

**INTERCONVERSIONS METABÒLIQUES DE L'UDPG :
 α -GLUCAN GLUCOSIL-TRANSFERASA**

Comunicació presentada el dia 22 d'abril de 1971 pel doctor

M. ROSELL i PÉREZ

Càtedra de Bioquímica. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona

INTRODUCCIÓ

La glucogeno-sintetasa (UDPG: α -1,4-glucan α -4-glucosil-transferasa; C. E. 2.4.1.11) de múscul de rata fou descoberta, de manera gairebé simultània, l'any 1958, per VILLAR i PALASÍ i LARNER²⁵ per un costat i per LEOIR i col·legues per l'altre.¹¹ L'enzim fou analitzat des del punt de vista cinètic per ROSELL i PÉREZ i altres,¹⁵ i hom demostrà ben aviat que l'enzim podia trobar-se en dues formes diferents caracteritzades per les seves constants cinètiques i per altres propietats. Aquestes formes podien ésser obtingudes raonablement en forma de preparacions d'activitat enriquida, que es distingien pel requeriment del cofactor glucosa-6-fosfat per part d'una d'elles per a donar activitat.¹⁵ A causa d'això foren anomenades formes «D» i «I» de la glucogeno-sintetasa; la primera absolutament dependent de la glucosa-6-fosfat com a activador al·lostèric, i independent d'aquest cofactor la segona; malgrat tot, aquesta podia mostrar activació pel sucre-fosfat a concentracions no saturants de l'UDPG.

INTERCONVERSIONS DE LES DUES FORMES

El 1961, ROSELL i PÉREZ i LARNER presentaren evidències, primer a Atlantic City¹³ i després a Xicago,¹⁴ indicant que les dues formes eren interconvertibles *in vitro*.

La forma independent (forma I) podia augmentar en detriment de la forma D per preincubació del material *in vitro* a 30 °C en presència de mercaptoetanol, un protector de grups sulfhidril. La forma D podia ésser obtinguda de la I per l'addició d'ATP i magnesi als extrems preincubats i preincubant de nou en condicions adequades.

FRIEDMAN i LARNER⁸ demostraren que el canvi produït en els extrems de múscul per aquestes manipulacions *in vitro* era permanent i afectava la proteïna enzimàtica, així com també el fet que aquests processos portaven com a conseqüència un intercanvi de fosfat inorgànic. Afegint ATP i magnesi es produïa una incorporació del fosfat terminal de l'ATP a la proteïna enzimàtica, amb què era originada la forma D fosforilada. La

incubació d'aquesta forma, aïllada per cromatografia de columna, junt amb extreus crus en presència de mercaptoetanol, eliminava fosfat inorgànic radioactiu a partir de la proteïna radioactiva (P 32), i aquest anió restava en el medi d'incubació durant el procés de transformació de la forma D a la forma I.

A causa de tot això, hom postulà que aquestes transformacions devien ésser portades a terme per mitjà d'una fosfoproteïno-fosfatasa pel pas de D a I, i per una proteïno-quinasa per a la interconversió contrària. ROSELL I PÉREZ i LARNER demostraren^{17, 18} que aquests sistemes eren també funcionals en el múscul estriat de gos, i que en aquest cas la presència de mercaptoetanol era altament estimuladora del pas de D a I, i que l'àcid adenílic cíclic (un activador de les proteïno-quinases) era molt efectiu en el sentit d'estimular l'acció provocada per l'addició d'ATP i de magnesi. Aquest últim fet fou confirmat per APPLEMAN i col·laboradors,² a l'Argentina pel que es refereix als sistemes musculars de la rata.

D'aquesta manera es va constatar que la glucogeno-sintetasa de múscul és un sistema enzimàtic amb dues formes, una activa (la forma I) i una altra de menys activa (la forma D), interconvertibles metabòlicament per mitjà de sistemes fosforilitzants i desfosforilitzants amb intervenció de quinases i fosfatases.

Aquests sistemes descoberts *in vitro* han estat correlacionats i confirmats amb experiments *in vivo* portats a terme per altres investigadors.^{4, 5, 12, 23}

ALTRES TIPUS DE CONVERSIONS

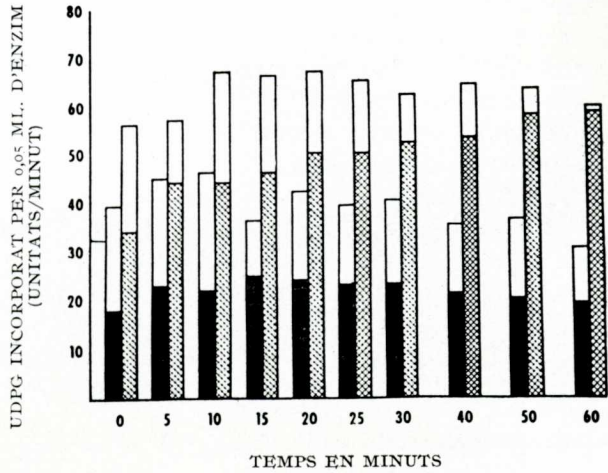
Aquí vull enfocar l'atenció sobre una sèrie de dades experimentals que, començades a recollir ja fa anys, semblen donar base a la convicció que les interconversions metabòliques entre les dues formes de glucogeno-sintetasa esmentades abans, poden ésser encara més complexes, i també que els mecanismes de regulació metabòlica d'aquests enzims poden incloure la formació d'espècies moleculars totalment inactives més o menys fosforilades que el que ho estan les formes I i D. Per tot això presentaré dades experimentals obtingudes amb preparacions enzimàtiques de músculs de diverses espècies animals i de diferents òrgans.

Ja el 1961 observàrem, en extreus de múscul de granota, un comportament curiós durant la incubació, la interpretació del qual vam publicar més tard.¹⁶ Quan els extreus de múscul de granota eren preincubats en presència de mercaptoetanol es produïa un fenomen completament diferent de l'observat en un tractament similar dels extreus de múscul de rata, com podem veure a la figura 1.¹⁵

FIG. 1. — Efecte de la preincubació en presència de mercaptoetanol sobre l'activitat de la glucogeno-sintetasa del múscul de rata.

L'alçada total de les barres representa l'activitat mesurada en presència de 10 mM de glucosa-6-fosfat. La part fosca de les barres assenjala l'activitat amb manca de glucosa-6-fosfat (activitat independent) amb (barres ratllades) o sense (barres negres) 0,05 M de mercaptoetanol.

(Rosell i Pérez, M., Villar i Palasi, C. i Larner, J. «Biochemistry»: 1, 763, 1962.)



En aquests extrems de rata l'activitat mesurada en absència de la glucosa-6-fosfat (forma I) augmenta amb el temps, mentre que l'activitat mesurada en presència de l'activador al·lostèric (en aquest cas activitat

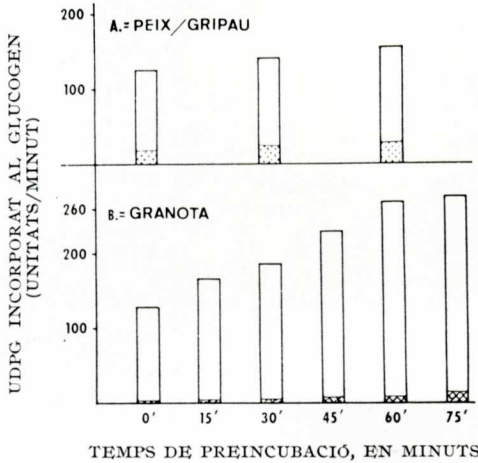


FIG. 2. — Efecte de la preincubació sobre l'activitat de la glucogeno-sintetasa d'extrets enzimàtics musculars de peix gripau (A) i de granota (B).

L'alçada total representa l'activitat en presència de 10 mM de glucosa-6-fosfat. La part ratllada és l'activitat sense afegir-hi l'activador. El mercaptoetanol 0,05 M era present en aquests extrems.

(Rosell i Pérez, M. i Larner, J. «Biochemistry»: 1, 769, 1962.)

total) roman pràcticament constant. Aquest fet fou interpretat con una transformació de la forma D en I. La figura 2 assenjala el comportament dels extrems de múscul de granota sotmesos a condicions experimentals similars; podem observar-hi un efecte diferent de l'anterior: la preincubació en presència o absència de mercaptoetanol provoca un increment de l'acti-

vitat només en el cas que aquesta sigui mesurada en presència de la glucosa-6-fosfat, ja que l'activitat mesurada en absència de l'activador era pràcticament nul·la i no apareixia ni tan sols en les millors condicions de preincubació.

En aquella època aquests fets foren interpretats ja com l'aparició de forma D a partir d'un precursor o precursors de l'enzim que eren inactius prèviament.

EXPERIMENTS AMB MÚSCUL DE GOS

Un segon tipus de dades experimentals relacionades amb el problema que ens ocupa sorgí del meu treball sobre preparacions de múscul de gos.¹⁸ La figura 3 mostra què passava en alguns experiments preparats per a aconseguir una transformació de la forma D en la I.

