

## ROLE DU MAGNÉSIUM ET DU POTASSIUM DANS LA RÉACTION FRUCTOKINASIQUE

par

H. G. HERS\*

*Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de  
Louvain (Belgique)*

Dans la publication précédente<sup>1</sup>, nous avons signalé que la fructokinase du foie est activée par le magnésium et par le potassium. Comme on connaît peu d'enzymes qui exigent deux ions métalliques pour leur activité optima, il nous a paru utile d'étudier le mécanisme d'action de ces deux cations et leurs interactions mutuelles. Les résultats que nous avons obtenus semblent avoir une portée plus générale et jeter une certaine lumière sur le rôle des ions dans d'autres réactions enzymatiques.

### TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Les techniques utilisées sont essentiellement les mêmes que celles décrites antérieurement<sup>1</sup>. Les expériences de fructokinase ont été toutes réalisées avec l'enzyme purifié. L'hexokinase de cerveau a été obtenue par centrifugation à  $20,000 \times g$  pendant 2 heures d'un homogénéisat de cerveau de cobaye, le liquide surnageant étant utilisé sans autre purification.

### RÉSULTATS

La vitesse de la réaction fructokinasiatique est influencée par les facteurs suivants: 1.  $p_H$ ; 2. concentration en fructose; 3. concentration en ATP; 4. concentration en magnésium; 5. nature du cation alcalin présent et 6. concentration en cations alcalins.

L'influence des deux premiers facteurs a déjà été décrite. Entre 5.5 et 7.8, le  $p_H$  ne modifie pas d'une manière appréciable la vitesse de la réaction. Quant à la concentration en fructose, elle n'influence guère cette vitesse dans les conditions usuelles, car l'enzyme a une très grande affinité pour ce substrat et il est pratiquement toujours saturé. Les effets des autres facteurs sont plus compliqués et il existe entre eux des interactions importantes auxquelles sont consacrées les recherches décrites ici.

#### 1. Rôle du magnésium

La fructokinase est entièrement inactive en l'absence de magnésium. La Fig. 1 montre que le degré d'activation par cet ion passe par un optimum qui dépend essentiellement de la concentration en ATP et aussi de la concentration en cations alcalins; en présence d'acétate de potassium molaire, cet optimum est obtenu pour un rapport

\* Chargé de recherche FNRS

$\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}} = 1$  tandis qu'en l'absence de ce sel il est déjà atteint pour une concentration en magnésium deux fois moindre.

L'existence d'un rapport optimum entre les concentrations en magnésium et en ATP n'est pas un fait isolé. La Fig. 2 montre que dans le cas de l'hexokinase de cerveau, la vitesse maxima est obtenue pour un rapport  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}} = 1$ .

