

BBA 66488

EFFETS DE L'ATP ET DE LA PHOTO-OXYDATION SUR L'AGRÉGATION DE LA GLUCOKINASE MICROSOMIQUE DU FOIE DE RAT

GISÈLE BERTHILLIER* ET RENÉ GOT

Laboratoire de Biochimie, UER Lyon-Sud, B.P. 12, 69-Oullins (France)

(Réçu le 2 Août 1971)

SUMMARY

Effects of ATP and photooxidation on the aggregation of microsomal glucokinase of rat liver

Two hepatic glucokinases, GM1 and GM2, were previously found to be bound to the microsomal fraction. These enzymes have been purified, and, as assessed by gel filtration on a polyacrylamide column, their molecular weights are 120 000 for GM1 and 55 000 for GM2. The enzyme GM1 presents regulatory properties: ATP, besides being a substrate, is also a modifier which inhibits the enzyme by binding at a site probably different from the catalytic site. There is no inhibition by ATP in the presence of AMP, which has an antagonistic effect. In the same conditions, GM2 is not inhibited by an excess of ATP. Photooxidation of the glucokinase GM1, in the presence of methylene blue, is described. The enzyme GM1, after photooxidation, is insensitive to ATP inhibition, and its K_m for glucose (28 mM) is similar to this of GM2 (20 mM). The Hill coefficient of the enzyme GM1 is 2.8 before photooxidation, and is decreased to 1.2 after photooxidation, indicating disappearance of interactions between ATP sites. Gel filtration gives a molecular weight of 55 000 for the desensitized enzyme GM1. All these results suggest that GM1 should be the associated form of the enzyme, GM2 being the minimum fully active form that we have been able to detect. The association-dissociation of these two forms have been studied: ATP tends to favour the associated form GM1, experiments being carried out either on the mixture of the two enzymes, or on the isolated form GM2. So, ATP which has no inhibitory effect on the enzyme GM2, tends to transform this enzyme into the associated form GM1. The difference between these results can be explained by the lag shown by the transformation of GM2 into GM1: GM2 must be incubated 10 min at 30° or 1 h 50 min at 4° in the presence of 1 mM ATP before the association begins. This association is reversible: gel filtration, in the absence of ATP, of GM2 incubated 4 h at 4° in the presence of 1 mM ATP gives for the enzyme a molecular weight of 55 000, which corresponds to "native" GM2.

The regulatory properties are discussed, and compared to those of phosphofructokinase.

* Ce mémoire constitue une partie de la thèse de Doctorat-ès-Sciences Physiques qui sera soutenue par G. BERTHILLIER devant l'Université Claude Bernard de Lyon.

INTRODUCTION

A côté des hexokinases (EC 2.7.1.1) solubles à fort et faible K_m , le foie de rat contient une activité glucokinase (EC 2.7.1.2) liée aux microsomes. Après purification, cette activité se répartit, par filtration sur colonne de Biogel, en deux pics, GM1 et GM2, dont les poids moléculaires apparents sont respectivement 120 000 et 55 000 (réf. 1).

A des concentrations relativement faibles en Mg^{2+} , l'ATP se comporte comme un inhibiteur de GM1, la cinétique de phosphorylation du glucose devenant sigmoïdale; cette inhibition est levée par l'AMP. Dans les mêmes conditions, GM2 reste michaelien.

Ces résultats suggèrent que GM1 est un dimère qui possède les caractéristiques d'un enzyme régulateur². GM2 est alors le monomère et l'on serait en présence d'un équilibre monomère-dimère. Le but de ce travail est de vérifier cette hypothèse, de préciser le rôle joué par l'ATP et l'AMP dans cet équilibre et d'étudier l'action d'un facteur de désensibilisation, la photo-oxydation.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'activité glucokinase est purifiée selon la technique précédemment décrite¹, à partir des microsomes de foie de rat Wistar, pesant 250–300 g, nourris à volonté.

Les principales étapes de préparation sont les suivantes: solubilisation par le Triton X-100, fractionnement par le sulfate d'ammonium, chromatographie sur DEAE-Séphadex, chromatographie sur DEAE-cellulose. A ce stade, les deux glucokinases GM1 et GM2 sont encore mélangées. C'est d'ailleurs ce mélange qui est utilisé dans les essais effectués en vue d'étudier l'équilibre des deux formes.