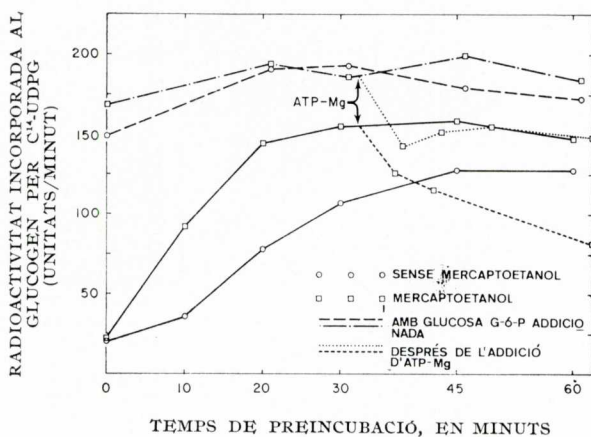


FIG. 3. — Efecte de la preincubació i posterior addició d'ATP-Mg sobre la glucogeno-sintetasa de múscul de gos.

El mercaptoetanol afegit era 0,05 M; l'ATP, 5 mM, i el Cl_2Mg , 10 mM.
(Rosell i Pérez, M. i Larner, J. «Biochemistry»: 3, 81, 1964.)

Quan hi afegíem ATP-Mg podíem observar una minva inicial de l'activitat total, que s'estabilitzava amb el temps, mentre que l'activitat I disminuïa, i donava llavors la transformació d'I en D.

Aquí sembla que es produïa alguna inactivació, bé en la forma D o bé en la I, en afegir ATP i Mg, durant els primers minuts posteriors a aquesta addició.¹⁸

Un altre tipus d'experiment significatiu fou aconseguit també en el treball sobre el múscul de gos amb la utilització d'UTP i Mg en lloc de l'ATP i Mg. La figura 4 mostra què passava en aquests extrems quan hom hi afegia quantitats equimolars d'ATP i d'UTP amb Mg. També hom hi afegí el 3',5'-AMP juntament amb l'ATP. Mentre el nucleòtid

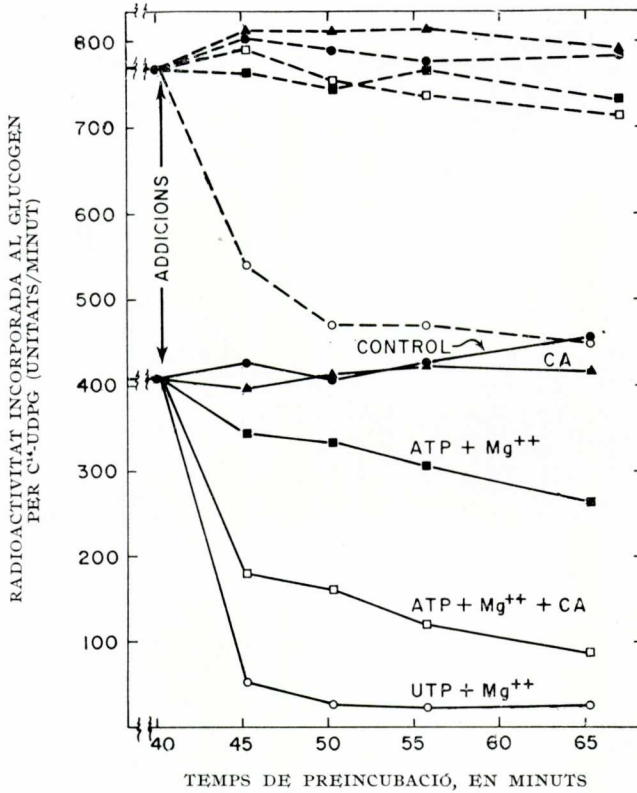


FIG. 4. — Efecte de l'addició d'ATP-Mg sobre la glucogeno-sintetasa de múscul de gos.

L'extret enzimàtic fou preincubat durant 40 minuts abans de l'experiment. Hom hi veu l'efecte de l'addició del nucleòtid 3',5'-AMP (CA) amb ATP-Mg i sense. Les concentracions d'ATP i UTP eren 5 mM i 10 mM de Cl₂Mg.

(Rosell i Pérez, M. i Larner, J. «Biochemistry»: 3, 81, 1964.)

cíclic estimulava fortament la transformació induïda per l'ATP-Mg, hom comprovà que l'addició d'UTP i Mg era encara més efectiva. En aquest cas, malgrat tot, i diferent dels altres casos, l'activitat total disminuïa de manera paral·lela a la de la I. Per tal com després de 25 minuts d'aquesta addició l'única activitat present era la que depenia de la glucosa-6-fosfat,

aquest comportament fou interpretat com una inactivació selectiva de la forma I de l'enzim induïda per l'UTP-Mg.

Si aquesta inactivació era produïda per fosforilació de la forma I, la forma inactiva resultant havia d'ésser més fosforilada que la forma I i menys que la D, ja que la transformació de D a I no tingué lloc.

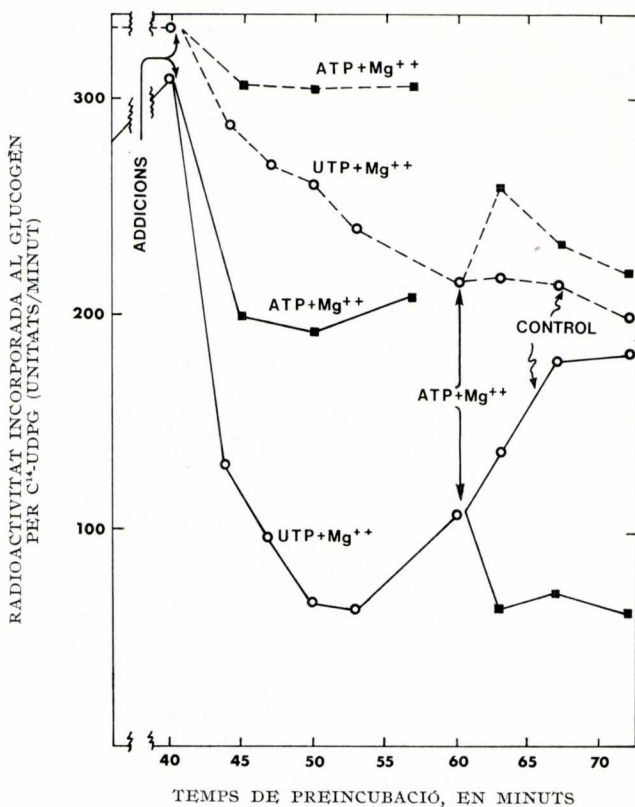


FIG. 5. — Efecte de l'addició d'ATP-Mg després d'una addició prèvia d'UTP-Mg.

Com en la figura anterior, l'extret fou preincubat prèviament amb 0,05 M de mercaptoetanol durant 40 minuts abans de les addicions. Passat aquest temps, hi foren afegits ATP-Mg i UTP-Mg, i 20 minuts després hom hi afegí més ATP-Mg en l'extret que ja duïa UTP-Mg. Les concentracions utilitzades són 5 mM per a l'ATP i l'UTP i 10 mM per al Cl_2Mg .

(Rosell i Pérez, M., dades no publicades.)

La figura 5 il·lustra un altre experiment preparat per a provar la interpretació discutida més amunt. Si aquesta fos correcta, l'extrafosforilació d'aquest intermediari inactiu, produïda per una nova addició d'ATP

i Mg, hauria de donar lloc a un increment de la forma D, per transformació de la forma inactiva menys fosforilada a la forma molecular més fosforilada i glucosa-6-fosfat dependent. Aquest postulat és el que aparentment sosté aquest tipus d'experiment. Hom pot veure que, després de la addició d'UTP-Mg, ha estat afegit de nou ATP-Mg. Pot ésser observat també, al mateix temps, un decreixement de l'activitat I romanent, juntament amb un augment significatiu de l'activitat D. Interpretem això com una transformació d'I a D més una transformació de forma inactiva a forma D deguda a una extrafosforilació de l'intermediari inactiu.

Mentre que la formació d'una o més espècies moleculars inactives en els sistemes enzimàtics de la glucogeno-sintetasa sembla que és obvia a causa d'aquests experiments, els que no resten clars són els mecanismes de la formació, la posició intermèdia entre les formes D i I o la possibilitat de formació de formes moleculars encara més fosforilades que les formes D.

EXPERIMENTS AMB MÚSCUL DE GRANOTA

L'increment de l'activitat D en l'activitat de la sintetasa de múscul de granota deguda a la incubació, ja assenyalada abans, resulta estimulada per la presència de mercaptoetanol, i recentment hem demostrat¹ que resulta fortament incrementada pels ions de magnesi.