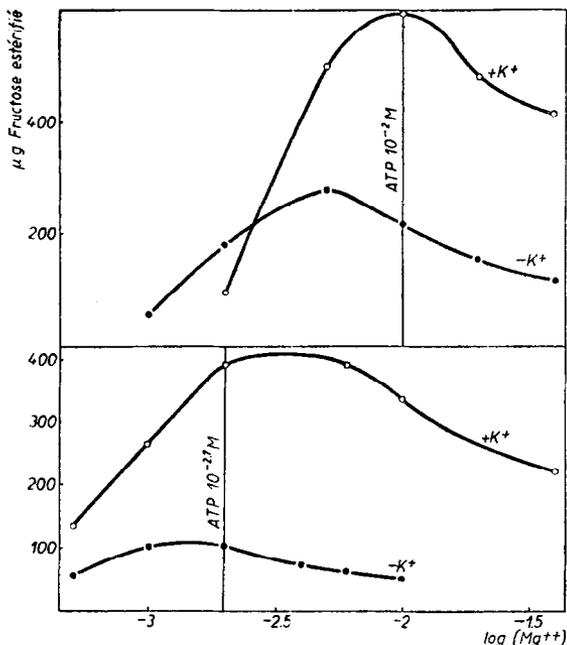


Fig. 1. Vitesse de la réaction en fonction de la concentration en  $\text{MgCl}_2$ . Les traits verticaux représentent la concentration en ATP; en haut:  $\text{ATP } 10^{-2} \text{ M}$  dans un volume total de 0.8 ml; en bas:  $\text{ATP } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  dans un volume total de 2 ml.  $\text{K}^+$  = acétate de  $\text{K}^+$   $\text{M}$ . En l'absence de  $\text{K}^+$ , une quantité trois fois plus grande d'enzyme est utilisée et les activités sont divisées par trois. Tampon cacodylate, 25 minutes d'incubation

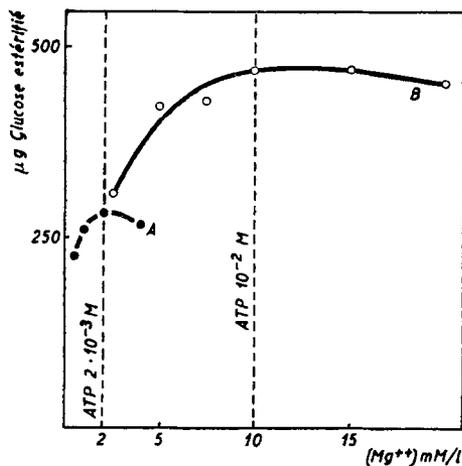


Fig. 2. Activité de l'hexokinase de cerveau en fonction de la concentration en  $\text{MgCl}_2$ . Les concentrations en ATP sont représentées par les traits verticaux; courbe A:  $\text{ATP } 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , volume total 2 ml; courbe B:  $\text{ATP } 10^{-2} \text{ M}$ , volume total 0.8 ml. Tampon cacodylate, 15 minutes d'incubation

L'examen de la littérature indique que cette règle est fréquemment vérifiée pour les enzymes qui agissent sur l'ATP ou d'autres composés polyphosphorés et qui sont activés par un cation bivalent.

Ces faits suggèrent fortement que le rôle du magnésium est de former avec l'ATP un ion complexe qui serait le véritable substrat de la réaction. La facilité avec laquelle l'ATP forme des complexes avec le magnésium ressort déjà d'observations décrites dans la publication précédente; nous avons constaté en effet que l'ATP empêche l'insolubilisation de  $\text{MgF}_2$  et qu'il n'est précipité par l'ion mercurique qu'en présence d'autres cations bivalents:  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Zn}^{++}$ . L'existence d'un ion complexe est clairement démontrée par la titration potentiométrique de l'ATP en l'absence et en présence

de magnésium (Fig. 3). Ces déterminations n'ont pas été effectuées avec une technique absolument rigoureuse, mais les différences observées dépassent de loin l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales; le calcul montre également que ces différences ne sont pas dues à l'augmentation de la force ionique provoquée par l'addition de  $MgCl_2$ .

Ces courbes de titration indiquent que c'est surtout le  $pK_4$  de l'ATP qui est abaissé par l'ion  $Mg^{++}$ ; c'est donc la quatrième fonction acide de l'ATP qui a le plus d'affinité pour le magnésium et on peut admettre la formation d'un ion  $ATP-Mg$  lorsque les deux composants du complexe sont mélangés en proportions équimoléculaires.

Il est encore intéressant de remarquer qu'en présence de magnésium, la dernière fonction acide de l'ATP est en majeure partie dissociée au-delà de  $pH$  5.5; ce fait permet de comprendre, au moins en partie, la faible influence du  $pH$  sur la vitesse de la réaction.

