

BBA 65792

INTERACTION DES ATP:GUANIDINE PHOSPHOTRANSFÉRASES AVEC
LEURS SUBSTRATS, ÉTUDIÉE PAR SPECTROPHOTOMETRIE
DIFFÉRENTIELLE

CLAUDE ROUSTAN, RIDHA KASSAB, LOUISE-ANNE PRADEL ET
NGUYEN VAN THOAI

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

(Reçu le mai 1, 1968)

SUMMARY

Differential spectrophotometry of ATP:guanidine phosphotransferase-substrate complexes

1. The difference spectra which result from the binding of nucleotide and guanidine substrates to creatine kinase and arginine kinase has been studied.

ADP produces specific shift in the absorption spectrum towards higher wave lengths when interacting with both enzymes. The change observed with ATP is quite different and results from a smaller absorption of the adenine ring. When present, the metal Mg^{2+} does not change the spectra.

Spectrophotometric titrations with nucleotides indicate a stoichiometry of one mole of nucleotide per mole of arginine kinase and two moles of nucleotide per mole of creatine kinase.

The dissociation constants for the nucleotide-phosphagene kinase complexes derived from spectral titration data are similar to those obtained from kinetic studies.

2. The binding of creatine to creatine kinase provides no difference spectrum. But a specific one accompanies the binding of L-arginine and L-arginine phosphate to arginine kinase with tyrosyl peaks at 280 and 287 m μ and a hypochromic phase at 239 m μ .

3. Identical difference spectra are also obtained with various hydrophobic L-amino acids such as isoleucine, valine, etc., suggesting interaction between the enzyme active site and the structure $-\text{HC}(\overset{\alpha}{\text{COOH}})\text{NH}_2$ of the studied derivatives. This fact is supported by the protecting effect afforded by the above amino acids against sulphydryl reagents inhibition. On the other hand, alkylation of arginine kinase with iodoacetamide provides a difference spectrum showing the tyrosyl peaks produced with L-arginine and L-amino acids. The S-carboxymethyl enzyme fails to bind arginine or amino acids while it still reacts with nucleotides.

These experiments suggest that the process of binding L-arginine and some L-amino acids to the arginine kinase active site involves the interaction of the essential sulphydryl group with the $-\text{HC}(\overset{\alpha}{\text{COOH}})\text{NH}_2$ function of these compounds.

Abréviation: DTNB, acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque.

INTRODUCTION

Les nombreuses études cinétiques faites jusqu'à présent ont démontré que le véritable substrat nucléotidique des ATP:guanidine phosphotransférases (EC 2.7.3) est constitué par le complexe ATP-Mg ou ADP-Mg (bibl. 1). Mais, si le mode de fixation de ce complexe est bien étudié dans le cas de la créatine kinase², aucune investigation similaire n'a été effectuée sur l'arginine kinase. D'autre part le rôle, déterminant ou non, du métal au cours de cette fixation reste, d'une façon générale, peu connu.

Par ailleurs, il a été supposé que le groupement sulfhydryle réactif et essentiel à l'activité de l'arginine phosphotransférase (EC 2.7.3.3) sert à fixer le groupement guanidique du substrat³. Nous avons pensé que l'étude, au moyen de la spectrophotométrie différentielle⁴, des interactions des phosphagènes kinases avec leurs substrats permettrait de saisir les variations structurales de l'enzyme provoquées séparément par chacun d'eux, sans l'interférence des autres substrats ou des produits de la réaction.

Les résultats que nous rapportons dans ce mémoire ont été obtenus au cours de l'étude de l'arginine kinase de muscle de homard et de la créatine kinase de muscle de lapin (EC 2.7.3.2). Les modifications spectrales provoquées par l'ATP et l'ADP ne sont pas affectées par la présence de Mg²⁺. En outre, les changements de spectre engendrés par la fixation de l'arginine et de différents analogues sur l'arginine kinase paraissent refléter des altérations spécifiques localisées au niveau du groupe -SH essentiel de l'enzyme.

MATÉRIEL

L'ATP sel de sodium et l'ADP sel de lithium (Calbiochem), chromatographiquement purs, sont employés en solution aqueuse neutralisée par NaOH 1 M.

Les dérivés guanidiques (L- et D-arginine, créatine, agmatine) ainsi que les L- ou D-aminoacides employés sont des produits purs d'origine commerciale; ils sont également utilisés en solution aqueuse neutralisée si nécessaire. L'acide arginique est recristallisé dans l'éthanol à partir du produit commercial (Fluka); le guanidinobutane ainsi que l'acide guanidinovalérianique sont synthétisés par amidination au moyen de la S-méthylisothiourée⁵.

L'arginine phosphate et le créatine phosphate sont préparés comme il a été décrit^{6,7}.

L'iodoacétamide (Calbiochem) et l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) (Aldrich Chemicals) sont des produits purs. La solution de DTNB est préparée dans le tampon phosphate 0.01 M (pH 7.3), à la concentration de 10⁻³ M.

L'arginine phosphokinase est obtenue suivant la méthode de DER TERROSSIAN *et al.*⁸. Son activité spécifique est de 230.

