

ACTIVATION DES ACIDES AMINÉS PAR LES MICROSOMES ET L'ENZYME pH 5 DE RÉTICULOCELLULES DE LAPIN

JACQUES KRUH ET JEAN-CLAUDE DREYFUS

Laboratoire de Recherches de Biochimie médicale,

Hôpital des Enfants Malades, Paris (France)

(Reçu le 26 Février, 1960)

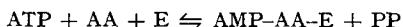
SUMMARY

Activation of amino acids by the microsomes and the pH-5-enzyme of rabbit reticulocytes

Microsomes from reticulocytes are able to activate aminoacids, as it is established by the measurement of the increase of the amino acid dependent ATP-³²PP exchanges. The activating properties of the microsomes are compared to those of the pH-5-enzyme from rabbit reticulocytes. They are similar, but not identical, and not additive.

INTRODUCTION

L'incorporation des acides aminés dans les protéines est précédée par l'activation de leur groupement carboxyl. Cette activation met en jeu l'ATP, l'ion Mg⁺⁺, et des enzymes spécifiques; ceux-ci se trouvent dans le surnageant de l'ultracentrifugation après séparation de toutes les particules. On peut les précipiter en amenant le milieu au pH 5.2, comme l'ont mis en évidence ZAMECNIK, HOAGLAND et leurs collaborateurs^{1,2} qui ont appelé cette préparation "enzyme pH 5". La mise en évidence de l'activation des acides aminés se fait en particulier grâce à la réaction réversible suivante^{3,4}, E étant l'enzyme activateur:



L'activation se mesure en incubant la préparation enzymatique avec l'acide aminé, ³²PP, ATP et Mg⁺⁺ puis en isolant l'ATP sur charbon et en mesurant son activité spécifique.

Cependant, récemment des enzymes activateurs ont été mis en évidence dans les mitochondries de cellules hépatiques. REIS *et al.*⁵ d'une part, CRADDOCK ET SIMPSON⁶ d'autre part ont extrait de ces particules une fraction se comportant comme l'enzyme pH 5, mais les mitochondries entières ne possèdent pas cette propriété activatrice. Par ailleurs, COHN⁷ a isolé des microsomes de cellules de foie de rat une fraction qui incorpore les acides aminés en absence d'enzyme pH 5; cependant les enzymes activateurs n'ont pu être mis en évidence dans cette fraction. Dans les cellules végétales

Abbréviations: AA, acide aminé; ATP, adénosine triphosphate; AMP, adénosine monophosphate; PP, pyrophosphate; Tris, tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

tales, WEBSTER⁸ a pu isoler à partir de particules ribonucléoprotéiques une fraction jouant le rôle d'enzyme pH 5. Par ailleurs, SCHWEET *et al.*⁹ ont observé une incorporation d'acides aminés dans les microsomes et l'hémoglobine de système acellaire provenant de réticulocytes de lapin. Cette incorporation se fait en présence d'enzyme pH 5, il est cependant remarquable qu'en absence de cet enzyme, l'incorporation, quoique fortement abaissée, soit loin d'être négligeable. Ceci nous a amené à chercher un rôle activateur possible des microsomes de réticulocytes.

MÉTHODES

Obtention des réticulocytes

Les lapins reçoivent 5 injections sous-cutanées, à raison d'une par jour, de solution neutralisée de chlorhydrate de phénylhydrazine à 2,5 %, à la dose de 0,4 ml/kg de poids et par injection. Le sang est prélevé par ponction cardiaque, les globules rouges sont centrifugés et lavés deux fois avec du sérum physiologique.

Préparation des fractions réticulocytaires

On opère selon la technique de SCHWEET *et al.*⁹. Les globules rouges lavés sont hémolysés à froid par addition de 4 volumes d'une solution de chlorure de magnésium 0,005 M et agitation magnétique pendant 10 min. On ajoute ensuite lentement 1 volume d'une solution formée de saccharose 1,5 M et de chlorure de potassium 0,15 M et on centrifuge 10 min à 10,000 \times g, le surnageant est centrifugé ensuite 60 min à 105,000 \times g dans une centrifugeuse Spinco préparative.

