

BBA 8298

"ACIDE AMINÉ-ACIDE RIBONUCLÉIQUE", INTERMÉDIAIRE
DANS LA SYNTHÈSE DES LIAISONS PEPTIDIQUES. VI

MIRKO BELJANSKI ET MONIQUE BELJANSKI

Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris (France)

(Reçu le 22 février 1963)

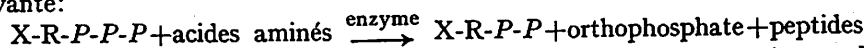
SUMMARY

"Amino acid-RNA", an intermediate in the formation of peptide bonds

Formation of peptides from free amino acids by purified enzymes of *Alcaligenes faecalis* requires an RNA fraction. This RNA is capable of fixing all L-amino acids "activated" in the presence of each of the four ribonucleoside 5'-triphosphates and purified polypeptide synthetases. An "amino acid-RNA" complex was isolated. The acceptor fraction was identified as rapidly labelled RNA containing both "messenger" and eosomal RNA. Base analogs incorporated into this fraction modify its capacity for amino acids fixation.

INTRODUCTION

Nous avons décrit précédemment les propriétés d'enzymes solubles caractérisés d'une part par leur capacité à échanger les ribonucleoside 5'-diphosphates avec les ribonucleoside 5'-triphosphates homologues¹ et d'autre part par leur propriété d'activer l'incorporation des acides aminés dans des fragments subcellulaires d'*Alcaligenes faecalis*². Par la suite nous avons montré que ces mêmes préparations enzymatiques en présence de divers acides aminés et de ribonucleoside 5'-triphosphates donnent lieu à la synthèse d'une variété de peptides de faible poids moléculaire³. Nous avons établi la stoechiométrie de ces réactions qui se produisent vraisemblablement de la façon suivante:



Nos préparations enzymatiques ne semblaient pas exiger la présence d'une fraction de RNA pour les réactions étudiées. A la suite de purifications plus poussées nous avons observé que les réactions catalysées par ces enzymes se produisaient à un taux maximum en présence de certaines fractions de RNA. Dans ce travail nous étudions tout particulièrement la formation et les propriétés d'un complexe entre les L-acides aminés et une fraction de RNA. Une note brève a résumé des résultats préliminaires⁴.

Abréviations: r-RNA, RNA ribosomal; s-RNA, RNA de transfert; rm-RNA, RNA ribosomal + RNA à marquage rapide; AA-RNA, complexe entre acide aminé et RNA; AA-rm-RNA, complexe entre acide aminé et rm-RNA; aza-GTP, azaguanosine triphosphate; PCMB, *p*-chloro-mercurobenzoate; poly-AGUC et poly-U, polynucléotides synthétisés par la polynucléotide phosphorylase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Provenance des produits utilisés

L-Acides aminés uniformément marqués au ^{14}C : Institut Pasteur; L- et D- ^{12}C acides aminés: "Calbiochem", Hoffmann-La Roche; ribonucléoside 5'-mono-, di- et triphosphates (sel de sodium), desoxyribonucléoside 5'-triphosphates: Sigma Chemical Company, Schwarz BioResearch, Inc., Mann Research Laboratories; ^{14}C ADP et ^{14}C ATP: Schwarz BioResearch, Inc.; 5-fluorouracile offert par Hoffmann-La Roche; azaguanine, ^{14}C uracile et 5-fluoro- ^{14}C uracile, "Calbiochem"; RNAase et DNAase: Worthington Biochemical Company. H_3PO_4 marqué au ^{32}P : Commissariat à l'Énergie Atomique; 5-fluoro-UTP et aza-GTP nous ont été aimablement donnés par le Dr. R. B. Ross, Cancer Chemotherapy, National Service Center, Public Health Service, Bethesda, Md. (U.S.A.); 5-fluoro-UDP et 5-fluoro-deUTP offerts par le Dr. C. HEIDELBERGER. PCMB, iodoacétate et DFP sont des produits commerciaux.

Préparations enzymatiques

Elles ont été obtenues à partir d'extraits solubles d'*Alcaligenes faecalis* d'après la méthode publiée comportant cinq étapes⁵. Une purification plus poussée des fractions 0.40-0.70 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Étape 5) est obtenue en utilisant une colonne de DEAE équilibrée par le tampon Tris 0.01 M, pH 7.4. Les protéines sont éluées à l'aide d'un gradient de KCl (0.1-0.6 M); les échantillons sont précipités par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0.70 de saturation; après dialyse contre du tampon Tris 0.01 M, pH 7.4, les activités d'échange ($\text{X-R-P-P} \rightleftharpoons \text{X-R-P-P-P}$), de libération d'orthophosphate et la formation du complexe "AA-ARN" ont été déterminées dans diverses fractions. Les trois activités sont tout particulièrement présentes dans les éluats 0.2-0.3 M de KCl. Pour obtenir des préparations enzymatiques contenant moins de 0.2 % d'acides nucléiques, la quantité de protamine (Étape 4) a été augmentée de 25 %. Avant leur utilisation les fractions d'enzymes ont été traitées par la bentonite⁶.

