

### LA ENZIMA H-ATPasa DE PLANTAS SUPERIORES: UN MODELO PARA EL ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ATPASAS DEL TIPO "P".

Shirley G. Roberts, Graciela R. Berberían y Luis A. Beaugé

Laboratorio de Biofísica. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra.  
CC 389. Córdoba Argentina. immmf@immmf.uncor.edu

#### INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática delimita el volumen celular. Sin embargo, su rol es mucho más complejo y relevante que un simple límite entre compartimientos. Sus características estructurales, una base lipídica con proteínas inmersas en ella, le confieren dos funciones vitales: es a la vez la separación y la comunicación entre los medios intra y extracelular. La función de comunicación es imprescindible para que la célula obtenga información respecto del ambiente que la rodea y, en los organismos pluricelulares, se relacione con células vecinas y distantes. Entre las proteínas estructurales de la membrana existen sistemas específicamente diseñados para permitir el transporte de agua y solutos hacia dentro y fuera de la célula; esto unido a la permeabilidad selectiva de la bicapa lipídica controla un ambiente bioquímico intracelular completamente diferente del extracelular y permite la existencia de diferencia de potencial eléctrico entre ambos compartimientos (el interior es 10-170 mV electronegativo respecto del exterior). En su conjunto, este sistema resulta en lo que se conoce como gradientes químicos (o electroquímicos en el caso de iones). Estos gradientes son generados gastando energía metabólica (transporte activo) y a su vez son utilizados para el transporte de una multiplicidad de sustratos y productos esenciales para la vida manteniendo la homeostasis celular (transporte pasivo). Las proteínas encargadas de estos transportes se encuentran altamente conservados en los

diferentes grupos de organismos, pudiendo aparecer bajo la forma de bombas (transporte activo), co y contratransportadores, canales, etc. (transporte pasivo) (1).

Casi todas las células animales presentan en sus membranas plasmáticas la "bomba de sodio", uno de los mecanismos de transporte activo más estudiados. Esta proteína es una enzima que hidroliza ATP y es capaz de autofosforilarse utilizando la energía de hidrólisis para mover cationes sodio hacia afuera, manteniendo una diferencia de concentración de este catión de 100 a 120 mM entre el medio interno y el externo. En animales, la mayoría del resto de transporte de materia ocurre por contrao cotransporte con sodio (2). En las células vegetales, el catión que cumple esa función no es sodio sino hidrógeno y la enzima encargada de "bombear" protones hacia el exterior celular, con gasto de energía y manteniendo un gradiente de pH, es la enzima H-ATPasa (3,4).

En los organismos vivos existen tres grupos bien caracterizados de enzimas transportadoras de protones y que hidrolizan ATP. Los tres grupos tienen distinto origen, por lo que también difieren en su estructura y función dentro de la célula. Estos son: 1) las F-ATPasas de mitocondrias y bacterias que en organelas de eucariotes funcionan como ATP sintetasas y en bacterias pueden funcionar en ambos sentidos, como ATP sintetasas y ATP hidrolasas, en este caso para generar un gradiente quimiosmótico de protones (5); 2) las V-ATPasas de endomembranas

de organelas que funcionan como reservorio de alguna sustancia particular para la célula como microsomas, vacuolas y vesículas de Golgi (4,5) y 3) las P-ATPasas, grupo que incluye a la enzima H-ATPasa de membrana plasmática de plantas (5) y otras enzimas H-ATPasas con idéntica función que se encuentran en membrana plasmática de hongos y levaduras. Las mismas son homólogas a otras ATPPasas sobre las cuales nos referimos a continuación.

