

## INFLUENCIA DE LA FLUIDEZ DE LA MEMBRANA SOBRE LA ATPasa DEPENDIENTE DE $Ca^{2+}$ DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO \*

### The influence of membrane fluidity on calcium dependent ATPase from Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle

José A. Teruel, Esmerilda G. Delicado, Francisco G. Carmona, Francisco G. Cánovas y Juan C. Gómez

Departamento de Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.

Recibido: 20 abril

#### RESUMEN

Se ha utilizado DMPC o DPPC para reconstituir  $Ca^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico y así disponer de un sistema lípido-proteico que contenga un único tipo de fosfolípido y un único tipo de proteína. Para estudiar el efecto del entorno lipídico sobre la proteína se han medido los cambios que tienen lugar en la actividad enzimática al variar la temperatura y la composición lipídica de la membrana. Los datos obtenidos mediante la variación de la actividad ATPasa con la temperatura revelan un aumento de la energía de activación a la temperatura de transición del fosfolípido y también a una temperatura inferior, a la cual tiene lugar la fusión de agregados lípido-proteicos. La dependencia de la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa reconstituida con DPPC con la concentración de sustrato (ATP) no sigue el modelo de Michaelis-Menten. Se propone un modelo cinético en el cual tiene lugar una activación por exceso de sustrato. Al estudiar la variación de los parámetros cinéticos asociados al modelo propuesto encontramos que todos ellos aumentan considerablemente a aproximadamente 30° C, temperatura por debajo de la temperatura de transición del DPPC (41° C). A esta temperatura tiene lugar la fusión de los agregados lipoproteicos ricos en proteína cuando el lípido utilizado es el DPPC.

*Palabras clave:* Biomembranas,  $Ca^{2+}$ -ATPasa, retículo sarcoplásmico.

#### SUMMARY

The ATPase from sarcoplasmic reticulum was reconstituted using either DMPC or DPPC in order to obtain a lipid-protein system with a single lipidic component and only one type of protein. The effects of the lipidic microenvironment on the protein have been studied through changes in enzyme activity at different temperatures and with different phospholipid composition of the membrane. The results obtained after the dependence of ATPase activity on temperature reveal an increase of activation energy at the transition temperature of the phospholipid ( $T_c$ ) and also at a temperature lower than  $T_c$  corresponding to the fusion of lipid-protein patches. ATPase reconstituted with DPPC did not follow a Michaelis-Menten type of kinetic model in which activation by excess of substrate (ATP) is proposed. A study of the proposed kinetic parameters showed that all of them notably increased at approximately 30° C, being this temperature below  $T_c$  for DPPC (41° C). This is the temperature at which the protein-rich lipid-protein patches melted in the DPPC-ATPase samples.

*Keywords:* Biomembranes,  $Ca^{2+}$ -ATPase, sarcoplasmic reticulum.

\* Este trabajo se ha realizado con una subvención de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica. (Proyecto n.º 0278-81)

## INTRODUCCIÓN

Las membranas del retículo sarcoplásmico se han caracterizado muy detalladamente en sus aspectos estructurales y funcionales (1, 2, 3). La principal proteína es la ATPasa que funciona como una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta proteína se encuentra asociada con lípidos de membrana que afectan notablemente a su actividad enzimática (4-6). Los lípidos en contacto con el enzima modulan su función mediante interacciones físicas, siendo especialmente importante la fluidez de la membrana (5-7).

Una de las mejores formas de investigar estas interacciones lípido-proteína es la reconstitución del enzima en una membrana bien definida donde se encuentre un único tipo de proteína y un único tipo de fosfolípido. Esto es precisamente lo que se realizó en experimentos anteriores con este enzima, utilizándose DMPC y DPPC (8-11). En estos trabajos se utilizaron

técnicas como microscopía electrónica de criofractura y réplica, RMN de  $^2\text{H}$  y  $^3\text{P}$ , fluorescencia de despolarización usando difenilhexatrieno como sonda, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y fotólisis inducida por destellos de láser. Las principales conclusiones obtenidas fueron que por debajo de  $T_c$  las proteínas quedaban agregadas en un conglomerado lipoprotéico rico en proteínas que quedaba segregado del fosfolípido cristalino. Al calentar y llegar a una cierta temperatura ( $30^\circ\text{C}$  en el caso del DPPC), por debajo de  $T_c$  del fosfolípido puro ( $41^\circ\text{C}$  para el DPPC) se produce una fusión parcial del fosfolípido que se atribuyó al atrapado en los agregados mencionados que tendrían un carácter de eutéctico. Al llegar a  $37-38^\circ\text{C}$ , en el caso del DPPC se produciría la fusión del resto de los fosfolípidos con lo que las proteínas quedarían libres para difundir en el plano de la membrana, observándose que se disponen entonces al azar.

