

**EFFECTES DE LA INSULINA, EL GLUCAGÓ
I LES CATECOLAMINES
SOBRE LA GLICOGENSINTASA
I LA GLICOGENFOSFORILASA D'HEPATÒCITS
DE RATA AÏLLATS**

Comunicació presentada el dia 1 de febrer de 1978
a les I Jornades d'Endocrinologia de la S.C.B.

per

JOAN MASSAGUÉ i JOAN GUINOVART

Càtedra de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona

INTRODUCCIÓ

La glicogensintasa i la glicogenfosforilasa són, respectivament, els enzims responsables directes de la formació i degradació de la mol·lècula de glicogen, el carbohidrat de reserva en els animals. Aquests enzims són regulats per canvis en llur grau de fosforilació o contingut de fosfat unit covalentment a la mol·lècula proteica. Les formes de la glicogensintasa actives fisiològicament són les no fosforilades (formes I), mentre que les més actives de la glicogenfosforilasa són precisament les fosforilades (formes a).

Els canvis en el grau de fosforilació poden ser induïts per la presència d'hormones a l'entorn cel·lular. Hormones com el glucagó i les catecolamines, altrament anomenades hormones glicogenolítiques, provoquen en molts teixits la fosforilació de la sintasa i de la fosforilasa mitjançant l'activació de proteïnaquinases, els enzims que catalitzen aquest pas. En conseqüència, la sintasa resulta inactivada i la fosforilasa activada. El resultat net de l'operació és la conducció del metabolisme del glicogen envers la seva degradació.

La insulina, al contrari, pot provocar el fenomen invers, és a dir, la pèrdua de fosfat lligat als enzims, per mecanismes encara mal coneguts. El resultat de l'acció de la insulina és l'increment de la síntesi de glicogen.

Al fetge, òrgan que té un paper cabdal en l'administració dels carbohidrats de l'organisme, l'efectivitat del control del metabolisme del glicogen per la insulina ha estat motiu de controvèrsia àmpliament debatut en els darrers anys. De fet, la majoria dels efectes sobre cèl·lules hepàtiques aïllades, el material més idoni per a aquests estudis, han estat observats en presència de glucosa, la qual és capaç per ella mateixa d'activar la glicogensintasa i d'inactivar la fosforilasa^{1,4}. Per exemple, l'activació de la sintasa per insulina en presència d'altres concentracions de glucosa s'ha descrit a partir d'experiments fets amb hepatòcits de rata incubats en medis complexos que contenien aminoàcids^{2,5}.

D'altra banda, cal destacar que observacions fetes per diferents autors^{6,7} van suggerir que, al fetge, l'acció de les catecolamines sobre el metabolisme de carbohidrats es duu a terme per un mecanisme independent de l'adenosinmonofosfat cíclic (AMP cíclic). Aquest nucleòtid es forma a l'interior de la cèl·lula si un senyal hormonal apropiat arriba a la superfície externa de la membrana. De bell antuvi se'l considerarà el misatger intracel·lular de les hormones que no penetren a la cèl·lula, i és el mateix nucleòtid qui desencadenaria la resta d'esdeveniments que en darrera instància provoquen la fosforilació dels enzims que en són susceptibles^{8,10}. El glucagó indueix efectivament la formació d'AMP cíclic al fetge^{11,12}. L'epinefrina, en canvi, tal com ha estat demostrat de manera concloent fa poc per EXTON i HARPER¹³ i per HUTSON i col·lab.¹⁴, no necessita induir la formació del nucleòtid per dur a terme els seus efectes en la cèl·lula hepàtica. Actua gairebé exclusivament a través dels receptors α -adrenèrgics que no estan relacionats amb la formació d'AMP cíclic, sinó que semblen lligats a canvis en la concentració intracel·lular de calci. L'acció a través dels receptors β -adrenèrgics relacionats amb la formació d'AMP cíclic és residual en el teixit hepàtic tal com ha estat demostrat pels autors esmentats.

En aquest treball presentem un estudi dels efectes del glucagó i de les catecolamines sobre la glicogensintasa i la glicogenfosforilasa en hepatòcits i oferim l'evidència de la disminució d'aquests efectes per la insulina en absència de glucosa.

