

Nouvelle méthode de purification des polypeptide synthétases VII

C. FISCHER-FERRARO et M. BELJANSKI

Service de Biochimie cellulaire de l'Institut Pasteur, Paris

(Reçu le 11 septembre/23 novembre 1967)

A new method for purification of "polypeptide synthetase" from *Alcaligenes faecalis* is described in which nucleic acids are removed by purification on DEAE-cellulose with a recovery of 60–75% of the initial enzymatic activity.

The enzyme preparation catalyses the binding of the naturally occurring L-amino acids to a messenger-like RNA whose properties have been previously described. The reaction requires the addition of any one of the four nucleoside triphosphates (ATP, GTP, CTP or UTP), which is degraded to the corresponding nucleoside diphosphate and orthophosphate. For certain amino acids, however, the requirement for a nucleoside triphosphate is limited to two of the four.

The purified enzyme preparation, unlike crude extracts, does not catalyse an amino dependent ATP- ^{32}P PP_i exchange. Neither crude extracts, nor purified preparations show detectable exchange between ^{32}P PP_i and GTP, CTP, or UTP in the presence or in the absence of L-amino acids.

The presence of more than one enzyme in the purified preparation was demonstrated by further substantial fractionation of ^{14}C leucine binding activity and separation of this from ^{14}C alanine binding activity. However, no fractionation, which was dependent on a specific nucleoside triphosphate, could be achieved.

Nous avons précédemment montré que les polypeptide synthétases purifiées forment, par l'intermédiaire de certaines fractions de RNA bactérien, des peptides de tailles variables [1,2]. Le complexe acide aminé-RNA dont la formation peut avoir lieu en présence séparément soit de GTP, de CTP, d'UTP soit d'ATP fut isolé et ses propriétés décrites [3]. Le RNA accepteur des L-acides aminés est une fraction de RNA à marquage rapide (mRNA) provenant des bactéries ou des levures ainsi que le RNA du TYMV [4]. Une méthode nouvelle de purification des polypeptide synthétases s'imposait. Elle fut élaborée pour deux raisons essentielles: (a) nous évitons d'utiliser la protamine qui peut entraîner la perte de quantités importantes de protéines actives; (b) les activités pour la fixation de nombreux acides aminés dans le mRNA en présence séparément de GTP, de CTP, d'UTP et d'ATP se trouvent concentrées dans une région relativement étroite de l'éluat de la colonne de DEAE-cellulose. Un essai nouveau, rapide et sensible a été utilisé pour déterminer les activités des préparations enzymatiques lors de la purification.

Abréviations non usuelles. Acide ribonucléique matriciel [6] présentant le rapport des bases proche de celui de l'ADN, et qui précipite pour une concentration de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variant entre 60 et 65% de la saturation mRNA; acide ribonucléique isolé de la mosaïque jaune du navet, RNA de TYMV; complexe entre ^{14}C acide aminé et mRNA, ^{14}C AA-mRNA.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Provenance des produits utilisés

Les ribonucleoside-5'-mono-, et triphosphates¹: Pabst Company, Schwarz Bio Research Inc.; L-acides aminés non marqués: Hoffmann-Laroche; L-acides aminés marqués au ^{14}C (activité spécifique: 60 ou 160 mC/mmmole): Schwarz Bio Research Inc.; gel de phosphate de calcium: Sigma Chemical Company; H_3PO_4 marqué au ^{32}P : Commissariat à l'Énergie Atomique; DEAE-cellulose: Brown Co.

Souche bactérienne

Les bactéries *Alcaligenes faecalis* n° 8750 sont cultivées en milieu « trypticase » Difco [5]. Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers agités à 32° et les bactéries récoltées vers la fin de la phase exponentielle de croissance.

Acides ribonucléiques actifs

Les fractions de mRNA utilisées sont des fractions enrichies en RNA à marquage rapide obtenues par la méthode décrite [3]. Le fractionnement à l'aide de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ des RNA totaux d'*Alcaligenes faecalis* [3]

¹ La pureté des ribonucleoside-5'-triphosphates est contrôlée ainsi que le degré de contamination par les ribonucleosides-5'-diphosphates.

nous permet d'enrichir en RNA à marquage rapide particulièrement la fraction du RNA précipitant entre 60 et 65% et entre 80 et 90% de la saturation en sulfate d'ammonium. Différents critères [6] nous permettent de considérer ces RNA comme des RNA matriciels. Le tRNA^{Ala} (pur à 75%) des levures a été aimablement mis à notre disposition par les Dr. J. T. Madison et Dr. Holley.

