

Universitat de Barcelona

Estudio de la regulación del metabolismo hidrocarbonado
durante la regeneración hepática



Tesis presentada por
Jose Luis Rosa López
para optar al grado de Doctor
en Ciencias Químicas

Capítulo 4: Estudio de la expresión génica de los enzimas reguladores de la glucólisis/gluconeogénesis durante la regeneración hepática

La producción y utilización de la glucosa hepática, centrándonos en la glucólisis y la gluconeogénesis, implica el movimiento de sustratos a través de tres ciclos principales (Fig. 4.1). La dirección y la magnitud de este movimiento están controladas por enzimas cuyas actividades están moduladas por mecanismos de acción rápida y lenta. La regulación rápida del metabolismo de la glucosa ocurre por cambios en la actividad enzimática mediada por hormonas, principalmente la fosforilación y defosforilación de dos enzimas claves, L-PK y PFK-2/FBPasa-2, y la regulación de la PFK-1 y FBPasa-1 por Fru-2,6-P₂ (Pilkis y El-Maghrabi, 1988). Las hormonas también producen efectos de acción más lenta en el tiempo en el metabolismo de la glucosa mediante cambios en la velocidad de síntesis de los enzimas. Estos efectos lentos suelen estar producidos por alteraciones en la velocidad de síntesis de los ARNm y, en algunos casos, por cambios en la velocidad de degradación de estos ARNm (Granner y Pilkis, 1990).

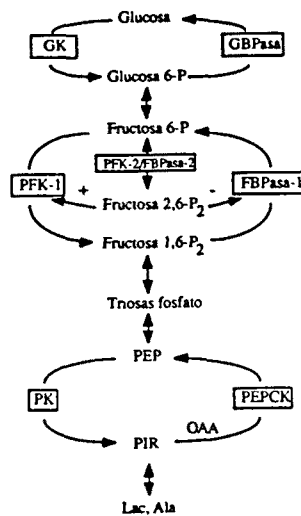


Fig. 4.1. Ciclos de sustratos implicados en la glucólisis/gluconeogénesis.

Adaptada de Granner y Pilkis (1990). PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; OAA, oxalacetato; Lac, lactato; Ala, alanina.

El flujo neto a través de los ciclos de sustrato: glucosa/glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato y fosfoenolpiruvato/piruvato depende de la actividad relativa de los enzimas ilustrados en la figura 4.1. En una situación en que la gluconeogénesis está favorecida como es después de una hepatectomía parcial, se ha descrito un incremento de la actividad PEPCK (Katz, 1979) y un coordinado descenso de laa actividades L-PK (Bonney *et al.*, 1973) y GK (Bonney *et al.*, 1973; Schofield *et al.*, 1986; Fig. 3.5). Nosotros hemos

demostrado que los niveles de Fru-2,6-P₂ rápidamente disminuyen post-hepatectomía (Fig. 2.4). Esta molécula regula las actividades PFK-1 y FBPasa-1 de una manera opuesta (Fig. 4.1) por lo que es de esperar que la actividad PFK-1 esté disminuída y la FBPasa-1 aumentada en la situación *in vivo*, puesto que no se han encontrado cambios en sus actividades en condiciones de V_{máx} (Katz, 1979). Esta situación produciría, además, una disminución de los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato que inhibirían a la actividad L-PK tanto alostéricamente como por fosforilación del enzima, puesto que la ausencia de fructosa 1,6-bisfosfato favorece la fosforilación de L-PK por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Pilkis *et al.*, 1990). Hemos demostrado que la rápida disminución de la concentración de Fru-2,6-P₂ es debida principalmente a la fosforilación del enzima (Rosa *et al.*, 1990) y que posteriormente hay una regulación de los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} (Fig. 3.18 y 3.20) a nivel transcripcional (Fig. 3.22), además del cambio en las características cinéticas del enzima (Rosa *et al.*, 1990). Ningún dato se había descrito sobre los niveles de ARNm de los demás enzimas reguladores de estos ciclos de sustrato durante la regeneración hepática, por este motivo decidimos analizarlos y observar si correlacionaban con la actividades previamente descritas.

1. Análisis del contenido de ARNm de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis

Los niveles de los ARNm de la GK, L-PK, FBPasa-1 y PEPCK fueron analizados durante la regeneración hepática mediante la técnica de *Northern Blot*. Los valores fueron corregidos por la cantidad de ARNm de la albúmina que fue usado como control de la cantidad aplicada (Petropoulos *et al.*, 1983; Sobczak *et al.*, 1989). En la figuras 4.2 y 4.3 se puede observar el descenso a las 6 h post-hepatectomía de los niveles del ARNm de la GK a un 20 % de su valor control. A partir de las 12 h los niveles del ARNm^{GK} aumentaron y se normalizaron a las 24 h. Los niveles del ARNm^{L-PK} decrecieron después de la hepatectomía parcial alcanzando un mínimo (15 %) alrededor de las 36 h. A partir de este tiempo los niveles aumentaron lentamente, no recuperándose hasta las 168 h. Estos perfiles son concordantes con el descenso de las actividades GK y L-PK descritas durante la regeneración hepática (Bonney *et al.*, 1973; Schofield *et al.*, 1986; Rosa *et al.*, 1990). Los niveles del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} siguieron el perfil previamente descrito (Fig. 3.18 y 3.20).

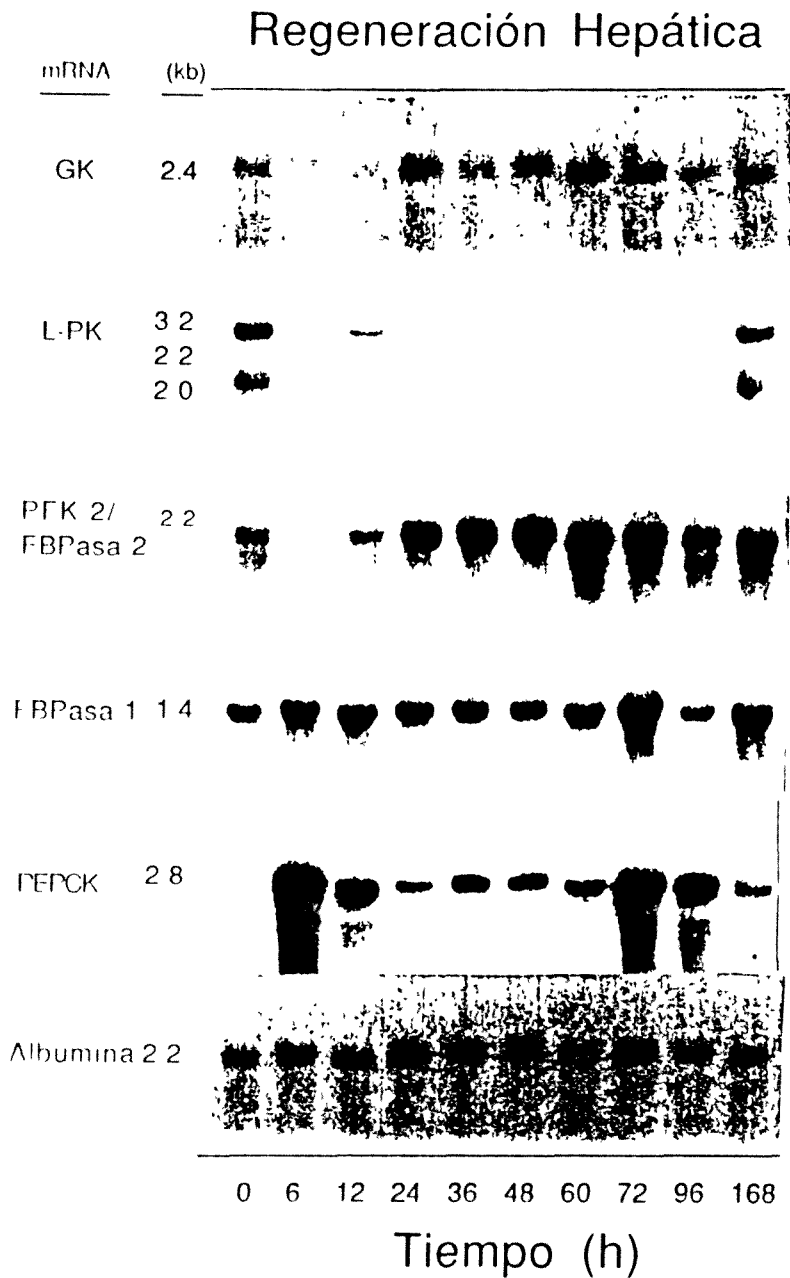


Fig. 4.2. Expresión génica de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa et al. (1991b). .Esta figura muestra Northern blots representativos con la indicación del tamaño de los ARNm. Para más información ver la leyenda de la fig. 4.3. Pueden identificarse, con la sonda utilizada, tres ARNm de la L-PK con diferente longitud en la cola poli-A (3.2, 2.2 y 2.0 kb). Sin embargo, se observa una variación similar lo que sugiere que tienen la misma estabilidad coincidiendo con los resultados de Vaultont et al. (1986) .

ARNm	Regeneración hepática (% control)										
	0	6	12	24	36	48	60	72	96	168	
GK	100	21	18	102	59	139	86	90	96	160	
L-PK	100	10	15	10	9	10	14	27	41	92	
PFK-2/FBPasa-2	100	8	78	182	334	393	394	207	165	228	
FBPasa-1	100	117	94	96	115	101	95	129	92	168	
PEPCK	100	1300	776	496	680	540	620	1300	1200	760	

Fig. 4.3. Expresión génica de los enzimas reguladores de la glucólisis/gluconeogénesis durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa et al. (1991b). ARN total (20 μ g/carril) extraído de hígados de rata normal (0 h) y regenerante a diferentes tiempos fue transferido a una membrana de nylon después de una electroforesis en agarosa al 1.5 %, e hibridizado con diferentes sondas (GK, L-PK, PFK-2/FBPasa-2, FBPasa-1 y albúmina). Los niveles de los ARNm fueron medidos mediante densitometría láser y corregidos por la cantidad del ARNm de la albúmina. Los valores representan el promedio de 3-4 experimentos diferentes. Northern blots representativos se muestran en la fig. 4.2.

Al contrario de lo que sucede con los niveles de los ARNm de los enzimas glucolíticos, los niveles de ARNm^{PEPCK} aumentaron 13 veces respecto a los animales control a las 6 h post-hepatectomía, permaneciendo elevados durante todo el proceso regenerativo. Estos resultados son concordantes con la activación transcripcional que habíamos descrito anteriormente (Fig. 3.22) y coincidentes con los encontrados por Mhon *et al.* (1990) al identificar al gen de la PEPCK como un *immediate-early gene* durante la regeneración hepática. Además, el incremento de los niveles de ARNm^{PEPCK} podría explicar el aumento de la actividad PEPCK descrita por Katz (1979). Los niveles de ARNm del otro enzima gluconeogénico, FBPasa-1, no se modificaron lo que podría también explicar la ausencia de cambios en la actividad enzimática (Katz, 1979).

El comportamiento de los enzimas glucolíticos GK, L-PK y PFK-2/FBPasa-2 fue opuesto al enzima gluconeogénico PEPCK durante la fase prereplicativa de la regeneración

hepática, mostrando un perfil similar en los niveles respectivos de ARNm. En el estado replicativo (>12 h post-hepatectomía) se encontraron diferencias en los niveles de ARNm^{L-PK}, que se recuperaron más tarde (168 h). Esta tardía recuperación del contenido de ARNm^{L-PK} y los elevados niveles de ARNm^{PEPCK} encontrados durante este período podrían estar relacionados con la hipótesis de que la glucogenogénesis estuviera funcionando mediante la ruta indirecta, siendo la mayor parte del glucógeno depositado en el hígado de origen gluconeogénico (Rosa *et al.*, 1990).

2. Efecto del estrés en los niveles de ARNm de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis

Observando los resultados descritos anteriormente, parece claro que es durante las primeras horas post-hepatectomía cuando se producen los mayores cambios en los niveles de ARNm. Para estudiar con más detalle esta fase analizamos el ARN extraído de los hígados de rata a diferentes tiempos durante las primeras 24 h post-hepatectomía, mediante la técnica de Northern blot. Alguien podría comentar que las variaciones observadas en los niveles de ARNm durante estas horas son debidas a un efecto del estrés quirúrgico o anestésico, más que a un efecto provocado por la hepatectomía parcial. Por este motivo analizamos también el ARNm extraído de los hígados de ratas laparotomizadas. En las figuras 4.4 y 4.5 se observa como los niveles de ARNm de los diferentes enzimas de los animales hepatectomizados siguieron una variación similar a la observada previamente (Fig. 4.2 y 4.3). En los animales laparotomizados, los ARNm de los enzimas también mostraron variaciones en sus niveles por efecto del estrés. Siendo, en general, las variaciones más pronunciadas en los animales regenerantes que en los laparotomizados.

ARNm	Regeneración hepática (% control)									
	Hep	100	51	46	127	96	18	18	274	102
GK	Lap	100	96	75	79	26	20	71	868	108
	Hep	100	31	73	74	100	72	15	11	10
L-PK	Lap	100	96	112	52	126	50	33	37	52
	Hep	100	92	88	72	40	36	78	93	182
PFK-2/FBPasa-2	Lap	100	86	93	126	171	78	80	78	85
	Hep	100	118	116	106	101	112	94	99	96
FBPasa-1	Lap	100	94	138	102	147	252	186	227	105
	Hep	100	758	913	737	672	608	776	310	496
PEPCK	Lap	100	320	660	600	100	630	360	140	400
			0	0.5	1	2	4	8	12	16

Tiempo (h)

Fig. 4.4. Efecto del estrés en la expresión génica de los enzimas reguladores de la glucólisis/gluconeogénesis después de una hepatectomía parcial.

Adaptada de Rosa et al. (1991b). ARN total (20 µg/carril) extraído de hígados de rata normal (0 h) y regenerante a diferentes tiempos fue transferido a una membrana de nylon después de una electroforesis en agarosa al 1.5 %, e hibridizado con diferentes sondas (GK, L-PK, PFK-2/FBPasa-2, FBPasa-1 y albúmina). Los niveles de los ARNm fueron medidos mediante densitometría láser. Northern blots representativos se muestran en la fig. 4.5.