La créatine kinase cristallisée est préparée selon le procédé B de KUBY ET NODA⁹. L'enzyme obtenu possède une activité spécifique de 70-80.

MÉTHODES

La concentration protéique est déterminée spectrophotométriquement à 280 mμ en prenant un coefficient d'absorption $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 8.8$ pour la créatine kinase¹⁰ et 8.1 pour l'arginine kinase.

La molarité des solutions enzymatiques est calculée d'après les poids moléculaires suivants : créatine kinase = 81 000 (bibl. 10) ; arginine kinase = 43 000 (bibl. 11), obtenus par ultracentrifugation.

La concentration en ADP et ATP est mesurée d'après l'absorption à 259 m μ et à pH 7 ($1.54 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (bibl. 12).

Les spectres d'absorption en ultraviolet et les spectres différentiels sont réalisés, à la température ordinaire, au moyen du spectrophotomètre Cary 15. Nous utilisons soit des semi-microcuves en quartz de 1 cm de trajet optique pour les dosages, soit des cuves en quartz à double compartiment de 0.4375 cm de trajet optique pour les spectres de différence. Ces derniers sont obtenus en utilisant l'expansion d'échelle.

Spectres différentiels

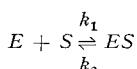
Les modifications spectrales produites par les substrats ou leurs analogues ainsi que par l'iodoacétamide sur les phosphokinases étudiées sont suivies par la méthode des spectres de double différence décrite par THEORELL ET YONETANI⁴. Dans ces essais, l'arginine kinase et la créatine kinase sont utilisées à la concentration finale de 1 à 2 mg/ml dans le tampon Tris-acétate 0.1 M, au pH optimum de la réaction de transphosphorylation : à pH 8.5, nous avons étudié l'interaction de ces deux enzymes avec l'ATP-Mg d'une part, leurs substrats guanidiques ainsi que divers analogues d'autre part ; à pH 7.15 celle avec l'ADP-Mg et les phosphagènes. Afin d'étudier l'influence du pH, des spectres sont également tracés à pH 7.15 pour l'ATP-Mg et l'arginine, et à pH 8.5 pour l'ADP-Mg. Enfin, des expériences de fixation des nucléotides en l'absence de magnésium sont réalisées dans les mêmes conditions, mais en présence d'EDTA 10^{-4} M pour éliminer les métaux libres.

Spectre différentiel de l'arginine kinase alkylée par l'iodoacétamide

La réaction est effectuée dans les cuves à double compartiment. 1.2 ml d'arginine kinase à la concentration de 1.5 mg/ml dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15), sont traités par 60 μl d'une solution d'iodoacétamide $3 \cdot 10^{-2}$ M dans un compartiment de la cuve essai. La lecture est faite simultanément contre témoins enzyme, d'une part, et iodoacétamide $1.5 \cdot 10^{-3}$ M dans le même tampon, d'autre part. Le spectre différentiel est suivi dans le temps et, parallèlement, des quantités aliquotes de protéines sont prélevées et l'activité résiduelle mesurée dans les conditions déjà décrites¹⁴. Le nombre de groupements -SH dans l'enzyme totalement inhibé par l'iodoacétamide est dosé en présence et en absence d'urée 8 M par le DTNB selon le protocole déjà décrit¹⁵ après dialyse de la protéine (24 h à 4° contre tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.2)).

Analyse des spectres

La fixation des substrats sur l'enzyme est étudiée à l'équilibre de la réaction :



A cet effet, nous traçons un réseau de spectres pour différentes concentrations en substrat. Ayant choisi dans le spectre un maximum d'absorption, nous exprimons les valeurs correspondantes suivant la représentation de LINEWEAVER ET BURK¹³, ce qui nous permet de déterminer la constante apparente de dissociation (K_D). La constante d'affinité vraie (K_s) est connue d'après la relation liant K_s à K_D : $K_s = K_D - E_0 n/2$ où E_0

représente la concentration molaire en enzyme total et n le nombre de sites de fixation. La représentation suivante mise au point par PANTALONI ET IWATSUBO (communication personnelle) permet de déterminer le nombre de sites: $1/I - X = f(c/X)$ où X est le pourcentage d'effet du substrat sur l'enzyme à la longueur d'onde choisie (100% d'effet correspond à la saturation de l'enzyme par le substrat), c étant la concentration molaire du substrat.

RÉSULTATS

Spectres différentiels des complexes enzyme-substrat

Enzyme-nucléotide. L'ADP-Mg à pH 7.15, c'est-à-dire au pH optimum de la réaction inverse, donne en présence des deux enzymes (arginine kinase et créatine kinase) des spectres différentiels révélant les caractéristiques suivantes: deux maxima à $295 \text{ m}\mu$ et à $278 \text{ m}\mu$ et un minimum à $254 \text{ m}\mu$ (Fig. 1A). Ce spectre peut être comparé

