

BBA 65791

SITE ACTIF DES ATP:GUANIDINE PHOSPHOTRANSFÉRASES

II. MISE EN ÉVIDENCE DE RÉSIDUS HISTIDINE ESSENTIELS AU MOYEN DU PYROCARBONATE D'ÉTHYLE

LOUISE-ANNE PRADEL ET RIDHA KASSAB

Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris (France)

(Reçu le 9 avril, 1968)

SUMMARY

The active site of ATP:guanidine phosphotransferases. II. Evidence for a critical histidine residue through use of a specific reagent, diethylpyrocarbonate

1. ATP-creatine phosphotransferase (EC 2.7.3.2) and ATP:L-arginine phosphotransferase (EC 2.7.3.3) are inhibited at pH 6.1 by diethylpyrocarbonate, their reactive sulphhydryl groups being reversibly masked or not. The extent of inactivation is first-order with respect to time and inhibitor concentration. The ability of the substrates, used separately or mixed, to protect arginine kinase against inhibition, suggests the involvement of the modified group in the enzymic reaction. Nevertheless, in the case of creatine kinase no protection has been observed.

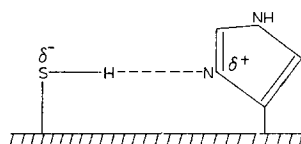
2. The carbethoxylated enzymes develop a difference ultraviolet spectrum with a maximum peak at 240 m μ , a specific feature of *N*-carbethoxyimidazole formation. From the kinetic data of spectrophotometric titrations and loss of activity, it is concluded that one histidine residue and two histidine residues are modified per mole of arginine kinase and creatine kinase respectively, causing total inactivation.

3. Advantages of diethylpyrocarbonate as a protein-histidyl reagent are demonstrated by the specific titration of the histidine content in both denaturated enzymes. Furthermore it is shown that the number and reactivity of -SH groups are not modified in the carbethoxylated inhibited phosphokinases.

INTRODUCTION

Au cours de nos recherches sur les résidus d'acides aminés essentiels à la catalyse enzymatique dans les ATP:guanidine phosphotransférases (EC 2.7.3), nous sommes particulièrement intéressés aux résidus histidine. En effet, les études de cinétique faites sur la créatine kinase (EC 2.7.3.2) ainsi que celles ayant trait à la réactivité particulière des fonctions -SH essentielles dans cet enzyme et dans l'arginine kinase (EC 2.7.3.3) ont suggéré la participation d'un groupement imidazole. Ainsi NODA, NIHEI ET MORALES¹ ont mis en évidence la relation existant entre la vitesse maxima de la réaction de transphosphorylation et l'ionisation d'un résidu de pK 6.5.

D'autre part, la réactivité des groupes -SH essentiels dans les phosphagène kinases étudiées s'étant révélée indépendante du pH, RABIN ET WATTS^{2,3}, VIRDEN ET WATTS⁴ ont émis l'hypothèse que ces groupements existeraient dans la molécule enzymatique native dans un état intermédiaire entre la forme mercaptan et l'ion mercaptide; cette structure serait rendue possible par l'existence d'une liaison hydrogène liant le groupement sulfhydryle à un résidu, tel que le noyau imidazole, selon le schéma suivant



Ce couple thiol-imidazole serait apte à promouvoir une catalyse du type acide-base au niveau du site actif de l'enzyme⁵.

Nous décrivons dans ce mémoire les résultats que nous avons obtenus concernant la modification de l'activité de deux phosphagène kinases, la créatine et l'arginine kinases, au moyen d'un nouveau réactif du résidu histidine, le pyrocarbonate d'éthyle. La réaction spécifique de ce dernier vis-à-vis du noyau imidazole à pH 6 a été démontrée par MÜHLRAD, HEGYI ET TOT⁶ et bien illustrée par les recherches d'ELÖDI⁷ sur la réactivité des résidus histidine dans les glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénases et les lacticodeshydrogénases.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel

L'ATP, sel de sodium, l'ADP, sel de lithium, produits Calbiochem, l'arginine, la créatine, d'origine commerciale, sont employés en solution aqueuse neutralisée.

Le pyrocarbonate d'éthyle (Carlo Erba) est utilisé en solution dans l'alcool absolu à la concentration désirée.