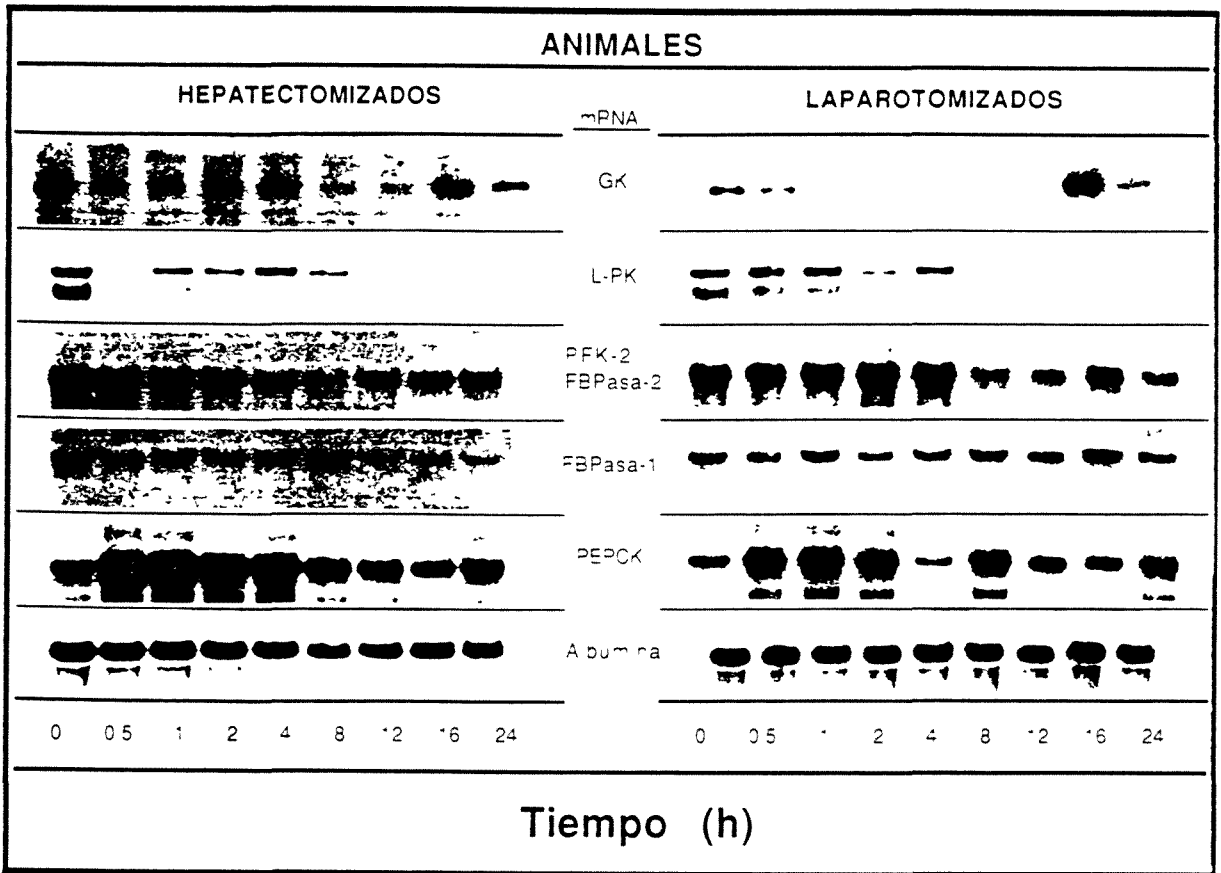


Fig. 4.5. Expresión génica de los enzimas reguladores de la glucolisis/ gluconeogénesis durante la regeneración hepática.

Adaptada de Rosa et al. (1991b). Esta figura muestra unos Northern blots representativos. Para más información ver la leyenda de la fig. 4.4.

En general, los cambios descritos en las actividades de los enzimas reguladores de la glucolisis/gluconeogénesis (Katz, 1990; Bonney *et al.*, 1973; Schofield *et al.*, 1986; Rosa *et al.*, 1990) correlacionan con los niveles de ARNm detectados (Fig. 4.2 a 4.5). Estos datos sugieren que diversas hormonas, factores de crecimiento y neuromediadores, presumiblemente actuando de una manera sinérgica, regulan la expresión de estos genes durante la regeneración hepática (Fausto y Mead, 1989; Michalopoulos, 1990).

Capítulo 5: Estudio de la acción del glucagón
sobre el sistema de la Fru-2,6-P₂

En el capítulo anterior habíamos hipotetizado que durante la fase pre-replicativa de la regeneración hepática el aumento de los niveles de cAMP y el descenso de los de insulina inducirían el rápido aumento del contenido de ARNm de los enzimas gluconeogénicos y reprimirían el de los enzimas glucolíticos. Tanto el glucagón como las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) producen un aumento de los niveles de cAMP en el hígado (Exton y Park, 1966 y 1968) y ambas hormonas se incrementan rápidamente en el plasma de los animales hepatectomizados (Morley *et al.*, 1975; Bucher y Weir, 1976; Leffert *et al.*, 1979; Cruise *et al.*, 1987), siendo probablemente las responsables del aumento del contenido de cAMP durante la regeneración hepática. Estas hormonas, además de regular la expresión génica de los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos, pueden actuar rápidamente sobre la actividad de estos enzimas mediante fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP, y la variación del contenido de Fru-2,6-P₂ (Pilkis *et al.*, 1988 y 1990). Para intentar demostrar que muchos de los efectos observados en los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos después de una hepatectomía parcial son debidos a un efecto hormonal, hemos administrado a los animales glucagón intraperitonealmente y hemos analizado las variaciones en el sistema de la Fru-2,6-P₂ (metabolito, enzima, ARNm, transcripción y estabilidad).

1. El glucagón mimetiza los efectos de las primeras horas post-hepatectomía parcial

El primer objetivo fue reproducir una situación similar a la encontrada en las primeras horas post-hepatectomía parcial. En la figura 5.1 se pueden observar las variaciones de los niveles de Fru-2,6-P₂, del cociente de actividades PFK-2 (*activa/total*) y de la actividad PFK-2 *total* durante las primeras cuatro horas post-hepatectomía parcial. Nosotros hemos conseguido reproducir una situación similar administrando glucagón intraperitonealmente con una dosis de 1mg/Kg (Fig. 5.1). Se puede apreciar como el metabolito rápidamente disminuye debido probablemente a la fosforilación del enzima. Además, se observa una rápida disminución del contenido de enzima bifuncional durante los primeros 15 min, recuperándose a valores control después de este tiempo. Como control de que los efectos observados tan rápidamente (5 min) no fueran una consecuencia del posible estrés producido por la manipulación de los animales en la administración del glucagón, analizamos durante los primeros 15 min el hígado de animales que habíamos manipulado de una manera similar y a los que habíamos inyectado NaCl a una concentración fisiológica (0.9 %). Los resultados obtenidos demuestran que no hay variaciones significativas con respecto a los animales control (0 h) en ninguno de los parámetros analizados (Fig. 5.1), por lo que

podemos concluir que los efectos observados son debidos a la administración de glucagón. Estos efectos fueron transitorios recuperándose el contenido de Fru-2,6-P₂ a las 4 h de la administración, en paralelo a la desfosforilación del enzima bifuncional.

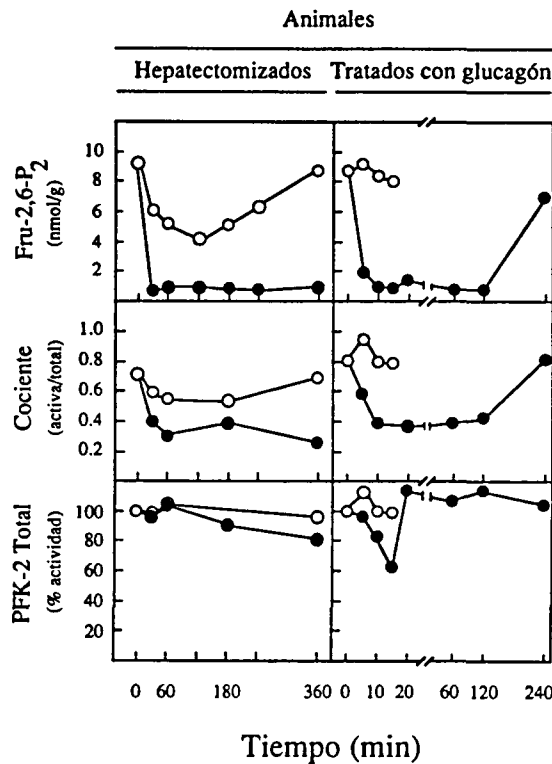


Fig. 5.1. El glucagón mimetiza los efectos de las primeras horas post-hepatectomía sobre el sistema de la Fru-2,6-P₂.

La metodología empleada es la descrita en Rosa et al. (1990 y 1991a). Los círculos rellenos representan los animales hepatectomizados o tratados con glucagón (1mg/Kg); los círculos abiertos los animales control: laparotomizados o inyectados con NaCl (0.9 %). Cociente significa la relación de actividades PFK-2: activa/total. Los valores son el promedio de 2-12 animales. Las desviaciones han sido omitidas para una mejor visualización. El 100% actividad PFK-2 total fue de 8 mU/g en los experimentos de regeneración y 0.15 mU/mg prot. en los experimentos con glucagón.

Los efectos del glucagón sobre los niveles de Fru-2,6-P₂ y la fosforilación de la PFK-2, anteriormente comentados, ya fueron descritos por Van Schaftingen *et al.* (1980). La disminución de la actividad PFK-2 *total* durante los primeros 15 min podría reflejar la cantidad de enzima presente. Esta disminución podría estar relacionada con la disminución de la actividad PFK-2 y el contenido de enzima descritos durante el ayuno y la diabetes, situaciones donde se observan cambios en el cociente glucagón/insulina plasmático, y en donde se había descrito que el contenido de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} no se modificaba (Colosia

et al., 1988; Crepin *et al.*, 1988). Esto llevó a sugerir que mecanismos post-transcripcionales tales como la traducción del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}, la degradación del enzima o ambos mecanismos podrían estar modulados por el ayuno y la diabetes (Colosia *et al.*, 1988; Crepin *et al.*, 1988). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el contenido de PFK-2/FBPasa-2 y los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} disminuyen en la diabetes (Miralpeix *et al.*, 1992).

2. El glucagón modifica la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa-2

Habíamos descrito una disminución del contenido de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} durante las primeras horas de la hepatectomía parcial (Fig. 3.20 y 4.5) y habíamos postulado que esta disminución podría estar relacionada con el aumento de los niveles de cAMP. Para comprobar esta hipótesis realizamos el análisis, por *Northern blot*, del ARN extraído de los hígados a los que les habíamos administrado glucagón. En la figura 5.2 se puede observar como hay una clara disminución de los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} durante los primeros 15 min, recuperándose posteriormente. Observando el paralelismo entre el contenido de enzima bifuncional (Fig. 5.1) y los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} (Fig. 5.2), alguien podría pensar que el descenso en la cantidad de enzima fuese una consecuencia de la disminución de los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}. Nosotros pensamos que, precisamente por este paralelismo tan perfecto en los tiempos (coinciden los descensos y las recuperaciones) y por el intervalo de tiempo tan corto (el descenso se observa a los 5-15 minutos) en que se detectan estos efectos, no puede ser uno la consecuencia del otro. Sin embargo, es obvio que ambos efectos son transitorios, desaparecen a los 20 min, lo que nos hace pensar que los mecanismos implicados han dejado de actuar.



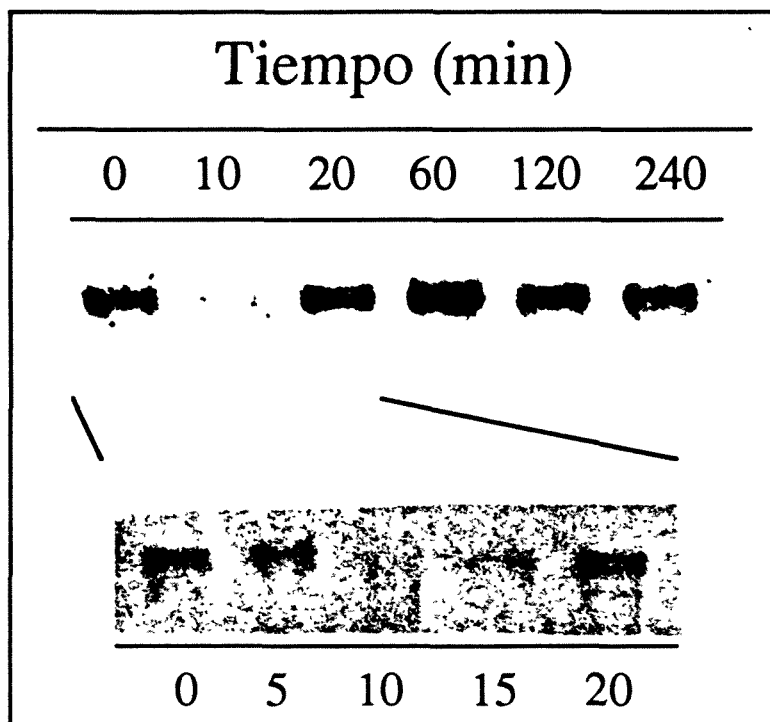


Fig. 5.2. El glucagón modifica la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa-2.

20 μ g de ARN extraído del hígado de las ratas inyectadas con glucagón (1 mg/Kg) fue aplicado a una electroforesis en agarosa al 1.5 % y transferido posteriormente a una membrana de nylon. La membrana fue hibridada con la sonda de PFK-2/FBPasa-2, lavada y autoradiografiada. La metodología empleada es la descrita en Rosa et al. (1991a).

3. Regulación de la expresión del gen de la PFK-2/FBPasa-2 por el glucagón

Una variación tan rápida en los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} parece sugerir una inhibición transcripcional de la expresión del gen acompañada de un incremento en la degradación del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}. Estos mecanismos de regulación de la expresión génica son comunes para otros genes del metabolismo hidrocarbonado regulados hormonalmente (Granner y Pilkis, 1990). Una situación muy similar a la que estamos describiendo sucede con el gen de la L-PK y el de la GK. La administración de glucagón, actuando vía cAMP, inhibe la transcripción del gen de la L-PK (Noguchi *et al.*, 1985; Vaultont *et al.*, 1986; Decaux *et al.*, 1989) y el de la GK (Iynedjian *et al.*, 1988 y 1989), y acelera la degradación del ARNm^{L-PK} (Noguchi *et al.*, 1985; Vaultont *et al.*, 1986) disminuyendo de este modo los niveles de sus ARNm. Una situación opuesta ocurre con el

gen de la PEPCK. En presencia de elevados niveles de cAMP, la transcripción del gen de la PEPCK aumenta (Lamers *et al.*, 1982; Granner *et al.*, 1983; Sasaki *et al.*, 1984; Sasaki y Granner, 1988; O'Brien y Granner, 1990), así como la estabilidad del ARNm^{PEPCK} (Hod y Hanson, 1988). Los genes de L-PK (Noguchi *et al.*, 1987), GK (Magnuson *et al.*, 1989 y 1990) y PEPCK (Yoo-Warren *et al.*, 1983; Beale *et al.*, 1985) han sido aislados y se han identificado secuencias que responden a cAMP (CRE) (Roesler *et al.*, 1988; Quinn *et al.*, 1988) y proteínas involucradas con esta secuencia (Quinn y Granner, 1990; Park *et al.*, 1990). Dos genes de la PFK-2/FBPasa-2 han sido aislados (Darville *et al.*, 1989; Lange *et al.*, 1989; Darville *et al.*, 1991), pero en ninguno de ellos se han identificado secuencias CRE conocidas (Lemaigre *et al.*, 1991).