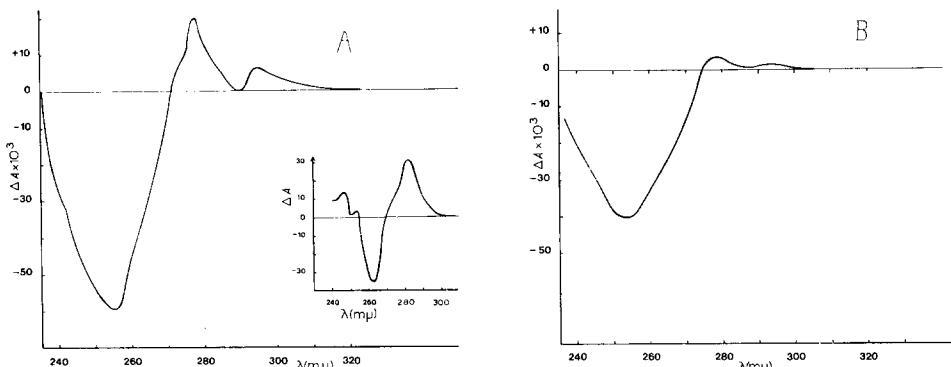


Fig. 1. Spectre de différence des complexes arginine phosphokinase-substrats nucléotidiques. A. Effet de ADP-Mg:ADP = acétate de magnésium $= 1.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, arginine kinase $3.8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15). A droite de la figure, spectre différentiel de pH pour l'ADP-Mg ($1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$), pH 1.6 contre pH 6.7. B. Effet de ATP-Mg:ATP = acétate de magnésium $= 3.4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, arginine kinase $3.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 8.5).

au spectre différentiel de pH (pH 6.7 contre pH 1.6) de l'ADP-Mg (Fig. 1A, à droite). A pH 8.5 nous obtenons pour l'ADP-Mg un spectre analogue, mais le pic à $278 \text{ m}\mu$ présente une amplitude plus faible.

Par contre, l'ATP-Mg à pH 8.5 ou 7.15 produit en se fixant sur les deux phosphogène kinases des spectres présentant uniquement le minimum à $254 \text{ m}\mu$ (Fig. 1B). En l'absence de métal les nucléotides employés sur l'arginine kinase donnent des spectres différentiels identiques à ceux décrits précédemment et qui, pour cette raison, ne sont pas représentés séparément ici.

Enzyme-substrat guanidique. La créatine kinase mise en présence de la créatine à pH 9 ou du créatine phosphate à pH 7.15 ne révèle aucune modification spectrale, même en présence de fortes concentrations en substrat ($4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$) ou après préincubation de l'enzyme avec l'ADP-Mg.

Les substrats de l'arginine kinase:L-arginine (pH 8.5) et L-arginine phosphate

(pH 7.15) présentent, au contraire, des spectres ayant des caractéristiques identiques deux minima situés à 287 et 279 m μ et un autre minimum vers 239 m μ (Fig. 2A). Le rapport $A_{287 \text{ m}\mu}/A_{239 \text{ m}\mu}$ est peu différent de 0.3. Enfin la L-arginine et le L-arginine phosphate ajoutés successivement à l'enzyme en concentrations saturantes ne provoquent pas d'effets spectraux additifs (Fig. 2B).

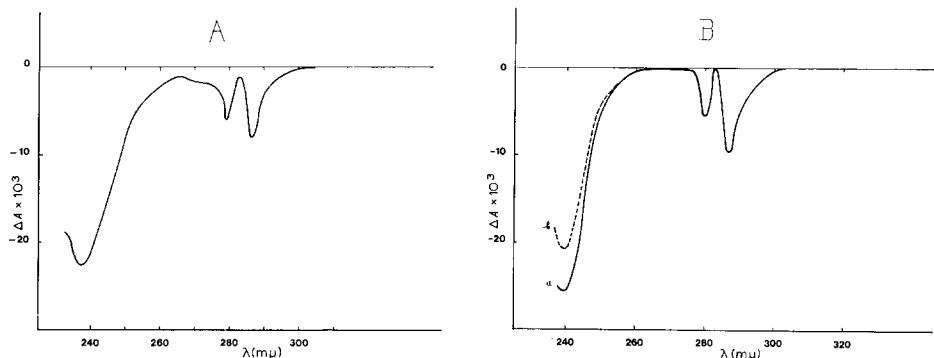


Fig. 2. Spectres de différence des complexes arginine kinase-substrats guanidiques. A. Interaction de la L-arginine ($2.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) avec l'arginine kinase $3.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 8.5). B. Fixation compétitive de la L-arginine et du L-arginine phosphate sur l'arginine kinase. Enzyme $3.8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15) mis en présence de L-arginine $3.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (spectre a), puis de L-arginine phosphate $3.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (spectre b).

