

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca en el Extranjero, 1975, individual. Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria. Centro de trabajo: Roche Institute of Molecular Biology. Nutley, New Jersey.

Fundación Juan March



FJM-Uni 56-San
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado d
Sánchez Lazo, Pedro.
1031628



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales

Pedro Sánchez Lazo

FJM

Uni-
56

San

56

Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales/Pedro Sánchez Lazo

Fundación Juan March
Serie Universitaria

56

Fructosa 1,6 Bisfosfatasa
de hígado de conejo:
modificación por
proteasas lisosomales



Pedro Sánchez Lazo



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

***La Fundación Juan March no se solidariza
necesariamente con las opiniones de los
autores cuyas obras publica.***

Depósito Legal: M - 15024 - 1978
I.S.B.N. 84 - 7075 - 086 - 0
Ibérica, Tarragona, 34.- Madrid-7

I N D I C E

	Página
1.— INTRODUCCION	3
2.— MODIFICACION POR SUBTILISINA	5
3.— MODIFICACION POR PROTEASAS LISOSOMALES	
3.1. Naturaleza de la modificación	6
3.2. Propiedades de la actividad transformante	13
3.3. Inactivación específica de la proteasa transformante	16
3.4. Papel de las membranas en la inactivación	20
3.5. Propiedades del factor de inactivación	23
4.— DISCUSION	25
5.— BIBLIOGRAFIA	27

1. INTRODUCCION.- La primera descripción de una fructosa difosfatasa específica fue la de Gomory(1) quien caracterizó el enzima como una fosfatasa alcalina que tenía muy poca o nula actividad a pH por debajo de 8. Posteriormente, otros investigadores obtuvieron preparaciones altamente purificadas del enzima(2-5). Estas preparaciones tenían curvas de pH análogas a las descritas por Gomory con la excepción de que algunas de ellas tenían alguna actividad a pH neutro. No obstante, algunos investigadores(6-9) habían decrito que los extractos crudos de hígado tenían FDP-asa que era activa a pH neutro y había algunas indicaciones de que el pH óptimo alcalino era el resultado de una modificación proteolítica del enzima nativo durante su aislamiento(6, 8,9). La primera evidencia clara de una modificación por proteasas endógenas fue la obtenida por Pogell y McGilverly(6) quienes describieron un incremento en la actividad del enzima a pH 9,2 cuando preparaciones parcialmente purificadas se incubaban con una fracción particulada de hígado de conejo. Este resultado sería confirmado más tarde por Nakashima y Horecker(10).

En 1971 pudo ser aislado en varios laboratorios el enzima con actividad óptima a pH neutro(11-13) confirmándose de esta forma definitivamente que la FDP-asa "alcalina" era un artefacto resultante de los métodos usados originalmente para su purificación.

Además de la diferencia en actividad, el enzima neutro se diferenciaba del alcalino en que mientras aquél estaba compuesto por cuatro subunidades de $M_r=36.000$, éste estaba constituido por cantidades variables de una subunidad cuya M_r era 29.000(11)

Algunas observaciones sugerían que la modificación proteolítica pudiera ocurrir también "in vivo" en ciertas condiciones fisiológicas. Así, se describió que el enzima aislado de conejos silvestres durante los meses de invierno mostraba indicaciones de que la modificación proteolítica había tenido lugar (aparecían trazas de subunidades de peso molecular pequeño), mientras que cuando el aislamiento se hacía durante los meses de verano el enzima no mostraba tales características(14). Diferencias análogas fueron también observadas cuando el enzima fue purificado de hígados de conejo de laboratorio expuestos al frío o a periodos prolongados ayuno(15,16), tratados con triamcinolona(17) ó en los que se indujo diabetes con alloxan(17). Estos hechos sugiriendo que la modificación proteolítica pudiera estar asociada con condiciones que favorecen la gluconeogénesis nos indujeron a examinar la naturaleza de tal modificación en la FDP-asa de hígado de conejo así como a intentar identificar y caracterizar los enzimas proteolíticos endógenos responsables de tales cambios.

2.-MODIFICACION POR SUBTILISINA: En nuestro laboratorio fueron estudiados originalmente los efectos de la subtilisina Calrsberg sobre la FDP-asa. Esta modificación constituía un excelente modelo puesto que los cambios que tenían lugar eran comparables a los observados con las proteasas endógenas(18). La incubación con subtilisina causa un incremento en la actividad del enzima a pH alcalino y una pérdida de sensibilidad hacia el AMP, que es un inhibidor alostético del enzima, mientras que la actividad a pH neutro cambia sólo ligeramente. El resultado final es que a pH 7,5 el efecto de la modificación proteolítica pareciera el de liberar al enzima de la inhibición por concentraciones fisiológicas de AMP. Estos cambios en las propiedades catalíticas están asociados con la conversión de las subunidades nativas ($M_r=36.000$) en una forma más ligera con $M_r=29.000$. Recientemente se ha podido comprobar que el péptido S($M_r=7.000$) no se libera durante la digestión sino que permanece asociado con las subunidades modificadas(19) y que el peso molecular de la proteína oligomérica permanece inalterado en 144.000. Sin embargo, en condiciones disociantes el péptido S y la subunidad residual pueden ser separados y aislados(19).