MATERIALS I MÈTODES

Rates Wistar de 180-240 g de pes, alimentades amb dieta de laboratori ordinària, eren mantingudes en dejú durant 24 h abans de l'aïllament dels hepatòcits. Els hepatòcits s'aïllaren per una modificació del mètode de BERRY i FRIEND¹⁵ sense usar hialuronidasa en el medi de perfusió. La perfusió s'iniciava amb medi preparat segons HANKS, exempt de calci (pH 7,4, 38 °C) amb glucosa 5 mM, a una velocitat de flux de 40 ml/min. Des-

prés de perfondre amb 250 ml de medi s'afegia colagenasa fins una concentració final de 0,4 mg/ml i seroalbúmina bovina (fracció V) fins a una concentració final de 15 mg/ml. La perfusió amb colagenasa era mantinguda en forma recirculant durant 15 min. a una velocitat de flux de 60 ml/min. El fetge es retirava seguidament i es disgregava de forma suau també en medi de HANKS exempt de calci. La suspensió cel·lular resultant era rentada tres cops per processos de centrifugació ($60\times g$, 1 min.) i re-suspensió alternatiu, i era finalment resuspesa (1/12) en un medi bicarbonat preparat segons KREBS-RINGER (pH 7,4) exempt de glucosa i de qualsevol altre substrat, i prèviament gasejat amb O_2/CO_2 95/5. El 85 % d'aquestes cèl·lules exclouïen el blau de tripan després de la darrera resuspensió. Alíquotes (3,5 ml) d'aquesta suspensió (10^7 cels./ml) es col·locaven en vials tapats de 30 ml i s'incubaven en un bany d'aigua amb agitació (100 oscil·lacions per minut). Aquestes cèl·lules no contenien glicogen precipitable amb etanol. Al final de les incubacions amb hormones el contingut de cada vial era centrifugat ($3.000\times g$, 30 segons) i el sediment de cèl·lules era immediatament homogeneïtzat en un homogeneïtzador de POTTER-ELVEJHEM amb 250 μ l de medi a pH 7,0 que contenia KF 150 mM i EDTA 15 mM. Tot seguit eren assajades les activitats enzimàtiques i el contingut en proteïna. En els experiments en els quals es mesurà l'AMP cíclic, la suspensió cel·lular era precipitada amb àcid tricloracètic al 5 %.

L'activitat glicogensintasa va ser mesurada a 30 °C pel mètode de THOMAS i col·lab.¹⁶ i la de la glicogenfosforilasa pel de GILBOE i col·labs.¹⁷. La proteïna cel·lular va determinar-se pels mètodes de LOWRY i col·lab.¹⁸ o de GORNALL i col·lab.¹⁹. La concentració intracel·lular d'AMP cíclic es mesurà segons el mètode de GILMAN²⁰.

El glucagó, l'epinefrina (bitartrat), 1'L-fenilefrina (clorhidrat), el DL-propranolol (clorhidrat) i la seroalbúmina bovina (fracció V) procedien de Sigma Chemical Co. La insulina d'Ely Lilly Co. La fenoxibenzamina (clorhidrat) fou un obsequi de SMITH, KLINE & FRENCH, Labs. La colagenasa era de la Worthington Biochemical Corp.

RESULTATS

El glucagó produïa una clara disminució en l'activitat glicogensintasa I (fig. 1,A) i un increment en l'activitat glicogenfosforilasa α (fig. 1,B). Aquests efectes eren aparents a dosis de glucagó de 10^{-10} M. Dosis superiors produïen efectes més marcats i duraders.

Malgrat que la insulina no modificava de manera aparent els nivells basals de cap d'ambdues activitats enzimàtiques, els efectes de glucagó 3×10^{-10} M eren significativament reduïts en cèl·lules incubades

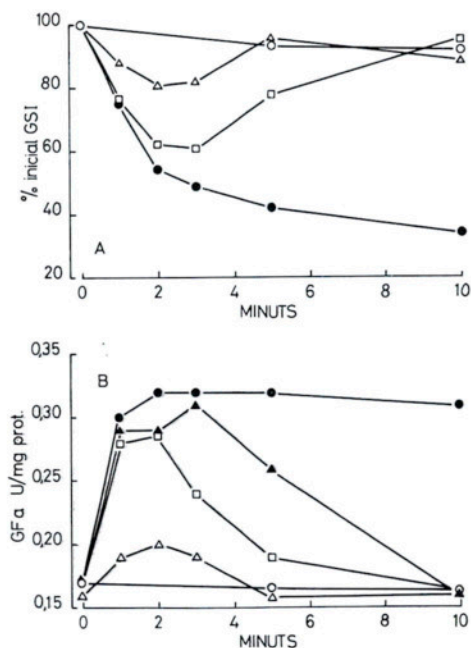


FIG. 1

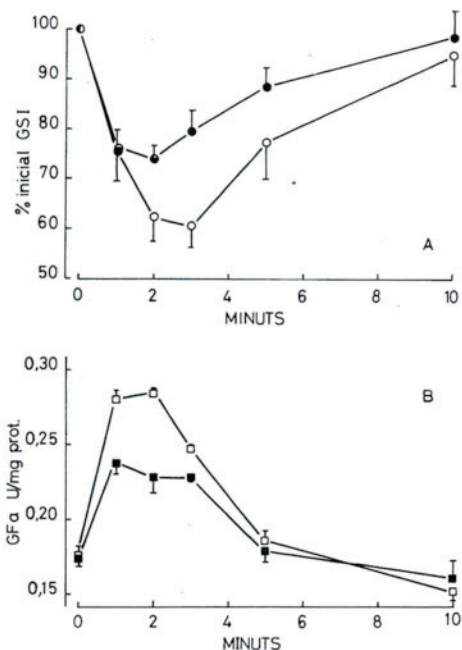


FIG. 2.