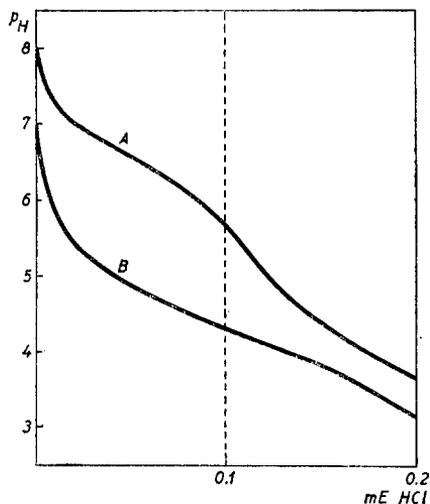


Fig. 3. Titration potentiométrique de 0.1 mM d'ATP par addition d'HCl 0.1 N (courbe A). Idem en présence de 0.3 mM de  $MgCl_2$  (courbe B). Titration effectuée sous azote

## 2. Rôle du potassium

L'examen de la Fig. 1 montre que l'addition d'acétate de potassium molaire a plusieurs effets sur la cinétique de la réaction: 1. le rapport optimum  $\frac{Mg}{ATP}$  passe de 0.5 à 1; 2. la vitesse maxima de la réaction est fortement augmentée et cette augmentation est proportionnellement plus marquée à faible concentration en ATP; 3. Lorsque la concentration en magnésium dépasse sa valeur optima, le potassium contrecarre l'inhibition par l'excès de magnésium; 4. Lorsque le rapport  $\frac{Mg}{ATP}$  est très petit, le potassium est lui-même inhibiteur.

La Fig. 4 montre que le déplacement du rapport optimum  $\frac{Mg}{ATP}$  n'est pas spécifique de l'ion  $K^+$ , car il peut être également obtenu avec de l'acétate de sodium molaire.

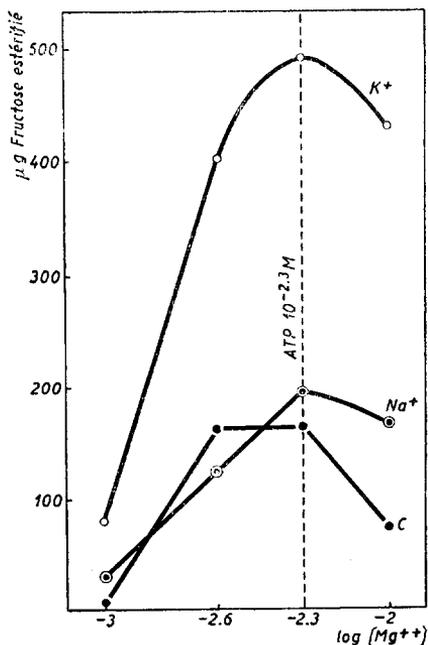


Fig. 4. Influence des ions  $Na^+$  et  $K^+$  M sur le rapport  $\frac{Mg}{ATP}$  optimum.  $K^+$  = acétate de  $K^+$  M.  $Na^+$  = acétate de  $Na^+$  M. C = contrôle. Concentration en ATP :  $5 \cdot 10^{-8}$  M, représentée par le trait vertical. En l'absence de  $K^+$ , une quantité double d'enzyme est utilisée et les activités sont divisées par deux. Tampon cacodylate, 30 minutes d'incubation

TABLEAU I

EFFET DES CATIONS ALCALINS SUR LA VITESSE DE LA RÉACTION FRUCTOKINASIQUE

Les sels ajoutés sont en concentration molaire. L'ATP et le  $MgCl_2$  sont  $5 \cdot 10^{-3} M$  sauf dans un des contrôles.

Sel ajouté	O	LiCl	NaCl	KCl	RbCl	CsCl
$\mu g$ de fructose estérifié en 30 minutes	195 332*	78	350	460	350	145

\*  $MgCl_2$   $2.5 \cdot 10^{-3} M$ 

L'augmentation de la vitesse maxima est par contre un effet spécifique du potassium; le Tableau I montre qu'elle ne peut être obtenue avec aucun autre ion alcalin; les faibles activations observées avec NaCl et probablement aussi avec RbCl sont dues au déplacement du rapport optimum  $\frac{Mg}{ATP}$ .