La dernière étape de purification consiste en une filtration sur colonne de Biogel "P 225", qui permet de séparer les deux enzymes. Les analyses portant sur les enzymes isolés sont effectuées sur les fractions correspondant au sommet des deux pics.

Dans tous les cas, les fractions actives sont concentrées par filtration sous vide à travers une ultragaine Schleicher et Schüll et conservées à 4° en solution saturée en sulfate d'ammonium.

L'activité glucokinase est dosée en suivant la formation de glucose-6-phosphate³ dans un spectrophotomètre enregistreur Beckman DB thermostaté à 30° (température prise dans les cuves). Le milieu réactionnel d'un volume total de 3 ml contient: Tris-HCl (80 mM), pH 8.1, (pour GM1) ou 8.4 (pour GM2), NADP⁺ (0.55 mM), glucose-6-phosphate déshydrogénase (0.05 unité), 6-phosphogluconate déshydrogénase (0.05 unité), EDTA (0.01 mM), 2-mercaptoéthanol (0.01 mM), ATP et $MgCl_2$ (en concentrations variables selon les expériences.) La solution enzymatique est ajoutée sous un volume de 5–100 μ l suivant les expériences. La réaction est initiée par addition de glucose (de 20 à 120 mM); la cinétique est enregistrée durant 5 min à 340 nm sur l'enregistreur 10 pouces, la partie linéaire de la courbe étant prise comme vitesse initiale.

Les études d'équilibre monomère-dimère sont réalisées: (a) soit par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5–20%) selon la technique de MARTIN ET

AMES⁴, avec la glucose-6-phosphate déshydrogénase (poids mol. = 110 000) et l'hémoglobine (poids mol. = 68 000) comme étalons; (b) soit par filtration sur colonne de Biogel "P 225" préalablement étalonnée avec le bleu Dextran, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la serumalbumine bovine (poids mol. = 65 000), la pepsine (poids mol. = 35 000), la trypsine (poids mol. = 23 800) et le cytochrome *c* (poids mol. = 12 500).

Dans toutes ces expériences, le tampon utilisé est un tampon Tris-HCl (0.02 M), pH 8, contenant EDTA (4 mM), 2-mercaptoéthanol (4 mM), glucose (5 mM), ATP et $MgCl_2$ (en concentrations variables selon les essais). La quantité d'enzyme récupéré n'est ja mais inférieure à 60% de la quantité d'enzyme déposé initialement sur le gradient ou sur la colonne. Les essais de désensibilisation sont effectués selon la technique de photo-oxydation utilisée par AHLFORS ET MANSOUR⁵ sur la phosphofructokinase du coeur de mouton.

RÉSULTATS

Modification de l'équilibre GM1/GM2

A l'état natif, à l'issue de la méthode de purification, le mélange GM1-GM2 contient une proportion plus importante de GM2, comme le montrent l'ultracentrifugation de zone (Fig. 1a) et la filtration sur colonne de Biogel (Fig. 2a).

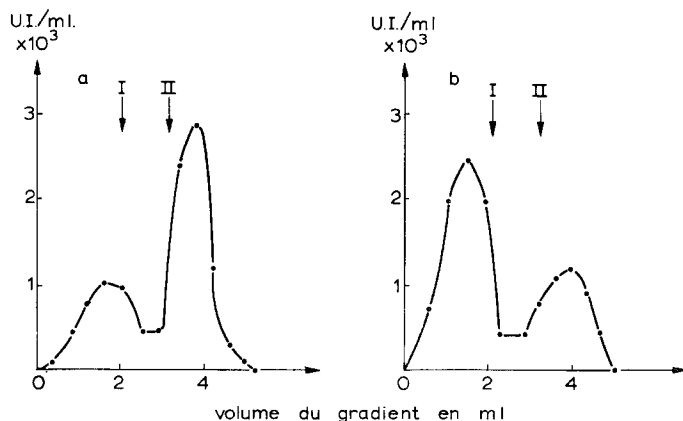


Fig. 1. Ultracentrifugation en gradient de saccharose (5–20%) 14 h à 38 000 tours/min dans le rotor SW 39 (ultra-centrifugeuse Spinco). Tampon Tris 0.02 M, pH 8, contenant EDTA 4 mM, mercaptoéthanol 4 mM, glucose 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM. En ordonnée, activité glucokinase de chaque fraction ponctionnée au fond du tube. Les flèches indiquent la position de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (I) et de l'hémoglobine (II). (a) Mélange natif sans ATP. (b) En présence d'une concentration millimolaire en ATP. Le premier pic d'activité correspond à GM1, le deuxième à GM2.