L'acide 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (Aldrich Chemicals) est dissous dans le tampon phosphate 10^{-2} M (pH 7.3) à la concentration de 10^{-3} M. Le dithiothreitol (Nutritional Biochemicals Corp.) est employé en solution 0.1 M dans l'eau distillée. Le tétrathionate de potassium est préparé selon le procédé de TRUDINGER⁸ et utilisé en solution aqueuse à pH 7.

L'urée cristallisée R.P. ainsi que le dodécyl sulfate recristallisé sont dissous avant usage dans le tampon choisi.

Le Séphadex G-25 coarse (Pharmacia, Uppsala) est équilibré à 4° soit avec de l'acétate de sodium 0.03 M (pH 6.25), soit avec le tampon phosphate 0.05 M (pH 8.1).

La créatine kinase de muscle de lapin, préparée à l'état cristallisé selon la méthode de MAHOWALD, NOLTMANN ET KUBY⁹, présente une activité spécifique de 70.

L'arginine kinase de muscle de homard est obtenue selon DER TERROSSIAN *et al.*¹⁰; son activité spécifique est de 230. Avant usage, les solutions enzymatiques sont dialysées à froid pendant 48 h contre le tampon phosphate 0.02 M (pH 7).

Méthodes

La concentration protéique est déterminée d'après les coefficients d'extinction

des enzymes à 280 $\mu\mu$ dans le tampon phosphate 0.01 M (pH 7) (créatine kinase $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 8.8$ (bibl. 11); arginine kinase $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 8.1$).

L'activité enzymatique est mesurée dans le sens direct de la réaction de transphosphorylation dans les conditions déjà indiquées^{12,13}.

Carbéthoxylation des phosphagène kinases. La réaction du pyrocarbonate d'éthyle est effectuée sur les enzymes natifs ou sur les enzymes dont les groupes -SH ont été préalablement protégés par le tétrathionate de potassium, comme il a été déjà décrit¹⁴. A 10 $\mu\mu$ moles d'arginine kinase (430 μg de protéine) et à 5.4 $\mu\mu$ moles de créatine kinase (430 μg de protéine) dans un volume final de 1 ml de tampon phosphate 0.05 M (pH 6.1), on ajoute, à la température ordinaire, 1 à 10 μl d'une solution alcoolique de pyrocarbonate d'éthyle dont la concentration est égale au moins à 0.1 M. La modification de l'activité enzymatique par carbéthoxylation est étudiée en fonction du temps, de la concentration en réactif, en l'absence et en présence des substrats. Lorsque les enzymes traités sont sous la forme S-sulfénysulfonate, la mesure de l'activité enzymatique est effectuée après réduction des protéines par le dithiothreitol, comme il a été déjà indiqué¹⁴.

Mesure spectrophotométrique de la carbéthoxylation des phosphokinases. A partir d'une solution de 3 ml contenant 30 $\mu\mu$ moles d'arginine kinase ou 15 $\mu\mu$ moles de créatine kinase dans le tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1), on prélève 2 fois 1 ml, destinés aux mesures de spectrophotométrie différentielle qui sont réalisées au spectrophotomètre Cary 15 dans des cuves à double compartiment de 0.4375 cm de trajet optique. On ajoute alors dans la cuve-essai 1 à 2 μl de pyrocarbonate d'éthyle prélevés à partir d'une solution 0.3 M dans l'alcool absolu et, dans la cuve témoin, autant d'alcool absolu. La carbéthoxylation est suivie dans le temps et à une température de 15–20°, par l'établissement des spectres différentiels dont l'absorption maxima à 242 $\mu\mu$ fournit, d'après le coefficient d'absorption molaire du *N*-carbéthoxy-imidazole ($\epsilon_M = 3200$) (bibl. 7), le nombre de résidus modifiés par mole de protéine (poids moléculaire arginine kinase = 43 000 (bibl. 15); poids moléculaire créatine kinase = 81 000 (bibl. 11)). Enfin, le ml de solution enzymatique restante, traité dans les mêmes conditions, permet la mesure parallèle de la perte d'activité.