Estos resultados sugerían que la FDP-asa poseía una región limitada de su estructura sucepti-

ble al ataque por subtilisina y que el resto de la molécula era resistente porque una serie de fuertes interacciones no covalentes evitaba el acceso de la proteasa a los enlaces peptídicos. Esta hipótesis ha sido confirmada por el análisis estructural por el que se han identificado los sitios de ruptura por subtilisina(Figura1). El péptido S, que contiene 60 aminoácidos incluyendo el residuo NH_2 -terminal, que está bloqueado(20), ha sido secuenciado completamente(21).

3.-MODIFICACION POR PROTEASAS LISOSOMALES:

3.1. Naturaleza de la modificación. En nuestros estudios sobre la modificación de la FDP-asa hemos empleado una preparación de membranas lisosomales que cataliza la conversión de la FDP-asa neutra en FDP-asa alcalina. Esta preparación, cuyas propiedades se describirán más abajo, tiene la ventaja de ser insoluble, de forma que la reacción puede terminarse por centrifugación dejando sólo la FDP-asa modificada en el sobrenadante. Las membranas lisosomales se preparan por congelación y descongelación sucesiva de una fracción de partículas pesadas obtenida de hígado de rata(15). El material insoluble de esta preparación se lava después exhaustivamente hasta que los lavados están libres de material capaz de absorber luz ultravioleta. Cuando las membranas así preparadas se añadían a

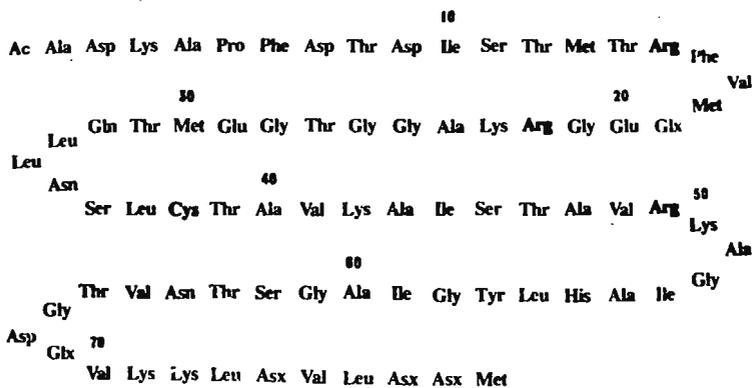


Figura 1.- Secuencia de aminoácidos en la región NH₂-terminal de la fructosa 1,6 difosfatasa de hígado de conejo. El péptido S originalmente aislado después de la digestión con subtilisina comprende hasta el residuo 60 (Ala). El péptido que se obtiene por digestión con proteasas lisosomales comprende hasta el residuo 64 (Asn).

la FDP-asa purificada se observaban cambios en las propiedades catalíticas del enzima similares a los obtenidos con subtilisina (Figura 2A). Es decir, un incremento en la actividad catalítica a pH 9,2 y un ligero descenso en la actividad catalítica a pH 7,5. Sin embargo, se encontraron algunas diferencias importantes entre los efectos de la preparación lisosomal y los de la subtilisina. La primera fue que el descenso en la sensibilidad a la inhibición por AMP era relativamente pequeño (Figura 2B). La segunda fue que los cambios en la estructura de las subunidades eran mucho más complejos. Además de la subunidad modificada con peso molecular de 29.000, también se observó la formación de una subunidad con $M_r=26.000$. Estas subunidades eran inestables y aparentemente eran degradadas a péptidos con $M_r=13.000$. El péptido con $M_r=29.000$ era estable incluso después de largos periodos de exposición a las membranas lisosomales.

A pesar de la presencia de por lo menos cinco péptidos diferentes en el enzima digerido durante dos horas con las membranas lisosomales (Figura 3B), la estructura cuaternaria del enzima permanecía inalterada y en condiciones no disociantes (figura 3A) la proteína digerida eluía en un sólo pico, que contenía la actividad enzimática, de una columna de Sephadex G-75.