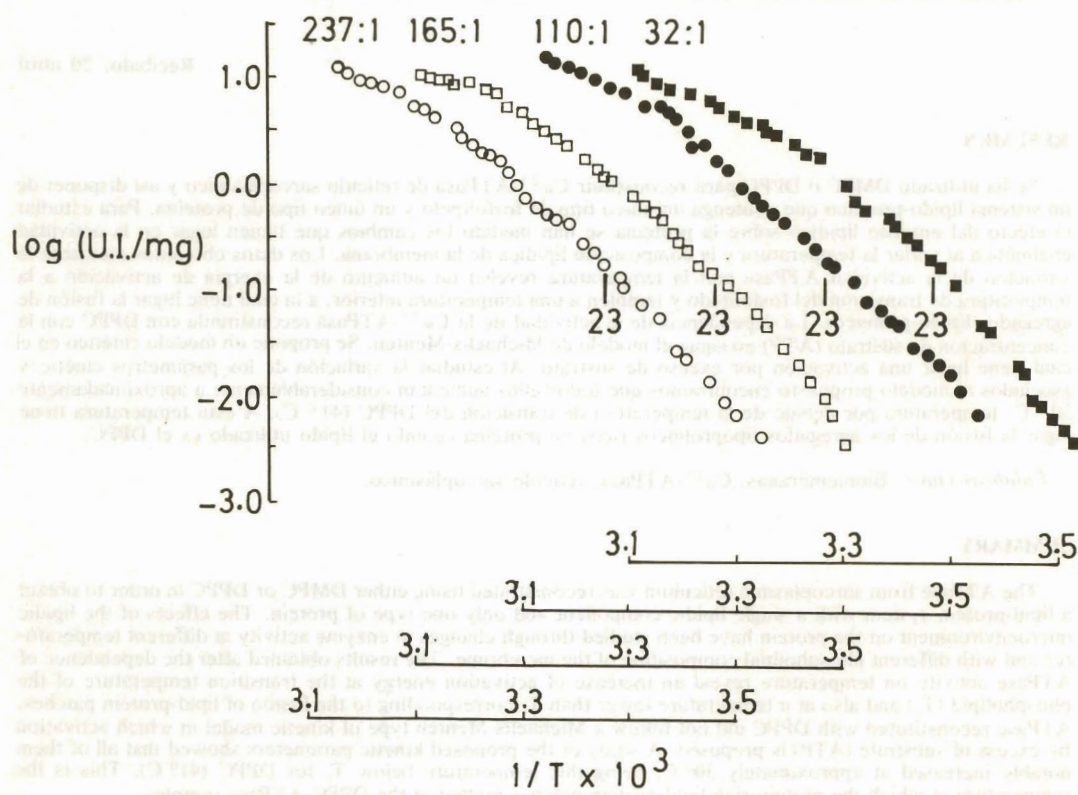


FIGURA 1. Representaciones de Arrhenius de la actividad ATPasa (expresada en Unidades Internacionales por miligramo de proteína) de preparaciones de muestras reconstituidas con DMPC a las relaciones molares lípido-proteína indicadas.

En este trabajo se estudia el efecto de estos cambios de fase sobre la actividad enzimática y sobre los parámetros cinéticos del enzima así como la estabilización de la proteína por los diferentes tipos de fosfolípidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Purificación de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa

El retículo sarcoplásmico se preparó a partir de músculo blanco dorsal y de las patas posteriores de conejo, de acuerdo al método de Nakamura y col. (12). La  $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPasa (ATP fosforilasa, EC 3.6.1.3.) se purificó de estas membranas según el método de Warren y col. (13) usando 0.3 mg de colato por mg de proteína.

### Preparación de ATPasa reconstituida

La ATPasa purificada se reconstituyó en vesículas de dipalmitilfosfatidilcolina (DPPC), con diferentes razones molares fosfolípido-proteína, de acuerdo al método de Gómez-Fernández y col. (9).

### Procedimientos analíticos

Las muestras reconstituidas se analizaron para confirmar la sustitución de los fosfolípidos endógenos de retículo sarcoplásmico por el DPPC añadido, mediante análisis de ácidos grasos. Para ello se transesterificaron con trifluoruro de boro/metanol, como se describió en otro trabajo anterior (9), usando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, equipado con una columna de 10% de DEGS sobre un soporte de Chromosor de 80/100 mallas. Las muestras reconstituidas mostraron un 95-99% de ácido palmítico.

La relación lípido:proteína de las muestras se calculó suponiendo que la ATPasa tiene 115.000 dalton (13) y analizando el fósforo orgánico de acuerdo a Barlett (14) y las proteínas según Lowry (15), utilizando en este último caso albúmina de suero bovino como patrón y añadiendo deoxicolato al 2% a todos los tubos para la solubilización de las muestras. El valor de la concentración de proteínas se dividió por 1.2 para compensar la diferencia de color producido entre la albúmina y la ATPasa (16).

