació de 3-O metilglucosa en músculs EDL (Pag. 17).
- Taula-2: Sistemes de transport d'aminoàcids (Pag. 19).
- Taula-3: Efecte de la cicloheximida sobre l'acció de la insulina estimulant la captació de MeAIB a músculs EDL (Pag. 28).
- Taula-4: Efectes de la colquicina i de la citocalasina-D sobre l'acció de la insulina estimulant la captació de MeAIB en EDL (Pag. 29).
- Taula-5: Efecte de la colquicina sobre l'acció de la insulina estimulant la captació de MeAIB en hepatòcits (Pag. 29).
- Taula-6: Efecte de la ouabaïna i de la gramicidina-D sobre l'acció de la insulina estimulant la captació de MeAIB en músculs EDL (Pag. 30).
- Taula-7: Efecte del benzilsuccinat sobre la captació de MeAIB estimulada per la insulina a soleus i EDL (Pag. 45).
- Taula-8: Efectes insulin-mimètics del fosfo-oligosacàrid, POS (Pag. 52).
- Taula-9: Efectes de la toxina pertussis sobre la captació de glucosa en soleus (Pag. 67).
- Taula-10: Efectes dels esters de forbol sobre la captació de MeAIB basal i estimulada per la insulina en músculs EDL (Pag. 77).
- Taula-11: Efectes de la dexametasona sobre la captació de MeAIB basal i estimulada per la insulina en músculs EDL (Pag. 97).

B.6. Bibliografia.

- Allard, W.J., Gibbs, E.M., Witters, L.A., Lienhard, G.E.; *Biochim.Biophys.Acta* 929: 288-95, 1987.
- Alvarez, J.F., Cabello, M.A., Feliu, J.E., Mato, J.M.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 262, 15285-90, 1987.
- Amir, S., Shechter, Y.; *Eur.J.Pharmacol.* 110: 283-5, 1985.
- Amir, S., Sasson, S., Kaiser, N., Meyerovitch, J., Shechter, Y.; *J.Biol.Chem.* 262(14): 6663-7, 1987.
- Andersen, P.H., Richelsen, B., Juhl, H.; *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 154(1): 171-8, 1988.
- Andreone, T.L., Beale, E.G., Bar, R.S., Granner, D.K.; *J.Biol.Chem.* 257: 35-8, 1982.
- Arch, J.R.S., Newsholme, E.A.; *Essays Biochem.* 14: 82-123, 1978.
- Arsenis, G., Livingston, J.N.; *Endocrinology* 119: 50-7, 1986.
- Aussel, C., Vaubourdolle, M., Cynober, L., Agneray, J., Ekindjian, O.G.; *Cell.Mol.Biol.* 34 (5): 539-51, 1988.
- Avruch, J., Nemenoff, R.A., Pierce, M., Kwok, Y.C., Blackshear, P.J.; in *Molecular Basis of Insulin Action* (Czech, M.P. ed.): 263-96, Plenum, New York, 1985.
- Bacher, N., Zisman, Y., Berent, T., Livneh, E.; *Mol.Cell.Biol.* 11: 126-33, 1991.
- Ballotti, R., Kowalski, A., Le Marchand-Brustel, Y., Van Obberghen, E.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 139: 179-85, 1986.
- Ballotti, R., Kowalski, A., White, M.F., Le Marchand-Brustel, Y., Van Obberghen, E.; *Biochem.J.* 241, 99-104, 1987.
- Barber, E.F., Handlogten, M.E., Kilberg, M.S.; *J.Biol.Chem.* 258: 11851-11855, 1983.
- Beigelman, P.M., Hollander, P.B.; *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 116: 590-5, 1962.
- Beigelman, P.M., Hollander, P.B.; *Diabetes* 12: 262-7, 1963.
- Beigelman, P.M., Hollander, P.B.; *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 116: 31-5, 1964.
- Bell, R.M.; *Cell* 45: 631-2, 1986.
- Bell, R.M., Burns, D.J.; *J.Biol.Chem.* 266(8): 4661-4, 1991.

- Bennet, G.V., Cuatrecasas, P.; *Science* 176: 805, 1972.
- Bernier, M., Laird, D.M., Lane, M.D.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 1844-48, 1987.
- Berridge, M.J.; *Biochem.J.* 220, 345-60, 1984.
- Bertran, J., Roca, A., Pola, E., Testar, X., Zorzano, A., Palacín, A.; *J.Biol.Chem.* 266: 798-802, 1991.
- Bihler, I., Sawh, P.C., Sloan, I.G.; *Biochim.Biophys.Acta* 510: 349-60, 1978.
- Birnbaum, M.J., Haspel, H.C., Rosen, O.M.; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85:5784-88, 1986.
- Birnbaum, M.J.; *Cell* 57: 305-15, 1989.
- Birnbaumer, L., Mattera, R., Codina, J., Hildebrant, J.D., Rojas, F.J., Iyengar, R.; *Regulation of Receptors and Adenylate Cyclase by N Proteins, Symposium St.Paul-de-Vence, France, 1984.*
- Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Yatani, A., Scherer, N., Toro, M.-J., Brown, A.M.; *Kidney Inter.* 32 (Suppl.23), S14-37, 1987.
- Blackshear, P.J., Haupt, D.M., App, H., Rapp, U.R.; *J.Biol. Chem.* 265: 12131-34, 1990.
- Boerner, P., Saier, M.H.Jr.; *J.Cell.Physiol.* 122: 308-315, 1985.
- Böhm, M., Gierschik, P., Ungerer, M., Erdmann, E.; *Eur.J. Pharmacol.(Mol.Pharmacol.)* 172: 407-11, 1989.
- Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Hewlett, E.L., Gilman, A.G.; *J.Biol.Chem.* 258: 2072-5, 1983.
- Bollag, G.E., Roth, R.A., Beaudoin, J., Mochly-Rosen, D., Koshland, D.E., Jr.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 5822-4, 1986.
- Boni-Schnetzler, M., Pilch, P.F.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 7832-36, 1987.
- Boni-Schnetzler, M., Rubin, J.B., Pilch, P.F.; *J.Biol.Chem.* 261: 15281-15287, 1986.
- Bouman, P.R., Dermen, W.; *Acta Endocrinol.* 35: 551-9, 1960.
- Borghetti, A.F., Piedimonte, G., Tramacere, M., Soverino, A., Ghiringhelli, P., Guidotti, G.G.; *J.Cell.Physiol.* 105: 39-49, 1980.
- Brunetti, A., Maddux, B.A., Wong, K.Y., Hofmann, C., Whittaker, J., Sung, C., Goldfine, I.D.; *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 165: 212-8, 1989.

- Budohoski, L., Challiss, R.A.J., McManus, B., Newsholme, E.A.; FEBS Lett. 167(1): 1-4, 1984.
- Burdett, E., Mills, G.B., Klip, A.; Am.J.Physiol.(Cell Physiol. 27): C99-C108, 1990.
- Burdett, E., Beeler, T., Klip, A.; Arch. Biochem. Biophys. 253: 279-86, 1986.
- Buss, J.E., Mumby, S.M., Casey, P.J., Gilman, A.G.; Proc.Natl. Acad.Sci.USA 84: 7493-7, 1987.
- Campa, M.J., Kilberg, M.S.; J.Cell.Physiol. 141: 645-652, 1989.
- Caron, M., Cherqui, G., Melin, B., Wicek, D., Capeau, J., Picard, J.; Horm.Metab.Res. 21: 295-300, 1989.
- Carpentier, J.L., Gorden, P., Barazzone, P., Freychet, P., Le Cam,, A., Orci, L.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76: 2803-7, 1979.
- Carreras, M., Bassols, A.M., Carreras, J., Climent, F.; Biochem.Int. 17(2): 359-66, 1988.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.; J.Biol.Chem. 257: 7847-51, 1982.
- Challis, R.A.J., Budohoski, L., McManus, B., Newsholme, E.A.; Biochem.J. 224: 915-7, 1984.
- Challis, R.A.J., Leighton, B., Lozeman, F.J., Budohoski, L., Newsholme, E.A.; Biochem.Pharmacol. 36: 357-61, 1987.
- Chambers, J.W., George, R.H., Bass, A.D.; Endocrinology 83: 1185-92, 1968.
- Charron, M.J., Brosius, F.C. III, Alper, S.L., Lodish, H.F.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 2535-39, 1989.
- Charuk, J.H.M., Howlet, S., Michalak, M.; Biochem.J. 264: 885-92, 1989.
- Cheng, L.C., Rogus, E.M., Zierler, K.M; Biochim.Biophys.Acta 513: 141-55, 1978.
- Cherqui, G., Caron, M., Wicek, D., Lascols, O., Capeau, J., Picard, J.; Endocrinology 118: 1759-69, 1986.
- Cherqui, G., Caron, M., Wicek, D., Lascols, O., Capeau, J., Picard, J.; Endocrinology 120: 2192-4, 1987.
- Cherqui, G., Caron, M., Wicek, D., Capeau, J., Picard, J.; Mol.Cell.Endocrinol. 65: 13-25, 1989.