Réaction des résidus histidine avec le pyrocarbonate dans les phosphagène kinases dénaturées. La carbéthoxylation des groupements histidine totaux de l'arginine kinase et de la créatine kinase est effectuée dans le temps, en traitant d'abord les protéines (14.2 $\mu\mu$ moles pour créatine kinase, 70 $\mu\mu$ moles pour arginine kinase) par l'urée à la concentration finale 6 M ou par le dodécyl sulfate de sodium à 1%, puis par 10 μl d'une solution apportant 500 μmoles de réactif par μmole de protéine. Les lectures sont faites à 242 $\mu\mu$ contre témoin protéine dénaturée sans pyrocarbonate d'éthyle.

Dosage des groupes -SH dans les carbéthoxyphosphokinases purifiées. 10 mg d'arginine kinase et 25 mg de créatine kinase dans un volume de 2 ml de tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1) sont traités par 1 μl d'une solution de pyrocarbonate 3 M. Au bout de 5 min de contact, à la température ordinaire, les enzymes inhibés sont filtrés à 4° sur une colonne de Séphadex G-25 (2 cm \times 20 cm) dans l'acétate de sodium 0.03 M (pH 6.25) ou dans le tampon phosphate 0.05 M (pH 8). La concentration des protéines contenues dans les effluents recueillis par fractions de 2.5 ml est déterminée d'après le coefficient d'extinction à 280 $\mu\mu$ et le dosage des groupements -SH est effectué en l'absence et en présence d'urée 8 M au moyen du réactif d'ELLMAN¹⁶, dans le tampon

Tris-acétate 0.5 M (pH 8). Parallèlement, on mesure par lecture différentielle à 242 m μ le nombre de résidus histidine carbéthoxylés.

RÉSULTATS

Inhibition de la créatine kinase et de l'arginine kinase par le pyrocarbonate d'éthyle

Le pyrocarbonate d'éthyle inhibe à température ordinaire, à pH 6.1, l'activité des phosphokinases étudiées, que celles-ci soient employées sous la forme native ou sous celle de S-sulfénylsulfonate enzyme. Le degré d'inhibition obtenu est propor-

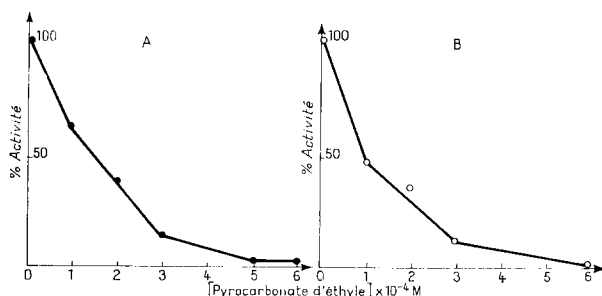


Fig. 1. Effet de la concentration en pyrocarbonate d'éthyle sur l'activité des phosphagène kinases. A, Créatine kinase: $5 \cdot 10^{-6}$ M; B, arginine kinase: $1 \cdot 10^{-5}$ M; tampon phosphate: $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1), température ordinaire; pyrocarbonate d'éthyle: aux concentrations indiquées, ajouté à partir d'une solution 0.1 M. Volume final: 1 ml. Au bout de 10 min de réaction, une partie aliquote de chaque essai est prélevée et diluée dans le tampon glycine-NaOH $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 8.4); l'activité enzymatique est mesurée sur 0.2 μ g d'arginine kinase et 1 μ g de créatine kinase.

tionnel à la concentration en réactif (Fig. 1) et dépend du temps de contact pour un rapport molaire: inhibiteur/enzyme supérieur à 50 (Fig. 2). La reproductibilité des vitesses d'inhibition exige l'emploi de solutions-mères de pyrocarbonate relativement concentrées (0.3 M), le réactif s'hydrolysant plus rapidement en solution diluée, même dans l'alcool absolu. La variation de la force ionique du milieu réactionnel ne modifie pas la vitesse de l'inhibition. Les ions nitrate, sulfate et acétate ajoutés à la concentration de $3 \cdot 10^{-2}$ M sont sans effet.

Influence des substrats

La vitesse de l'inhibition est modifiée par la présence des substrats de la réaction de transphosphorylation d'une façon différente pour les deux enzymes. En effet, comme l'indique le Tableau I, l'arginine kinase est protégée par les nucléotides, d'une part, et l'arginine, d'autre part, employés séparément; la protection est encore meilleure en présence du mélange réactionnel ATP-Mg *plus* arginine (Fig. 3). Par contre, aucune protection valable n'a été observée pour la créatine kinase, même en présence des substrats réunis.