Formation et isolement du complexe [¹⁴C]acide aminé-mRNA

L'activité enzymatique de diverses fractions au cours de la purification a été déterminée en l'absence et en présence de mRNA exogène. Le milieu d'incubation contient 1–3 μmoles de MgCl₂; 20–25 μmoles de tampon Tris (pH 7,6); 0,5 μmole de NTP; 1 ou 2 nmoles de [¹⁴C]leucine (50.000–100.000 coups/min); 100 μg de mRNA lorsque l'ATP et l'UTP sont utilisés et 50 μg en présence de GTP et de CTP; 100 μg d'extrait brut d'enzyme et 20 μg de la fraction précipitant à 70% de la saturation en (NH₄)₂SO₄, en présence d'UTP et d'ATP; 150 μg d'extrait brut et 80 μg de cette même fraction en présence de GTP et de CTP. Pour les fractions enzymatiques DEAE II et celle du gel S-1 les quantités utilisées sont 5 à 10 μg pour l'UTP et l'ATP et 20 à 50 pour le GTP et le CTP. Volume final 0,5 ml. Incubation 2, 5, 10 et 20 min à 30°. Le complexe est précipité par HClO₄ 0,3 N (concentration finale) à 4°. 150 μg de RNA des levures et 300 μg d'albumine de sérum sont alors ajoutés comme entraîneurs. Le précipité, séparé par centrifugation est lavé avec HClO₄ 0,3 N, redissous dans l'ammoniaque N, séché, et la radioactivité déterminée dans un compteur Tracerlab à fenêtre mince. Les résultats sont exprimés en nmoles de [¹⁴C]acide aminé incorporé dans le mRNA, ou en coups/min. Dans le cas de l'extrait brut et de la fraction précipitée par 70% de la saturation en sulfate d'ammonium, la quantité de [¹⁴C]acide aminé fixé sans addition de mRNA exogène est de l'ordre de 5 à 20% par rapport aux échantillons additionnés de mRNA exogène. Pour les fractions enzymatiques exemptes de RNA endogène (Tableau 1) ces valeurs sont de l'ordre de 2%.

Purification des polypeptide synthétases

Essai enzymatique. Un essai rapide basé sur la fixation des L-[¹⁴C]acides aminés dans le mRNA est utilisé. Le complexe [¹⁴C]AA-mRNA formé en présence de fractions enzymatiques et d'un des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates peut être facilement isolé par précipitation dans les conditions décrites.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la fixation d'une nmole de L-[¹⁴C]acide aminé dans le mRNA (en 10 min). Pour la définition de l'unité enzymatique les valeurs ont été prises dans la partie linéaire de la courbe représentant le taux de fixation (30–40%) d'acide aminé. Pour des raisons de facilité, la L-[¹⁴C]-leucine a été utilisée; la fixation d'autres L-acides aminés a également lieu en présence de ces mêmes préparations enzymatiques. Activité spécifique = nombre d'unités par mg de préparation enzymatique.

Extraits bruts. 100 g (poids humide) de bactéries *Alcaligenes faecalis* sont suspendus dans 500 ml d'eau distillée et les bactéries détruites à l'aide de l'appareil Raythéon [5]. Après centrifugation de l'extrait à 10.000 × g pendant 30 minutes, le culot est éliminé. Le surnageant, dialysé pendant 16 heures contre le tampon de phosphate 10 mM pH 7,4 correspond à l'extrait brut.

Fraction précipitée par 70% de la saturation en sulfate d'ammonium. L'extrait brut dialysé est dilué (10 mg/ml) avec du tampon phosphate 10 mM de pH 7,4 puis additionné de SO₄(NH₄)₂ solide (25% de la saturation pour *Alcaligenes faecalis* et 40% pour *Escherichia coli*). Après élimination du précipité par centrifugation, la solution surnageante est additionnée de SO₄(NH₄)₂ jusqu'à 70% de la saturation et centrifugée. Le précipité est dialysé pendant une nuit contre le même tampon. Le dialysat correspond à la fraction précipitée par 70% de la saturation en sulfate d'ammonium. Toutes les opérations sont effectuées à 4° et le pH est constamment maintenu à 7,4. Les protéines sont dosées par la méthode du biuret.

Passage sur colonne de DEAE-cellulose. La fraction précipitée à 70% de la saturation en sulfate d'ammonium (4 g), préalablement traitée par la bentonite, est déposée sur une colonne de DEAE-

Tableau 1. Etapes de purification des polypeptide synthétases

Fractions	Vo- lume	Poids de pro- téines	Unités				Activité spécifique*				A ₂₈₀	Rendement		
			GTP	CTP	UTP	ATP	GTP	CTP	UTP	ATP		A ₂₈₀	GTP	UTP
	ml	mg												
Extraits bruts	250	9.850	1.590	1.700	7.200	19.800	0,16	0,18	0,76	2,00	0,62	100	100	
Fractions précipitées à 70% de la saturation en SO ₄ (NH ₄) ₂	200	4.400	1.585	1.710	7.300	21.000	0,36	0,39	1,82	5,14	0,62	100	100	
DEAE-cellulose II	30	429	930	980	4.960	14.660	2,16	2,30	10,56	33,70	1,50	60	74	
Gel S-1	10	150	900	926	5.300	14.812	6,00	6,23	40,06	92,00	1,60	59	74	

* Exprimée en nmoles de [¹⁴C]leucine fixée par le mRNA en présence de 1 mg d'enzymes et en 10 minutes.

cellulose (30×5 cm). L'éluion des protéines est réalisée à l'aide d'un gradient: 1 l de tampon Tris 10 mM et de pH 7,4 + 1 l de KCl 0,5 M dans le même tampon Tris. Deux cent fractions de 10 ml chacune (10 ml/3 minutes) sont recueillies, puis essayées pour leur capacité à fixer la [¹⁴C]leucine en présence séparément d'ATP, d'UTP, GTP et de CTP. Les fractions actives (zone II, Fig.1) sont réunies, les protéines précipitées par 70% de la saturation en SO₄(NH₄)₂. Le précipité, après centrifugation, est dialysé contre du tampon Tris 10 mM pH 7,4 pendant 3 heures.