L'any 1966²⁰ assenyalàrem que l'addició d'ATP-Mg als extrems crus de múscul (fig. 6) produïa una inactivació dependent del temps en la forma D de l'enzim d'aquest origen. Aquí podem veure també l'estimulació produïda només pel Mg^{2+} i que fou explicada per l'alteració produïda per aquest catió sobre la K_a de l'activador al·lostèric necessari glucosa-6-fosfat, que es redueix deu vegades quan el magnesi és present, fent així l'activador més efectiu.²⁰

Ja hem estudiat una mica més sobre aquest comportament. La mateixa figura 6 presenta un experiment amb extrems de múscul de granota en el qual la preincubació fou efectuada en presència de Cl_2Mg 10 mM. L'augment en l'activitat D és impressionant (més de 4 vegades més), mentre que l'activitat sense la glucosa-6-fosfat afegida pràcticament no apareix. Als 20 minuts de preincubació hi foren afegides diferents quantitats d'ATP i també de 3',5'-AMP. Podem observar que la inactivació produïda per aquestes addicions és dependent tant del temps com de la concentració d'ATP afegit. Podem apreciar també que la presència del cicloadenilat fa més efectiva la concentració 1 mM d'ATP, i produeix, després de 25 minuts de l'addició, la mateixa inactivació total que una concentració d'ATP sol, cinc vegades més gran.

En la figura 7 presentem el comportament d'aquest enzim quan ha estat purificat per ultracentrifugació a $100.000 \times g$ durant 90 minuts. El precipitat de glucogen obtingut es va resuspendre amb la meitat del seu volum original en amortidor de Tris-EDTA-mercaptoetanol. Així no es troba gens d'activitat I, fins i tot després de 65 minuts de preincubació

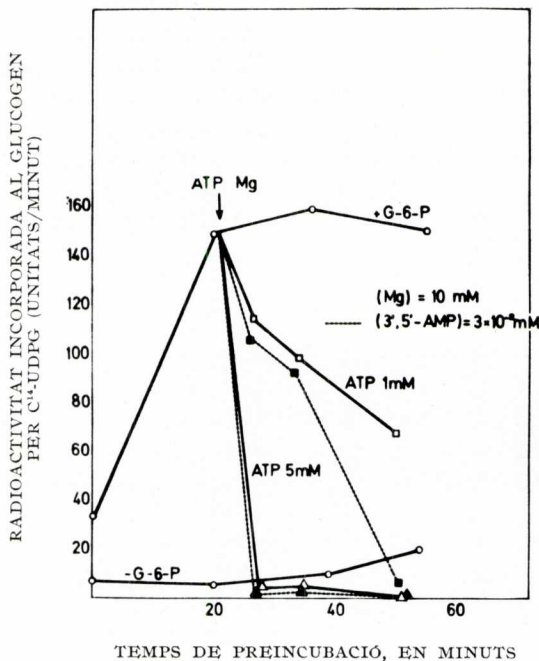


FIG. 6. — Efecte de la preincubació i addició de l'ATP-Mg sobre la forma D (glucosa-6-P) dependent de la glucogeno-sintetasa del múscul de granota.

Els extrems crus de l'enzim foren preincubats a 30°C en presència de 50 mM mercaptoetanol i després de 20 minuts hi foren fetes les addicions indicades, bo i provant l'activitat de la glucogeno-sintetasa en parts al·lòtiques preses en els temps indicats. Cl_2Mg fou 10 mM, i $3',5'$ -AMP, 0,03 mM.

(Albert, J. L. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.» : 25, 130, 1970.)

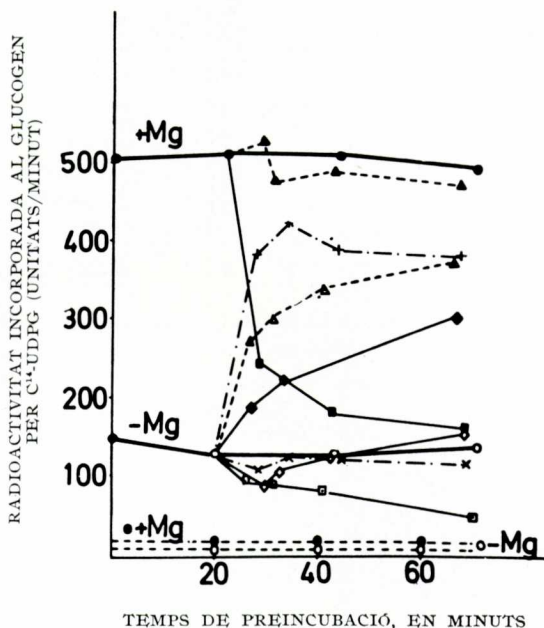
amb, o sense, Mg afegit prèviament. La presència d'ions de magnesi produïa una activació tres o quatre vegades més alta àdhuc al temps 0 de preincubació. Després de 20 minuts de preincubació a 30°C foren provades diverses addicions. L'ATP i el Mg, en concentracions de 5 i 10 mM respectivament, produïen un decreixement de l'activitat que depèn del temps, com en els extrems crus, en les dues activitats D (amb Mg afegit prèviament i sense). Si la concentració d'ATP és reduïda a 1 mM sense alterar la concentració de magnesi (10 mM), no pot ésser observat cap efecte en la preparació enzimàtica amb Mg afegit prèviament, i pot ésser notat un increment de l'activitat en lloc d'un decreixement en la preparació paral·lela sense Mg. El fet que aquest increment sigui degut al Mg pot ésser demostrat afegint només Mg en aquest punt.

L'activitat D puja pràcticament als mateixos nivells de la que té magnesi

des del començament (en altres experiments arriba exactament als mateixos nivells). L'ATP sol, sense magnesi, no té efecte. L'addició de 3',5'-AMP ($5 \times 10^{-5}M$) amb baixes concentracions d'ATP (1 mM) no evita l'acció del magnesi sinó que només la disminueix per competència amb el catíon.

FIG. 7. — Efecte de l'addició de Mg^{2+} i ATP-Mg sobre la fracció particulada de la glucogeno-sintetasa del múscul de granota.

Les preparacions enzimàtiques foren resuspeses en amortidor Tris-EDTA després d'una centrifugació dels extrems a $100.000 \times g$ durant 90 minuts. Hom afegí mercaptoetanol a la suspensió fins a 50 mM, i aquesta fou dividida en dues parts alíquotes, a una de les quals fou afegit Cl_2Mg 10 mM. Fou preincubada i als 20 minuts hom hi féu les addicions pertinents, i fou mesurada l'activitat enzimàtica després de les addicions en els intervals de temps que indica la figura.



Concentracions

d'ATP-Mg	5-10 mM : ■-■	ATP sol	5 mM : □-□
	1-10 mM : ▲-▲		10 mM : △-△
	1-10 mM més 5×10^{-5} 3',5' AMP : ◆-◆	Mg^{2+} sol	5 mM : ×-×
	1-5 mM més 5×10^{-5} 3',5' AMP : ○-○		10 mM : +-+

(Albert, J. L. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.» : 26, 130, 1970.)

El magnesi, així, sembla que exerceix la seva influència en més d'un nivell pel que respecta a aquest sistema enzimàtic.

TRANSFORMACIONS AMB EL MÚSCUL DE COR DE RATA

Ara vull mostrar alguns altres experiments il·lustratius fets amb preparacions de múscul cardíac de rata.

Quan són preincubats extrems normals de múscul cardíac de rata a 30 °C en presència de mercaptoetanol 50 mM, hi ha un increment de l'activitat I al llarg del temps de la preincubació, sense mostrar un canvi

excessiu de l'activitat total (mesurada en presència de glucosa-6-fosfat 10 mM). Això pot ésser vist a la figura 8. Sense mercaptoetanol, l'augment en l'activitat I és molt menys apreciable.

En altres experiments, com aquest que podem veure a la figura, hi ha també un augment en l'activitat total, especialment quan hi ha poc o molt de Mg present. De tota manera, la proporció d'activitat + glucosa-6-fosfat / — glucosa-6-fosfat, disminueix, és a dir, «l'activitat intrínseca» augmenta. Si hi afegim ions de magnesi, fins a 8-10 mM, l'activitat I augmenta més de pressa i fins més amunt que l'altra, i la transformació de D a I és més completa en menys temps. La transformació total de D a I pot ésser aconseguida en 30 minuts.

L'activitat total en aquestes condicions (de 8 a 10 mM de Mg^{2+}) és més alta als 0 minuts de preincubació quan el catió ha estat afegit prèviament. L'augment de l'activitat total per efecte de la preincubació en

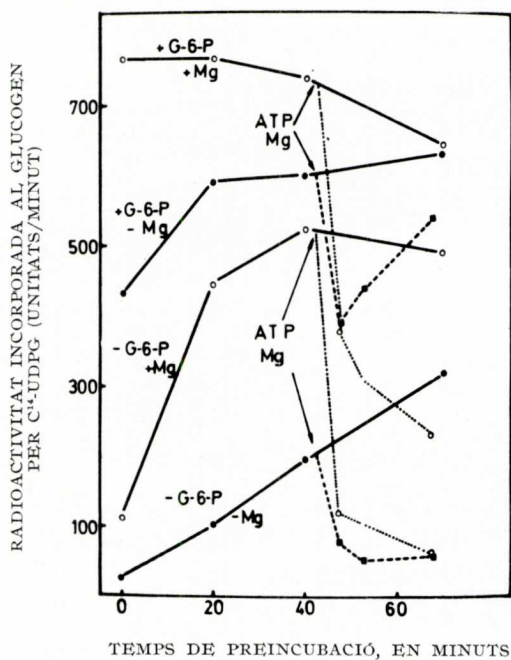


FIG. 8. — Efecte de la preincubació i de l'addició d'ATP-Mg sobre la glucogeno-sintetasa del múscul cardíac de rata.