Enzyme-analogue de substrat. Si différents dérivés guanidiques tels que la D-arginine, l'acide arginique, l'acide guanidinovalérianique et le guanidinobutane ne présentent aucun spectre différentiel de fixation sur l'arginine kinase, des L-aminoacides tels que la L-isoleucine, la L-valine, la L-norleucine, la citrulline et l'ornithine

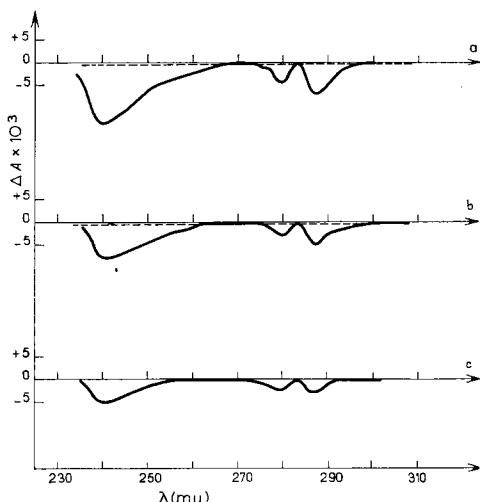


Fig. 3. Spectres différentiels de l'interaction entre l'arginine kinase et divers acides aminés. Enzyme $4.6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 8.5) + acides aminés $9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. a. Isoleucine. b. Valine. c. Citrulline. —, dérivés L; ----, dérivés D.

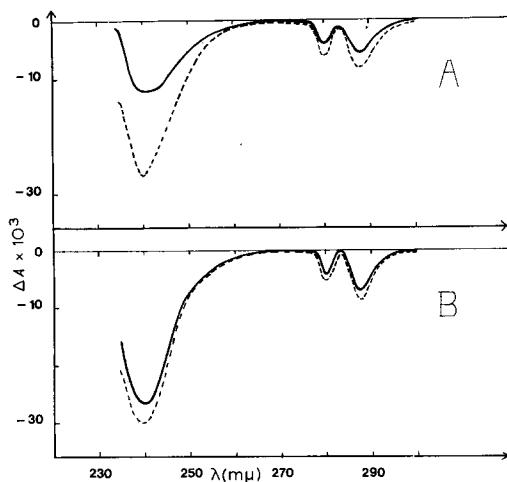


Fig. 4. Spectres différentiels de la fixation compétitive de la L-arginine et de la L-isoleucine sur l'arginine kinase. A. Addition de L-isoleucine $6.6 \cdot 10^{-3}$ M à l'enzyme $3.8 \cdot 10^{-5}$ M, puis de L-arginine $4.2 \cdot 10^{-3}$ M. B. Addition de L-arginine $5 \cdot 10^{-3}$ M à l'enzyme $3.8 \cdot 10^{-5}$ M, puis de L-isoleucine $6.6 \cdot 10^{-3}$ M. Tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 8.5). ----, L-arginine; —, L-isoleucine.

présentent un spectre différentiel ayant les mêmes caractéristiques que celles décrites pour la L-arginine, l'amplitude des pics ainsi que le rapport $A_{287 \text{ m}\mu}/A_{239 \text{ m}\mu}$ étant variables suivant le dérivé employé (Fig. 3).

Par contre, les D-aminoacides correspondants ne présentent aucun phénomène de fixation.

Enfin, l'effet de la L-isoleucine sur l'arginine kinase est compétitif de celui dû à la L-arginine (Fig. 4).

Constantes d'affinité et nombre de sites

Nous avons étudié l'amplitude des spectres de fixation des nucléotides et de la L-arginine sur l'arginine kinase en fonction de la concentration en substrat. Nous en avons déduit les constantes d'affinité (K_s) de l'enzyme pour l'ADP-Mg (Fig. 5C), l'ATP-Mg (Fig. 5A) et la L-arginine (Fig. 5B), ainsi que celles pour l'ADP et l'ATP employés sans métal (Tableau I).

TABLEAU I

DÉTERMINATION DE LA CONSTANTE D'AFFINITÉ ET DU NOMBRE DE SITES (n) DANS L'ARGININE KINASE ET LA CRÉATINE KINASE

Substrat	λ (mμ)	K_s (mM)		n	
		Arginine kinase	Créatine kinase	Arginine kinase	Créatine kinase
ADP-Mg	254	0.065	0.043	1	2
	278		0.047		
ADP	254	0.074			
ATP-Mg	254	0.46	0.30	1	2
ATP	254	0.48			
L-Arginine	239	1.2			