3.1. El glucagón inhibe la velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2

Nosotros hemos analizado la velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2 durante los primeros 15 min que siguen a la administración de glucagón, mediante el ensayo de *run-on* descrito en la sección 6.1 del capítulo 3. Aislamos los núcleos a partir de los hígados de las ratas inyectadas con glucagón. Incubamos estos núcleos con (α -P³²)UTP, aislamos los transcritos producidos y los hibridamos con un ADNc de la PFK-2/FBPasa-2 de hígado. En la figura 5.3 se presentan los resultados obtenidos, observándose una clara disminución en la velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2. Como control del experimento determinamos también la velocidad de transcripción del gen de la PEPCK. Tal y como estaba descrito, la velocidad de transcripción del gen de la PEPCK se incrementó (Lamers *et al.*, 1982; Granner *et al.*, 1983; Sasaki *et al.*, 1984; Sasaki y Granner, 1988; O'Brien y Granner, 1990). Probablemente el efecto del glucagón, como ocurre en otros genes (Pilkis y Granner, 1990), es vía cAMP y, por lo tanto, la disminución de la velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPasa-2 decrita durante las primeras horas post-hepatectomía parcial (Fig. 3.23), podría ser explicada por el incremento de los niveles de glucagón y catecolaminas en esta etapa (Morley *et al.*, 1975; Bucher y Weir, 1976; Leffert *et al.*, 1979; Cruise *et al.*, 1987). Estudios adicionales son necesarios para saber cómo el glucagón inhibe la transcripción de la PFK-2/FBPasa-2 pues, como hemos comentado anteriormente, ningún elemento que responda a cAMP (CRE) ha sido identificado en los genes de la PFK-2/FBPasa-2 (Lemaigre *et al.*, 1991, Darville *et al.*, 1991).

Tiempo (min)	PFK-2/FBPase-2		PEPCK	
	Unidades arbitrarias	%	Unidades arbitrarias	%
0	1.453	100	4.737	100
5	0.426	29	6.153	130
10	0.121	8	6.042	128
15	0.169	12	9.297	196

Fig. 5.3. El glucagón inhibió la velocidad de transcripción del gen de la PFK-2/FBPase-2.

La metodología empleada es la descrita en Rosa et al. (1991a).

3.2. El glucagón modificó la estabilidad del ARNm PFK-2/FBPase-2 en suspensiones de hepatocitos

La estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPase-2} fue analizada en suspensión de hepatocitos en presencia de actinomicina D (5 µg/ml), tal y como describimos en la sección 6.2 del capítulo 3. En la figura 5.4 se observa como, sorprendentemente, la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPase-2} se incrementó en presencia de glucagón 10⁻⁷ M. Como control de este experimento hibridamos estas mismas membranas con las sondas de la PEPCK y la L-PK porque se habían descrito efectos opuestos en la estabilidad de sus ARNm producidos por el glucagón; aumentaba la estabilidad del ARNm^{PEPCK} (Hod y Hanson, 1988) y disminuía la del ARNm^{L-PK} (Decaux *et al.*, 1989). En la figura 5.5 podemos apreciar, que en ambos casos, y similarmente a lo que ocurría con la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPase-2}, en presencia de glucagón aumenta la estabilidad de los ARNm. Estos datos parecen sugerir que los efectos que estamos observando, más que específicos para un ARNm concreto, son debidos a un mecanismo más general, como por ejemplo la implicación de alguna proteína regulada por un proceso dependiente de glucagón. Las diferencias entre los efectos que se muestran en la estabilidad del ARNm^{L-PK} (Fig. 5.5) y los descritos por Decaux *et al.* (1989) podrían ser debidos a las diferentes condiciones experimentales (medios de incubación utilizados, insulina, etc.). La no coincidencia en los valores de estabilidad obtenidos para el ARNm^{PFK-2/FBPase-2} en suspensión (Rosa *et al.*, 1991a) o cultivo de hepatocitos (Kummel y Pilkis, 1990) con los esperados de los datos *in vivo* (fig. 5.2), nos hace pensar que los

valores de estabilidad de ARNm que se obtienen con este sistema *in vitro* no reflejen los valores reales. Sin embargo, este sistema *in vitro* podría ser útil para estudiar mecanismos que regulen la estabilidad de los ARNm.

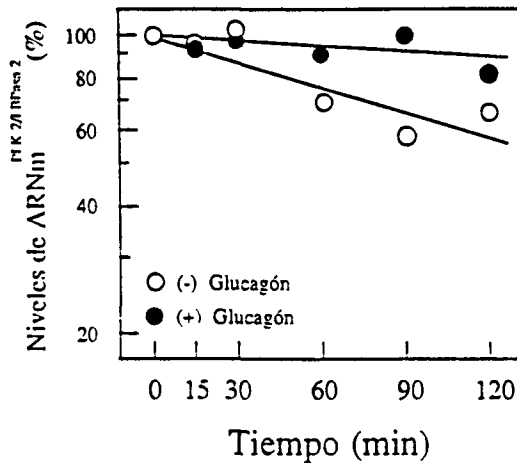


Fig. 5.4. Efecto del glucagón sobre la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}.

Los hepatocitos aislados de hígado de rata alimentada fueron incubados en presencia de actinomicina D (5 µg/ml) durante los tiempos indicados. El glucagón fue añadido al principio de la incubación a una concentración final de 10⁻⁷M (círculos negros). El ARN fue aislado y analizado mediante técnicas de Northern blot. La sonda común de la PFK-2/FBPasa-2 (Fig. 3.17) fue la utilizada para las hibridaciones. Los niveles de ARNm fueron cuantificados por densitometría láser de los autoradiogramas y expresados relativos a la cantidad presente a tiempo cero que fue escogido como 100 %. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos independientes.

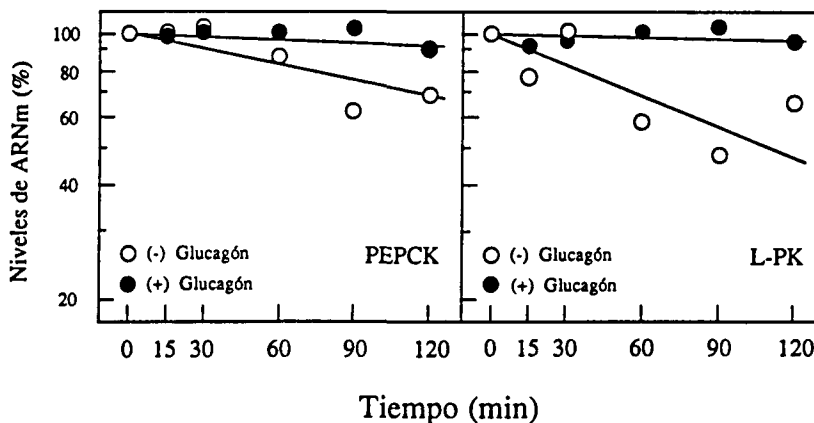


Fig. 5.5. Efecto del glucagón sobre la estabilidad de los ARNm^{PEPCK} y ARNm^{L-PK}.

Leyenda similar a la de la Fig. 5.4. Sondas de la PEPCK y L-PK (Rosa et al., 1991b) fueron utilizadas para las hibridaciones. Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes.

Con la idea de que quizás alguna proteína regulada por un proceso dependiente de glucagón podría estar modificando la estabilidad de estos ARNm y tuviera un recambio muy rápido, incubamos los hepatocitos con actinomicina D (5 µg/ml) y cicloheximida (10 µg/ml) en ausencia y en presencia de glucagón 10^{-7} M. La estabilidad de los anteriores ARNm fue analizada. En la figura 5.6 observamos como en presencia de cicloheximida, la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} se incrementa mientras que en presencia de cicloheximida y glucagón disminuye. Todos estos datos parecen indicar que en la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} hay implicadas al menos dos proteínas. Una con un recambio muy rápido que podría modificarse por un proceso dependiente de glucagón (posiblemente vía cAMP), estabilizando los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} y que dejaría de actuar cuando la síntesis proteica estuviera inhibida estabilizándose también los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}. Otra proteína con un recambio más lento que sólo actuaría cuando la síntesis proteica estuviera inhibida y estuviera modificada por un proceso dependiente de glucagón.

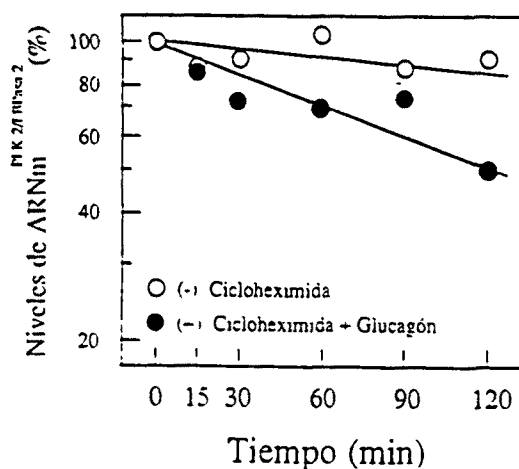


Fig. 5.6. Efecto de la cicloheximida sobre la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} en presencia y ausencia de glucagón.

Leyenda similar a la figura 5.4 pero donde los hepatocitos han sido incubados en presencia de actinomicina D (5 µg/ml) y cicloheximida (10 µg/ml).

Cuando analizamos la estabilidad de los ARNm de la PEPCK y la L-PK, en presencia de cicloheximida y de cicloheximida y glucagón, observamos un comportamiento similar en la estabilidad de ambos ARNm pero diferente al encontrado con el ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} (Fig. 5.7). En presencia de cicloheximida, la estabilidad de ambos ARNm se incrementó y no fue modificada por acción del glucagón. Estos experimentos son coincidentes con los realizados *in vivo* con el ARNm^{PEPCK} en presencia de cordicepina, un

inhibidor de la síntesis de ARNm, donde se mostraba que la vida media del ARNm^{PEPCK} aumentaba en presencia de cicloheximida (Nelson *et al.*, 1980; Cimbala *et al.*, 1982). Todos estos datos parecen indicar que una proteína con un recambio muy rápido podría estar desestabilizando los niveles de estos ARNm. Esta proteína podría modificarse por un proceso dependiente de glucagón, estabilizándose los niveles de estos ARNm cuando esto sucede. Cuando la síntesis proteica estuviera inhibida esta proteína rápidamente desaparecería, estabilizándose los niveles de estos ARNm y no modificándose en presencia de glucagón.

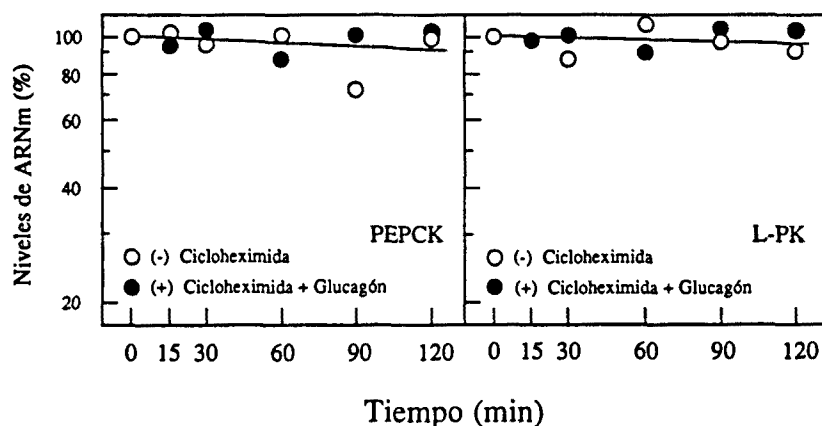


Fig. 5.7. Efecto de la cicloheximida sobre la estabilidad de los ARNm^{PEPCK} y ARNm^{L-PK} en presencia y ausencia de glucagón.

Leyenda similar a la figura 5.4 y 5.5 pero donde los hepatocitos han sido incubados en presencia de actinomicina D (5 µg/ml) y cicloheximida (10 µg/ml).

Poco es conocido acerca de las proteínas que pueden estar involucradas en la estabilidad de los ARNm. Ha sido demostrado que hay proteínas que se unen a la cola poli(A) de los ARNm, denominadas PABP: *poli A binding protein* (Blobel, 1973). Para que PABP pueda interaccionar con la cola poli(A) es necesario una cola mínima de 27-30 adeninas (Baer y Kornberg, 1983). Esto correlaciona con la observación de que una cola mínima de 30 adeninas al final de un ARNm es la longitud mínima para la estabilización de un ARNm (Mercer y Wake, 1985) y sugiere que la interacción cola poli(A) y PABP protege al ARNm de un rápido ataque nucleofílico (Bernstein *et al.*, 1989). También se ha descrito que muchos ARNm se estabilizan en presencia de inhibidores de la síntesis proteica lo que ha sugerido dos posibles explicaciones para esta dependencia de la traducción: a) que las nucleasas u otros factores involucrados en la degradación están asociados a los ribosomas;

b) que algún componente de la maquinaria de degradación es lábil y requiere la síntesis continua (Brawerman, 1989; Atwater *et al.*, 1990). Con respecto a la regulación de las nucleasas responsables de la degradación de los ARNm se trabaja con dos hipótesis: a) que existan nucleasas específicas de sustrato puedan para un ARNm específico o grupos de ARNm; b) que la regulación ocurra en alguna etapa inicial de una ruta que controle la accesibilidad de un ARNm específico a una nucleasa inespecífica (Atwater *et al.*, 1990).