FIG. 1. — Efectes de diferents dosis de glucagó sobre la glicogensintasa I (A) i la glicogenfosforilasa *a* (B). Hepatòcits aïllats de rates dejunes foren pre-incubats 10 minuts a 37° C. Tot seguit s'afegiren les diferents dosis de glucagó i les incubacions es perllongaren els períodes de temps indicats. Cèl·lules control (○); cèl·lules incubades amb glucagó 10^{-10} M (△), 3×10^{-10} M (□), 10^{-9} M (▲) i 10^{-7} M (●). L'activitat de la sintasa I s'expressa com a percentatge de l'activitat I dels controls incubats sense hormones (% inicial I). L'activitat sintasa assajada amb glucosa-6-fosfat (activitat total) era $5,8 \pm 1,1$ mU/mg prot. Una unitat d'activitat enzimàtica és la quantitat d'enzim que transforma un mol de substrat per minut.

FIG. 2. — Contrarestació per la insulina dels efectes del glucagó sobre la glicogensintasa I (A) i la glicogenfosforilasa *a* (B). Els hepatòcits foren incubats 10 min. amb insulina 8×10^{-9} M (●) o sense insulina (○). Al final d'aquest període les cèl·lules es tractaren amb glucagó 3×10^{-10} M durant els períodes de temps indicats. Els resultats són la mitjana de quatre experiments \pm M.E.S. i s'expressen com a la figura 1.

prèviament amb insulina (fig. 2, A i B). Al tercer minut d'incubació amb glucagó sol, sense exposició prèvia a la insulina, la inactivació de la sintasa era màxima.

L'activitat basal de la forma I estava reduïda en un 40 % aproximadament. Als 10 minuts l'activitat tornava a ser gairebé la inicial. La resposta a la mateixa dosi de glucagó en cèl·lules prèviament incubades amb insulina 8×10^{-9} M durant 10 minuts, era marcadament més dèbil que la de les cèl·lules incubades sense insulina. En les tractades amb insulina l'activitat es recobrava ja al tercer minut d'incubació amb glucagó des-

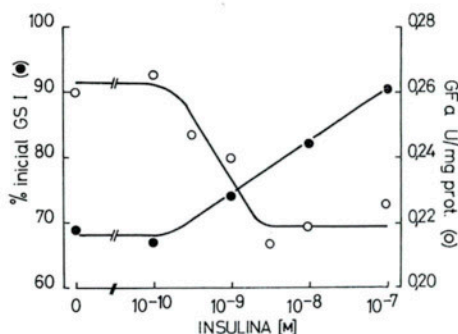


FIG. 3.

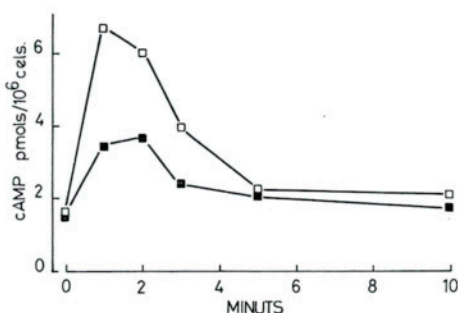


FIG. 4.

FIG. 3. — Relació dosi-dependència de l'efecte de la insulina sobre la glicogensintasa I (●) i la glicogenfosforilasa *a* (○) d'hepatòcits tractats amb glucagó. Les cèl·lules foren incubades 10 min. amb les dosis d'insulina indicades i a continuació es tractaren amb glucagó 3×10^{-10} M durant 3 min. (sintasa) o 1,5 min. (fosforilasa). Els resultats s'expressen com a la figura 1.

FIG. 4. — Efecte de la insulina sobre l'elevació dels nivells d'AMP cíclic causada pel glucagó. Els hepatòcits incubats 10 min. amb insulina 8×10^{-9} M (■) o sense insulina (□) es tractaren tot seguit amb glucagó 10^{-9} M durant els períodes de temps indicats. No s'observaren canvis en els valors d'AMP cíclic de cèl·lules no tractades al llarg del període d'incubació.

prés d'haver assolit un màxim decrement de tan sols el 25 % del valor original.

En els mateixos experiments es va mesurar l'activitat de la glicogenfosforilasa. L'activitat de la forma *a* de l'enzim era ràpidament incrementada per acció del glucagó, retornant al valor inicial a partir del segon minut d'incubació amb l'hormona. En les cèl·lules tractades prèviament amb insulina l'amplitud de la resposta de la fosforilasa al glucagó era aproximadament la meitat de la de cèl·lules no tractades amb insulina.

