Metodi di studio della biosintesi del colesterolo

ENRICA GROSSI PAOLETTI †

Istituto di Farmacologia, Facoltà di Medicina, Università di Milano

La Prof.ssa Enrica Grossi Paoletti, Libero Docente di Farmacologia e Aiuto Ordinario dell'Istituto di Farmacologia dell'Università di Milano, è tragicamente scomparsa il 26 gennaio 1972, pochi giorni dopo l'invio del testo della conferenza tenuta nel nostro Istituto il 14 febbraio 1971 in occasione della VII Riuniune del Gruppo di Ricerca sul Metabolismo Lipidico, del quale era Membro attivo sin dalla sua fondazione.

La pubblicazione integrale di questa conferenza intende essere un estremo omaggio dei Soci del Gruppo alla Sua Memoria.

R. ANGELICO

La biosintesi del colesterolo può essere studiata sia *in vivo* sia *in vitro* e le tecniche attualmente disponibili permettono di approfondire anche la conoscenza dei suoi meccanismi.

Studi di biosintesi del colesterolo *in vitro* a partire da precursori semplici vengono effettuati ogni qual volta se ne vogliano studiare i meccanismi fisiologici e patologici di regolazione. Questi risultano di difficile interpretazione se si tiene conto della esistenza di complessi problemi di compartimentazione. È tuttavia il caso di ricordare un problema di notevole importanza risolto soltanto attraverso ricerche *in vivo*, lo studio cioè del meccanismo di regolazione della colesterolemia nell'uomo. Si riteneva infatti che il meccanismo di « feedback » negativo, che regola la sintesi epatica del colesterolo nel ratto e nel cane [1], fosse operante anche nell'uomo, e che perciò poco significato potesse avere, dal punto di vista pratico, la riduzione dello apporto dietetico di colesterolo. Al contrario, accurati studi condotti somministrando acetato marcato hanno messo in evidenza l'esistenza di un pool endogeno di colesterolo [2] pari a 2/3, 3/4 del colesterolo totale. Ricerche effettuate con D_2O hanno permesso di chiarire che l'apporto esogeno di colesterolo nell'uomo non fa spostare il pool endogeno, mentre si verifica un effetto somma con aumento notevole della colesterolemia. Ciò ha fatto

pensare o che il « feedback » nel fegato umano non funzionasse, o che altri tessuti non sottoposti a « feedback » entrassero in gioco con un ruolo importante (3).

Gli studi *in vitro* sono molto avanzati: sappiamo che si possono isolare dal fegato complessi multienzimatici, che si trovano nelle frazioni microsomiale e solubile e che sono in grado di effettuare la biosintesi da MVA fino al colesterolo (4).

Diversi cofattori sono necessari: O_2, Mg^{++}, ATP, NADH, NADPH. Le modalità di purificazione degli enzimi, la preparazione dei substrati e le condizioni ottimali di lavoro per studi di biosintesi del colesterolo sono state dettagliatamente descritte di recente da Popjak (4) e Dempsey (5).

Un aspetto importante della questione riguarda i tessuti nei quali può essere studiata la biosintesi del colesterolo. Il fegato è notoriamente il tessuto che dà il migliore rendimento. Altri tessuti, quali il muscolo e il rene, dimostrano scarsa attività. Un discorso a parte meritano la cute e il tessuto nervoso. Nella cute sono presenti steroli intermedi della biosintesi e, pur essendo la preparazione del tessuto un pò complessa, vi si possono studiare bene i problemi che riguardano i passaggi dopo la ciclizzazione dello squalene (6). Il tessuto nervoso sintetizza colesterolo in quantità assolutamente trascurabili nell'animale adulto. Durante la sua maturazione, invece, sintetizza attivamente steroli (7), con accumulo di prodotti intermedi della biosintesi, che ci è stato agevole identificare (8). Con maggiore difficoltà abbiamo invece identificato gli steroli precursori presenti nel cervello dell'uomo adulto (Tab. 1). Il riconoscimento degli steroli endogeni è reso più difficile nel fegato dalla presenza di steroli dietetici che complica l'interpretazione dei risultati.