Si ce même mélange est analysé par ces deux techniques, en présence d'une concentration de 1 mM en ATP et 1 mM en $MgCl_2$, la proportion de GM1 devient nettement plus élevée que celle de GM2 (Figs. 1b, 2b).

Si l'on effectue alors les mêmes expériences en présence d'AMP (concentration 1 mM), on retrouve les proportions du mélange natif, que l'ATP soit ou non présent (Fig. 3).

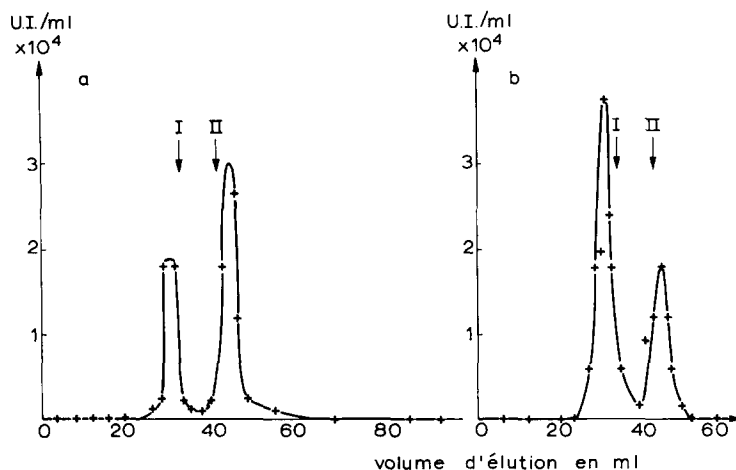


Fig. 2. Chromatographie sur colonne de Biogel équilibrée contre le même tampon que dans les expériences d'ultra-centrifugation. Ordonnée: activité glucokinase de chaque fraction. Les flèches indiquent la position de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (I) et de la serum albumine (II). (a) Mélange natif sans ATP. (b) En présence d'une concentration millimolaire en ATP. Le premier pic d'activité correspond à GM1, le deuxième à GM2.

Ainsi, l'ATP, qui exerce un effet coopératif sur GM1, agit également sur le mélange GM1-GM2 en déplaçant l'équilibre vers GM1. L'AMP, qui joue un rôle antagoniste, ne modifie pas, lui-même, l'équilibre et n'intervient que pour s'opposer à l'action de l'ATP.

Signalons que si l'on remplace l'ATP par son analogue structural, le β,γ -méthylène ATP, la composition du mélange GM1-GM2 reste inchangée.

Effet de la photo-oxydation

Les études cinétiques portant sur la glucokinase GM1 ayant subi ou non la photo-oxydation, sont résumées dans les Figs. 4 et 5.

Le dosage de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en ATP

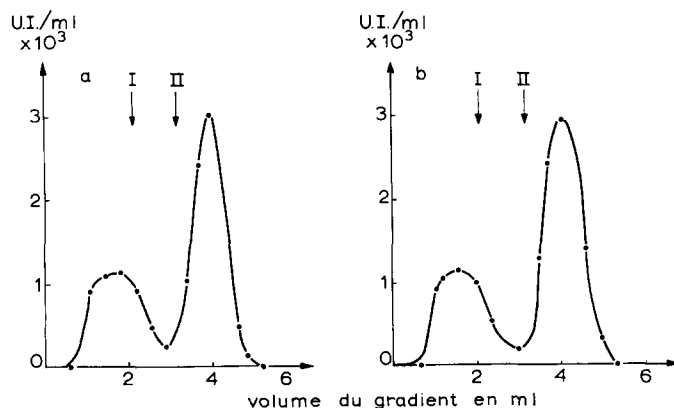


Fig. 3. Ultra-centrifugation effectuée sur le mélange natif des glucokinases GM1 et GM2 dans les mêmes conditions que pour la Fig. 1. (a) En présence d'AMP 1 mM. (b) En présence d'AMP 1 mM et d'ATP 1 mM.

