

BIOCHIMIE. — *Nouvelle méthode de purification des polypeptide-synthétases.*

Note (*) de Mme CATALINA FISCHER-FERRARO et M. MIRKO BELJANSKI, transmise par M. Jacques Tréfouël.

Une méthode nouvelle de purification des polypeptide-synthétases à partir d'extraits d'*Alcaligenes faecalis* permet d'obtenir à rendement élevé des préparations enzymatiques substantiellement purifiées.

Nous avons montré que les polypeptide-synthétases purifiées forment, par l'intermédiaire de certaines fractions d'ARN bactérien des peptides de tailles variables (1). Avant d'être engagés en liaisons peptidiques, les acides aminés sont directement fixés sur une fraction d'ARN bactérien (2) ou viral [TYMV (3)] en présence soit de GTP, de CTP, d'UTP, soit d'ATP. Un complexe acide aminé-ARN fut isolé et ses propriétés décrites (3). Dans la nouvelle méthode nous évitons d'utiliser la protamine (4) qui entraîne des quantités importantes de protéines actives; les activités pour la fixation de tous les acides aminés sur l'ARN se trouvent groupées après une purification substantielle.

ESSAI ENZYMATIQUE. — Une unité enzymatique est définie comme quantité d'enzyme qui catalyse la fixation d'une millimicromole d'un *l*-acide aminé ¹⁴C sur l'ARN-m en 10 mn. L'activité spécifique est exprimée en nombre d'unités par milligramme de protéines. L'ARN d'*Alcaligenes f.* enrichi en ARN à marquage rapide (ARN-m) (3) est utilisé.

Le milieu d'incubation contient, en micromoles : MgCl₂, 2,0; tampon Tris, 50 (pH optimal, 7,6); X-R-P-P-P (ribonucléoside-5'-triphosphate), 0,5; *l*-acide aminé ¹⁴C, 1-2 mμmole (100 000 CPM); ARN-m, 50 μg; enzyme de 5 à 100 μg selon le degré de purification. Volume final : 0,8 ml, 10 mn à 32°. Le complexe « acide aminé-ARN-m » est précipité et lavé à l'aide de HClO₄ 0,3 N, puis la radioactivité déterminée. Les résultats sont exprimés soit en millimicromoles d'acide aminé lié à l'ARN, soit en CPM.

PURIFICATION DES POLYPEPTIDES-SYNTHÉTASES. — 1. *Extrait brut.* — Les bactéries d'*Alcaligenes faecalis* (100 g poids humide) suspendues dans 500 ml d'eau distillée sont détruites (Raythéon) (4). Après centrifugation de l'extrait à 10 000 × g pendant 30 mn, le surnageant est dialysé pendant 16 h contre du tampon phosphate 10⁻²M pH 7,4.

2. *Fraction 70 % S. A.* — L'extrait brut est dilué (10 mg/ml) avec du tampon phosphate 10⁻² M pH 7,4. Du (NH₄)₂SO₄ solide est ajouté (25 % de saturation pour *Alcaligenes f.* et 40 % pour *E. coli*). Après centrifugation, le surnageant est saturé à 70 % par SO₄(NH₄)₂, centrifugé; le précipité est dialysé une nuit contre le tampon utilisé. Toutes les opérations sont faites à 4° et le pH maintenu à 7,4.

3. *Fraction DEAE.* — La fraction 70 % S. A. (4 g) bentonitée est déposée sur une colonne de DEAE 30×5 cm, équilibrée avec du tampon Tris 10^{-2} M, pH 7,4; gradient d'éluion : tampon Tris 10^{-2} M (pH 7,4) 1000 ml : Tris + KCl 0,5 M 1000 ml. Les 200 fractions (10 ml/3 mn) obtenues sont testées pour fixer la leucine- ^{14}C en présence séparément d'ATP, d'UTP, GTP et CTP. Les fractions actives (de 120 à 165) sont réunies. Saturées par 70 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, les protéines sont centrifugées et dialysées contre du tampon Tris 10^{-2} M pH 7,4 pendant 3 h.

TABLEAU I.

Étapes de purification des polypeptide-synthétases.