Per esperienze di biosintesi del colesterolo, la scelta della marcatura è legata a vari fattori. La marcatura con ^{14}C, anche se più difficile da ottenere, è preferita, quando è possibile, per le maggiori garanzie di riproducibilità. Infatti, usando composti marcati con tritio si deve sempre controllare che non si abbiano perdite aspecifiche di ^{3}H, ed è perciò necessario affiancare le esperienze con prove in bianco. Inoltre le elevate marcature specifiche dei composti tritiati, se danno vantaggio in alcuni casi, rischiano però di accelerare la decomposizione delle molecole stesse durante la conservazione e richiedono perciò frequenti purificazioni del materiale.

Teoricamente tutti gli intermedi della biosintesi del colesterolo da acetato a desmosterolo possono essere utilizzati marcati per studi di biosintesi. In pratica sono disponibili precursori cosiddetti « lontani » quali acetato marcato con ^{14}C nel metile o nel COOH e mevalonato marcato con ^{14}C in 1 o 2, oppure con ^{3}H in 2, 4 o 5.

L'uso di acetato o mevalonato si rende indispensabile quando si vogliano studiare i meccanismi di regolazione della sintesi, fisiologica o patologica, od il meccanismo di azione dei farmaci attivi sulla sintesi del colesterolo.

Oggi il mevalonato si può ottenere anche marcato stereospecificamente con ^3H, cioè si possono avere separate le due configurazioni possibili assunte a seconda della posizione dell'^3H nella molecola (4). La marcatura stereospecifica permette di studiare più a fondo l'introduzione e la scomparsa

TABELLA 1

Steroli identificati nel cervello umano adulto (*)

STEROLO	STEROLI µg/g tessuto	%
C 30 Δ^8	0,596	0,003
C 29 Δ^8	5,642	0,030
C 28 Δ^8	3,857	0,020
C 27 Δ^8	15,480	0,082
C 30 $\Delta^{8,24}$	0,708	0,004
C 29 $\Delta^{8,24}$	3,588	0,019
C 28 $\Delta^{8,24}$	3,064	0,016
C 27 $\Delta^{8,24}$	2,157	0,011
C 27 $\Delta^{5,24}$	3,838	0,020
C 27 Δ^5	18.660,000	99,090
C 27 Δ^{14}	3,835	0,020
C 27 Δ^5 (7 C=0)	1,626	0,009
C 27 Δ^0	54,750	0,291
Steroli identificati solo parzialmente	72,380	0,384

(*) Da Galli e coll. (9).

di H durante la sintesi biologica. Per marcare invece precursori che abbiano già la configurazione sterolica si ricorre in genere all'introduzione di ^{14}C nelle posizioni 1, 4, 26 e di ^3H in 2 per gli steroli da C^{28} a C^{30}, in 2, 3, o 4 per quelli a 27 atomi di carbonio (5).

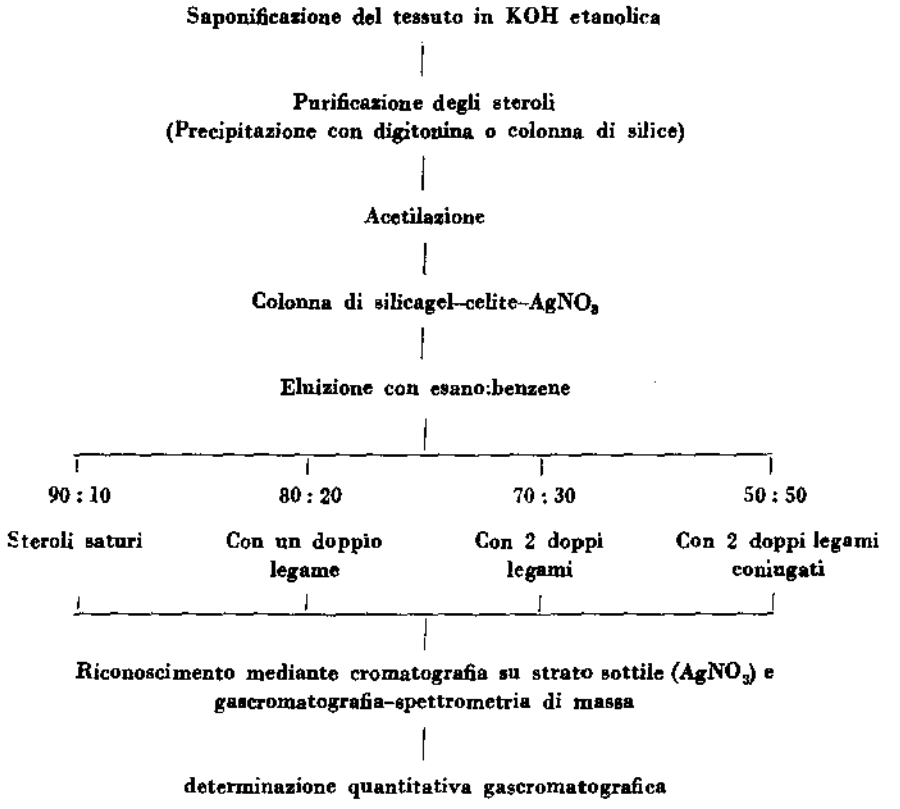
I problemi più complessi nello studio della biosintesi del colesterolo sono connessi ai metodi da usare per separare ed identificare i prodotti delle reazioni di biosintesi, sia che siano effettuate *in vivo* che *in vitro*, con la identificazione degli intermedi formatisi od eventualmente già presenti nel tessuto in esame.