Préparation des acides nucléiques

Dans les expériences préliminaires le r-RNA et le s-RNA ont été isolés au phénol à partir de ribosomes ou de surnageant à $105\,000 \times g$ provenant de bactéries d'*Alcaligenes faecalis* broyées en présence de MgCl_2 10^{-2}M (ref. 7). Nous isolons maintenant les acides nucléiques par une méthode voisine de celle d'OFENGAND *et al.*⁸. Les bactéries lavées, sont resuspendues dans du tampon Tris 0.01 M, pH 7.0, et additionnées de lauryl sulfate à 1.5 % (concentration finale). Le mélange est porté à 100° pendant 3 min (ou simplement agité pendant 5 min à la température du laboratoire en présence de MgCl_2 10^{-2}M et de bentonite 0.2 % (concentration finale). Le s-RNA est extrait à l'aide de NaCl 1.5 M (refs. 8, 9) et le RNA non extractible dans ces conditions est extrait au phénol. Il est désigné par le sigle rm-RNA. Les solutions d'acides nucléiques sont ensuite traitées par la DNAase (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) puis déprotéinées par la méthode de SEVAG¹⁰. Le DNA a été préparé à partir d'acides nucléiques totaux isolés au phénol puis traités par la RNAase (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et enfin déprotéinés. Les acides nucléiques ont été reprécipités plusieurs fois par l'alcool à 95° , resuspendus dans de l'eau distillée, dialysés d'abord 4 min contre une solution d'ammoniaque 0.01 N puis 6 h contre de l'eau distillée et enfin traités par la bentonite⁸. Le RNA à

renouvellement rapide (contenant selon les données actuelles le RNA "messenger" et une fraction de RNA (éosomal) précurseur de r-RNA), a été caractérisé sur un gradient de sucrose¹¹ à partir du RNA total isolé des bactéries marquées pendant 30 sec par le [³²P]orthophosphate soit par le [¹⁴C]uracile (ou le 5-fluoro-[¹⁴C]uracile). Les RNA contenant le 5-fluorouracile ou le azaguanine ont été isolés à partir de bactéries auxquelles, en phase exponentielle de croissance, furent ajoutés des analogues (10 à 25 µg/ml) pour des temps variables. La quantité de RNA a été déterminée colorimétriquement¹² et par absorption à 260 mµ. Le DNA fut dosé par la méthode de DISCHE¹³.

Formation et isolement du complexe "[¹⁴C]AA-RNA"

Le milieu d'incubation pour la formation du complexe est le suivant: MgCl₂, 5 µmoles; tampon de Tris (pH 8.0), 50 µmoles; KF, 2 µmoles ribonucléoside 5'-triphosphate, 0.5-2.0 µmoles; RNA, 200 µg (soit s-RNA, DNA ou polynucléotides synthétiques); le [¹⁴C]acide aminé, 3-50 mµmoles (1 · 10⁵ à 2 · 10⁵ coups/min); préparations enzymatiques, 50 µg; volume final, 1 ml. Incubation, sauf indication, 20 min. Température, 30°. Le complexe "AA-rm-RNA" est précipité par HClO₄ 0.3 M (concentration finale) à 4°. 150 µg de RNA des levures et 300 µg d'albumine de sérum sont alors ajoutés comme entraîneurs. Dans de telles conditions le complexe "AA-rm-RNA" est stable pendant plusieurs heures. Le précipité séparé par centrifugation est lavé deux fois avec HClO₄ 0.3 M puis redissout dans l'ammoniaque 1 N. Les échantillons sont séchés et la radioactivité déterminée dans un compteur Tracerlab à fenêtre mince. Les résultats corrigés pour l'autoabsorption sont exprimés en mµmoles de [¹⁴C]acides aminés incorporés dans 200 µg de rm-RNA, ou par nombre de coups/min.

RÉSULTATS

Propriétés des préparations enzymatiques

Nous avons comparé en cours de purification les diverses activités des polypeptide synthétases. Le Tableau I résume les résultats et montre que les trois réactions d'échange (X-R-P-P ⇌ X-R-P-P-P), de libération d'orthophosphate et de formation du complexe "AA-rm-RNA" sont catalysées dans les mêmes proportions par les mêmes fractions enzymatiques. On observe en particulier que la quantité de [¹⁴C]-alanine fixée sur le rm-RNA est du même ordre que la quantité d'orthophosphate libéré. Dans nos conditions données de fixation des acides aminés sur le rm-RNA la formation de peptides est négligeable. Nos résultats antérieurs ont montré qu'il y avait une stoechiométrie entre les liaisons peptidiques formées et l'orthophosphate libéré³.

Diverses caractéristiques de ces préparations enzymatiques ont été déjà décrites⁶. Rappelons cependant que la réaction d'échange entre le [³²P]diphosphate et l'un des quatre ribonucléoside 5'-triphosphates en présence de chacun des vingt L-acides aminés n'est pas catalysée par les polypeptide synthétases sauf, occasionnellement avec ATP en présence de L-valine ou de L-leucine. Précisons également que nous n'avons pu déceler d'échange significatif entre le [³²P]orthophosphate et les ribonucléoside 5'-triphosphates ni en absence ni en présence de rm-RNA et de L-acides aminés.