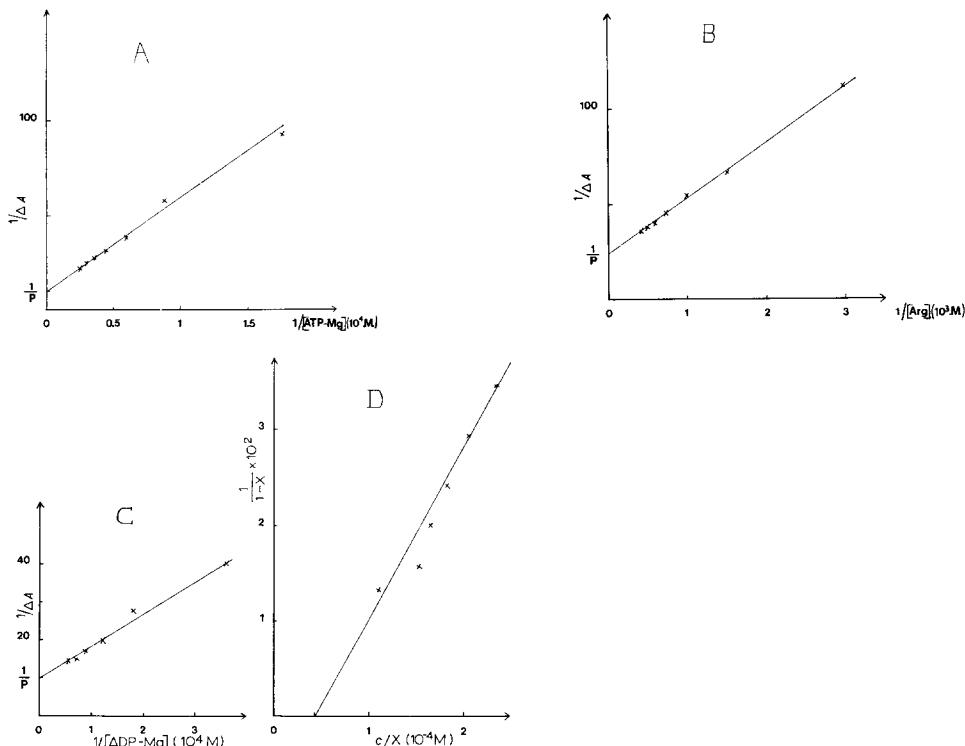


Fig. 5. Représentation selon LINEWEAVER ET BURK de la fixation des différents substrats sur l'arginine kinase. Nombre de sites. A. Fixation de l'ATP-Mg:enzyme $3.6 \cdot 10^{-5} M$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 8.5); ATP = acétate de magnésium aux concentrations indiquées. Lecture à $254 m\mu$. B. Fixation de la L-arginine: enzyme $3.6 \cdot 10^{-5} M$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 8.5); L-arginine aux concentrations indiquées. Lecture à $239 m\mu$. C. Fixation de l'ADP-Mg:enzyme $3.8 \cdot 10^{-5} M$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15); ADP = acétate de magnésium aux concentrations indiquées. Lecture à $254 m\mu$. D. Détermination du nombre de sites de fixation de l'ADP-Mg selon la relation $\frac{1}{1-X} = f(c/X)$.

En ce qui concerne la créatine kinase, seules les constantes d'affinité vis-à-vis de l'ADP-Mg et de l'ATP-Mg ont pu être déterminées (Tableau I, Fig. 6A).

Le nombre de sites de fixation des substrats a été également calculé et trouvé égal à 1 pour l'arginine kinase et à 2 pour la créatine kinase (Tableau II, Figs. 5D et 6B).

Alkylation de l'arginine kinase par l'iodoacétamide

Spectres différentiels de la S-carboxyméthyl arginine kinase en l'absence et en présence des substrats. La Fig. 7 montre que la fixation de l'iodoacétamide sur l'arginine kinase entraîne l'apparition d'un spectre différentiel identique par les minima à $287 m\mu$ et $279 m\mu$ à celui décrit pour la L-arginine, mais s'en différenciant par la présence d'un minimum à $257 m\mu$ suivi d'une très forte absorption aux plus courtes longueurs d'onde.

La Fig. 8 montre la relation qui existe entre la diminution de l'activité enzymatique en fonction du temps et l'augmentation de l'amplitude du minimum à $287 m\mu$. La valeur maximum de cette amplitude est obtenue au bout de 35 min et correspond à l'inactivation totale de l'enzyme.

Les dosages, par le DTNB en présence ou en l'absence d'urée, des groupements

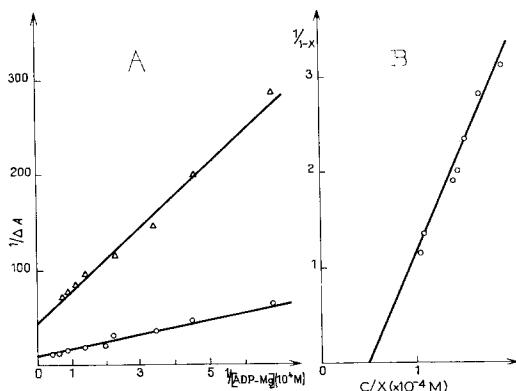


Fig. 6. Représentation selon LINEWEAVER ET BURK de la fixation de l'ADP-Mg sur la créatine kinase. A. Enzyme $2.9 \cdot 10^{-5} M$ dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15); ADP = acétate de magnésium aux concentrations indiquées; ○—○, lecture à $254 m\mu$; △—△, lecture à $278 m\mu$. B. Détermination du nombre de sites pour l'ADP-Mg selon la relation $1/1-X = f(c/X)$.

-SH restant dans l'enzyme inhibé par l'iodoacétamide montrent la disparition de 2 groupes -SH sur les 6 contenus dans l'enzyme natif.

Par ailleurs, la Fig. 9 montre que l'enzyme dont deux groupements -SH sont bloqués par l'iodoacétamide fixe toujours normalement l'ADP-Mg, mais qu'il est devenu inapte à fixer la L-arginine, le L-arginine phosphate ou la L-isoleucine.



Fig. 7. Spectre de différence de l'arginine kinase alkylée par l'iodoacétamide. Enzyme $3.5 \cdot 10^{-5} M$ traité par l'inhibiteur ($1.5 \cdot 10^{-3} M$) dans Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15). Spectre établi après 35 min de réaction à t° ordinaire.