Discuteremo soltanto della separazione degli intermedi di natura sterolica. Le tecniche di cromatografia su strato sottile, che sono le più semplici, non danno da sole risultati molto soddisfacenti, per lo scarso potere separatore, nei confronti degli steroli intermedi.

Abbiamo già presentato altre volte le caratteristiche della tecnica da noi adottata per separare e riconoscere gli steroli intermedi della biosintesi del colesterolo nei tessuti (10,11) ed i risultati ottenuti analizzando tessuti quali

fegato ([12]), cervello ([8]) ed i tumori cerebrali ([13]). Il metodo (Schema 1) è basato essenzialmente sulla separazione in colonna cromatografica di silicagel-celite-$AgNO_3$. Gli steroli da separare devono essere applicati come derivati acetilati (per mascherarne l'OH in 3).

La separazione è basata sulle differenze in posizione e numero dei doppi legami e viene controllata per gascromatografia.



SCHEMA I. — Frazionamento ed identificazione di steroli da campioni biologici. Da Galli e Grossi Paoletti ([10]).

Essa offre diversi vantaggi: 1) gli steroli sono protetti da degradazione od isomerizzazione dei doppi legami durante la cromatografia; 2) il recupero è completo; 3) è possibile ottenere separazione di steroli presenti in piccolissima quantità; a tale scopo può essere utile usare due colonne: una prima per allontanare la quota maggiore di colesterolo presente, ed una seconda per separare gli steroli presenti in piccola quantità.

Le frazioni steroliche eluite vengono successivamente analizzate per gascromatografia-spettrometria di massa, contro standards.

Nel cervello, come accennato precedentemente, abbiamo messo in evidenza con questo metodo la presenza di due serie di intermedi sterolici da 30 a 27 atomi di carbonio (Tab. I), una serie con doppio legame in catena laterale ed una senza. Questo risultato e l'uso di precursori marcati ci hanno permesso di stabilire che la via metabolica che mantiene il doppio legame in catena laterale è preferenziale nel tessuto nervoso [9]. Abbiamo inoltre riconosciuto nel cervello la presenza di alcuni steroli che non sono previsti come intermedi normali di biosintesi, come ad esempio Δ^{14} colestanolo [13].

Analogamente Eneroth e coll. [14] hanno separato gli steroli del meconio mediante cromatografia su colonna. Gli steroli convertiti in trimetilsilileteri sono poi stati riconosciuti mediante gascromatografia-spettrometria di massa.

Analizzando lo spettro di massa relativo al C29Δ_8 (Fig. 1) questi AA. hanno notato che, oltre al picco padre m/e 486 ed ai picchi caratteristici m/e 396, m/e 381 ed m/e 353 erano presenti picchi di discreta intensità m/e 484, m/e 394, m/e 379 ed m/e 351 indicativi della presenza contemporanea di uno sterolo con due doppi legami.