Le précipité est lavé par la solution de chlorure de magnésium pour éliminer toute trace de surnageant. Dans quelques expériences les microsomes sont remis en suspension dans un mélange formé de 4 volumes de la solution de chlorure de magnésium et 1 volume de la solution de saccharose-KCl, puis centrifugés de nouveau 60 min à 105,000 \times g. Certaines expériences ont été réalisées, non avec des microsomes entiers, mais avec la fraction insoluble dans le désoxycholate de sodium, selon LITTLEFIELD *et al.*¹⁰. Pour cela les microsomes sont mis en suspension dans une solution froide préparée extemporanément de désoxycholate de sodium à 5 % dans un tampon Tris à pH 8,0, le poids de désoxycholate représentant les trois quarts de celui des microsomes. Après addition du mélange formé de 4 volumes de la solution de chlorure de magnésium et de 1 volume de la solution de saccharose-KCl, la préparation est centrifugée de nouveau 60 min à 105,000 \times g. Dans tous les cas les microsomes sont mis en suspension dans 2 ml de tampon Tris à pH 7,8 et dialysés 16 heures contre le même tampon. Le surnageant de la première centrifugation rapide est amené à pH 5,15 avec de l'acide acétique 1,0 N; le précipité est centrifugé, lavé pour éliminer l'hémoglobine, puis dissous dans 2 ml de tampon Tris pH 7,8 et dialysé 16 h contre le même tampon. La concentration en protéine est déterminée par le réactif du biuret.

Incubation

Le milieu d'incubation est voisin de celui décrit par DEMOSS ET NOVELLI⁴. Sauf indication contraire dans certaines expériences, on mélange dans un petit tube à centrifuger: 10 μ moles KF, 10 μ moles ATP neutralisé, 10 μ moles 32 PP contenant entre 60 et 150,000 coups/min, la préparation enzymatique, 2 μ moles d'acide aminé,

10 μ moles $MgCl_2$, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Le volume total est de 1 ml, on incube en général 30 min dans un incubateur de Dubnoff avec agitation à 37°. La réaction est arrêtée par addition de 1 ml d'acide trichloroacétique à 5 %.

Préparation de l'ATP. Mesure de la radioactivité

Après centrifugation, le surnageant de la précipitation trichloroacétique est décanté dans un tube à centrifuger contenant 100 mg de charbon Norit A, selon la technique de CRANE ET LIPMANN¹¹, on agite et on centrifuge, le charbon est lavé 4 fois par mise en suspension dans 10 ml d'eau et centrifugation pour éliminer les dérivés phosphorés minéraux. Le charbon est ensuite mis en suspension homogène dans 2 ml d'une solution d'ammoniaque 0.3 M dans de l'alcool à 50 %. Une partie aliquote est transférée dans une cuve de cuivre de 2.85 cm² dans laquelle on a fixé une rondelle de papier mince; elle est desséchée sous infra-rouge et pesée, la radioactivité est mesurée au compteur de Geiger-Müller à fenêtre mince. Après correction d'épaisseur, on calcule la radioactivité correspondant à 100 mg de charbon.

Le nombre de μ moles de ^{32}PP incorporé dans l'ATP est donné par la formule suivante, sachant que l'incubation a été faite en présence de 10 μ moles de PP et 10 μ moles d'ATP:

$$\frac{\text{Activité spécifique ATP}}{\text{Activité spécifique PP}} \times 10.$$

On détermine également le pourcentage d'échange selon DEMOSS ET NOVELLI⁴:

$$\frac{\text{Activité spécifique ATP}}{0.5 \times \text{Activité spécifique PP}} \times 100.$$

RÉSULTATS

Activation des différents acides aminés (Tableau I)

L'incubation se fait en présence soit de microsomes soit d'enzyme pH 5 en quantité correspondant à 2 mg de protéine, de 5 μ moles de chacun des acides aminés, de forme L. Elle dure 30 min. On voit que les acides aminés suivants augmentent au moins 2 fois les échanges ATP-PP, par ordre d'activation décroissante:

Microsomes: méthionine, valine, phénylalanine, tyrosine, leucine, glutamine, lysine, acide aspartique, asparagine, isoleucine, arginine et acide glutamique.