- Cherqui, G., Reynet, C., Caron, M., Melin, B., Wicek, D., Clauser, E., Capeau, J., Picard, J.; *J.Biol.Chem.* 265(34): 21254-61, 1990.
- Chiasson, J.-L., Shikama, H., Chu, D.T.W., Exton, J.H.; *J.Clin.Invest.* 68: 706-13, 1981.
- Chou, C.K., Dull, T.J., Russell, D.S., Gherzi, R., Lebwohl, D., Ullrich, A., Rosen, O.M.; *J.Biol.Chem.* 262: 1842-1847, 1987.
- Christensen, H.N.; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 51: 337-344, 1964.
- Christensen, H.N., Liang, M., Archer, E.G.; *J.Biol.Chem.* 242: 5237-96, 1967.
- Christensen, H.N., Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Tager, H.S., Täljedal, I.-B.; *Biochim.Biophys.Acta* 241: 341-8, 1971.
- Christensen, H.N.; *Current Topics in Membranes and Transport* (Bronner, T. and Kleinzeller, A. eds.). Vol.6, 227-258, Academic Press, New York, 1975.
- Christensen, H.N.; *Physiological Reviews* 70 (1): 43-77, 1990.
- Chu, D.T., Isaacson, C.M., Bell, P.A.; *Biochem.Soc. Transactions*, 635th Meeting, Aberdeen Vol. 18: 1247-8, 1990.
- Clancy, B.M., Czech, M.P.; *J.Biol.Chem.* 265(21): 12434-43, 1990.
- Clausen, T., Elbrink, J., Dahl-Hansen, A.B.; *Biochim.Biophys. Acta* 375: 292-308, 1975.
- Clausen, T.; *Cell Calcium* 1: 311-25, 1980.
- Clausen, T., Anderson, T.L., Sturup-Johansen, M., Petkova, O.; *Biochim.Biophys.Acta* 646, 261-7, 1981.
- Cleland, P.J.F., Appleby, G.J., Rattigan, S., Clark, M.G.; *J.Biol.Chem.* 264(30): 17704-11, 1989.
- Cleland, P.J.F., Abel, K.C., Rattigan, S., Clark, M.G.; *Biochem.J.* 267: 659-63, 1990.
- Colca, J.R., DeWald, D.B., Pearson, J.D., Palazuk, B.J., Laurino, J.P., McDonald, J.M.; *J.Biol.Chem.* 262: 11399-402, 1987.
- Condorelli, G., Formisano, P., Villone, G., Smith, R.J., Beguinot, F.; *J.Biol.Chem.* 264: 12633-38, 1989.
- Conn, J.W., Fajans, S.S.; *Metabolism* 5: 114, 1956.
- Cooper, D.R., Konda, T.S., Standaert, M.L., Davis, J.S., Pollet, R.J., Farese, R.V.; *J.Biol.Chem.* 262(8): 3633-9, 1987.

- Cooper, D.R., Watson, J.E., Acevedo-Duncan, M., Pollet, R.J., Standaert, M.L., Farese, R.V.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 161: 327-34, 1989.
- Cori, C.F., Cori, G.T.; *J.Biol.Chem.* 79: 343-55, 1928.
- Coulston, L., Dandona, P.; *Diabetes* 29: 665-7, 1980.
- Cushman, S.W. i Wardzala, L.J.; *J.Biol.Chem.* 255: 4758-4762, 1980.
- Czech, M.P., Fain, J.N.; *Endocrinology* 91: 518, 1972.
- De Meyts, P., Roth, J.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 66: 1118-1126, 1975.
- De Meyts, P., Bianco, A.R., Roth, J.; *J.Biol.Chem.* 251: 1877-1888, 1976.
- De Meyts, P., Van Obberghen, E., Roth, J., Wollmer, A., Brandenburg, D.; *Nature* 273: 504-509, 1978.
- Debant, A., Clauser, E., Ponzio, G., Filloux, C., Auzan, C., Contreres, J.O., Rossi, B.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85: 8032-36, 1988.
- Debant, A., Ponzio, G., Clauser, E., Contreres, J.O., Rossi, B.; *Biochemistry* 28: 14-7, 1989.
- Denton, R.M., Brownsey, R.W., Belsham, G.J.; *Diabetologia* 21: 347-62, 1981.
- Degerman, E., Smith, C.J., Tornqvist, H., Vasta, V., Belfrage, P., Manganiello, V.C.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 533-37, 1990.
- Deibert, D.C., DeFronzo, R.A.; *J.Clin.Invest.* 65: 717-21, 1980.
- Del Vecchio, R.L., Pilch, P.F.; *Biochim.Biophys.Acta* 986: 41-46, 1989.
- Deshpande, A.K., Kung, H.-F.; *Mol.Cell.Biol.* 1: 1285-8, 1987.
- Dietz, M.R., Chiasson, J.L., Soderling, T.R., Exton, J.H.; *J.Biol.Chem.*255: 2301-7, 1980.
- Dolais-Kitabgi, J., Rey, J.F., Fehlmann, M., Morin, O., Freychet, P.; *Endocrinology* 109: 868-875, 1981.
- Dubyak, G.R., Kleinzeller, A.; *J.Biol.Chem.* 255: 5306-12, 1980.
- Duckworth, W.C., Solomon, S.S., Liepnieks, J., Hamel, F.G., Hand, S., Peavy, D.E.; *Endocrinology* 122: 2285-9, 1988.
- Dulhunty, A.F., Gage, P.W., Lamb, G.D.; *J. Muscle Res. Cell Motil* 7, 225-36, 1986.
- Duronio, V., Jacobs, S., Cuatrecasas, P.; *J.Biol.Chem.* 261: 970-975, 1986.

- Ebina, Y., Araki, E., Taira, M., Shimada, F., Mori, M., Craik, C.S.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 704-708, 1987.
- Eckel, J., Gerlach-Eskucuchen, E., Reinauer, H.; Biochem.J. 272: 691-6, 1990.
- Edmondson, J.W., Lumeng, L.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 96: 61-8, 1980.
- Egan, J.J., Saltis, J., Wek, S.A., Simpson, I.A., Londos, C.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87: 1052-6, 1990.
- Elks, M.L., Jackson, M., Manganiello, V.C., Vaughan, M.; Am.J.Physiol. 252 (Cell Physiol. 21): C342-8, 1987.
- Ellis, L., Clauser, E., Morgan, D.O., Edery, M., Roth, R.A., Rutter, W.J.; Cell 45: 721-732, 1986.
- Elsas, L.J., Wheeler, F.B., Danner, D.J., DeHaan, R.L.; J.Biol.Chem. 250: 9381-9390, 1975.
- Endemann, G., Yonezawa, K., Roth, R.A.; J.Biol.Chem. 265: 396-400, 1990.
- England, P.J., Shahid, M.; Biochem.J. 246: 687-95, 1987.
- Englesberg, E., Moffet, J.; J.Membrane Biol. 91: 199-212, 1986.
- Espinal, J., Challiss, R.A.J., Newsholme, E.A.; FEBS Lett. 158(1): 103-6, 1983.
- Exton, J.H.; Am.J.Physiol. 248(Endocrinol.Metab. 11): E633-47, 1985.
- Ezaki, O.; J.Biol.Chem. 264(27): 16118-22, 1989.
- Fafournoux, P., Rémésy, C., Demigné, C.; Biochem.J. 231: 315-20, 1985.
- Farago, A., Nishizuka, Y.; FEBS Lett. 268, 350-4, 1990.
- Farese, R.V., Barnes, D.E., Davis, J.S., Standaert, M.L., Pollet, R.J.; J.Biol.Chem. 259: 7094-100, 1984.
- Farese, R.V., Davis, J.S., Barnes, D.E., Standaert, M.L., Babischkin, J.S., Hock, R., Rosic, N.K., Pollet, R.J.; Biochem.J. 231: 269-78, 1985.
- Farese, R.V., Rosic, N., Standaert, M., Babischkin, K., Cooper, D.R., Davis, J.S., Pollet, R.J.; Diabetes 35(9): 951-7, 1986.
- Farese, R.V., Konda, T.S., Davis, J.S., Standaert, M.L., Pollet, R.J., Cooper, D.R.; Science 236: 586-9, 1987.