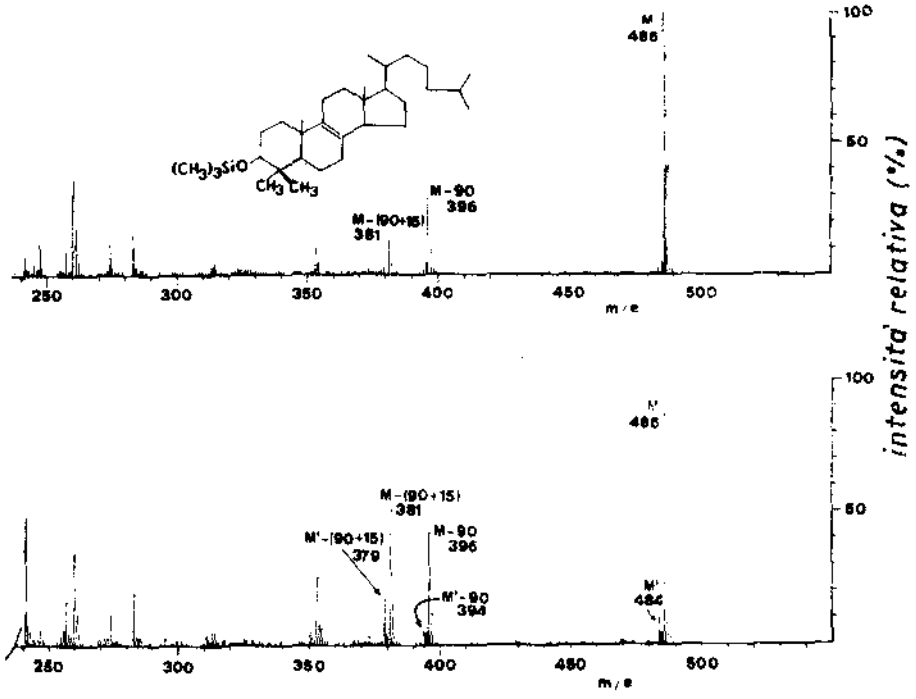
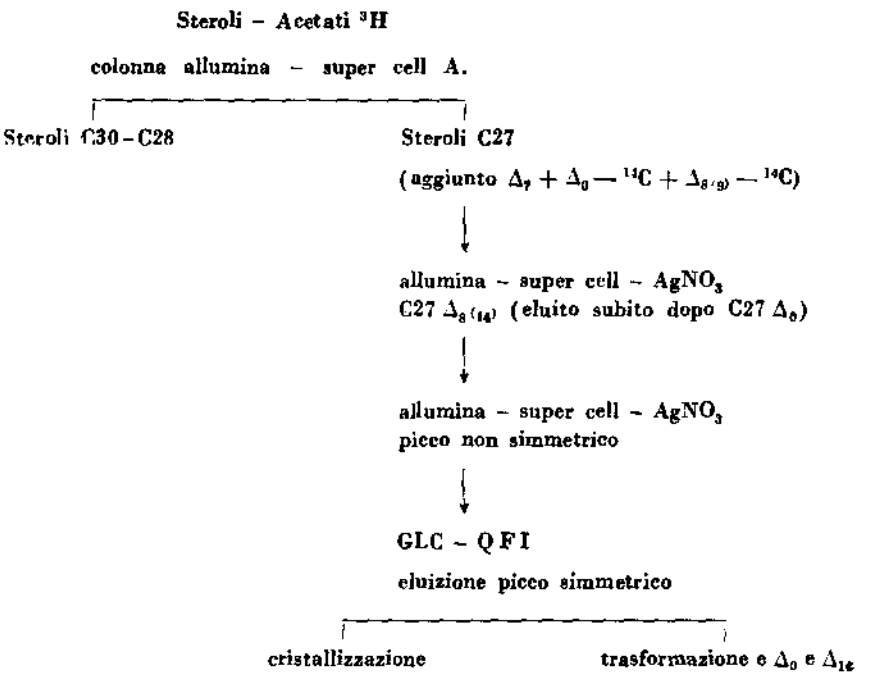


Fig. 1. — Spettro di massa relativo al C29Δ_8. Da Eneroth e coll. [14].

Questo sterolo è stato identificato da Eneroth e coll. ([14]) come C29$\Delta_{8,14}$ in base alle caratteristiche di rottura ed alla identità con lo spettro, da noi pubblicato, del composto di sintesi ([15]).

Un metodo più complesso di identificazione di steroli sconosciuti è stato adottato da Lutsky e Schroepfer ([16]) per l'analisi di steroli della cute (Schema 2). Gli steroli purificati mediante precipitazione con digitonina,



Schema 2. — Identificaziane di C27$\Delta_{8(14)}$ nella cute. Da Lutsky e Schroepfr ([16]).