### LAS ATPPasas DE TIPO P

La superfamilia de proteínas de transporte denominadas P-ATPasas está constituida por bombas catiónicas que tienen dominios de organización comunes. Incluye representantes como las enzimas Na,K-ATPasa de células animales, Ca-ATPasa de membrana plasmática, Ca-ATPasa de retículo sarcoplásmico, K-ATPasa de bacterias, H-ATPasa renal, H,K-ATPasa de mucosa gástrica, H-ATPasa de levaduras y de hongos entre otras. Considerando su estructura total, la homología entre estos transportadores es variable (aproximadamente entre el 25 y el 85 %), aunque existen ciertos dominios de la molécula donde la homología es muy elevada, y esto se traduce en que su funcionamiento pueda ser descrito en términos generales como muy similar (3). Todas se caracterizan por formar un intermediario fosforilado estable en medio ácido, producto de la unión de un grupo fosfato del ATP a un residuo aspartilo de la molécula, son inhibidas por vanadato y la secuencia de aminoácidos alrededor del aspartilo está conservada (3). En el curso de su ciclo de reacción presentan alternancia de conformaciones conocidas como E1 y E2 con diferencias bioquímicas entre ellas (2,4). La enzima en la conformación E1 tiene el sitio de unión para ATP que va a ser hidrolizado para fosforilar la enzima; es decir que E1 es la conformación con actividad kinasa. Esta conformación tiene del lado intracelular, sitios de alta afinidad para el catión que va a salir. La enzima en la conformación E2 tiene actividad fosfatasa y muy baja afinidad por los cationes que se mueven

hacia afuera. La diferencia entre las afinidades por los cationes en E1 y E2 posibilita que los mismos puedan ser capturados en un lado de la membrana y liberados en el otro luego del cambio conformacional (2,3,4,6). Otra característica de estas enzimas es que ATP no solo es sustrato sino que actúa con baja afinidad como regulador no fosforilante acelerando algún paso limitante en el ciclo catalítico. Este efecto se observa en la curva de estimulación como la suma de dos funciones michaelianas. Aunque usualmente se asigna a E1 el sitio de alta afinidad y a E2 el de baja, el significado de estos sitios es aún motivo de debate (7).

En los últimos años el estudio de la estructura de estas bombas se ha basado en modelos propuestos sobre cristalografía de proteínas purificadas. Un impresionante avance en el conocimiento de estas enzimas lo constituyen los trabajos que describieron la estructura de las dos conformaciones E1 y E2 de la enzima SERCA1a (Ca-ATPasa de retículo sarcoplásmico) (8,9). De la estructura de la conformación con Ca<sup>2+</sup> unido (E1) y la conformación libre de calcio (E2) se propuso un modelo de funcionamiento que incluye la interacción de tres dominios dentro de la porción citoplasmática central involucrados en la unión del nucleótido, fosforilación y transducción (dominios N, P y A respectivamente)

### LA ENZIMA H-ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE PLANTAS SUPERIORES

En plantas la actividad de la enzima H-ATPasa de membrana plasmática es capaz de utilizar el 25% de todo el ATP producido en la célula (6,3). Por otra parte el movimiento de protones para generar el gradiente electroquímico, está acoplado al movimiento de metabolitos esenciales como nitrato, sulfato y moléculas orgánicas como aminoácidos y sacarosa (3,6). Un indicador adicional de la importancia de la enzima H-ATPasa es su abundancia en la membrana representando entre el 1 al 5% del total de proteínas (6). Dentro del grupo de ATPPasas P esta enzima es una de

las menos conocidas, aunque la homología estructural y funcional con otras P-ATPasas, permite analizar su estructura y función de manera comparativa con la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa, Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática (PM Ca<sup>2+</sup>-ATPasa) y Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA) las que han sido más estudiadas.