Les preincubacions foren dutes a terme de manera similar a les figures anteriors. Als 40 minuts hom hi afegí ATP-Mg (1-8 mM, respectivament): hom en comprovà l'activitat a intervals després de l'addició. En una de les preparacions (+Mg) hi havia 10 mM de Cl_2Mg . Les ratlles fraccionades mostren l'activitat després de l'addició.

(Sacristán, A. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)

absència de magnesi és més o menys lent, però normalment arriba, amb el temps, fins als nivells de l'activitat total amb magnesi.

Si hom hi afegeix ATP-Mg (1 i 8 mM respectivament) algun temps després del període de preincubació, la transformació pot ésser tornada endarrera amb algun comportament característic.

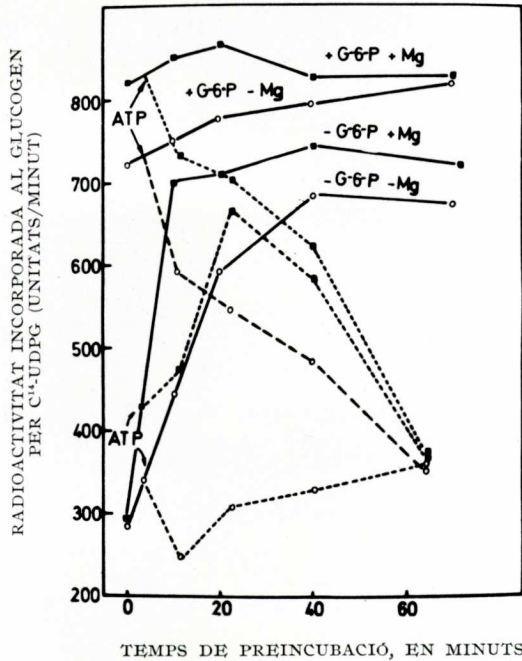
En aquesta figura podem veure que l'addició d'ATP-Mg als extrems enzimàtics, després de 40 minuts de preincubació, produeix diferents efectes que depenen de la presència prèvia d'alguna concentració de magnesi en els extrems. En els que fou afegit prèviament el magnesi, produeix un decreixement en l'activitat I amb una baixada pràcticament igual en l'activitat total. Quan l'addició d'ATP-Mg és portada a terme sobre un extrem enzimàtic sense Mg^{2+} , podem apreciar un decreixement en l'activitat I i també en l'activitat total, bé que aquesta última es recupera en els primers 5 minuts i augmenta amb el temps. Al final, tot el que resta és pràcticament activitat D.

Ara, en la figura 9 veiem què s'esdevé quan modifiquem una mica les condicions de l'experiment. En aquest cas tenim també un extrem enzimàtic amb Mg^{2+} prèviament afegit i sense. L'ATP-Mg hi fou afegit molt

FIG. 9 — Efecte de l'addició d'ATP-Mg (5-10 mM, respectivament) als tres minuts de preincubació de la glucogeno-sintetasa de múscul cardíac.

Les ratlles fraccionades, igual que en la figura anterior, mostren les activitats després de l'addició. Cl_2Mg (10 mM) era present en una de les preparacions (+Mg).

(Sacristán, A. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)



aviat, després dels 3 primers minuts de preincubació (5 i 10 mM respectivament). Com podem veure, els efectes foren una mica diferents dels de l'experiment primitiu. L'activitat I sense magnesi afegit no pujava, mentre que l'activitat D fou eliminada durant la preincubació gràcies a aquesta addició, i arribà al nivell de l'activitat I en 65 minuts. La trans-

formació de D a I fou disminuïda en l'extret que tenia Mg^{2+} però al mateix temps l'activitat total començà a baixar mentre els controls romanien estables. Quan ambdues activitats eren pràcticament la mateixa, perquè tota la D s'havia transformat en I, aquesta s'anà inactivant amb el temps fins que arribà al mateix nivell de l'activitat sense magnesi.

Així es produïren diversos tipus de transformacions, dependents del temps, aparentment per l'addició d'ATP i de magnesi: a) Un canvi de sentit de la reacció de la fosfatasa que interconverteix l'activitat D a I

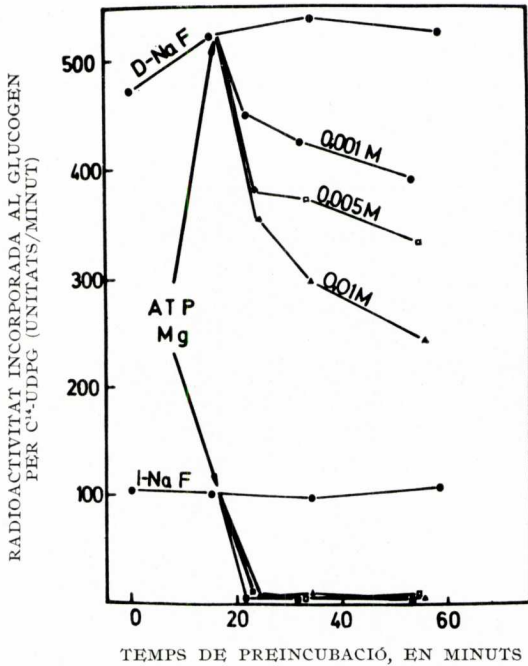


FIG 10. — Efecte de la concentració d'ATP sobre la inactivació de la glucogeno-sintetasa D de múscul de rata.

Fou impedita la transformació de D a I mitjançant l'addició a l'amortidor d'extracció de FNa 50 mM, i, després de preincubar-ho durant 15 minuts a 30 °C, hom hi afegí Cl_2Mg 10 mM i les quantitats d'ATP que hi ha indicades.

(Sacristán, A. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)

per acció d'una quinasa portada a terme per l'addició d'ATP-Mg a l'extret enzimàtic que no tenia magnesi; b) Una disminució d'aquesta transformació deguda a un procediment similar en l'extret enzimàtic que tenia el catió afegit prèviament; c) Un nou tipus de transformació, és a dir, una inactivació o transformació de l'activitat D en una espècie molecular inactiva, efecte aparentment provocat per l'addició de Mg i d'ATP. Aquest nou tipus de reacció pot significar una extrafosforilació d'aquesta forma D, que porta com a conseqüència la seva inactivació; d) I, finalment, una inactivació de l'activitat I, sense transformació de I a D, en els extrems enzimàtics que disposaven inicialment de magnesi.

Per tal de definir una mica més aquests tipus de reaccions prepararem

nous tipus d'experiments. La figura 10 mostra un experiment en el qual la transformació de D a I fou impedita inhibint els sistemes de la fosfatasa, afegint, a l'amortidor d'extracció, FNa fins a 50 mM. Als 15 minuts de preincubació foren afegides quantitats diferents d'ATP i 10 mM de Mg^{2+} a diferents quantitats alíquotes de l'extret, i l'activitat en fou determinada després de 5, 10 i 20 minuts de les addicions.

Hom pot observar que en aquestes condicions és suficient 1 mM d'ATP per a inactivar la baixa activitat I basal, però també hom pot observar

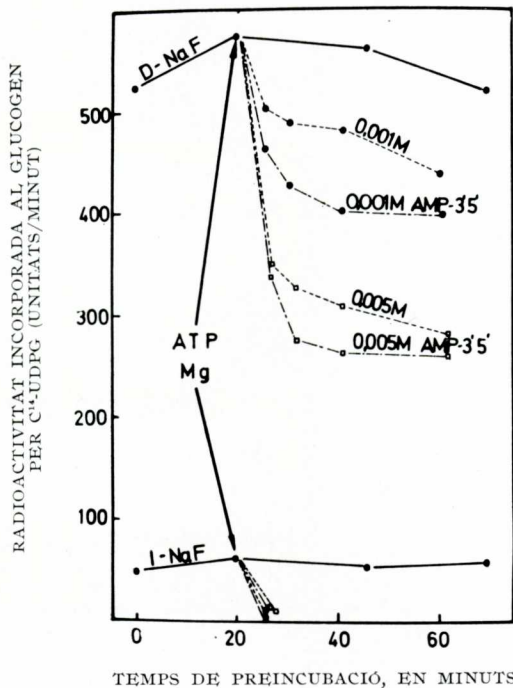


FIG. 11. — Sensibilitat de la reacció d'inactivació de la forma D de la glucogeno-sintetasa en presència de 3',5'-AMP.

Les condicions experimentals foren semblants a les de la figura 10, però en algunes mostres alíquotes hom afegí, a més, 0,02 mM de 3',5'-AMP.