- Farese, R.V., Cooper, D.R., Konda, T.S., Nair, G., Standaert, M.L., Pollet, R.J.; *Biochem.J.* 256: 185-8, 1988.
- Farese, R.V.; *Am.J.Medecine* 85 (suppl 5A), 36-43, 1988.
- Fehlmann, M., Le Cam, A., Kitabgi, P., Rey, J.-F., Freychet, P.; *J.Biol.Chem.* 254: 401-407, 1979a.
- Fehlmann, M., Le Cam, A., Freychet, P.; *J.Biol.Chem.* 254(20), 10431-10437, 1979b.
- Fehlmann, M., Carpentier, J.L., Van Obberghen, E., Freychet, P., Thamm, P., Saunders, D., Brandenburg, D., Orci, L.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79: 5921-25, 1982.
- Flier, J.S., Mueckler, M., McCall, A.L., Lodish, H.F.; *J.Clin.Invest.* 79: 657-61, 1987.
- Flint, A., Paladini, R., Koshland, D.; *Science* 249: 408-11, 1990.
- Forsayeth, J.R., Caro, J.F., Sinha, M.K., Maddux, B.A., Goldfine, I.D.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 3448-51, 1987.
- Foster, D.O., Pardee, A.B.; *J.Biol.Chem.* 244: 2675-81, 1969.
- Franchi-Gazzola, R., Gazzola, G.C., Ronchi, P., Baibene, V., Guidotti, G.G.; *Biochim.Biophys.Acta* 291: 545-556, 1973.
- Francis, S.H., Kono, T.; *Mol.Cell.Biochem.* 42, 109-16, 1982.
- Freissmuth, M., Casey, P.J., Gilman, A.G.; *FASEB J.* 3: 2125-31, 1989.
- Friedmann, N., Dambach, G.; *Biochim.Biophys.Acta* 307: 399-403, 1973.
- Fujita-Yamaguchi, Y., Kathuria, S.; *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 157(3): 955-62, 1988.
- Fujita-Yamaguchi, Y., Harmon, J.T., Kathuria, S.; *Biochemistry* 28: 4556-4563, 1989.
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85: 5434-8, 1988.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F.; *J.Biol.Chem.* 264: 7776-79, 1989.
- Fuller, R.W., Baker, J.C.; *FEBS Lett.* 53, 8-9, 1975.
- Fushiki, T., Wells, J.A., Tapscott, E.B., Dohm, G.L.; *Am.J.Physiol.* 256: E580-87, 1989.
- Gazzano, H., Kowalski, A., Fehlmann, M., Van Obberghen, E.; *Biochem.J.* 216: 575-82, 1983.

- Gazzola, G.C., Franchi-Gazzola, R., Saibene, V., Ronchi, P., Guidotti, G.G.; *Biochim.Biophys.Acta* 266: 407-421, 1972.
- Gazzola, G.C., Dall'Asta, V., Guidotti, G.G.; *J.Biol.Chem.* 255: 929-936, 1980.
- Gazzola, G.C., Dall'Asta, V., Guidotti, G.G.; *J.Biol.Chem.* 256: 3191-98, 1981.
- Gherzi, R., Russell, D.S., Taylor, S.I., Rosen, O.M.; *J.Biol.Chem.* 262: 16900-5, 1987.
- Gibbs, E.M., Allard, W.J., Lienhard, G.E.; *J.Biol.Chem.* 261: 16597-603, 1986.
- Gil, J., Miralpeix, M., Carreras, J., Bartrons, R.; *J.Biol. Chem.* 263: 1868-71, 1988.
- Gomez-Foix, A.M., Rodriguez-Gil, J.E., Fillat, C., Guinovart, J.J., Bosch, F.; *Biochem.J.* 255: 507-12, 1988.
- Goodman, S.A., Esau, B., Koontz, J.W.; *Arch.Biochem.Biophys.* 266(2): 343-50, 1988.
- Goren, J.J., Northrup, J.K., Hollenberg, M.D.; *Can.J.Physiol. Pharmacol.* 63: 1017-22, 1985.
- Gottschalk, W.K., Jarett, L.; *Arch.Biochem.Biophys.* 261: 175, 1988.
- Green, A.; *Biochem.J.* 212: 189-95, 1983.
- Green, A.; *Biochem.J.* 238: 663-9, 1986.
- Greene, E.C.; *Anatomy of the rat. Transactions of the American Physiological Society. New Series-Vol.XXVII.* Hafner Publishing Company, N.Y. and Lond., 1963.
- Grémeaux, T., Tanti, J.-F., Van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y.; *Am.J.Physiol.* 252 (Endocrinol.Metab. 15): E248-54, 1987.
- Grunberger, G., Zick, Y., Gorden, P.; *Science*, 223: 932-4, 1984.
- Grunfeld, C., Baird, K., Van Obberghen, E., Kahn, C.R.; *Endocrinology* 109: 1723-30, 1981.
- Guidotti, G.G., Gazzola, G.C., Borghetti, A.F., Franchi-Gazzola, R.; *Biochim.Biophys.Acta* 406: 264-279, 1975.
- Guidotti, G.G., Borghetti, A.J., Gazzola, G.C.; *Biochim. Biophys.Acta* 515: 329-366, 1978.
- Gumà, A., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.; *Biochem.J.* 253: 625-629, 1988 (A).
- Gumà, A., Camps, A., Palacín, M., Testar, X., Zorzano, A.; *Biochem.J.* 268: 633-9, 1990 (B).

Gumà, A., Viñals, F., Muñoz, P., Camps, A., Bertran, J., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.; FEBS Lett. (manuscrit en preparació) (C).

Gumà, A., Muñoz, P., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.; (manuscrit en preparació) (D).

Gumà, A., Castelló, A., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.; Biochem.J. (sotmés a revisió per a la seva publicació) (E).

Gumà, A., Viñals, F., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.; Biochem.J. (sotmés a revisió per a la seva publicació) (F).

Hadden, J.W., Hadden, E.M., Wilson, E.E., Good, R.A., Coffey, R.G.; Nature New Biol. 235: 174-77, 1972.

Handlogten, M.E., Kilberg, M.S.; J.Biol.Chem. 259: 3519-3525, 1984.

Häring, H.U., Kemmler, W., Hepp, K.D.; FEBS Lett. 105(2): 329-32, 1979.

Häring, H.U., White, M.F., Kahn, C.R., Kasuga, M., Lauris, V., Fleischmann, R., Murray, M., Pawelek, J.; J.Cell.Biol. 99: 900-8, 1984.

Häring, H.U., Kirsch, D., Obermaier, B., Ermel, B., Machicao, F.; J.Biol.Chem. 261: 3869-75, 1986.

Hawley, D.M., Maddux, B.A., Patel, R.G., Wong, K.Y., Mamula, P.W., Firestone, G.L., Brunetti, A., Verspohl, E., Goldfine, I.D.; J.Biol.Chem. 264: 2438-44, 1989.

Hayes, M.R., McGivan, J.D.; Biochem.J. 214: 489-495, 1983.

Henriksen, E.J., Rodnick, K.J., Holloszy, J.O.; J.Biol.Chem. 264(36): 21536-43, 1989.

Herman, M.S.; Ramey, E.R.; Am.J.Physiol. 199: 226-8, 1960.

Heyworth, C.M., Houslay, M.D.; Biochem.J. 214: 547-52, 1983.

Heyworth, C.M., Whetton, A.D., Wong, S., Martin, R.B.,

Horner, H.C., Munck, A., Lienhard, G.E.; J.Biol.Chem. 262(36): 17696-702, 1987.

Houslay, M.D.; Biochem.J. 228: 593-603, 1985.

Himms-Hagen, J.; Ann.Rev.Nutr. 5: 69-94, 1985.

Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., Sasaki, Y.; Biochemistry 23: 5036-41, 1984.

Hokin, L.E., Hokin, M.R.; Biochim.Biophys.Acta 18, 102-10, 1955.

Hokin, M.R., Hokin, L.E.; *J.Biol.Chem.* 203: 967-77, 1953.

House, C., Kemp, B.; *Cell Signalling* 2: 187-90, 1990.

Houslay, M.D., Wallace, A.V., Wilson, S.R., Marchmont, R.J., Heyworth, C.M.; *Hormones and Cell Regulation* (Dumont, J.N. & Nuñez, J. eds.), vol. VII: 105-20, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1983.

Houslay, M.D.; *Molecular Mechanisms of Transmembrane Signalling*, Cohen & Houslay eds., Chap.9, 1985.

Hsuan, J.J., Downward, J., Clark, S., Waterfield, M.D.; *Biochem.J.* 259: 519-527, 1989.

Hume, S.P., Lamb, J.F.; *J.Physiol.(Lond)* 259: 83-101, 1976.