vengono acetilati con anidride acetica ^3H e sottoposti a separazione su colonne di acido silicico-super cell. Queste permettono la prima separazione degli steroli a 27 atomi di carbonio dagli altri (da C 28 a C 30). Gli steroli con 27 atomi di carbonio raccolti insieme, e con aggiunta di acetati di Δ^7-colestenolo freddo, colestanolo ^{14}C e C27$\Delta_{8(9)}$ ^{14}C sono stati passati in colonna di allumina-super cell-$AgNO_3$. Le frazioni corrispondenti allo sterolo del quale si vuole accertare la presenza, C27$\Delta_{8(14)}$, eluite subito dopo il colestanolo, vengono raccolte e riapplicate ad una colonna di allumina-super cell-$AgNO_3$ e successivamente in gascromatografia con colonna di QF 1,

Lo sterolo eluito da questa mostra coincidenza tra il picco di radioattività e quello di massa. La diluizione e la cristallizzazione a radioattività costante dello sterolo hanno portato gli AA. a riconoscere che si trattava del $C27\Delta_{8\,(14)}$ atteso.

L'isolamento di composti puri radiochimicamente deve essere particolarmente accurato quando, anzichè cercare la presenza di un intermedio nei tessuti, si vuole studiare il meccanismo di qualche passaggio della biosintesi. La presenza di impurezze altamente marcate deve sempre essere sospettata quando si parte da materiale di origine biologica ed il problema si presenta più complesso quando il precursore sia lontano come l'acido mevalonico. In questi casi, spesso, non è sufficiente ricorrere alla separazione cromatografica ed alle cristallizzazioni successive del prodotto desiderato, ma si deve aggiungere a questi procedimenti qualche reazione chimica specifica, che garantisca la purezza radiochimica del composto in esame.

Per il colesterolo, garanzia sufficiente di purezza si ottiene mediante la formazione del dibromuro ([15]). Il problema è invece più complesso quando si debba, ad esempio, sintetizzare $\Delta_{5,7}$ colestadienolo. Questo sterolo non si accumula normalmente nei tessuti, a meno che non si ricorra all'uso di farmaci, quale AY-9944, che ne impediscano la trasformazione a colesterolo ([17]). Ad esempio, incubando per un'ora omogenato di fegato con mevalonato 2-^{14}C, il 50% della radioattività dell'insaponificabile appartiene a $\Delta_{5,7}$ acetato, separato in colonna di silicagel G-$AgNO_3$ ([18]).

L'idrogenazione del doppio legame in 5 con catalizzatore opportuno (trifenilfosfina rodio ioduro, che evita isomerizzazioni) porta a formazione di $C27\Delta_7$, che dimostra una riduzione del 50 % della radioattività molare alla prima cristallizzazione ed ulteriori diminuzioni in cristallizzazioni successive.

Due tipi di contaminazioni radioattive possono essere presenti in questo caso:

a) steroli che co-cristallizzano;

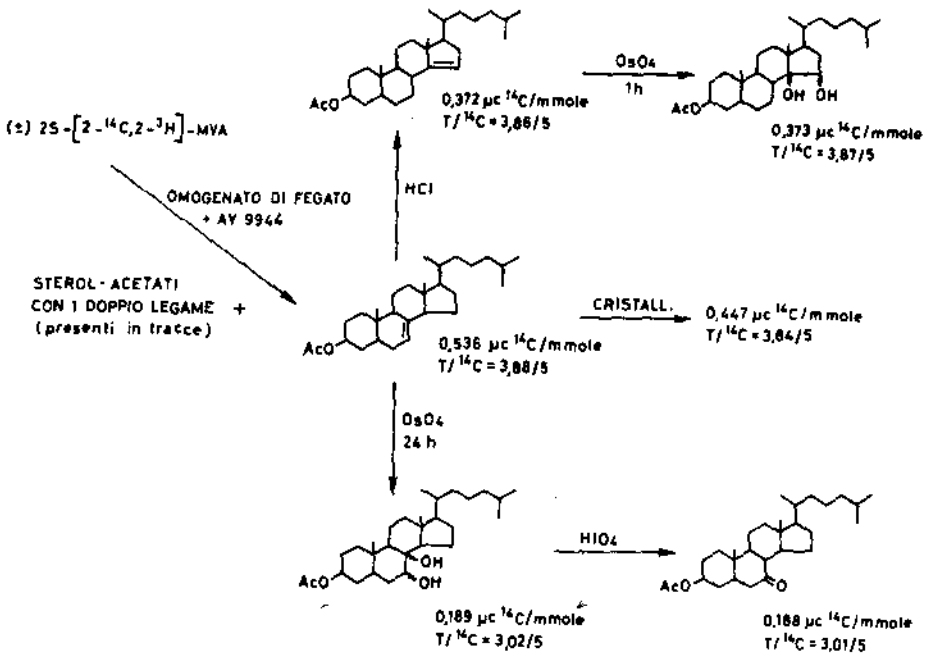
b) materiale non sterolico, formatosi durante la biosintesi, presente nella soluzione madre.