La enzima H-ATPasa tiene un papel central en la fisiología de plantas ya que la acidificación del medio externo ocurre previo a los procesos que son desencadenados con el crecimiento celular (10). El transporte activo de protones hacia el medio externo puede generar un potencial de membrana de -120 a -160 mV (negativo hacia dentro) y un gradiente de 1,5 a 2 unidades de pH (ácido hacia el lado externo) (6). Como la célula vegetal presenta una pared rígida por fuera, el proceso de elongación celular en estas células es posible por la acción de enzimas hidrolíticas que son activadas en medio ácido y actúan por fuera de la membrana plasmática alojando la estructura de la pared (10,11). Por otra parte el incremento del gradiente electrosmótico permite que los nutrientes necesarios para el crecimiento sean introducidos con mayor eficiencia, entre ellos el ión potasio, cofactor esencial en muchos procesos en el metabolismo vegetal como activador de enzimas y regulador de la expresión génica (11,3,4,6). Se han descrito condiciones anómalas de máxima activación de la bomba donde los procesos de crecimiento son sobre estimulados produciendo muerte celular. Una de estas condiciones se produce por la acción de fusicoccina, un glicósido diterpeno producido como toxina por hongos de la especie *Fusicoccum amygdali* (12). Este compuesto ha sido muy estudiado como un potencial herbicida y tiene una función específica sobre uno de los mecanismos de regulación de esta enzima (12,13).

Varias isoformas de enzima H-ATPasa de membrana de plantas han podido ser expresadas eficientemente en sistemas heterólogos, como levaduras *Sacharomices cerevisiae* (14,15). La alta eficiencia de estos sistemas de expresión permitió avanzar en el conocimiento de su estructura y función, ya que la enzima

puede obtenerse en estado activo y altamente pura (16). La sobre expresión y purificación por columna de afinidad de la isoforma más abundante (enzima AHA2) permitió obtener cristales bidimensionales de esta proteína en la membrana. Los datos espectroscópicos obtenidos a partir de dichos cristales revelan su estructura homóloga a otras P-ATPasas en cuanto al empaquetamiento de los segmentos transmembrana y a la existencia de una gran porción citoplasmática, sugiriendo además que la enzima sería un homodímero (16). El posible significado de este arreglo oligomérico es aún motivo de discusión.

Los estudios sobre su función se realizan incorporando la enzima en proteoliposomas, donde es posible estudiar el transporte de protones utilizando colorantes como la acridina, sustancia que al unir protones (estado protonado) cambia de color y a su vez se hace impermeable a la membrana lipídica, quedando atrapada dentro de la vesícula (4,17). En preparaciones con diferente grado de purificación es posible también medir la actividad de hidrólisis de ATP producida por esta enzima, usando inhibidores de las actividades ATPasas contaminantes, como azida para la ATPasa mitocondrial, nitrato para la ATPasa vacuolar y molibdato para las fosfatasa ácidas (7).

La enzima tiene su pH óptimo para la hidrólisis de ATP alrededor de 6,5 aunque el valor de máxima actividad se relaciona con la afinidad del sitio de transporte por protones, pudiendo incrementarse la actividad en condiciones de activación a concentraciones más bajas de hidrógeno (pH más alcalino), debido a un aumento en la afinidad del sitio de transporte (4,18).

Como en las P-ATPasas animales se han podido identificar en la H-ATPasa de plantas superiores por lo menos dos conformaciones enzimáticas, las que fueron homologadas con E1 y E2. Esta caracterización se basa en las diferencias que presenta la enzima fosforilada a sufrir una rápida defosforilación por el efecto de ADP sobre la enzima en la conformación E1 y por potasio sobre la

enzima en la conformación E2 (3,4). Aunque potasio no es transportado por esta enzima, como ocurre en la enzima Na,K-ATPasa de animales, este catión es un activador no esencial de la enzima H-ATPasa y su transporte hacia el interior celular se produce para mantener la electroneutralidad (4).

#### **FAMILIA DE ATPasas DE PLANTAS.**

En plantas las P-ATPasas forman una vasta superfamilia. Uno de los modelos de organismo más comúnmente utilizado para el estudio de la bioquímica y genética de plantas es la especie *Arabidopsis thaliana*, en cuyo genoma se han identificado 45 genes que codifican para diferentes ATPasas de tipo P, incluidas en cinco subfamilias de proteínas relacionadas evolutivamente (3,19). La diversidad y la cantidad de genes relacionados con las P-ATPasas son indicadores de su importancia fisiológica, ya sea para la generación de la fuerza electromotriz de gradiente o para el transporte de cationes pequeños, presentando diferencias en la especificidad de expresión los diferentes tejidos y en su regulación (19).