La actividad ATPasa se midió utilizando un sistema de enzimas acoplados. La mezcla de reacción estaba formada por 100 mM de KCl, 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM de EGTA, 2 mM de fosfoenolpiruvato, 2 mM  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP (variable en algunas medidas), 0.2 mM de NADH, 4 unida-

des/ml de piruvato quinasa, 6 unidades/ml de lactato deshidrogenasa, en 100 mM de trietanolamina, pH 7. Las muestras se equilibraron a la temperatura requerida antes de añadir  $\text{CaCl}_2$  de una disolución 50 mM para dar una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre real de 1.58  $\mu\text{M}$ . La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre real se estimó mediante un programa de computador (17) que tiene en cuenta las concentraciones presentes de EGTA,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , ATP, fosfoenolpiruvato, KCl, fosfato y además el pH.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Influencia de la fluidez de la membrana

Se ha reconstituido ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  empleando dimiristilfosfatidilcolina (DMPC) y dipalmitilfosfatidilcolina (DPPC). Se han utilizado preparaciones de ATPasa reconstituida con cantidades diferentes de lípidos, para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. A 43°C, es decir, por encima de la temperatura de transición, tanto de dimiristilfosfatidilcolina como de dipalmitilfosfatidilcolina, las actividades específicas eran de 8-10 unidades/mg para la muestra de DMPC y de 15-20 unidades/mg para la de DPPC.

El retículo sarcoplásmico nativo y las muestras reconstituidas con dimiristilfosfatidilcolina, muestran actividades similares a 43°C. No se observaron cambios en actividad específica, al variar la relación lípido:proteína, excepto en el caso de la muestra de dipalmitilfosfatidilcolina-ATPasa con relación molar 28:1, que tiene una actividad menor que las demás (10 unidades/mg).

Las representaciones de Arrhenius de la actividad específica, muestran perfiles no lineales (figuras 1 y 2). Aunque no se observaron en general, cambios bruscos en la energía de activación ( $E_a$ ), sí que se apreciaron cambios graduales en ciertos intervalos de temperatura críticos. En los recombinantes de dimiristilfosfatidilcolina ocurre un cambio en  $E_a$  a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , que podría relacionarse con la fase de transición del lípido. Por debajo de esta temperatura, la  $E_a$  es mayor, es decir, la actividad es más dependiente de la temperatura. Todas las muestras reconstituidas con DMPC, muestran el mismo perfil, independientemente de la relación lípido-proteína. En las reconstituidas con DPPC, se observan dos discontinuidades, una a 28-30°C y otra a 40°C aproximadamente. La  $E_a$  es máxima en este intervalo de temperatura. De nuevo los perfiles de actividad parecen ser independientes de la relación lípido-proteína.