TABLEAU I

COMPARAISON DES ACTIVITÉS DES POLYPEPTIDE SYNTHÉTASES AU COURS DE LA PURIFICATION
Echange et libération d' orthophosphate ont été déterminés selon les méthodes décrites¹¹. La quantité de [¹⁴C]alanine incorporée dans le rm-RNA fut calculée d'après les valeurs prises entre la 15ème et la 20ème minute d'incubation (incorporation linéaire en présence d'ATP).

Fractions enzymatiques	µmoles/mg de protéines/h			
	Echange $X-R-P-P \rightleftharpoons X-R-P-P$	Phosphore libéré	[¹⁴ C]Alanine incorporée dans le rm-RNA	Rapport $\frac{P \text{ libéré}}{\text{Alanine incorporée}}$
1. Extrait	75	—	—	—
2. 0.25-0.70 (NH ₄) ₂ SO ₄	150	—	—	—
3. Ca ₃ (PO ₄) ₂ , éluat	420	0.19	0.17	1.10
4. Protamine, surnageant	1800	0.73	0.78	0.94
5. 0.40-0.70 (NH ₄) ₂ SO ₄	4500	1.54	1.38	1.10
6. DEAE, éluat	18130	6.70	5.90	1.14

Effet des acides nucléiques sur la libération d'orthophosphate et sur la synthèse des peptides

Dans nos expériences précédentes les fractions actives (Fraction 5) dans la libération d'orthophosphate et dans la synthèse peptidique contenaient 1-3 % d'acides nucléiques. De telles préparations catalysaient la dégradation des ribonucléoside triphosphates et la synthèse des peptides sans addition de RNA exogène. Lorsque les préparations enzymatiques plus purifiées contiennent moins de 0.2 % de matériel nucléotidique la libération d'orthophosphate et la synthèse des peptides sont tout à fait ralenties (Tableaux II et III). L'addition de rm-RNA dans les conditions de nos expériences influence dans les mêmes proportions les deux réactions tandis que le s-RNA et le DNA sont sans effet⁴. La spécificité des ribonucléoside 5'-triphosphates pour les groupes d'acides aminés³ est essentiellement la même en présence ou en absence de rm-RNA. Toutefois dans les mêmes conditions le rm-RNA stimule la dégradation de ceux des nucléotides faiblement dégradés en l'absence d'acides nucléiques. Notons que les nucléotides suivants: aza-GTP, 5-fluoro-UTP, ribonucléoside 5'-diphosphates, désoxyribonucléoside 5'-triphosphates ne sont pas dégradés par les polypeptide synthétases.

TABLEAU II

EFFET DE RM-RNA SUR LA DÉGRADATION DES RIBONUCLÉOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES EN PRÉSENCE D'ACIDES AMINÉS

µmoles/ml: ribonucléoside 5'-triphosphates, 2.0; L-alanine, 6.0; tampon Tris (pH 8.0), 100; KF, 2; MgCl₂, 5.0; acides nucléiques, 30 µg; enzymes (Fraction 5), 300 µg; les inhibiteurs ont été pré-incubés avec de l'enzyme pendant 5 min à la température du laboratoire.

	µmole de phosphore minéral libéré			
	ATP	GTP	aza-GTP	UTP
Milieu complet	0.40	0.21	0.07	0.19
Sans MgCl ₂	0.01	0.01	0.01	0.01
Sans alanine	0.01	0.01	0.01	0.01
Sans rm-RNA	0.10	0.04	0.01	0.01
rm-RNA après RNAase	0.11	0.04	—	0.05
rm-RNA + iodoacétate 10 ⁻³ M	0.40	0.21	—	0.20
rm-RNA + PCMB 10 ⁻⁵ M	0.10	0.03	—	0.02
rm-RNA + DFP 10 ⁻³ M	0.41	0.20	—	0.18

TABLEAU III

ANALYSE DES PEPTIDES À [¹⁴C]ALANINE FORMÉS EN PRÉSENCE D'ATP

μmoles/ml: ATP, 2.5; MgCl₂, 5.0; tampon Tris (pH 8.0), 100; L-[¹⁴C]alanine 6.0 (1.5-2.0 · 10⁶ coups/min); acides nucléiques, 30 μg; enzymes (Fraction 5), 400 μg; incubation 2 h à 32°.

	μmole de [¹⁴ C]alanine dans peptides	μmole de [¹⁴ C]alanine dans dipeptide	μmole de [¹⁴ C]alanine dans térapeptide
Milieu complet	0.94	0.16	0.78
Sans rm-RNA	0.12	0.12	pas
rm-RNA + DFP 10 ⁻³ M	0.96	0.17	0.79

Incorporation des [¹⁴C]acides aminés dans le rm-RNA

Le rôle activateur du rm-RNA dans la réaction de libération d'orthophosphate et dans la synthèse des peptides, suggère que cet RNA est un intermédiaire dans la formation des liaisons peptidiques. Nous avons cherché les conditions permettant l'incorporation des acides aminés dans le rm-RNA. Les résultats présentés dans le tableau montrent en effet qu'un complexe "[¹⁴C]AA-rm-RNA" peut être isolé sous forme de précipité stable en présence de HClO₄ (Tableau IV). En milieu fortement alcalin (pH > 10) l'acide aminé est libéré du RNA et se trouve sous forme libre.