Las bombas de protones de la membrana plasmática de plantas están incluidas dentro de la subfamilia conocida como P<sub>1</sub> ATPasas con 12 miembros que comparten una homología del 66%, siendo las más abundantes en la membrana plasmática las enzimas AHA1 y AHA2. Las ATPasas del grupo P<sub>1</sub> poseen una sola subunidad catalítica de alrededor de 96 kDa que atraviesa 10 veces la membrana plasmática dejando el extremo N y C terminal del lado interno (3,19). En la mitad de la secuencia entre los segmentos transmembrana 5 y 6 un dominio intracelular se proyecta al citoplasma que corresponde al dominio P, homólogo en la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa (SERCA) (8,9), donde se ubica el sitio de unión de ATP y el sitio de fosforilación. El extremo C-terminal comprende una porción importante de la molécula con función regulatoria (autoinhibitoria) llamada dominio R. La activación por lípidos, hormonas del tipo de las auxinas, ciertas toxinas de hongos

(fusococcina) y los efectos relacionados con la respuesta a la luz, son mediados por este dominio (3,20,21,22,3).

Se ha demostrado que en el dominio R se une un tipo especial de proteínas citoplasmáticas con función de regulación de la familia de proteínas 14-3-3 (21). Las proteínas 14-3-3 son un grupo muy conservado de pequeñas proteínas solubles que fueron identificadas en muchos tipos de células eucariotas y que actúan reuniendo otras proteínas para favorecer la interacción entre ellas (23,24). En la H-ATPasa de plantas, la fosforilación en el penúltimo residuo treonina (Thr) es condición previa a la unión de proteína 14-3-3, por lo que necesariamente en este modo de regulación también participaría por lo menos alguna enzima kinasa (25), enzima aún no identificada.

#### **DOS SITIOS PARA SUSTRATO: COMPLEJA INTERACCIÓN PARA LA REGULACIÓN DE LA BOMBA.**

Uno de los aspectos bioquímicos conocidos sobre la H-ATPasa de plantas que comparte con otras P-ATPasa es su cinética de activación por sustrato. La enzima H-ATPasa obtenida a partir de membrana plasmática de raíz de avena (*Avena sativa* L.) muestra dos sitios de activación por sustrato: un sitio de alta afinidad por ATP, entre 10-20  $\mu$ M con baja velocidad máxima y un sitio de baja afinidad, entre 200-500  $\mu$ M y velocidad máxima de alrededor de 10 veces la actividad del primer sitio (7). Este fenómeno podría explicarse por el efecto dual de ATP como sustrato y como regulador, aunque no hay evidencias directas acerca de la naturaleza de tales sitios en esta enzima.

Las enzimas H-ATPasa de *Arabidopsis thaliana* AHA1 y AHA2 obtenidas por expresión en levadura también demuestran una cinética compleja para sustrato, pero en este caso la activación por ATP se explica mejor considerando efectos de cooperatividad entre sitios. Así, diferentes condiciones o ligandos provocan que la interacción entre sitios se modifique variando desde cooperatividad positiva, en el estado inhibido de la bomba, hasta

cooperatividad negativa entre sitios en el estado activado (26,27). Esto hace que en el estado inhibido, la enzima requiera alta concentración de sustrato para funcionar con eficiencia.

El estado inhibido de la enzima es producido por la acción del dominio R ubicado en el extremo C-terminal. Para explicar este efecto se propone que el extremo C-terminal se superpone al sitio P en el dominio citoplasmático central, impidiendo la unión de sustrato. Un efecto semejante se describe en la enzima Ca-ATPasa de membrana plasmática de animales (PM-Ca-ATPasa) donde la inhibición puede ser revertida por unión de calmodulina en el extremo C-terminal (3,28). En plantas el efecto inhibitorio puede ser revertido por eliminación del C-terminal (aproximadamente 100 aminoácidos) o bloqueando su efecto por unión de proteína 14-3-3 (20,21). En ambos sistemas se propone que la unión de estas proteínas reguladoras activa por medio de liberar el C-terminal del sitio P, favoreciendo la unión de sustrato y la hidrólisis (3). En las enzimas de plantas expresadas el dominio R puede unir proteína 14-3-3 de la levadura donde estas bombas se expresan, demostrando el alto grado de conservación de estos mecanismos reguladores (3,28,29,30).

