REGULACIÓ PER SUCRES DE LA GLICOGENO-SINTASA I DE LA GLICOGENO-FOSFORILASA EN HEPATÒCITS AÏLLATS: MODIFICACIÓ PEL DEJUNI I PER LA DIABETIS

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1980

per

CARLES JULIÀ CIUDAD, JOAN MASSAGUÉ i JOAN J. GUINOVART

Departament de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona

SUMARI

L'activitat glicogen-sintasa total en hepatòcits de rata aïllats (7,3±0,5 mU/mg proteïna) mesurada en presència de glucosa-6-P no és modificada pel dejuni o per la diabetis, mentre que l'estat d'activació de l'enzim (relació d'activitats-glucosa-6-P/+glucosa-6-P) varia segons l'estat de l'animal. Aquesta relació té un valor de 0,21±0,02 en els hepatòcits de rates dejunes (24 h) i de 0,13±0,02 en els de rates alimentades. En les rates diabètiques, aquestes xifres són aproximadament la meitat dels valors observats en rates normals, és a dir, 0,11±0,01 i 0,05±0,01, respectivament.

L'activitat glicogen-fosforilasa a *(o activa) basal (0,18±0,01 U/mg proteïna), no és modificada pel dejuni, encara que els hepatòcits de rates diabètiques tenen un nivell aproximadament 2/3 dels valors obtinguts en els animals normals.*

En hepatòcits de rata normal, la glucosa produeix l'activació de la glicogeno-sintasa i la inactivació simultània de la glicogeno-fosforilasa, de manera independent de l'estat de nutrició. D'altra banda, la fructosa provoca l'activació simultània d'ambdós enzims. Aquest efecte hom pot observar-lo tant en rates alimentades com sotmeses a dejuni.

En animals diabètics, tot i que la glucosa causa la inactivació de la glicogen-fosforilasa, no produeix cap increment del nivell de glicogen-sintasa independent ni produeix cap augment en l'acumulació de glicogen. Contràriament, els efectes de la fructosa no es perden en les rates diabètiques i la incubació amb aquest sucre mena a la deposició de glicogen.

INTRODUCCIÓ

Si bé hom havia descrit que la fructosa produïa una inactivació de la glicogeno-fosforilasa hepàtica [1], és ara evident que aquest sucre pot produir un increment en els nivells de fosforilasa *a* [2]. Més encara, hem descrit recentment que en hepatòcits de rata aïllats, la fructosa provoca un increment simultani en l'activitat glicogeno-sintasa i en els nivells de fosforilasa *a* [3].

La capacitat de la fructosa d'incrementar els nivells de fosforilasa *a* suggereix que aquest sucre actuaria com un agent glicogenolític, mentre que l'activació simultània de la glicogeno-sintasa conduiria a un cicle fútil entre glicogen i glucosa-fosfat. Tot i així, hom ha observat una substancial deposició de glicogen tant en fetge perfós [4] com en hepatòcits aïllats quan hom addicionava fructosa a un medi que contingués glucosa [5, 6]. Similarment ha estat descrit que la presència de fructosa evita la degradació de glicogen que té lloc en hepatòcits de rates alimentades en presència de baixes concentracions de glucosa [7].

En aquest treball, demostrem que la incubació d'hepatòcits amb fructosa condueix a la deposició de glicogen, tot i que produeix una elevació simultània dels nivells de fosforilasa *a*. També presentem resultats de les variacions en les activitats de la glicogeno-sintasa i glicogeno-fosforilasa com a resposta a les incubacions amb aquests sucres en els estats alimentat, dejú i diabètic. Aquests resultats poden ajudar a clarificar quin és el camí pel qual es produeix la citada deposició de glicogen.

D'altra banda, és conegut que en l'estat diabètic existeix un defecte en el sistema d'enzims reguladors del metabolisme del glicogen al fetge, de tal manera que en la diabetis no s'observa increment de l'activitat glicogeno-sintasa ni síntesi neta de glicogen a partir de la glucosa. Ja que la fructosa és capaç de produir un increment en l'activitat de la glicogeno-sintasa en hepatòcits de rata normal i mena a la deposició de glicogen, era la nostra intenció investigar si la fructosa, que té un mecanisme de fosforilació independent del de la glucosa, podria mantenir els seus efectes sobre hepatòcits aïllats de rates diabètiques.

A tal fi, presentem resultats d'un estudi comparatiu sobre les respostes enzimàtiques i nivells de glicogen trobats en hepatòcits de rates normals i diabètiques després d'incubar-los amb glucosa, fructosa i combinacions d'ambdós sucres.