Analyse spectrophotométrique de la carbéthoxylation des phosphagène kinases

Les Figs. 4A et 4B représentent respectivement les spectres d'absorption diffé-

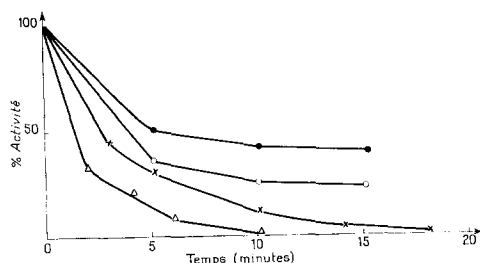


Fig. 2. Cinétique de l'inhibition de l'arginine kinase par le pyrocarbonate d'éthyle. Enzyme: $1 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1), température ordinaire. Pyrocarbonate d'éthyle: $1 \cdot 10^{-4}$ M (●—●); $2 \cdot 10^{-4}$ M (○—○); $3 \cdot 10^{-4}$ M (×—×); $6 \cdot 10^{-4}$ M (△—△). Volume final: 1 ml. Aux temps indiqués, une partie aliquote de chaque essai est prélevée et diluée dans le tampon glycine-NaOH $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 8.4); l'activité enzymatique est mesurée sur $0.2 \mu\text{g}$ de protéine.

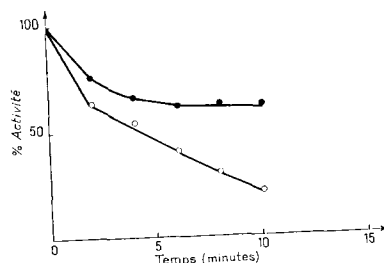


Fig. 3. Protection de l'arginine kinase par le mélange des substrats de la réaction directe de transphosphorylation contre l'inhibition par le pyrocarbonate d'éthyle. Enzyme: $1 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1), température ordinaire; pyrocarbonate d'éthyle: $3 \cdot 10^{-4}$ M. Substrats: arginine $2 \cdot 10^{-2}$ M; ATP = acétate de Mg $= 2 \cdot 10^{-2}$ M; I 0.017. ○—○, enzyme + pyrocarbonate d'éthyle; ●—●, enzyme préincubé en présence des substrats puis traité par pyrocarbonate d'éthyle. Aux temps indiqués, une partie aliquote de chaque essai est prélevée, diluée dans le tampon glycine-NaOH $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 8.4); l'activité enzymatique est mesurée sur $0.2 \mu\text{g}$ de protéine.

rentiels à pH 6.1 de la créatine kinase et de l'arginine kinase natives, carbéthoxylées. Les protéines montrent un maximum d'absorption à $242 m\mu$ caractéristique du *N*-carbéthoxyimidazole^{6,7}. Si l'on suit parallèlement l'augmentation de l'absorption à $242 m\mu$ et la perte d'activité enzymatique, on obtient les diagrammes illustrés sur les Figs. 5A et 5B, qui mettent en évidence la relation existant entre la perte d'activité des protéines et leur carbéthoxylation. Les droites des Figs. 6A et 6B mettent en relief la stoechiométrie de cette réaction et montrent que l'inhibition totale est due à la

TABLEAU I

INFLUENCE DES SUBSTRATS DE LA RÉACTION DE TRANSPHOSPHORYLATION SUR L'INHIBITION DES PHOSPHAGÈNE KINASES PAR LE PYROCARBONATE D'ÉTHYLE

Enzymes: arginine kinase = $1 \cdot 10^{-5}$ M; créatine kinase = $5 \cdot 10^{-6}$ M. Tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1). pyrocarbonate d'éthyle = $3 \cdot 10^{-4}$ M. Température ordinaire. Temps de réaction: 10 min. Protéines préincubées en présence des substrats employés séparément ou mélangés: ATP-Mg = ADP-Mg = arginine = créatine = $2 \cdot 10^{-2}$ M. Activité enzymatique mesurée sur $0.2 \mu\text{g}$ et $1 \mu\text{g}$ de protéine pour arginine kinase et créatine kinase respectivement.