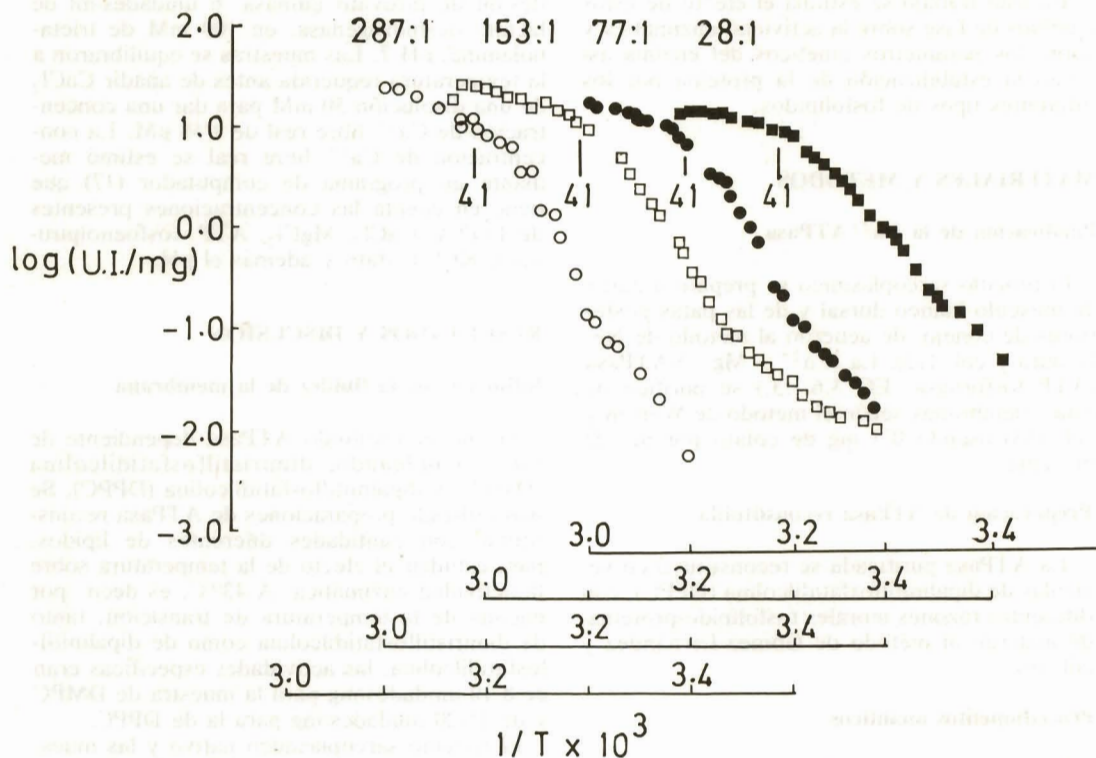


FIGURA 2. Representaciones de Arrhenius de la actividad ATPasa (expresada en Unidades Internacionales por milígramo de proteína) de preparaciones de muestras reconstituidas con DPPC a las relaciones molares lípido-proteína indicadas.

Estos resultados se pueden interpretar de acuerdo a experimentos anteriores realizados con técnicas físicas (9-10), como reflejo de la fusión de agregados lipoprotéicos, ricos en proteínas.

Esta fusión, que ocurriría a varios grados por debajo de la temperatura de transición (28-30°C) en el caso de DPPC, permite una mayor movilidad rotacional de la ATPasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y por consiguiente una mayor actividad enzimática.

#### Estabilidad de las muestras con la temperatura

Se han utilizado muestras reconstituidas, DMPC-ATPasa, DPPC-ATPasa y retículo sarcoplásmico nativo. Todas ellas presentaban una relación molar lípido:proteína similar al retículo sarcoplásmico nativo (80-90:1).

Las representaciones de Arrhenius de la actividad específica de las tres muestras (figura 3), muestran un descenso de la actividad a temperaturas elevadas. Las actividades máximas se

observan a  $47.5 \pm 0.6^\circ C$ , para la ATPasa reconstituida con dimiristilfosfatidilcolina,  $50.1 \pm 1^\circ C$  para la reconstituida con dipalmitilfosfatidilcolina y  $55 \pm 1.1^\circ C$  para la ATPasa de retículo sarcoplásmico nativo.

El descenso observado a temperaturas elevadas, puede ser debido a la desnaturalización térmica de la proteína, que predomina en este intervalo de temperaturas sobre la activación térmica.

Por debajo de  $35-37^\circ C$ , la muestra DMPC-ATPasa tiene una mayor actividad que la DPPC-ATPasa. Puesto que ambas muestras tienen igual relación molar lípido-proteína y la temperatura es igual para ambas, este hecho se puede atribuir a la mayor fluidez de la muestra de DMPC-ATPasa, ya que a estas temperaturas la membrana está en estado fluido.

El retículo sarcoplásmico presenta mayor fluidez que las muestras reconstituidas, debido al elevado contenido en ácidos grasos insaturados y también se observa una gran actividad a bajas temperaturas.