(Sacristán, A. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)

que l'activitat D és inactivada per mitjà d'una reacció que és dependent tant del temps com de la concentració d'ATP afegida.

Un segon experiment subratlla i confirma l'evidència d'una reacció d'una quinasa que treballa sobre la forma molecular D de l'enzim. Aquest és el representat a la figura 11. Ací veiem que l'efecte produït per l'addició *in vitro* d'ATP-Mg, inactivant la forma D, és encara incrementada per la presència, juntament amb l'ATP, del 3',5'-cicloadenilat (2×10^{-5} M). Les addicions foren efectuades després de 20 minuts de preincubació, i en fou comprovada l'activitat enzimàtica, 5, 10, 15 i 40 minuts després. Sembla clar, gràcies a aquests dos tipus darrers d'experiments, que té lloc un tipus

de reacció de quinasa que inactiva la forma D del múscul cardíac de rata per extrafosforilació, quan és iniciada per l'addició d'ATP-Mg.

Finalment, en la figura 12, hom vol mostrar un últim experiment amb les preparacions d'enzim de cor de rata, que és similar, en part, al precedent, bé que algunes de les condicions són lleugerament diferents. L'ac-

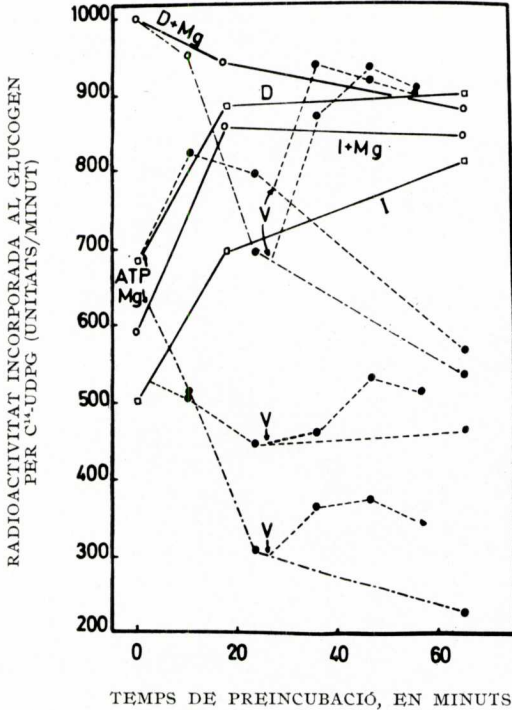


FIG. 12. — Recuperació de les activitats D i I de la glucogeno-sintetasa de cor de rata després de la inactivació per ATP-Mg.

L'ATP-Mg fou afegit després dels primers tres minuts de preincubació, i 20 minuts més tard hom hi afegí 20 mM d'EDTA per aturar les reaccions inactives. V indica l'addició d'EDTA (Versene).

(Sacristán, A. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)

tivitat I sense Mg^{++} previ era, en aquesta ocasió, més del 70 % del total al temps 0 de preincubació, i propera al 60 % quan el Mg^{2+} hi era present, la qual cosa indica la presència d'una glucogeno-sintetasa-D-fosfatasa molt activa.

L'activitat total amb Mg^{2+} era un 30 % superior a la trobada sense el catió. L'ATP-Mg fou afegida després dels 3 primers minuts de preincubació. Ací veiem de nou l'evitació de la pujada d'activitat I en absència de magnesi i la gran inactivació dependent del temps produïda en presència d'aquest; i també la inhibició dependent del temps de l'activitat total amb o sense Mg^{2+} , amb una pujada prèvia, en aquest últim cas deguda a l'efecte del magnesi.^{1, 20}

Als 25 minuts de la preincubació, o 22 minuts després de l'addició de

l'ATP-Mg, hom afegí EDTA 20 mM als tubs que havien tingut barreja d'ATP-Mg, i llavors en fou determinada l'activitat als 6, 10 i 20 minuts d'aquesta addició. Podem observar una inversió completa de la inactivació produïda per ATP-Mg quan hom hi afegeix l'EDTA per captar el magnesi de la quinasa que té disponible. L'activitat total arribà als nivells

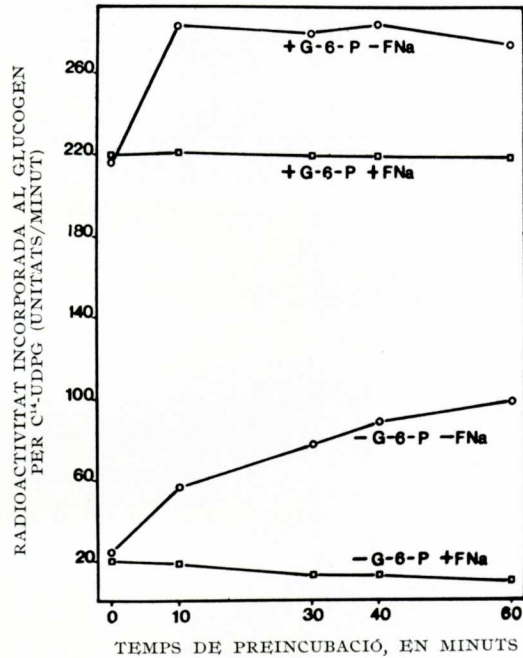


FIG. 13. — Acció del FNa sobre la glucogeno-sintetasa de ronyó durant la preincubació dels extrems.

Foren preparats extrems crus (1:10 pes/volum) amb amortidor i mercaptoetanol (50 mM) i la meitat d'un d'ells tingué afegit també FNa 50 mM. No fou observat un augment d'activitat (bé sigui amb glucosa-6-fosfat o bé sense) en el preparat que tingué FNa.

(Hidalgo, J. L. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)

dels controls després de 10 minuts. La inactivació I també canvià, però els nivells d'activitat I no arribaren al final als controls. Sembla aquí que l'acció captadora de magnesi de l'EDTA, apropiant-se del que necessita la quinasa, ha afavorit l'equilibri entre les quinases i fosfatases presents, cap a les últimes, que llavors desfosforilen els intermediaris inactius.

EXPERIMENTS AMB RONYÓ DE RATA

Ara ens trobem amb la qüestió si els increments observats de l'activitat D són deguts a l'acció de fosfatases que actuen sobre l'espècie molecular inactiva més fosforilada que la forma D. Les preparacions de ronyó de rata ens han donat indicacions que això ben bé ha pogut ésser. La figura 13 mostra un simple experiment il·lustratiu.

Els extrems de ronyó de rata foren preparats en presència i en absència de FNa 50 mM, i llavors fou determinada la transformació durant la preincubació amb mercaptoetanol. Podem veure nivells d'activitat idèntics en ambdós extrems a temps 0 de preincubació, però hom comprova una clara diferència de comportament durant aquesta. Hi ha una pujada en l'activitat tant en la D com en la I, pujada que és evitada en ambdós casos pel FNa, però podem observar que l'increment és molt diferent en les activitats D i I. Mentre que la D té un fort increment i s'anivella després dels 10 primers minuts, la I presenta un increment lent però conti-

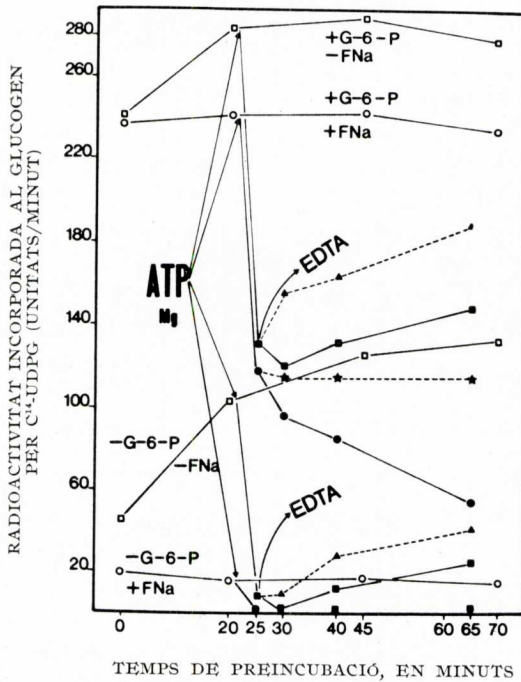


FIG. 14. — Aturada de la reacció i reversió d'aquesta per addició d'EDTA.

Foren obtinguts extrems paral·lels amb FNa (50 mM) o sense, i hom hi afegí ATP-Mg (5-10 mM) després dels 15 primers minuts de preincubació a 30 °C. Als 5 minuts d'aquesta addició hom hi afegí EDTA 25 mM a parts alíquotes de les anteriors preparacions i mesurà l'activitat de la glucogenosintetasa dels controls i les preparacions tractades, a diferents intervals de temps.

(Hidalgo, J. L. i Rosell i Pérez, M. «Rev. Esp. Fisiol.»; en premsa [1971].)

nuat. Això sembla indicar que treballen juntes dues classes diferents de fosfatases, o potser només una però amb afinitats diferents per a les diferents espècies moleculars presents. Mentre que la pujada de la forma D pot significar una desfosforilació d'algunes espècies moleculars presents, més fosforilades que la forma D, la lenta pujada en l'activitat I pot ésser explicada per una desfosforilació de la forma D, que és convertida en I.