MATERIALS I MÈTODES

Es varen utilitzar rates Sprague-Dawley (200-250 g) alimentades o bé sotmeses a dejuni 24 hores abans de l'aïllament dels hepatòcits. Pel que

fa a l'estat diabètic, aquest era induït amb *estreptozotocina* (70 mg/kg de pes corporal) que era dissolta en 1,0 ml de tampó de citrat sòdic pH 4,5 i administrada intravenosament sota anestèsia per dietil-èter a rates mantingudes en dejuni durant 8-10 hores. Quatre dies després de la injecció, la concentració de glucosa a la orina era superior a 20 mg/ml assajada amb tires Ames i aquests nivells de glucosúria es mantenien elevats almenys durant vint dies. Les rates tractades amb *estreptozotocina* perdien pes i, en l'estat alimentat, la seva concentració de glucosa a la sang superava la xifra de 20 mM. Les rates diabètiques eren utilitzades entre els dies 6 i 15 després del tractament amb *estreptozotocina.*

Les cèl·lules aïllades segons [8] eren finalment resuspeses en tampó de Krebs-Ringer bicarbonatat (pH 7,4) lliure de glucosa i equilibrat amb O_2/CO_2 19 : 1. Alíquotes de 3,5 ml de suspensió cel·lular ($8\text{-}10 \times 10^6$ cèl·lules/ml) eren distribuïdes en vials tapats i incubades a 37 °C amb agitació (100 moviments/minut). Els hepatòcits eren preincubats durant 30 minuts abans de la addició dels sucres, els quals eren dissolts en aigua a una concentració de 300 mM. S'afegien diferents volums d'aquestes solucions a les suspensions cel·lulars per tal d'arribar a les concentracions finals desitjades. Al final de les incubacions, els continguts dels vials eren centrifugats ($1.000 \times g$, 20 segons) i el sediment cel·lular era immediatament homogeneïtzat amb 230 microlitres de tampó fred constituït per 150 mM KF i 15 mM EDTA (pH 7,0). Els homogenats cel·lulars eren centrifugats durant 15 minuts a $6.000 \times g$ i als sobrenedants hom assajava les activitats enzimàtiques. La glicogeno-sintasa va ésser mesurada a 30 °C pel mètode descrit en [9] en absència de glucosa-6-P i en presència de 6,6 mM de glucosa-6-P. L'activitat de la glicogeno-fosforilasa va ésser mesurada a 30 °C, segons el mètode descrit en [10], en absència de 5'AMP. Una unitat d'activitat enzimàtica és la quantitat d'enzim que incorpora 1 micromol de (^{14}C)glucosa a partir d'UDP-(^{14}C)glucosa (glicogeno-sintasa) i/o a partir de (^{14}C)glucosa-1-P (glicogeno-fosforilasa) a glicogen per minut. La determinació de proteïna es va fer segons el mètode de Biuret descrit en [11]. En els experiments on eren determinats els continguts de glicogen, s'hi afegia 1 ml de suspensió cel·lular a 1 ml de KOH 60 % p/v i seguidament s'escalfaven a 100 °C per 30 minuts; el glicogen era precipitat amb etanol i mesurat pel mètode descrit en [12]. La D-fructosa va ésser obtinguda de Sigma Chemical Co. i la D-glucosa de Merck.

RESULTATS

Nivells basals de les activitats glicogeno-sintasa i glicogeno-fosforilasa

L'activitat total glicogen sintasa (mesurada en presència de glucosa-6-fosfat (G-6-P)) es mantenia constant en animals alimentats o sotmesos a

dejuni tant si eren normals com diabètics. Ara bé, tant l'estat nutrici com la diabetis sí que variaren la relació d'activitats (—G-6-P/+G-6-P) de la glicogeno-sintasa. Aquesta relació tenia el valor més alt en animals normals després d'un dejuni de 24 hores (0,21±0,02) i era rebaixat fins a 0,13±0,02 en els animals alimentats. Aquests valors quedaren reduïts pràcticament a la meitat quan es tractava d'animals diabètics (taula 1).

Els nivells basals d'activitat glicogeno-fosforilasa no eren aparentment afectats per l'estat nutrici, encara que en els animals diabètics aquests nivells eren reduïts a un valor del voltant de 2/3 del valor observat en animals normals.