Hurrell, D.G.; Pedersen, O., Kahn, C.R.; *Endocrinology* 125: 2454-62, 1989.

Ishizuka, T., Cooper, D.R., Hernandez, H., Buckley, D., Standaert, M., Farese, R.V.; *Diabetes* 39: 181-90, 1990.

Jackson, T.K., Salhanick, A.I., Sparks, J.D., Sparks, C.E., Bolognino, M., Amatruda, J.M.; *Diabetes* 37: 1234-40, 1988.

Jacobs, S., Hazum, E., Cuatrecasas, P.; *J.Biol.Chem.* 255: 6937-6940, 1980.

Jacobs, S., Sahyoun, N.E., Saltiel, A.R., Cuatrecasas, P.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80: 6211-3, 1983.

Jacquez, J.A.; *J.Gen.Physiol.* 65: 57-83, 1975.

James, D.E., Brown, R., Navarro, J., Pilch, P.F.; *Nature (Lond)* 333: 183-85, 1988.

James, D.E., Strube, M., Mueckler, M.; *Nature (Lond)* 338: 83-87, 1989a.

James, D.E., Hiken, J.F., Lawrence, J.C.Jr.; *Proc.Natl.Acad. Sci.USA* 86: 8368-72, 1989b.

Joost, H.G., Weber, T.M., Cushman, S.W., Simpson, I.A.; *J.Biol.Chem.* 261: 10033-6, 1986.

Joost, H.G., Weber, T.M., Cushman, S.W., Simpson, I.A.; *J.Biol.Chem.* 262: 11262-7, 1987.

Juhlin-Dannfelt, A.C., Terblanche, S.E., Fell, R.D., Young, J.C., Holloszy, J.O.; *J.Appl.Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 53: 549-54, 1982.

Jung, C.Y.; *The red blood cell*. 2nd ed. Surgenor, D.M., Ed. New York, Academic, 705-51, 1975.

- Kaestner, K.H., Christy, R.J., McLenithan, J.C., Braiterman, L.T., Cornelius, P., Pekala, P.H., Lane, M.D.; Proc.Natl.Acad. Sci.USA 86: 3150-54, 1989.
- Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J., Neville, D.M.; J.Biol.Chem. 249: 2249-2257, 1974.
- Kahn, C.R., Goldfine, I.D., Neville, Jr. D.M., De Meyts; Endocrinology 103: 1059, 1978.
- Kahn, C.R., White, M.F.; J.Clin.Invest. 82: 1151-6, 1988.
- Kamata, T., Kathuria, S., Fujita-Yamaguchi, Y.; Biochem. Biophys.Res.Comm. 144: 19-25, 1987.
- Karasik, A., Kahn, R.; Endocrinology 123(5): 2214-22, 1988.
- Karasik, A., Pepinsky, R.B., Shoelson, S.E., Kahn, C.R.; J.Biol.Chem. 263: 11862-67, 1988.
- Karasik, A., Rothenberg, P.L., Yamada, K., White, M.F., Kahn, C.R.; J.Biol.Chem. 265: 10226-31, 1990.
- Karnieli, E., Barzilai, A., Rafaeloff, R., Armoni, M.; J.Clin.Invest. 78: 1051-55, 1986.
- Kasahara, M., Hinkle, P.C.; J.Biol.Chem. 253: 7384-90, 1977.
- Kashiwagi, A., Foley, J.E.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 107: 1151-7, 1982.
- Kashiwagi, A., Hoekstead, T.P., Foley, J.E.; J.Biol.Chem. 258: 13685-92, 1983.
- Kasuga, M., Hedzo, J.A., Yamada, K.M., Kahn, C.R.; J.Biol.Chem. 257: 10392-10399, 1982a.
- Kasuga, M., Karlsson, F.A., Kahn, C.R.; Science, 215: 185-7, 1982b.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I.; J.Biol.Chem. 263: 15245-8, 1988.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.Y., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S., Bell, G.I.; J.Biol.Chem. 265(22): 13276-82, 1990.
- Kellerer, M., Seffer, E., Mushack, J., Obermaier-Kusser, B., Häring, H.U.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 172(2): 446-54, 1990.
- Kelley, D.S., Potter, V.R.; J.Biol.Chem. 253: 9009-9017, 1978.
- Kelley, D.S., Potter, V.R.; J.Biol.Chem. 254: 6691-6697, 1979.
- Kelley, D.S., Evanson, T., Potter, V.R.; Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77: 5953-5957, 1980.
- Kelly, K.L., Mato, J.M., Jarett, L.; FEBS Lett. 209, 238-42, 1986.

- Kelly, K.L., Mato, J.M., Merida, I., Jarett, L.; Proc.Natl. Acad.Sci.USA 84, 6404-7, 1987.
- Kessel, R.G., Kardon, R.H.; Tissues and Organs: a Text-Atlas of scanning electron microscopy. Ed. Freeman and Co., 1979.
- Kiechle, F.L., Jarett, L., Kotagal, N., Popp, D.A.; Diabetes 29: 852-55, 1980.
- Kilberg, M.S., Neuhaus, O.W.; J.Supramol.Struct. 6:191-204, 1977.
- Kilberg, M.S., Handlogten, M.E., Christensen, H.N.; J.Biol.Chem. 255: 4011-9, 1980.
- Kilberg, M.S., Han, H.P., Barber, E.F., Chiles, T.C.; J.Cell. Physiol. 122: 290-298, 1985.
- Kilberg, M.S.; Fed.Proc. 45: 2438-54, 1986.
- Kim, H.D.K., Sergeant, S., Shukla, S.D.; J.Pharmacol.Exp.Ther. 236: 585-9, 1986.
- Kipnis, D.M. i Noall, H.W.; Biochem.Biophys.Acta: 28, 226-227, 1958.
- Kipnis, D.M., Cori, C.R.; J.Biol.Chem. 234: 171-7, 1959.
- Kirsch, D., Häring, H.U., Kemmler, W.; Biochem.Biophys.Res. Commun. 115: 378-405, 1983a.
- Kirsch, D., Baumgarten, M., Deufel, T., Rinninger, F., Kemmler, W., Häring, H.U.; Biochem.J. 216: 737-45, 1983b.
- Kirsch, D., Obermaier, B., Häring, H.U.; Biochem.Biophys.Res. Commun. 128(2): 824-32, 1985.
- Klein, H.H., Freidenberg, G.R., Kladde, M., Olefski, J.M.; J.Biol.Chem. 261: 4691-97, 1986.
- Klein, H.H., Matthaei, S., Drenkhan, M., Ries, W., Scriba, P.C.; Biochem.J. 274: 787-92, 1991.
- Kletzien, R.F., Pariza, M.W., Becker, J.E., Potter, V.R., Butcher, F.R.; J.Biol.Chem. 251: 3014-20, 1976.
- Klip, A., Li, G., Logan, W.J.; Am.J.Physiol. 247 (Endocrinol.Metab. 10): E297-E304, 1984.
- Klip, A., Ramlal, T., Young, D.A., Holloszy, J.O.; FEBS Lett. 224: 224-30, 1987a.
- Klip, A., Ramlal, T.; Biochem.J. 242: 131-6, 1987b.
- Klip, A.; In Sarcolemma Biochemistry. Vol. 2. Kidwai, A.M., Ed. Boca Raton, F.L., C.R.C., 129-53, 1987c.