Vegem ara un altre experiment, amb un tipus similar d'extrems de ronyó de rata, que presentem a la figura 14. L'esquema general, discutit en l'experiment anterior, es veu clarament i és pràcticament idèntic.

Als 20 minuts de preincubació hom hi afegí ATP-Mg (1-8 mM respectivament) amb la qual cosa podem veure una inactivació d'ambdues activitats. La inactivació de l'activitat D és completament diferent, dependent que les fosfatases hagin estat inhibides per la presència de FNa. En la preparació que havia estat inhibida, el decreixement de l'activitat continua durant tot el temps, i als 65 minuts gairebé tota l'activitat ha desaparegut. El no inhibit tenia un bon decreixement inicial, però 10 minuts després de l'addició, pel fet que la concentració d'ATP ha disminuït, comença a recuperar-se lentament, per tal com la fosfatasa actua en contra de la quinasa que encara està treballant. Una recuperació lenta similar pot ésser observada en l'activitat I, que és explicable per les mateixes raons. En algunes parts alíquotes de les preparacions de l'enzim que han estat tractades amb ATP-Mg, hi afegim EDTA 20 mM després dels primers 5 minuts de l'addició d'ATP. Podem veure que la inactivació de la quinasa ha estat perfectament aturada en la preparació que contenia FNa, però, com que la fosfatasa ja estava inhibida, hom no hi podia observar cap recuperació de l'activitat. D'altra banda, en el cas sense FNa no sols és aturada l'acció de les quinases per l'acció captadora del magnesi, sinó que llavors la fosfatasa és lliure d'actuar, i la retransformació en activitat D comença immediatament a partir de l'espècie molecular inactiva més fosforilada. En un grau menor hom pot observar el mateix comportament en l'activitat I, la pujada de la qual pot ésser deguda al fet que algunes molècules de D hagin estat desfosforilades per a convertir-se en I, o potser per desfosforilació d'alguns intermediaris inactius més fosforilats que la I, i menys que la D.

ELS SISTEMES EN MÚSCUL DE RATA

El tipus de transformació mostrat fins aquí no és limitat a les fonts de sistemes de glucogeno-sintetasa descrits fins ara. Hem volgut veure si podien ésser observats en les preparacions de múscul de rata, en les quals foren descobertes les primeres transformacions entre les formes D i I de l'enzim, i per això portàrem a terme acurats experiments amb extractes de múscul de rata en què controlàvem i variàvem les quantitats d'ATP i magnesi afegides sota condicions diferents. Volem mostrar ara alguns experiments il·lustratius i característics. La figura 15 mostra un experiment de preincubació en el qual fou afegit Mg^{2+} prèviament als extrems.

En la primera part podem veure una transformació típica de D a I durant 30 minuts. En aquest punt, quan pràcticament tota l'activitat era I, hom hi afegí ATP-Mg (5-6,5 mM), i podem veure que es produeix una inactivació paral·lela en les activitats mesurades amb glucosa-6-fosfat o sense.

Vint minuts després de l'addició, la diferència entre les activitats amb glucosa-6-fosfat o sense era la mateixa que abans d'aquesta addició. Aquí sembla clar que no hi ha hagut transformació d'I a D, sinó una inactivació de la forma I, gairebé l'única present després dels 30 primers minuts de la preincubació.

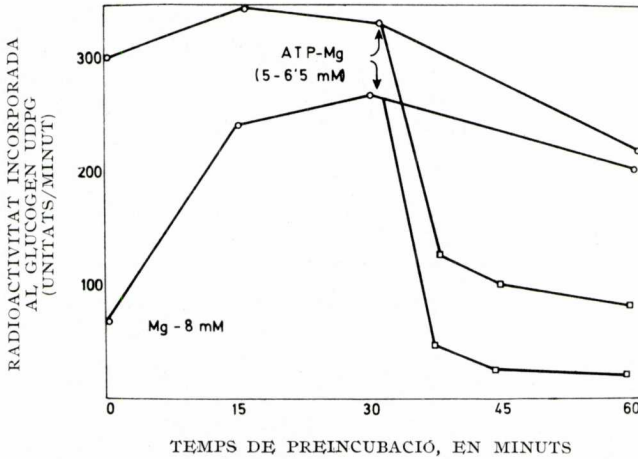


FIG. 15. — Inactivació de l'activitat independent de la glucogeno-sintetasa de múscul de rata per l'acció d'ATP-Mg

Foren obtinguts extrems de múscul de rata (1:10 pes/volum), els quals foren preincubats en presència de mercaptoetanol i Cl_2Mg 8 mM. Als 30 minuts hom hi addicionà a parts alíquotes ATP-Mg a concentracions 5 i 6,5 mM, respectivament, i després fou mesurada l'activitat en els intervals indicats.

(Morey, P. i Rosell i Pérez, M. Dades no publicades.)

Vegem ara un altre experiment, el que mostra la figura 16. Els extrems tenien FNa (100 mM) afegit prèviament, amb què la transformació de D a I fou evitada durant la preincubació. També contenien Mg^{2+} (8 mM) prèviament incorporat.

L'addició d'ATP-Mg (5-10 mM respectivament) provocà una inactivació de la forma I (25 % de la total inicial), i també una inactivació de la D, quantitativament molt superior a la de la I. Llavors podem veure aquí, no sols una transformació de la I en forma D, sinó una inactivació de tota la forma D present induïda per l'addició d'ATP i magnesi i dependent del temps de preincubació. Podem, doncs, suposar que s'ha produït una extrafosforilació.

Per contrast, vegem ara en la figura 17 el comportament de la mateixa preparació sense FNa ni Mg^{2+} afegits prèviament. Les activitats més altes foren detectades al temps 0 de preincubació, i durant aquesta hom pot

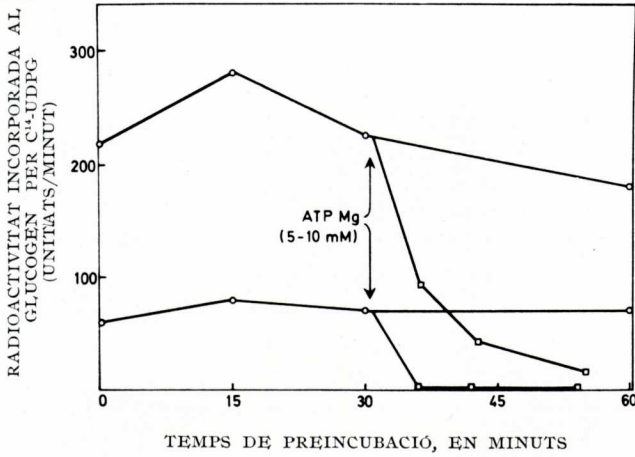


FIG. 16. — Inactivació de l'activitat dependent de la glucogeno-sintetasa de múscul de rata.

Els extrems de múscul de rata duïen 100 mM de FNa i Cl₂Mg 8 mM, i als 30 minuts de preincubació hom hi afegí ATP-Mg a les concentracions indicades en la figura.

(Morey, P. i Rosell i Pérez, M. Dades no publicades.)

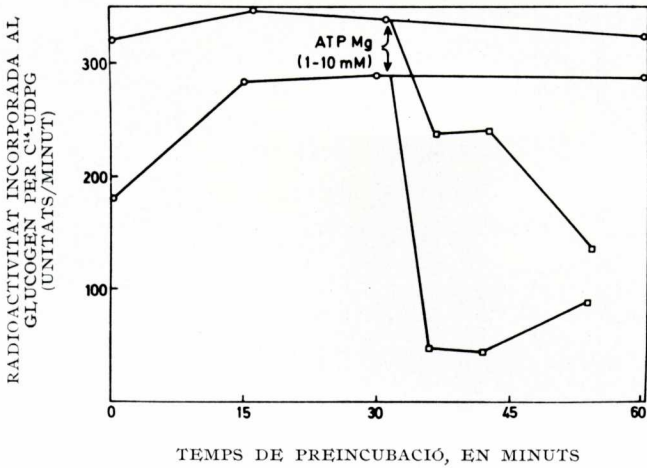


FIG. 17. — Transformacions en les activitats dependent i independent de la glucogeno-sintetasa de múscul de rata.

Els extrems de la mateixa preparació anterior, però sense FNa ni Cl₂Mg, foren addicionats d'ATP-Mg a les concentracions que hom indica (1 i 10 mM, respectivament) als 30 minuts de preincubació.