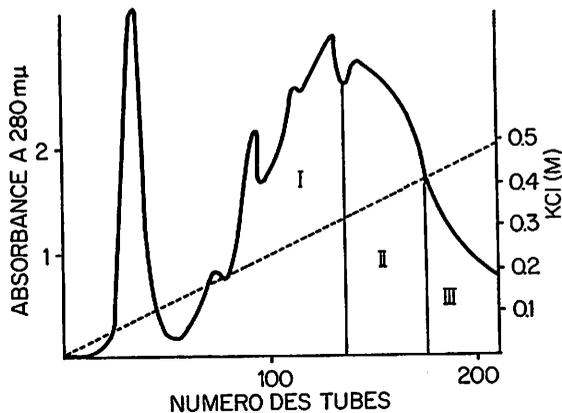


Fig.1. Activité des polypeptide synthétases dans les éluats de la colonne de DEAE-cellulose. Conditions d'incubation, voir la légende du Tableau 3. Quantité de protéines 80–150 μg (0,1–0,2 ml)

Adsorption sur gel de phosphate de Ca. La fraction DEAE II (300 mg de protéines dans 30 ml) est additionnée de 500 mg de gel de phosphate de calcium (poids sec) et le pH ajusté à 5,7. Après un contact de 10 min, le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 10.000×g et le surnageant saturé à 70% par SO₄(NH₄)₂. Le précipité, collecté par centrifugation est dialysé contre du tampon Tris 10 mM pH 7,4 pendant 2 h 30 (Gel S-1). Cette fraction contient presque la totalité des protéines enzymatiques tandis qu'une faible quantité reste adsorbée sur le gel de phosphate de calcium. Elle peut être éluée à l'aide de tampon de phosphate 0,2 M (pH 6,0).

RÉSULTATS

Purification et activités des polypeptides synthétases

Il apparaît à l'examen du Tableau 1 que les activités enzymatiques pour la formation du complexe [¹⁴C]Leu-mRNA en présence séparément de GTP, de CTP, d'UTP et d'ATP restent groupées deux par deux (GTP-CTP; UTP-ATP) au cours de la purification. Le rapport des activités à l'égard de chaque ribonucléoside-5'-triphosphate reste sensiblement le même au cours de la purification. Il faut noter que les activités manifestées en présence de GTP et de

CTP sont pratiquement identiques et vont toujours de pair. Elles peuvent varier notablement d'un extrait brut à l'autre. Celles en présence d'ATP et d'UTP sont apparemment associées.

Au cours de la troisième étape de purification, parmi les 200 fractions recueillies en éluant la colonne de DEAE-cellulose, on distingue (Fig.1) trois zones lorsqu'on détermine la capacité des fractions pour la fixation des [¹⁴C]acides aminés dans les mRNA (Tableau 2). Les fractions 1 à 140 (I) contenant des

Tableau 2. Activités enzymatiques dans les éluats de la colonne de DEAE-cellulose

Fractions éluées	[¹⁴ C]leucine incorporée dans du mRNA			
	ATP	CTP	GTP	UTP
	coups/min			
I	30	40	60	60
II	13.010	5.810	6.700	12.850
III	2.300	274	120	1.130

pigments et des protéines sont dépourvues d'activité (Tableau 2). Les fractions 140 à 170 (II) par contre manifestent une forte activité pour la fixation de nombreux acides aminés dans le mRNA selon la nature du ribonucléoside-5'-triphosphate utilisé (Tableau 3). Ces fractions sont pratiquement exemptes d'acides nucléiques (rapport $A_{280}/A_{260} = 1,4-1,6$) et la perte de protéines enzymatiques est négligeable bien qu'une importante purification soit obtenue. Enfin, les fractions 170–200 (III) ne manifestent généralement qu'une faible activité.

Notons qu'on retrouve également dans la fraction gel S-1 les activités observées pour plusieurs acides aminés, comme en présence de la fraction DEAE-cellulose II.

