

- [5] *M. Yoshikawa & T. Kato*, Bull. chem. Soc. Japan *40*, 2489 (1967); *A. Yamazaki, I. Kumashiro & T. Takenishi*, J. org. Chemistry *33*, 2585 (1968).
- [6] *M. Ikehara, S. Uesigi & M. Kaneko*, Chem. Commun. *1*, 17 (1967).
- [7] *D. E. Hoard & D. G. Ott*, J. Amer. chem. Soc. *87*, 1785 (1965).
- [8] *A. Gabbai & Th. Posternak*, Helv. *54*, 2141 (1971).
- [9] *R. D. Hurst & G. C. Becking*, Canad. J. Biochem. Biophysics *41*, 469 (1963).
- [10] *M. Ikehara, E. Ohtsuka & F. Ishikawa*, Chem. pharm. Bull. Japan *9*, 173 (1961).
- [11] *M. P. Gordon, V. S. Weliki & G. B. Brown*, J. Amer. chem. Soc. *79*, 3245 (1957); *G. B. Brown & V. S. Weliki*, J. biol. Chemistry *204*, 1019 (1953).
- [12] *A. Hampton & D. I. Magrath*, J. Amer. chem. Soc. *79*, 3250 (1957).
- [13] *D. I. Magrath & G. B. Brown*, J. Amer. chem. Soc. *79*, 3252 (1957).
- [14] *M. Ikehara, E. Ohtsuka, S. Kitagawa, K. Yagi & Y. Tonomura*, J. Amer. chem. Soc. *83*, 2679 (1961).
- [15] *H. Klenow & S. Frederickson*, Biochim. biophysica Acta *52*, 384 (1961).

233. Dérivés de nucléotides d'intérêt biologique, IX¹⁾

Essais enzymatiques avec des analogues de l'acide adénosine-triphosphorique (ATP)

Communication préliminaire²⁾

par **A. Gabbai et Th. Posternak**

Laboratoires de Chimie biologique et organique spéciale de l'Université de Genève

(30 VIII 71)

Summary. The reactivity, as substrates for hexokinase and glycerokinase, of some analogous of ATP has been compared with that of ATP.

Certains des analogues décrits précédemment [1] ont été essayés comme substrats de deux kinases: l'hexokinase et la glycérokinase. Les travaux avec le deuxième enzyme n'ont qu'un caractère préliminaire, alors que les essais avec l'hexokinase ont été plus approfondis et comportent des mesures de V_{\max} et de K_m .

Nous avons utilisé l'hexokinase de levure cristallisée *Sigma* et la glycérokinase *Boehringer*.

Hexokinase. Pour les essais avec l'hexokinase, nous avons recouru essentiellement à la méthode spectrophotométrique basée sur la déshydrogénation, en présence d'un grand excès de glucose-6-phosphate-déshydrogénase, de l'acide glucose-6-phosphorique formé. Cette réaction est étudiée par l'observation au spectrophotomètre de la densité optique à 366 nm (mesure de la concentration en NADPH), ce qui permet de suivre le cours de la phosphorylation du glucose [2]. Les K_m et V_{\max} ont été déterminés par la représentation graphique classique de *Lineweaver & Burke* ($1/V$ vs $1/[S]$). Dans les essais (tableau 1) on a opéré à une concentration saturante en glucose. Les concentrations en ATP ou en analogue variaient généralement entre les limites $5,3 \cdot 10^{-4}M$ et $5,3 \cdot 10^{-5}M$; dans certains cas, cette concentration atteignait

¹⁾ Communication VIII: [1].

²⁾ Un mémoire détaillé sera présenté à Helv. pour publication.

$1,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (désamino-6-ATP) et $2,65 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ (bromo-8-ATP). Dans les conditions employées, nous avons trouvé pour l'ATP $K_m \sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}^3$.

Tableau 1. K_m et V_{\max} relatifs d'analogues de l'ATP dans la réaction de l'hexokinase

Substances	$K_m \cdot 10^4 \text{ M}$	$V_{\max}/V_{\max} \text{ ATP}$
ATP	1,0	1,0
Butyryl-N ⁶ -ATP	2,3	1,2
Méthyl-N ⁶ -ATP	1,5	0,85
Diméthyl-N ⁶ -ATP	1,2	0,77
<i>n</i> -Butyl-N ⁶ -ATP	1,2	0,57
<i>t</i> -Butyl-N ⁶ -ATP	0,68	0,71
Désamino-6-ATP	6,0	0,53
Bromo-8-ATP	0,32	0,40
Amino-8-ATP	1,2	0,57
Oxydo-N(1)-ATP	21,2	0,73

Composition du mélange réactionnel d'un volume total de 3,07 ml: tampon tris-HCl $3,9 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ de pH 7,6, MgCl_2 $6,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, dithiothréitol $4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, glucose $2,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, NADP 0,65 mg/ml, glucose-6-phosphate-déshydrogénase 0,67 $\mu\text{g/ml}$, hexokinase 0,13 $\mu\text{g/ml}$. La réaction a été effectuée à 25°; elle a été déclenchée par l'addition d'hexokinase. On a toujours effectué des mesures parallèles en présence d'ATP.