Aquests efectes de la insulina eren dependents de la dosi utilitzada. Cèl·lules tractades amb diferents dosis d'insulina foren incubades a continuació amb glucagó 3×10^{-10} M durant períodes de temps en els quals s'havien observat les màximes diferències entre cèl·lules tractades amb insulina i cèl·lules no tractades, en la primera sèrie d'experiments. En la figura 3 s'expressen els resultats obtinguts. Per a la sintasa la dosi d'insulina més baixa que causa un efecte 10^{-9} M mentre que en el cas de la fosforilasa era 3×10^{-10} M i una dosi de 3×10^{-9} M ja era saturant.

Els efectes del glucagó sobre la glicogensintasa i la fosforilasa anaven acompanyats d'un increment en els nivells d'AMP cíclic a l'interior de la cèl·lula. Quan els hepatòcits es tractaren amb insulina, l'increment d'AMP cíclic intracel·lular produït pel glucagó era solament la meitat del corresponent a cèl·lules no tractades (fig. 4).

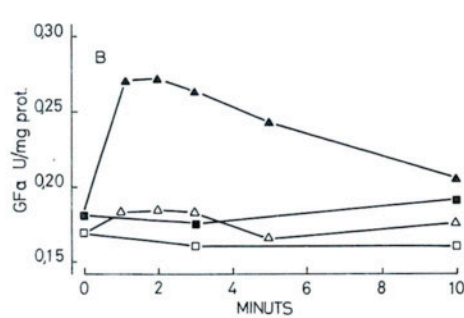
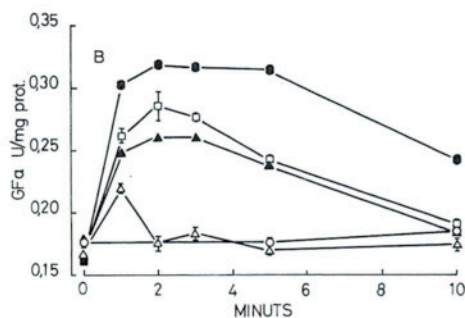
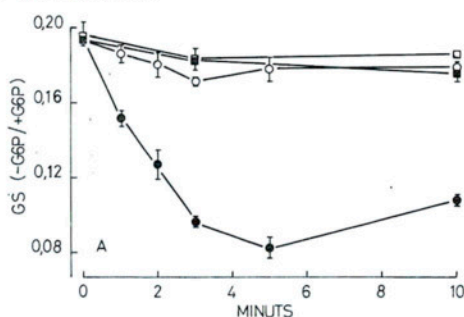
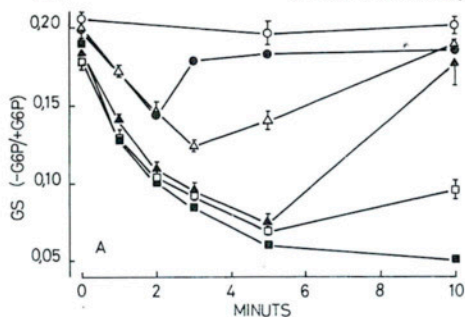


FIG. 5.

FIG. 6.

FIG. 5. — Efectes de diferents dosis d'epinefrina sobre la glicogensintasa (A) i la glicogenfosforilasa (B). Els hepatòcits aïllats de rata dejuna i pre-incubats 10 min. a 37 °C foren tractats a continuació amb epinefrina 10^{-5} M (■), 10^{-7} M (□), 6×10^{-8} M (▲), 10^{-8} M (△) i 6×10^{-9} M (●) o amb solució salina isotònica (○) per diferents períodes de temps. L'activitat glicogensintasa fou assajada en absència de glucosa-6-fosfat (activitat sintasa I) i en presència d'aquest activador de la forma D (activitat sintasa total) i s'expressa en forma de relació entre ambdós valors. L'activitat sintasa total, que es mantingué invariable al llarg dels períodes d'incubació, fou de $8,5$ mU/mg prot. Els resultats que s'expressen \pm M.E.S. són la mitjana de dos o tres experiments segons les dosis.

FIG. 6. — Bloqueig dels efectes de l'epinefrina sobre la glicogensintasa (A) i la glicogenfosforilasa a (B) per la fenoxibenzamina. Els hepatòcits foren incubats 10 min. amb fenoxibenzamina 10^{-5} M (□, ○, △) o sense aquest producte (■, ●, ▲), i a continuació foren tractats amb epinefrina 10^{-7} M (○, ●, △, ▲) o amb solució salina isotònica (□, ■). L'activitat sintasa total al llarg dels períodes d'incubació fou de $8,3 \pm 1,0$ mU/mg prot.