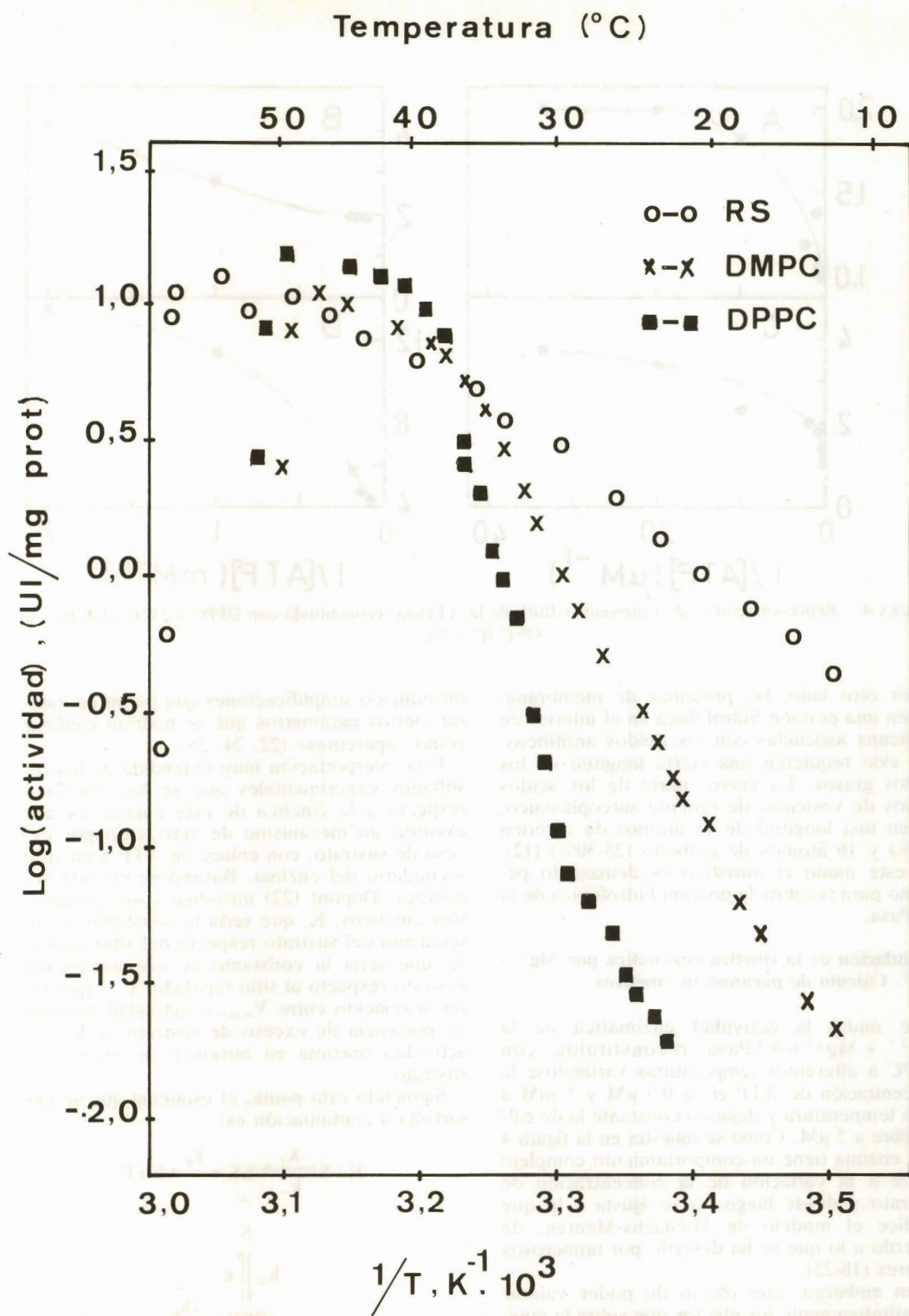


FIGURA 3. Representaciones de Arrhenius de la actividad ATPasa (expresada en Unidades Internacionales por miligramo de proteína) de las muestras indicadas en la figura.

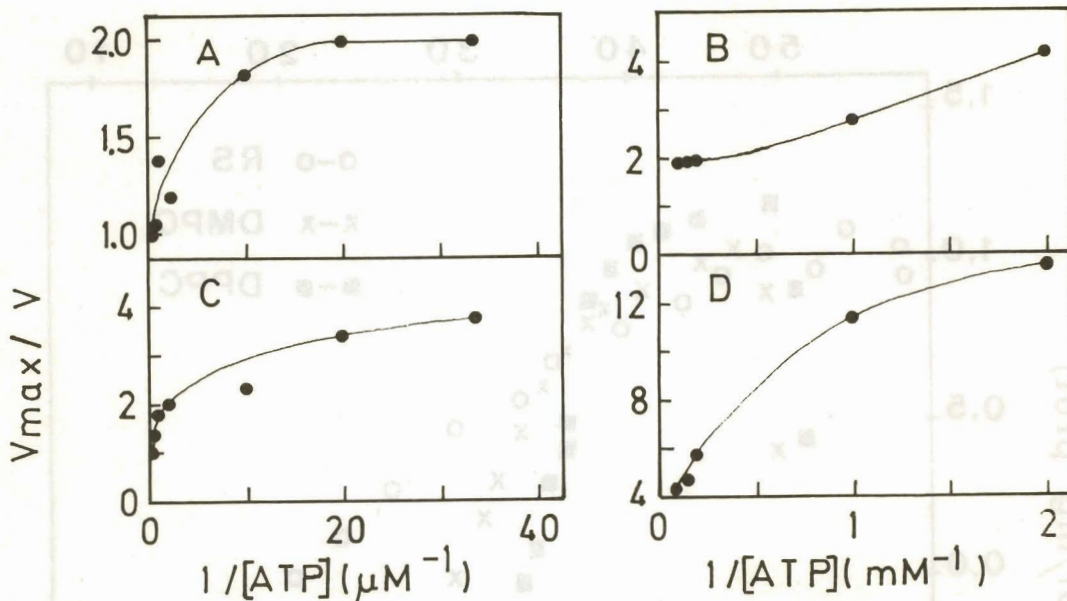


FIGURA 4. Representaciones de Lineweaver-Burk de la ATPasa reconstituida con DPPC a 25° C (A y B) y a 37° C (C y D).

Por otro lado, las proteínas de membrana, tienen una porción hidrofóbica en el interior de la bicapa asociadas con los lípidos anfífilos. Por esto requieren una cierta longitud de los ácidos grasos. La mayor parte de los ácidos grasos de vesículas de retículo sarcoplásmico, tienen una longitud de 18 átomos de carbono (50%) y 16 átomos de carbono (25-30%) (12). De este modo el mirístico es demasiado pequeño para recubrir la porción hidrofóbica de la ATPasa.