La activación de la bomba también se produce con ciertos lípidos y en condiciones como solubilización y posterior reconstitución en un liposoma. Estos efectos se describen en otras ATPasas y también están asociados a efectos sobre el dominio R (31,32). Nuestros trabajos nos permiten afirmar que en las condiciones que producen activación de la hidrólisis y del transporte, la cinética para sustrato correspondiente a cooperatividad negativa y estos datos cinéticos también podrían explicarse por la aparición de los dos sitios michaelianos clásicos de las enzimas P-ATPasas (25).

La estructura cristalográfica dimerica descrita para esta enzima podría sugerir que los sitios resultarían de la interacción entre subunidades de un oligómero, ya que solo un sitio por monómero ha podido ser demostrado. Esta hipótesis podría apoyarse en los estudios de inactivación

por radiación que describen una masa molecular correspondiente al doble de la unidad estructural de 96 kDa. (4). Sin embargo existen otros modelos cinéticos que podrían aplicarse para explicar la aparición de dos sitios aún que la enzima fuese monomérica (25), y hasta el momento la relación estructura-función en esta enzima es motivo de discusión.

### REFLEXIÓN FINAL

En este trabajo se describe de manera sintética la importancia de uno de los tantos transportadores de membrana que existen en los sistemas biológicos, La enzima H-ATPasa de plantas superiores. A pesar de la enorme cantidad de proteínas que participan en los diferentes transportes celulares, su estudio se puede encarar de manera comparada gracias a que la evolución es, en esencia, un proceso conservativo que se basa en mantener aquellas estructuras y funciones exitosas. La enzima H-ATPasa de plantas es una máquina altamente eficiente y como las otras P-ATPasas de células animales son estructuras que evolucionaron desde una proteína ancestral. Su conocimiento despejará interrogantes no resueltos aún sobre los mecanismos de transporte de las ATPasas de tipo P, abriendo el camino para la identificación y tratamiento de aquellas patologías asociadas directa o indirectamente con deficiencias en el transporte de cationes.

### REFERENCIAS

1. Pedersen PL, Carafoli E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, Properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 1987. 12:146-50.
2. Post R.L., Hegyvary C., Kume S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 1972. 247:6530-6540.
3. Palmgren, M.G. PLANT PLASMA MEMBRANE H-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001. 52:817-845.