L'epinefrina modificava també les activitats de la glicogensintasa I i de la glicogenfosforilasa a en els hepatòcits a partir de dosis d'hormona de 6×10^{-9} M per la sintasa i de 10^{-8} M per la fosforilasa (fig. 5, A i B). Com en el cas del glucagó, el procés d'activació-retorn als nivells originals d'activitat fosforilasa era més ràpid que el corresponent procés d'inactivació-retorn de la sintasa. Aquests efectes de l'epinefrina no anaven acompanyats d'increments significatius en els nivells intracel·lulars d'AMP cíclic (dades no exposades).

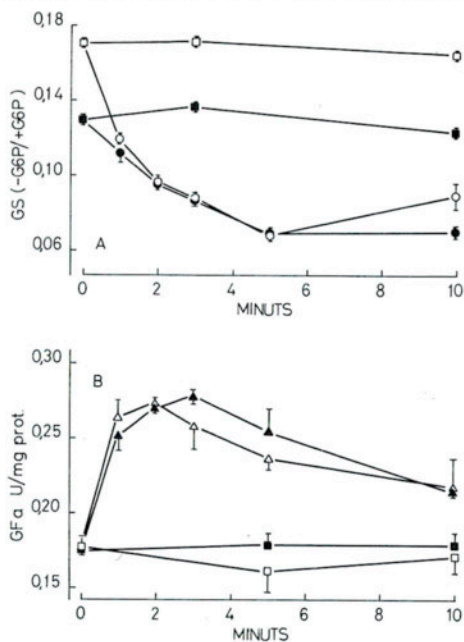


FIG. 7.

FIG. 7.— Efecte de l'epinefrina sobre la glicogensintasa (A) i la glicogenfosforilasa *a* (B) en presència de propanolol. Les cèl·lules incubades 10 min. amb DL-propanolol 2×10^{-5} M (■, ●, ▲) o en absència d'aquest producte (□, ○, △) foren tractades amb epinefrina 10^{-7} M (●, ○, ▲, △) o amb solució salina isotònica (■, □). L'activitat sintasa total al llarg dels períodes d'incubació fou de $8,5 \pm 1,0$ mU/mg prot. Els resultats són la mitjana de dos experiments \pm D.S.

La fenoxibenzamina, un compost amb acció bloquejant dels receptors α -adrenèrgics^{21, 22}, anul·lava els efectes de l'epinefrina sobre la sintasa i la fosforilasa. Les activitats basals d'ambdós enzims no eren modificades significativament per una dosi de 10^{-7} M d'epinefrina quan les cèl·lules eren incubades prèviament amb una dosi de 10^{-5} M de fenoxibenzamina durant 10 minuts (fig. 6, A i B). Els efectes de la mateixa dosi d'epinefrina, en canvi, no eren alterats quan les cèl·lules es tractaven durant 10 minuts amb una dosi de 10^{-5} M de L-propanolol (2×10^{-5} M DL-propanolol) que és un compost amb acció bloquejant dels receptors β -adrenèrgics^{23, 24} (fig. 7, A i B). El DL-propanolol tenia la capacitat de rebaixar lleugerament el valor inicial de l'activitat glicogensintasa I, però aquest efecte no es va fer additiu al de l'epinefrina quan ambdós productes es trobaven junts en el medi d'incubació (fig. 7,A). No s'observaren diferències significatives entre l'activitat glicogenfosforilasa *a* de cèl·lules control incubades amb DL-propanolol 2×10^{-5} M i la de controls incubats sense aquest producte (fig. 7,B).

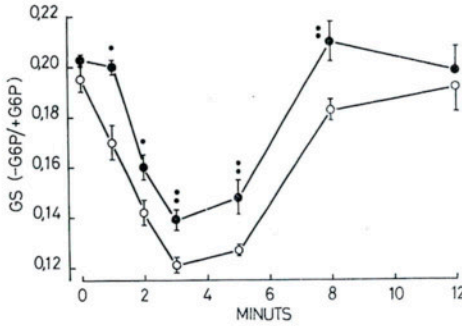


FIG. 8.

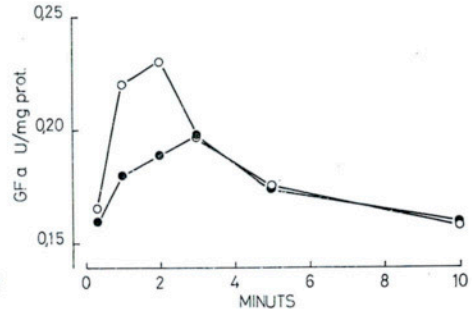


FIG. 9.

FIG. 8.— Contrarestració de l'efecte de l'epinefrina sobre la glicogensintasa per la insulina. Els hepatòcits foren tractats durant 10 min. amb insulina 10^{-7} M (●) o sense insulina (○). Tot seguit s'afegí epinefrina 10^{-8} M i les incubacions es perllongaren durant els períodes de temps indicats. L'activitat glicogensintasa total al llarg dels experiments fou de $7,8 \pm 1,2$ mU/mg prot. Els resultats són la mitjana de sis experiments \pm M.E.S. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$.