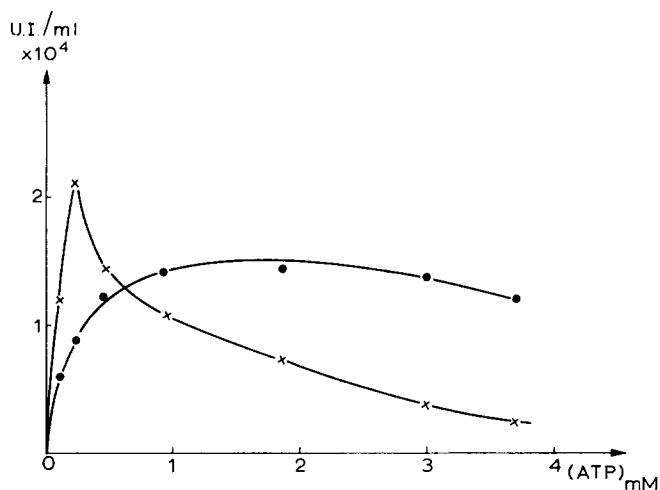


Fig. 4. Variation de la vitesse de phosphorylation du glucose par la glucokinase GM1 en fonction de la concentration en ATP. Le milieu d'incubation contient, en plus des réactifs précisés au paragraphe MATÉRIEL ET MÉTHODES: glucose 30 mM, MgCl_2 0.5 mM. \times — \times , GM1 en présence de bleu de méthylène; ●—●, GM1 après photo-oxydation.

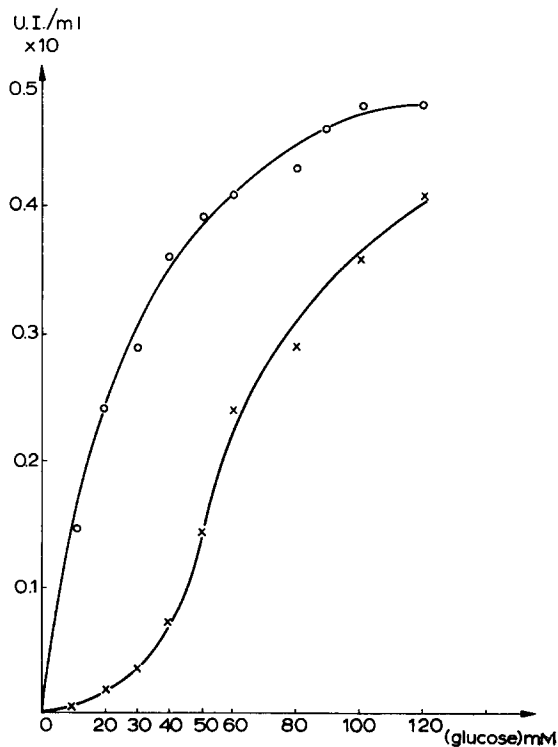


Fig. 5. Variation de la vitesse de phosphorylation du glucose par la glucokinase microsomique GM1 en fonction de la concentration en glucose. Le milieu d'incubation contient en plus des réactifs précisés au paragraphe MATÉRIEL ET MÉTHODES: MgCl_2 1 mM, ATP 0.5 mM. \times — \times , GM1 en présence de bleu de méthylène; ○—○, GM1 après photo-oxydation.

permet de retrouver la courbe d'inhibition typique lorsque l'on est en présence du bleu de méthylène seul. Cette courbe a été réalisée à titre de témoin. Au delà d'une concentration de 0.3 mM, l'ATP devient inhibiteur.

Au contraire, l'ATP n'inhibe plus l'enzyme photo-oxydé (Fig. 4), sauf pour des concentrations supérieures à 8 mM (valeurs non portées sur la figure).

Le bleu de méthylène et l'illumination sont nécessaires à la désensibilisation.

La courbe de dosage de l'activité glucokinasique en fonction de la concentration en glucose est toujours une courbe d'ordre supérieur à 1, en présence de bleu de méthylène.

Après photo-oxydation, la cinétique redevient michaelienne (Fig. 5), le K_m correspondant à une valeur de 28 mM voisine de celle obtenue sur GM2.