Al comenzar este capítulo comentábamos que el objetivo que perseguíamos al administrar glucagón era el de reproducir total o parcialmente los efectos que observábamos sobre el sistema de la Fru-2,6-P₂ después de una hepatectomía parcial. De manera que, al menos durante la fase pre-replicative de la regeneración hepática, pudieran explicarse por hormonas, neurotransmisores o factores de crecimiento que aumentasen los niveles de cAMP. Después de analizar los diversos parámetros podemos decir que, en general, el glucagón mimetizó los efectos observados sobre el sistema de la Fru-2,6-P₂ durante la regeneración hepática. Disminuyó los niveles de Fru-2,6-P₂ a través de la fosforilación del enzima, a la vez que decreció el contenido de enzima bifuncional. Los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} también disminuyeron en paralelo a la inhibición de la transcripción del gen. Todos estos efectos fueron transitorios posiblemente debidos a la rápida metabolización del glucagón administrado. El único parámetro que no ha reproducido el glucagón es la estabilidad del ARNm, entrando en contradicción con los datos de ARNm y velocidad de transcripción. El hecho que todos los otros parámetros se hayan determinado *in vivo* y sólo la estabilidad *in vitro*, junto a la no coincidencia de valores de vida media de algunos ARNm estimados *in vivo* con los obtenidos *in vitro*, nos hace pensar que el sistema *in vitro* utilizado no refleja la vida media real del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}. Otra posible explicación es que al parar la transcripción con actinomicina D estemos creando algún tipo de artefacto (Atwater *et al.*, 1990), por este motivo sería interesante repetir estos experimentos en hepatocitos sin bloquear la transcripción y añadiendo transitoriamente (α -P³²)UTP, estos experimentos reciben el nombre de *Pulse-chase* (Brock y Shapiro, 1983a y b). Después, extraeríamos el ARN marcado a diferentes tiempos y lo hibridaríamos con la sonda que nos interesase, que estaría unida covalentemente a una membrana y, de este modo, podríamos seguir la desaparición del (α -P³²)UTP incorporado al ARN. De todas formas el resultado de estos experimentos hay que relativizarlos también, puesto que habría que asumir que la expresión génica y su regulación es la misma en el cultivo celular que *in vivo* (Bucher *et al.*, 1990).

Capítulo 6: Discusión y perspectivas

Después de una hepatectomía parcial el hígado comienza a proliferar para restablecer su masa hepática y su funcionalidad. Aquellas funciones hepáticas que son esenciales para el organismo ahora se deben de realizar con un 30 % de la masa hepática, por lo que el hígado soporta una sobrecarga funcional. Una de estas funciones es el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Para mantener los niveles de glucosa sanguínea, en el hígado remanente, se observa un incremento de la glucogenolisis (Harkness, 1952; Yokoyama *et al.*, 1953) y de la gluconeogénesis (Katz, 1979), y una disminución de la glucolisis (Katz, 1979). La actividad gluconeogénica del riñón, otro órgano capaz de sintetizar glucosa, también aumenta después de una hepatectomía parcial pero su contribución en el mantenimiento de la glucosa es bastante inferior (15-29 % a las 24 h post-hepatectomía) y no se observa en este órgano una modificación del flujo glucolítico (Katz, 1979). Además de los enzimas GK y PEPCK (Katz, 1979), la Fru-2,6-P₂ (Rosa *et al.*, 1990) también está involucrada en la disminución del flujo glucolítico y el aumento del gluconeogénico durante la regeneración hepática. La rápida disminución de su concentración (<1 h) después de una hepatectomía parcial sugiere un importante papel modulador de este metabolito en el hígado. La variación de los niveles de Fru-2,6-P₂ involucra a dos ciclos de sustrato. Uno, fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato, directamente debido a que la Fru-2,6-P₂ activa a la PFK-1 e inhibe a la FBPasa-1. Otro, piruvato/fosfoenolpiruvato, indirectamente debido a la variación de los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato que afectan a la actividad L-PK tanto alostéricamente como por modificación de su grado de fosforilación (Fig. 2.3) (Pilkis *et al.*, 1990). La rápida fosforilación e inactivación del enzima bifuncional PFK-2/FBPasa-2, que sintetiza y degrada a este metabolito, explicaría su disminución. Otros factores como el descenso del contenido de hexosas 6-fosfato a las 6 h (Fig. 3.3) o el aumento de citrato y fosfoenolpiruvato a las 24 h (Schofield *et al.*, 1986 y 1987) podrían estar involucrados en la disminución de la actividad PFK-2, pero todos estos factores tienen una cinética de aparición más tardía lo que parece indicar que aunque pueden ayudar a mantener los bajos niveles de Fru-2,6-P₂ durante la regeneración hepática no son los responsables iniciales de la disminución de su contenido. Evidencias cinéticas e inmunológicas sugieren que el enzima bifuncional, además de regularse por fosforilación, sustratos y efectores, se regula por algún mecanismo post-transcripcional todavía no descrito durante la regeneración hepática. La ADP-ribosilación del enzima podría ser este mecanismo ya que se ha demostrado que la ADP-ribosilación de la L-PK ocurre en una de las Arg de la secuencia de reconocimiento por la proteína quinasa dependiente de cAMP (-Arg-Arg-X-Ser-X-) (Matsuura *et al.*, 1988). La ADP-ribosilación de esta arginina impide la fosforilación de la serina por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Matsuura *et al.*, 1988). La PFK-2/FBPasa-2 tiene esta secuencia de reconocimiento en su extremo amino y la ADP-ribosilación de la arginina podría explicar la no fosforilación del enzima por la proteína quinasa dependiente de cAMP (Rosa *et al.*, 1990)

y el menor reconocimiento por el anticuerpo Ab_L (Fig. 3.16) durante la regeneración hepática. Este mecanismo podría ser importante en la modulación de la estructura y función de las proteínas durante este proceso proliferativo, ya que se ha descrito un aumento de la actividad poli(ADP-ribosa) polimerasa durante la regeneración hepática (Alvárez-González y Ringer, 1988).

Los niveles del enzima bifuncional también se regulan a nivel génico durante la regeneración hepática (Rosa *et al.*, 1991a). El contenido de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} se modifica de modo que se observa un gran descenso post-hepatectomía, con un mínimo a las 6 h, incrementándose después de este tiempo por encima de los valores control (máximo 48-60 h) y tendiendo a normalizarse después de este tiempo. Esta variación correlaciona bastante bien con la velocidad de transcripción del gen. La estabilidad del ARNm no se modificó durante las primeras horas post-hepatectomía lo que sugiere un papel principal de la transcripción génica en el control de la expresión de la PFK-2/FBPasa-2, al menos durante la fase pre-replicativa de la regeneración hepática.

Muchos de los efectos observados durante las primeras horas post-hepatectomía podemos reproducirlos *in vivo* mediante inyección intraperitoneal de glucagón (1 mg/Kg), indicándonos el importante papel de esta hormona sobre el sistema de la Fru-2,6-P₂ (enzima, ARNm, transcripción) (Fig. 5.1, 5.2 y 5.3). Los estudios de estabilidad de los ARNm de los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos con glucagón y cicloheximida sugieren la existencia de proteínas modulables por cAMP y/o con un recambio rápido implicadas en la regulación de los niveles de estos ARNm.

Enzima	Expresión génica		
	Insulina	Glucagón	Glucocorticoides
GK	↑ t	↓ t	—
PFK-1	↑	↓	?
L-PK	↑ t s	↓ t s	P
PFK-2/FBPasa-2	↑ t	↓	↑
PEPCK	↓ t	↑ t s	↑ t s
FBPasa-1	↓	↑	?
GBPasa-6	?	?	?

Fig. 6.1. Regulación de la expresión génica de los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos por insulina, glucagón y glucocorticoides.

Adaptada de Granner y Pilkis (1990). t, transcripción génica; s, estabilidad del ARNm; P, requerimiento permisivo; ?, no se sabe; —, no cambia.

Una regulación coordinada de los enzimas reguladores de la glucólisis y gluconeogénesis ha sido sugerida por Granner y Pilkis (1990). Es conocida la importancia de hormonas como el glucagón, la insulina y los glucocorticoides en la regulación de estos flujos y precisamente estas hormonas son las que regulan la expresión génica de estos enzimas (Fig. 6.1). Así tenemos que la insulina induce la expresión de los enzimas glucolíticos y el glucagón de los gluconeogénicos. De modo que en situaciones con glucagón elevado e insulina baja (ej. post-hepatectomía), los enzimas gluconeogénicos se expresarían y los glucolíticos se inhibirían. Nosotros hemos confirmado esta hipótesis durante la fase pre-replicativa de la regeneración hepática. Durante la fase replicativa la buena coordinación se rompe y, así, mientras los niveles de ARNm de la L-PK permanecen bajos, los de GK se recuperan y los de la PFK-2/FBPasa-2 y PEPCK están incrementados, sugiriendo un papel más relevante en esta fase de los glucocorticoides en la activación de la transcripción de estos genes. Teniendo en cuenta lo que es conocido a cerca de la regulación de estos genes en otras condiciones fisiológicas (revisado por Granner y Pilkis, 1990), sugerimos el siguiente modelo. El rápido aumento de los niveles de cAMP que sigue a la hepatectomía parcial (Fig. 2.6; Koide *et al.*, 1978) induciría el aumento de los niveles de ARNm de los enzimas gluconeogénicos y reprimiría el de los enzimas glucolíticos (Granner y Pilkis, 1990). El descenso en los niveles de insulina (Bucher y Weir, 1976; Leffert *et al.*, 1979) actuaría en la expresión de estos genes de una manera similar (Granner y Pilkis, 1990). Sin embargo, el efecto del incremento de la concentración de glucocorticoides (Leffert *et al.*, 1979) podría ser más restrictivo, rompiendo la buena coordinación entre los niveles de ARNm de los enzimas glucolíticos y gluconeogénicos durante la fase replicativa. Por consiguiente, la inducción de los genes de la PEPCK y la PFK-2/FBPasa-2 podría tener lugar, mientras que el gen de la L-PK permanecería inhibido (Granner y Pilkis, 1990). En relación con esta idea, recientemente se ha descrito que la subunidad reguladora I α (RI α) de la proteína quinasa dependiente de cAMP es el extinguidor específico de tejido denominado TSE1 localizado en el cromosoma 17 (Jones *et al.*, 1991; Boshart *et al.*, 1991). Varios autores observaron una disminución de la unión entre CREB (proteína que se une al elemento de respuesta a cAMP) y CRE (elemento de respuesta a cAMP) cuando TSE1 se expresaba. Esta disminución era debida a que el extinguidor actúa disminuyendo la actividad proteína quinasa dependiente de cAMP, lo que conlleva una disminución de la fosforilación de CREB y, por consiguiente, la unión de CREB a CRE disminuye (Fig. 6.2) (González *et al.*, 1989; González y Montminy, 1989; Thayer y Fournier, 1989; Boshart *et al.*, 1990; Ruppert *et al.*, 1990; Boshart *et al.*, 1991). Durante la regeneración hepática Ekanger *et al.* (1989) habían descrito una expresión diferencial de las subunidades de la proteína quinasa dependiente de cAMP, demostrando que los niveles de ARNm de las subunidades reguladoras RI α y RII α aumentaban a partir de las 4 h, con un máximo a las 8 h (3-4 veces los niveles control) y permaneciendo elevados a

las 36 h (2 veces). El ARNm de la subunidad catalítica (C) no se modificó. Siguiendo el aumento de los niveles de ARNm, el contenido proteico de las subunidades reguladoras aumentó a partir de las 6-8 h, con un máximo entre las 12-18 h y permaneciendo elevados a las 36 h. Estas subunidades reguladoras podrían interaccionar con las subunidades catalíticas libres, disminuyendo la actividad proteína quinasa dependiente de cAMP y, por lo tanto, inhibiendo los procesos dependientes de esta actividad. Todos estos datos estarían de acuerdo con la buena coordinación de los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos durante la fase pre-replicative (< 12) antes del aumento de la expresión de $R\alpha$ que podría reprimir la expresión génica regulada por CRE durante la fase replicativa.

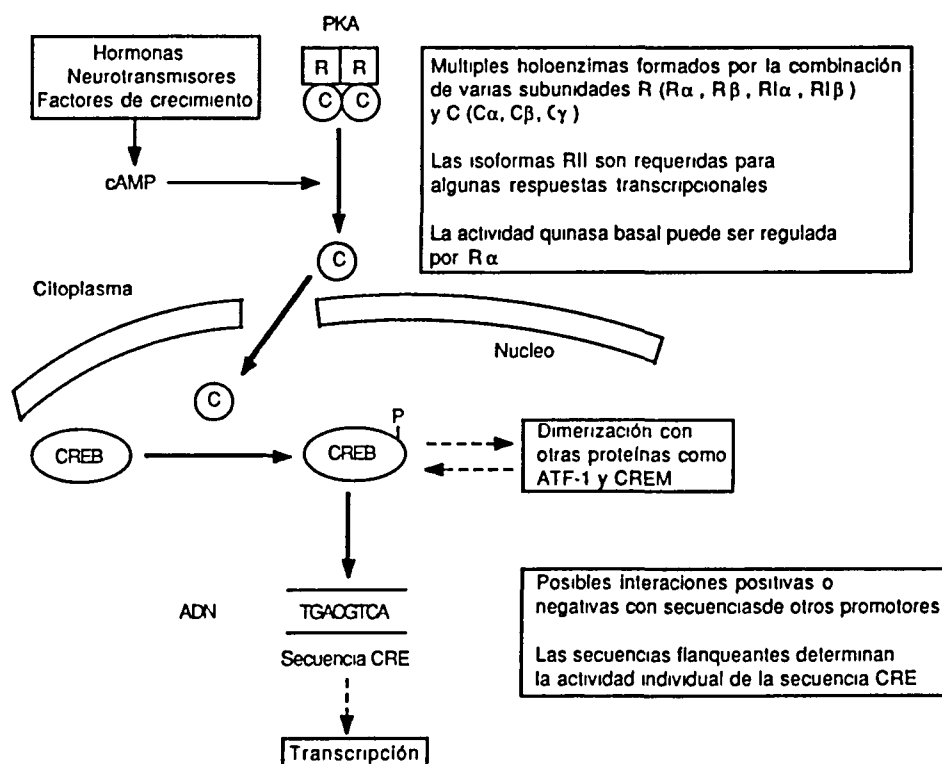


Fig. 6.2. Regulación de la transcripción por cAMP.

Adaptada de Lee (1991). El aumento de cAMP intracelular produce la disociación de las subunidades catalíticas (C) y reguladoras (R) de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) en el citoplasma. Las subunidades catalíticas translocan al núcleo y activan la proteína que se une al elemento de respuesta a cAMP (CREB) por fosforilación. Entonces, CREB activa la transcripción por interacción directa con la secuencia que responde a cAMP (CRE) (contienen la secuencia: -TGACGTCA-) en los promotores. Algunos de los factores que modulan este proceso se indican en las cajas. ATF, factor activante de la transcripción; CREM, modulador del elemento de respuesta a cAMP.

Los estudios realizados implican al ciclo de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato, a través de la Fru-2,6-P₂, como una etapa importante en el control del flujo glucolítico/gluconeogénico durante la regeneración hepática. La compleja regulación de la expresión y modulación del enzima PFK-2/FBPasa-2 también lo sugiere. Estudios posteriores son necesarios para explicar las hipótesis que se han ido sugiriendo: ¿se ADP-ribosila la PFK-2/FBPasa-2?; ¿explicaría esta ADP-ribosilación los efectos encontrados?; ¿puede ser la ADP-ribosilación un mecanismo de modulación de los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos durante procesos proliferativos?; ¿qué elementos están regulados por cAMP en la expresión de la PFK-2/FBPasa-2?; ¿qué proteínas están involucradas en la estabilidad de los ARNm?; etc.