Efectes sobre la glicogen sintasa i fosforilasa produïts per la glucosa i fructosa

I. *Animals normals*

a) Animals dejuns. — En hepatòcits aïllats de rates dejunes per 24 hores, la glucosa produïa un increment en la relació d'activitats —G-6-P/+G-6-P de la glicogeno-sintasa i un decrement en els nivells de fosforilasa *a*, mentre que la fructosa provocava de forma simultània l'activació de la glicogeno-sintasa i l'increment en els nivells de fosforilasa *a* (figs. 1, 2 i 4). En hepatòcits incubats solament amb glucosa, es produïa un marcat increment en el contingut intracel·lular de glicogen. Paradoxalment, la fructosa *per se* era capaç de produir una acumulació neta de glicogen, tot i que els nivells de fosforilasa *a* estaven incrementats (taula 2). És de notar que els experiments destinats a demostrar la síntesi

TAULA 1. — Valors basals de les activitats enzimàtiques glicogeno-sintasa i glicogeno-forsforilasa en hepatòcits aïllats d'animals normals i diabètics en condicions d'alimentació i dejuni.

Condicions	Glicogeno-sintasa		Fosforilasa *a*
	Activitat total (mU/mg prot.)	Relació activitats —G6P/+G6P	(U/mg prot.)
Normal alimentada	7,6±0,6	0,13±0,02	0,17±0,01
Normal dejuna (24 h)	7,1±0,5	0,21±0,02	0,17±0,02
Diabètica alimentada	7,6±0,7	0,05±0,01	0,10±0,01
Diabètica dejuna (24 h)	8,2±0,5	0,11±0,01	0,12±0,01

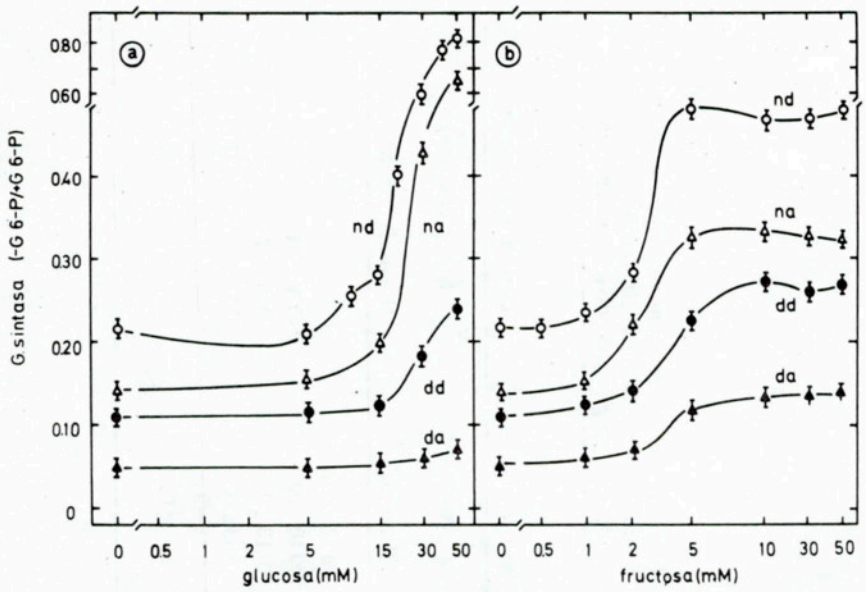

FIG. 1. — Dosi-resposta a glucosa i fructosa sobre l'activitat de la glicogeno-sintasa (relació d'activitats -G-6-P/+G-6-P) en hepatòcits aïllats a partir d'animals: normals dejuns (Nd); normals alimentats (Na); diabètics dejuns (Dd) i diabètics alimentats (Da). Temps d'incubació: 12 minuts.

