

BBA Report

BBA 71421

SIALYL-TRANSFERASE MITOCHONDRIALE

ODILE GATEAU, MARIA ROCHA DE MORILLO*, PIERRE LOUISOT** et
RENÉE MORELIS

Université de Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Laboratoire de Biochimie Générale et Médicale, ERA-CNRS 562 et INSERM U 189, B.P. 12, 69600 Oullins (France)

(Received July 18th, 1979)

Key words: Sialyltransferase; Mitochondrial membrane; Glycoconjugates

Summary

Mitochondrial sialyltransferase

A sialyl transferase activity is found in purified mitochondria. It is not due to residual contamination and this enzymatic system is located in the outer mitochondrial membrane. This proves mitochondrial autonomy in regard to glycoconjugate sialylation.

Résumé

Une activité sialyl-transférasique a été mise en évidence dans les mitochondries purifiées. Elle n'est pas due à une contamination golgienne et ce système enzymatique est localisé dans la membrane externe. Il démontre l'autonomie mitochondriale en matière de sialylation des glycoconjugués.

Différents auteurs ont montré l'existence de glycoprotéines, dont des sialoglycoprotéines, dans les mitochondries [1–3]; Melnick et al. [4] ont mis en évidence, par électrophorèse en gel de polyacrylamide, un polypeptide contenant une chaîne glycannique à acide sialique, et Tinberg [5] a solubilisé une sialoglycoprotéine à partir de la membrane mitochondriale externe. Des travaux antérieurs ont cependant démontré l'autonomie mitochondriale en matière de glycosylation des glycoconjugués. La mannosylation dans les mitochondries de foie est un exemple [6, 7]. Une mannosyl-transférase mitochondriale catalysant le transfert de mannose sur un accepteur protéinique endogène a été localisée

* Adresse actuelle: Universidad de Salamanca, Facultad de Ciencias, Salamanca, Espagne.

** A qui toute correspondance doit être adressée.

dans la membrane interne [8] ; des travaux plus récents ont mis en évidence dans la membrane mitochondriale externe purifiée, une mannosyl-transférase permettant la synthèse de mannosyl-phosphoryl-dolichol [9]. Il existe aussi dans les mitochondries des systèmes enzymatiques capables de transférer la *N*-acétyl-glucosamine sur des accepteurs polyprénique et protéinique endogènes [10]. Il importait donc, dans le cadre des études sur l'autonomie mitochondriale, de rechercher l'existence dans ces organites, et plus spécialement dans la membrane externe, d'une sialyl-transférase capable de synthétiser les sialoglycoprotéines.

Les mitochondries sont préparées selon la méthode de Weinbach [11] améliorée par la méthode de Bustamente [12], complétée par une purification sous l'action ménagée des ultra-sons. La membrane externe est préparée par choc osmotique à partir de ces mitochondries, puis purifiée par passage sur gradient discontinu de saccharose. La qualité des préparations est contrôlée par la mesure d'activité des marqueurs enzymatiques spécifiques et par la microscopie électronique [9]. Les membranes golgiennes sont isolées sur un gradient discontinu de saccharose à partir des microsomes préparés selon la technique de Bouchilloux et al. [13].

Le Tableau I récapitule les activités spécifiques d'incorporation d'acide sialique sur accepteurs protéiniques, dans les mitochondries entières et la membrane mitochondriale externe en relation avec leur degré de purification. Après action ménagée des ultra-sons, le taux d'incorporation d'acide sialique dans les mitochondries entières diminue de façon importante. On individualise en outre, au niveau de la membrane mitochondriale externe purifiée, une activité sialyl-transférasique importante. Si, par comparaison, on évalue l'activité spécifique sialyl-transférasique des membranes golgiennes, on observe sur le même Tableau I, que son ordre de grandeur est identique à ce qui est détecté dans les structures mitochondrielles.

Dans tous les cas l'acide sialique est fixé par liaison de covalence aux structures protéiniques acceptrices comme on a pu le vérifier sur les glycopeptides préparés par hydrolyse pronasique des mitochondries et de la membrane ex-

TABLEAU I

INCORPORATION D'ACIDE SIALIQUE DANS LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES ET GOLGIENNES

Le milieu d'incubation contient du chlorure de manganèse 5 mM, 0.7 mg de protéines mitochondrielles ou 0.3 mg de protéines de suspension de membrane externe (les protéines sont dosées selon la méthode de Gornall [14]) ; 400 µg d'une solution de fétuine désialylée par voie chimique [15] dont la capacité acceptrice s'est révélée très supérieure à celle de la mucine traitée dans les mêmes conditions. Le milieu d'incubation est complété à 260 µl avec du tampon Tris 20 mM, à pH 7.4, contenant 0.2% de Triton X-100. La réaction est initiée par 10 µl d'une solution contenant 84 pmol d'acide CMP-*N*-¹⁴C-acétyl-neuraminique (New England Nuclear Chemicals, U.S.A., activité spécifique 237 Ci/mol) ; elle se poursuit 15 min à 30°C et les glycoprotéines sont précipitées par addition d'acide trichloracétique 20% (w/v). Les résultats sont exprimés en pmol d'acide sialique incorporé par mg de protéines mitochondrielles, au bout des 15 min d'incubation.