(Morey, P. i Rosell i Pérez, M. Dades no publicades.)

observar la transformació de D a I. Als 30 minuts de preincubació hi afegirem ATP-Mg utilitzant 5 vegades menys ATP que en els altres experiments però mantenint la mateixa concentració de magnesi. Aquí podem veure diferents tendències en el tipus de transformacions que tenen lloc. L'activitat I, en els 5 primers minuts després de l'addició, baixà molt més que l'activitat D, i durant els 5 minuts següents s'estabilitzà igual que la D. En els minuts següents l'activitat I pujà altre cop, mentre que l'activitat D disminuí fins que ambdues activitats foren gairebé iguals. Vegem ara una representació gràfica de la conversió d'I a D durant els primers 10 minuts, i llavors una doble conversió, per exemple, una conversió de D a I, en la qual la fosfatasa és estimulada per l'excés de Mg^{2+} , i una conversió de D a forma inactiva similar a la descrita en l'experiment anterior.

La concentració d'ATP és decisiva en cada experiment de cara a produir aquestes transformacions, i també ho és la proporció entre ATP

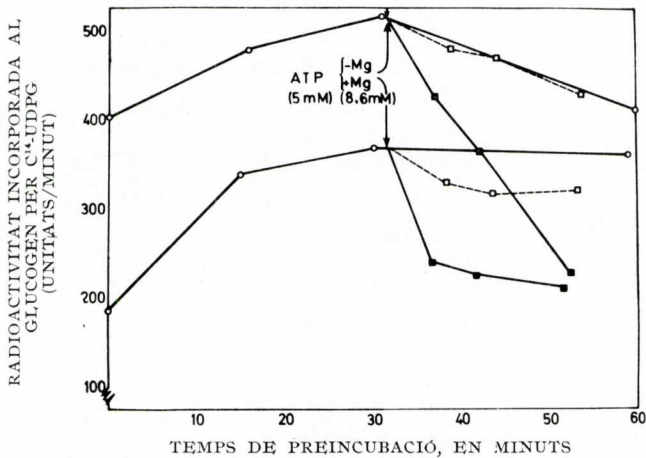


FIG. 18. — Efecte de l'ATP sol i de l'ATP-Mg sobre l'activitat de la glucogeno-sintetasa de múscul de rata.

Els extrems no duen inicialment ni FNa ni Cl_2Mg . Als 30 minuts de preincubació hom hi afegí bé ATP sol (5 mM), ratlles fraccionades, bé ATP amb Cl_2Mg (8,6 mM).

(Morey, P. i Rosell i Pérez, M. Dades no publicades.)

i magnesi, possiblement per la presència de metabòlits endògens. Una concentració incrementada d'ATP en aquest extret produeix exactament el mateix quadre que el que hom pot veure a la figura 15.

En l'experiment que mostra la figura 18 les condicions són semblants, bé que variàrem les concentracions d'ATP i Mg i llavors varià la res-

posta a l'addició d'ATP-Mg. Aquí, però, el decreixement de l'activitat D és constant durant el temps posterior a l'addició i pràcticament tota l'activitat romanent després de 23 minuts de l'addició és activitat I, a causa de la inactivació de la forma D present i no per transformació de la D en I. De nou l'addició d'ATP sol no pot respondre dels efectes observats i hem d'admetre que, a més de la inactivació de part de la forma I, es produeix una inactivació addicional de la forma D per l'acció conjunta del magnesi i l'ATP.

DISCUSSIÓ

Des del començament de l'estudi de les interconversions de la glucogeno-sintetasa, foren obtingudes algunes dades que indicaven que les reaccions que interconverteixen les dues formes poden ésser complexes i també incloure la producció de més d'una classe d'espècies moleculars. Nosaltres hem postulat la hipòtesi d'un precursor inactiu de la forma D del múscul de granota, l'any 1962,¹⁶ i també ho assenyalàrem per al múscul de gos una mica més tard.^{17, 18} Durant els últims set anys hem acumulat evidència, en el nostre laboratori, indicant que les formes moleculars inactives poden produir-se durant les interconversions de les formes I i D de la glucogeno-sintetasa de múscul de diferents fonts i també en leucòcits; també altres laboratoris han fornit dades que estan d'acord amb aquests mecanismes.

BELFORD i CUNNINGHAM, per exemple, treballant amb el múscul cardíac de gat³ trobaren que l'aminofilina i el calci, que augmenten la força de la concentració, no augmenten l'activitat I, i l'aminofilina en realitat disminueix l'activitat total. Així conclogueren que no té lloc una interconversió simple i que potser una forma inactiva hi pot fer un cert paper, com postulaven ROSELL i PÉREZ i LARNER.¹⁶

VARDANIS postulà fa tres anys²⁴ l'existència d'una forma inactiva per a la glucogeno-sintetasa de fetge de ratolins que fou inclosa en el meu esquema presentat a Mònaco fa tres anys²² i que fou incorporat al treball de metabolisme de proteïnes enzimàtiques de DE FLORA.⁶ Això ha estat ara ampliat una mica més i és present a la figura que ara discutirem amb detall.

Mentre que aquest esquema d'interconversions és encara sustentat per una base hipotètica i és una mica especulatiu, la quantitat d'evidència experimental recollida fins ara sembla indicar-nos que, fins i tot si no és completament correcte, hem d'estar ben a prop de la veritat en la nostra interpretació. D'altra banda, la verificació d'aquesta correcció només podrà ésser possible quan les formes moleculars de la glucogeno-sintetasa

siguin completament purificades i puguin quantificar-se les anàlisis d'incorporació del fosfat i de la inactivació.

Com que els mecanismes d'interconversió entre les formes D i I semblen força ben sustentats i acceptats, volem centrar la discussió en la formació d'espècies moleculars inactives així com en els mecanismes de llur formació.

Hem de tenir en compte, però, per a la discussió, que, com fins ara sabem i sembla que no hi ha dubtes al respecte, la forma D és més fosforilada que la I; la transformació de D a I és portada a terme per

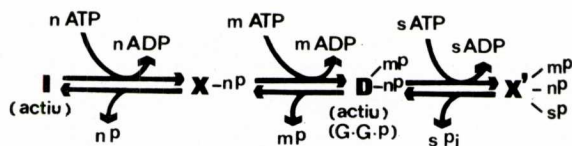


FIG. 19. — Esquema de les interconversions entre les formes de la glucogeno-sintetasa de múscul.

Les reaccions cap a la dreta suposen fosforilacions portades a terme per una quinasa o diverses, i cap a l'esquerra desfosforilacions produïdes per una fosfatasa o diverses.

una proteïna-fosfatasa, la glucogeno-D-fosfatasa que separa fosfat inorgànic de la proteïna enzimàtica, i la transformació de I a D es produeix per l'acció d'una proteïna quinasa, la glucogeno-sintetasa-I-quinasa, que incorpora fosfat inorgànic a l'enzim a partir del grup fosfat terminal de l'ATP.

Comencen amb el pas de la forma D a l'espècie inactiva X', més fosforilada que la forma D. Aquesta reacció sembla força ben documentada amb diferents troballes experimentals a partir de preparacions de fonts diverses. Recapitem: a) l'enzim de múscul de granota, que és una forma D, pot ésser inactivat totalment per una reacció produïda per l'addició d'ATP-Mg als extrems i que és dependent del temps i de la concentració d'ATP, i que es mostra sensible a la presència de 3',5'-cicloadenilat; b) les formes D de diferents fonts com ronyó, cor o múscul estriat de rata, poden ésser igualment inactivades per l'addició d'ATP-Mg en reaccions dependents del temps, i per la concentració d'ATP, novament sensibles a la presència de 3',5'-AMP; c) en glòbuls blancs ha estat vista la mateixa classe d'inactivació originada per l'ATP en aquestes preparacions que no tenen activitat I ni sistema d'interconversió D a I, com passa en els leucòcits polimorfonuclears d'homes normals.¹⁹ Aquesta evidència directa ha estat també confirmada indirectament amb els limfòcits,

en els quals ha estat demostrat quantitativament en determinades condicions que una quantitat de l'activitat D és també inactivada.⁹

Ara veurem l'evidència de la reacció contrària que afavoreix la hipotètica acció de les fosfatases convertint l'espècie molecular inactiva, més fosforilada, en la menys fosforilada forma D: a) la preincubació d'extrets de múscul de granota en presència de mercaptoetanol produeix un increment dependent del temps de tres a sis vegades superior en l'única activitat present que és la forma D, i aquest augment és sensible a la presència d'ions de magnesi, que també són activadors de l'altra ben coneguda reacció de la fosfatasa que interconverteix la D en I; b) en preparacions de ronyó de rata pot ésser aturat un increment similar en l'activitat D per la presència de FNa, un inhibidor ben conegut de les fosfoproteïna-fosfatases; c) en preparacions de cor i ronyó, la inactivació de la forma D, portada a terme per l'ATP-Mg, pot ésser aturada i completament invertida amb el temps, per addició de fortes concentracions de EDTA que captin el Mg^{2+} necessari per a l'acció de la quinasa; d) condicions similars, en presència de FNa, aturen la inactivació induïda per l'ATP, però no es recupera l'activitat D perquè qualsevol fosfatasa present és inhibida.