Fig. 8. Relation entre l'inhibition et les modifications spectrales à $287 m\mu$ provoquées par l'alkylation de l'arginine kinase par l'iodoacétamide. Enzyme $3.5 \cdot 10^{-5} M$ traité par l'iodoacétamide ($1.5 \cdot 10^{-3} M$) dans le tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15). ○—○, variation dans le temps de l'amplitude du minimum à $287 m\mu$; ×—×, variation dans le temps de l'activité enzymatique mesurée en prélevant une partie aliquote et en mesurant le degré d'inactivation sur $0.2 \mu g$ de protéine.

Protection de l'arginine kinase par différents L-aminoacides contre l'inhibition par l'iodoacétamide et le DTNB. L'identité des spectres différentiels obtenus en mettant l'arginine kinase en présence de L-arginine, d'iodoacétamide ou des différents L-aminoacides déjà cités nous a conduits à étudier la protection de l'enzyme par ces derniers contre son inhibition par l'iodoacétamide ou le DTNB. Comme l'indique le Tableau II,

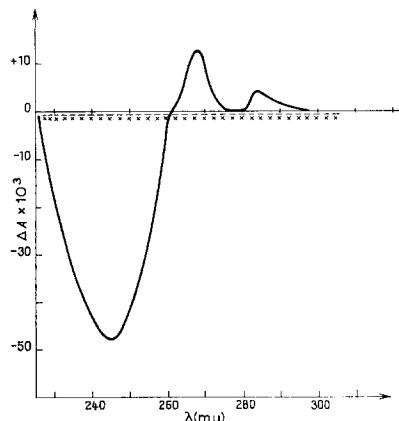


Fig. 9. Spectre différentiel de l'interaction des différents substrats avec la *S*-carboxyméthyl-arginine kinase. *S*-Carboxyméthyl protéine $3.5 \cdot 10^{-5}$ M dans tampon Tris-acétate 0.1 M (pH 7.15); spectres établis en présence d'ADP = acétate de magnésium $= 8.3 \cdot 10^{-5}$ M (—), de L-arginine $3.3 \cdot 10^{-3}$ M (---) et de L-arginine phosphate $3.3 \cdot 10^{-3}$ M (×××).

TABLEAU II

PROTECTION DE L'ARGININE KINASE PAR DIVERS ANALOGUES DE SUBSTRAT CONTRE L'INHIBITION PAR LE DTNB ET L'IDOACÉTAMIDE

L'enzyme 0.3–0.4 µg est préincubé 5 min à 25° avec le dérivé choisi 10^{-2} M dans le tampon glycine-soude 0.2 M (pH 8.5); au mélange on ajoute l'inhibiteur (DTNB $2.5 \cdot 10^{-7}$ M; iodoacétamide 10^{-3} M) et au bout de 20 min la L-arginine 10^{-2} M. La réaction est amorcée par l'ATP-Mg $5 \cdot 10^{-3}$ M. Incubation 15 min à 25°.

Substrats	Inhibiteur employé	
	DTNB	Iodoacétamide
% de protection		
<i>Dérivés guanidiques</i>		
L-Arginine	62	80
Agmatine		0
Acide arginique	0	
Guanidinobutane	0	
<i>Acides amines série L</i>		
Isoleucine	49	41
Valine	39	30
Norleucine	37	
α-Alanine	31	
Norvaline	30	
Citrulline	28	
Leucine	27	
Lysine	27	
Ornithine	20	
Asparagine	18	
Acide aspartique	5	
<i>Acides aminés série D</i>		
Arginine	0	2
Alloisoleucine	0	3
Valine	0	0

les acides aminés de la série L essayés, en particulier ceux possédant une chaîne latérale hydrophobe, comme l'isoleucine, assurent une protection notable quoique inférieure à celle observée avec le substrat guanidique, la L-arginine. Par contre, les dérivés correspondants de la série D et les composés guanidiques dépourvus de α -COOH ou de α -NH₂ sont sans effet.

DISCUSSION

Fixation des substrats nucléotidiques

L'ATP et l'ADP libres ou liés au magnésium donnent chacun des spectres identiques en présence d'arginine kinase et de créatine kinase (Fig. 1). Cependant le spectre correspondant à la fixation de l'ADP ou de l'ADP-Mg est différent de celui donné par l'ATP ou l'ATP-Mg.

Il est intéressant de noter la similitude existant entre le spectre différentiel produit par le complexe enzyme-ADP et celui de l'ADP-Mg seul établi à pH 1.6 contre pH 6.7; dans ce dernier cas, l'effet spectral observé est dû à la protonation du noyau adénine¹⁶.

L'effet de la fixation de l'ADP sur les deux enzymes s'est traduit par un déplacement de la bande d'absorption du nucléotide vers les grandes longueurs d'onde (red shift). La contribution spécifique de la molécule enzymatique est illustrée, d'une part, par l'inégalité des pics à 278 m μ et 254 m μ et, d'autre part, par l'apparition d'un pic vers 294 m μ , qui pourrait être dû à un changement de conformation mettant en évidence un résidu tryptophane.