4. Briskin, D.P. The plasma membrane H-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function, *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. 1019:95-109.
5. Mccarty RE., A plant biochemist's view of H-ATPases and ATP synthases. *J exp Biol.* 1992. 172:431-441.
6. Sze H, Li X, Palmgren MG. Energization of plant cell membranes by H-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis *Plant Cell.* 1999. 11:677-90.
7. Roberts, G., Berberían, G. and Beaugé, L. Some properties of the H<sup>+</sup>-ATPase activity present in root plasmalemma of *Avena sativa* L. Two different enzymes or one enzyme with two ATP sites? *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. 1064:131-138.
8. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* 2000. 405, 647-55.
9. Toyoshima C, Nomura H, Sugita Y. Crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in various physiological states. *Ann N Y Acad Sci.* 2003. 986: 1-8.
10. Rober-Kleber N, Albrechtova JT, Fleig S, Huck N, Michalke W, Wagner E, Speth V, Neuhaus G, Fischer-Iglesias C., Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.* 2003. 131:1302-12.
11. Hager A., Role of the plasma membrane H-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res.* 2003. 116:483-505.
12. Wurtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A., Oecking, C., Structural view of a fungal toxin acting on a 14-3-3 regulatory complex, *EMBO J.* 2003. 22: 987-94.
13. Oecking C, Eckerskorn C, Weiler EW. The fusaric acid receptor of plants is a member of the 14-3-3 superfamily of eukaryotic regulatory proteins, *FEBS Lett.* 1994. 352: 163-6.
14. Villalba, J., Palmgren, M., Berberian, G., Ferguson, G. and Serrano, R. Functional expression of plant plasma membrane H-ATPase in yeast endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 1992. 267: 12341-12349.
15. Palmgren, M. and Christensen, G. Complementation in situ of the yeast plasma membrane H-ATPase gene *pma1* by an H<sup>+</sup>-ATPase gene from a heterologous species, *FEBS Lett.* 1993. 317: 216-222.
16. Jahn, T., Dietrich, J., Andersen, B., Leidvik, B., Otter, C., Briving, C., Kuhlbrandt, W. and Palmgren, M.G. Large scale expression, purification and 2D crystallization of recombinant plant plasma membrane H-ATPase, *J Mol Biol.* 2001. 309: 465-76.
17. Serrano R. H-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods in Enzymol.* 1988. 157: 533-544.
18. Buch-Pedersen MJ, Palmgren MG., Mechanism of proton transport by plant plasma membrane proton ATPases. *J Plant Res.* 2003, 116:507-15.
19. Axelsen KB, Palmgren MG. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2001. 126:696-706.
20. Palmgren, M., Larsson, C. and Sommarin, M. Proteolytic activation of the plant plasma membrane H-ATPase by removal of a terminal segment, *J. Biol. Chem.* 1990. 265:13423-13426.
21. Kasamo K., Regulation of plasma membrane H-ATPase activity by the membrane environment. *J Plant Res.* 2003. 116:517-23.
22. Jelich-Ottmann, C., Weiler, E.W., Oecking, C. Binding of regulatory 14-3-3 proteins to the C terminus of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase involves part of its autoinhibitory region. *J Biol Chem.* 2001. 276:39852-7.
23. Roberts MR. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci.* 2003. 8:218-23.
24. Bunney TD, van den Wijngaard PW, de Boer AH. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. *Plant Mol Biol.* 2002. 50:1041-51.
25. Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., Palmgren, M.G. Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H(+)-ATPase

AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947), *J Biol Chem.*, 1999. 274:36774-80.

26. Roberts, G., Berberían, G. and Beaugé, L. Evidence for two catalytic sites in the functional unit of H-ATPase from high plants, *Plant Physiol.* 1995. 108:813-819.

27. Roberts, G., Beauge, L., Complex ATP-activation kinetics of plant H-transporting ATPase may or may not require two substrate sites, *Eur J Biochem.* 1997. 246: 228-32.

28. Vorherr, T., Kessler, T., Hofmann, F. and Carafoli, E. The calmodulin-binding domain mediates the self-association of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump, *J. Biol. Chem.* 1991. 266:22-27.

29. Woloszynska M, Kanczewska J, Drabkin A, Maudoux O, Dambly S, Boutry M., Function and regulation of the two major plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases. *Ann NY Acad Sci.* 2003. 986:198-203.

30. Olivari, C., Meanti, C., De Michelis, M.I., Rasi-Caldogno, F. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of the plasma membrane H(+)-ATPase. IV. Fusicoccin induces the association between the plasma membrane H(+)-ATPase and the fusicoccin receptor. *Plant Physiol.* 1998. 116:529-37.

31. Lund, S., Orłowski, S., Foresta, B., Champeil, P., le Maire, M. and Moller, J. Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 1989. 264:4907-15.

32. Gomes, E., Venema, K., Simon-Plas, F., Milat, M.L., Palmgren, M.G., Blein, J.P. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Is there a direct interaction between lysophosphatidylcholine and the C-terminal part of the enzyme? *FEBS Lett.*, 1996. 398:48-52.