Enzyme pH 5: méthionine, lysine, isoleucine, leucine, valine, tyrosine, glutamine, alanine, cystéine, asparagine, arginine, acide glutamique et histidine.

Dans l'ensemble, ce sont les mêmes acides aminés qui augmentent les échanges ATP-PP avec les deux systèmes, à l'exception toutefois de la phénylalanine qui n'est pas activée par l'enzyme pH 5, et l'est par les microsomes ainsi que l'analogue de cet acide aminé, la fluorophénylalanine. Il a été montré précédemment que cet analogue peut être incorporé dans l'hémoglobine des réticulocytes¹². Par contre la norleucine n'est pas activée.

Additivité des activations de différents acides aminés (Tableau II)

L'incubation se fait en présence soit de microsomes, soit d'enzyme pH 5 en

TABLEAU I

ACTIVATION DES DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS PAR LES MICROSOMES ET L'ENZYME pH 5

Le milieu contenait: 10 μ moles ATP, 10 μ moles ^{32}PP (15,000 coups/min/ μ mole), 5 μ moles AA, 10 μ moles MgCl_2 , 10 μ moles KF, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Enzyme pH 5 et microsomes correspondant à 2 mg protéine, 30 min incubation à 37°.

Acides aminés ajoutés au milieu	Microsomes			Enzyme pH 5		
	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	Augmentation des échanges	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	Augmentation des échanges
Sans acide aminé	0.57	11.4		0.62	12.4	
L-méthionine	3.62	72.4	6.35	2.96	59.8	4.82
L-valine	2.80	56.0	4.90	2.12	42.4	3.42
L-phenylalanine	2.67	53.4	4.70	1.05	21.0	1.80
L-tyrosine	1.92	38.4	3.36	2.70	41.0	3.30
L-leucine	1.74	34.8	3.06	2.20	44.0	3.55
Glutamine	1.73	34.6	3.03	1.92	38.4	3.10
L-lysine	1.72	34.4	3.02	2.36	47.2	3.80
Acide L-aspartique	1.40	28.0	3.26	1.89	37.8	3.04
Asparagine	1.27	25.4	2.23	1.78	35.6	2.87
L-cystéine	1.17	23.4	2.05	1.86	37.2	3.00
L-isoleucine	1.16	23.2	2.04	2.18	43.6	3.62
L-arginine	1.14	22.8	2.00	1.68	33.6	2.70
Acide L-glutamique	1.14	22.4	2.00	1.40	28.0	2.26
L-histidine	0.93	18.6	1.63	1.28	25.6	2.06
L-thréonine	0.90	18.0	1.58	1.20	24.0	1.93
L-tryptophane	0.75	15.0	1.31	0.74	14.8	1.19
L-alanine	0.66	13.2	1.16	1.90	38.0	3.06
L-proline	0.58	11.6	1.02	0.85	17.0	1.37
L-sérine	0.57	11.4	1.00	1.02	20.4	1.65
Glycocolle	0.57	11.4	1.00	0.75	15.0	1.21
Fluorophénylalanine	2.13	42.6	3.74	0.70	12.4	1.13
Norleucine	0.59	11.8	1.04	0.70	12.4	1.13

TABLEAU II

ADDITIVITÉ DES ACTIVATIONS DE DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS

Le milieu contenait: 10 μ moles ATP, 10 μ moles ^{32}PP (11,500 coups/min/ μ mole), 2 μ moles AA, 10 μ moles MgCl_2 , 10 μ moles KF, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Enzyme pH 5 et microsomes correspondant à 1 mg protéine, 30 min incubation à 37°.

Acides aminés ajoutés au milieu	Microsomes			Enzyme pH 5		
	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	Augmentation des échanges	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	Augmentation des échanges
Sans acide aminé	0.30	6.0		0.20	4.0	
+ L-valine	1.47	29.4	4.9	0.70	14.0	3.5
+ L-lysine	0.92	18.4	3.1	0.89	17.8	4.35
+ L-leucine	1.00	20.0	3.34	0.65	13.0	3.25
+ L-valine + L-lysine	2.30	46	7.60	1.52	30.4	7.65
+ L-valine + L-lysine + L-leucine	3.30	66.0	11	2.15	43	10.7

quantité correspondant à 1.0 mg de protéine et de 2 μ moles d'acide aminé. On constate avec les trois acides aminés étudiés qu'il y a additivité des échanges ATP-PP provoqués par chacun des acides aminés.