Fractions.	mg de protéines.	Unités.			Activité spécifique.			D. O. 280 / 260	Rendement % UTP.
		GTP ou CTP.	UTP.	ATP.	GTP ou CTP.	UTP.	ATP.		
Extrait brut....	9 850	1590	7 200	19 800	0,16	0,76	2,00	0,62	100
Fraction 70 % S. A....	4 400	1585	7 300	21 000	0,36	1,82	5,14	0,62	100
DEAE.....	429	930	4 960	14 660	2,16	10,56	33,70	1,50	74
Gel S-1.....	150	900	5 300	14 812	6,00	40,06	92,00	1,60	74

TABLEAU II.

Présence dans la fraction DEAE d'activités pour la fixation de divers acides aminés ^{14}C sur l'ARN-m.

20 μg d'ARN et 100 μg d'enzyme sont utilisés.

Millimicromole d'acide aminé ^{14}C incorporé dans 20 μg d'ARN.

l-acides aminés.	Enzymes Alcaligènes.				Enzymes <i>E. coll.</i>			
	GTP.	CTP.	UTP.	ATP.	GTP.	CTP.	UTP.	ATP.
Leu.....	0,17	0,18	0,34	0,36	0,01	0,03	0,07	0,34
Val.....	0,08	0,10	0,11	0,12	0,10	0,12	0,13	0,12
Phe.....	0,04	0,06	0,05	0,05	—	—	—	—
Ala.....	0,14	0,10	0,26	0,29	0,03	0,02	0,18	0,20
Ser.....	0,02	0,01	0,13	0,14	—	—	—	—
Gly.....	0,25	0,28	0,38	0,40	—	—	—	—
Arg.....	0,01	0,01	0,10	0,15	0,10	0,12	0,14	0,13
Lys.....	0,01	0,01	0,06	0,10	0,08	0,08	0,18	0,17
Thr.....	—	—	0,09	0,12	—	—	—	—
Met.....	0,04	0,04	0,36	0,34	—	—	—	—
Iso.....	0,01	0,01	0,08	0,07	—	—	—	—

4. *Gel S-1.* — La fraction DEAE (300 mg) est mise en contact 10 mn avec 500 mg de gel de phosphate de calcium (poids sec); pH 5,7. On centrifuge 10 mn à 10 000 g et le surnageant est saturé par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 %). Après centrifugation, le précipité est dialysé contre du tampon Tris 10^{-2} M pH 7,4 pendant 2,30 h (gel S-1).

RÉSULTATS. — Les activités enzymatiques (tableau I) pour la fixation de leu-¹⁴C sur l'ARN-m en présence de GTP et de CTP sont pratiquement identiques et vont de pair au cours de la purification; celles en présence d'UTP et d'ATP semblent associées. La large spécificité observée entre les acides aminés et les X-R-P-P-P dépend également de la source de préparation enzymatique (tableau II); soulignons que les X-R-P-P-P ne sont pas incorporés dans du matériel acidoprécipitable. La quantité de

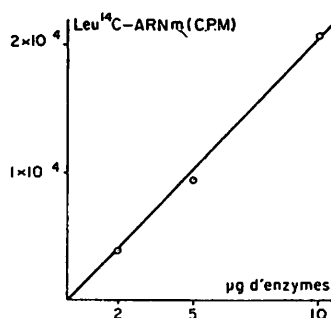


Fig. 1 (voir le texte).

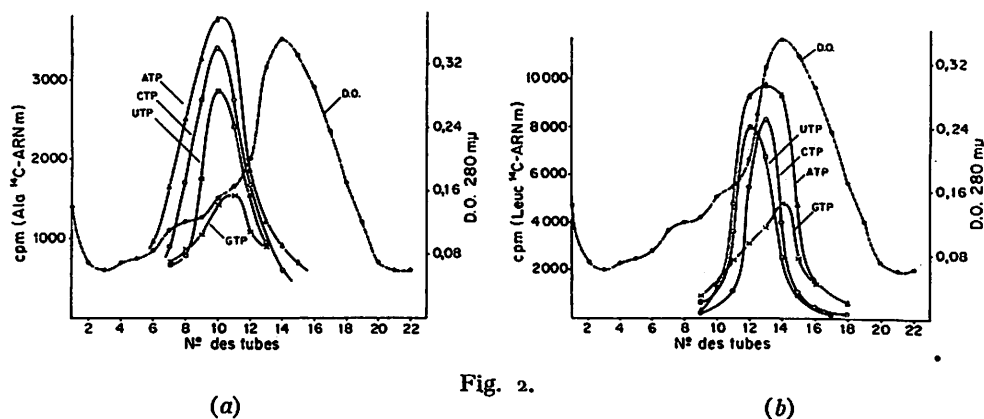


Fig. 2.

