

CHROM. 7956

Note

Chromatographie d'affinité de la glucokinase microsomique du foie de chat

G. AZZAR, G. BERTHILLIER et R. GOT

Université Claude Bernard Lyon I, Laboratoire de Biochimie des Membranes, 43, Boulevard du 11 novembre 1918, 69621-Villeurbanne (France)

(Reçu le 16 septembre 1974)

Bien qu'ayant été l'objet de nombreux travaux en raison de leur intérêt sur le plan physiologique, les glucokinases hépatiques sont encore peu ou mal caractérisées au point de vue physicochimique.

De telles études exigent, en effet, des quantités relativement importantes d'enzymes purifiés; or, les méthodes de fractionnement et de purification établies pour ces glucokinases sont longues et laborieuses^{1,2} et n'aboutissent qu'à de petites quantités d'un enzyme encore impur. Ces difficultés sont encore accrues s'il s'agit d'un enzyme membranaire car il faut préalablement le solubiliser à partir de fractions subcellulaires dont l'obtention généralement en faible quantité nécessite la mise en oeuvre d'un fractionnement cellulaire plus ou moins élaboré.

C'est ainsi que la glucokinase du foie de rat^{3,4} dont les propriétés cinétiques présentent une originalité certaine^{5,6} n'a pu être aussi bien caractérisée qu'il aurait été souhaitable. La chromatographie d'affinité semble apporter une solution à ces difficultés grâce à sa rapidité, sa simplicité, son rendement et son facteur de purification élevés.

Le foie de chat possède également une glucokinase microsomique mais en quantité nettement plus élevée que le foie de rat⁷. C'est donc cet enzyme qui a été l'objet de nos investigations. S'agissant d'une glucokinase plusieurs types de ligands peuvent être fixés à la matrice: glucose, glucosamine ou N-acétylglucosamine, ATP en ne considérant que les substrats. Pour des raisons de simplicité de fixation, nous avons été amenés à choisir l'ATP.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les microsomes des hépatocytes de chat contiennent en moyenne le tiers de l'activité glucokinasiq ue cellulaire⁷. Cette activité est solubilisée en totalité par action du Triton X-100 à une concentration de 0.1% (v/v).

La solution ainsi obtenue est amenée à une concentration 1.8 M en sulfate d'ammonium. Après élimination du précipité, le surnageant est ajusté à une concentration 2.2 M. Le nouveau précipité contient environ 70% de l'activité glucokinasiq ue des microsomes. Ce précipité est redissous et dialysé contre le tampon Tris-HCl 20 mM (pH 8), MgSO₄ 4 mM, glucose 4 mM, mercaptoethanol 4 mM et EDTA 4 mM. La concentration finale est de 10 mg de protéines dosées par la méthode de

Lowry *et al.*⁸ par millilitre. L'ATP est fixé sur du Sepharose activé par le CNBr (Pharmacia, Uppsala, Suède; lot N° 6744) selon la méthode de Jackson *et al.*⁹, le bras utilisé étant le γ -méthyl ester de glutamate. L'addition de [¹⁴C]ATP permet d'estimer par une simple mesure de radioactivité la quantité d'ATP fixé sur le Sépharose. L'éluion de l'activité glucokinase est réalisée soit par concentration croissante de KCl soit par une solution d'ATP.

Les fractions protéiques sont analysées par électrofocalisation¹⁰.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

En partant d'1 g de Sépharose 4B-CNBr lyophilisé on obtient 3.5 ml de gel sur lequel sont fixés 5 mg d'ATP soit 8.5 μ moles.

La Fig. 1 donne le schéma d'éluion d'une colonne de ce gel équilibré contre le tampon Tris-acétate pH 7.15 (10 mM) contenant de l'EDTA (0.1 mM) et du phosphate de sodium (1 mM). L'essentiel des protéines inactives est entraîné sans retard par le tampon d'équilibre alors que l'activité glucokinase n'est élué que par addition de KCl 1 M au tampon.

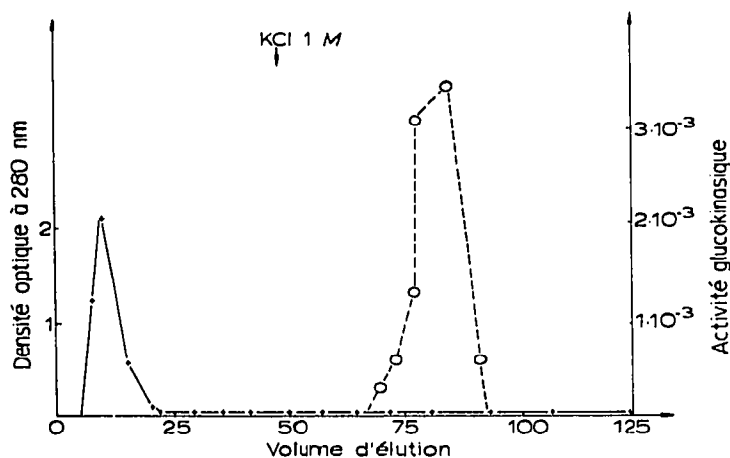


Fig. 1. Chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose-ATP de la glucokinase particulée de foie de chat. +—+, protéines à 280 nm; ○---○, activité glucokinase totale (unité par fraction).

En effet des essais préalables ont montré que les concentrations inférieures en KCl n'éluient aucune activité. La dissociation du complexe ATP insolubilisé-glucokinase est également obtenue par addition d'ATP 0.01 M au tampon d'éluion; ce fait démontre que l'affinité est la véritable nature de l'interaction glucokinase-ATP insolubilisé.