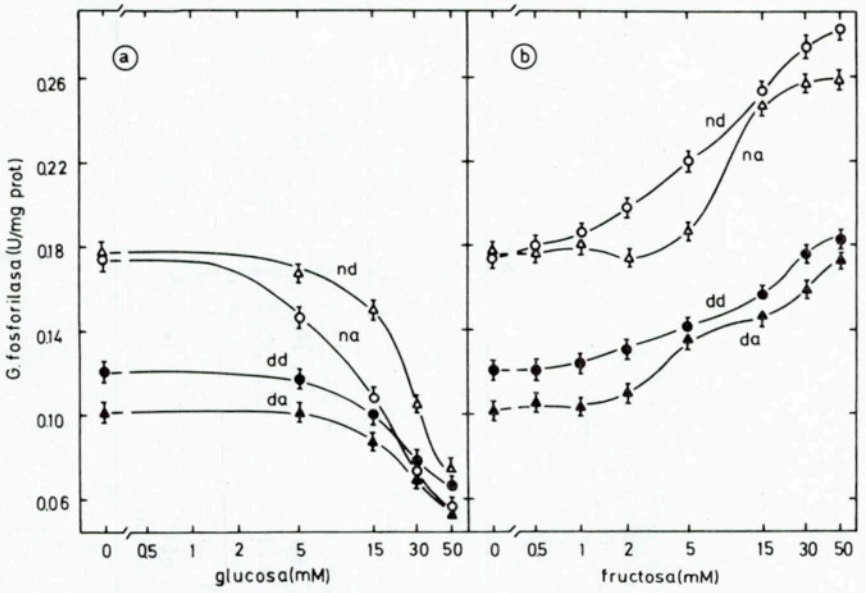

FIG. 2. — Dosi-resposta a glucosa i fructosa sobre l'activitat de la glicogeno-fosforilasa (U/mg proteïna), en hepatòcits de rata aïllats. Temps d'incubació: 12 minuts.

TAULA 2. — Respostes enzimàtiques de la glicogeno-sintasa fosforilasa a diferents concentracions de glucosa, fructosa i mescles d'ambdós sucres en hepatòcits de rates normals i diabètiques en condicions de dejuni. El temps d'incubació va ésser de 10 minuts. S'expressen també les xifres dels continguts intracel·lulars de glicogen observats en cada cas.

Addicions	G. sintasa		Fosforilasa *a*		Deposició glicogen	
	(—G6P/+G6P)		(unitats/mg prot.)		(μg/g cèl·lules)	
	Normal	Diabètic	Normal	Diabètic	Normal	Diabètic
Salina (control)	0,24±0,02	0,11±0,01	0,17±0,01	0,12±0,01	—	—
Glucosa 20 mM	0,49±0,02	0,13±0,01	0,13±0,01	0,10±0,01	390±70	38±13
Glucosa 23 mM	0,52±0,02	0,12±0,02	0,12±0,01	0,10±0,01	440±22	42±17
Fructosa 3 mM	0,42±0,01	0,23±0,02	0,19±0,02	0,13±0,02	122±17	171±37
Fructosa 23 mM	0,50±0,01	0,23±0,01	0,25±0,02	0,15±0,01	346±41	283±45
Glucosa 20 mM + fructosa 3 mM	0,74±0,03	0,32±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01	905±98	810±43

de glicogen es varen fer a un temps d'incubació de 10 minuts, quan encara tots dos enzims eren activats per la fructosa.

Es varen fer una altra sèrie d'experiments amb la fi d'estudiar els canvis en les activitats glicogeno-sintasa i fosforilasa i la relació amb la síntesi de glicogen quan glucosa i fructosa es trobaven juntes en el medi d'incubació. Quan les cèl·lules eren incubades amb glucosa 10 mM (una concentració que produeix canvis mínims en l'activació de la glicogeno-sintasa) més fructosa 15 mM, l'increment en la relació d'activitats —G-6-P/+G-6-P de la glicogeno-sintasa era més alta que la observada quan els sucres eren addicionats separadament a les mateixes concentracions (fig. 4).

L'addició d'aquesta combinació d'hexoses era també seguida per un increment en els nivells de fosforilasa *a* similar a l'increment obtingut amb fructosa 15 mM solament. També va ésser estudiada la combinació de més altes concentracions de glucosa (20 mM) amb una baixa concentració de fructosa (3 mM). En aquestes condicions, la glicogeno-sintasa va ésser activada a un nivell més alt que el produït per les hexoses per separat. D'altra banda, la glicogeno-fosforilasa, que era lleugerament activada a una concentració de fructosa 3 mM quan aquesta concentració de fructosa era combinada amb glucosa 20 mM, resultava clarament inactivada. La presència de glucosa, en conseqüència, pot contrarestar l'efecte de la fructosa sobre la fosforilasa en aquestes condicions.