1/10 à 1/3 de chaque fraction d'enzyme après centrifugation sur gradient de saccharose est utilisé pour former le complexe.
(a) Ala ¹⁴C-ARN; (b) Leu-¹⁴C-ARN.

leu-¹⁴C (*fig. 1*) liée à l'ARN-m en présence de X-R-P-P-P (UTP) est proportionnelle à la quantité de protéines lorsque l'ARN-m est en excès.

Existe-t-il une enzyme spécifique pour chaque acide aminé? Les activités pour chacun des quatre X-R-P-P-P sont-elles une seule protéine? La fraction gel S-1 (1,5 mg), après centrifugation sur gradient de saccharose (5 à 20 %) à 40 000 tr/mn (18 h) présente un seul pic (6 S) de densité optique (280 m μ) (masse moléculaire apparente : 80 000). L'activité pour la fixation de la leucine est séparable de celle de l'alanine (*fig. 2*). Pour un acide aminé donné (ala ou leu) les activités (³) en présence séparément de GTP, d'UTP, de CTP et d'ATP ne semblent pas dissociables.

TABLEAU III.

Échange $^{32}\text{PP} \rightleftharpoons \text{X-R-P-P-P}$,Enzyme : 100 μg . Temps d'incubation : 15 mn; méthode d'échange (1).

	Extrait brut.				Enzyme Gel S — 1.			
	CPM de ^{32}PP incorporé dans				CPM de ^{32}PP incorporé dans			
L-acides aminés.	GTP.	CTP.	UTP.	ATP.	GTP.	CTP.	UTP.	ATP.
Sans.....	98	86	100	116	89	100	96	220
18 acides aminés.....	104	96	99	10 630	76	84	89	11 103
<i>l</i> -leucine.....	120	104	100	9 610	80	91	93	10 300
<i>l</i> -valine.....	101	100	103	9 430	78	90	85	5 230
<i>l</i> -alanine.....	99	108	110	1 150	68	74	72	230
<i>l</i> -phénylalanine.....	112	96	101	1 110	92	81	86	210

Cations métalliques. — Le Mg^{++} est indispensable pour les activités en présence de CTP, ATP, UTP et GTP. Mn^{++} à dose égale remplace le Mg^{++} uniquement en présence d'ATP et d'UTP. Zn^{++} et Co^{++} sont inactifs.

Échange $^{32}\text{PP} \rightleftharpoons \text{X-R-P-P-P}$. — Les polypeptides-synthétases dégradent, en présence d'acides aminés, les X-R-P-P-P sans catalyser l'échange $^{32}\text{P} \rightleftharpoons \text{X-R-P-P-P}$ (1). Aucun échange n'est observé entre le ^{32}PP et les GTP, CTP et UTP en l'absence ou en présence d'acides aminés (tableau III). Cependant, l'échange $\text{ATP} \rightleftharpoons ^{32}\text{PP}$ est catalysé par l'extrait brut en présence des acides aminés indiqués alors que la fraction gel S-1 ne le catalyse qu'en présence de *l*-val et *l*-leu. L'activité spécifique d'échange $\text{ATP} \rightleftharpoons ^{32}\text{PP}$ n'augmente pas au cours de la purification. Rappelons que les polypeptides-synthétases catalysent l'échange entre un X-R-P-P-P et le X-R-P-P homologue (1).

(*) Séance du 4 janvier 1967.

(1) M. BELJANSKI et M^{me} M. BELJANSKI, *Bioch. Biophys. Acta*, 72, 1963, p. 585.

(2) M. BELJANSKI, M^{me} C. FISCHER et M^{me} M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 257, 1963, p. 547.

(3) M. BELJANSKI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, 1965, p. 1645.

(4) M. BELJANSKI et S. OCHOA, *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 44, 1958, p. 494.

(5) Après gradient de saccharose on constate une perte sensible d'activité surtout en présence de GTP.

(Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)