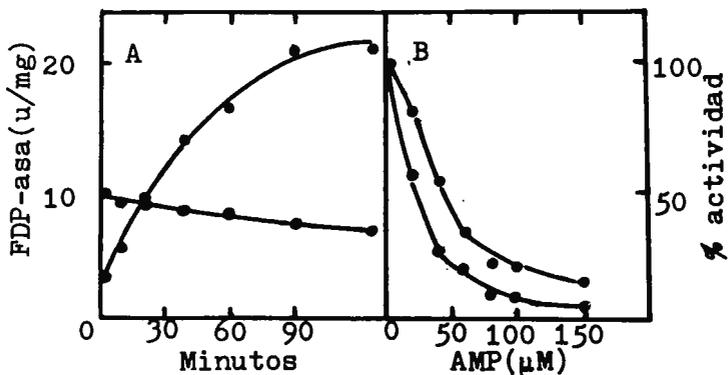


Figura 2.- Cambios en las propiedades catalíticas y reguladoras de la FDP-asa durante su digestión con una fracción de membranas lisosomales. (A) Ensayos de actividad realizados a pH 9,2(●) y a pH 7,5(○). (B) Inhibición por concentraciones crecientes de AMP antes(○) y después(●) de la digestión con membranas lisosomales durante 120 minutos.

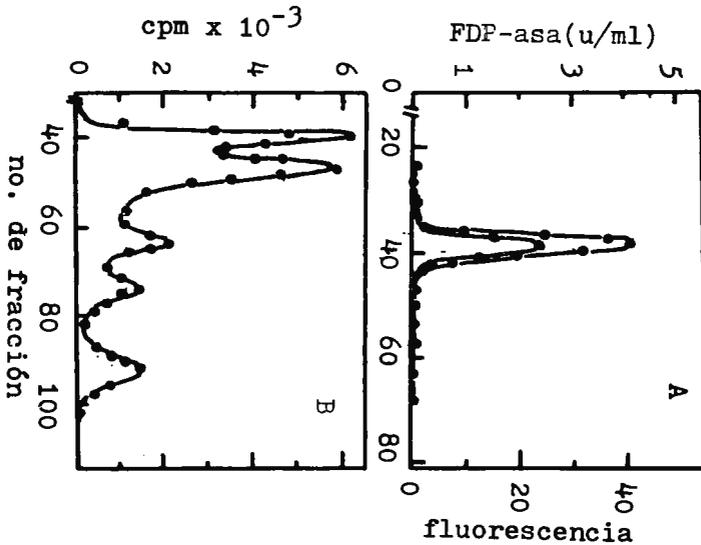


Figura 3.- Cromatografía en condiciones disociantes y no disociantes del enzima digerido con una preparación de membranas lisosomales. (A) La FDP-asa digerida como se indica en la figura 2 se cromatografió en una columna de Sephadex G-75 de 2m x 1,6 cm equilibrada con tampón acetato 0,1M pH 6,5. En las fracciones se analizó actividad FDP-asa(●) y proteína total con fluorescamina(o). (B): Las fracciones 35-44 de la columna A se carboximetilaron con iodoacetato(¹⁴C) y el producto se analizó en una columna similar a la exterior equilibrada con 10% de ácido fórmico.

Evidentemente la acción de las proteasas lisosomales estaba limitada por fuertes interacciones no covalentes que prevenían del desdoblamiento de la estructura residual. Como confirmación directa de esta idea se encuentra el hecho de que el enzima es completamente digerido en pequeños trozos si su estructura se ha relajado al modificar químicamente los residuos de arginina con butanodiona.

Uno de los sitios de ruptura, el que da lugar a los péptidos con $M_r=29.000$ y $M_r=7.000$ ha sido identificado. Las fracciones de la figura 3B que contenían los péptidos 29K y 7K fueron reunidas y se determinaron las secuencias de aminoácidos en sus extremos NH_2 -terminal y $COOH$ -terminal. Los resultados indicaron que la hidrólisis había tenido lugar en el enlace peptídico 64-65 (Asn-Val) (Figura 4), adyacente a uno de los enlaces peptídicos susceptible a la acción de la subtilisina. Este hecho apoya fuertemente la hipótesis de que la estructura del enzima nativo contiene en esa región un péptido expuesto al medio que es susceptible al ataque por distintas proteinasas. Sin embargo, otras regiones expuestas al medio, resistentes a la subtilisina pero susceptibles al ataque por proteasas lisosomales, deben estar presentes en la estructura para explicar la formación de los péptidos con pesos moleculares de 26.000 , 13.000 y 10.000.