Aquests resultats suggereixen que els efectes d'una mescla de glúcosa i fructosa estan en funció de les relatives concentracions d'ambdós sucres. Aquest fet es posa clarament en evidència de la figura 3, que mostra l'efecte d'un ample rang de concentracions de fructosa (0,5 a 30 mM) sobre la glicogeno-sintasa i glicogeno-fosforilasa en presència i absència d'una concentració fixa de glucosa 15 mM. Aquesta concentració de glucosa produeix un efecte sobre ambdós enzims que és aproximadament la meitat de l'efecte màxim. La fructosa sola produïa una activació simultània de glicogeno-sintasa i glicogeno-fosforilasa que depenia de la concentració emprada. En presència de glucosa, l'activació de la glicogen sintasa era incrementada a totes les concentracions de fructosa assajades. L'activitat de la glicogeno-fosforilasa, al contrari, variava segons les relatives concentracions d'ambdós sucres. Així, els nivells de fosforilasa *a* disminuïen a baixes concentracions de fructosa, mentre que a altes concentracions de la cetosa els nivells de glicogeno-fosforilasa *a* estaven clarament incrementats.

b) Animals alimentats. — Si bé en hepatòcits de rates alimentades l'activitat basal de la glicogeno-sintasa és més baixa que en els de rates dejunes, la glucosa i fructosa produïen l'activació de l'enzim. La concentració necessària d'aquests sucres per a arribar a la meitat de l'activació màxima de l'enzim, era igual a la trobada en animals dejuns. Pel que fa

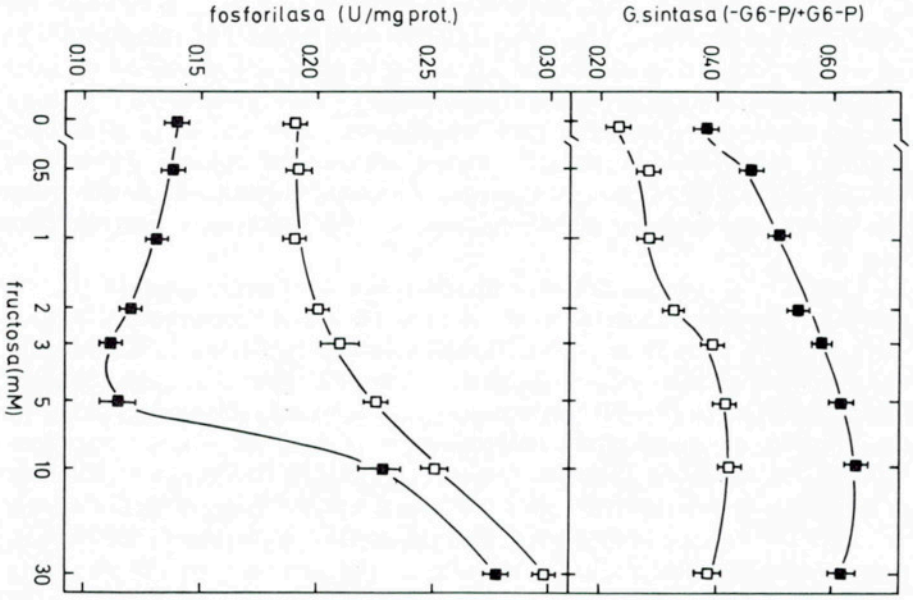

FIG. 3. — Efecte de concentracions creixents de fructosa en hepatòcits incubats en presència o absència de glucosa. Els hepatòcits de rates normals dejunes varen ésser incubats amb concentracions creixents de fructosa en presència de glucosa 15 mM (■) o en la seva absència (□). Les activitats enzimàtiques varen ésser mesurades 4 minuts després de l'addició de les hexoses. Les dades són valors (±SE) obtinguts a partir de quatre experiments duts a terme en dies diferents.

a la glicogeno-fosforilasa, ,la, fructosa i la glucosa mantenen els mateixos efectes sobre l'enzim que en el cas d'animals dejuns.

II. *Animals diabètics*

a) Animals dejuns. — En els hepatocits aïllats de rates diabètiques dejunes la glucosa no provocava pràcticament cap augment en la relació d'activitats —G-6-P/+G-6-P de la glicogeno-sintasa, i s'observà només una petita activació a molt altes concentracions de glucosa. D'altra banda, la fructosa sí que provocava l'activació de l'enzim, i la concentració d'aquest sucre necessària per arribar a la meitat de la màxima activació fou la

mateixa que la trobada en animals normals (fig. 1). Davant de la poca resposta de la glicogeno-sintasa a la glucosa en l'estat diabètic, la fosforilasa és clarament inactivada per la glucosa (fig. 2). Quan s'incubaven hepatòcits procedents de rates diabètiques dejunes amb fructosa, sempre s'arribava a l'activació simultània d'ambdós enzims.

b) Animals alimentats. — Els hepatòcits procedents d'aquests animals, en ésser incubats amb glucosa, no produïen cap activació de la glicogeno-sintasa, àdhuc a concentracions tan altes com 30 mM, encara que la glicogeno-fosforilasa sí que era inactivada per l'hexosa (figs. 1 i 2). Si la fructosa era afegida al medi de incubació, es produïa el mateix patró d'actuació que per als altres grups d'animals, és a dir, l'activació de tots dos enzims.