Substrats	% Inhibition	
	Arginine kinase	Créatine kinase
—	80	100
ATP-Mg	38	75
ADP-Mg	38	80
Arginine	42	
Créatine		100
ATP-Mg + arginine	20	100
ATP-Mg ou ADP-Mg + créatine		80

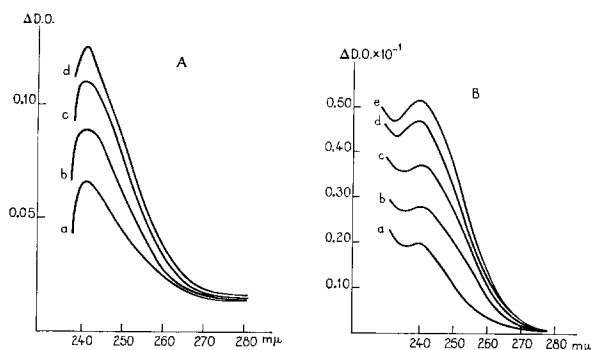


Fig. 4. Spectre d'absorption différentiel des carbethoxyphosphagène kinases. A. Créatine kinase: $1 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 6.1, traitée à 20° par pyrocarbonate d'éthyle: $6 \cdot 10^{-4}$ M. Spectre établi dans le temps, a: 2 min; b: 3 min; c: 4 min; d: 5 min. B. Arginine kinase: $1 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 6.1, traitée à 20° par pyrocarbonate d'éthyle: $6 \cdot 10^{-4}$ M. Spectre établi dans le temps, a: 2 min; b: 3 min; c: 4 min; d: 5 min; e: 6 min. Les différences d'absorption sont données pour un trajet optique de 1 cm.

modification d'un résidu histidine dans l'arginine kinase et de deux résidus histidine dans la créatine kinase.

En ce qui concerne l'arginine kinase, la stabilité de l'enzyme carbéthoxylé dépend étroitement de la température. Aussi la modification de cette protéine par le pyrocarbonate d'éthyle doit être menée à une température n'excédant pas 15° .

En vue de tester la spécificité de la réaction du pyrocarbonate d'éthyle sur les résidus histidine dans les enzymes étudiés, des dosages spectrophotométriques ont été effectués dans le temps après la dénaturation des protéines et l'emploi d'un excès de réactif. La Fig. 7A illustre les résultats obtenus pour la créatine kinase et la Fig. 7B ceux correspondant à l'arginine kinase. Pour les deux enzymes, la réaction est plus rapide en présence d'urée 6 M qu'en présence de dodécyl sulfate. Finalement, le nombre

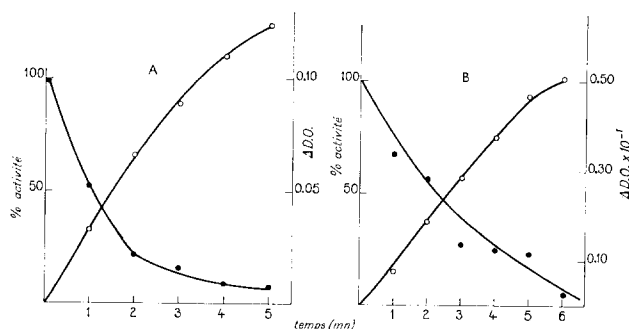


Fig. 5. Relation entre le degré d'inhibition des phosphagène kinases par le pyrocarbonate d'éthyle et l'augmentation de leur absorption à $242 \text{ m}\mu$. A. Créatine kinase: $1 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 6.1, carbéthoxylée à 20° par pyrocarbonate d'éthyle: $6 \cdot 10^{-4}$ M. B. Arginine kinase: $1 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 6.1, carbéthoxylée à 20° par pyrocarbonate d'éthyle: $6 \cdot 10^{-4}$ M. Aux temps indiqués, on mesure l'augmentation d'absorption à $242 \text{ m}\mu$ et, parallèlement, sur un échantillon traité dans les mêmes conditions, on détermine la perte d'activité enzymatique. (●—●), % activité; (○—○), augmentation de l'absorption à $242 \text{ m}\mu$ pour un trajet optique de 1 cm.