Si l'on utilise la représentation de Hill, on obtient deux droites (Fig. 6) dont

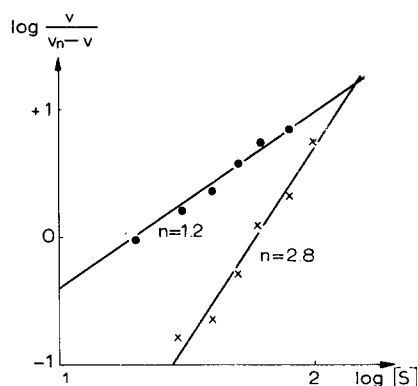


Fig. 6. Cinétiques de la Fig. 5 dans la représentation de Hill. $\times - \times$, GM1 en présence de bleu de méthylène; $\bullet - \bullet$, GM1 après photo-oxydation.

les pentes donnent le coefficient de Hill, n , qui permet d'évaluer la coopérativité. Ce coefficient est 2.8 avant photo-oxydation et 1.2 pour l'enzyme photo-oxydé.

Ces résultats confirment que la photo-oxydation a aboli les propriétés coopératives de GM1.

Le fait que l'enzyme désensibilisé présente un K_m voisin de GM2 amène à supposer que l'action de la photo-oxydation est, en fait, une action dépolymérisante. Cette hypothèse a été vérifiée par filtration sur colonne de Biogel de l'enzyme GM1 avant et après photo-oxydation. La Fig. 7 montre que l'enzyme GM1, après photo-oxydation, est effectivement élué de la colonne en même temps que GM2.

Etude du passage du monomère au dimère

Dans un travail antérieur², nous avons montré par des dosages effectués extemporanément, que l'ATP était sans action sur GM2. Or, les résultats exposés ci-dessus amènent à conclure que l'ATP induit la transformation du monomère GM2 en dimère GM1. Il existe donc une apparente contradiction entre ces deux conclusions.

Une explication plausible serait que ce passage du monomère au dimère, sous l'influence de l'ATP, présente une latence. En effet, les ultracentrifugations ou les filtrations sur gel demandent plusieurs heures, pendant lesquelles GM2 reste en

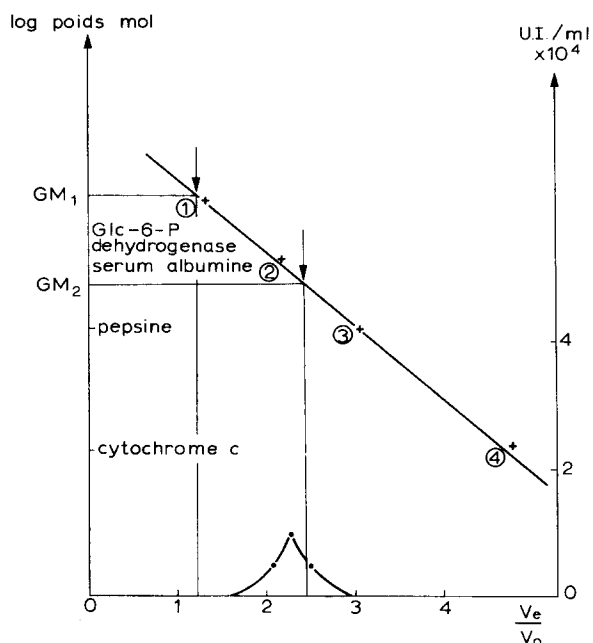


Fig. 7. Chromatographie de GM1 après photo-oxydation sur colonne de Biogel, effectuée dans les mêmes conditions que pour la Fig. 2. En ordonnée, activité glucokinase de chaque fraction. En abscisse, rapport V_e/V_o entre le volume d'élution et le volume d'exclusion. La droite représente la courbe d'étalonnage de la colonne, $\log \text{ poids mol.} = f(V_e/V_o)$. (1) Glucose-6-phosphate déshydrogénase, poids mol. = 110 000; (2) sérum albumine, poids mol. = 65 000; (3) pepsine, poids mol. = 35 000; (4) cytochrome c, poids mol. = 12 500.

contact avec l'ATP, alors que les dosages effectués au cours des études cinétiques limitent ce contact à quelques minutes.

La courbe d'élution représentée sur la Fig. 8 confirme que GM2, filtré sur colonne de Biogel en présence d'une concentration de 1 mM en ATP, est transformé en GM1. Or cette filtration demande une douzaine d'heures; nous avons donc incubé GM2 pendant 12 h à 4°, avec l'ATP (1 mM), puis effectué son dosage en présence de quantités croissantes d'ATP. L'enzyme présente alors une courbe d'inhibition sensiblement identique à celle obtenue pour GM1 (Fig. 4), avec toutefois une inhibition plus importante aux fortes concentrations en ATP; de plus, sa courbe d'activité en fonction de la concentration en glucose devient d'ordre supérieur à 1 (Fig. 9).