Il était important de déterminer d'une part s'il existe un enzyme spécifique pour chaque acide aminé et d'autre part de savoir si les activités en présence d'UTP, de GTP, de CTP et d'ATP pour la fixation d'un même acide aminé (leucine) sont liées à une seule protéine (c'est-à-dire à l'enzyme spécifique de cet acide aminé) ou bien à des protéines différentes. Nos résultats précédents [2] ont clairement montré que divers acides aminés peuvent être fixés dans le RNA sans compétition détectable ce qui suggérait fortement l'existence d'un enzyme pour chaque acide aminé. Après séparation sur gradient de saccharose (5–20 g/100 ml; 40.000 tours/minute pendant 18 heures) de la préparation enzymatique purifiée (gel S-1), la courbe d'absorbance prise à 280 mμ (Fig.2 et 3) montre essentiellement un seul pic de protéines correspondant à environ 6 ou 7 S (masse moléculaire apparente de 80.000). Nous avons déterminé sur chacune des 15 à 20 fractions du gradient la fixation de la [¹⁴C]leucine et de [¹⁴C]alanine séparément. Le pic de la courbe représentant le complexe

Tableau 3. Activités de la fraction DEAE-cellulose II pour la fixation de divers [14 C]acides aminés dans le RNA

Acide aminé	Acide aminé fixé							
	Enzyme de <i>Alcaligenes faecalis</i>				Enzyme de <i>Escherichia coli</i>			
	GTP	CTP	UTP	ATP	GTP	CTP	UTP	ATP
	nmoles/20 μ g RNA				nmoles/20 μ g RNA			
L-Leucine	0,17	0,18	0,34	0,36	0,01	0,03	0,07	0,34
L-Valine	0,08	0,10	0,11	0,12	0,10	0,12	0,13	0,12
L-Phénylalanine	0,04	0,06	0,05	0,05	—	—	—	—
L-Alanine	0,14	0,10	0,26	0,29	0,03	0,02	0,18	0,20
L-Sérine	0,02	0,01	0,13	0,14	—	—	—	—
Glycine	0,25	0,28	0,38	0,40	—	—	—	—
L-Arginine	0,01	0,01	0,10	0,15	0,10	0,12	0,14	0,13
L-Lysine	0,01	0,01	0,06	0,10	0,08	0,08	0,18	0,17
L-Thréonine	—	—	0,09	0,12	—	—	—	—
L-Méthionine	0,04	0,04	0,36	0,34	—	—	—	—
L-Isoleucine	0,01	0,01	0,08	0,07	—	—	—	—

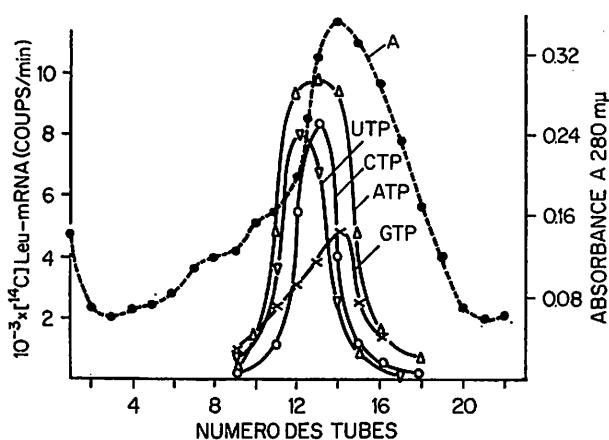
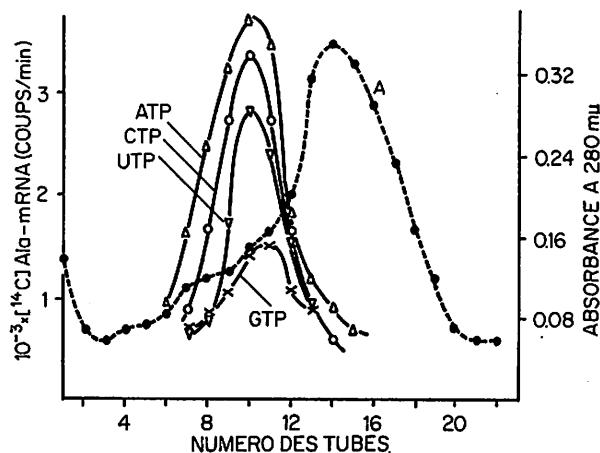
Fig. 2. Localisation de l'activité pour la fixation de la [14 C]-alanine dans la fraction Gel S-1 après centrifugation sur gradient de saccharoseFig. 3. Localisation de l'activité pour la fixation de la [14 C]-leucine dans la fraction Gel S-1 après centrifugation sur gradient de saccharose

Fig. 2 et 3. 1,5 mg d'enzyme Gel S-1 a été déposé sur gradient de saccharose (5–20 g/100 ml du tampon Tris 50 mM, pH 7,4), puis centrifugé pendant 16 h à 39.000 tours par minute. On recueille 0,15 ml par tube. Le volume de chaque tube est complété à 0,8 ml et l'absorbance déterminée à 280 m μ . Les conditions pour la formation du complexe [14 C]Leu-mRNA et de celui de [14 C]Ala-mRNA sont identiques à celles décrites dans la légende du tableau 3. 20 μ g de mRNA; 0,3 ml de chaque fraction du gradient lorsque le GTP et le CTP sont utilisés; 0,2 ml en présence d'UTP et 0,1 ml en présence d'ATP

[14 C]Ala-RNA est nettement déplacé par rapport à celui de la courbe représentant le complexe [14 C]Leu-RNA; ces résultats montrent que l'activité à l'égard de la leucine est séparable de celle de l'alanine.