Conclusiones

1) La concentración de Fru-2,6-P₂ disminuye rápidamente (mínimo valor a 1 h) como consecuencia de una hepatectomía de un ≈70 %, incrementándose después de 24 h, sin llegar a recuperarse a los 7 días, cuando la masa hepática está restablecida. Los bajos niveles de Fru-2,6-P₂ correlacionan con el aumento de la gluconeogénesis y la disminución de la glucólisis, sugiriendo que el ciclo de sustrato fructosa 6-fosfato/fructosa 1,6-bisfosfato está involucrado en la regulación de la glucólisis/gluconeogénesis durante la regeneración hepática.

2) En paralelo con la disminución de la concentración de Fru-2,6-P₂, el contenido de glucógeno también decreció, pero con una cinética más lenta (mínimo valor a las 6 h). Su recuperación fue más rápida que la de la Fru-2,6-P₂ (76 y 40 %, respectivamente, a los 7 días), lo que sugiere que la glucogenogénesis puede estar sostenida mediante la ruta indirecta, siendo la mayor parte del glucógeno que se deposita de origen gluconeogénico.

3) En los animales laparotomizados se observa una disminución inicial, pero menos pronunciada que en los hepatectomizados, del contenido de Fru-2,6-P₂ y glucógeno, reestableciéndose a valores control a las 6 h y 24 h, respectivamente. Estos datos sugieren que durante las primeras horas del estrés quirúrgico la degradación del glucógeno podría producir la recuperación de los niveles de Fru-2,6-P₂, al suministrar fructosa 6-fosfato para su síntesis. La recuperación del contenido de glucógeno se produce durante el periodo de realimentación de los animales (después de 12 h) y en presencia de elevados niveles de Fru-2,6-P₂ lo que parece indicar que la vía directa está prevaleciendo en esta recuperación.

4) El enzima bifuncional, PFK-2/FBPasa-2, se fosforila rápidamente (<1 h), disminuyendo su actividad quinasa y aumentando la bisfosfatasa. Esta fosforilación es transitoria, restableciéndose a niveles control a las 24 h. La actividad PFK-2 *total* también disminuyó, recuperándose a los 10 días. La rápida fosforilación del enzima podría explicar el rápido descenso de los niveles de Fru-2,6-P₂. En el mantenimiento de los bajos niveles de Fru-2,6-P₂ después de la desfosforilación del enzima podrían estar involucrados diversos factores tales como la disminución de la actividad PFK-2 *total* y el aumento del contenido de moduladores negativos, citrato y fosfoenolpiruvato.

5) El enzima PFK-2/FBPasa-2 presenta durante la regeneración hepática unas propiedades cinéticas (incubaciones con glicerol 3-fosfato y con la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP) e inmunológicas (Ab_p y Ab_L) diferentes a las presentes en el hígado normal, siendo sus pesos moleculares y sus comportamientos cromatográficos similares.

6) Durante la regeneración hepática el ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} que se expresa es el específico de hígado. Esta conclusión junto a la 4 sugiere que el enzima bifuncional sufre alguna modificación post-transcripcional aún no descrita durante el proceso proliferativo.

7) Los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} están modulados durante la regeneración hepática, observándose una disminución durante la fase prereplicativa (<12-16 h) y un incremento en la replicativa (> 16 h).

8) Las variaciones en los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} correlacionan con las velocidades de transcripción del gen determinadas, lo que sugiere un importante papel de la transcripción en la regulación de los niveles de ARNm^{PFK-2/FBPasa-2} durante la regeneración hepática.

9) Los hepatocitos aislados de hígados de rata, obtenidos dos horas después de una hepatectomía parcial, no mostraron una modificación de la estabilidad del ARNm^{PFK-2/FBPasa-2}, comparados con los hepatocitos de hígados normales.

10) Se observa una regulación coordinada de la expresión génica de los enzimas reguladores de la glucólisis/gluconeogénesis durante la fase prereplicativa de la regeneración hepática, que se correlaciona con las actividades enzimáticas descritas. Así, mientras los niveles de los ARNm de la GK, L-PK y PFK-2/FBPasa-2 disminuyen, los de la PEPCK aumentan. Durante la fase replicativa, esta buena coordinación se rompe y se observan elevados niveles de PFK-2/FBPasa-2 y PEPCK, mientras que los de la L-PK permanecen bajos y los de GK se recuperan. Los niveles del ARNm de la FBPasa-1 no se modificaron durante todo el proceso proliferativo.

11) El estrés quirúrgico y anestésico produjo variaciones en los niveles de los ARNm de los enzimas glucolíticos/gluconeogénicos anteriores, aunque estas variaciones fueron mucho menos pronunciadas que las observadas post-hepatectomía, normalizándose hacia las 24 h.

12) Durante la regeneración hepática se observa una elevada velocidad de transcripción del gen de la PEPCK. Este hecho junto con la estabilidad descrita de su ARNm en presencia de cAMP, pueden justificar los elevados niveles de ARNm de la PEPCK encontrados.

13) El glucagón mimetizó transitoriamente muchos de los efectos de la hepatectomía parcial sobre el sistema de la Fru-2,6-P₂. Disminuyó el contenido de Fru-2,6-P₂, la actividad PFK-2 *activa* y *total*, los niveles de ARNm y la transcripción del gen.

14) La falta de correlación entre las vidas medias esperadas de los ARNm *in vivo* con los datos encontrados *in vitro* nos hacen pensar que el sistema *in vitro* (hepatocitos en cultivo o suspensión) no refleje la vida media real de los ARNm.

15) Los estudios en suspensión de hepatocitos con actinomicina D en presencia de glucagón y/o cicloheximida parecen involucrar a proteínas de recambio rápido, y modificables por un proceso dependiente de glucagón (probablemente vía cAMP), en la estabilidad de los ARNm de los enzimas glucolíticos y gluconeogénicos.

Bibliografía

- **Algaier, J. and Uyeda, K.** Molecular cloning, sequence analysis, and expression of a human liver cDNA coding for fructose-6-P 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:328-333.

- **Almendral, J.M., Sommer, D., Mac-Donald-Bravo, H., Burkhardt, J., Perera, J. and Bravo, R.** Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2140-2148.

- **Altin, J.G. and Bygrave, F.L.** Non-parenchymal cells as mediators of physiological responses in liver. (1988) *Mol. Cell. Biochem.* 83:3-14.

- **Alvárez-González, R. and Ringer, D.P.** Nuclear matrix associated poly(ADP-ribose) metabolism in regenerating rat liver. (1988) *FEBS Lett.* 236:362-366.

- **Andreis, P.G., Whitfield, J.F. and Armato, V.** Stimulation of DNA synthesis and mitosis in primary cultures of neonatal rat liver by arachidonic acid and prostaglandins. (1981) *Exp. Cell. Res.* 134:265-272.

- **Arias, I., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, D.A.** *The Liver: Biology and Pathobiology.* (1982) Raven Press, New York.

- **Atkinson, D.E. and Fall, L.** Adenosine triphosphate conservation in biosynthetic regulation. *Escherichia phosphoribosilpyrophosphate synthetase.* (1967) *J. Biol. Chem.* 242:3241-3242.

- **Atwater, J.A., Wisdom, R. and Verma, I.M.** Regulated mRNA stability. (1990) *Annu. Rev. Genet.* 24:519-541.

- **Barbiroli, B. and Potter, V.R.** DNA synthesis and interaction between controlled feeding schedules and partial hepatectomy in rats. (1971) *Science* 172:738-741.

- **Baer, B.W. and Kornberg, R.D.** The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A) ribonucleoprotein. (1983) *J. Cell. Biol.* 96:717-721.

- **Bartrons, R., Hue, L., Van Shaftingen, E. and Hers, H.G.** Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. (1983) *Biochem. J.* 214:829-837.

- Bazan, J.F., Fletterick, R.J. and Pilkis, S.J. Evolution of a bifunctional enzyme: 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9642-9646.

- Beale, E.G., Chrapkiewicz, N.B., Scoble, H.A., Metz, R.J., Quick, D.P., Noble, R.L., Donelson, J.E., Biemann, K. and Granner, D.K. Rat hepatic cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). (1985) *J. Biol. Chem.* 260:10478-10760.

- Bernstein, P., Peltz, S.W. and Ross, J. The poly(A)-poly(A) binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9:659-670.

- Besse, T., de Hemptinne, B., Kabeya, V. and Lambotte, L. Stimulation of liver regeneration by prostacyclin. (1991) *Transplantation Proceedings* 23:542-544.

- Bhat, N.K., Fisher, R.J., Fujiwara, S., Ascione, R. and Papas, T.S. Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:3161-3165.

- Blobel, G. A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:924-928.

- Blomhoff, R., Holte, K., Naess, L. and Berg, T. Newly administered (³H)-retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. (1984) *Exp. Cell Res.* 150:186-193.

- Bocckino, S.B., Wilson, P.B. and Exton, J.H. An early elevation of diacylglycerol and phosphatidate in regenerating liver. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:290-294.

- Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. and Tjian, R. Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. (1987) *Science* 238:1386-1392.

- Bonney, R.J., Hopkins, H.A., Walker, P.R. and Potter, V.R. Glycolytic isoenzymes and glycogen metabolism in regenerating liver from rats on controlled feeding schedules. (1973) *Biochem. J.* 136:115-124.

- Boshart, M., Weih, F., Schmidt, A., Fournier, R.E.K. and Schütz, G. A cyclic AMP response element mediates repression of tyrosine aminotransferase gene transcription by the tissue-specific extinguisher locus TSE-1. (1990) *Cell* 61:905-916.

-
- Boshart, M., Weih, F., Nichols, M. and Schütz, G. The tissue-specific extinguisher locus TSE-1 encodes a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. (1991) *Cell* 66:849-859.

 - Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M.L., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F. and Aaronson, S.A. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. (1991) *Science* 251:802-804.

 - Braun, L., Mead, J.E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G.I. and Fausto, N. Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1539-1543.

 - Brawerman, G. mRNA Decay: finding the right targets. (1989) *Cell* 57:9-10.

 - Brenner, D.A., Koch, K.S. and Leffert, H.L. Transforming growth factor alpha stimulates proto-oncogene c-jun expression and a mitogenic program in primary cultures of adult rat hepatocytes. (1989) *DNA* 8:279-285.

 - Brock, M.L. and Shapiro, D.J. Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. (1983a) *Cell* 34:207-214.

 - Brock, M.L. and Shapiro, D.J. Estrogen regulates the absolute rate of transcription of the *Xenopus laevis* vitellogenin genes. (1983b) *J. Biol. Chem.* 258:5449-5455.

 - Bucher, N.L.R. and Malt, R.A. Regeneration of liver and kidney. (1971) Boston, Little Brown Co. pp:17-176.

 - Bucher, N.L.R. and Swaffield, M.N. Regeneration of liver in rats in the absence of portal splanchnic organs and a portal blood supply. (1973) *Canc. Res.* 33:3189-3194.

 - Bucher, N.L.R. and Swaffield, M.N. Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1157-1160.

 - Bucher, N.L.R. and Weir, G.C. Insulin, glucagon, liver regeneration and DNA synthesis. (1976) *Metabolism* 25:1423-1425.

 - Bucher, N.L.R. Regeneration of the mammalian liver. (1963) *Int. Rev. Cytol.* 15:245-300.

- **Bucher, N.L.R.** Thirty years of liver regeneration: a distillate. (1982) In "Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation", Vol. 9, pp:15-26.

- **Bucher, N.L.R., McGowan, J.A. and Patel, U.** Hormonal regulation of liver growth. (1978a) In "ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology", Vol. XII (E.R. Dirkson, D.M. Prescott and C.F. Fox, eds.) pp:661-670. Academic Press, New York.

- **Bucher, N.L.R., Patel, U. and Cohen, S.** Hormonal factors and liver growth. (1978b) In "Advances in Enzyme Regulation", Vol. 16 (G. Weber, ed.) pp:205-213. Pergamon Press. New York.

- **Bucher, N.L.R., Robinson, G.S. and Farmer, S.R.** Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. (1990) In "Seminars in liver disease" Vol. 10, 1:11-19. Thieme Medical Publishers. New York.

- **Burgess, W.H. and Maciag, T.** The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58:575-606.

- **Burnette, W.N.** "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. (1981) *Analytical Biochemistry* 112:195-203.

- **Carr, B.I., Hayashi, I., Branum, E.L. and Moses, H.L.** Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type transforming growth factor. (1986) *Cancer Res.* 46:2330-2334.

- **Carr, B.I., Huang, T.H., Itakura, K., Noel, M. and Marceau, N.** TGF- β gene transcription in normal and neoplastic liver growth. (1989) *J. Cell. Biochem.* 39:477-487.

- **Casteleijn, E., Kuiper, J., van Rooij, H.C.J., Kamps, J.A.A.M., Foster, J.F. and van Berkel, T.J.C.** Hormonal control of glycogenolysis in parenchymal liver cells by Kupffer and endothelial liver cells. (1988a) *J. Biol. Chem.* 263:2699-2703.

- **Casteleijn, E., Kuiper, J., van Rooij, H.C.J., Kamps, J.A.A.M., Foster, J.F. and van Berkel, T.J.C.** Prostaglandin D₂ mediates the stimulation of glycogenolysis in the liver by phorbol ester. (1988b) *Biochem. J.* 250:77-80.

-
- **Cimbala, M.A., Lamers, W.H., Nelson, K., Monahan, J.E., Yoo-Warren, H. and Hanson, R.W.** Rapid changes in the concentration of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat liver and kidney. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:7629-7636.
- **Cifuentes, M.E., Espinet, C., Lange, A.J., Pilkis, S.J. and Hod, Y.** Hormonal control of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression in rat hepatoma cells. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:1557-1563.
- **Colosia, A.D., Marker, A.J., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R., Granner, D.K., Tauler, A., Pilkis, J. and Pilkis, S.J.** Induction of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:18669-18677.
- **Crepin, K.M., Darville, M.I., Hue, L. and Rousseau, G.G.** Starvation or diabetes decreases the content but not the mRNA of 6-phosphofructo 2-kinase in rat liver. (1988) *FEBS Lett.* 227:136-140.
- **Crepin, K.M., Darville, M.I., Hue, L. and Rousseau, G.G.** Characterization of distinct mRNAs coding for putative isozymes of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1989a) *Eur. J. Biochem.* 183:433-440.
- **Crepin, K.M., Darville, M.I., Michel, A., Hue, L. and Rousseau, G.G.** Cloning and expression in *Escherichia coli* of a rat hepatoma cell cDNA coding for 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1989b) *Biochem. J.* 264:151-160.
- **Cruise, J.L., Houck, K.A. and Michalopoulos, G.K.** Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha-1 adrenoreceptor by norepinephrine. (1985) *Science* 227:749-751.
- **Cruise, J.L., Cotecchia, S. and Michalopoulos, G.K.** Norepinephrine decreases EGF binding in primary rat hepatocyte cultures. (1986) *J. Cell. Physiol.* 127:39-44.
- **Cruise, J.L., Knechtle, S.J., Bollinger, R.R., Kuhn, C. and Michalopoulos, G.K.** Alpha-1 adrenergic effects and liver regeneration. (1987) *Hepatology* 7:1189-1194.
- **Cruise, J.L., Muga S.J., Lee, Y.S. and Michalopoulos, G.K.** Regulation of hepatocyte cell growth: alpha-1 adrenergic receptor and ras r21 changes in liver regeneration. (1989) *J. Cell. Physiol.* 140:195-201.