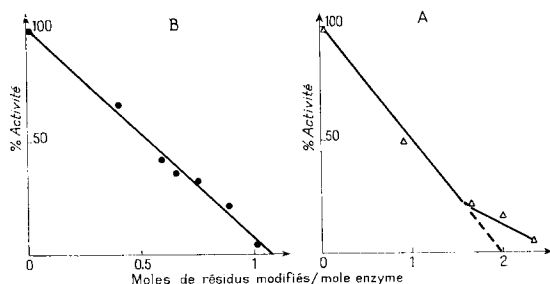


Fig. 6. Stoechiométrie de l'inactivation des phosphagène kinases par le pyrocarbonate d'éthyle. A. Créatine kinase. B. Arginine kinase.

de résidus histidine dosés est de 34 moles pour la créatine kinase et de 8 moles pour l'arginine kinase, valeurs identiques à celles obtenues par analyse de leur composition en acides aminés^{10,17}.

Dosage des groupements -SH des phosphagène kinases carbéthoxylées

Afin de montrer que la perte d'activité des phosphagène kinases après action du pyrocarbonate d'éthyle est indépendante des groupements sulfhydryles, ces derniers

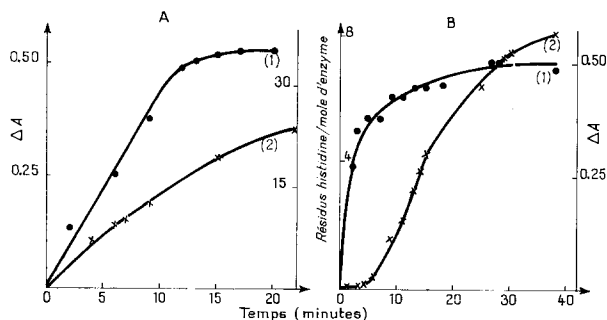


Fig. 7. Réaction des résidus histidine dans les phosphagène kinases avec le pyrocarbonate d'éthyle. A. Créatine kinase: $4.76 \cdot 10^{-6}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1), traitée par pyrocarbonate d'éthyle: $2.2 \cdot 10^{-3}$ M dans un volume final de 3 ml, après contact avec urée 6 M (courbe 1) ou chauffage 5 min à 100° en présence de dodécyl sulfate à 1% (courbe 2). B. Arginine kinase: $2.33 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 6.1), traitée par pyrocarbonate d'éthyle: $1.1 \cdot 10^{-2}$ M dans un volume final de 3 ml, après contact avec urée 6 M (courbe 1) ou chauffage 5 min à 100° , en présence de dodécyl sulfate à 1% (courbe 2). Lectures à $242 \text{ m}\mu$ contre témoin protéine en l'absence de réactif.

ont été dosés dans les enzymes inhibés et purifiés. Le Tableau II montre que la créatine kinase a non seulement conservé la totalité de ses groupements -SH mais aussi la réactivité de ses 2 -SH essentiels. L'arginine kinase présente la totalité de ses 6 groupements dosables en l'absence d'urée.

TABLEAU II

DOSAGE DES GROUPEMENTS -SH DANS LES CARBÉTHOXYPHOSPHAGÈNE KINASES

Préparations	% Inhibition	Nombre de résidus histidine modifiés par mole d'enzyme	Groupements -SH dosés			
			Sans urée		Avec urée	
			Témoin	Essai	Témoin	Essai
Créatine kinase native	85	1.75	1.72	2.2	8.1	6.6
Arginine kinase native	95	0.80	6.0	5.9		

DISCUSSION

Les résultats expérimentaux que nous avons décrits mettent en évidence l'inhibition des phosphagène kinases, natives ou ayant les groupes -SH masqués, par la carbéthoxylation d'un nombre bien défini de résidus histidine.

En effet, les caractéristiques spectrales des enzymes traités par le pyrocarbonate d'éthyle à pH 6.1 sont celles connues pour le *N*-carbéthoxyimidazole^{6,7}. De plus, le degré de perte d'activité pour les deux enzymes est en relation étroite avec l'augmentation de l'absorption à 240 m μ . Ainsi l'arginine kinase et la créatine kinase semblent renfermer un résidu histidine actif par 40 000 g de protéine. Ceci est en accord avec les résultats déjà obtenus concernant la présence du même nombre de groupe -SH (bibl. 4, 18, 19) et de résidu lysine essentiels¹⁴. Dans le cas de la créatine kinase, ces données indiquent que chaque sous-unité possède son propre site catalytique.