Lorsqu'on examine maintenant les courbes des complexes [14 C]acide aminé-mRNA formés en présence de GTP, d'UTP, de CTP ou d'ATP séparément, on observe que les courbes restent tout à fait groupées pour un acide aminé donné et quel que soit le nucléoside-5'-triphosphate utilisé (Fig. 2 et 3): les quatre activités semblent être liées à chaque enzyme spéci-

fique. Cependant dans le cas de la leucine, on observe tout de même un faible décalage entre les courbes représentant le complexe formé en présence de CTP, d'UTP et de GTP². Les quatre activités enzymatiques observées pour un acide aminé donné avec chacun des ribonucléoside-5'-triphosphates ne sont pas nettement séparables sur gradient de saccharose. Rappelons qu'il existe des fractions de la colonne de DEAE-cellulose (Tableau 2) qui catalysent la fixation de la leucine dans le mRNA en présence d'UTP, d'ATP, de GTP et de CTP et d'autres fractions qui ne la fixent qu'en présence d'UTP et d'ATP. A l'heure actuelle la question ne peut être définitivement tranchée à cet égard. Les polypeptide synthétases d'*Escherichia coli* ont été également purifiées par la présente méthode. L'activité enzymatique a été

² Après centrifugation de la préparation enzymatique sur gradient de saccharose, on constate une perte sensible d'activité surtout en présence de GTP et peu en présence de CTP.

déterminée en suivant la formation du complexe $[^{14}\text{C}]\text{Val-mRNA}$ qui se forme en présence de chacun des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates. Le tableau montre le spectre d'activités pour divers acides aminés (Tableau 3).

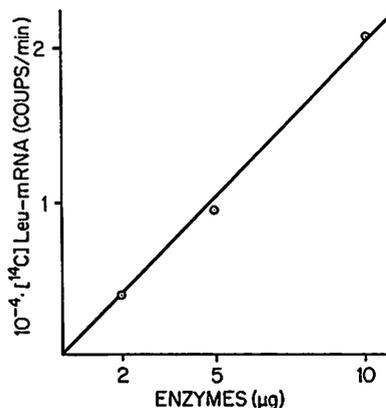


Fig. 4. Différentes concentrations d'enzyme Gel S-1 et incorporation de la $[^{14}\text{C}]$ leucine dans du mRNA. Conditions, voir Méthodes. UTP, 0,5 μmole ; mRNA, 100 μg . Quantité d'enzymes Gel S-1 indiqué sur la figure. Incubation 5 min à 30°

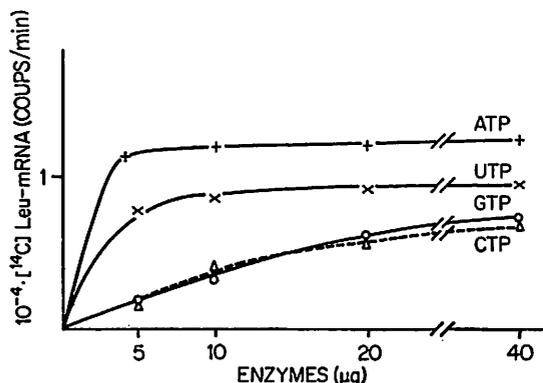


Fig. 5. Cinétique d'incorporation de la $[^{14}\text{C}]$ leucine dans du mRNA en présence de chacun des nucléoside triphosphates. Conditions, voir Méthodes. mRNA 20 μg ; enzyme Gel S-1 20 μg ; Incubation 10 min à 30°

La Fig. 4 montre que la quantité de $[^{14}\text{C}]$ leucine fixée dans le mRNA en présence d'un ribonucléoside-5'-triphosphate (UTP) est proportionnelle à la quantité de protéines lorsque le RNA est en excès. Pour une quantité choisie d'enzymes (limitante pour le GTP) la cinétique de fixation de leucine varie selon la nature du ribonucléoside-5'-triphosphate (Fig. 5). On observe un parallélisme entre les activités qui se manifestent en présence de GTP et de CTP d'une part et de l'UTP et de l'ATP d'autre part. Soulignons que ces nucléoside triphosphates ne sont pas incorporés dans du matériel acido-précipitable.

La Fig. 6 montre que pour une concentration donnée d'enzyme la quantité de $[^{14}\text{C}]$ leucine dans le

mRNA est proportionnelle à la quantité de RNA (pour certaines concentrations).

pH optimum. Dans une solution de tampon Tris la formation optimale du complexe acide aminé-mRNA a lieu à pH 7,4—7,6 en présence, séparément,