Si provvede perciò a purificare su colonna il Δ_7 colestenolo ottenuto per idrogenazione, mentre un'aliquota di Δ_7-acetato si fa reagire con OsO_4 a dare 7,8 diolo. La radioattività molare è identica a quella del Δ_7-purificato su colonna (i prodotti che potrebbero reagire più lentamente sono eliminati se si sceglie un tempo di reazione opportuno). L'ulteriore purificazione del diolo a chetolo non porta a modificazione della radioattività molare, garantendo così l'isolamento del composto puro ([19]).

Quando si usi la doppia marcatura con mevalonato stereospecifico ^{14}C e 2S-^{3}H (Fig. 2), 6 molecole di mevalonato formano una molecola di lanosterolo, perciò in esso il rapporto $^3H/^{14}C$ è 6/6, mentre nella sua trasforma-

zione a colesterolo, per la perdita di 1 metile marcato il rapporto diventa 5/5. Inoltre durante il trasferimento del doppio legame da 8 a 7 e la formazione del doppio legame in 14, si ha perdita di H in 7 e 15 ed il rapporto $^{3}H/^{14}C$ deve diventare 3/5 ([19]).

Si ricorre anche alla inibizione con AY-9944 quando si effettua la sintesi con mevalonato-2-3-^{3}H o 2-S-^{3}H, cioè con marcatura sterospecifica in omogenati di fegato e si voglia isolare $_{7}$colestenolo (Schema 3). Alla fine



SCHEMA 3. — Biosintesi di steroli da ^{3}H-mevalonato stereospecifico.

dell'incubazione, separando gli steroli su colonna, si ottiene Δ_7 colestenolo, che sembra puro per GLC; cristallizzazioni successive dimostrano invece che nonostante non cambi il rapporto H/C si ha perdita di radioattività: perciò si devono eliminare gli eventuali contaminanti altamente marcati ([19]).

Si è pensato che questi fossero steroli con doppio legame in 8, poichè l'isomerizzazione a Δ_{14} faceva ridurre la radioattività molare, ma non faceva cambiare il rapporto H/C e lo stesso Δ_{14} trasformato in diolo non cambiava radioattività.

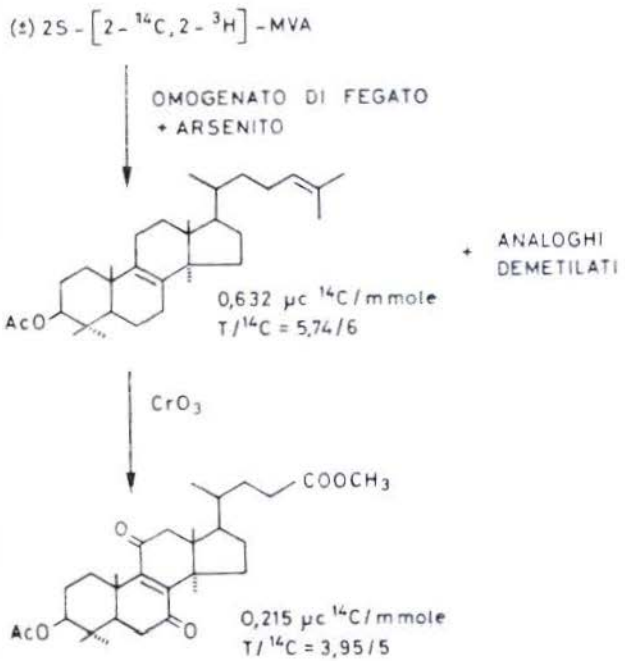
Invece il trattamento con OsO_4, che reagisce in tempi diversi in relazione con la posizione del doppio legame, formando diolo (infatti un Δ_{14}

reagisce in 1 ora, un Δ_7 reagisce in 36 ore, ed uno sterolo Δ_8 reagisce in 100 ore), fa ridurre di molto la radioattività molare, ma soprattutto chiarisce il rapporto H/C, che diventa esattamente 3/5.

La formazione successiva del 7-cheto con reazione molto specifica con HIO_4 dà lo stesso risultato.

Il 7-deidrocolesterolo purificato analogamente, dà un risultato simile ed ha permesso di confermare la perdita preconizzata dell'H in 15 ([20]) oltre che in 7 ([19]).