Síntesi de glicogen a partir d'una mescla de glucosa i fructosa

I. *Animals normals*

La presència simultània de glucosa i fructosa incrementava la síntesi de glicogen. Si els hepatòcits eren incubats en presència de glucosa 20 mM més fructosa 3 mM, la deposició de glicogen era més gran que després de la incubació amb glucosa 20 mM i fructosa 3 mM per separat. És de notar que, si bé tant la glucosa com la fructosa incrementaven la relació d'activitats —G-6-P/+G-6-P de la glicogeno-sintasa, tots dos sucres junts produïen un més gran increment en l'activitat de l'enzim. D'altra banda, si bé la glucosa i la fructosa soles produïen la inactivació i l'activació, respectivament, de la glicogeno-fosforilasa, quan s'incubaven hepatòcits en presència de la combinació específica dels dos sucres es produïa una més alta inactivació de la glicogeno-fosforilasa que quan ho eren en presència de glucosa sola (fig. 4 i taula 1).

II. *Animals diabètics*

Els hepatòcits aïllats a partir de rates diabètiques responen a aquesta combinació de sucres (glucosa 20 mM més fructosa 3mM) donant lloc a una activació de la glicogeno-sintasa superior a l'observada per efecte de la fructosa sola. D'altra banda, també es produeix una més gran inactivació de la fosforilasa que l'obtinguda per glucosa 20 mM (fig. 5). Les xifres de glicogen determinades en aquest experiment demostren que si, com era d'esperar, no existeix pràcticament síntesi de glicogen a partir de glucosa en hepatòcits de rates diabètiques, sí que es produïa una important acumulació de glicogen quan s'incubaven amb fructosa. La

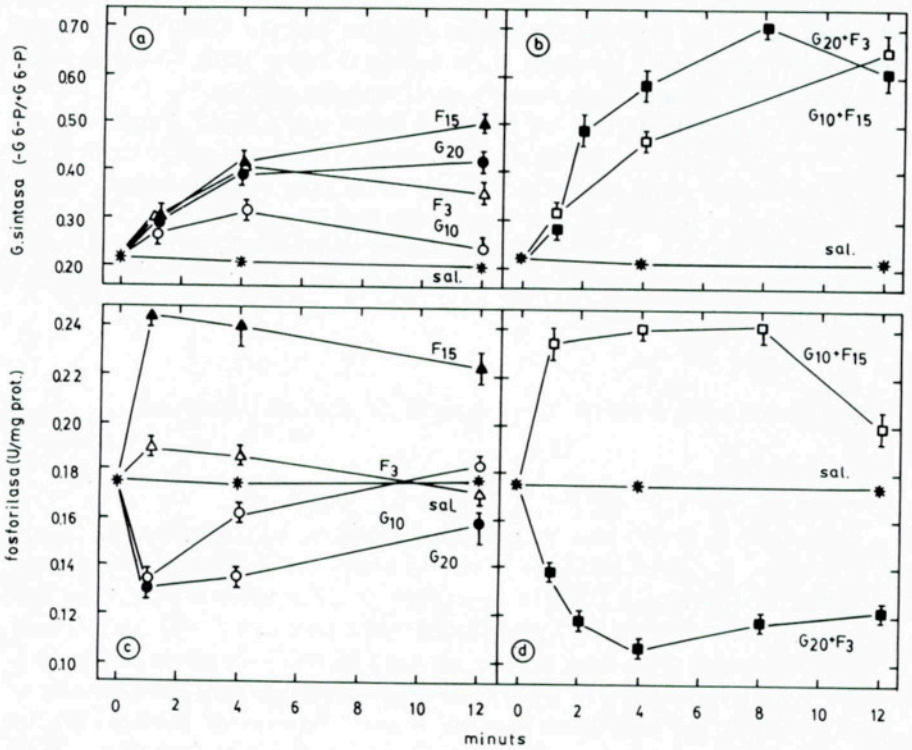

FIG. 4. — Efectes de diferents concentracions de glucosa i fructosa (a i c), així com de mescles d'ambdós sucres (b i d), al llarg del temps, sobre les activitats de la glicogeno-sintasa i glicogeno-fosforilasa en hepatòcits aïllats a partir de rates normals dejunes.

quantitat de glicogen sintetitzada en presència de la cetosa era similar a l'obtinguda en animals normals amb el mateix sucre. Si la incubació de les cèl·lules es feia amb la mescla de glucosa 20 mM i fructosa 3 mM, de nou, igual que en rates normals, es manifestava un gran increment en la síntesi de glicogen molt superior al provocat per glucosa o fructosa soles en rates diabètiques (taula 2).