- Klip, A., Ramlal, Douen, A.G., Bilan, P.J., Skoreck, K.L.; *Biochem.J.* 255: 1023-9, 1988.
- Klip, A., Douen, A.G.; *J.Membrane Biol.* 111: 1-23, 1989.
- Klip, A., Pâquet, M.R.; *Diabetes Care* 13 (3): 228-43, 1990.
- Kole, H.K., Abdel-Ghany, M., Racker, E.; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85: 5849-53, 1988.
- Korn, L.J., Siebel, C.W., McCormick, F., Roth, R.A.; *Sci.Wash.DC* 236: 840-3, 1987.
- Kovacina, K.S., Yonezawa, K., Brautigan, D.L., Tonks, N.K., Rapp, U.R., Roth, R.A.; *J.Biol.Chem.* 265: 12115-18, 1990.
- Krishna, G., Moskowitz, J., Dempsey, P.; *Life Sci.* 9: 1353-61, 1970.
- Krupinski, J., Rajaram, R., Lakonishok, M., Benovic, J.L., Cerione, R.A.; *J.Biol.Chem.* 263: 12333-41, 1988.
- Kuroda, M., Simpson, I.A., Honnor, R., Londos, C., Cushman, S.W.; *Fed.Proc.* 43: 1814 (Abstr.), 1984.
- Kuroda, M., Honnor, R.C., Cushman, S.W., Londos, C., Simpson, I.A.; *J.Biol.Chem.* 262: 245-53, 1987.
- Larner, J., Galasko, G., Cheng, K., DePaoli-Roach, A.A., Huang, P., Daggy, P., Kellog, J.; *Science Wash. DC* 206: 1408-10, 1979.
- Lawrence, J.C.Jr., Hiken, J.F., James, D.E.; *J.Biol.Chem.* 265: 2324-32, 1990.
- Lefevre, P.G.; *Metabolic Pathways. Metabolic Transport. Vol.4.* Hokin, L.C., Ed. New York, Academic, 385-451, 1972.
- Le Marchand-Brustel, Y., Gremeaux, T., Ballotti, R., Van Obberghen, E.; *Nature*, 315: 676-9, 1985.
- Le Marchand-Brustel, Y., Ballotti, R., Gremeaux, T., Tanti, J.F., Brandenburg, D., Van Obberghen, E.; *J.Biol.Chem.* 264: 21316-21321, 1989.
- Lever, J.E., Kennedy, B.G., Vasan, R.; *Arch.Biochem.Biophys.* 234: 330-40, 1984.
- Levitzki, A.; *Science* 241: 800-6, 1988.
- Lewis, R.E., Wu, G.P., MacDonald, R.G., Czech, M.P.; *J.Biol.Chem.* 265: 947-54, 1990.
- Lienhard, G.E., Hie Kim, H., Ransome, K.J., Gorga, J.C.; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 105: 1150-56, 1982.

- Lipson, K.E., Yamada, K., Kolhatkar, A.A., Donner, D.B.; *J.Biol.Chem.* 261: 10833-10838, 1986.
- Logan, W.S., Klip, A., Gagalang, E.; *J.Cell Physiol.* 112: 229-236, 1982.
- Lönnroth, P., Smith, U.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 112: 972, 1983.
- Low, M.G., Ferguson, M.A.J., Futterman, A.H., Silman, I.; *Trends Biochem.Sci.* 11: 212-4, 1986.
- Low, M.G., Saltiel, A.R.; *Science Wash.DC* 239: 268-75, 1988.
- Ludvigsen, C., Jarett, L., McDonald, J.M.; *Endocrinology* 106: 786-80, 1980.
- Luly, P., Barnabei, O., Tria, E.; *Biochim.Biophys.Acta* 282: 447-52, 1972.
- Luttrell, L.M., Rogol, A.D.; *Mol.Pharmacol.* 30: 624-30, 1987.
- Luttrell, L.M., Hewlett, E.L., Romero, G., Rogol, A.D.; *J.Biol.Chem.* 263: 6134, 1988.
- Magnuson, M.A., Quinn, P.G., Granner, D.K.; *J.Biol.Chem.* 262 (31): 14917-20, 1987.
- Mailliard, M.E., Kilberg, M.S.; *J.Biol.Chem.* 265(24): 14321-14326, 1990.
- Majerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, V.S., Wilson, D.B.; *Science* 234: 1519-26, 1986.
- Maller, J.L., Pike, L.J., Freidenberg, G.R., Cordera, R., Stith, B.J., Olefsky, J.M., Krebs, E.G.; *Nature* 320: 459-61, 1986.
- Manchester, K.L.; Guidotti, G.G., Borghetti, A.F., Lüneburg, B.; *Biochim.Biophys.Acta* 241: 226-241, 1971.
- Manchester, K.L.; *South African J.Sci.* 83: 581-3, 1987.
- Marchmont, R.J., Houslay, M.D.; *Biochem.J.* 195: 653-60, 1981.
- Margolis, R.N., Schell, M.J., Taylor, S.I., Hubbard, A.L.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 166: 562-66, 1990.
- Maroni, B.J., Haesemeyer, R.W., Kutner, M.H., Mitch, W.E.; *Am.J.Physiol.* 258: F1304-F1310, 1990.
- Mattera, R., Graziano, M.P., Yatani, A., Zhou, Z., Graf, R., Codina, J., Birnbaumer, L., Gilman, A.G., Brown, A.M.; *Science* 243: 804-7, 1989.
- Matthaei, S., Garvey, W.T., Horuk, R., Hueckstaedt, T.P., Olefsky, J.M.; *J.Clin.Invest.* 79: 703-709, 1987.

- May, J.M., Contoreggi, C.S.; *J.Biol.Chem.* 257: 4362-8, 1982.
- Mazzei, G.J., Katoh, N., Kuo, J.F.; *BioChem.Biophys. Res. Commun.* 109: 1129-33, 1982.
- McCormick, F.; *Cell* 56: 5-8, 1989.
- McCormick, J.I., Tsang, D., Johnstone, R.M.; *Arch.Biochem. Biophys.* 231, 355-365, 1984.
- McCormick, J.I., Johnstone, R.M.; *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85: 7877-7881, 1988.
- McDonald, J.R., Lawrence, J.C., Jr.; *J.Biol.Chem.* 264: 9611-18, 1989.
- McGivan, J.D., Ramsell, J., Lacey, J.H.; *Biochim.Biophys.Acta* 644: 295-304, 1981.
- McKiddie, M.T., Jasani, M.K., Buchanin, K.D., Boyle, J.A., Buchanin, W.W.; *Metabolism* 17: 730, 1968.
- Merida, I., Corrales, F.J., Clemente, R., Ruiz-Albusac, J.M., Villalba, M., Mato, J.M.; *FEBS Lett.* 236(1), 251-5, 1988.
- Minakuchi, R., Takai, Y., Yu, B., Nishizuka, Y.; *J.Biochem.* 89: 1651, 1981.
- Mitsumoto, Y., Burdett, E., Grant, A., Klip, A.; *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 175(2): 652-9, 1991.
- Modigliani, E., Strauch, A., Luton, J.P., Bricaine, H.; *Diabetologia* 6: 8, 1970.
- Moffet, J., Englesberg, E.; *J.Cell.Physiol.* 126: 421-429, 1986.
- Mojsilovic, I.P., Rosic, N.K., Standaert, M.L., Mooney, R.A., Anderson, D.L.; *J.Biol.Chem.* 264: 6850-7, 1989.
- Mooney, R.A., Bordwell, K.L., Luhowskyj, S., Casnellie, J.E.; *Endocrinology* 124: 422, 1989.
- Moran, N.C.; *AI: Handbook of Physiology, Endocrinology, Sect. 7, Vol. VI, Capitol 29. Am.Physiol.Soc., Wash.DC: 447-52, 1975.*
- Morgan, H.E., Earl, D.C.N., Broadus, A., Wolpert, E.B., Giger, K.E., Jefferson, L.S.; *J.Biol.Chem.* 246: 2152-62, 1971.
- Morgan, D.O., Roth, R.A.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 41-45, 1987.
- Morgan, H.C., Regen, D.M., Park, C.R.; *J.Biol.Chem.* 239: 369-74, 1966.
- Moule, S.K., McGivan, J.D.; *Biochem.J.* 247: 233-235, 1987.
- Moule, S.K., Bradford, N.M., McGivan, J.D.; *Biochem.J.* 241: 737-43, 1987.

- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F.; *Science*, 229: 941-45, 1985.
- Mühlbacher, C., Karnieli, E., Schaff, P., Obermaier, B., Muschack, J., Rattenhuber, E., Häring, H.U.; *Biochem.J.* 249: 865-70, 1988.
- Munck, A., Koritz, S.B.; *Biochim.Biophys.Acta* 57: 310, 1962.
- Muñoz, P., Gumà, A., Camps, M., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A.; (en preparació).
- Murayama, T., Ui, M.; *J.Biol.Chem.* 258: 3319-26, 1983.
- Naftalin, R.J., Holman, G.D.; *Membrane transport in red cells*. Ellory, J.C., Lew, V.L., Eds. New York, Academic, 257-300, 1977.
- Narahara, H.T., Ozand, P., Cori, D.F.; *J.Biol.Chem.* 235: 3370-78, 1960.
- Narahara, H.T., Ozand, P.; *J.Biol.Chem.* 238: 40-49, 1963.
- Nel, A.E., Wooten, M.W., Goldschmidt-Clermont, P.J., Miller, P.J., Stevenson, H.C., Galbraith, R.M.; *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 128: 1364-72, 1985.
- Newsholme, E.A., Randle, P.J.; *Biochem.J.* 80: 655-62, 1961.
- Nilsen-Hamilton, M., Hamilton, R.T.; *Biochim.Biophys.Acta* 588: 322-331, 1979.
- Nishizuka, Y.; *Ann.Rev.Biochem.* 58: 31-44, 1989.
- Nishizuka, Y.; *Nature* 308: 693-7, 1984.
- Northup, J.K., Sternweis, P.C., Smigel, M.D., Schleifer, L.S., Ross, E.M., Gilman, A.G.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77, 6516-20, 1980.
- Obermaier-Kusser, B., Mühlbacher, C., Mushack, J., Rattenhuber, E., Fehlmann, M., Haring, H.U.; *Biochem.J.* 256: 515-20, 1988.
- O'Brien, R.M., Siddle, K., Houslay, M.D., Hall, A.; *FEBS Lett.* 217: 253-9, 1987.
- Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Kasuga, M., Kanazawa, Y., Takaku, F.; *J.Biol.Chem.* 263: 13432-39, 1988.
- Olsen, S.R., Uhler, M.D.; *J.Biol.Chem.* 264(31): 18662-6, 1989.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., Nishizuka, Y.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86: 3099-103, 1989.
- Oxender, D.L.; *Ann.Rev.Biochem.* 74: 777-814, 1972.