D'ailleurs aucune activité n'est retenue sur un gel sans ATP. Le rendement de la chromatographie est proche de 100% avec un facteur de purification d'environ 400. C'est ainsi qu'il n'est plus possible de mesurer une absorption à 280 nm dans les fractions contenant l'activité enzymatique.

Ce résultat est corroboré par l'électrofocalisation en gel: Alors que 25 à 30 lignes apparaissent dans l'extrait déposé sur la colonne (Fig. 2) aucune ligne n'est

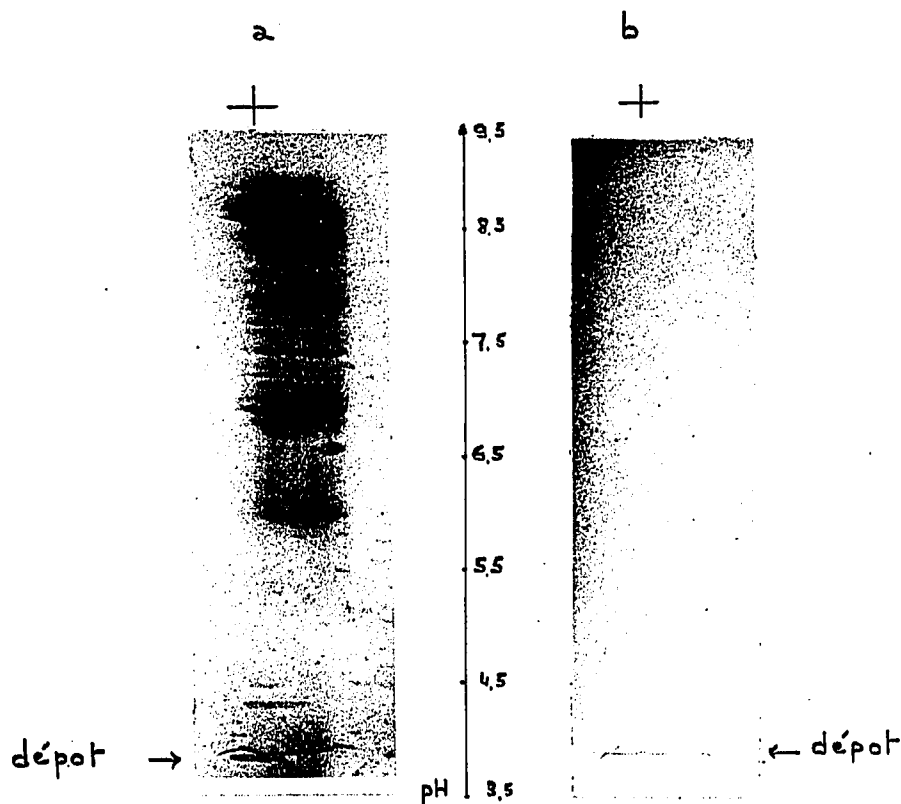


Fig. 2. Electrofocalisation. (a) Extrait brut après traitement par sulfate d'ammonium. (b) Glucokinase de foie de chat purifiée après passage sur colonne de Sepharose-ATP.

détectée dans les fractions correspondant au maximum d'activité glucokinasiqne bien qu'elles aient été concentrées quatre fois par rapport à l'extrait initial.

L'activité spécifique de l'enzyme ainsi purifié 0.15 UI/mg de protéines n'est que de deux à trois fois moins élevée que celle obtenue par une méthode très laborieuse avec un rendement d'environ 12% pour la glucokinase microsomique du foie de rat³.

Il faut préciser que l'affinité de la glucokinase de chat n'est pas très élevée pour l'ATP puisque le K_m correspondant est de 0.25 mM. De plus, les risques de dénaturation nous ont amené à réfrigérer la colonne à + 6°.

La fixation d'ATP est plus simple que la fixation de glucosamine utilisée par Chester *et al.*¹¹. Toutefois cette dernière technique permet de séparer la glucokinase des hexokinases qui n'ont pas d'affinité pour la glucosamine.

Notre méthode parfaitement reproductible est cependant justifiée puisqu'il n'existe pas d'activité hexokinasiqne dans l'extrait membranare étudié.

RÉFÉRENCES

- 1 M. J. Parry et D. G. Walker, *Biochem. J.*, 99 (1966) 266.
- 2 S. J. Pilkiss, *Arch. Biochem. Biophys.*, 149 (1972) 349.

- 3 G. Berthillier, L. Colobert, M. Richard et R. Got, *Biochim. Biophys. Acta*, 206 (1970) 1.
- 4 G. Berthillier, P. Dubois et R. Got, *Biochim. Biophys. Acta*, 293 (1973) 370.
- 5 G. Berthillier et R. Got, *FEBS Lett.*, 8 (1970) 122.
- 6 G. Berthillier et R. Got, *Biochim. Biophys. Acta*, 258 (1972) 88.
- 7 G. Azzar, G. Berthillier et R. Got, *Comp. Biochem. Physiol.*, sous presse.
- 8 O. H. Lowry, N. Y. Rosenbrough, A. L. Farr et R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 R. J. Jackson, R. M. Wolcott et T. Shiota, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51 (1973) 428.
- 10 O. Vesterberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 257 (1972) 11.
- 11 J. M. E. Chesher, I. P. Trayer et D. G. Walker, *Biochem. Soc. Trans.*, 4 (1973) 876.