Nous avons alors déterminé le temps de latence existant pour la transformation $\text{GM2} \rightarrow \text{GM1}$ sous l'action de l'ATP. Pour ce faire, GM2 a été incubée en présence d'une concentration de 1 mM en ATP et dosée à des intervalles de temps successifs. Puisque l'ATP est sans action sur l'activité de GM2, mais inhibe GM1, on peut admettre que la perte d'activité de GM2, observée par rapport à un témoin incubé dans les mêmes conditions, mais sans ATP, est la preuve de la transformation $\text{GM2} \rightarrow \text{GM1}$.

La Fig. 10 donne les résultats obtenus pour des incubations réalisées à 4° et à 30°. Le temps de latence est alors de 1 h 50 min à 4° et de 10 min à 30°, si l'on se réfère au début de la transformation.

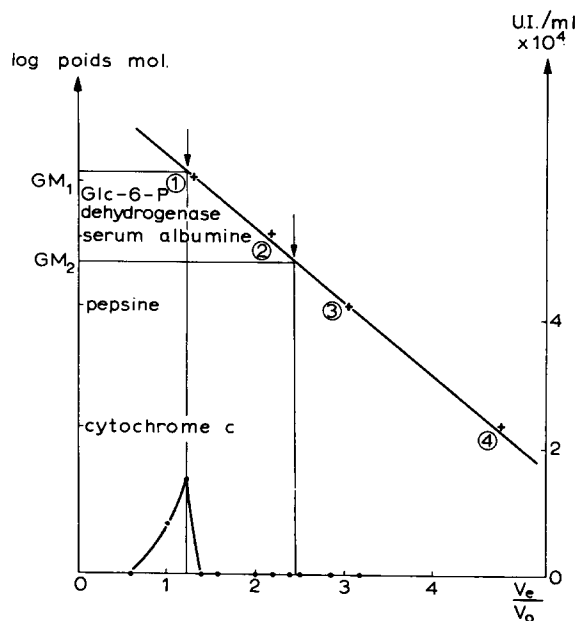


Fig. 8. Chromatographie de GM2 sur colonne de Biogel (cf. Fig. 7) équilibré à une concentration millimolaire en ATP.

Un dernier point restait à préciser: la transformation $GM2 \rightarrow GM1$ est-elle réversible? Un mélange natif a donc été incubé pendant 4 h à 4° , temps suffisant pour transformer GM2 en GM1; puis il a été filtré sur une colonne de Biogel ne contenant

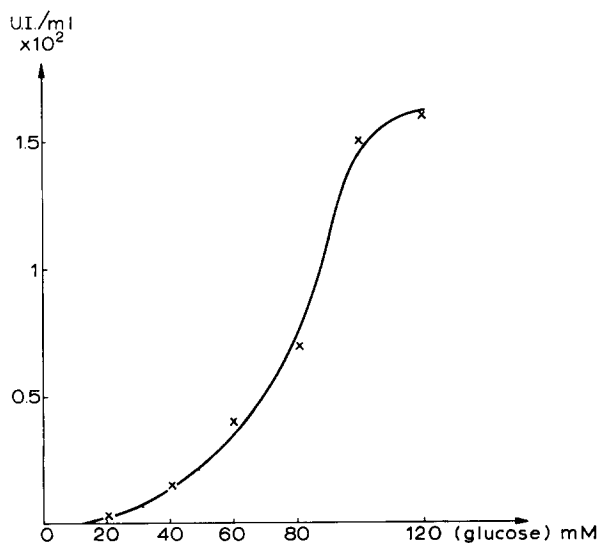


Fig. 9. Variation de la vitesse de phosphorylation du glucose par GM2 incubé 12 h à 4° en présence d'une concentration millimolaire en ATP. Mêmes conditions que dans la Fig. 5.