#### Modulación de la cinética enzimática por $Mg^{2+}$ -ATP. Cálculo de parámetros cinéticos

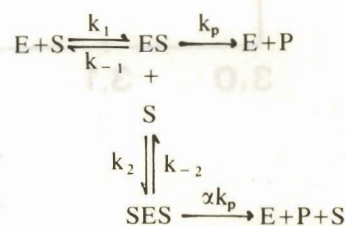
Se midió la actividad enzimática de la  $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPasa reconstituida con DPPC a diferentes temperaturas variándose la concentración de ATP entre 0.5  $\mu$ M y 5 mM a cada temperatura y dejando constante la de calcio libre a 5  $\mu$ M. Como se muestra en la figura 4 este enzima tiene un comportamiento complejo frente a la variación de la concentración de sustrato y desde luego no se ajusta a lo que predice el modelo de Michaelis-Menten, de acuerdo a lo que se ha descrito por numerosos autores (18-25).

Sin embargo, con objeto de poder valorar cuantitativamente los efectos que sobre la cinética puedan tener factores tales como la temperatura, inhibidores, etc., algunos autores han

introducido simplificaciones que permiten valorar ciertos parámetros que se podrían calificar como «aparentes» (22, 24, 25).

Una interpretación muy extendida de los resultados experimentales que se han obtenido respecto a la cinética de este enzima es que existiría un mecanismo de activación por exceso de sustrato, con enlace de ATP a un sitio secundario del enzima. Basándose en esta suposición Dupont (22) introdujo como parámetros cinéticos,  $K_s$  que sería la constante de disociación del sustrato respecto del sitio activo,  $K_r$  que sería la constante de disociación del sustrato respecto al sitio regulador y  $V_{max}$  que sería la relación entre  $V_{max}$ , o actividad máxima en presencia de exceso de sustrato, y  $V_{max}$  o actividad máxima en ausencia de exceso de sustrato.

Siguiendo esta pauta, el esquema que se desarrolla a continuación es:



ESQUEMA 1

La expresión de la velocidad queda definida como:

$$V = k_p[ES] + \alpha k_p[SES] \quad (1)$$

El balance de materia para el enzima es:

$$[E_T] = [E] + [ES] + [SES] \quad (2)$$

dividiendo ecuación (1) entre (2) queda:

$$\frac{V}{[E_T]} = \frac{k_p[ES] + \alpha k_p[SES]}{[E] + [ES] + [SES]} \quad (3)$$

Aceptando el equilibrio en las etapas de unión de sustrato, podemos definir las constantes de disociación  $K_s$  y  $K_r$  como:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (4) \text{ y } K_r = \frac{[ES][S]}{[SES]} \quad (5)$$

Teniendo en cuenta ecuaciones (4) y (5) y sustituyendo en ecuación (3) queda:

$$\frac{V}{[E_T]} = \frac{k_p \cdot \frac{[E][S]}{K_s} + k_p \cdot \frac{[E][S][S]}{K_r \cdot K_s}}{[E] + \frac{[S][E]}{K_s} + \frac{[E][S][S]}{K_r K_s}} \quad (6)$$

esta ecuación equivale a:

$$\frac{V}{k_p[E_T]} = \frac{K_r[S] + \alpha[S]^2}{K_r K_s + K_r[S] + [S]^2} \quad (7)$$

La velocidad máxima de la ecuación estaría definida por:

$$V_{\max} = \alpha k_p[E_T] \quad (8)$$

Sustituyendo ecuación (8) en (7), queda:

Si sustituimos el valor de  $V_{\max}$  en la ecuación anterior, se obtendría la ecuación final:

$$\frac{V}{V_{\max}} = \frac{K_r[S] + \alpha[S]^2}{K_s K_r + K_r[S] + [S]^2} \quad (9)$$

En el esquema anterior,  $\alpha$  sería un factor de activación, que desplazaría el equilibrio hacia la ruta de elevada concentración de sustrato.

Los valores de actividad obtenidos para cada concentración de sustrato, a cada temperatura, se suministraron a un computador que mediante un programa de regresión no lineal de mínimos cuadrados calculó  $K_s$ ,  $K_r$  y  $\alpha$  para cada temperatura, de acuerdo a la ecuación (9).