TABLEAU III
NON ADDITIVITÉ DES ACTIVATIONS PAR L'ENZYME pH 5 ET LES MICROSMES
Le milieu contenait: 10 μ moles ATP, 10 μ moles 32 PP (9,000 coups/min/ μ moles), 2 μ moles AA, 10 μ moles $MgCl_2$, 100 μ moles KF, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8, 30 min incubation à 37°.

	Sans acide aminé		2 μ moles L-valine		2 μ moles L-tyrosine	
	mmoles PP incorporé	Pour cent échanges ATP-PP	mmoles PP incorporé	Pour cent échanges ATP-PP	mmoles PP incorporé	Pour cent échanges ATP-PP
Microsomes: 2 mg protéines	0.50	10.0	1.96	39.2	3.92	1.76
Microsomes: 4 mg protéines	0.66	13.2	2.58	51.6	3.90	2.07
Enzyme pH 5: 2 mg protéines	0.63	12.7	2.54	50.8	4.0	2.44
Enzyme pH 5: 4 mg protéines	0.89	17.8	2.95	59.0	3.32	2.77
Microsomes: 2 mg protéines + Enzyme pH 5: 2 mg protéines	0.80	16.0	2.90	58.0	3.63	2.53

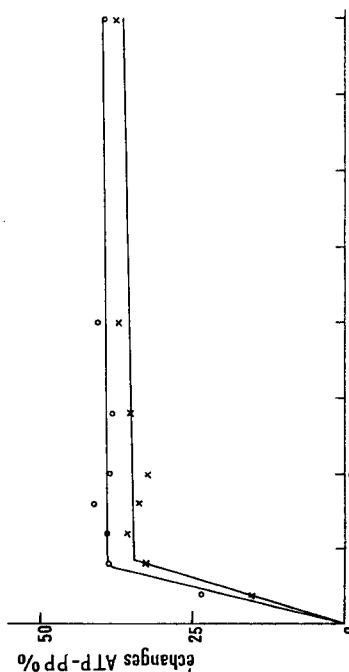


Fig. 1. Activation de la L-valine en fonction de sa concentration: O—O, en présence de microsomes; X—X, en présence d'enzyme pH 5, 100 μ moles ATP, 10 μ moles PP (7,550 coups/min/ μ moles), 10 μ moles KF, 10 μ moles valine, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Microsomes et enzyme pH 5, correspondant à 1 mg protéine. Incubation 30 min à 37°.

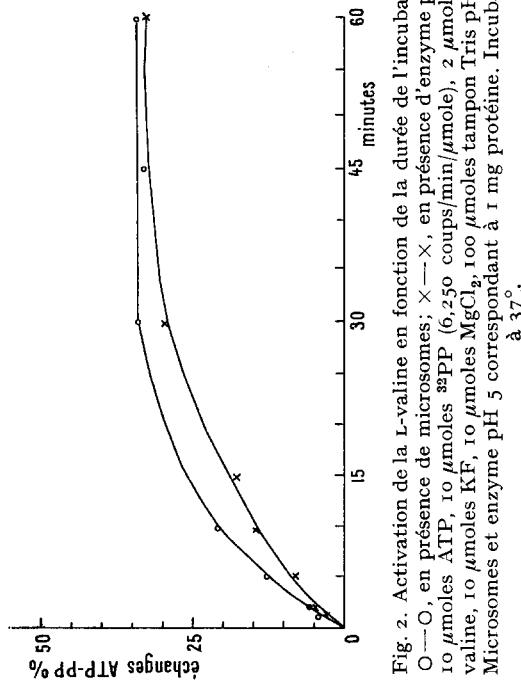


Fig. 2. Activation de la L-valine en fonction de la durée de l'incubation: O—O, en présence de microsomes; X—X, en présence d'enzyme pH 5, 10 μ moles ATP, 10 μ moles 32 PP (6,250 coups/min/ μ moles), 2 μ moles L-valine, 100 μ moles KF, 100 μ moles $MgCl_2$, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Microsomes et enzyme pH 5 correspondant à 1 mg protéine. Incubation à 37°.