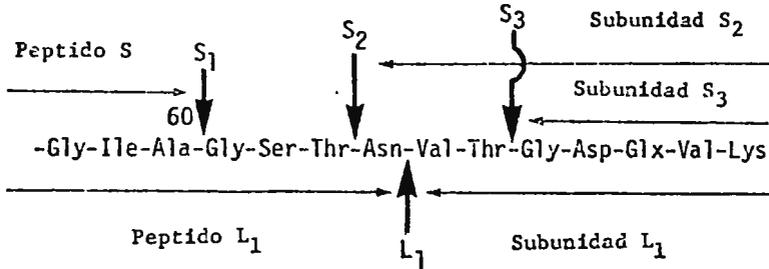


Figura 4.- Sitio de ruptura por la proteasa lisosomal. Las fracciones que componían el segundo pico en el experimento de la figura 3B correspondientes al péptido de 29.000 daltons se reunieron y se determinó la secuencia de aminoácidos del extremo NH₂-terminal que empezaba por Val. Las fracciones correspondientes al último pico (7.000 daltons) se analizaron para determinar la secuencia del extremo COOH-terminal, que era Asn. Los aminoácidos están numerados empezando desde el extremo NH₂ del enzima nativo (ver figura 1). Se indica el sitio de ruptura por las membranas lisosomales (L₁) y se compara con los sitios de ruptura por la¹subtilisina (ver también figura 1).

3.2. Propiedades de la actividad transformante.

La actividad transformante se encuentra en los lisosomas (22), pero por conveniencia práctica, la mayoría de los experimentos que se describen aquí han sido realizados con una fracción pesada que contiene lisosomas y mitocondrias(16). La fracción pesada que se obtiene en sacarosa isotónica a partir del tejido hepático es inactiva; sin embargo, la actividad transformante, junto con otras actividades lisosomales, se puede poner de manifiesto por congelación y descongelación de la fracción pesada ó añadiéndole Triton X-100(Figura 5). Después de una congelación y descongelación aproximadamente el 60% de AT aparece en la fracción soluble, pero a medida que se aumenta el número de veces que la preparación se congela y descongela, la actividad se reasocia con las membranas de tal forma que después de 10 ciclos la actividad soluble se reduce a menos del 25%. Un comportamiento similar se observa en el caso de la hexosaminidasa: inicialmente entre el 50 y el 65% del total de la actividad está en la fracción soluble mientras que después de 10 ciclos de congelación y descongelación ésta fracción se reduce a menos del 10%. Tanto la actividad transformante de las membranas como la hexosaminidasa pueden ser eluidas con una concentración salina de 0,1M (Fig. 5).

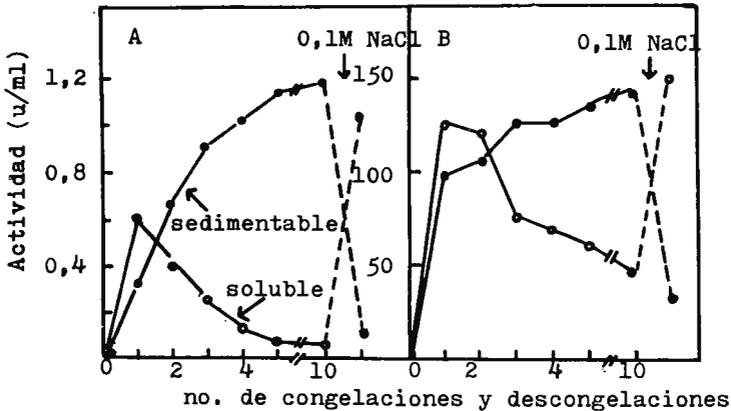


Figura 5.- Efecto de sucesivas congelaciones y descongelaciones en la distribución de dos actividades lisosomales entre las fracciones particulada y soluble. La fracción de partículas pesadas suspendida en sacarosa fue congelada y descongelada 10 veces como se ha indicado anteriormente. Después de cada ciclo se tomó una alícuota y se centrifugó, valorándose las actividades en el sobrenadante y en el sedimento resuspendido en el volumen original. Las actividades valoradas fueron hexosaminidasa (A) y actividad transformante (B). Después del décimo ciclo la fracción particulada se suspendió en NaCl 0,1M y se determinaron de nuevo las actividades. La AT se determinó valorando el aumento en la actividad específica de la FDP-asa a pH 9,2 después de 30 min. de incubación a 30°C.

La reasociación de la actividad eluida con las membranas no se pudo observar en el caso de otras proteasas lisosomales ensayadas(Tabla I).

TABLA I

Efecto de la congelación y descongelación en la distribución de enzimas lisosomales entre la fracción soluble y la particulada.

<u>Actividad</u>	<u>1 ciclo</u> <u>% Soluble</u>	<u>10 ciclos</u> <u>% Soluble</u>
Actividad Transformante	66	28
Hexosaminidasa	35	5
Catepsina A	55	53
Catepsina B ₁	67	69
Catepsina C	89	95
Catepsina D	39	50

Según Nakashima y Ogino(23) la actividad transformante de hígado de conejo copurifica con la catepsinaB₁ pero los resultados obtenidos por nosotros con hígado de rata indican que son dos enzimas diferentes. Así, por ejemplo, la AT tiende a reasociarse con las membranas lisosomales durante la congelación y descongelación mientras que la catepsina B₁ no muestra tal tendencia. Otras propiedades de la AT sirven para distinguirla de la catepsina B₁. Entre éstas se encuentran el efec-

to de inhibidores sobre su actividad(Figura 6). La leupeptina, que es un inhibidor de la catepsina B₁(24) no es capaz de inhibir la actividad transformante, que es inhibida por TPCK ó iodoacetato y también parcialmente inhibida por PMSF y TLCK. Al contrario que la catepsina B₁(23,24) la AT no es activada por reactivos del grupo SH como el mercaptoetanol o el ditiotreitól.