Les courbes de la Fig. 5 montrent que l'activation par le potassium est due à une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le substrat ATP-Mg. Les valeurs trouvées pour la constante de Michaëlis sont:  $5.4 \cdot 10^{-3} M$  en l'absence de  $K^+$  (courbe A),  $1 \cdot 10^{-3} M$  en présence de KCl  $M$  (courbe B) et  $1 \cdot 10^{-3} M$  avec une faible concentration ionique, le seul cation alcalin présent étant le  $K^+$  (courbe C). Cet effet du potassium sur l'affinité explique que l'activation par cet ion soit la plus marquée lorsque la concentration en ATP-Mg est faible.

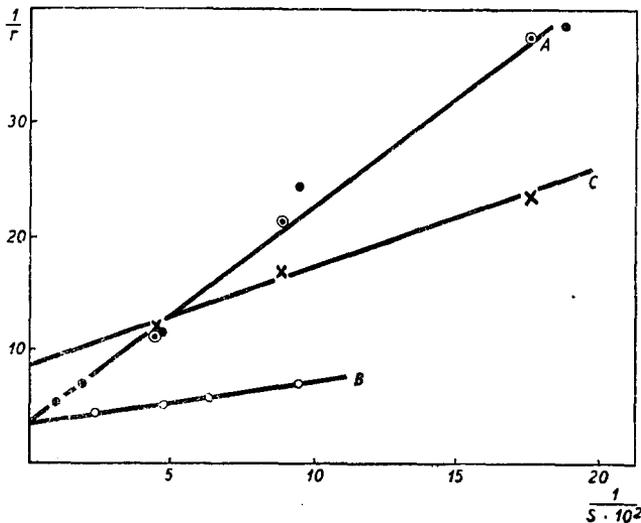


Fig. 5. Mesure de l'affinité de la fructokinase pour ATP-Mg. La vitesse de la réaction est mesurée manométriquement. Courbe A: 2 expériences réalisées en l'absence d'ion  $K^+$  (cation alcalin présent:  $Na^+$ ); Courbe B: avec KCl  $M$ ; courbe C: faible concentration ionique,  $K^+$  comme seul cation alcalin (autre préparation que pour les expériences A et B). Le rapport  $\frac{Mg}{ATP}$  est toujours optimum soit 0.5 dans expériences A et C et 1 dans expérience B. Les concentrations en substrat sont exprimées en ATP-Mg et les valeurs de la constante de MICHAELIS ( $K_m$ ) calculées graphiquement selon l'équation:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{S} \quad S \text{ étant exprimé en } M/l \text{ et } v \text{ en } \mu M/\text{min}$$

Finalement les courbes de la Fig. 6 montrent qu'il existe une concentration optimale en ion  $K^+$  et que cet optimum dépend de la concentration en ATP-Mg; à très forte concentration le potassium est inhibiteur mais cette inhibition est du type compétitif car elle est partiellement levée par une plus grande concentration en ATP-Mg.