FIG. 9.— Efecte de la insulina sobre la glicogenfosforilasa α d'hepatòcits incubats amb epinefrina. Les condicions foren les mateixes que en la figura 8 excepte que la dosi d'epinefrina utilitzada fou de 2×10^{-8} M.

L'acció de l'epinefrina sobre la glicogensintasa era disminuïda significativament quan les cèl·lules es tractaven amb insulina. En la figura 8,A es presenta la inactivació de la sintasa per una dosi d'epinefrina de 10^{-8} M en cèl·lules pre-incubades sense insulina i en cèl·lules pre-incubades 10 minuts amb una dosi de 10^{-7} M d'insulina. De manera semblant, l'activació de la fosforilasa per una dosi de 2×10^{-8} M d'epinefrina estava reduïda aproximadament a la meitat quan les cèl·lules es tractaven prèviament amb insulina (fig. 9).

La fenilefrina, un efector α -adrenèrgic pur^{25, 26} presentava una acció sobre la sintasa i la fosforilasa molt semblant a la de l'epinefrina, malgrat que les concentracions necessàries per a obtenir efectes d'intensitat similars als de l'epinefrina havien de ser un ordre de magnitud més elevades.

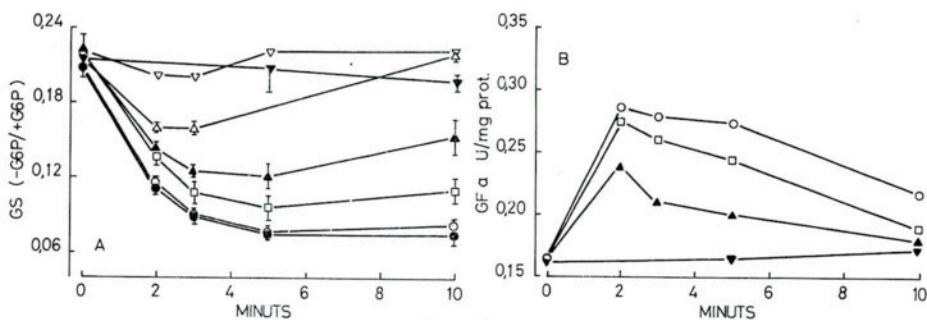


FIG. 10.

FIG. 10. — Efectes de la fenilefrina sobre la glicogensintasa (A) i la glicogenfosforilasa a (B) en hepatòcits procedents de rata dejuna. Les incubacions es dugueren a terme amb les següents dosis de fenilefrina: 10^{-4} M (●), 10^{-5} M (○), 3×10^{-6} M (□), 10^{-6} M (▲), 3×10^{-7} M (△) i 10^{-7} M (▽), i amb solució salina isotònica (▼). Per a la glicogensintasa els resultats són la mitjana \pm M.E.S. de dues a vuit dades segons les dosis. El valor de l'activitat sintasa total al llarg dels períodes d'incubació fou de $9,1 \pm 0,8$ mU/mg prot.

En la figura 10,A es presenten els efectes de diferents dosis de fenilefrina sobre la sintasa. La mínima dosi que causava un efecte sobre aquest enzim era de 3×10^{-7} M i dosis superiors a 10^{-5} M ja es comportaven com a saturants. La glicogenfosforilasa era activada també per aquest efector (fig. 10,B).

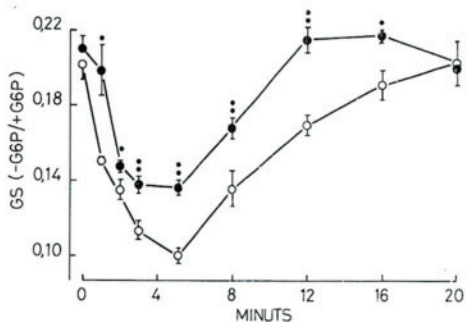


FIG. 11.

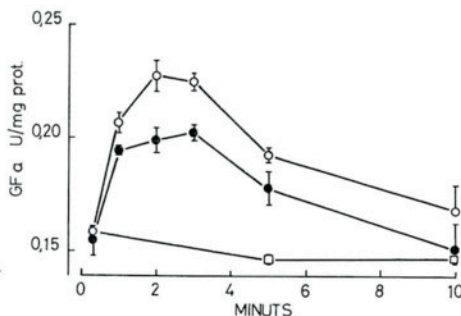


FIG. 12.

FIG. 11. — Efecte de la insulina sobre la glicogensintasa d'hepatòcits incubats amb fenilefrina. Les cèl·lules foren tractades amb insulina 10^{-7} M (●), o sense insulina (○), durant 10 min. i tot seguit amb fenilefrina 10^{-6} M. El valor de l'activitat sintasa total fou de $7,6 \pm 0,4$ mU/mg prot. al llarg de les incubacions. Els resultats són la mitjana \pm M.E.S. de cinc experiments. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

FIG. 12. — Contrarestació per la insulina de l'efecte de la fenilefrina sobre la glicogenfosforilasa a. Els hepatòcits foren tractats com en la figura 11, excepte que la dosi de fenilefrina utilitzada fou de 2×10^{-6} M. Les dades són la mitjana de dos experiments.