3.3. Inactivación específica de la proteasa transformante de la FDP-asa.

Una propiedad importante de la AT que la identifica como un enzima diferente de todas las catepsinas ensayadas es su sensibilidad, en presencia de sal, a un factor, presente también en la fracción pesada, al que llamaremos factor de inactivación de la AT ó, simplemente, FI. La observación original fue que la AT presente en la fracción soluble era inactivada durante el fraccionamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ó cualquier otro fraccionamiento que conllevara la adición de sal. En presencia de NaCl 0,1M la actividad era completamente destruida después de 30 minutos a temperatura ambiente.

Al contrario que la actividad presente en la fracción soluble, la actividad adsorbida a las membranas y después eluida con sal era completamente estable. Esto sugería que un factor adicional, que no estaba en la fracción eluida de las membra-

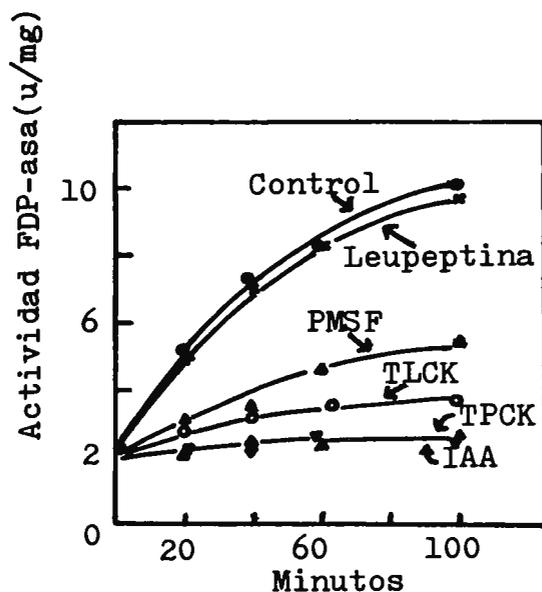
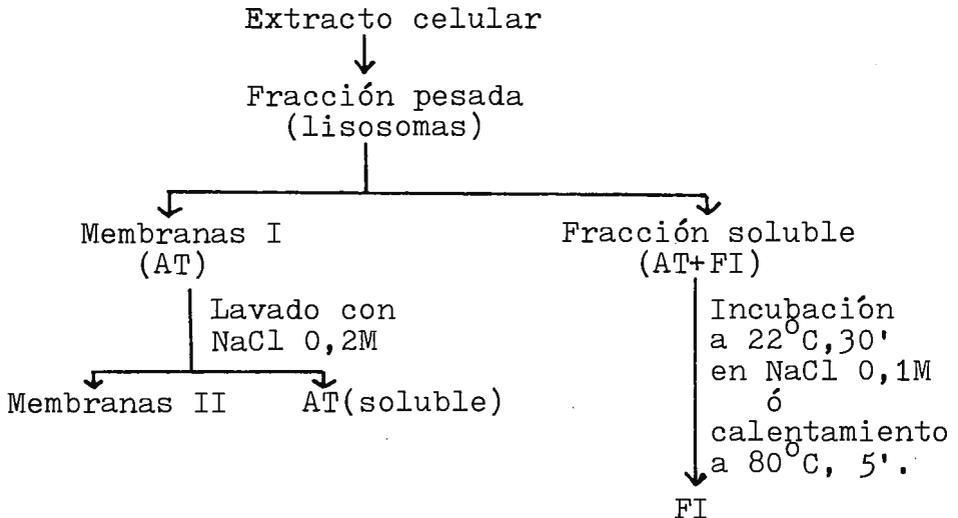


Figura 6.- Efecto de distintos inhibidores en la actividad transformante. Se determinó el aumento en la actividad específica de la FDP-asa durante la incubación con las membranas lisosomales en presencia de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de leupeptina o en presencia de los otros inhibidores indicados en concentraciones 1 mM. En otros experimentos se determinó que la leupeptina tampoco es capaz de inhibir la forma soluble del enzima transformante.

nas por la sal, era requerido para que la inactivación tuviera lugar. Para probar esta hipótesis se añadió sal a la fracción soluble de los lisosomas y, después de incubarla durante 30 minutos para inactivar la AT endógena, se ensayó su actividad FI sobre la AT eluida de las membranas con NaCl (Figura 7). En el control sin FI la AT eluida de las membranas era completamente estable. En los otros casos, después de la adición de FI, la actividad AT empezó a reducirse y la velocidad de inactivación era proporcional a la cantidad de FI añadida.