La formation du complexe ADP-phosphagène kinase produit des changements spectraux semblables à ceux décrits au cours de l'interaction de l'ADP, l'ADP-ribose et le NAD avec l'alcool deshydrogénase⁴ et la glutamate deshydrogénase¹⁷.

L'interaction des phosphokinases avec l'ATP ou l'ATP-Mg permet d'obtenir un spectre caractéristique dont le minimum dans la région de 254 m μ traduit surtout une diminution de l'absorption du noyau adénine. La différence observée entre les spectres ATP- et ADP-enzyme traduit la formation de complexes enzyme-substrat différents bien que ces derniers se fixent sur un même site^{4,18}.

Les valeurs des constantes de dissociation (K_s) de l'ADP-Mg sont pour les deux enzymes plus faibles que celles déterminées pour l'ATP-Mg (Tableau I). Dans le cas de la créatine kinase, les valeurs trouvées sont très peu différentes de celles obtenues par d'autres méthodes¹. L'arginine kinase donne les mêmes constantes en l'absence ou en présence de métal. Ce fait indique que l'ion Mg²⁺ n'est pas indispensable à la fixation des nucléotides à l'enzyme ou qu'il ne modifie pas d'une façon sensible la structure de ce dernier.

Les mesures effectuées à partir des spectres de différence montrent que les deux enzymes présentent 1 site de fixation des substrats nucléotidiques par 40 000 g de protéine. Ce résultat est identique à celui trouvé, pour la créatine kinase, par d'autres méthodes physiques. Il a été déjà démontré que les deux enzymes possèdent, par unité de 40 000 g de protéine, le même nombre de résidus essentiels^{1,3,15,19,20}.

Fixation des substrats guanidiques et de leurs analogues

La fixation des substrats guanidiques permet de différencier nettement ces deux phosphagène kinases. Alors que la créatine kinase, en présence de créatine employée

seule à très forte concentration ($4 \cdot 10^{-2}$ M) ou en présence d'ADP-Mg qui favorise la fixation de ce guanidique²¹, ne donne aucune modification de spectre, l'arginine kinase fixe la L-arginine ou le L-arginine phosphate en produisant un spectre différentiel caractéristique (Fig. 2A). On observe deux modifications principales: 2 pics à 287 et 280 m μ , dus à un déplacement vers les courtes longueurs d'onde de la bande d'absorption de la tyrosine (blue shift), d'une part, et un minimum de plus forte amplitude à 239 m μ , d'autre part. Calculée à partir de l'absorption à 239 m μ , la constante d'affinité (K_s) de la L-arginine est égale à $1.2 \cdot 10^{-3}$ M, valeur identique à celle obtenue par des mesures cinétiques¹⁸.

Afin de distinguer les groupements du substrat qui déterminent les modifications spectrales observées, nous avons étudié l'interaction de différents composés guanidiques et acides aminés possédant une ou deux des fonctions principales de la molécule. La phospho-L-arginine donne un spectre identique non additif à celui de la L-arginine, mais la D-arginine, l'acide arginique, l'agmatine ne déterminent aucun changement de spectre. Les spectres obtenus avec les acides aminés de la série L, à chaîne latérale hydrophobe, sont identiques à celui observé avec la L-arginine; ce fait indique que les modifications spectrales provoquées par le substrat naturel sont dues essentiellement à l'interaction de la structure $-\text{HC}(\text{NH}_2)\overset{\alpha}{\text{COOH}}$ avec l'enzyme. D'autre part, la longueur et l'hydrophobie de la chaîne hydrocarbonée renforcent cette interaction; celle-ci est d'une stéréospécificité stricte, puisque tous les dérivés de la série D sont inactifs (Figs. 3 et 4).

Rôle du groupe -SH dans la fixation du substrat guanidique

La présence dans le spectre différentiel de l'arginine kinase alkylée par l'iodoacétamide (Fig. 7) des deux pics caractéristiques de la tyrosine dont l'amplitude est proportionnelle à la baisse de l'activité (Fig. 8) suggère que la modification spectrale observée dans les complexes enzyme-L-arginine et enzyme-L-aminoacides est due à

l'interaction de la structure $-\text{HC}(\text{NH}_2)\overset{\alpha}{\text{COOH}}$ de ces molécules avec le groupe -SH essentiel de l'enzyme. Cette argumentation est renforcée par l'effet protecteur exercé par les L-aminoacides contre l'inhibition de l'enzyme par l'iodoacétamide ou le DTNB et qui, pour chaque dérivé, est proportionnel à l'amplitude de la modification spectrale qu'il produit (Tableau II). L'implication du groupement thiol essentiel dans la fixation de

la L-arginine et des L-aminoacides du côté $-\text{HC}(\text{NH}_2)\overset{\alpha}{\text{COOH}}$ est démontrée aussi par l'absence de spectre différentiel quand on ajoute la L-isoleucine ou la L-arginine à la S-carboxyméthyl arginine kinase, alors que l'ADP-Mg continue à réagir normalement (Fig. 9).