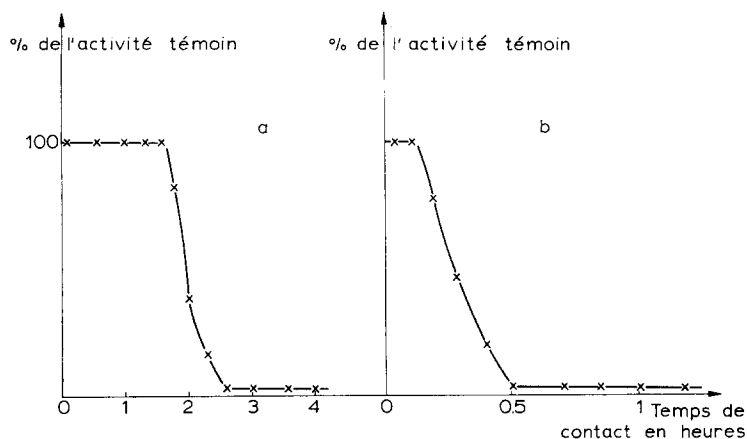


Fig. 10. Détermination du temps de passage de GM2 à GM1 par incubation dans le tampon "Tris" contenant ATP 1 mM. Ordonnée: activité de phosphorylation exprimée en pour cent de l'activité initiale de GM2. (a) 4°. (b) 30°.

pas d'ATP: la répartition des enzymes dans les fractions effluentes se retrouve identique au mélange natif. Il semble donc que l'élimination de l'ATP au cours de la filtration sur gel entraîne la réversibilité de la transformation $\text{GM2} \rightarrow \text{GM1}$ obtenue après l'incubation.

DISCUSSION

Les expériences décrites ci-dessus ont été réalisées à des concentrations en enzyme sensiblement constantes et en présence d'une concentration de 1 à 5 mM en substrat accepteur, le glucose, nécessaire à la stabilisation de l'activité. Précisons que cette concentration est toujours suffisamment faible (compte tenu des dilutions dans le milieu réactionnel ou dans les milieux d'incubation et du K_m élevé des glucokinases) pour ne pas intervenir dans les déterminations des vitesses de phosphorylation du glucose ou par une production incontrôlée de glucose-6-phosphate ou d'ADP; d'autre part, il n'a pas été possible de préparer, à partir des microsomes de foie de rat, les quantités d'enzymes purifiés suffisantes pour étudier le rôle éventuel de la concentration.

Des études cinétiques avaient montré que la glucokinase GM1 et la phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) possédaient des propriétés voisines². De même, il est bien établi que les phosphofructokinases de mammifères présentent un phénomène d'association-dissociation. Enfin, la phosphofructokinase du coeur de mouton est désensibilisée par photo-oxydation.

Nonobstant ces analogies, une analyse plus approfondie met en évidence des divergences fondamentales dans les propriétés de ces enzymes. Par exemple, si la phosphofructokinase de coeur de mouton est effectivement dissociée réversiblement, c'est sous l'influence du pH et pour donner un protomère n'ayant plus d'activité. Mieux même, l'ATP favorise la dissociation⁵. Ces résultats sont en opposition complète avec ceux obtenus sur la glucokinase dont les deux formes, associées ou dissociées, ont des activités catalytiques sensiblement équivalentes et pour laquelle

l'équilibre monomère-dimère semble essentiellement régi par l'ATP qui induit la formation du dimère et dont l'élimination permet de revenir au monomère.

Il est d'ailleurs frappant de constater que les deux formes moléculaires de la glucokinase microsomique existent à l'état natif; la proportion plus importante du monomère GM2 pourrait d'ailleurs être en rapport avec un taux physiologique faible d'ATP au niveau de la fraction submicrosomique des hépatocytes à laquelle est liée cette activité catalytique.

Quant à la désensibilisation de la phosphofructokinase par photo-oxydation, elle a été l'objet d'une étude approfondie^{7,8}. Toutefois, son action sur le degré de dissociation de l'enzyme reste hypothétique. Dans le cas de la glucokinase, nous avons montré que la photo-oxydation provoquait, en fait, une dépolymérisation qui ramenait le dimère au monomère. Pour les raisons invoquées plus haut, à propos des difficultés de préparation de l'enzyme purifié en quantité importante, il ne nous a pas été possible de déterminer si cette dépolymérisation était liée à une altération des résidus histidine que SETLOW ET MANSOUR⁸ rendaient responsables de la perte des propriétés allostériques de la phosphofructokinase.

Des études récentes sur la liaison des substrats et des effecteurs avec cette phosphofructokinase native ou photo-oxydée montrent qu'il existe, pour l'ATP, deux sites régulateurs et deux sites catalytiques par 10^5 g d'enzyme⁷. L'enzyme de ce poids moléculaire comporterait 4 chaînes peptidiques⁹; ces chaînes seraient de deux types: deux seraient concernées par la catalyse et comporteraient les deux sites spécifiques du fructose-6-phosphate. Les deux autres seraient impliquées dans la régulation allostérique.