Así pues, se puede llegar a dos fracciones que contienen FI y AT respectivamente, en ausencia del otro, de acuerdo con el siguiente esquema de preparación:



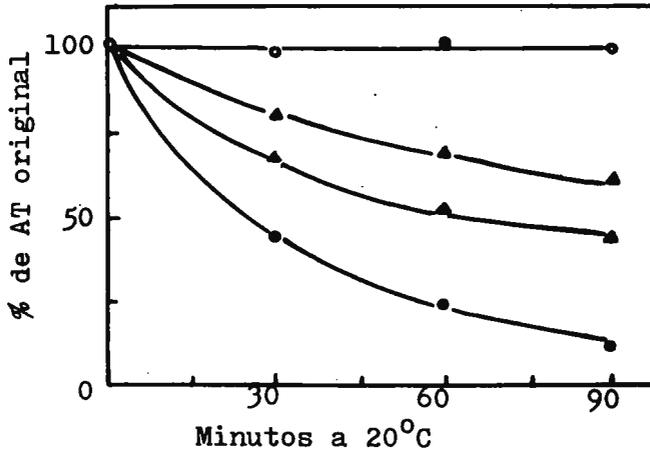


Figura 7.- Requerimiento de un factor soluble para la inactivación del enzima transformante. El control(o) representa la actividad del enzima transformante eluido a partir de la fracción particulada después de diez ciclos de congelación y descongelación utilizándose un volumen de NaCl 0,1M igual al volumen original de la fracción de partículas pesadas(ver figura 5). FI representa el factor de inactivación presente en el sobrenadante después de un ciclo de congelación y descongelación que ha sido incubado durante 30 min. con NaCl 0,1M a temperatura ambiente para inactivar la AT endógena. Un volumen de solución de AT se mezcló con 0,33(Δ), 0,5(▲) y 1(●) volúmenes de la solución de FI y se incubó como se ha descrito anteriormente.

La inactivación por sal en presencia de FI es específica para la actividad transformante. Ninguna de las catepsinas ensayadas perdió actividad alguna en las mismas condiciones en las que la AT era inactivada y la hexosaminidasa era también estable en dichas condiciones (Figura 8). Estos resultados confirmaron nuestra conclusión original de que la actividad transformante no se debe a la catepsina B₁ como tampoco es debida a ninguna de las catepsinas ensayadas.

3.4. Papel de las membranas en la reacción de inactivación.

Hemos descrito cómo la presencia de las membranas protege a la AT de la inactivación por FI. Aparentemente la razón es que en presencia de NaCl (u otra sal) las membranas pueden unir el FI originalmente soluble de forma que no puede ejercer su acción. Tal hecho se haya confirmado por el experimento expresado en la Tabla II en el que alícuotas conteniendo FI (fracción FI del esquema de la pg. 18) se incubaron con varias cantidades de membranas (fracción Memb. II del mismo esquema) en presencia de NaCl 0,1M. Las membranas se separaron después por centrifugación y a continuación se ensayó la actividad de FI en el sobrenadante frente a una preparación de AT. Los resultados indican que las membranas pueden "cazar" el FI soluble de una forma cuantitativa, lo cual está en favor de un papel activo de las membranas

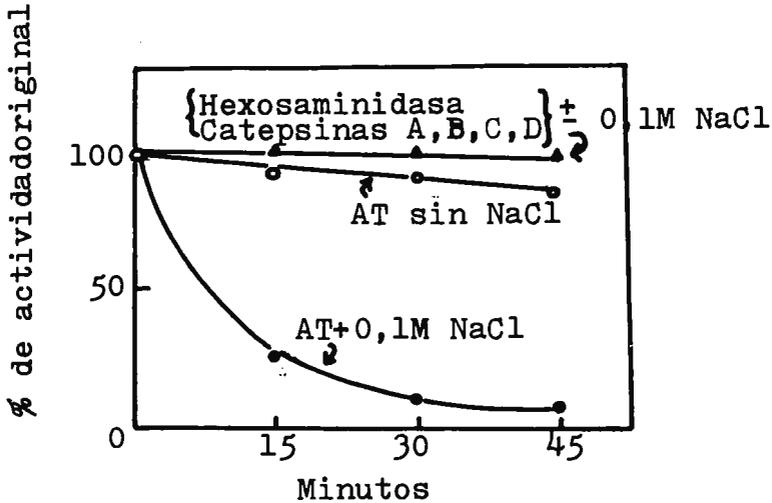


Figura 8.- Especificidad del factor de inactivación. El sobrenadante de después del primer ciclo de congelación y descongelación se llevó a una concentración 0,1M de NaCl y se incubó a temperatura ambiente. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas en las que se valoraron la actividad transformante, las catepsinas A, B, C y D y la hexosaminidasa. Al mismo tiempo se hicieron controles para cada enzima a los que no se añadió NaCl.

en el control de FI y por lo tanto en una posible vía de controlar la actividad de la FDP-asa.