Non additivité des activations par les microsomes et l'enzyme pH 5 (Tableau III)

Les incubations se font en absence d'acide aminé et en présence de 2 μ moles de L-valine et de 2 μ moles de L-tyrosine avec les deux préparations enzymatiques séparément. On constate que dans les deux cas l'augmentation des échanges est maximale avec les préparations contenant 2 mg de protéine, puisqu'elle n'est pas plus élevée avec 4 mg de protéine. Lorsque l'on incube ces acides aminés avec à la fois les microsomes et l'enzyme pH 5 correspondant chacun à 2 mg de protéine, les échanges ne sont pas plus élevés qu'avec l'une des deux préparations seulement. Il n'y a donc pas additivité des activations par les microsomes et l'enzyme pH 5.

Activation en fonction de la concentration de valine (Fig. 1)

On incube 30 min à 37° en présence soit de microsomes soit d'enzyme pH 5 en quantité correspondant à 1 mg de protéine, et de quantités croissantes de L-valine. On constate que dans les deux cas il y a augmentation linéaire des échanges jusqu'à 2 μ moles de valine, puis les échanges n'augmentent plus jusqu'à 20 μ moles de l'acide aminé.

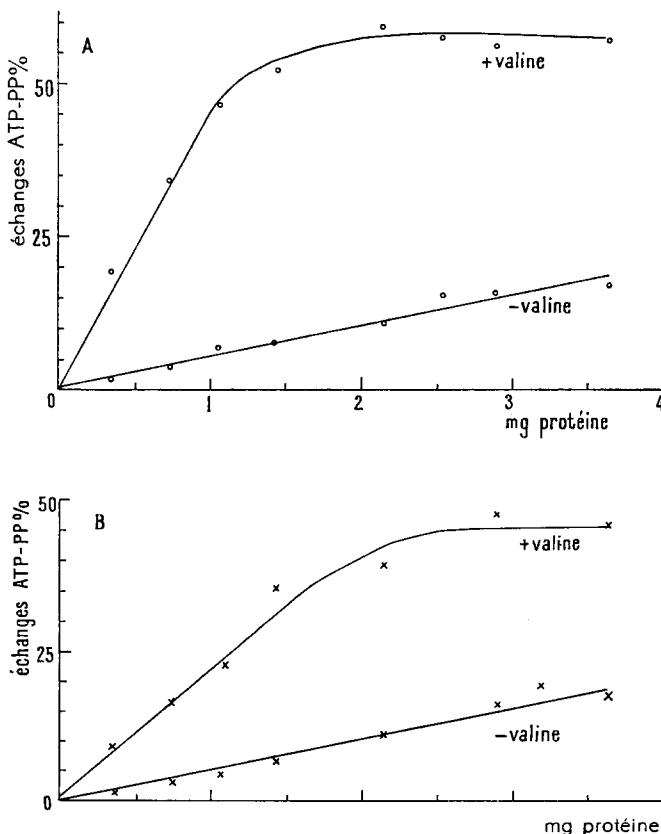


Fig. 3. Activation de la L-valine en fonction de la concentration en microsomes et en enzyme pH 5: A, en présence de microsomes; B, en présence d'enzyme pH 5. 10 μ moles ATP, 10 μ moles ^{32}PP (8,550 coups/min/ μ mole), 2 μ moles L-valine, 10 μ moles KF, 10 μ moles MgCl_2 , 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Incubation 30 min à 37°.

Activation en fonction de la durée de l'incubation (Fig. 2)

On incube 2 μ moles de L-valine en présence soit de microsomes soit d'enzyme pH 5 correspondant à 1 mg de protéine à 37°. Les échanges augmentent jusqu'à la 30ème minute, puis restent constants jusqu'à la 60ème minute. Entre la 115ème et la 130ème minutes les échanges augmentent de 60 % en présence de l'enzyme pH 5 et de 30 % en présence de microsomes.