L'absorption dans la région 280-287 m μ pourrait être due soit à un changement de conformation du site actif exposant un résidu tyrosine au milieu ambiant, soit à une rupture d'une liaison hydrogène liant l'oxygène de la tyrosine à un autre groupement de la protéine, soit enfin à l'interaction des groupements chargés des substrats avec le système électron π du noyau aromatique de la tyrosine²²; cette dernière supposition est improbable en raison de l'effet produit par l'iodoacétamide, molécule non chargée.

Enfin, l'identité des spectres différentiels arginine kinase-L-arginine, arginine kinase-L-isoleucine et arginine kinase-iodoacétamide démontre que le groupement

$-\text{SH}$ essentiel de cet enzyme, dont la réactivité a été décrite comme indépendante du pH (bibl. 3) et dont la modification par l'iodoacétamide³, le DTNB et la NEM¹⁵ inactive l'enzyme, est directement lié à la fixation de la structure $-\text{HC}\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array}$ du substrat guanidique et non à celle du groupement guanidique comme il avait été supposé³.

RÉSUMÉ

1. La formation de complexes entre phosphagène kinases (créatine kinase et arginine kinase) et leurs substrats nucléotidiques ou guanidiques a été étudiée par spectrophotométrie différentielle. En présence de l'ATP ou de l'ADP, les deux enzymes donnent des spectres de différence identiques, celui obtenu en présence d'ATP étant différent de celui de l'ADP; le premier correspond à une diminution de l'absorption du noyau adénine, le second à un déplacement de la bande d'absorption du nucléotide (red shift).

Les constantes d'affinité K_s ont été calculées à partir des variations d'amplitude des spectres, en fonction des concentrations de substrats. Le nombre de sites de fixation des nucléotides a été trouvé égal à 1 pour l'arginine kinase et à 2 pour la créatine kinase.

2. La fixation des substrats guanidiques permet de différencier ces deux phosphagène kinases. Alors que le complexe créatine kinase-créatine ne donne aucune modification de spectre, l'arginine kinase fixe la L-arginine ou le L-arginine phosphate en produisant un spectre différentiel caractérisé surtout par un "blue shift" de la tyrosine.

3. L'identité des spectres différentiels fournis par l'arginine kinase en présence d'acides aminés de la série L, à chaîne latérale hydrophobe (isoleucine, valine, etc.), avec celui obtenu en présence de L-arginine, suggère que les modifications spectrales sont dues à l'interaction du site actif de l'enzyme avec la structure $-\text{HC}\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array}$ de ces dérivés.

Ce fait est encore corroboré par l'effet protecteur des acides aminés de la série L essayés contre l'inhibition de l'enzyme par les réactifs des groupes $-\text{SH}$. L'un de ces derniers, l'iodoacétamide, alkyle la protéine en donnant un spectre différentiel en partie semblable à ceux obtenus avec l'arginine et les acides aminés de la série L; l'enzyme S-carboxyméthylé ne fixe plus l'arginine et les acides aminés, mais continue à réagir avec les nucléotides.

On peut en conclure que le groupement sulphydryle essentiel de l'arginine kinase est impliqué dans la fixation de la partie $-\text{HC}\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \diagup \\ \text{NH}_2 \end{array}$ de la molécule de L-arginine et de L-arginine phosphate.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme Ch. DUBORD de sa très précieuse collaboration technique.

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.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 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.
- 2 M. COHN ET J. S. LEIGH, *Nature*, 193 (1962) 1037.
- 3 R. VIRDEN ET D. C. WATTS, *Biochem. J.*, 99 (1966) 162.
- 4 H. THEORELL ET T. YONETANI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 106 (1964) 252.
- 5 E. SCHUTTE, *Z. Phys. Chem.*, 279 (1943) 52.
- 6 N. V. THIEM, N. V. THOAI ET J. ROCHE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 285.
- 7 L. A. PRADEL, N. V. THIEM, P. PIN ET N. V. THOAI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 41 (1959) 519.
- 8 E. DER TERROSSIAN, R. KASSAB, L. A. PRADEL ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 462.
- 9 S. A. KUBY, L. H. NODA ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 191.
- 10 S. A. KUBY, L. H. NODA ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 203.
- 11 N. V. THOAI, R. KASSAB ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 532.
- 12 R. M. BOCK, N. S. LING, S. A. MORELL ET S. H. LIPTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 253.
- 13 H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 14 L. A. PRADEL, R. KASSAB, F. REGNOUF ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 255.
- 15 R. KASSAB, L. A. PRADEL, E. DER TERROSSIAN ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 347.
- 16 R. F. FISHER, A. C. HAINE, A. T. MATHIAS ET B. R. RABIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 139 (1967) 169.
- 17 D. PANTALONI ET M. IWATSUBO, *Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 217.
- 18 M. L. UHR, F. MARCUS ET J. F. MORRISON, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 5428.
- 19 R. KASSAB, C. ROUSTAN ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 308.
- 20 L. A. PRADEL ET R. KASSAB, *Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 317.
- 21 G. JACOBS ET L. W. CUNNINGHAM, *Biochemistry*, 7 (1968) 143.
- 22 S. J. LEACH ET H. A. SHERAGA, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 2827.

Biochim. Biophys. Acta, 167 (1968) 326-338