- Oxender, D.L., Christensen, H.N.; *J.Biol.Chem.* 238: 3686-3699, 1963.
- Palacín, M., Werner, A., Dittmer, J., Murer, H., Biber, J.; *Biochem.J.* 270: 189-95, 1990.
- Pang, D.T., Shafer, J.A.; *J.Biol.Chem.* 259: 8589-8596, 1984.
- Pang, D.T., Shafer, J.A.; *J.Biol.Chem.* 260: 5126-30, 1985.
- Pang, D.T., Sharma, B.R., Shafer, J.A., White, M.F., Kahn, C.R.; *J.Biol.Chem.* 260: 7131-6, 1985.
- Pariza, M.W., Butcher, F.R., Kletzien, R.F., Becker, J.E., Potter, V.R.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 73: 4511-5, 1976.
- Pariza, M.W., Butcher, F.R., Becker, J.E., Potter, V.R.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74: 234-7, 1977.
- Park, C.R., Bornstein, J., Post, L.R.; *Am.J.Physiol* 182: 12-20, 1955.
- Parker, J.C., Kiechle, F.L., Jarett, L.; *Arch.Biochem.Biophys.* 215: 339-44, 1982.
- Parker, P.J., Kour, G., Marais, R., Mitchell, F., Pears, C., Schaap, D., Stabel, S., Webster, C.; *Mol.Cell.Endocrinol.* 65: 1-11, 1989.
- Parnes, J.R., Isselbacher, K.J.; In: *Progress in Experimental Tumor Research.* Karger, Basel, Vol. 22: 79-122, 1978.
- Peavy, D.E., Edmonson, J.W., Duckworth, W.C.; *Endocrinology* 114: 753-60, 1984.
- Peck, W.A., Rockwell, L.H., Lichtman, M.A.; *J.Cell Physiol.* 89: 417-428, 1976.
- Pessin, J.E., Gitomer, W., Oka, Y., Oppenheimer, C.L., Czech, M.P.; *J.Biol.Chem.* 258: 7386-94, 1983.
- Petersen, O.H.; *J.Physiol.(London)* 232: 647-54, 1974.
- Peterson, N.A., Rahupatty, E.; *J.Neurochem.* 19: 1423-1438, 1972.
- Pike, L.J., Kuenzel, E.A., Casnellie, J.E., Krebs, E.G.; *J.Biol.Chem.* 259: 9913-9921, 1984.
- Pilch, P.F., Czech, M.P.; *J.Biol.Chem.* 255: 1722-1731, 1980.
- Pilch, P.F., Czech, M.P.; *J.Biol.Chem.* 254: 3375-3381, 1979.
- Plotz, C.M., Knowton, A.I., Ragan, C.; *Am.J.Med.* 13: 597, 1952.
- Plough, T., Galbo, H., Vinten, J., Jorgensen, M., Richter, E.A.; *Am. J. Physiol.* 253: E12-20, 1987.

- Pola, E., Bertran, J., Roca, A., Palacín, M., Zorzano, A., Testar, X.; *Biochem.J.* 271: 297-303, 1990.
- Pollet, R.J., Kempner, E.S., Standaert, M.L., Haase, B.A.; *J.Biol.Chem.* 257: 894-898, 1982.
- Ponzio, G., Contreres, J.O., Debant, A., Baron, V., Gautier, N., Dolais-Kitabgi, J., Rossi, B.; *EMBO J.* 7: 4111-7, 1988.
- Prentki, M., Crettaz, M., Jeanrenaud, B.; *J.Biol.Chem.* 256: 4336-4340, 1981.
- Pupo, A.A., Wajchenberg, L., Schneider, J.; *Diabetes* 15: 24, 1966.
- Quesada, A.R., McGivan, J.D.; *Biochem.J.* 255: 963-969, 1988.
- Qian, N.X., Jones, M., Englesberg, E.; *J.Cell Biol.* 107: 362a, 1988.
- Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J.; *J.Biol.Chem.* 224: 463-75, 1957.
- Reiss, K., Korohoda, W.; *Folia Histochem. et Cytobiol.* 26(3): 133-42, 1988.
- Reynolds, R.A., Segal, S.; *Biochim.Biophys.Acta* 426: 513-525, 1976.
- Richter, E.A., Ruderman, N.B., Galbo, H.; *Acta Physiol. Scand.* 116: 215-22, 1982.
- Richter, E.A., Cleland, P.J.F., Rattigan, S., Clark, M.G.; *FEBS Lett.* 217(2): 232-6, 1987.
- Ridge, K.D., Hofmann, K., Finn, F.M.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85: 9489-9493, 1988.
- Riet-Correa, P., Magalhaes, P.E., Krahl, M.E.; *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 103: 704, 1960.
- Riggs, T.R.; In: *Biochemical Actions of Hormones*, Academic Press, N.Y., Vol.1:157-208, 1970.
- Riggs, T.R., Pan, M.W.; *Biochem.J.* 128: 19-27, 1972.
- Ricquier, D., Mory, G.; *Clin.Endocrinol.Metab.* 13: 501-20, 1984.
- Robertson, R.P., Porte, D.; *Diabetes* 22: 1-8, 1973.
- Robinson, J.H.; *J.Cell.Physiol.* 89: 101-10, 1976.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.J.; *J.Biol.Chem.* 246: 1877-82, 1971.
- Rodger, I.W., Shahid, M.; *Br.J.Pharmacol.* 81: 151-9, 1984.
- Rogus, E., Zierler, K.L.; *J.Gen.Physiol.* 54: 188-202, 1969.

- Romero, G., Luttrell, L., Rogol, A., Zeller, K., Hewlerr, E., Larner, J.; *Science* 240: 509, 1988.
- Rosen, O.M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L.M., Cobb, M.H.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 80: 2337-40, 1983.
- Roth, R.A., Beaudoin, J.; *Diabetes* 36: 123-6, 1987.
- Rothenberg, P.L., Kahn, C.R.; *J.Biol.Chem.* 263: 15546-52, 1988.
- Ruderman, N.B., Houghton, C.R.S., Hems, R.; *Biochem.J.* 124: 639-51, 1971.
- Russell, D.S., Gherzi, R., Johnson, E.L., Chou, C.K., Rosen, O.M.; *J.Biol.Chem.* 262: 11833-40, 1987.
- Ryu, S.H., Kim, U.-H., Wahl, M.I., Brown, A.B., Carpenter, G., Huang, K.-P., Rhee, S.G.; *J.Biol.Chem.* 265(29): 17941-5, 1990.
- Sacks, D.B., Fujita-Yamaguchi, Y., Gale, R.D., McDonald, J.M.; *Biochem.J.* 263: 803-12, 1989.
- Saier, M.H., Daniels, G.A., Boerner, P., Lin, J.; *J.Mem.Biol.* 104: 1-20, 1988.
- Saitoh, Y., Itaya, K., Ui, M.; *Biochim.Biophys.Acta* 343: 492-9, 1974.
- Salomon, D.S.; *J.Biol.Chem.* 256: 7958-66, 1981.
- Saltiel, A.R., Doble, A., Jacobs, S., Cuatrecasas, P.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 110: 789-95, 1983.
- Saltiel, A.R., Cuatrecasas, P.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 5793-7, 1986.
- Saltiel, A.R., Fox, J.A., Sherline, P., Cuatrecasas, P.; *Science Wash.DC* 233: 967-72, 1986.
- Saltiel, A.R., Sherline, P., Fox, J.A.; *J.Biol.Chem.* 262: 1116-21, 1987.
- Saltiel, A.R., Sorbara-Cazan, A.L.; *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 149: 1084-92, 1987.
- Saltis, J., Habberfield, A.D., Egan, J.J., Londos, C., Simpson, I.A., Cushman, S.W.; *J.Biol.Chem.* 266(1): 261-7, 1991.
- Salviati, G., Volpe, P.; *Am.J.Physiol.* 254 (Cell Physiol. 23): C459-C465, 1988.
- Samson, M., Fehlmann, M., Morin, O., Dolais-Kitabgi, J., Freychet, P.; *Metabolism* 31: 766-72, 1982.
- Saperstein, R., Vicario, P.P., Strout, H.V., Brady, E. Slater, E.E., Greenlee, W.J., Ondeyka, D.L.; Patchett, A.A., Hangauer, D.G.; *Biochemistry* 28: 5694-701, 1989.