Activation en fonction de la concentration en protéines (Fig. 3)

On incube 2 μ moles de L-valine en présence de quantités croissantes de microsomes et d'enzyme pH 5. On constate qu'il y a augmentation linéaire des échanges jusqu'à une concentration d'enzyme pH 5 correspondant à 1.6 mg de protéine et une concentration de microsomes correspondant à environ 1.1 mg de protéine. Les échanges restent constants entre 2 et 3.5 mg de protéine avec les deux systèmes. En absence de valine les échanges augmentent linéairement avec la concentration en protéine.

Action de quelques facteurs sur les échanges ATP-PP (Tableau IV)

On incube soit les microsomes soit l'enzyme pH 5 à une concentration correspondant à 1 mg de protéine en présence et en absence de 2 μ moles de L-valine. La valine augmente les échanges de 3.6 fois. Si on ne met pas de chlorure de magnésium, les échanges ne sont pas augmentés par la valine. En absence d'ATP il n'y a que très peu de radioactivité. Si on chauffe préalablement les microsomes et l'enzyme pH 5 au bain-marie à 100° pendant 10 min les échanges deviennent négligeables.

TABLEAU IV

ACTION DE DIFFÉRENTS FACTEURS SUR L'ACTIVATION DE LA L-VALINE

Le milieu contenait: 10 μ moles ATP, 10 μ moles ^{32}PP (7,500 coups/min/ μ moles), 2 μ moles L-valine, 10 μ moles MgCl_2 , 10 μ moles KF, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Microsomes et enzyme pH 5 correspondant chacun à 1 mg de protéine, 30 min incubation à 37°.

	Microsomes		Enzyme pH 5	
	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP
Complet — acide aminé	0.58	11.6	0.52	10.3
Complet + L-valine	2.12	42.4	1.80	36.0
Complet + L-valine — ATP	0.14	2.9	0.13	2.60
Complet + L-valine — Mg^{++}	0.62	12.4	0.60	12.0
Complet + L-valine protéines chauffées*	0.06	1.2	0.03	0.6

* Avant l'addition des autres composés les microsomes et l'enzyme pH 5 sont placés 10 min dans un bain-marie à 100°.

Purification et fractionnement des microsomes (Tableau V)

Pour s'assurer qu'il n'y a aucune contamination des microsomes par des enzymes du surnageant, on lave les microsomes (voir MÉTHODES) et on incube une quantité correspondant à 1 mg de protéine avec 2 μ moles de L-valine. On constate que les

échanges sont sensiblement les mêmes que l'on incube avec les microsomes préparés selon la méthode habituelle ou avec les microsomes purifiés, mais dans ce dernier cas les échanges sont fortement abaissés en absence de valine, si bien que l'augmentation des échanges due à la valine est de 11.0 fois avec les microsomes purifiés au lieu de 2.8 fois avec les microsomes préparés par la méthode habituelle. Avec la fraction de microsome insoluble dans le désoxycholate il y a à la fois abaissement des échanges en présence et en absence de valine. L'augmentation des échanges due à la valine est dans ce cas de 10.5 fois.

TABLEAU V

ACTIVATION DE LA L-VALINE PAR DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS DE MICROSMES

Le milieu contenait: 10 μ moles ATP, 10 μ moles ^{32}PP (6,000 coups/min/ μ mole), 2 μ moles L-valine, 10 μ moles MgCl_2 , 10 μ moles KF, 100 μ moles tampon Tris pH 7.8. Microsomes correspondant à 1 mg de protéine.

	Sans valine		Avec valine		
	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	μ moles PP incorporé	Pour cent échanges PP-ATP	Augmentation des échanges
Microsomes	0.70	14	1.97	39.4	2.80
Microsomes lavés*	0.16	3.2	1.77	35.4	11.0
Fraction microsomique insoluble dans desoxycholate**	0.10	2.0	1.05	21.0	10.5

* Les microsomes sont remis en suspension dans 10 ml de solution MgCl_2 -saccharose-KCl et centrifugés une 2ème fois 60 min à 105,000 \times g.