TABLA II

Adsorción por las membranas lisosomales del FI presente en la fracción soluble.

Volúmenes de M II incubados con FI(*)	% de AT inactivado en 30' por el sobrenadante de la incubación.
0	70
0,25	53
0,50	30
1,0	5
Control de AT(**)	12
1,0 (Membranas presentes durante la reacción de FI y AT)	12

(*) 1 volumen indica la proporción en que las membranas y la fracción soluble se encuentran en la preparación original de lisosomas.

(**) AT incubado con NaCl 0,1M sin adición de FI

3.5. Propiedades del factor de inactivación.

En la Tabla III se indican algunas de las propiedades del factor de inactivación. El factor es termoresistente y no es precipitable por ácido tricloroacético. Su peso molecular, basado en su retención por membrana de diálisis spectrapor 3 es mayor de 3.000. Sin embargo no es retenido por un filtro Aminco capaz de retener moléculas con Mr mayor de 15.000. Es precipitado por 10 volúmenes de acetona pero no lo es por ácido perclórico. Finalmente, es resistente a la acción de la tripsina y a la de la Pronasa. Un conocimiento más amplio de la naturaleza del factor de inactivación debe esperar hasta su purificación y caracterización química.

TABLA III

Propiedades del factor de inactivación

3.000	Mr	15.000
Estable a 100°C, 5 minutos.		
Precipitable por 90% de acetona		
No precipitable por HClO ₄		
Resistente a tripsina y Pronasa		

Una propiedad particularmente interesante del FI es su capacidad de ser adsorbido por las membranas en presencia de NaCl, como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto el FI puede ser libera-

do de los lisosomas durante la congelación y descongelación en ausencia de sal pero después puede ser readsorbido a las membranas en presencia de sal. De esta forma el efecto de la sal en la adsorción del FI a la fracción de las membranas es recíproco al observado en el caso de la actividad transformante de la FDP-asa(Tabla IV)

Tabla IV

Liberación y adsorción de AT y FI de las membranas lisosomales

<u>Actividad transformante</u>	<u>Factor de inactivación</u>
Liberado de los lisosomas por congelación y descongelación en sacarosa 0,25M	Igual
Readsorbida a las membranas al repetir la congelación y descongelación	Permanece en el sobrenadante
Se eluye de las membranas con sal	Se adsorbe a las membranas en presencia de sal

4.- DISCUSION.

Los resultados presentados indican que la regulación de la actividad de la FDP-asa puede ser un fenómeno muy complejo en el que pueden jugar un papel distinto factores como proteasas y agentes que regulen la actividad de éstas. En otras palabras, es posible que pueda existir un mecanismo de los conocidos como "de cascada" en el que el objetivo final de la regulación sólo se cumple después de que varios acontecimientos concretos se han producido y en un orden determinado.

La FDP-asa como uno de los enzimas clave en la regulación de la gluconeogénesis pudiera así estar sometida a dos tipos diferentes de control. Es fácil pensar en un mecanismo por el que el enzima responde a la presencia o ausencia de efectores alostéricos y otro mecanismo, con efectos más a largo plazo, por el que el enzima se vería adaptado a situaciones "crónicas" en las que el suministro de glucosa se viera reducido sistemáticamente. La regulación proteolítica podría ser un mecanismo de este tipo.

Hay aún muchos puntos oscuros en el posible papel de la proteólisis como mecanismo regulador en este caso concreto. El objetivo de conocer más íntimamente la proteína encargada de la modificación está aún abierto.

En el dominio concreto del factor que inactiva a la actividad transformante ni siquiera se conoce su naturaleza. Es evidente que la presencia de este factor en los lisosomas ha abierto un nuevo campo en el que trabajar con objeto de establecer de una forma más concreta su participación en la regulación de la actividad de la fructosa 1,6 difosfatasa.