L'effet protecteur important exercé par le mélange des substrats à l'égard de l'arginine kinase traduit l'interaction du guanidique et des nucléotides avec ou à proximité de l'histidine active. L'ensemble de ces résultats apporte, pour la première fois sans doute, un appui expérimental au rôle des résidus histidine dans le mécanisme d'action des phosphagène kinases³⁻⁵.

L'emploi du pyrocarbonate d'éthyle comme réactif spécifique du noyau imidazole à pH 6 a été déjà mis en évidence par ELÖDI⁷. Le présent travail confirme son utilisation fructueuse pour montrer l'implication des résidus histidine dans l'activité d'enzymes possédant des groupes -SH réactifs.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce, en partie, au crédit de la R.C.P. No. 99 et à celui du groupe de recherche No. 6 du Centre National de la Recherche Scientifique.

RÉSUMÉ

1. L'ATP:créatine phosphotransférase (EC 2.7.3.2) et l'ATP:L-arginine phosphotransférase (EC 2.7.3.3), employées sous la forme native ou après masquage de leurs groupes -SH essentiels, sont inhibées, à pH 6.1, par le pyrocarbonate d'éthyle. Le degré d'inhibition varie avec le temps et la concentration en inhibiteur. Les substrats de la réaction de transphosphorylation, employés séparément ou mélangés, protègent

efficacement l'arginine kinase, mais ne sont d'aucun effet vis-à-vis de la créatine kinase.

2. Les enzymes carbéthoxylés présentent un spectre d'absorption différentiel avec un maximum d'absorption à 240 m μ , caractéristique de la formation de *N*-carbéthoxyimidazole. Les déterminations spectrophotométriques effectuées parallèlement aux mesures de la perte d'activité démontrent l'implication de deux résidus histidine actifs dans la créatine kinase et d'un résidu histidine essentiel dans l'arginine kinase.

3. La spécificité du pyrocarbonate d'éthyle à l'égard des résidus histidine a été mise en relief par l'étude de la carbéthoxylation de ces aminoacides dans les phosphagène kinases dénaturées. Cette spécificité a été encore soulignée par la non-modification du nombre et de la réactivité des groupes -SH dans les enzymes inhibés.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 L. NODA, T. NIHEI ET M. F. MORALES, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 2830.
- 2 B. R. RABIN ET D. C. WATTS, *Nature*, 188 (1960) 1163.
- 3 D. C. WATTS ET B. R. RABIN, *Biochem. J.*, 85 (1962) 516.
- 4 R. VIRDEN ET D. C. WATTS, *Biochem. J.*, 99 (1966) 162.
- 5 D. C. WATTS, in K. A. MUNDAY, *Studies in Comparative Biochemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1965, p. 162.
- 6 A. MÜHLRAD, G. HEGYI ET G. TOTH, *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 2 (1967) 19.
- 7 P. ELÖDI, in N. V. THOAI ET J. ROCHE, *Biochemical Evolution and Homologous Enzymes*. Gordon and Breach, New York, 1968, p. 105.
- 8 P. A. TRUDINGER, *Biochem. J.*, 78 (1961) 680.
- 9 T. A. MAHOWALD, E. A. NOLTMANN ET S. A. KUBY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1535.
- 10 E. DER TERROSSIAN, R. KASSAB, L. A. PRADEL ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 462.
- 11 S. A. KUBY, L. NODA ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 191.
- 12 L. A. PRADEL, R. KASSAB, F. REGNOUF ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 255.
- 13 R. KASSAB, Thèse Doctorat ès Sciences, Paris, 1966.
- 14 R. KASSAB, CL. ROUSTAN ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 308.
- 15 N. V. THOAI, R. KASSAB ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 532.
- 16 G. ELLMAN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 70.
- 17 R. H. YUE, R. H. PALMIERI, O. E. OLSON ET S. A. KUBY, *Biochemistry*, 6 (1967) 3204.
- 18 R. KASSAB, L. A. PRADEL, E. DER TERROSSIAN ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 347.
- 19 S. A. KUBY ET E. A. NOLTMANN, in P. D. BOYER, H. LARDY ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. 6, 2e éd., Academic Press, New York, 1962, p. 515.

Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 317-325