TABLEAU IV

μμMOLES DE [¹⁴C]ACIDE AMINÉ INCORPORÉ DANS 200 μg DE RM-RNA

Conditions décrites dans le texte. Incubation à 30° pendant 10 min pour [¹⁴C]leucine et 25 min pour [¹⁴C]alanine.

Conditions	[¹⁴ C]Alanine		[¹⁴ C]Leucine	
	ATP	GTP	UTP	CTP
Milieu complet	1.15	0.63	0.87	0.96
Sans nucléotide	0.05	0.04	0.06	0.04
Sans MgCl ₂	0.03	0.03	0.04	0.03
Sans enzyme	0.03	0.03	0.03	0.04
Sans rm-RNA	0.04	0.02	0.03	0.04
rm-RNA chauffé à 100° 15 min à pH 7.0	1.13	0.67	0.84	0.89
s-RNA sans rm-RNA	0.22	0.18	0.20	0.26
DNA sans rm-RNA	0.08	0.06	0.06	0.07
Poly-U sans rm-RNA	0.06	0.05	0.05	0.04
Poly-AGUC sans rm-RNA	0.07	0.05	0.04	0.04
rm-RNA + s-RNA (100 μg)	1.04	0.57	0.84	0.93
rm-RNA après RNAase	0.06	0.05	0.07	0.08
rm-RNA + DFP 10 ⁻³ M	1.12	0.60	—	—
rm-RNA + orthophosphate 2 μM	0.48	0.26	0.31	0.25
rm-RNA + diphosphate 2 μM	0.28	0.23	—	—
RNA de l'enzyme	1.03	0.51	—	0.82
Milieu complet + PCMB 10 ⁻⁴ M	0.20	0.12	—	—
Milieu complet + iodoacétate 10 ⁻² M	1.30	0.50	—	—
Milieu complet + NH ₂ OH 1M	0.03	0.02	0.04	0.05

Dans les conditions choisies la formation du complexe "AA-rm-RNA" dépend de la concentration en Mg²⁺ et du pH de la solution tampon (Figs. 1 et 2). Le tableau IV montre que le rm-RNA n'est pas remplaçable par s-RNA, DNA, AGUC et poly-U.

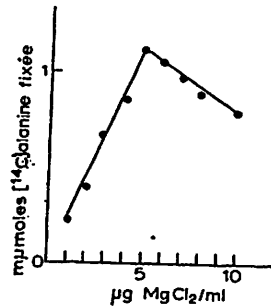


Fig. 1. Effet de $MgCl_2$ sur la formation du complexe "AA-rm-RNA". Conditions identiques à celles du Tableau IV.

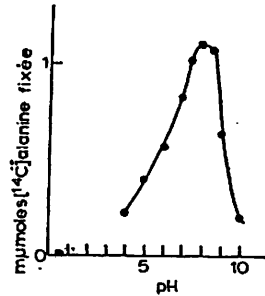


Fig. 2. Incorporation d'acides aminés dans le rm-RNA à différents pH. Des solutions tampon de cacodylate et de Tris ont été utilisées.

Le DFP et l'iodoacétate sont sans effet sur les activités enzymatiques, tandis que le PCMB est un inhibiteur puissant. En présence de NH_2OH 1 M on n'observe pas la formation du complexe.

En présence de fortes concentrations d'enzymes et de 200 μg de rm-RNA la fixation des acides aminés est proportionnelle, pour des faibles concentrations, aux ribonucléoside 5'-triphosphates, jusqu'à un niveau maximum où s'observe alors une inhibition en présence d'un excès de nucléotides (Fig. 3).

Les ribonucléoside 5'-monophosphates: AMP, GMP, UMP et CMP n'ont pas d'effet sur la formation du complexe "AA-rm-RNA" (Fig. 4). Par contre les

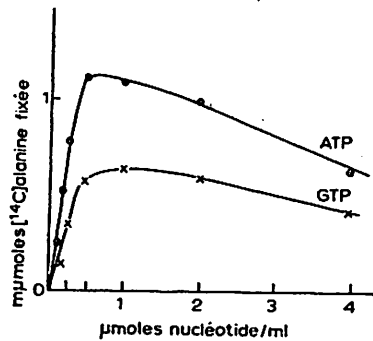


Fig. 3. Formation du complexe "AA-rm-RNA" en présence de diverses concentrations en ribonucléoside 5'-triphosphates. Conditions décrites dans le texte. Enzymes (Fraction 5).

ribonucléoside 5'-diphosphates: ADP, GDP, UDP et CDP ajoutés en même temps que les ribonucléoside triphosphates, inhibent fortement la formation du complexe. Il est intéressant de remarquer que les désoxyribonucléoside 5'-triphosphates possèdent un très fort pouvoir inhibiteur (particulièrement le fluoro-deUTP contenant le 5-fluorouracile (Fig. 4).

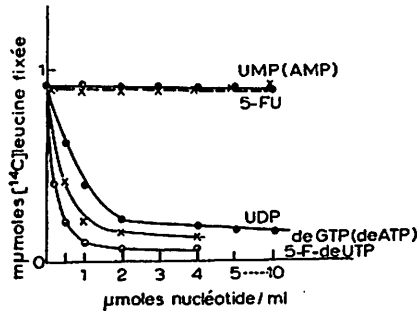


Fig. 4. Effet de divers nucléotides sur la formation du complexe "AA-rm-RNA". Conditions décrites dans le texte. Les différents nucléotides ont été ajoutés au milieu d'incubation en même temps que l'UTP. 5-FU, 5-fluorouracile; 5-F-deUTP, 5-fluorodésoxyuridine triphosphate.