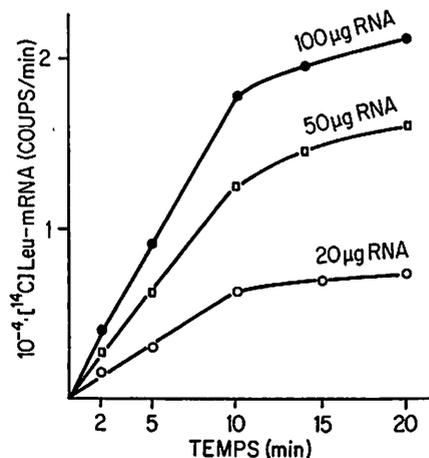


Fig. 6. Différentes concentrations du mRNA et incorporation de la $[^{14}\text{C}]$ leucine. Conditions, voir méthodes. Enzyme Gel S-1, 5 μg ; UTP, 0,5 μmole . Quantité de mRNA indiqué sur la figure. Incubation de 5 min à 30°

de GTP, CTP, UTP et d'ATP. La force ionique de KCl entre 0,1 et 0,2 M n'influence pas sensiblement les activités, tandis que des concentrations plus élevées provoquent des inhibitions. A pH 6,4 et 8,1 la quantité de complexe formé en présence, soit de GTP, soit de CTP est environ 20—30%. Celui formé en présence d'UTP et d'ATP est environ de 50%. Pour la libération de phosphate à partir de nucléoside triphosphates, le pH optimum se situe vers 8,5.

Cations métalliques. Parmi les cations essayés (Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , Co^{++}) la présence de Mg^{++} est indispensable pour les quatre activités. Mn^{++} à dose égale remplace le Mg^{++} pour la fixation de la leucine dans le mRNA en présence d'ATP et d'UTP mais ne peut le remplacer en présence de GTP et de CTP. Pour la fixation d'autres acides aminés, le Mg^{++} est également indispensable.

Stabilité des préparations enzymatiques. Les activités des enzymes de l'extrait brut, de la fraction 70% de la saturation en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et de la fraction DEAE-cellulose II ne diminuent pas pendant plusieurs mois lorsque les préparations sont gardées congelées à -15° . Les enzymes du surnageant du gel S-1 se conservent dans les mêmes conditions pendant un mois au moins. Cependant pour la phénylalanine les activités en présence de GTP et de CTP peuvent être assez rapidement diminuées. Le chauffage à 60° pendant deux minutes abolit toutes les activités.

Echange entre le [³²P]orthophosphate ou le [³²P]pyrophosphate et les ribonucléoside-5'-triphosphates

Les nucléoside triphosphates indispensables à la fixation des acides aminés L dans le mRNA sont dégradés en nucléoside diphosphates et en orthophosphate en présence de polypeptide synthétases (Tableau 4). Ces mêmes préparations enzymatiques ne catalysent cependant pas l'échange entre le ³²P_i libre et le γ-P d'ATP, GTP, CTP et d'UTP en l'absence ou en présence d'acides aminés L (Tableau 5). Les résultats concernant l'échange entre [³²P]PP_i et chaque nucléoside triphosphate en l'absence ou en présence de certains acides aminés sont présentés dans le Tableau 6. On n'observe aucun échange entre le [³²P]PP_i et le pyrophosphate du GTP, de CTP

Tableau 4. Libération de phosphate à partir de nucléoside triphosphates

	Nucléoside triphosphate			
	ATP	UTP	GTP	CTP
	nmole/mg enzyme/10 min			
Milieu complet	110	100	80	120
Sans RNA	30	20	20	20
Sans L-Leucine	10	10	10	10

Tableau 5. Echange entre le [³²P]PP_i et le γ-P des nucléoside triphosphates en présence de polypeptide synthétases d'*Alcaligenes faecalis*

Addition	Enzyme Gel S-1			
	Incorporation du ³² P dans			
	GTP	CTP	UTP	ATP
	coups/min			
Néant	58	65	70	110
18 acides aminés	62	60	80	115
L-Valine	56	54	61	96
L-Leucine	64	70	67	88
L-Alanine	49	58	62	90
L-Alanine + mRNA (20 μg)	67	60	59	100

Tableau 6. Incorporation du [³²P]PP_i dans les nucléoside triphosphates

Les quantités suivantes ont été utilisées: 5 μmoles de MgCl₂; 50 μmoles de Tris (pH 7,7); 1,0 μmole de [³²P]PP_i (60.000 coups/min); 1 μmole de nucléoside triphosphate; 2,0 μmoles de KF; 1 μmole d'acide aminé; 5 μmoles de mélange de 18 acides aminés L; 100 μg d'enzyme. Volume final = 1 ml. Incubation 15 min à 30°. Adsorption sur charbon

Additions	Extrait brut				Enzyme Gel S-1			
	[³² P]PP _i incorporé dans				[³² P]PP _i incorporé dans			
	GTP	CTP	UTP	ATP	GTP	CTP	UTP	ATP
	coups/min				coups/min			
Néant	98	86	100	116	89	100	96	220
18 acides aminés L	104	96	99	10.630	76	84	89	11.103
L-Leucine	120	104	100	9.610	80	91	93	10.300
L-Valine	101	100	103	9.430	78	90	85	5.230
L-Alanine	99	108	110	1.150	68	74	72	230
L-Phénylalanine	112	96	101	1.110	92	81	86	210
L-Arginine	100	102	100	680	95	89	97	207

et d'UTP soit en l'absence soit en présence d'un seul ou de plusieurs acides aminés L (extraits bruts ou enzymes purifiés). Suivi en présence d'enzymes purifiés (Tableau 6) et de divers acides aminés chacun séparément utilisé, on constate que l'échange entre l'ATP et le [³²P]PP_i a lieu uniquement en présence soit de L-valine, soit de L-leucine, tandis que celle en présence d'alanine, de phénylalanine et d'arginine, n'est plus détectable.