- Sasaki, K., Cripe, T.P., Koch, S.R., Andreone, T.L., Petersen, D.D., Beale, E.G., Granner, D.K.; *J.Biol.Chem.* 259: 15242-51, 1984.
- Sato, M.; *Japanese J.Physiol.* 39: 461-74, 1989.
- Sato, T., Villar-Palasi, C., Huang, L., Tang, G., Larner, A.C., Larner, J.; *Endocrinology* 123: 1559-64, 1988.
- Scott, D.F., Butcher, F.R., Potter, V.R., Morris, H.P.; *Cancer Res.* 32: 2127-2134, 1972.
- Schechter, Y., Ron, A.; *J.Biol.Chem.* 261: 14945, 1986.
- Schubert, D., Harris, A.J., Divine, C.E., Heinemann, S.; *J.Cell Biol.* 61: 398-413, 1974.
- Schürmann, A., Rosenthal, W., Hinsch, K.D., Joost, H.G.; *FEBS Lett.* 255(2): 259-64, 1989.
- Sergeant, S., Kim, H.D.; *J.Biol.Chem.* 260: 14677-82, 1985.
- Shanahan, M.F., Edwards, B.M., Ruoho, A.E.; *Biochim.Biophys. Acta* 887: 121-9, 1986.
- Shechter, Y., Taish, P., Chorev, M., Gilon, C., Braun, S., Levitzki, A.; *EMBO J.* 8: 1671-6, 1989.
- Shimizu, M., Webster, C., Morgan, D.O., Blau, H.M., Roth, R.A.; *Am.J.Physiol.* 251 (Endocrinol.Metab. 14): E611-5, 1986.
- Shimoyama R., Savage, C.R., Boden, G.; *J.Clin.Endocrinol. Metab.* 60: 928-33, 1985.
- Shoelson, S.E., White, M.F., Kahn, C.R.; *J.Biol.Chem.* 263: 4852-4860, 1988.
- Shoelson, S.E., Kahn, C.R.; *Insulin Action*, Alan R. Liss Ed., pag. 23-33, 1989.
- Shotwell, M.A., Jayme, D.W., Kilberg, M.S., Oxender, D.L.; *J.Biol.Chem.* 256, 5244-5247, 1981.
- Shotwell, M.A., Kilberg, M.S., Oxender, D.L.; *Biochim.Biophys. Acta* 737: 267-284, 1983.
- Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J.; *Nature (London)* 317: 124-9, 1985.
- Siegel, T.W., Ganguly, S., Jacobs, S., Rosen, O.M., Rubin, C.S.; *J. Biol.Chem.* 256: 9266-9273, 1981.
- Simpson, T.A., Hedo, J.A.; *Science* 223: 1301-4, 1984.
- Sloan, I.G., Sawh, P.C., Bhiler, I.; *Mol.Cell.Endocrinol.* 10: 3-12, 1978.
- Smith, U., Kuroda, M., Simpson, I.A.; *J.Biol.Chem.* 259: 8758-63, 1984.

- Smith, D.M., King, M.J., Sale, G.J.; *Biochem.J.* 250: 509-19, 1988.
- Smith, D.M., Sale, G.J.; *Biochem.J.* 256: 903-9, 1988.
- Smith, C.H., Adcock, E.W., Teasdale, F., Meschia, G., Battaglia, F.C.; *Am.J.Physiol.* 224: 558-564, 1973.
- Soderling, T.R., Park, C.R.; *Adv.Cyclic Nucleotide Res.* 4: 283-334, 1974.
- Sowell, M.O., Treutelaar, M.K., Burant, C.F., Buse, M.G.; *Diabetes* 37: 499-506, 1988.
- Sowell, M.O., Dutton, S.L., Buse, M.G.; *Am.J.Physiol.* 257 (Endocrinol.Metab. 20): E418-25, 1989.
- Sowell, M.O., Boggs, K.P., Robinson, K.A., Dutton, S.L., Buse, M.G.; *Am.J.Physiol.* 260 (Endocrinol.Metab.23): E247-56, 1991.
- Srivastava, A.K., Chiasson, J.L.; *Biochim.Biophys.Acta* 996: 13-18, 1989.
- Stadtmauer, L., Rosen, O.M.; *J.Biol.Chem.* 261: 3402-7, 1986.
- Standaert, M.L., Farese, R.V., Cooper, D.R., Pollet, R.J.; *J.Biol.Chem.* 263(18): 8696-705, 1988.
- Steele-Perkins, G., Roth, R.A.; *J.Biol.Chem.* 265: 9458-63, 1990.
- Steinfelder, H.J., Joost, H.G.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 104: 45, 1982.
- Sternlicht, E., Barnard, R.J., Grimditch, G.K.; *Am.J.Physiol.* 254: E633-38, 1988.
- Strout, H.V., Vicario, P.P., Biswas, C., Saperstein, R., Brady, E.J., Pilch, P.F., Berger, J.; *Endocrinology* 126: 2728-32, 1990.
- Struhar, D., Harbeck, R.J.; *FASEB J.* 1: 116-8, 1987.
- Sung, C.K., Maddux, B.A., Hawley, D.M., Goldfine, I.D.; *J.Biol.Chem.* 264: 18951-9, 1989.
- Suzuki, K. i Kono, T.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77: 2542-2545, 1980.
- Suzuki, K., Toyoto, T., Suzuki, H., Goto, Y.; *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 118: 40-6, 1984.
- Swanson, M.L., Pessin, J.E.; *J.Mem.Biol.* 108: 217-225, 1989.
- Sweet, L.J., Morrison, B.D., Pessin, J.E.; *J.Biol.Chem.* 262: 6939-6942, 1987.
- Takayama, S., White, M.F., Lauris, V., Kahn, C.R.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81: 7797-801, 1984.

- Takayama, S., White, M.F., Kahn, C.R.; *J.Biol.Chem.* 263: 3440-7, 1988.
- Tamura, S., Brown, T.A., Dubler, R.E., Lerner, J.; *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 113: 80, 1983.
- Tamura, S., Brown, T.A., Whipple, J.H., Fujita-Yamaguchi, Y., Dubler, R.E., Cheng, K., Lerner, J.; *J.Biol.Chem.* 259: 6650-8, 1984.
- Tan, M.H., Bonen, A.; *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 63: 1133-8, 1985.
- Tanti, J-F., Grémeaux, T., Rochet, N., Van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y.; *Biochem.J.* 245: 19-26, 1987.
- Tanti, J-F., Rochet, N., Grémeaux, T., Van Obberghen, E., Le Marchand-Brustel, Y.; *Biochem.J.* 258: 141-146, 1989.
- Tarnuzzer, R.W., Campa, M.J., Qian, N.-X., Englesberg, E., Kilberg, M.S.; *J.Biol.Chem.* 265(23): 13914-13917, 1990.
- Tavaré, J.M., O'Brien, R.M., Siddle, K., Denton, R.M.; *Biochem.J.* 253: 783-8, 1988.
- Taverna, R.D., Langdon, R.G.; *Biochim.Biophys.Acta* 323:207-19, 1973.
- Taylor, W.M., Mak, M., Halperin, M.L.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 73: 4359-63, 1976.
- Taylor, W.M., Halperin, M.L.; *Biochem.J.*, 178: 381-9, 1979.
- Taylor, P.M., Hundal, H.S., Rennie, M.J.; *J.Membr.Biol.* 112: 149-157, 1990.
- Taylor, S.S.; *J.Biol.Chem.* 264(15): 8443-6, 1990.
- Tedstone, A.E., Tedolti, B., Ilic, V., Williamson, D.H.; *Biochem.J.* 261: 445-50, 1989.
- Tews, J.K., Woodcok, N.A., Harper, A.E.; *J.Biol.Chem.* 245: 3026-32, 1970.
- Tews, J.K., Woodcok Colosi, N., Harper, A.E.; *Life Sci.* 16: 739-49, 1975.
- Thakker, J.K., DiMarchi, R., MacDonald, K., Caro, J.F.; *J.Biol.Chem.* 264(13): 7169-75, 1989.
- Theis, R.S., Ullrich, A., McClain, D.A.; *J.Biol.Chem.* 264: 12820-25, 1989.
- Thomopoulos, P., Testa, U., Gourdin, M.-F., Hervi, C., Titeux, M., Vainchenker, W.; *Eur.J.Biochem.* 129: 389-93, 1982.
- Thompson, W.J., Strada, S.J.; *Receptors and Hormone Action* (Birnbaumer & O'Malley eds.), vol.3: 553-75, Academic Press, N.Y., 1978.