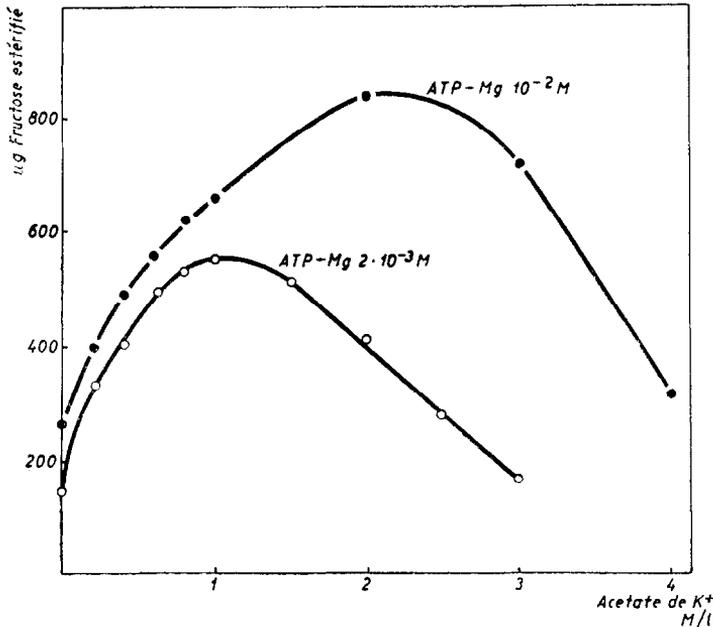


Fig. 6. Influence de la concentration en  $K^+$  sur la vitesse de la réaction en présence de 2 concentrations différentes en ATP-Mg

#### DISCUSSION

1. Divers auteurs ont déjà signalé la propriété que possèdent les composés phosphorés et en particulier l'ATP et les autres polyphosphates de former des complexes avec les cations bivalents. NEUBERG ET MANDL<sup>2</sup> notamment ont décrit la solubilisation par l'ATP d'un très grand nombre de sels insolubles de métaux bivalents. L'importance que pourrait avoir la formation de ces complexes dans la cinétique de diverses réactions enzymatiques a été soulignée récemment par LEHNINGER<sup>3</sup>. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus montrent que les hexokinases agissent vraisemblablement sur un ion complexe ATP-Mg.

2. Le seul enzyme qui, à notre connaissance, soit activé par le potassium est celui qui catalyse le transfert d'un phosphate de l'ATP sur l'acide pyruvique en présence de magnésium et dont l'action est donc analogue à celle de la fructokinase (LARDY ET ZIEGLER<sup>4</sup>). Le mode d'action du potassium dans cette réaction est inconnu.

Dans le cas de la fructokinase, l'effet du potassium, même lorsqu'il se trouve à faible concentration, est essentiellement une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le complexe ATP-Mg.

D'autres actions n'ont été observées qu'avec des concentrations élevées en potas-

sium et certaines d'entr'elles ont pu être reproduites avec des concentrations équivalentes en ion sodium. Ce sont: 1. Modification du rapport optimum  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}}$  qui passe de 0.5 à 1. 2. Diminution de l'action inhibitrice du magnésium en excès. 3. Inhibition de la réaction à très forte concentration. Parce que cette inhibition s'oppose à toutes les autres actions de potassium, il existe une concentration optima en potassium; le fait que celle-ci soit plus élevée lorsque la concentration ATP-Mg est plus grande, indique une action compétitive.

L'ensemble de ces faits pourrait s'expliquer par l'hypothèse suivante: l'enzyme porterait deux fonctions voisines dont l'une fixerait normalement le complexe Mg-ATP et l'autre un ion  $\text{K}^+$  donnant lieu à la forme (1).



Le remplacement du  $\text{K}^+$  par du  $\text{Na}^+$  (forme 2) diminue 5 fois l'affinité de l'enzyme pour ATP-Mg. La fixation d'autres cations, tels que  $\text{Mg}^{++}$  (forme 3) entraînerait une inhibition plus ou moins marquée, levée par un excès de  $\text{K}^+$ . Le fait qu'à faible concentration en cations alcalins, l'activité est suboptimale lorsque le rapport  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}}$  est égal à 1 conduit à supposer que la forme (4) peut aussi exister et qu'elle est moins active, mais que cette inhibition par ATP-Mg est levée par un excès d'ions  $\text{K}^+$  ou  $\text{Na}^+$ . Lorsque le rapport  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}}$  est égal à 0.5 on peut supposer la formation de l'ion complexe ATP-Mg-ATP qui pourrait servir de substrat à la réaction mais ne serait pas inhibiteur.