Fractions étudiées	Activité sialyl-transférasique
Mitochondries non purifiées	15
Mitochondries purifiées	6
Membrane externe	36
Membrane externe purifiée	38
Membrane golgiennes	23

TABLEAU II

EVALUATION DE LA CONTAMINATION DES MITOCHONDRIES PAR LES MEMBRANES GOLGIENNES, EN UTILISANT LE MARQUEUR ENZYMATIQUE GALACTOSYL-TRANSFÉRASE

Le milieu d'incubation contient du chlorure de manganèse 5 mM, 0.7 mg de protéines mitochondrielles ou 0.3 mg de protéines de suspension de membrane externe ou 0.2 mg de protéines de suspension de membranes golgiennes; 400 µg d'une solution de fétuine désialylée et dégalactosylée. Le milieu d'incubation est complété à 260 µl avec du tampon Tris 20 mM, à pH 7.4; la réaction est initiée par addition de 10 µl d'une solution contenant 60 pmol d'UDP-[¹⁴C] galactose (New England Nuclear Chemicals, U.S.A., activité spécifique 289 Ci/mol); elle se poursuit 20 min à 32°C et les glycoprotéines sont précipitées par addition d'acide trichloracétique 20% (W/V).

Fractions étudiées	Activité galactosyl-transférasique*	% de galactose incorporé par référence aux membranes golgiennes
Mitochondries non purifiées	0.67	1
Mitochondries purifiées	0.26	0.4
Membranes golgiennes	65	100

*Les résultats sont exprimés en pmol de galactose incorporé par mg de protéines, au bout de 20 min d'incubation.

terne purifiées, après l'arrêt du processus de glycosylation (technique de Yamashina et al. [16].

Afin d'éliminer l'hypothèse d'une contamination sialyl-transférasique toujours possible des fractions mitochondrielles par les membranes golgiennes, on a suivi la distribution d'un marqueur spécifique de ces membranes, la galactosyl-transférase [13, 17-19].

Sur la base de ce critère, le Tableau II montre que la contamination des mitochondries par les membranes golgiennes est très faible (1%) et devient négligeable après purification (0.4%). D'ailleurs Fleischer et al. [19] en étudiant la répartition de certains marqueurs enzymatiques, dont la galactosyl-transférase, dans les fractions sub-cellulaires de rein de rat, avaient également observé une contamination des mitochondries par les membranes golgiennes de l'ordre de 0.4%.

Il devient de ce fait évident que l'activité sialyl-transférasique mesurée dans les fractions mitochondrielles ne peut pas être due à une contamination golienne.

La diminution du taux d'incorporation d'acide sialique sur les accepteurs exogènes dans les mitochondries entières après purification s'explique parfaitement par la solubilisation de la fraction la plus labile de la sialyl-transférase mitochondriale membranaire externe sous l'action ménagée des ultra-sons. D'ailleurs De Bernard et al. [1], en étudiant la répartition d'acide sialique dans les mitochondries, avaient constaté que 80% de leur contenu en acide sialique sont solubilisés au cours du fractionnement sub-mitochondrial par choc osmotique et ultra-sons. Ces observations structurales et enzymatiques sont donc en parfaite corrélation.

En conclusion, nos résultats montrent qu'il existe une sialyl-transférase mitochondriale autonome et que ce système enzymatique est localisé dans la membrane externe.

Ce travail a bénéficié de l'aide du Centre National de la Recherche Scientifique (ERA-CNRS 562), de l'Institut National de la Santé et de la Recherche

Médicale U 189 et CRL 77.1.085.3), de la Direction des Recherches, Etudes et Techniques (Convention 78.152), de la Fondation pour la Recherche Médicale Française, de l'Association Française de Lutte contre la Mucoviscidose, et de l'Université de Lyon (Faculté de Médecine Lyon-Sud).

Bibliographie

- 1 De Bernard, B., Pugliarello, M.C., Sandri, G., Sottocasa, G.L. et Vittur, F. (1971) FEBS Lett. 12, 125—128
- 2 Martin, S.S. et Bosmann, H.B. (1971) Exp. Cell Res. 66, 59—64
- 3 Bosmann, H.B., Myers, M.W., Dehond, D., Ball, R. et Case, K.R. (1972) J. Cell Biol. 55, 147—160
- 4 Melnick, R.L., Tinberg, H.M., Maguire, J. et Packer, L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 311, 230—24
- 5 Tinberg, H.M. (1976) Biophys. J., 16, 113_a TH-POS-F 14
- 6 Bosmann, H.B. et Martin, S.S. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 411—422
- 7 Morelis, R. et Louisot, P. (1973) Biochimie 55, 671—677
- 8 Morelis, R., Broquet, P. et Louisot, P. (1974) Biochim. Biophys. Acta 373, 10—17
- 9 Gateau, O., Morelis, R. et Louisot, P. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 613—622
- 10 Gateau, O., Morelis, R. et Louisot, P. (1979) C.R. Acad. Sci. Paris 288, 547—549
- 11 Weinbach, E.C. (1961) Anal. Biochem. 2, 335—343
- 12 Bustamente, E., Soper, J.N. et Pederson, P.L. (1977) Anal. Biochem. 80, 401—408
- 13 Bouchilloux, S., Chabaud, O., Michel-Bechet, M., Ferrand, M. et Atholiel-Haon, A.M. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 314—320
- 14 Gornall, A.G., Bardawill, C.J. et David, H.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751—766
- 15 Ko, G.K.W. et Raghupathy, E. (1971) Biochim. Biophys. Acta 244, 396—409
- 16 Yamashina, I. et Hakino, M. (1962) J. Biochem. (Tokyo) 51, 359—366
- 17 Fleischer, B. et Fleischer, S. (1970) Biochim. Biophys. Acta 219, 301—319
- 18 Moscarello, M.A., Kashuba, L. et Sturgess, J.M. (1972) FEBS Lett. 26, 87—92
- 19 Fleischer, B., Zambrano, F. et Fleischer, S. (1974) J. Supramol. Struct. 2, 737—750