La cinétique d'incorporation des acides aminés dans le rm-RNA est illustrée par la Fig. 5.

Pour des faibles concentrations de rm-RNA, la quantité de [¹⁴C]acides aminés

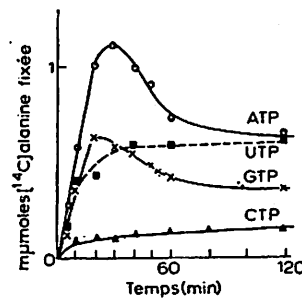


Fig. 5. Cinétique d'incorporation de [¹⁴C]alanine dans le rm-RNA. Conditions décrites dans le texte.

fixés est proportionnelle à la quantité de rm-RNA en présence d'un excès d'enzyme (Fig. 6).

La fixation d'acides aminés sur le rm-RNA est proportionnelle à la quantité d'enzyme lorsque celui-ci est utilisé en faible concentration (Fig. 7).

Pour des quantités inférieures à la saturation la fixation d'acides aminés sur le rm-RNA est proportionnelle à la concentration en acides aminés et le maximum est atteint environ à 10^{-5} M (Fig. 8).

Nous avons vérifié que les fractions enzymatiques actives étaient capables de former un complexe entre le rm-RNA et les acides aminés suivants: Ala, Leu, Val, His, Phe, Ser, Arg, Pro, Gly, Tyr, Glu, Ileu, Lys, Try, Met. Les conditions de fixation

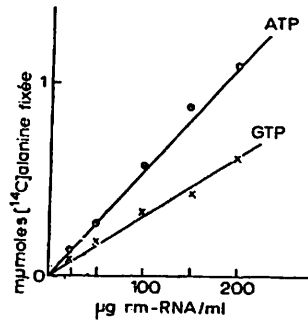


Fig. 6. Formation du complexe "AA-rm-RNA" en fonction de la concentration en rm-RNA. Conditions décrites dans le texte.

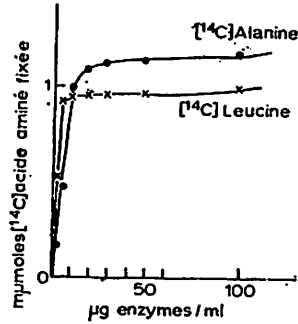


Fig. 7. Effet de diverses concentrations d'enzymes sur la formation du complexe "AA-rm-RNA". Conditions décrites dans le texte. Enzyme (Fraction 6).

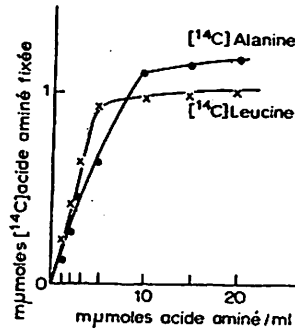


Fig. 8. Formation du complexe "AA-rm-RNA" en présence de diverses concentrations en [¹⁴C]acides aminés. Conditions décrites dans le texte. Enzyme (Fraction 5).

maximum ont été établies pour: Ala, Leu, Val, Phe, Lys. Les valeurs données pour les autres acides aminés ont été prises à la vingtième minute d'incubation dans les conditions décrites (Tableau V).

Spécificité des acides aminés dans la formation du complexe "AA-rm-RNA"

Les données précédentes suggèrent que la fraction de rm-RNA utilisée peut fixer au maximum une quantité limitée d'acides aminés. Les résultats présentés dans le

TABLEAU V

mμMOLES DE [¹⁴C]ACIDE AMINÉ INCORPORÉ DANS 200 μg DE rm-RNA
 Nucléotides utilisés: ATP (Ala, Lys); GTP (Arg); CTP (Leu, Phe, Val, His). Enzymes, 20 μg
 (Fraction 6).

	mμmoles
[¹⁴ C]Ala	1.15
[¹⁴ C]Lys	1.00
[¹⁴ C]Leu	0.96
[¹⁴ C]Phe	0.74
[¹⁴ C]Val	0.80
[¹⁴ C]Arg	0.66
[¹⁴ C]His	0.41

tableau montrent que la somme des acides aminés fixés sur le rm-RNA dans les meilleures conditions de fixation correspond à la somme de chacun d'entre eux individuellement incorporés (Tableau VI). Il semble donc d'après ces résultats que chaque acide aminé se fixe sur le RNA indépendamment de la présence d'autres acides aminés c'est à dire qu'il n'y a pas de compétition pour les sites accepteurs. Confirmant ces observations les résultats présentés dans le Tableau VII montrent que de très fortes concentrations en un [¹²C]acide aminé (L- ou D-) ou en un mélange de [¹²C]acides aminés n'influencent ni la cinétique ni le taux de fixation du [¹⁴C]acide aminé. Nous concluons de cet ensemble de résultats que le système enzymatique possède une spécificité presque absolue dans le choix des L-acides aminés en présence du rm-RNA.