Un altro problema risolto con una purificazione adeguata riguarda il lanosterolo di origine biosintetica, pure derivato da MVA stereospecifico doppiamente marcato (Schema 4).



Schema 4. — Biosintesi di lanosterolo da ^{3}H-mevalonato stereopecifico.

Per accumulare lanosterolo marcato in omogenati di fegato si è dovuto ricorrere all'uso di arsenito, che blocca le demetilazioni dell'anello steroideo ([21]). Tuttavia contaminanti sterolici, pure marcati, erano presenti e, per la purificazione, si doveva sfruttare la differenza tra questi ed il lanosterolo, che possiede un metile in 14 ([20]).

Mediante cromatografia su strato sottile di silica gel G-$AgNO_3$, si è fatta una prima grossolana purificazione del lanosterolo sintetizzato che,

eluito dal piatto, è stato poi ossidato con acido cromico in acido acetico al suo dichetoderivato.

Si osserva una importante caduta della radioattività molare, dovuta quasi sicuramente a desmetilanaloghi C29 e C28, formatisi nel sistema, come si può dedurre dal basso rapporto C/H del lanosterolo prima della purificazione: dopo la purificazione il rapporto C/H diventa quello atteso, cioè 6/6.

Il problema è molto semplice quando si voglia invece controllare la purezza di uno sterolo derivato da un precursore vicino, perchè il numero dei possibili contaminanti che si formano nel tessuto è inferiore e di essi è molto più facile prevedere la natura. Così ad esempio, volendo studiare la trasformazione del $C29\Delta_{8,14}$, al suo immediato successore ([15]), questo composto marcato è stato incubato con omogenato di fegato in anaerobiosi: l'isolamento degli steroli alla fine della reazione e la purificazione su colonna ha permesso di vedere quali steroli si formino in queste condizioni; la radioattività dell'insaponificabile è così ripartita (Tab. 2):

TABELLA 2

Conversione di C29 $\Delta_{8,14}$-^{3}H da parte di omogenato di fegato in anaerobiosi (*)

STEROLI	% INSAPONIFICABILE
C29 $\Delta^{8,14}$	26,4
C27 Δ^5	0,001
C29 $\Delta^8 + \Delta^7$	61,0
Altri steroli	8,0

(*) Da Canonica e coll. ([15]).

$C29\Delta_{8,14}$ non reagito = 26,4 %; $C29\Delta_8 + \Delta_7 = 61{,}8$ %; $\Delta_5 = 0{,}001$ %; $\Delta_8 + \Delta_5 = 8{,}0$ %. Dal momento che il colesterolo non è marcato si può dedurre che la prima trasformazione subita dal $C29\Delta_{8,14}$ in omogenati di fegato sia la perdita del doppio legame in 14.

Un ultimo caso che interessa la biosintesi in generale e quella del colesterolo in particolare si riferisce alla esclusione di un composto dal ruolo di intermedio.

Nel passaggio da Δ_7 a $\Delta_{5,7}$, ad esempio, è noto che i microsomi di fegato effettuano la trasformazione in atmosfera di O_2 e che sono necessari cofattori piridinici. Dal momento che in anaerobiosi non si ha reazione si è pensato alla esistenza di un intermedio ossigenato: perciò si è preconizzato il ruolo di un epossido.

È stato sintetizzato epossido 7α marcato ([22]). Questo sterolo, che in atmosfera di O_2 si trasforma attivamente a colesterolo, in anaerobiosi è convertito solo a Δ_7-colesterolo (Tab. 3).

TABELLA 3

Incorporazione di 7α, 8α epossido da parte di omogenati di fegato

ATMOSFERA	Δ_7 COLESTENOLO % INSAP.	COLESTEROLO % INSAP.
N_2	67,49	0,79
O_2	—	45,30

Si dimostra pertanto che:

a) il composto non è un intermedio obbligato tra Δ_7-colestenolo e 7-deidrocolesterolo;

b) dal momento che il sistema biologico può convertirlo a Δ_7, esso potrebbe appartenere a qualche via collaterale di biosintesi, dimostrandosi così la capacità del tessuto di riportarlo nelle vie naturali di sintesi.

Mentre è relativamente facile ottenere una risposta positiva nel ritrovamento di un intermedio vero, è molto più difficile stabilire il significato eventuale di vie secondarie di biosintesi.