En la figura 5 se ha realizado una representa-

ción de  $K_s$  frente a la temperatura, observándose que su valor aumenta a aproximadamente 30°C alcanzando un valor de 1.4 μM a 34°C. Posteriormente desciende para volver a incrementarse a partir de 41°C alcanzando un valor de 3 μM a 47°C.  $K_r$  (figura 6) sufre un aumento a una temperatura próxima también a 30°C con un máximo de 1.6 mM a 32°C aproximadamente y un descenso a partir de esta temperatura estabilizándose hacia los 36°C en 0.35 mM. El parámetro de activación  $\alpha$ , por último (figura 7), tiene una brusca transición a 32°C, con un notable incremento en su valor, que le lleva desde aproximadamente 1.9 a bajas temperaturas hasta 5.9 a 47.5°C.

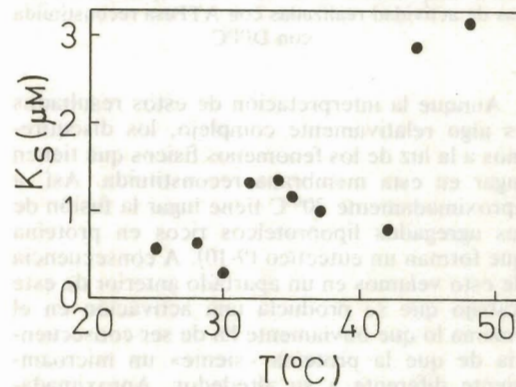


FIGURA 5. Variación del parámetro  $K_s$  (definido en el texto) con la temperatura. Estos datos corresponden a medidas de actividad realizadas con ATPasa reconstituida con DPPC.

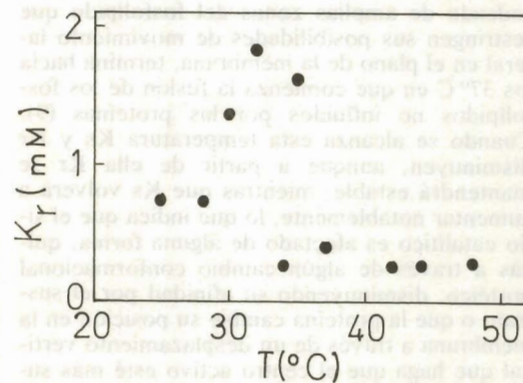


FIGURA 6. Variación del parámetro  $K_r$  (definido en el texto) con la temperatura. Estos datos corresponden a medidas de actividad realizadas con ATPasa reconstituida con DPPC.

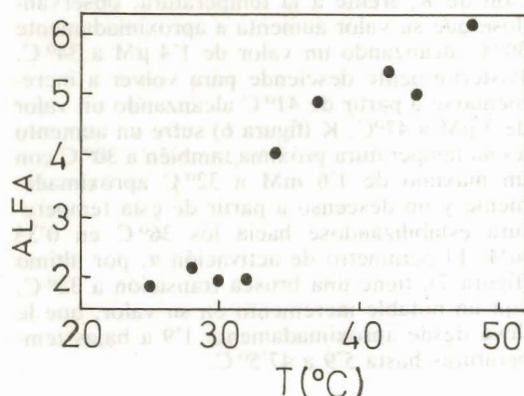


FIGURA 7. Variación del parámetro de activación ( $\alpha$ ) con la temperatura. Estos datos corresponden a medidas de actividad realizadas con ATPasa reconstituida con DPPC.

Aunque la interpretación de estos resultados es algo relativamente complejo, los discutiremos a la luz de los fenómenos físicos que tienen lugar en esta membrana reconstituida. Así, a aproximadamente 30°C tiene lugar la fusión de los agregados lipoproteicos ricos en proteína que forman un eutéctico (9-10). A consecuencia de esto veíamos en un apartado anterior de este trabajo que se producía una activación en el enzima lo que obviamente ha de ser consecuencia de que la proteína «siente» un microambiente diferente a su alrededor. Aproximadamente a esta temperatura se produce el primero de los incrementos en  $K_s$  indicando una menor afinidad del centro regulador por el sustrato: se precisa más sustrato para producir el efecto de activación. Esta fase es la que el enzima se encuentra en focos fluidos de la membrana pero rodeado de amplias zonas del fosfolípido que restringen sus posibilidades de movimiento lateral en el plano de la membrana, termina hacia los 37°C en que comienza la fusión de los fosfolípidos no influidos por las proteínas (9). Cuando se alcanza esta temperatura  $K_s$  y  $K_r$  disminuyen, aunque a partir de ella  $K_r$  se mantendrá estable, mientras que  $K_s$  volverá a aumentar notablemente, lo que indica que el sitio catalítico es afectado de alguna forma, quizás a través de algún cambio conformacional protéico, disminuyendo su afinidad por el sustrato o que la proteína cambie su posición en la membrana a través de un desplazamiento vertical que haga que el centro activo esté más sumergido en la bicapa teniendo el sustrato una menor accesibilidad. Este tipo de desplazamiento se ha sugerido para otras proteínas de membrana anteriormente (26). Es también co-

nocido que al sufrir la fusión la membrana aumenta su grosor (27, 28).