Les dades que indiquen la presència d'un intermediari inactiu entre les formes D i I són una mica més dèbils, però encara consistents en aquesta idea: a) sota condicions seleccionades de concentracions d'ATP i Mg, llur addició a extrets de múscul, que han estat completament convertits en la forma I, no produeix conversió de I a D sinó una inactivació dependent del temps de l'única activitat present, l'activitat I; això, d'altra banda, pot ésser explicat com un ultrapassar-se en la inactivació que transforma la I en D i aquesta en X' massa ràpidament per a ésser observada; b) l'addició d'ATP-Mg als extrets de múscul cardíac que tenien Mg^{2+} , no evita la pujada en l'activitat I simultània amb el decreixement de la D; quan tot era activitat I, produïda per la doble transformació, inactivació de la D i transformació de D a I, llavors aquesta activitat I s'inactivava (això és difícil d'explicar com un ultrapassament de l'acció de la quinasa); en absència de magnesi, la forma I no pujava i la D baixava constantment fins als nivells de la I, la qual cosa també sembla incompatible amb un ultrapassament; c) hem vist en alguns dels experiments en què ambdues formes coexisteixen, que l'addició d'ATP-Mg produeix una inactivació completa de l'activitat I i un decreixement paral·lel en la D, que és l'única activitat present al final del període d'incubació. Aquí sembla que l'única activitat afectada hagi estat la I, sense cap posterior transformació de D ni cap conversió de D a l'espècie inactiva. Llavors la forma inactiva produïda a partir de la I ha d'ésser intermediària entre aquesta i la D.

La part més difícil per a obtenir-ne dades experimentals és en provar les reaccions contràries entre l'intermediari inactiu X i bé la forma D o bé la forma I, per tal com aquestes reaccions són justament oposades. Hi ha també el fet que no s'ha trobat cap font de glucogeno-sintetasa que sigui únicament del tipus I, cosa que no ens permet de provar experimentalment per a comprovar aquesta hipòtesi.

Per contra, hem vist que hi ha fonts únicament amb l'activitat D. Tenim únicament una dada significativa que no hem presentat aquí. Els extrems d'enzim de ronyó presenten, a diferència de totes les altres fonts provades, una inactivació de l'activitat D en presència de Mg^{2+} , mentre que l'activitat I en les mateixes condicions augmenta. Aquesta inactivació de l'enzim D no sembla que sigui produïda precisament per una quinasa.

Un altre aspecte de les qüestions que introdueix l'esquema és si les reaccions que van cap a la dreta són produïdes per una quinasa o per més d'una, així com si les reaccions van cap a l'esquerra (la qual cosa ens portaria a formes menys fosforilades) podrien ésser produïdes per una fosfatasa o per diverses. Això encara no pot ésser contestat.

Tammateix sembla força clar que en els sistemes de la glucogeno-sintetasa hi ha la possibilitat d'existència de diverses formes moleculars més o menys actives, i també inactives amb diferents graus de fosforilació.

No és aquest l'únic cas que ha estat trobat d'enzims controlats metabòlicament, i amb la fosforilasa, HURD i col·laboradors¹⁰ han demostrat que durant la interconversió de la forma *b* en la *a*, es produeixen diferents intermediaris amb graus diversos de fosforilació, cadascun amb diversa activitat.

Els efectes fisiològics d'aquestes conversions no són clars encara, però poden explicar alguns dels contradictoris efectes *in vivo* citats a la bibliografia respecte a l'acció d'hormones, algunes drogues o unes certes condicions experimentals. A qualsevol nivell mostren una complexitat extrema de factors que regulen el metabolisme del glucogen. Representen uns mecanismes encara més delicats per a la regulació metabòlica de determinats enzims que modulen llurs propietats catalítiques en un cas particular.

Les formes inactives poden representar un mecanisme complet de supressió del pas de la biosíntesi del glucogen, que pot ésser important en els casos en què les cèl·lules tenen una forta demanda d'energia.

També poden ésser d'importància en cèl·lules, teixits i òrgans que tenen només una de les dues formes actives com a mecanismes reguladors per a modular llur activitat.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBERT, J. L., i ROSELL I PÉREZ, M. — *Studies in frog muscle glycogen synthetase. Factors affecting its activity.* «R. Esp. Fisiol.», 26, 29 (1970).
2. APPLEMAN, M. M., BELOCOPITOW, E., i TORRES, H. N. — *Factors affecting the activity of muscle glycogen synthetase.* «Biochem. Biophys. Res. Com.», 14, 550 (1964).
3. BELFORD, J., i CUNNINGHAM, M. A. — *The effect of inotropic catecholamines, calcium and aminophylline on the glycogen synthetase activity in the intact cat heart.* «J. Pharm. Exp. Ther.», 162, 134 (1968).
4. CRAIG, J. W., RALL, T. W., i LARNER, J. — *The influence of insulin epinephrine and adenosine 3',5'-phosphate on glycogen transferase in muscle.* «Biochim. Biophys. Acta», 177, 213 (1969).
5. DANDFORD, W. H. — *Glycogen synthetase activity in skeletal muscle. Interconversions of two forms and control of glycogen synthesis.* «J. Biol. Chem.», 240, 588 (1965).
6. DE FLORA, A. — *Metabolism of enzyme proteins.* «Ital. J. Biochem.», 17, 365 (1968).
7. ESMANN, V., HEDESCOV, C. J., i ROSELL I PÉREZ, M. — *UDPG-glucan glucosyltransferase activity of polymorphonuclear leucocytes from diabetic subjects.* «Diabetologia», 4, 181 (1968).
8. FRIEDMANN, D. L., i LARNER, J. — *Studies on UDPG: α -glucan transglucosylase. III Interconversion of two forms of muscle UDPG: α -glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence.* «Biochemistry», 2, 669 (1963).
9. HEDESCOV, C. J., ESMANN, V., i ROSELL I PÉREZ, M. — *Glycogen content and UDPG-glucan glucosyltransferase activity of normal human lymphocytes.* «Biochim. Biophys. Acta», 130, 393 (1966).
10. HURD, S. S., TELLER, D., i FISHER, E. H. — *Probable formation of partially phosphorylated intermediates in the interconversions of phosphorylase a and b.* «Biochim. Biophys. Res. Com.», 24, 79 (1966).
11. LELOIR, L. F., OLAVARRÍA, J. M., GOLDENBERG, S. H., i CARMINATTI, H. — *Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose.* «Arch. Biochem. Biophys.», 81, 508 (1959).
12. PIRAS, R., i STANELONI, R. — *In vivo regulation of rat muscle glycogen synthetase activity.* «Biochemistry», 8, 153 (1969).
13. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — *Evidence for two forms of UDPG, glycogen transglucosylase in muscle.* «Fed. Prac.», 20, 193 (1961).
14. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — *Nucleotide sugar enzymes in glycogen anabolism and their control.* «Abstr. 140th ACS Meeting», 12D (1961).
15. ROSELL I PÉREZ, M., VILLAR I PALASÍ, C., i LARNER, J. — *Studies on UDPG-glycogen transglucosylase. I Preparation and diferentiation of two activities of UDPG-glycogen transglucosylase from muscle.* «Biochemistry», 1, 763 (1962).
16. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — *Studies on UDPG-glycogen transglucosylase. II Species variation of glucose-6-phosphate sensitivity of UDPG-glycogen transglucosylase.* «Biochemistry», 1, 769 (1962).
17. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — *Dog muscle UDPG-glycogen transglucosylase.* «Fed. Prac.», 22, 463 (1963).
18. ROSELL I PÉREZ, M., i LARNER, J. — *Studies on UDPG: α -glucan transglucosylase. V Two forms of the enzyme in dog skeletal muscle.* «Biochemistry», 3, 81 (1964).
19. ROSELL I PÉREZ, M., i ESMANN, V. — *UDPG-glucan glucosyltransferase in human polymorphonuclear leucocytes.* «Acta Chem. Scand.», 19, 679 (1965).
20. ROSELL I PÉREZ, M., i VILLAR, V. — *Estudios sobre la UDPG: α -glucán transferasa de músculo de rana.* «R. Esp. Fisiol.», 22, 185 (1966).

21. ROSELL I PÉREZ, M., HEDESCOV, C. J., i ESMANN, V. — *Glycogen biosynthesis in leucocytes of normal and alloxan diabetic rats.* «Biochim. Biophys. Acta», 156, 414 (1968).
22. SACRISTÁN, A., ROSELL I PÉREZ, M., i VILLAR, V. — *Inactivación de las formas D de la glucógeno sintetasa de músculo de rata por extrafosforilización.* «Res. IX Journ. Biochimiques Latines», 90, 66 (1968).
23. STANELONI, R., i PIRAS, R. — *Changes in glycogen synthetase and phosphorylase during muscular contraction.* «Biochim. Biophys. Res. Com.», 36, 1032 (1969).
24. VARDANIS, A. — *Mammalian liver glycogen synthetase. Transformations of the enzyme in vitro.* «Arc. Biochem. Biophys.», 130, 413 (1969).
25. VILLAR I PALASÍ, C., i LARNER, J. — *A uridine coenzyme linked-pathway of glycogen synthesis in muscle.* «Biochim. Biophys. Acta», 30, 449 (1958).