DISCUSSIÓ

Els resultats comentats en aquest treball presenten evidència del fet que la deposició de glicogen pot donar-se en condicions en què els nivells

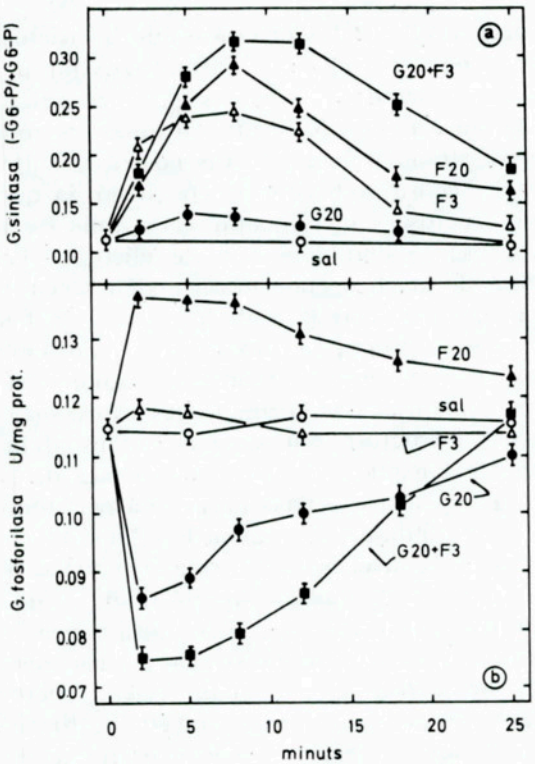

FIG. 5. — Efectes de diferents concentracions de glucosa i fructosa al llarg del temps sobre les activitats glicogeno-sintasa i fosforilasa en hepatòcits aïllats de rates diabètiques dejunes. Els valors són la mitjana + SE de quatre experiments duts a terme en dies diferents.

de fosforilasa *a* estan incrementats, un estat que pot considerar-se com altament paradoxal. S'ofereix una explicació per les contradictòries troballes sobre l'efecte de la fructosa sobre la fosforilasa per part de diferents autors. Aquests resultats ofereixen també una explicació de la incrementada síntesi de glicogen observada en fetge perfós i hepatòcits aïllats quan s'afegeix fructosa a un medi d'incubació que conté glucosa.

Els nostres resultats confirmen observacions prèvies de SEGLEN i KATZ *et al.*, els quals observaren síntesi neta de glicogen a partir d'altes concentracions de glucosa en hepatòcits de rates dejunes. La base per a aquest increment en la síntesi pot ésser explicada per l'activació de la glicogeno-sintasa i el decrement en els nivells de fosforilasa *a*, com varen indicar HERS i col·laboradors [13]. Addicionalment, hem demostrat que es dóna lloc a síntesi de glicogen quan els hepatòcits són incubats només en presència de fructosa i que en aquest cas la síntesi és permesa tot

i l'increment dels nivells de fosforilasa *a* que la fructosa provoca. KATZ *et al.* no varen trobar correlacions entre l'activitat de la fosforilasa i síntesi de glicogen a partir de substrats gluconeogènics en presència de glucosa, i arribaren a la conclusió que en aquestes condicions la fosforilasa devia estar altament inhibida. Els nostres resultats amb fructosa estan en general d'acord amb aquesta conclusió, ja que en incubar els hepatòcits amb fructosa i incrementar els nivells de fosforilasa *a*, no s'observà glicogenòlisi, sinó deposició de glicogen. Per tant, els alts nivells d'activitat de la glicogeno-sintasa poden servir de base per a la deposició de glicogen observada amb fructosa, i la fosforilasa, encara que és present en gran proporció com a forma *a*, no sembla que exerceixi una gran influència en el procés, en aquestes condicions.