- Chan, K., Kost, D.P. and Michalopoulos, G.K. Multiple sequential periods of DNA synthesis and quiescence in primary hepatocyte cultures maintained on the DMSO-EGF protocol. (1989) *J. Cell. Physiol.* 141:584-590.

- Darnell, J.E. Jr. Variety in the level of gene control in eukaryotic cells. (1982) *Nature* 297:365-371.

- Darville, M.I., Crepin, K.M., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Octave, J.N., Rider, M.H., Marchand, M.J., Hue, L. and Rousseau, G.G. Complete nucleotide sequence coding for rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase derived from a cDNA clone. (1987) *FEBS Lett.* 224:317-321.

- Darville, M.I., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G. 5'flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6543-6547.

- Darville, M.I., Chikri, M., Lebeau, E. , Hue, L. and Rousseau, G.G. A rat gene encoding heart 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1991) *FEBS Lett.* 288:91-94.

- Decaux, J.F., Antoine, B. and Kahn, A. Regulation of the expression of the L-type pyruvate kinase gene in adult rat hepatocytes in primary culture. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:11584-11590.

- De Oliveira, J., Rosa, J.L., Ambrosio, S. and Bartrons, R. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism. Protective role of fructose 1,6-bisphosphate. (1991) Submitted a *Hepatology*.

- Di Renzo, M.F., Narsimhan, R.P., Olivero, M., Bretti, S., Giordano, S., Medico, E., Gaglia, P., Zara, P. and Comoglio, P.M. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. (1991) *Oncogene* (In the press).

- Earp, H.S. and O'Keefe E.J. Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. (1981) *J. Clin. Invest.* 67:1580-1583.

- Ekanger, R., Vintermyr, O.K., Houge, G., Sand, T.E., Scott, J.D., Krebs, E.G., Eikhom, T.S., Christoffersen, T., Ogreid, D. and Doskeland, S.O. The expression of cAMP-dependent protein kinase subunits is differentially regulated during liver regeneration. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:4374-4382.

-
- **El-Maghrabi, M.R., Haston, W.S., Flockhart, D.A., Claus, T.H. and Pilkis, S.J.** Studies on the phosphorylation and dephosphorylation of L-type pyruvate kinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:668-675.

 - **El-Maghrabi, M.R., Correia, J.J., Heil, P.J., Pate, T.M., Cobb, C.E. and Pilkis, S.J.** Tissue distribution, immunoreactivity, and physical properties of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5005-5009.

 - **El-Maghrabi, M.R., Pate, T.M., D'Angelo, G., Correia, J.J., Lively, M.O. and Pilkis, S.J.** Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. Identification of essential sulphhydryl residues in the primary sequence of the enzyme. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:11714-11720.

 - **Emond, J., Capron-Laudereau, M., Meriggi, F., Berneau, J., Reynes, M. and Houssin, D.** Extent of hepatectomy in the rat. (1989) *Eur. Surg. Res.* 21:251-259.

 - **Exton, J.H. and Park, C.R.** The stimulation of gluconeogenesis from lactate by epinephrine, glucagon, and cyclic 3',5'-adenylate in the perfused rat liver. (1966) *Pharmacol. Rev.* 18:181-188.

 - **Exton, J.H. and Park, C.R.** Control of gluconeogenesis in liver. Effects of glucagon, catecholamines, and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. (1968) *J. Biol. Chem.* 243:4189-4196.

 - **Exton, J.H.** Role of phosphoinositides in the regulation of liver function. (1988) *Hepatology* 8:152-166.

 - **Farivar, M., Wands, J.R., Isselbacher, K.J. and Bucher, N.L.R.** Effect of pancreatic hormones on fulminant murine hepatitis. (1976) *New Engl. J. Med.* 295:1517-1519.

 - **Farreras, P. and Rozman, C.** *Medicina Interna.* 11 Edición. (1988) Ed. Doyma (Barcelona).

 - **Fausto, N. and Mead, J.E.** Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. (1989) *Laboratory Investigation* 60:4-13.

 - **Fausto, N.** Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. (1990) *Current Opinion in Cell Biology* 2:1036-1042.

 - **Fawcett, D.W.** *Tratado de Histología.* 11 Edición. (1989) Ed. Interamericana-McGraw-Hill (Madrid).

- Fisher, B., Gunduz, N., Saffer, E.A. and Zheng, S. Relation of estrogen and its receptor to rat liver growth and regeneration. (1984) *Cancer Res.* 44:2410-2415.

- Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. and Fisher, E.R. A portal factor as the humoral agent in liver regeneration. (1971) *Science* 171:575-577.

- Fleig, W.E. and Hoss, G. Partial purification of rat hepatic stimulator substance and characterization of its action on hepatoma cells and normal hepatocytes. (1989) *Hepatology* 9:240-248.

- Francavilla, A., Dileo, A., Eagon, P.K., Wu, S.Q., Ove, P., Van thiel, D.H. and Starzl, T.E. Regenerating rat liver: correlations between estrogen receptor localization and deoxyribonucleic acid synthesis. (1984) *Gastroenterology* 86:552-557.

- Francavilla, A., Eagon, P.K., Dileo, A., Polimeno, L., Panella, C., Aquilino, A.M., Ingrosso, M., Van Thiel, D.H. and Starzl, T.E. Sex hormone-related functions in regenerating male rat liver. (1986a) *Gastroenterology*. 91:1263-1270.

- Francavilla, A., Gavaler, J.S., Makowka, L., Barone, M., Mazzaferro, V., Ambrosino, G., Iwatsuki, S., Guglielmi, F.W., DiLeo, A., Balestrazzi, A., Van Thiel, D.H. and Starzl, T.E. Estradiol and testosterone levels in patients undergoing partial hepatectomy. A possible signal for hepatic regeneration?. (1989) *Dig. Dis. Sci.* 34:818-822.

- Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Coetzee, M., Makowka, L., Rose, J., Van Thiel, D.H. and Starzl, T.E. Extraction and partial purification of a hepatic stimulatory substance in rats, mice and dogs. (1987) *Cancer Res.* 47:5600-5605.

- Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Sciascia, C., Coetzee, M., and Starzl, T.E. Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy. (1986b) *Cancer Res.* 46:1318-1323.

- Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J. and Bissell, M. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8681-8685.

- Garnett, M.E., Dyson, R.D. and Dost, F.N. Pyruvate kinase isozyme changes in parenchymal cells of regenerating rat liver. (1974) *J. Biol. Chem.* 249:5222-5226.

-
- Gerber, M.A., Thung, S.N., Sehn, S., Strohmeyer, F.W. and Ishak, K.G. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis and nodular transformation of the liver. (1983) *Am. J. Pathol.* 110:70-74.

 - Gil, J. Regulació dels nivells hepàtics de glucosa 1,6-bisfosfat i de fructosa 2,6-bisfosfat. Efectes de la diabetis, la insulina i el vanadat. (1987) Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. pp:102-104.

 - Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M.F., Cooper, C.S. and Comoglio, P.M. Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. (1989a) *Nature* 339:155-156.

 - Giordano, S., Di Renzo, M.F., Narsimhan, R., Cooper, C.S., Rosa, C. and Comoglio, P.M. Biosynthesis of the protein encoded by c-met proto-oncogene. (1989b) *Oncogene* 4:1383-1388.

 - Ghoda, E., Yamasaki, T., Tsubouchi, H., Kurobe, M., Sakiyama, O., Aoki, H., Niidani, N., Shin, S., Hayashi, K., Hashimoto, S., Daikuhara, Y. and Yamamoto, I. Biological and immunological properties of human hepatocyte growth factor from plasma of patients with fulminant hepatic failure. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1053:21-26.

 - Gohda, E., Tsubouchi, H., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Miyazaki, H., Hashimoto, S. and Daikuhara, Y. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with hepatic failure. (1988) *J. Clin. Invest.* 81:414-419.

 - González, G.A., Yamamoto, K.K., Fischer, W.H., Karr, D., Menzel, P., Biggs III, W., Vale, W.W. and Montminy, M.R. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. (1989) *Nature* 337:749-752.

 - González, G.A. and Montminy, M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. (1989) *Cell* 59:675-680.

 - Gove, C.D. and Hems, D.A. Fatty acid synthesis in the regenerating liver of the rat. (1978) *Biochem. J.* 170:1-8.

 - Goyette, M.C., Petropoulos, J., Shank, P.R. and Fausto, N. Regulated transcription of c-Ki-ras and c-myc during compensatory growth of rat liver. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 9:1493-1498.

- **Granner, D., Andreone, T., Sasaki, K. and Beale, E.** Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. (1983) *Nature* 305:549-551.

- **Granner, D.K. y Pilkis, S.J.** The genes of hepatic glucose metabolism. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:10173-10176.

- **Grisham, J.W.** A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating liver; autoradiography with thymidine-tritiade. (1962) *Cancer Res.* 22:842-849.

- **Gruppuso, P.A., Mead, J.E. and Fausto, N.** Transforming growth factor receptors in liver regeneration following partial hepatectomy in the rat. (1990) *Cancer Res.* 50:1464-1469.

- **Guyton, A.C.** Tratado de Fisiología Médica. 7 Edición. (1988) (7 Ed.) Ed. Interamericana-McGraw-Hill (Madrid).

- **Hanley, M.R.** Mitogenic neurotransmitters (news). (1989) *Nature (London)* 340:97.

- **Harkness, R.D.** Changes in the liver of the rat after partial hepatectomy. (1952) *J. Physiol.* 117:267.

- **Hashimoto, N., Watanabe, T., Ukeda, Y., Toda, G., Yamada, H., Yoshikawa, Y., Mitsui, H. and Kurokawa, K.** Down-regulation of prostaglandin E2 receptors in regenerating rat liver and its physiological significance. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176:226-232.

- **Hers, H.G. and Hue, L.** Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52:617-653.

- **Higgins, G.M. and Anderson, R.M.** Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. (1931) *Arch. Pathol.* 12:186-202.

- **Higuchi, O. and Nakamura, T.** Identification and change in the receptor for hepatocyte growth factor in rat liver after partial hepatectomy or induced hepatitis. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:599-607.

- **Hilliker, C.E., Darville, M.I., Aly, M.S., Chikri, M., Szpirer, C., Marynen, P., Rousseau, G.G. and Cassiman, J.J.** Human and rat chromosomal localization of two genes for 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase by analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization. (1991) *Genomics* 10:867-873.

-
- Hod, Y. and Hanson, R.W. Cyclic AMP stabilizes the mRNA for phosphoenolpyruvate carboxikinase (GTP) against degradation. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:7747-7752.
- Hou, J., Kan, M., McKeehan, K., McBride, G., Adams, P. and McKeehan, W.L. Fibroblast growth factor receptors from liver vary in three structural domains. (1991) *Science* 251:665-668.
- Houck, K.A. and Michalopoulos, G.K. Altered responses of regenerating hepatocytes to TGF- β . (1989) *J. Cell. Physiol.* 141:503-509.
- Houck, K.A., Cruise, J.L. and Michalopoulos, G.K. Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary hepatocyte cultures. (1988) *J. Cell. Physiol.* 125:551-555.
- Hsu, J.C., Laz, T., Mhon, K.L. and Taub R. Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3511-3515.
- Hue, L. and Bartrons, R. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in liver, muscle, and adipose tissue. (1985) in *Regulation of carbohydrate metabolism* (Beitner, R., ed.) vol. 1, pp:29-44, CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Hue, L. and Rider, M.H. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. (1987) *Biochem. J.* 245:313-324.
- Hue, L., Maisin, L. and Rider, M.H. Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle. (1988) *Biochem. J.* 251:541-545.
- Huggett, A.C., Krutzsch, H.C. and Thorgeirsson, S.S. Characterization of a hepatic proliferation inhibitor (HPI): effect of HPI on the growth of normal liver cells-comparison with transforming growth factor beta. (1987) *J. Cell. Biochem.* 35:305-314.
- Ikejiri, N. and Tanikawa, K. Effects of vitamin A and estrogen on the sinusoidal cells in the rat liver. (1977) Wisse and Knook (eds) *Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells*. Elsevier, Amsterdam. pp: 83-93.
- Ito, T. Recent advances in the study of the fine structure of the hepatic sinusoidal wall: a review. (1973) *Gunnar Rep. Med. Sci.* 6:119-163.

- **Iynedjian, P.B., Ojinovci, A., Renold, A.E.** Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:740-744.

- **Iynedjian, P.B., Jotterand, D., Nospikel, T., Asfari, M. and Pilot, P.R.** Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:21824-21829.

- **Johansson, S., Andersson, N. and Andersson, G.** Pretranslational and posttranslational regulation of the EGF receptor during the prereplicative phase of liver regeneration. (1990) *Hepatology* 12:533-541.

- **Jones, K.W., Shapero, M.H., Chevrette, M. and Fournier, R.E.K.** Subtractive hybridization cloning of a tissue-specific extinguisher: TSE1 encodes a regulatory subunit of protein kinase A. (1991) *Cell* 66:861-872.

- **Jungermann, K. and Katz, N.** *Metabolic Compartmentation.* (1982) H Sies (ed). Academic Press, London. pp:411-435.

- **Kan, M., Huang, J., Mansson, P., Yasumitsu, H., Carr, B. and McKeehan, W.** Heparin-binding growth factor type I (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:7432-7436.

- **Katsumoto, F., Miyazaki, K. and Nakayama, F.** Stimulation of DNA synthesis in hepatocytes by Kupffer cells after partial hepatectomy. (1989) *Hepatology* 9:405-410.

- **Katz, N.** Correlation between rates and enzymes levels os increased gluconeogenesis in rat liver and kidney after partial hepatectomy. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98:535-542.

- **Katz, J. and McGarry, J.D.** The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?. (1984) *J. Clin. Invest.* 74:1901-1909.

- **Kawahara, R.S. and Deuel, T.** Platelet-derived growth factor-inducible gene JE is a member of a family of small inducible genes related to platelet factor 4. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:679-682.

-
- **Kepler, D. and Decker, K.** Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis: accumulation of galactosamine 1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. (1969) *Eur. J. Biochem.* 19:219-225.

 - **Kiernan, F.** The anatomy and physiology of the liver. (1833) *Phil. Trans. Soc.* 123:711-770.