Els efectes de la fenilefrina eren contrarestats per preincubació de les cèl·lules amb insulina. La inactivació de la glicogensintasa per fenilefrina en cèl·lules pre-incubades amb 10^{-7} M insulina durant 10 minuts era molt més reduïda en amplitud i durada que la inactivació produïda per la mateixa dosi de fenilefrina en cèl·lules pre-incubades sense insulina (fig. 11). La mateixa reducció d'efectes de la fenilefrina per la insulina s'observava en l'activació de la fosforilasa per una dosi de 2×10^{-6} M de fenilefrina (fig. 12).

DISCUSSIÓ

Les dades presentades donen suport a la possibilitat que el metabolisme hepàtic del glicogen sigui controlat per la insulina, tal com ja havia estat suggerit anteriorment per LARNER i collab.^{27, 28} a partir d'estudis realitzats en fetges de rata perfosos amb insulina. Segons els resultats que aquí es presenten, la insulina contraresta els efectes del glucagó i de les catecolamines sobre la glicogensintasa i la glicogenfosforilasa hepàtiques en absència de glucosa.

Els experiments amb glucagó proven la capacitat de l'hormona per disminuir l'activitat inicial de la glicogensintasa I. Fins ara aquest efecte estava mal documentat. HUSTON i collab.¹⁴ havien pogut observar efectes clars en hepatòcits de rata alimentada, únicament després que la forma I fos elevada previ tractament amb glucosa. Les observacions que es presenten sobre un efecte del glucagó, àdhuc partint de valors baixos d'activitat sintasa I poden estar relacionades amb el fet que han estat utilitzats animals en dejú.

Els resultats exposats confirmen també que les catecolamines actuen mitjançant els receptors α -adrenèrgics, i no els β -adrenèrgics, per dur a terme llurs accions sobre la glicogensintasa i la glicogenfosforilasa en el fetge. Cal acceptar, doncs, que al fetge l'AMP cíclic no és indispensable per a desencadenar els mecanismes intracel·lulars que provoquen en última instància la fosforilació d'enzims interconvertibles com els del metabolisme del glicogen. El fet que la insulina contraresti tant els efectes no mediatitzats per AMP cíclic com els dependents del nucleòtid representa un canvi envers el punt de vista clàssic de com la insulina interactua en el metabolisme del glicogen. Fins fa poc, la proteïna quinasa dependent d'AMP cíclic ha estat considerada com el primer objectiu de l'acció de la insulina i s'ha suggerit que l'hormona l'afectaria sia per descens de la concentració d'AMP cíclic²⁹, sia per un canvi en la sensibilitat de la proteïna quinasa per al nucleòtid.³⁰ Si acceptem que l'AMP cíclic i la proteïna quinasa dependent d'ell no participen en el mecanisme de l'activa-

ció α -adrenèrgica de la glicogenòlisi en hepatòcits de rata ³¹, aleshores cal cercar una nova explicació de com la insulina pot contrarestar aquests efectes.

KEPPENS i col·lab. ³² i ASSIMACOPOULOS i col·lab. ³³ han proposat que el calci és el segon missatger per a les hormones glucogenolítiques que no actuen a través de la formació d'AMP cíclic en l'interior de la cèl·lula. També han suggerit que la fosforilasa quinasa activable per calci en seria l'objectiu immediat. Ara bé, aquesta quinasa no té capacitat per fosforilar la sintasa ³⁴. Caldria en aquest cas pensar en una sintasa quinasa activable per calci directament o indirecta, o en una sintasa fosfatasa inhibible per l'ió. De fet ja s'ha postulat un paper del calci en l'acció de la insulina ^{35, 36}. A més de tot això, cal no menysprear la possibilitat de l'existència d'efectes de la insulina directament sobre enzims regulats per calci o, fins i tot, sobre la glicogensintasa.

En conclusió, doncs, és potser el moment d'una reavaluació general dels mecanismes que intervenen en la regulació hormonal del metabolisme hepàtic del glicogen.