- Thorens, B., Sarkar, H.K., Kaback, H.R., Lodish, H.F.; *Cell* 55: 281-91, 1988.
- Tolman, E.L., Barris, E., Burns, M., Pansini, A., Patridge, R.; *Life Sci.* 25: 1159-64, 1979.
- Tornqvist, H.E., Pierce, M.W., Frackelton, A.R., Nemenoff, R.A., Avruch, J.; *J.Biol.Chem.* 262: 10212-10219, 1987.
- Toutant, M., Barhanin, J., Bockaert, J., Rouot, B.; *Biochem.J.* 254: 405-9, 1988.
- Trevillyan, J.M., Perisic, O., Traugh, J.A., Byus, C.V.; *J.Biol.Chem.* 260: 3041-4, 1985.
- Ueda, M., Robinson, F.W., Smith, M.M., Kono, T.; *J.Biol.Chem.* 259: 9520-5, 1984.
- Uhler, M.D., McKnight, G.S.; *J.Biol.Chem.* 262: 15202-7, 1987.
- Ui, M.; *am.J.Physiol.* 209: 359-64, 1965.
- Ullrich, K.J.; *Ann.Rev.Physiol.* 41: 181-95, 1979.
- Ullrich, A., Bell, J.R., Chen, E.Y., Herrera, R., Petruzzelli, L.M., Dull, T.J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y.C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P.H., Grunfeld, C., Rosen, O.M., Ramachandran, J.; *Nature (London)* 313: 756-61, 1985.
- Ullrich, A., Schlessinger, J.; *Cell* 61: 203-212, 1990.
- Vaartjes, W.J., de Haas, C.G.M., Van den Bergh, S.G.; *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 138(3): 1328-33, 1986.
- Vaartjes, W.J., de Haas, C.G.M., Geelen, M.J.H., Bijleveld, C.; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 142: 135-40, 1987.
- Van Putten, J.P.M., Krans, H.M.J.; *Am.J.Physiol.* 248: E706-11, 1985.
- Van de Werve, G., Proietto, J., Jeanrenaud, B.; *Biochem.J.* 225: 523-7, 1985.
- Van de Werve, G., Zaninetti, D., Lang, U., Vallotton, M.B., Jeanrenaud, B.; *Diabetes* 36(3): 310-4, 1987.
- Van Winkle, L.J.; *Biochim.Biophys.Acta* 947: 173-208, 1988.
- Vara, F., Rozengust, E.; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 130: 646-53, 1985.
- Varela, I., Avila, M., Mato, J.M., Hue, L.; *Biochem.J.* 267: 541-44, 1990.
- Vegesna, R.V., Diamond, J.; *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 61: 1202-5, 1983.
- Villar-Palasi, C., Larner, J.; In: Snell EE (ed.) *Ann.Rev.Biochem.* 39, *Ann.Rev.Inc.Palo Alto Calif.:* 639-72, 1970.

- Wajchenberg, L., Pereira, V.G., Pupo, A.A., Shraider, J., deU Cintra, A.B., Mattar, E.; *Diabetes* 13: 169, 1964.
- Walaas, O., Walaas, E.; *J.Biol.Chem.* 187: 769-76, 1950.
- Walaas, E.; *Acta Physiol.Scand.* 35: 109-25, 1955.
- Walaas, S.I., Horn, R.S., Adler, A., Albert, K.A., Walaas, O.; *FEBS Lett.* 220(2), 311-8, 1987.
- Wardzala, L.J., Cushman, S.W., Salans, L.B.; *J.Biol.Chem.* 253: 8002-8005, 1978.
- Wardzala, L.J., Jeanrenaud, B.; *J.Biol.Chem.* 256: 7090-93, 1981.
- Wardzala, L.J., Jeanrenaud, B.; *Biochim.Biophys.Acta* 730: 49-56, 1983.
- Watanabe, T., Smith, M.M., Robinson, F.W., Kono, T.; *J.Biol.Chem.* 259: 13117-22, 1984.
- Wheeler, T.J., Simpson, I.A., Sogin, D.C. Hinkle, P.C., Cushman, S.W.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 105: 89-95, 1982.
- White, M.F., Häring, H.U., Kasuga, M., Kahn, C.R.; *J.Biol.Chem.* 259: 255-264, 1984.
- White, M.F., Maron, R., Kahn, C.R.; *Nature* 318: 183-86, 1985.
- White, M.F., Shoelson, S.E., Keutmann, H., Kahn, C.R.; *J.Biol.Chem.* 263: 2969-2980, 1988.
- Wilden, P.A., Boyle, T.R., Swanson, M.L., Sweet, L.J., Pessin, J.E.; *Biochemistry* 25: 4381-4388, 1986.
- Wilden P.A., Backer, J.M., Kahn, C.R., Cahill, D.A., Schroeder, G.J., White, M.F.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 3358-62, 1990.
- Winter, C.G. i Christensen, H.N.; *J.Biol.Chem.* 240: 3594-3600, 1965.
- Wise, B., Glass, D.B., Jen Chou, C.K., Raynor, R.L., Katoh, N., Schatzman, R.C., Turner, R.S., Kibler, R.F., Kuo, J.F.; *J.Biol.Chem.* 257: 8489-95, 1982.
- Witters, L.A., Vater, C.A., Lienhard, G.E.; *Nature (London)* 315: 777-8, 1985.
- Wolf, M., LeVine, H., May, W.S, Cuatrecasas, P., Sahyoun, N.; *Nature* 317: 546-9, 1985.
- Wondergen, R., Harder, D.R.; *J.Cell.Physiol.* 102: 193-97, 1980.
- Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Castagna, M., Nishizuka, Y.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 112: 778-86, 1983.

- Yarden, Y., Ullrich, A.; *Ann.Rev.Biochem.* 57: 443-478, 1988.
- Yatani, A., Imoto, Y., Codina, J., Hamilton, S.L., Brown, A.M., Birnbaumer, L.; *J.Biol.Chem.* 263: 9887-95, 1988.
- Yip, C.C., Yeung, C.W.T., Moule, M.L.; *J.Biol.Chem.* 253: 1743-1745, 1978.
- Yip, C.C., Hsu, H., Patel, R.G., Hawley, D.M., Maddux, B.A., Goldfine, I.D.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 157: 321-329, 1988.
- Yu, K.-T., Czech, M.P.; *J.Biol.Chem.* 261: 4715-22, 1986.
- Yu, K.-T., Khalaf, N., Czech, M.P.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84: 3972-6, 1987.
- Zaninetti, D. Greco-Perotto, R., Assimacopoulos-Jeannet, F., Jeanrenaud, B.; *Biochem.J.* 250: 277-83, 1988.
- Zick, Y., Rees-Jones, R.W., Taylor, S.I., Gorden, P., Roth, J.; *J.Biol.Chem.* 259: 4396-4400, 1984.
- Zick, Y., Sagi-Eisenberg, R., Pines, M., Gierschik, P., Spiegel, A.M.; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 9294-7, 1986.
- Zierler, K.L.; *Science* 126: 1067-8, 1951.
- Zierler, K.L.; *Am.J.Physiol.* 197: 524-6, 1959.
- Zierler, K.L.; *Am.J.Physiol.* 198: 1066-70, 1960.
- Zierler, K.L., Rabinowitz, D.; *J.Clin.Invest.* 43: 950-62, 1964.
- Zoccoli, M.A., Baldwin, S.A., Lienhard, G.E.; *J.Biol.Chem.* 253: 6923-30, 1978.
- Zorzano, A., Balon, T.W., Garetto, L.P., Goodman, M.N., Ruderman, N.B.; *Am.J.Physiol.* 248 (Endocrinol.Metab. 11): E546-52, 1985.
- Zorzano, A., Balon, T.W., Goodman, M.N., Ruderman, N.B.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 134: 1342-49, 1986.
- Zorzano, A., Balon, T.W., Goodman, M.N., Ruderman, N.B.; *Am.J.Physiol.* 251 (Endocrinol.Metab. 14): 21-6, 1986a.
- Zorzano, A., James, D.E., Ruderman, N.B., Pilch, P.F.; *FEBS Lett.* 234(2): 257-62, 1988.
- Zorzano, A., Wilkinson, W., Kotliar, N., Thoidis, G., Wadzinski, B.E., Ruoho, A.E., Pilch, P.F.; *J.Biol.Chem.* 264: 12358-63, 1989.