 - **Kinoshita, T., Hirao, S., Matsumoto, K. and Nakamura, T.** Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177:330-335.

 - **Kitajima, S., Thomas, H. and Uyeda, K.** Effect of modification of lysine residues of fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase with pyridoxal 5'-phosphate. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:13995-14002.

 - **Kitamura, K. and Uyeda, K.** Purification and characterization of myocardial fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:9027-9033.

 - **Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H. and Uyeda, K.** Phosphorylation of myocardial fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:16796-16801.

 - **Kitamura, K., Uyeda, K., Kangawa, K. and Matsuo, H.** Purification and characterization of rat skeletal muscle fructose 6-phosphate, 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:9799-9806.

 - **Klein, R., Conway, D., Parada, L.F. and Barbacid, M.** The *trkB* tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. (1990) *Cell* 61:647-656.

 - **Koide, Y., Shelton, H.E., Ong, S.H. and Steiner, A.L.** Alterations in the intracellular distribution of cGMP and guanylate cyclase activity during rat liver regeneration. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:4439-4445.

 - **Krebs H.A. and Henseleit, K.** Untersuchungen über die harnstoffbildung im tierkörper. (1932) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 210:33-66.

- Kruijer, W., Skelly, H., Botteri, F., van der Putten, H., Barber, J.R., Verma, I.M. and Leffert, H.L. Proto-oncogene expression in regenerating liver is stimulated in cultures of primary adult rat hepatocytes. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:7929-7933.

- Kummel, L. y Pilkis, S.J. Multihormonal regulation of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:406-413.

- Kuo, C.F., Paulson, K.E. and Darnell Jr., J.E. Positional and developmental regulation of glutamine synthetase expression in mouse liver. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:4966-4971.

- Kupffer, C. (1876) *Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklunsmech* 12,353-358.

- Kurland, I.J. and Pilkis, S.J. Indirect versus direct routes of hepatic glycogen synthesis. (1989) *FASEB J.* 3:2277-2281.

- Kuwajima, M., Newgard, C.B., Foster, D.W. and McGarry, J.D. Time course and significance of changes in hepatic fructose 2,6-bisphosphate levels during refeeding of fasted rats. (1984) *J. Clin. Invest.* 74:1108-1111.

- Kuwajima, M., Golden, S., Katz, J., Unger, R.H., Foster, D.W. and McGarry, J.D. Active hepatic glycogen synthesis from gluconeogenic precursors despite high tissue levels of fructose 2,6-bisphosphate. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:2632-2637.

- LaBrecque, D.R., Steele, G., Fogerty, S., Wilson, M. and Barton, J. Purification and physical-chemical characterization of hepatic stimulator substance. (1987) *Hepatology* 7:100-106.

- Laitinen, J., Sistonen, L., Alitalo, K. and Hölttä, E. c-Ha-ras^{val 12} oncogene-transformed NIH-3T3 fibroblasts display more decondensed nucleosomal organization than normal fibroblasts. (1990) *J. Cell. Biol.* 111:9-17.

- Lamers, W.H., Hanson, R.W. and Meisner, H.M. cAMP stimulates transcription of the gene for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat liver nuclei. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5137-5141.

-
- Lange, A.J., Kummel, L., El-Maghrabi, M.R., Tauler, A., Colosia, A., Marker, A. and Pilgis, S.J. Sequence of the 5'-flanking region of the rat 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene: regulation by glucocorticoids. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:753-760.

 - Lau, L.F. and Nathans, D. Expression of a set of growth-related immediate-early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:1182-1186.

 - Lau, L.F. and Nathans, D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. (1985) *EMBO J.* 4:3145-3151.

 - Lech, K., Anderson, K. and Brent, R. DNA-bound fos proteins activate transcription in yeast. (1988) *Cell* 52:179-184.

 - Lee, K.A.W. Transcriptional regulation by cAMP. (1991) *Current Opinion In Cell Biology* 3:953-959.

 - Leffert, H.L., Alexander, N.M.; Faloona, G., Rubalcava, B. and Unger, R. Specific endocrine and hormonal receptor changes associated with liver regeneration in adult rats. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:4033-4036.

 - Leffert, H.L., Koch, K.S., Moran, T. and Rubalcava, B. Hormonal control of rat liver regeneration. (1979) *Gastroenterology* 76:1470-1482.

 - Leffert, H.L., Koch, K.S., Lu, X.P., Brenner, D.A., Karin, M., Skelly, H.F., Rippe, R.A., Fey, G. and Chojkier, M. Cellular and molecular biology of hepatocyte growth, regeneration and gene expression. (1990) In *The Biology and Medicine of Signal Transduction*, ed. Nishizuka *et al.*, Raven Press, New York. pp:352-358.

 - Lemaigre, F.P., Durviaux, S.M. and Rousseau, G.G. Identification of regulatory sequences and protein-binding sites in the liver-type promoter of a gene encoding 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11:1099-1106.

 - Liddle, C., Murray, M. and Farrell, G.C. Effect of liver regeneration on hepatic cytochrome P450 isozymes and serum sex steroids in the male rat. (1989) 96:864-872.

 - Little, P., Skouteris, G.G., Ord, M.G. and Stocken, L.A. Serum from partially hepatectomized rats induces primary hepatocytes to enter S phase: a role for prostaglandins?. (1988) *J. Cell Sci.* 91:549-553.

- Lively, M.O., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J., D'Angelo, G., Colosia, A.D., Ciavola, J.A., Fraser, B.A. and Pilkis, S.J. Complete amino acid sequence of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:839-849.

- Loiseau, A.M., Rider, M.H., Foret, D., Rousseau, G.G. and Hue, L. Rat hepatoma (HTC) cell 6-phosphofructo 2-kinase differs from that in liver and can be separated from fructose 2,6-bisphosphatase. (1988) *Eur. J. Biochem.* 175:27-32.

- Luetke, N.C., Michalopoulos, G.K., Teixido, J. Gilmore, R., Massagué, J. and Lee, D.C. Characterization of high molecular weight transforming growth factor alpha produced by rat hepatocellular carcinoma cells. (1988) *Biochemistry* 27:6487-6494.

- MacManus, J.P., Braceland, B.M., Youdale, T. and Whitfield, J.F. Adrenergic antagonists and a possible link between the increase in cyclic AMP and DNA synthesis during liver regeneration. (1973) *J. Cell. Physiol.* 82:157-164.

- MacManus, J.P. and Braceland, B.M. A connection between the production of prostaglandins during liver regeneration and the DNA synthetic response. (1976) *Prostaglandins* 11:609-620.

- Magnuson, M.A., Andreone, T.L., Printz, R.L., Koch, S. and Granner, D.K. Rat glucokinase gene: Structure and regulation by insulin. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4838-4842.

- Magnuson, M.A. Glucokinase gene structure: Functional implications of molecular genetic studies. (1990) *Diabetes* 39:523-527.

- Marker, A.J., Colosia, A.D., Tauler, A., Solomon, D.H., Cayre, Y., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J. Glucocorticoid regulation of hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase gene expression. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:7000-7004.

- Martín-Sanz, P., Cascales, M. and Boscá, L. Fructose 2,6-bisphosphate in isolated foetal hepatocytes (1987) *FEBS Lett.* 225:37-42.

- Martín-Sanz, P., Cascales, M. and Boscá, L. Characterization of 6-phosphofructo 2-kinase from foetal rat liver. (1991) Submitted to *Biochem. J.*

-
- **Matsuura, R., Tanigawa, Y., Tsuchiya, M., Mishima, K., Yoshimura, Y. and Shimoyama, M.** ADP-ribosylation suppresses phosphorylation of the L-type pyruvate kinase. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 969:57-65.
- **McGarry, J.D., Kuwajima, M., Newgard, C.B., Foster, D.W. and Katz, J.** From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. (1987) *Annu. Rev. Nutr.* 7:51-73.
- **McGowan, J.A., Strain, A.J. and Bucher, N.L.R.** DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. (1981) *J. Cell. Physiol.* 180:353-363.
- **McKnight, G.S. and Palmiter, R.D.** Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:9050-9058.
- **Mead, J.E. and Fausto, N.** Transforming growth factor α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1558-1562.
- **Mercer, J.F.B. and Wake, S.A.** An analysis of the rate of metallothionein poly(A)-shortening using RNA blot hybridization. (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:7929-7943.
- **Meyer, D.H., Bachem, M.G. and Gressner, A.M.** Bidirectional effects of Kupffer cells on hepatocyte proliferation in vitro. (1991) *FEBS Lett.* 283:150-154.
- **Mhon, K.L., Laz, T.M., Melby, A.E. and Taub, R.** Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated Balb/c 3T3 cells. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:21914-21921.
- **Mhon, K.L., Laz, T.M., Hsu, J.C., Melby, A.E., Bravo, R. and Taub, R.** The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes. *Mol. Cell. Biol.* (1991a) 11:381-390.
- **Mhon, K.L., Melby, A.E., Tewari, D.S., Laz, T.M. and Taub, R.** The gene encoding rat insulinlike growth factor-binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. (1991b) *Mol. Cell. Biol.* 11:1393-1401.

- Michalopoulos, G.K. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. (1990) *FASEB J.* 4:176-187.

- Michalopoulos, G.K., Houck, K.A., Dolan, M.L. and Luetke, N.C. Control of hepatocyte replication by two serum factors. (1984) *Cancer Res.* 44:4414-4419.

- Michalopoulos, G.K., Houck, K.A., Dolan, M.L. and Novicki, D.L. Control of proliferation of hepatocytes by two serum hepatopoietins. (1983) *Fed. Proc.* 42:1023.

- Miralpeix, M., Carballo, E., Bartrons, R., Crepin, K., Hue, L. and Rousseau, G.G. Oral administration of vanadate to diabetic rats restores liver 6-phosphofructo 2-kinase content and mRNA. (1992) *Diabetologia* (In the press).

- Mitaka, T., Sattler, C.A., Sattler, G.L., Sargent, L.M. and Pitot, H.C. Multiple cell cycles occur in rat hepatocytes cultured in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. (1991) *Hepatology* 13:21-30.

- Miura, Y. and Fukui, N. Prostaglandins as possible triggers for liver regeneration after partial hepatectomy. (1979) *Cell. Mol. Biol.* 25:179-184.

- Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Gohoda, E., Daikuhara, Y. and Kitamura, N. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:967-973.

- Moolten, F.L. and Bucher, N.L.R. Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agents by cross circulation. (1967) *Science* 158:272-274.

- Morley, C.G.D., Kuku, S., Rubenstein, A.H. and Boyer, J.L. Serum hormone levels following partial hepatectomy in the rat. (1975) *67:653-660.*

- Nagelkerke, J.F., Barto, K.P. and van Berkel, T.J.C. In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer, and parenchymal cells. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:12221-12227.

- Nakamura, T., Arakaki, R. and Ichihara, A. Interleukin-1 is a potent growth factor inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. (1988) *Exp. Cell. Res.* 179:488-497.

- Nakamura, T., Nawa, K. and Ichihara, A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122:1450-1459.

- Nakamura, T., Nawa, K., Ichihara, A., Kaise, N. and Nishino, T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. (1987) *FEBS Lett.* 224:311-316.

- Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. and Shimizu, S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. (1989) *Nature (London)*. 342:440-443.

- Nakamura, T., Teramoto, H. and Ichihara, A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6489-6493.

- Nakata, R., Tsukamoto, I., Miyoshi, M. and Kojo, S. Liver regeneration in streptozotocin-diabetic rats. (1986) *Biochemical Pharmacology* 35:865-867.

- Naldini, L., Weidner, K.M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzatto, C., Narsimhan, R.P., Hartman, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G.K., Birchmeier, W. and Comoglio, P.M. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. (1991) *The EMBO J.* 10:2867-2878.

- Nathans, D., Lau, L.F., Christy, B., Hartzell, S., Nakabeppu, Y. and Ryder, K. Genomic response to growth factors. (1988) In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. LIII pp:893-900.

- Nelson, K., Cimbala, M.A. and Hanson R.W. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) mRNA turnover in rat liver. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:8509-8515.

- Netter, F.H. *Sistema digestivo: hígado, vías biliares y páncreas*. 2 Edición. (1990) Ed. Salvat (Barcelona).

- Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase in diabetic rat liver by insulin and dietary. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:14393-14397.

- **Noguchi, T., Yamada, K., Inoue, H., Matsuda, T. and Tanaka, T.** The L- and R- type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:14366-14371.

- **O'Brien, R.M. and Granner, D.K.** PEPCK gene as model of inhibitory effects of insulin on gene transcription. (1990) *Diabetes Care* 13:327-339.

- **Olsen, P.S., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, K., Almdal, T., Poulsen, S.S. and Nexø, E.** Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. (1988) *Hepatology* 8:992-996.

- **Oquendo, P., Alberta, J., Wen, D., Graycar, J.L., Derynck, R. and Stiles, C.D.** The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:4133-4137.

- **Park E.A., Roesler, W.J., Liu, J., Klemm, D.J., Gurney, A.L., Thatcher, J.D., Shuman, J., Friedman, A. and Hanson R.W.** The role of the CCAAT/Enhancer-binding protein in the transcriptional regulation of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:6264-6272.

- **Pelech, S., Cohen, P., Fisher, M.J., Pogson, C.I., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J.** The protein phosphatases involved in cellular regulation. Glycolysis, gluconeogenesis and aromatic amino acid breakdown in rat liver. (1984) *Eur. J. Biochem.* 145:39-49.

- **Petropoulos, C., Andrews, G., Tamaoki, T. and Fausto, N.** α -Fetoprotein and albumin mRNA levels in liver regeneration and carcinogenesis. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:4901-4906.

- **Pilkis, S.J., Lively, M.O. and El-Maghrabi, M.R.** Active site sequence of hepatic fructose 2,6-bisphosphatase. Homology in primary structure with phosphoglycerate mutase (1987) *J. Biol. Chem.* 262:12672-12675.

- **Pilkis, S.J. and El-Maghrabi, M.R.** Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:755-783.

- **Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R. and Claus, T.H.** Fructose 2,6-bisphosphate in control of hepatic gluconeogenesis. From metabolites to molecular genetics. (1990) *Diabetes Care* 13:582-589.

-
- **Prat, M., Crepaldi, T., Gandino, L., Giordano, S., Longati, P. and Comoglio, P. C.** Terminal-truncated forms of met, the hepatocyte growth factor receptor. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11:5954-5962.

 - **Quinn, P.G., Wong, T.W., Magnuson, M.A., Shabb, J.B. and Granner, D.K.** Identification of basal and cyclic AMP regulatory elements in the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3467-3475.

 - **Quinn, P.G. and Granner, D.K.** Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cyclic AMP regulatory element. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3357-3364.