Polypeptide synthétases et RNA de transfert

Nos résultats précédents [3,4] et ceux concernant l'identification des sites accepteurs de [¹⁴C]arginine et de [¹⁴C]valine [6] ont clairement montré que le système enzymatique purifié que nous utilisons catalyse la fixation des acides aminés L à des RNA différents du tRNA. Ici nous présentons les résultats concernant la fixation de [¹⁴C]alanine au tRNA^{Ala} (pureté supérieure à 75%) des levures et au mRNA d'*Alcaligenes faecalis* (Fig. 7, Tableau 7). On observe que le tRNA^{Ala} accepte la [¹⁴C]alanine exclusivement en présence d'ATP et d'enzymes non purifiés. Le GTP, le CTP et l'UTP sont inactifs. En présence de polypeptide synthétases purifiées (Tableau 7) aucune fixation de la [¹⁴C]alanine n'est observée ni en présence d'ATP ni d'UTP, ni de CTP ni de GTP. Ces

Tableau 7. Complexe [¹⁴C]Ala-RNA

Conditions, voir Méthodes. tRNA^{Ala} des levures, 50 μg; mRNA d'*Alcaligenes faecalis*, 30 μg; fraction enzymatique précipitée par (NH₄)₂SO₄ (70% de la saturation) non purifiée, 160 μg; fraction Gel S-1, 100 μg. Incubation 20 min à 30°

	Radioactivité			
	tRNA ^{Ala} de levures		mRNA d' <i>Alcaligenes faecalis</i>	
	Enzyme non purifié	Enzyme purifié	Enzyme non purifié	Enzyme purifié
	coups/min		coups/min	
ATP	6.340	260	5.230	5.403
UTP	270	271	5.780	5.740
CTP	340	304	5.760	4.930
GTP	310	269	3.540	3.840

résultats confirment que dans les polypeptide synthétases purifiées l'enzyme catalysant l'échange $[^{32}\text{P}]\text{PP}_i \rightleftharpoons \text{ATP}$ en présence d'alanine n'existe pas. Rappelons que le mRNA d'*Alcaligenes faecalis* nettement séparable du tRNA sur gradient de saccharose (Fig. 7) accepte activement la $[^{14}\text{C}]$ alanine (et d'autres acides aminés) en présence séparément de chacun des quatre nucléoside triphosphates, indépendamment de l'état de purification des enzymes utilisés (Tableau 7).

Les polypeptide synthétases d'*Alcaligenes faecalis* préparées selon la nouvelle méthode présentent toutes les caractéristiques d'échange entre les nucléoside tri- et diphosphates homologues [2] et catalysent la synthèse des chaînes peptidiques [2].

comme celle de la $[^{14}\text{C}]$ alanine, a lieu en présence séparément de GTP, de CTP, d'UTP et d'ATP. Compte tenu de l'absence de compétition entre les acides aminés lors de la fixation dans du mRNA et des résultats présentés ici, nous en arrivons à la conclusion qu'il existerait pour chaque acide aminé un enzyme spécifique manifestant ses activités en présence, soit de quatre, soit de deux nucléoside triphosphates. Cependant il ne faut pas perdre de vue que les activités observées en présence de GTP et de CTP diffèrent nettement de celles observées en présence d'UTP et d'ATP. Doit on penser qu'il existerait deux protéines pour chaque acide aminé, l'une fonctionnant avec le GTP et le CTP et l'autre

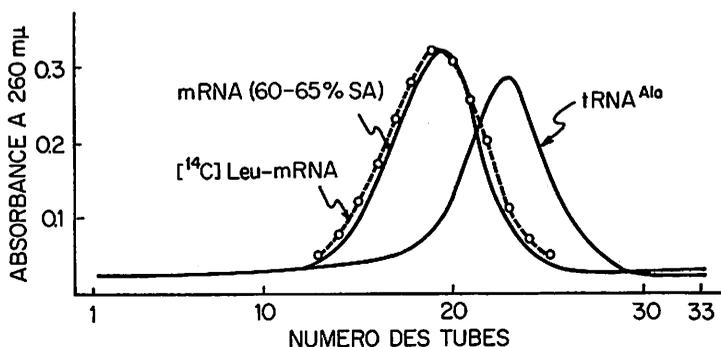


Fig. 7. Profil du tRNA^{Ala} purifié des levures (4 S) et du mRNA d'*Alcaligenes faecalis* obtenu après centrifugation séparément de chacun de ces RNA sur gradient de saccharose (5–20 g/100 ml de tampon succinate 0,25 M, pH 6,5) pendant 16 h (SW₃₀). L'incorporation de la $[^{14}\text{C}]$ leucine (ou d'autres acides aminés marqués au ^{14}C) a été réalisée en utilisant séparément chacune des fractions du gradient du mRNA d'*Alcaligenes faecalis*, en présence d'UTP et de fraction Gel S-1 (voir méthodes). 60–65% SA = 60 à 65% de la saturation en sulfate d'ammonium