Nous n'avons pu étudier la structure fine de la glucokinase GM2, que nous considérons comme un monomère ayant un poids moléculaire de 55 000, est peut-être lui-même composé de deux sous-unités. Cependant, un résultat acquis précédemment¹ apporte une précision intéressante. En effet, les études cinétiques effectuées, non pas à concentration en Mg^{2+} constante, mais à rapport ATP/ Mg^{2+} constant, font apparaître une activation par le substrat. Or, ce phénomène est interprété comme étant la preuve de l'existence de deux sites de fixation du substrat¹⁰: il y aurait ainsi un site de fixation auxiliaire, distinct du site principal. La fixation d'une deuxième molécule de substrat sur ce site auxiliaire entraînerait alors une modification dans la conformation tridimensionnelle de la molécule enzymatique. Suivant les concentrations en ATP et en Mg^{2+} présentes et leur rapport, ce changement de structure aurait pour effet une activation par le substrat ou une cinétique d'ordre supérieur à 1.

La glucokinase microsomique comporterait donc deux types de sites de fixation de l'ATP, qui existeraient déjà sur le monomère GM2. Les propriétés catalytiques de ce monomère restent d'ordre 1 quelles que soient les concentrations en ATP ou en Mg^{2+} . Toutefois, à faible concentration, en Mg^{2+} , l'ATP entraîne avec un certain temps de latence, la formation du dimère GM1, qui, possédant une structure quaternaire, présente alors les propriétés de coopérativité inhérentes aux enzymes régulateurs. La photo-oxydation, qui dépolymérise le dimère, abolit évidemment ces propriétés de coopérativité; l'élimination de l'ATP donne le même résultat. Quant à l'AMP, il joue un rôle antagoniste, en s'opposant à l'effet polymérisant ou coopératif de l'ATP.

RÉSUMÉ

Deux glucokinases, GM1 et GM2, ont été mises en évidence dans les microsomes du foie de rat. Ces enzymes, après purification, possèdent des poids moléculaires apparents de 120 000 pour GM1 et 55 000 pour GM2. L'enzyme GM1 présente des propriétés régulatrices: un de ses substrats, l'ATP, se conduit également comme un effecteur qui inhibe l'enzyme en se fixant sur un site vraisemblablement différent du site catalytique. L'AMP lève l'inhibition produite par l'ATP. Dans les mêmes conditions, l'enzyme GM2 n'est pas inhibé par un excès d'ATP.

La photo-oxydation de la glucokinase GM1 est, en fait, une dépolymérisation, qui non seulement désensibilise l'enzyme vis à vis de l'ATP, mais lui confère également les propriétés et le poids moléculaire de GM2, qui est considéré comme le monomère. L'équilibre monomère-dimère est étudié: il est régi par l'ATP, qui induit la formation du dimère à partir de GM2. L'ATP n'ayant aucune action inhibitrice sur GM2, il existe une apparente contradiction entre les résultats: cette différence peut s'expliquer par le fait que la transformation de GM2 en GM1 sous l'influence de l'ATP exige une latence de 10 min à 30° et 1 h 50 min à 4°. Cette transformation est réversible.

Les propriétés régulatrices sont discutées et comparées à celles de la phosphofructokinase.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. BERTHILLIER, L. COLOBERT, M. RICHARD ET R. GOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 206 (1970) 1.
- 2 G. BERTHILLIER ET R. GOT, *FEBS Lett.*, 8 (1970) 122.
- 3 L. GROSSBARD ET R. T. SCHIMKE, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3546.
- 4 R. G. MARTIN ET B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
- 5 C. E. AHLFORS ET T. E. MANSOUR, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 1247.
- 6 T. E. MANSOUR ET C. E. AHLFORS, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 2523.
- 7 M. Y. LORENSEN ET T. E. MANSOUR, *J. Biol. Chem.*, 244 (1969) 6420.
- 8 B. SETLOW ET T. E. MANSOUR, *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 5524.
- 9 V. H. PAETKAU, S. E. YOUNATHAN ET H. A. LARDY, *J. Mol. Biol.*, 33 (1968) 721.
- 10 J. J.-BECHET ET J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 117.

Biochim. Biophys. Acta, 258 (1972) 88-98