Finalement, l'inhibition par une très forte concentration en  $\text{K}^+$  signifierait que cet ion peut également déplacer compétitivement ATP-Mg de la fonction active de l'enzyme, donnant naissance à la forme (5) inactive.



Une telle hypothèse aurait l'avantage d'expliquer raisonnablement les faits observés. Ceux-ci sont cependant toujours la résultante d'actions multiples et il est très difficile de faire séparément une étude de chacun des facteurs qui influencent la cinétique de la réaction.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par un subside des "Lilly Research Laboratories". Nous remercions le professeur CHR. DE DUVE des conseils qu'il nous a donnés au cours de l'exécution de ce travail. Nous sommes reconnaissant à Monsieur L. EYCKMANS pour l'aide technique qu'il nous a apportée.

## RÉSUMÉ

Il existe une concentration en magnésium optima pour la réaction fructokinase; sa valeur dépend de la concentration en ATP et de la concentration en cations alcalins. Le rapport  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}}$  optimum est de 0.5 en présence de faibles concentrations en cations alcalins; il est égal à un en présence d'acétate ou de chlorure de sodium ou de potassium molaire.

2. Le magnésium forme avec l'ATP un ion complexe, qui constituerait le véritable substrat de la réaction.

3. L'affinité de l'enzyme pour le complexe ATP-Mg est cinq fois plus grande en présence d'ions  $\text{K}^+$  que d'ions  $\text{Na}^+$ .

4. L'ion  $\text{K}^+$  à très forte concentration exerce une inhibition qui est compétitive avec ATP-Mg.

5. La signification de ces faits a été discutée et une hypothèse explicative est proposée.

## SUMMARY

1. There is an optimum magnesium concentration for the fructokinase reaction. Its value is dependent on the ATP concentration and on the amount of alkali cations present. At low concentrations of alkaline cations, the optimum  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}}$  ratio equals 0.5. It reaches unity in the presence of molar potassium or sodium chloride or acetate.

2. Magnesium forms a complex with ATP. This complex appears to be the real substrate of the reaction.

3. The affinity of the enzyme for the ATP-Mg complex is five times greater in the presence of  $\text{K}^+$  ions than in the presence of  $\text{Na}^+$  ions.

4. At very high concentrations,  $\text{K}^+$  ions are inhibitory. The inhibition is competitive with ATP-Mg.

5. The significance of these facts is discussed and an interpretative hypothesis is suggested.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Es gibt eine optimale Magnesium-Konzentration für die Fruktokinase-Reaktion; dieses Optimum hängt von der Konzentration des ATP und der Alkali-Kationen ab. Bei geringen Konzentrationen der Alkali-Kationen ist der optimale Wert des Verhältnisses  $\frac{\text{Mg}}{\text{ATP}}$  gleich 0.5. Bei molaren Konzentrationen von Kalium- oder Natriumchlorid oder -acetat ist dieses Verhältnis gleich 1.

2. Das Magnesium bildet mit dem ATP ein komplexes Ion, welches das eigentliche Substrat der Reaktion zu sein scheint.

3. Die Affinität des Enzyms zu dem Komplex ATP-Mg ist in Gegenwart von  $\text{K}^+$ -Ionen fünfmal grösser als in Gegenwart von  $\text{Na}^+$ -Ionen.

4. In hoher Konzentration übt das  $\text{K}^+$ -Ion eine konkurrierende Hemmwirkung auf ATP-Mg aus.

5. Die Bedeutung dieser Tatsachen wurde erörtert und eine erklärende Hypothese aufgestellt.

## BIBLIOGRAPHIE

<sup>1</sup> H. G. HERS, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 416.

<sup>2</sup> C. NEUBERG ET I. MANDL, *Arch. Biochem.*, 23 (1949) 499.

<sup>3</sup> A. L. LEHNINGER, *Physiol. Rev.*, 30 (1950) 393.

<sup>4</sup> H. A. LARDY ET J. A. ZIEGLER, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 343.

Reçu le 9 mai 1951