TABLEAU VI

INCORPORATION DE PLUSIEURS L-ACIDES AMINÉS DANS 200 μg DE rm-RNA
 Nucléotides utilisés en présence de divers acides aminés sont ceux du Tableau V.

	mμmoles
[¹⁴ C]Ala	1.18
[¹⁴ C]Ala + [¹⁴ C]Leu	2.31
[¹⁴ C]Ala + [¹⁴ C]Leu + [¹⁴ C]His	2.98
[¹⁴ C]Ala + [¹⁴ C]Leu + [¹⁴ C]His + [¹⁴ C]Phe	3.70
[¹⁴ C]Ala + [¹⁴ C]Leu + [¹⁴ C]His + [¹⁴ C]Phe + [¹⁴ C]Lys	4.68

TABLEAU VII

INCORPORATION DE [¹⁴C]ALANINE ET DE [¹⁴C]LEUCINE EN PRÉSENCE DE [¹²C]ACIDE AMINÉ
 Conditions dans la légende du Tableau IV. Les D- et L-[¹²C]acides aminés ajoutés au temps zéro.

	mμmole de [¹⁴ C]acide aminé incorporé dans 200 μg de rm-RNA	
	[¹⁴ C]Alanine ATP	[¹⁴ C]Leucine UTP
Milieu complet	1.15	0.87
Milieu complet + L-[¹² C]Ala 5 μM	0.04	0.93
Milieu complet + D-[¹² C]Ala 5 μM	1.04	0.90
Milieu complet + L-[¹² C]Leu 5 μM	1.14	0.03
Milieu complet + D-[¹² C]Leu 5 μM	1.08	0.88
Milieu complet + L-[¹² C]His 5 μM	1.06	0.82
Milieu complet + L-[¹² C]Arg 5 μM	1.09	0.85

Identification de la fraction de RNA accepteur d'acides aminés

Nous avons cherché à déterminer quelle était la fraction de RNA responsable de la fixation des acides aminés. On sait que les bactéries contiennent principalement trois tailles de RNA (23 S, 16 S et 4 S) séparables en particulier à l'aide d'un gradient de sucrose. Nous montrons que le RNA à renouvellement rapide marqué pendant 30 sec à l'aide de [¹⁴C]uracile présente une courbe large et étendue (Fig. 9) caractéristique de ce type de RNA. Par contre les autres fractions de RNA ne sont pas

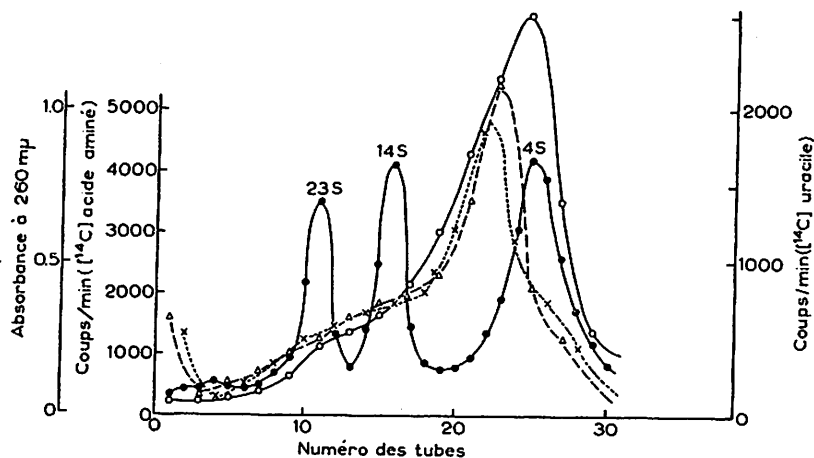


Fig. 9. Profil des RNA d' *Alcaligenes faecalis* après gradient de sucrose. Le RNA marqué (36 sec) au [¹⁴C]uracile est centrifugé pendant 16 h (SW 25) à 25 000 rev./min (Spinco) dans un gradient linéaire de sucrose 5-20 % contenant 0.01 M de Tris (pH 7.2) et 0.1M de NaCl. Lecture à 260 mμ contre H₂O distillée. L'absorption due au sucrose n'a pas été retranchée. Les résultats de l'incorporation des [¹⁴C]acides aminés dans le RNA de chaque fraction du gradient sont exprimés en nombre de coups/min. Les valeurs de la radioactivité correspondant au [¹⁴C]uracile dans le RNA ont été déduites. ●-●, absorbance; ○-○, [¹⁴C]uracile; x---x, [¹⁴C]alanine; △--△, [¹⁴C]valine.

marquées dans ces conditions en présence de [¹⁴C]uracile, pendant les temps indiqués. Nous avons examiné la capacité de chacune des fractions du gradient à former le complexe avec les [¹⁴C]acides aminés en présence d'un des ribonucléoside 5'-triphosphate et d'un excès d'enzyme. Les résultats sont exprimés en nombre de coups/min par échantillon. Il est étonnant de constater que la courbe du complexe "[¹⁴C]AA-RNA" ne suit pas celle des densités optiques des divers types de RNA (Fig. 9). Elle se superpose pratiquement à la courbe du RNA à marquage rapide par le [¹⁴C]uracile. Pour divers [¹⁴C]acides aminés (Ala, Leu, Val, Lys, Phe) fixés chacun individuellement sur la fraction "active" de RNA nous avons obtenu des courbes du complexe "AA-RNA" semblables à celles présentées dans la figure.