BIBLIOGRAFIA

1. Gomori, G. (1943) J. Biol. Chem. 148, 139-149.
2. Pogell, B.M. y McGilvery, R.W. (1954) J. Biol. Chem. 208, 149-157.
3. Mokrasch, L.C. y McGilvery, R.W. (1956) J. Biol. Chem. 221, 909-917.
4. Mendicino, J. y Varashely, F.J. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3528-3534.
5. Pontremoli, S. et al (1965) J. Biol. Chem. 240, 3464-3469.
6. Pogell, B.M. y McGilvery, R.W. (1952) J. Biol. Chem. 197, 293-302.
7. Pogell, B.M. (1961) en "FDP-ase and its role in gluconeogenesis" (McGilvery & Pogell eds.) pp. 20-30. American Institute of Biological Sciences, Washington, D.C.
8. Hers, H.B. y Kusaka, T. (1953) Biochim. Biophys. Acta. 11, 427-437.
9. Byrne, W.L. (1961). Obra citada en referencia 7 pp. 89-100.
10. Nakashima, L. y Horecker, B.L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146, 153-160.
11. Traniello, S. et al (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146, 161-166.
12. Byrne, W.L. et al (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146, 118-133.
13. Carlson, C.W. et al (1973) J. Biol. Chem. 248, 5555-5561.

14. Pontremoli, S. et al (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 303-305.
15. Pontremoli, S. et al (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3674-3678.
16. Pontremoli, S. et al (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1776-1779.
17. Pontremoli, S. et al (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2969-2973.
18. Pontremoli, S. et al (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 661-664.
19. Dzugaj, A. et al (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 638-646.
20. El-Dorry, H.A. et al (1977) Arch. Biochem. Biophys. 178, 200-207.
21. El-Dorry, H.A. et al (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 763-773.
22. Pontrelomi, S. et al (1976) Biochemie 58, 149-154.
23. Nakashima, L. y Ogino, K. (1974) J. Biochem. 75, 355-365.
24. Aoyagi, T. y Umezawa, H. (1975) en "Proteases and Biological Control"(Reich, rifkin y Shaw eds) pp. 429-454. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.



FUNDACION JUAN MARCH SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso / A. Fierro*
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua/A. Mulet*
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla/F. Velasco*
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados/J.M. Santiuste*
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura/José Luis Vicent López*
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos/José Alemán Vega*
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos/José Plá Carrera*
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935–1973) / F. Torres Monreal*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular/J.M. Drake Moyano*
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn ^c Ezra/Carlos del Valle Rodriguez*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*
Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos/Carlos Solís Santos*
(Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica./ Gumersindo Ruíz Bravo*
(Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-Adrenérgicos./ José Salvador Serrano Molina*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial./Miguel Durán-Lóriga*
(Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información./ Antonio Pascual Acosta*
(Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile*
Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*
Teoría y realizaciones. /Juan Manuel Martín Sánchez
(Ingeniería. España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 27.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 28.— *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* /Vicente Zugasti Arbizu
(Física. España, 1975)
- 29.— *Transferencia de carga en aleaciones binarias./ Julio A. Alonso*
(Física. Extranjero, 1975)
- 30.— *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastian Franco.
(Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.* Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudio sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.* / Eduardo Acosta Mendez (Filosofía. España, 1973)
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.* / Salvador Ordoñez Delgado (Geología. España, 1975).
34. *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obrero y empleados.* / Federico Durán López (Derecho. España, 1975)
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.* / Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.* / Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.* / Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos, Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.* / José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.* / José Luis Blasco Olcina (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.* / M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología, España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.* / Francisco Sandoval Hernandez (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.* / José Antonio Pero-Sanz Elorz (Ingeniería. España, 1974).
- 43.— *Virus de insectos: Multiplicación, aislamiento y bioensayo de baculovirus.* / Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
- 44.— *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.* / Lucas Sanchez Rodriguez. (Biología. España, 1976).

45. – *Sistema automático para la exploración del campo visual.*
José Ignacio Acha Catalina (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
España, 1975).
46. – *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección
mecánica/ Margarita Ruiz Altisent (Ciencias Agrarias. España 1975).*
47. – *El uso del ácido salicílico para la medida del p^H intracelular en
las células de Ehrlich y en escherichia coli/ Francisco Javier
García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
Extranjero, 1974).*
48. – *Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación
de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica. /
Antonio García García. (Medicina, Farmacia y Veterinaria.
España, 1975).*
49. – *Introducción a los espacios métricos generalizados.*
Enrique Trillas y Claudi Alsina. (Matemáticas. España, 1974).
50. – *Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados. / Enrique
Pando Ramos (Química, España, 1975).*
51. – *Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la
mejora. / Fernando Orozco y Carlos López-Fanjul (Biología
Genética. España, 1973).*
52. – *Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa
plexiforme externa de la retina. / Antonio Gallego Fernández
(Biología Neurobiología. España, 1975).*
53. – *Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham. / M^a.
Teresa Herrera Hernández. (Literatura y Filología. España 1976).*
54. – *Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago. / Rafael
Flaquer Montequi. (Filosofía y Letras. España, 1975).*
55. – *Una contribución al estudio de las teorías de cohomología
generalizadas. / Manuel Castellet Solanas. (Matemáticas.
Extranjero, 1974).*