Els canvis en les variacions enzimàtiques expressades en aquest treball quan glucosa i fructosa són afegides juntes al medi d'incubació, forneixen la base per explicar els diferents efectes de la fructosa sobre l'activitat de la glicogeno-fosforilasa observada per diferents autors. Les nostres observacions indiquen que quan la relació fructosa a glucosa és alta, la fosforilasa es converteix en forma *a*; aquesta seria la situació immediatament després de l'administració d'una gran i única dosi de fructosa. De fet, ha estat descrit que la fructosa activa la glicogeno-fosforilasa [14] poc després de la seva administració a altes concentracions. D'altra banda, hem demostrat que, quan la relació fructosa a glucosa és baixa, es produeix un decrement en els nivells de fosforilasa *a*. Com va suggerir MILLER [15], aquesta baixa relació existiria després d'una llarga incubació amb fructosa, ja que la glucosa pot acumular-se via gluconeogènesi. Cal fer notar que la inactivació de la glicogeno-fosforilasa va ésser descrita en experiments on els períodes d'incubació amb aquest sucre foren llargs.

La síntesi incrementada de glicogen en presència de glucosa i baixes concentracions de fructosa pot ésser explicada sobre la base d'una més alta activació de la glicogeno-sintasa a què s'arriba en presència d'ambdós sucres en comparació a l'obtinguda quan solament és present la glucosa. Addicionalment, en aquestes condicions els nivells de fosforilasa *a* disminueixen en comptes d'augmentar, com és el cas quan la fructosa és l'únic substrat. De tota manera, la quantitat en la qual aquesta disminució contribueix a l'increment en la síntesi de glicogen és difícil d'esbrinar i dependrà del grau d'inhibició de la glicogeno-fosforilasa *a* dins de la cèl·lula sota les mateixes condicions.

D'altra banda, els resultats trobats sobre els hepatòcits aïllats a partir d'animals diabètics demostren que, si bé en l'estat diabètic està pràcticament perduda la capacitat de sintetitzar glicogen a partir de glucosa, no ho està quan s'utilitza fructosa com a substrat. El tractament d'hepatòcits de rata diabètica amb fructosa mena, al contrari del que passa amb

la glucosa, a un increment en la relació d'activitats —G-6-P/+G-6-P de la glicogeno-sintasa i a un increment en els nivells de fosforilasa *a*. Aquest increment de l'activitat glicogeno-sintasa donaria, segons el mateix raonament que l'exposat per a les rates normals, la base per a la síntesi de glicogen, síntesi que, igual que en les rates normals, és altament incrementada quan els hepatòcits són incubats amb la mescla de glucosa 20 mM i fructosa 3 mM. Per tant, la pèrdua de resposta a la glucosa en l'estat diabètic pot ésser atribuïda a un defecte específic en el mecanisme d'acció de la glucosa, ja que la incubació amb fructosa demostra que la capacitat del sistema per emmagatzemar glicogen no està totalment perduda.

BIBLIOGRAFIA

1. THURSTON, J. H., JONES, E. H. i HANHART, R. E. — «Diabetes», 23, 579-604 (1974).
2. JAKOB, A. — «Mol. Cell. Endocrinol.», 6, 47-58 (1976).
3. CIUDAD, C. J., MASSAGUÉ, J. i GUINOVART, J. J. — «FEBS Lett.», 99, 321-324 (1979).
4. HEMS, D. A., WHITTON, P. D. i TAYLOR, E. A. — «Biochem. J.», 129, 529-538 (1972).
5. SEGLEN, P. O. — «Biochim. Biophys. Acta», 338, 317-336 (1974).
6. KATZ, J., GOLDEN, S. i WALS, P. A. — «Biochem. J.», 180, 389-402 (1979).
7. HOWARD, R. B. i WIDDER, D. J. — «Biochem. Biophys. Res. Com.», 68, 262-269 (1976).
8. MASSAGUÉ, J. i GUINOVART, J. J. — «Biochim. Biophys. Acta», 543, 269-272 (1978).
9. THOMAS, J. A., SCHLENDER, K. K. i LARNER, J. — «Anal. Biochem.», 25, 486-499 (1968).
10. GILBOE, D. P., LARSON, K. L. i NUTTALL, F. Q. — «Anal. Biochem.», 47, 20-27 (1972).
11. LAYNE, E. — A: «Methods in Enzymol.», 3, 450-451 (1957).
12. CARROLL, N. V., LONGLEY, R. W. i ROE, J. H. — «J. Biol. Chem.», 220, 583-593 (1956).
13. HERS, H. G., DE WULF, H., STALMANS, W. i VAN DEN BERGHE. — «Adv. Enzyme Regul.», 8, 171-190 (1970).
14. WALLI, A. K., BIRKMANN, L. i SCHIMMASSEK, H. — «Biochem. Soc. Trans.», 3, 1.039-1.041 (1975).
15. MILLER, T. B., Jr. — «Biochim. Biophys. Acta», 540, 151-161 (1978).