** Les microsomes sont traités par le désoxycholate de sodium selon la technique de LITTLEFIELD et al.¹⁰ et centrifugés une 2ème fois 60 min à 105,000 \times g.

DISCUSSION

Le schéma classique de HOAGLAND de l'activation des acides aminés et de leur incorporation dans les protéines peut s'appliquer aux réticulocytes comme l'ont montré SCHWEET et al.⁹. Cependant les résultats décrits ici montrent que l'enzyme pH 5 n'est pas la seule fraction cellulaire capable d'activer les acides aminés, cette activation pouvant être réalisée par les microsomes. La première question qui se pose est de savoir si cette activation par les microsomes n'est pas en réalité due à une contamination par le surnageant. La purification des microsomes qui ne diminue pas le pouvoir activateur permet d'éliminer formellement cette possibilité. La deuxième question est de savoir si les deux systèmes sont identiques. Il est plus difficile d'y répondre. Les facteurs cinétiques sont très voisins. Les différences peuvent être dues aux différences d'environnement. Dans les deux cas l'ion Mg^{++} est indispensable, le chauffage abolit toute activité. Il n'y a pas identité de l'activation des acides aminés individuels par les deux systèmes, en particulier la phénylalanine et la fluorophénylalanine ne sont activées que par les microsomes. L'alanine n'est activée que par l'enzyme pH 5; il n'est cependant pas exclu que l'enzyme pH 5 ne contient pas la totalité des enzymes activateurs du surnageant. Le mécanisme de l'activation par l'enzyme pH 5 et les microsomes semble identique, puisque leur action n'est pas additive. Le fait qu'en absence d'enzyme pH 5 l'incorporation des acides aminés dans les microsomes de systèmes acellulaires de microsomes soit faible, peut s'expliquer

par la seule absence dans le milieu d'acide ribonucléique soluble. Des expériences sont entreprises pour tester cette hypothèse. Le rôle physiologique des propriétés activatrices des microsomes est difficile à comprendre actuellement. Les microsomes complètent-ils simplement l'action de la fraction non particulière ou bien possèdent-ils un rôle particulier dans la synthèse protéique en plus de ceux qui leur sont actuellement attribués?

RÉSUMÉ

Les microsomes de réticulocytes sont capables d'activer les acides aminés comme on peut l'établir par l'augmentation des échanges ATP-³²PP.

Les propriétés activatrices des microsomes et de l'enzyme pH 5 ont été comparées: elles sont voisines quoique non identiques et elles ne sont pas additives.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. G. SCHAPIRA ainsi que les Drs. R. S. SCHWEET et B. NISMAN pour les discussions au cours de ce travail. Les travaux ont été réalisés avec la collaboration technique de L. TIKHONITZKY.

Nous remercions l'Institut National d'Hygiène, le Commissariat à l'Energie Atomique, la Caisse Nationale de Sécurité Sociale et "The National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases", Public Health Service (Subvention de Recherches No. A 2773) de l'aide apportée à ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. C. ZAMECNIK ET E. B. KELLER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 337.
- ² M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER ET P. C. ZAMECNIK, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 345.
- ³ M. B. HOAGLAND, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 288.
- ⁴ J. A. DEMOSS ET G. D. NOVELLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 49.
- ⁵ P. R. REISS, J. L. COOTE ET T.-S. WORK, *Biochem. J.*, 72 (1959) 24.
- ⁶ V. M. CRADDOCK ET M. V. SIMPSON, *Biochem. J.*, 74 (1960) 10 P.
- ⁷ P. COHN, *Biochem. J.*, 73 (1959) 25 P.
- ⁸ G. C. WEBSTER, *J. Biol. Chem.*, 229 (1957) 535.
- ⁹ R. S. SCHWEET, H. LAMFROM ET E. ALLEN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 1029.
- ¹⁰ J. W. LITTLEFIELD, E. B. KELLER, J. GROSS ET P. C. ZAMECNIK, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 111.
- ¹¹ R. K. CRANE ET F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 235.
- ¹² J. KRUH ET J. ROSA, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 561.

Biochim. Biophys. Acta, 44 (1960) 55-63