 - **Rabes, H.M., Tuzek H.V. and Wirshing, R.** Kinetics of hepatocellular proliferation after partial hepatectomy as a function of structural and biochemical heterogeneity of the rat liver. (1975) In "Liver Regeneration After Experimental Injury" (R, Lesch and W. Reutter, eds) pp:35-52. New York, Stratton International Medical Book Corporation.

 - **Raper, S.E., Burwen, S.J., Barker, M.E. and Jones, A.L.** Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. (1987) *Gastroenterology* 92:1243-1250.

 - **Rappaport , A.M.** The structural and functional unit in the human liver. (1958) *Anat. Rec.* 130:673-689.

 - **Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Loughheed, W.M. and Lotto, W.N.** Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. (1954) *Anat. Rec.* 119:11-27.

 - **Rauscher, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R. and Spiegelman, B.M.** Common DNA binding site for fos protein complexes and transcription factor AP-1. (1988) *Cell* 52:471-480.

 - **Rider, M.H., Foret, D. and Hue, L.** Comparison of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo 2-kinase. (1985) *Biochem. J.* 231:193-196.

 - **Rider, M.H. and Hue, L.** Phosphorylation of purified bovine heart and rat liver 6-phosphofructo 2-kinase by protein kinase C and comparison of the fructose 2,6-bisphosphatase activity of the two enzymes. (1986) *Biochem. J.* 240:57-61.

- **Rixon, R.H. and Whitfield, J.F.** An early mitosis determining event in regenerating rat liver and its possible mediation by prostaglandins or thromboxane. (1982) *J. Cell. Physiol.* 113:281-288.

- **Roesler, W.J., Vandenbark, G.R. and Hanson, R.W.** Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:9063-9066.

- **Rollins, B.J., Morrison, E.D. and Stiles C.D.** Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factors whose product has cytokine-like properties. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3738-3742.

- **Rosa, J.L., Bartrons, R. and Tauler, A.** Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. (1991b) Submitted to *Biochem. J.*

- **Rosa, J.L., Tauler, A., Lange, A.J., Pilkis, S.J. and Bartrons, R.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase during liver regeneration. (1991a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (In the press).

- **Rosa, J.L., Ventura, F., Carreras, J. and Bartrons, R.** Fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo 2-kinase during liver regeneration. (1990) *Biochem. J.* 270:645-649.

- **Rubin, R.A., O'keefe, E.J. and Earp, H.S.** Alteration of epidermal growth factor-dependent phosphorylation during rat liver regeneration. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:776-780.

- **Ruppert, S., Boshart, M., Bosch, F.X., Schmid, W., Fournier, R.E.K. and Schütz, G.** Two genetically defined trans-acting loci coordinately regulate overlapping sets of liver-specific genes. (1990) *Cell* 61:895-904.

- **Russell, W.E. and Bucher, N.L.R.** Vasopressin modulates liver regeneration in the Brattleboro rat. (1983) *Am. J. Physiol.* 245:G321-G324.

- **Russell, W.E.** Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits hepatocyte DNA synthesis independently of EGF binding and EGF receptor autophosphorylation. (1988) *J. Cell. Physiol.* 135:253-261.

- **Russell, W.E., Coffey, R.J., Ouellette, A.J. and Moses, H.L.** Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:5126-5130.

-
- Ryseck, R.P., MacDonald-Bravo, H., Mattei, M.G. and Bravo, R. Cloning and sequence of a secretory protein induced by growth factors in mouse fibroblasts. (1989) *Exp. Cell Res.* 180:266-275.
- Sakakibara, R., Kitajima, S. and Uyeda, K. Differences in kinetic properties of phospho and dephospho forms of fructose 6-phosphate 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:41-46.
- Sakata, J. and Uyeda, K. Bovine heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: Complete amino acid sequence and localization of phosphorylation sites. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4951-4955.
- Sakata, J., Abe, Y. and Uyeda, K. Characterization of two isozymic forms of heart fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 180:470-474.
- Sakata, J., Abe, Y. and Uyeda, K. Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:15764-15770.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Second edition.
- Sandness, D., Sand, T.E., Sager, g., Bronstad, G.O., Refsnes, M.R., Gladhaug, I.P., Jacobsen, S. and Christoffersen, T. Elevated level of β -adrenergic receptors in hepatocytes from regenerating rat liver. (1986) *Exp. Cell. Res.* 165:117-126.
- Sasaki, K., Cripe, T.P., Koch, S.R., Andreone, T.L., Petersen, D.D., Beale, E.G. and Granner, D.K. Multihormonal regulation of phosphoenolpyruvate carboxikinase gene transcription. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:15242-15251.
- Sasaki, K. and Granner, D.K. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxikinase gene transcription by insulin and cAMP: Reciprocal actions on initiation and elongation. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2954-2958.
- Sato, S., Matsushima, T. and Sugimura T. Hexokinase isozyme patterns of experimental hepatomas of rats. (1969) *Cancer Res.* 29:1437-1446.

- Schofield, P.S., McLees, D.J., Myles, D.D. and Sugden, M.C. Ketone-body metabolism after partial hepatectomy in the rat. (1985) *Biochem. J.* 231:225-228.

- Schofield, P.S., Kerbey, A.L. and Sugden, M.C. Hepatic pyruvate metabolism during liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. (1986) *Int. J. Biochem.* 18:453-458.

- Schofield, P.S., Sugden, M.C., Costorphine, C.G. and Zammit, V.A. Altered interactions between lipogenesis and fatty acid oxidation in regenerating rat liver. (1987) *Biochem. J.* 241:469-474.

- Schwarz, L.C., Damen, J.E., Greenberg, A.H. and Wright, J.A. (1988) Altered responsiveness of metastatic versus non-metastatic fibroblasts to heparin-binding growth factors. (1988) *Cancer Lett.* 42:193-197.

- Seglen, P.O. Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. (1973) *Exp. Cell. Res.* 82:391-398.

- Selden, C., Jones, M., Wade, D. and Hodgson, H. Hepatotropin mRNA expression in human foetal liver development and in liver regeneration. (1990). *FEBS Lett.* 270:81-84.

- Sell, S. and Dunsford, H.A. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. (1989) *Am. J. Pathol.* 134:1347-1363.

- Shafritz, D.A. Transcriptional and post-transcriptional control of liver gene expression during various physiologic and pathophysiologic states. (1988) *Seminars in liver disease* 8:285-292.

- Shen, T.Y. and Winter, C.A. Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their analogues. (1977) *Adv. Drug Res.* 12:89-245.

- Shi, Y.E. and Yager, J.D. Effects of the liver tumor promoter ethinyl estradiol on epidermal growth factor-induced DNA synthesis and epidermal growth factor receptor levels in cultured rat hepatocytes. (1989) *Cancer Res.* 49:3574-3580.

- Shimoyama, M., Tanigawa, Y., Ushiroyama, T., Tsuchiya, M. and Matsuura, R. In: ADP-ribosylation of proteins (F.R. Althause, H. Hilz, S. Shall, eds.) (1985) Springer-verlag, Berlin. pp:74-81.

-
- Sies, H. Liver heterogeneity: intercellular and intracellular. (1987) *Biochem. Soc. Trans.* 621st Meeting, London. 15:359-360.

 - Sies, H. *Metabolic Compartmentation*. (1982) Academic Press, London. pp:1-6.

 - Simek, J., Chmelar, V., Melka, J., Pazderka, J. and Charvat, Z. Influence of protracted infusion of glucose and insulin on the composition and regeneration activity of liver after partial hepatectomy in rats. (1967) *Nature (London)* 213:910-911.

 - Skouteris, G.G., Ord, M.G. and Stocken, L.A. Regulation of the proliferation of primary rat hepatocytes by eicosanoids. (1988) *J. Cell. Physiol.* 135:516-520.

 - Sobczak, J., Tournier, M.F., Lotti, A.M. and Duguet, M. Gene expression in regenerating liver in relation to cell proliferation and stress. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180:49-53.

 - Sporn, M.B. and Roberts, A.B. Transforming growth factor-beta: new chemical forms and new biological roles. (1988) *Biofactors* 1:89-93.

 - Stewart, H.B., El-Maghrabi, M.R. and Pilgis, S.J. Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphatase. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:12935-12941.

 - Tajima, H., Matsumoto, K. and Nakamura, T. Hepatocyte growth factor has potent anti-proliferative activity in various tumor cell lines. (1991) *FEBS Lett.* 291:229-232.

 - Takai, S., Nakamura, T., Komi, N. and Ichihara, A. Mechanism of stimulation of DNA synthesis induced by epinephrine in primary culture of adult rat hepatocytes. *J. Biochem.* 103:848-852.

 - Taniyama, M., Kitamura, K., Thomas, H., Lawson, J.W.R. and Uyeda, K. Isozymes of fructose 6-phosphate 2-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase in rat and bovine heart, liver, and skeletal muscle. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:949-954.

 - Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S. and Nakamura, T. Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3200-3204.

- **Tauler, A., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J.** Functional homology of 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase, phosphoglycerate mutase, and 2,3-bisphosphoglycerate mutase. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:16808-16815.

- **Tauler, A., Rosenberg, A.H., Colosia, A., Studier, F.W. and Pilkis, S.J.** Expression of the bisphosphatase domain of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in *Escherichia coli*. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6642-6646.

- **Tauler, A., Lange, A.J., El-Maghrabi, M.R. and Pilkis, S.J.** Expression of rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase and its kinase domain in *Escherichia coli*. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7316-7320.

- **Tauler, A., Lin, K. and Pilkis, S.J.** Hepatic 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase. Use of site-directed mutagenesis to evaluate the roles of His-258 and His-392 in catalysis. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:15617-15622.

- **Thayer, M.J. and Fournier, R.E.K.** Hormonal regulation of TSE1-repressed genes: evidence for multiple genetic controls in extinction. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9:2837-2846.

- **Thompson, N.L., Mead, J.E., Braun, L., Goyette, M., Shank, P.R. and Fausto, N.** Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. (1986) *Cancer Res.* 46:3111-3117.

- **Thurman, R.G, Kauffman, F.C. and Jungermann, K.** Regulation of hepatic metabolism. Intra and intercellular compartmentation. (1986) Plenum Press, New York.

- **Tsubouchi, H., Hirono, S., Ghoda, E., Nakayama, H., Takahashi, K., Sakiyama, O., Miyazaki, H., Sugihara, J., Tomita, E., Muto, Y., Daikuhara, Y. and Hashimoto, S.** Clinical significance of human hepatocyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. (1989) *Hepatology* 9:875-881.

- **Tsubouchi, H., Niitani, Y., Hirono, S., Nakayama, H., Ghoda, E., Arakaki, N., Sakiyama, O., Takahashi, K., Kimoto, M., Kawakami, S., Setoguchi, M., Tachikawa, T., Shin, S., Arima, T. and Daikuhara, Y.** Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. (1991) *Hepatology* 13:1-5.

-
- **Tsakamoto, I. and Kojo, S.** Effect of glucocorticoid on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. (1989) *Gut* 30:387-390.

 - **Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.

 - **Van Berkel, T.J.C.** The role of non-parenchymal cells in liver metabolism. (1979) *Trends Biomed. Sci.* 4:202-205.

 - **Van Schaftingen, E., Hue, L. and Hers, H.G.** Control of the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. (1980) *Biochem. J.* 192:887-895.

 - **Van Schaftingen, E. and Hers, H.G.** Purification and properties of phosphofructokinase 2/fructose 2,6-bisphosphatase from chicken liver and from pigeon muscle. (1986) *Eur. J. Biochem.* 159:359-365.

 - **Van Schaftingen, E.** Fructose 2,6-bisphosphate. (1987) *Adv. Enzymology* 59:315-395.

 - **Vaulont, S., Munnich, A., Decaux, J.F. and Kahn, A.** Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:7621-7625.

 - **Ventura, F., Rosa, J.L., Ambrosio, S., Gil, J. and Bartrons, R.** 6-Phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase in rat brain. (1991) *Biochem. J.* 276:455-460.

 - **Verity, M.A., Travis, G. and Brown, W.J.** Glycogen mobilization after partial hepatectomy. (1972) *Laboratory Investigation* 27:108-114.

 - **Vintermyr, O.K. and Doskeland, S.O.** Cell cycle parameters of adult rat hepatocytes in a defined medium. A note on the timing of nucleolar DNA replication. (1987) *J. Cell. Physiol.* 132:12-21.

 - **Wall, S.R., Van den Hove, M.F., Crepin, K.M., Hue, L. and Rousseau, G.G.** Thyroid hormone stimulates expression of 6-phosphofructo 2-kinase in rat liver. (1989) *FEBS Lett.* 257:211-214.

 - **Widmann, J.J., Cotran, R.S. and Fahimi, H.D.** Mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells. Identification of two functional cell types in rat liver sinusoids by endogenous peroxidase activity. (1972) *J. Cell. Biol.* 52:159-170.

- Wolf, H.K., Zarnegar, R. and Michalopoulos, G.K. Localization of hepatocyte growth factor in human and rat tissues: an immunohistochemical study. (1991) *Hepatology* 14:488-494.

- Wollenberg, G.K., Harris, L., Farber, E. and Hayes, M.A. Inverse relationship between epidermal growth factor induced proliferation and expression of high affinity surface epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes. (1989) *Lab. Invest.* 60:254-259.

- Wollenberg, G.K., Semple, E., Quinn, B.A. and Hayes, M.A. Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic and neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor- β . (1987) *Cancer Res.* 47:6595-6599.

- Woodgett, J.R., Gould, K.L. and Hunter, T. Substrate specificity of protein kinase C. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161:177-184.

- Yokoyama, H.O., Wilson, M.E., Tsuboi, K.K. and Stowell, R.E. Regeneration of mouse liver after partial hepatectomy. (1953) *Cancer Res.* 13:80.

- You-Warren, H., Monahan, J.E., Short, J., Short, H., Bruzel, A., Wynshaw-Boris, A., Meisner, H.M., Samols, D. and Hanson, R.W. Isolation and characterization of the gene coding for cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from the rat. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3656-3660.

- Younger, L.P., King, J. and Steiner, D.F. Hepatic proliferative response to insulin in severe alloxan diabetes. (1966) *Canc. Res.* 26:1408.

- Zarnegar, R., DeFrances, M.C., Kost, D.P., Lindroos, P. and Michalopoulos, G.K. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 177:559-565.

- Zarnegar, R., Muga, S., Rahija, R. and Michalopoulos, G.K. Tissue distribution of HPTA, a heparin-binding polypeptide growth factor for hepatocytes. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1252-1256.

- Zarnegar, R. and Michalopoulos, G.K. Purification and biological characterization of human hepatopietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. (1989) *Cancer Res.* 49:3314-3320.

- Zoli, M., Marchesini, H., Melli, A., Viti, G., Marra, A., Marrano, D. and Pisi, E.
Evaluation of liver volume and liver function following hepatic resection in man. (1986) *Liver* 6:286-291.