AGRAÏMENTS

J. Massagué es beneficia d'una beca del «Plan de Formación de Personal Investigador» del MEC i J. J. Guinovart d'una beca de la «Fundació Pedro i Pons», de Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

1. GLINSMANN, W. H., PAUK, G. i HERN, E. P. — «Biochem. Biophys. Res. Comm.», 39: 774-782 (1970).
2. WITTEBS, L. A., ALBERICO, L. i AVRUCH, J. — «Biochem Biophys. Res. Commun.», 69: 997-1003 (1976).
3. BUSCHIAZZO, H., EXTON, J. H. i PARK, C. R. — «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 65: 383-387 (1970).
4. HUE, L., BONTEMPS, F. i HERS, H. G. — «Biochem. J.», 152: 105-114 (1975).
5. AKPAN, J. O., GARDNER, R. i WAGLE, S. R. — «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 69: 222-229 (1974).
6. SHERLINE, P., LYNCH, A. i GLINSMANN, W. H. — «Endocrinology», 91: 680-690 (1972).
7. TOLBERT, M. E. M., BUTCHER, F. R. i FAIN, J. N. — «J. Biol. Chem.», 248: 5686-5692 (1973).
8. RALL, T. W. i SUTHERLAND, E. W. — «J. Biol. Chem.», 232: 1065-1076 (1958).
9. RALL, T. W., SUTHERLAND, E. W. i BERTHET, J. — «J. Biol. Chem.», 224: 463-475 (1957).
10. ROSELL PÉREZ, M. i LARNER, J. — «Biochemistry», 3: 75-81 (1964).
11. EXTON, J. H., ROBISON, G. A., SUTHERLAND, E. W. i PARK, C. R. — «J. Biol. Chem.», 246: 6166-6177 (1971).
12. JOHNSON, M. E. M., DAS, N. M., BUTCHER, F. R. i FAIN, J. N. — «J. Biol. Chem.», 247: 3228-3235 (1972).
13. EXTON, J. H. i HARPER, S. C. — «Adv. Cyclic Nucleotide Res.», 5: 519-532 (1975).

14. HUTSON, N. J., BRUMLEY, F. T., ASSIMACOPOULOS, F. D., HARPER, S. i EXTON, J. H. — «J. Biol. Chem.», 251: 5200-5208 (1976).
15. BERRY, H. N. i FRIEND, D. S. — «J. Cell. Biol.», 43: 506-520 (1969).
16. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K. i LARNER, J. — «Anal. Biochem.», 25: 486-499 (1968).
17. GILBOE, D. P., LARSON, K. L. i NUTTALL, F. Q. — «Anal. Biochem.», 47: 20-27 (1972).
18. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. i RANDALL, R. J. — «J. Biol. Chem.», 193: 265-275 (1951).
19. GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. S. i DAVID, H. M. — «J. Biol. Chem.», 177: 751 (1949).
20. GILMAN, A. G. — «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 67: 305-312 (1970).
21. NICKERSON, M. i GOODMAN, L. S. — «J. Pharmac. exp. Ther.», 89: 167-185 (1947).
22. GIUDICELLI, Y., AGLI, B., BRULLE, D. i NORDMANN, R. — «FEBS Lett.», 83: 225-230 (1977).
23. POWELL, C. E. i SLATER, I. H. — «J. Pharmac. exp. Ther.», 122: 480-488 (1958).
24. BIRNBAUM, M. J. i FAIN, J. N. — «J. Biol. Chem.», 252: 528-535 (1977).
25. BARGER, G. i DALE, H. H. — «J. Physiol. Lond.», 41: 19-59 (1910).
26. VAN DE WERBE, G., HUE, L. i HERS, H. G. — «Biochem. J.», 162: 135-142 (1977).
27. MILLER, T. B. i LARNER, J. — «J. Biol. Chem.», 248: 3483-3488 (1973).
28. MILLER, T. B., HAZEN, R. i LARNER, J. — «Biochem. Biophys. Res. Commun.», 53: 466-474 (1973).
29. SODERLING, T. R., CORBIN, J. D. i PARK, C. R. — «J. Biol. Chem.», 248: 1822-1829 (1973).
30. SHEN, L. C., VILLAR PALASÍ, C. i LARNER, J. — «Physiol. Chem. Phys.», 2: 536-544 (1970).
31. CHERRINGTON, A. D., ASSIMACOPOULOS, F. D., HARPER, S. C., CORBIN, J. D., PARK, C. R. i EXTON, J. H. — «J. Biol. Chem.», 251: 5209-5218 (1976).
32. KEPPENS, S., VANDENHEEDE, J. R. i DE WULF, H. — «Biochem. Biophys. Acta», 496: 448-457 (1977).
33. ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. D., BLACKMORE, P. F. i EXTON, J. H. — «J. Biol. Chem.», 252: 2662-2669 (1977).
34. FRIEDMAN, D. L. i LARNER, J. — «Biochemistry», 4: 2261-2264 (1965).
35. KISSEBAH, A. H., VYDELINGUM, N., TULLOCH, B. R., HOPE-GILL, H. i FRASER, T. R. — «Horm. Metab. Res.», 6: 247-255 (1974).
36. KISSEBAH, A. H., TULLOCH, B. R., VYDELINGUM, N., HOPE-GILL, H., CLARKE, P. i FRASER, T. R. — «Horm. Metab. Res.», 6: 357-364 (1974).