Nous avons pensé que l'incorporation de deux analogues, le 5-fluorouracile et le azaguanine dans le RNA à marquage rapide nous permettrait de démontrer d'une autre façon le rôle de ce RNA dans la formation du complexe avec les acides aminés. Il est connu que ces deux analogues s'incorporent dans les acides nucléiques^{14,15} et modifient la distribution des acides aminés dans les protéines¹⁶ ou ceux du pool¹⁷. Nous avons tout d'abord constaté (Fig. 9), comme pour le [¹⁴C]uracile que seule la

fraction de RNA à renouvellement rapide contenant du messenger se marque en présence de 5-fluoro^[14C]juracile. Ce RNA contenant soit du 5-fluorouracile soit du azaguanine présente des modifications de la fixation et de la distribution des acides aminés liés au RNA actif. Remarquons en particulier le cas de l'histidine dont l'incorporation dans le 5-fluoro-rm-RNA, contrairement aux autres acides aminés essayés, est fortement augmentée. En revanche l'azaguanine-rm-RNA se présente comme un mauvais accepteur des acides aminés (Tableaux VIII et IX). L'ensemble de

TABLEAU VIII

INCORPORATION DE ^[14C]ACIDES AMINÉS DANS 200 µg DE rm-RNA CONTENANT DU 5-FLUOROURACILE
Ribonucléoside 5'-triphosphates indiqués dans la légende du Tableau V, ont été utilisés. Enzyme (Fraction 5); incubation 20 min à 32°. Les valeurs pour le rm-RNA au temps zéro, sont prises comme 100. Pourcentage de fixation exprimé par rapport au rm-RNA au temps 5 min.

	Temps d'incorporation du 5-fluorouracile dans le rm-RNA				Pourcentage de fixation (5 min)
	0 min (µmoles)	0.5 min (µmoles)	2.5 min (µmoles)	5 min (µmoles)	
Ala	100	85	68	45	55
Leu	100	72	53	37	63
Lys	100	85	51	48	52
Val	100	92	51	47	53
His	100	200	178	196	200

TABLEAU IX

INCORPORATION DE ^[14C]ACIDES AMINÉS DANS 200 µg DE rm-RNA CONTENANT L'AZAGUANINE
Conditions identiques à celles du Tableau VIII. Azaguanine-rm-RNA isolé des bactéries préincubées en présence d'azaguanine pendant 5 min. Enzyme (Fraction 5).

	rm-RNA (µmoles)	Azaguanine-rm-RNA (µmoles)	Inhibition (%)
Ala	1.06	0.43	60
Leu	0.94	0.36	61
Lys	0.95	0.35	62
Val	0.77	0.27	65
His	0.38	0.20	49

ces résultats permet de penser que le rm-RNA pourrait constituer une matrice alignant les acides aminés "activés" avant qu'ils soient polymérisés en chaînes peptidiques.

Nous présenterons ailleurs des données concernant les propriétés de la liaison formée entre les acides aminés et le rm-RNA. Les méthodes et les résultats permettant d'identifier des sites accepteurs des acides aminés sur le rm-RNA seront décrits dans la même publication.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Nous avons antérieurement montré que les polypeptide synthétases, utilisent en l'absence ou en présence de fragments bactériens les quatre ribonucléoside triphosphates pour former des peptides à partir de L-acides aminés^{3,4}. Afin de déterminer l'effet des acides nucléiques sur l'activité de ces enzymes nous avons utilisé des

préparations enzymatiques purifiées contenant moins de 0.2 % de matériel nucléotidique. Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'une fraction de RNA permet de réactiver ces préparations peu actives en absence d'acides nucléiques. Cette fraction de RNA est capable de fixer dans les conditions données tous les L-[¹⁴C]acides aminés. Pour un mélange de [¹⁴C]acides aminés, la radioactivité totale fixée sur le RNA à marquage rapide représente la somme des radioactivités de chaque acide aminé incorporé. De plus la fixation d'un [¹⁴C]acide aminé est indépendante du nombre d'autres [¹²C]acides aminés présents dans le milieu d'incubation. Ces résultats indiquent l'existence de sites accepteurs spécifiques dans le RNA actif et dans les préparations enzymatiques l'existence d'un enzyme pour chaque acide aminé. Calculé pour vingt acides aminés, un acide aminé est lié pour environ 35 nucléotides du rm-RNA. Dans la région du gradient situé entre 14 S et 4 S, région où le RNA à marquage rapide semble le mieux séparé des autres fractions, nous trouvons approximativement 0.13 μ mole de [¹⁴C]alanine fixé pour environ 12-15 nucléotides, et 0.10 μ mole pour la valine.

Si ce RNA joue le rôle de matrice pour les acides aminés on devrait s'attendre à ce que l'introduction de 5-fluorouracile par exemple perturbe ses réactions vis à vis des acides aminés. Nos expériences montrent en effet que cet analogue (ou l'azaguanine) incorporé dans le RNA à marquage rapide modifie profondément les capacités de ce RNA à fixer les acides aminés en présence de polypeptide synthétases. Ces mêmes analogues, incorporés abondamment dans le s-RNA ne modifient pas ses propriétés^{16,18}. Nous pensons donc que le RNA à marquage rapide peut servir de matrice pour aligner directement les acides aminés "activés" par les polypeptide synthétases. Précisons que ce RNA contient du RNA messenger^{19,20}, et du RNA éosomal²¹. Nos résultats ne nous permettent pas de décider si l'un, ou les deux sont actifs comme accepteurs des acides aminés.