Hemos de comentar por último el brusco aumento en el parámetro de activación. Este se produce a una temperatura próxima a la fusión del agregado lipoprotéico, e indica que la unión de un segundo ATP a la molécula de ATPasa aumenta grandemente la velocidad de hidrólisis del ATP (ver esquema I). De alguna manera la constricción cinética que sufre el enzima a temperaturas inferiores queda pues rota a esta temperatura.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1 DE MEIS, L. (1981): The sarcoplasmic reticulum transport and energy translocation. Wiley Interscience.
- 2 INESI, G. (1981): En Cell and muscle mobility, vol. 1 (dirigido por Robert M. Dowbenad Jerry W. Shay), pp. 63-67. Plenum Pu. Co.
- 3 MOLLER, J. V.; ANDERSEN, J. P. y LE MAIRE, M. (1982): Mol. Cell. Biochem. 42, 83-107.
- 4 HESKETH, T. R.; SMITH, G. A.; HOUSLAY, M. D.; MCGILL, K. A.; BIRDSALL, N. J. M.; METCALFE, J. C. y WARREN, G. B. (1976): Biochemistry 15, 4.145-4.151.
- 5 MOORE, B. M.; LENTZ, B. R. y MEISSNER, G. (1978): Biochemistry 17, 5.248-5.255.
- 6 JOHANNSSON, A.; KIGHTLAY, C. A.; SMITH, G. A.; RICHARDS, C.; HESKETH, T. R. y METCALFE, J. C. (1981): J. Biol. Chem. 256, 1.647-1.650.
- 7 ALMEIDA, L. M.; VAZ, W. L. C.; ZACHARIASSE, K. A. y MADEIRA, V. M. C. (1984): Biochemistry 23, 4.714-4.720.
- 8 RICE, C. M.; MEADOWS, M. D.; SCHEINMAN, A. O.; GOÑI, F. M.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; MOSCARIELLO, M. A.; CHAPMAN, D. y OLDFIELD, E. (1979): Biochemistry 18, 5.893-5.903.
- 9 GÓMEZ FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; BACH, D.; RESTALL, C. J. y CHAPMAN, D. (1980): Biochim. Biophys. Acta 598, 502-516.
- 10 HOFFMANN, W.; SARZALA, M. G.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; GOÑI, F. M.; RESTALL, C. J.; CHAMPAN, D.; HEPPELEER, G. y KRENTZ, W. (1980): J. Mol. Biol. 141, 119-132.
- 11 CORTIJO, M.; ALONSO, A.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. y CHAPMAN, D. (1982): J. Mol. Biol. 157, 597-618.
- 12 NAKAMURA, H.; JILKA, R. L.; BOLAND, R., y MARTONOSI, A. N. (1976): J. Biol. Chem. 251, 5.414-5.423.
- 13 WARREN, G. B.; TOON, P. A.; BIRDSALL, N. J. M.; LEE, A. G. y METCALFE, J. C. (1974): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 622-626.
- 14 BARTLETT, G. R. (1959): J. Biol. Chem. 234, 466-471.
- 15 LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. C. y RANDALL, R. J. (1951): J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 16 HARDWICKE, P. M. D. y GREEN, N. W. (1974): Eur. J. Biochem. 42, 183-193.



- 17 FABIATO, A. y FABIATO, F. J. (1979): *J. PHYSIOL.* Paris. 75, 463-505.
- 18 YAMAMOTO, T. y TONOMURA, Y. (1967): *J. Biochem. Tokyo.* 62, 558-575.
- 19 INESI, G.; GOODMAN, J. J. y WATANABE, S. (1967): *J. Biol. Chem.* 242, 4.637-4.643.
- 20 DE MEIS, L. y FABIALHO DE MELLO, M. C. (1973): *J. Biol. Chem.* 248, 3.691-3.701.
- 21 VIANNA, A. L. (1975): *Biochim. Biophys. Acta* 410, 389-406.
- 22 DUPONT, Y. (1977): *Eur. J. Biochem.* 72, 357-363.
- 23 NEET, K. E. y GREEN, N. M. (1977): *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 588-597.
- 24 TAYLOR, J. S. y HATTAN, D. (1979): *J. Biol. Chem.* 254, 4.402-4.407.
- 25 MOLLER, J. V.; LIND, K. E. y ANDERSEN, J. P. (1980): *J. Biol. Chem.* 255, 1.912-1.920.
- 26 BOROCHOV, H.; ABBOTT, R. E.; SCHACHTER, D. y SHINITZKY, M. (1979): *Biochemistry* 18, 251-258.
- 27 JANIAC, M. J.; SMALL, D. M. y SHIPLEY, G. G. (1982): *Biochemistry* 15, 4.575-4.580.
- 28 RUOCCO, M. J. y SHIPLEY, G. G. (1982): *Biochim. Biophys. Acta* 691, 309-320.