Ad esempio il $\Delta_{8\,(14)}$ colestenolo, che pure è stato isolato marcato dai tessuti ([16]) ed è trasformato a colesterolo in atmosfera di O_2 ([23]), ha dato risultati negativi in esperimenti di trappola ([24]). Ha posto così seri dubbi all'ipotesi che si tratti di un intermedio obbligato delle biosintesi del colesterolo.

Vorrei concludere sottolineando che se i metodi di cromatografia su strato sottile (e quelli gascromatografici di controllo) sono i più semplici per lo studio della biosintesi del colesterolo, i risultati più convincenti e rigorosi si ottengono soltanto combinando queste due tecniche con la cromatografia su colonna, la spettrometria di massa e le trasformazioni chimiche, che permettono di garantirsi da errori dovuti alla presenza di impurezze radiochimiche.

Con l'impiego di queste metodiche è così possibile arrivare a:

— conoscere l'entità di biosintesi del colesterolo nei tessuti;

— identificare steroli ignoti e steroli presenti nei tessuti in piccolissime quantità;

— stabilire il ruolo di intermedi di nuovi composti;

— studiare inibitori delle tappe enzimatiche capaci di realizzare un blocco delle sintesi endogene del colesterolo dell'organismo.

BIBLIOGRAFIA

(1) TAYLOR, C. B. & R. G. GOULD, *Circulation*, **2**, 467 (1950).

(2) COX, G. E., C. B. TAYLOR, D. PATTON, G. B. DAVIS JR. & N. BLANDIN, *Arch. Pathol.* **76**, 60 (1963).

(3) TAYLOR, C. B., B. MIKKELSON, J. A. ANDERSON, D. T. FORMAN, A. K. ASDEL & K. J. HO. *Med. Time*, **95**, 489 (1967).

(4) POPJAK, G. *Methods Enzymol.* **15**, 393 (1969).

(5) DEMPSEY, M. E. *Methods Enzymol.* **15**, 501 (1969).

(6) GAYLOR, J. L., *Advan. Lipid Res.*, **10**, (1972) in corso di stampa.

(7) GROSSI-PAOLETTI, E. & R. PAOLETTI. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.* **66**, 564 (1958).

(8) WEISS, J. F., G. GALLI & E. GROSSI-PAOLETTI. *J. Neurochem.*, **15**, 563 (1968).

(9) GALLI, G., E. GROSSI-PAOLETTI & J. F. WEISS. *Science*, **162**, 1495 (1968).

(10) GALLI, G. & E. GROSSI-PAOLETTI. *Lipids*. **2**, 72 (1967).

(11) GALLI, G. & E. GROSSI-PAOLETTI. *Lipids*, **2**, 84 (1967).

(12) GALLI, G., R. FUMAGALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI, *Intern. Conference on Radioactive Isotopes in Pharmacology*, Geneve, P. G. Waser and B. Glasson, Eds., Wiley Interscience, London, 1967, p. 279.

(13) PAOLETTI, R., G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI, A. FIECCHI & A. SCALA. *Lipids*, **6**, 134 (1971).

(14) ENEROTH, P., J. A. GUSTAFSSON & E. NYSTROM. *Europ. J. Biochem.*, **11**, 456 (1969).

(15) CANONICA, L., A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6532 (1968).

(16) LUTSKY, B. N. & G. J. SCHROEPFER JR. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6449 (1970).

(17) DVORNIK, D., M. KRAML, J. DUBUC, M. GIVNER, & R. GAUDRY. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3309 (1963).

(18) FIECCHI, A., G. GALLI, M. GALLI-KIENLE & A. SCALA. *Progr. Biochem. Pharmacol.*, **5**, 11 (1969).

(19) CANONICA, L., A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *Steroids*, **11**, 749 (1968).

(20) CANONICA, L., A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2597 (1968).

(21) MOLLER, M. L. & T. T. TCHEN. *J. Lipid Res.*, **2**, 342 (1961).

(22) FIECCHI, A., M. GALLI-KIENLE, A. SCALA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLETTI & R. PAOLETTI. *J. Biol. Chem.*, 1972 (in corso di stampa).

(23) HUI LEE, W., B. N. LUTSKY & G. J. SCHROEPFER JR, *J. Biol. Chem.*, **244**, 5440 (1969).

(24) FIECCHI, A., A. SCALA, F. CATTABENI & E. GROSSI-PAOLETTI. *Life Sciences* **9**, 1201 (1970).