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

La méthode [5] qui a servi pour la purification des enzymes utilisés dans nos travaux antérieurs présentait certains inconvénients. Selon l'échantillon de protamine (destinée à éliminer les acides nucléiques) le rendement en protéines enzymatiques variait fortement. L'essai utilisé pour déterminer les activités enzymatiques était trop laborieux et long. La méthode nouvelle, décrite ici, est simple. La colonne de DEAE-cellulose permet d'une part d'éliminer les acides nucléiques sans perte notable de protéines enzymatiques et d'autre part les activités pour la fixation de nombreux acides aminés dans le mRNA en présence de chacun des quatre nucléoside triphosphates ou de deux d'entre eux se trouvent groupées dans une région relativement étroite de l'éluat de la colonne. L'essai d'activité enzymatique est rapide et sensible. Il est basé sur la formation du complexe acide aminé-mRNA en présence de nucléoside triphosphates et de préparation enzymatique.

Nous avons mis en évidence que l'activité enzymatique spécifique de la $[^{14}\text{C}]$ leucine est séparable de celle qui catalyse la fixation de la $[^{14}\text{C}]$ alanine dans du mRNA. D'autre part la fixation de la $[^{14}\text{C}]$ leucine

avec l'UTP et l'ATP ? Les données actuelles ne permettent pas de trancher cette question.

Lorsqu'on compare les activités des polypeptide synthétases isolées d'*Alcaligenes faecalis* avec celles d'*Escherichia coli* (Tableau 3) on constate que pour certains acides aminés la fixation dans le mRNA n'a pas lieu en présence des mêmes nucléoside triphosphates. En effet la fixation de l'alanine avec les enzymes d'*Alcaligenes faecalis* a lieu en présence séparément de chacun des quatre NTP tandis que les enzymes d'*Escherichia coli* ne fonctionnent pour ce même acide aminé qu'en présence d'UTP et d'ATP. Ces différences tiennent probablement plus à la nature des polypeptide synthétases dans chaque espèce bactérienne qu'au mode d'isolement et de purification.

Les polypeptide synthétases purifiées catalysent la dégradation des nucléoside triphosphates en présence des acides aminés. L'échange entre le $[^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ et le PP_i du GTP, du CTP et d'UTP n'est observé ni en présence d'extraits bruts ni en présence de préparations enzymatiques purifiées: seul l'ATP échange son PP_i avec le $[^{32}\text{P}]\text{PP}_i$ en présence d'extraits bruts et de chaque acide aminé L utilisé. Par contre, en présence de la fraction enzymatique gel S-1

(ou même de la fraction DEAE-cellulose II) l'échange $[^{32}\text{P}]\text{PP}_1 \rightleftharpoons \text{ATP}$ n'est plus observé en présence soit d'alanine, de phénylalanine soit d'arginine. Ce résultat est confirmé par l'observation que le tRNA^{Ala} purifié et spécifique accepte cet acide aminé uniquement en présence d'ATP et exclusivement en présence d'extraits bruts. Le mRNA d'*Alcaligenes faecalis* est un excellent accepteur d'alanine (ou d'autres acides aminés) en présence séparément de chacun des quatre nucléoside triphosphates et d'enzymes purifiés ou d'enzymes présents dans l'extrait brut.

Les propriétés des polypeptide synthétases décrites ici montrent que ces enzymes particuliers et spécifiques utilisent selon la nature de l'acide aminé soit les quatre nucléoside triphosphates soit deux seulement pour l'attachement des acides aminés dans le mRNA. Le RNA actif dans ce système diffère du tRNA par sa masse moléculaire (Fig. 7) et par ses propriétés décrites précédemment [3]. Le mécanisme concernant l'activation des acides aminés (phosphorylation de l'enzyme) et le rôle des RNA matriciels (existence d'une famille des mRNA) seront présentés et discutés prochainement.

Ce travail a bénéficié de l'aide des National Institutes of Health, du Jane Goffin Childs Memorial Fund, de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, et du Commissariat à l'Energie Atomique. Nous remercions vivement M. Pierre Bourgarel pour sa participation efficace dans la réalisation de la partie technique de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

1. Beljanski, M., *Compt. Rend.* 250 (1960) 624.
2. Beljanski, M., et Beljanski, M., *Biochim. Biophys. Acta*, 72 (1963) 585.
3. Beljanski, M., Fischer, C., et Beljanski, M., *Compt. Rend.* 257 (1963) 547.
4. Beljanski, M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1645.
5. Beljanski, M., et Ochoa, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 44 (1958) 494.
6. Beljanski, M., Fischer, C., et Bourgarel, P., résultats non publiés.
7. Delsal, J. L., et Marihouri, H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40 (1958) 1623.
8. De Moss, J. A., et Novelli, G. D., *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 49.

C. Fischer-Ferraro et M. Beljanski
Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur
25 Rue du Docteur Roux, 75-Paris-15, France