Tableau 2. Vitesses relatives de la réaction de la glycérokinase

Substances	Vitesses relatives	Substances	Vitesses relatives
ATP	100	<i>n</i> -Butyl-N ⁶ -ATP	72
Propionyl-N ⁶ -ATP	82	<i>t</i> -Butyl-N ⁶ -ATP	16
Valéryl-N ⁶ -ATP	63	Désamino-6-ATP	79
Hexanoyl-N ⁶ -ATP	75	Amino-8-ATP	65
Méthyl-N ⁶ -ATP	90	Bromo-8-ATP	79
Diméthyl-N ⁶ -ATP	80		

Composition du mélange réactionnel d'un volume total de 2,16 ml: tampon hydrazine $3,3 \text{ M}$ + glycine $0,17 \text{ M}$ de pH 9,8, glycérol $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, MgCl_2 $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, dithiothréitol $5,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, ATP ou analogue $1,13 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, NAD 0,30 mg/ml, glycérophosphate-déshydrogénase 92 $\mu\text{g/ml}$, glycérokinase 1,4 $\mu\text{g/ml}$. Température 25–30°. La réaction a été déclenchée par l'addition du glycérol.

Glycérokinase. La réaction de la glycérokinase (phosphorylation du glycérol par l'ATP) a été couplée à celle de la glycérophosphate-déshydrogénase [5]. Ce dernier enzyme, qui comporte comme coferment du NAD, était en quantité beaucoup plus forte que la kinase. La variation de densité optique à 366 nm due au NADH a été utilisée comme mesure de la vitesse de consommation du glycérol. On a opéré à pH 9,8 après s'être assuré que dans ces conditions les acyl-N⁶-ATP ne subissent pas

³⁾ Le degré d'association des isoenzymes de l'hexokinase et, peut-être, leur conformation, dépendent de la composition du milieu, en particulier de la concentration en électrolytes et en glucose [3]. On trouve ainsi dans la littérature des valeurs assez diverses pour le K_m de l'ATP. La valeur de $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ que nous observons est proche de celle indiquée notamment par *Kaji & Colowick* [4].

d'altérations notables. Chaque série de mesures concernant un analogue était accompagnée d'une autre série effectuée avec de l'ATP (tableau 2).

Discussion. On sait que l'hexokinase cristallisée est un mélange d'isoenzymes. Tous nos essais ont été effectués avec la même préparation cristallisée *Sigma* qui, par analogie avec d'autres préparations, serait essentiellement un dimère dans les conditions employées [3]. Quoi qu'il en soit, les valeurs figurant dans le tableau 1 représentent les actions globales des diverses formes de ces isoenzymes. Ce tableau ne montre pas de variations très notables des V_{\max} : les mono- ou di-substitutions en N⁶, ou la forme oxydique de N(1), produisent des réductions de 15 à 23%. Il faut toutefois noter que l'effet inhibiteur sur V_{\max} du groupe *t*-butyle en N⁶ est nettement moins élevé que celui du groupe *n*-butyle. La présence du brome en C(8) produit une diminution de 60%. Les variations des K_m sont beaucoup plus importantes. Les substitutions en N⁶ augmentent la dissociation, à l'exception toutefois du groupe *t*-butyle qui produit l'effet contraire: nous n'entrerons pas ici dans le détail des relations possibles entre le caractère volumineux du substituant et la diminution de la dissociation de la combinaison enzyme-substrat. Toujours est-il que le doublet non partagé en N⁶ semble jouer un rôle en ce qui concerne la liaison du substrat, car celle-ci est fortement affaiblie par la suppression du groupe amino en 6, dans le désamino-6-ATP. On pourrait faire la même remarque en ce qui concerne le doublet libre en N(1), car son blocage dans l'oxyde-N(1) augmente considérablement le K_m . La substitution en C(8) par le brome augmente l'association, alors que celle par NH₂ la diminue: ici encore, il est prématuré de discuter les diverses explications possibles.

On constate que les modifications apportées ici à l'ATP ne produisent pas un affaiblissement de l'action enzymatique comparable à celle indiquée, dans le cas de l'hexokinase, pour le GTP ou pour l'ITP dans lesquels le groupe amino en 6 de l'ATP est remplacé par un C=O [4].

En ce qui concerne la glycérokinase, il faut noter (tableau 2) l'inhibition considérable produite, dans les conditions expérimentales employées, par le substituant volumineux *t*-butyle en N⁶.

Nous remercions de son appui le *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *A. Gabbai, I. Marcus, J. G. Falbriard & Th. Posternak*, *Helv.* 54, 2133 (1971).
- [2] Hexokinase, *Bull. Inform. Boehringer* (1961).
- [3] *Methods in Enzymology* 9, p. 381, éd. *S. P. Colowick et N. O. Kaplan*, Academic Press, New York – London 1966; *F. B. Rudolph & H. J. Fromm*, *J. biol. Chemistry* 245, 4047 (1970).
- [4] *A. Kaji & S. P. Colowick*, *J. biol. Chemistry* 240, 4454 (1965).
- [5] Glycérokinase, *Bull. Inform. Boehringer* (1961).