Rappelons que dans nos expériences précédentes³ les préparations enzymatiques purifiées contenant 1-3 % d'acides nucléiques pouvaient former des peptides sans addition de RNA exogène. Nous avons vérifié que le RNA de ces enzymes contient une fraction de RNA à marquage rapide. Isolé à partir des polypeptide synthétases purifiées, ce RNA fixe les acides aminés dans les conditions décrites.

Soulignons enfin que des enzymes purifiés à partir d'*Escherichia coli*, probablement identiques aux polypeptide synthétases, sont capables de dégrader les ribonucléoside 5'-triphosphates en présence de L-acides aminés²². Des extraits des levures semblent également contenir ces enzymes²³. Certains systèmes subcellulaires d'origine animale^{24,25} possèdent des enzymes présentant des analogies avec ceux utilisés dans notre travail. De plus une fixation d'acides aminés sur le "RNA des microsomes" du foie de rat semble avoir été observée en présence d'extraits solubles^{26,27}.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Professeur J. MONOD pour tout l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à ce travail.

Les échantillons de poly-AGUC et de poly-U nous ont été aimablement donnés par le Dr. M. GRUNBERG MANAGO que nous remercions.

Ce travail a bénéficié de l'aide du Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, du National Institutes of Health, du Commissariat à l'Energie Atomique et de la Délégation générale à la Recherche Scientifique et Technique.

RÉSUMÉ

Des enzymes purifiés d'*Alcaligenes faecalis* forment des peptides à partir d'acides aminés libres en présence d'une fraction de RNA. Ce RNA accepte tous les L-acides aminés "activés" en présence de chacun des quatre ribonucléoside 5'-triphosphates; le complexe "acide aminé-RNA" a été isolé. La fraction de RNA actif fut identifié comme RNA à marquage rapide, mélange de RNA messenger et de RNA éosomal. Les analogues des bases, incorporés dans cette fraction modifient sa capacité à fixer les acides aminés.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. BELJANSKI, *Compt. Rend.*, 248 (1959) 446.
- ² M. BELJANSKI ET S. OCHOA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 494.
- ³ M. BELJANSKI, M. BELJANSKI ET T. LOVINY, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 559.
- ⁴ M. BELJANSKI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8 (1962) 15.
- ⁵ M. BELJANSKI, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol 5, Academic press, New York, 1962.
- ⁶ H. FRAENKEL-CONRAT, B. SINGER ET A. TSUGITA, *Virology*, 14 (1961) 54.
- ⁷ A. TISSIÈRES ET J. W. HOPKINS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47 (1961) 2015.
- ⁸ E. J. OFENGAND, M. DIECKMANN ET P. BERG, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1741.
- ⁹ A. M. CRESTFIELD, K. C. SMITH ET F. W. ALLEN, *J. Biol. Chem.*, 216 (1955) 185.
- ¹⁰ M. G. SEVAG, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 419.
- ¹¹ R. J. BRITTEN ET R. B. ROBERTS, *Science*, 131 (1960) 32.
- ¹² M. BELJANSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 451.
- ¹³ Z. DISCHE, *Mikrochemie*, 8 (1930) 4.
- ¹⁴ J. D. SMITH ET R. E. F. MATTHEWS, *Biochem. J.*, 66 (1957) 323.
- ¹⁵ H. CHANTRENNE ET S. DEVREUX, *Exptl. Cell Res. Suppl.*, 6 (1958) 155.
- ¹⁶ F. GROS ET S. NAONO, *Symposium on Protein Biosynthesis*, Wassenaar, Academic Press, London, 1960, p. 195.
- ¹⁷ E. S. KEMPNER ET J. H. MILLER, *Biophys. J.*, 21 (1962) 327.
- ¹⁸ E. OTAKA, *Exptl. Cell Res.*, 21 (1960) 229.
- ¹⁹ F. JACOB ET J. MONOD, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 318.
- ²⁰ E. VOLKIN ET L. ASTRACHAN, *Virology*, 2 (1956) 146.
- ²¹ B. J. MC CARTHY, R. J. BRITTEN ET R. B. ROBERTS, *Biophys. J.*, 2 (1962) 57.
- ²² B. NISMAN ET H. FUKUHARA, *Compt. Rend.*, 251 (1960) 908.
- ²³ A. H. W. N. SCHUURS, S. R. DE KLO ET V. V. KONINGSBERGER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3 (1960) 301.
- ²⁴ J. P. ZALTA, *Compt. Rend.*, 250 (1960) 4058.
- ²⁵ J. P. ZALTA, F. LACHURIE ET S. OSORNO, *Compt. Rend.*, 251 (1960) 814.
- ²⁶ K. C. SMITH ET R. G. DOELL, *Federation Proc.*, 19 (1960) 318.
- ²⁷ J. M. FESSEDEN ET K. MOLDAVE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1961) 232.

Biochim. Biophys. Acta, 72 (1963) 585-597