

## HYDROLYSE DES AMINOACYL-tARN PAR LA PHOSPHODIESTERASE DU VENIN

P.YOT, P.GUEGUEN et F.CHAPEVILLE

*Service de Biochimie, Département de Biologie, Centre d'Etudes Nucléaires,  
Saclay 91, Gif-sur Yvette, France*

Reçu le 20 Juillet 1968

The influence of the esterification of the 3'(2') hydroxyl group of tRNA on the hydrolysis by venom phosphodiesterase (*Crotalus adamanteus*) was studied. It was shown that this esterification does not change the rate of hydrolysis. At pH 7–8, no significant differences were observed either when the  $\alpha$  amino group of the attached amino acid was free or blocked, or when the amino acid contained a free carboxyl group or a second amino group (glutamic acid or lysine). Aminoacyl-AMP or oligopeptidyl-AMP can be prepared by this method.

### 1. Introduction

On sait que l'hydrolyse des Acides Nucléiques par la phosphodiesterase du venin de serpent (*Crotalus adamanteus*) conduit à la libération de nucléosides-5'-monophosphates à partir de l'extrémité 3'-OH. Dans le cas des ARN de transfert, les nucléotides correspondant à l'extrémité -CCA sont très rapidement libérés alors que le reste de la molécule est beaucoup plus résistant à l'attaque par cet enzyme. On dispose de peu d'informations sur l'importance du groupement hydroxyle en position 3' lors de cette hydrolyse. Il a été montré que la vitesse de dégradation des 3'-phosphooligonucléotides est extrêmement faible [1] alors que l'acétylation du groupement OH en 3' n'entraîne qu'un léger ralentissement de l'hydrolyse [2]. Dans le cas d'une autre exonucléase (Exonucléase I de *E.coli*) ces mêmes substitutions empêchent complètement la dégradation [3].

Dans ce travail nous avons examiné l'influence de l'estérification par les acides aminés du groupement -OH en position 3'(2') des ARN de transfert vis-à-vis de l'attaque par la phosphodiesterase du venin. Les résultats obtenus montrent que ce blocage n'influence pas la vitesse d'hydrolyse des ARN de transfert. Celle-ci est sensiblement identique quelle que soit la nature des acides aminés: basique, neutre ou acide.

### 2. Matériel et méthodes

Les acides ribonucléiques de transfert de *E. coli* B (General Biochemicals) ou de la levure (General Biochemicals) ont été chargés avec différents L-<sup>14</sup>C-amino-acides, dans les conditions habituelles. Ils ont été utilisés directement ou après acétylation par voie chimique du groupement aminé de l'acide [4]. Cette acétylation augmente par un facteur de cinq la stabilité de la liaison ester entre l'acide et le tARN vis-à-vis de l'hydrolyse alcaline.

Il a été vérifié que le lot de phosphodiesterase du venin (Sigma) employée était dépourvu de 5'-nucléotidase et, dans les conditions utilisées, d'activité endonucléasique décelable par la libération d'oligonucléotides non précipitables par l'acide trichloracétique.

Les produits libérés en présence de la phosphodiesterase ont été identifiés par comparaison à des substances-témoins: 3'(2')-O-(N-acétyl-L-valyl)-AMP synthétisé par voie chimique, qui nous a été fourni par le Dr. Boris Gottikh; 3'(2')-O-(L-<sup>14</sup>C-aminoacyl)-adénosine et 3'(2')-O-(N-acétyl-L-<sup>14</sup>C-aminoacyl)-adénosine obtenus par action de la RNase pancréatique sur l'aminoacyl-tARN acétylé ou non; N-acétyl-L-<sup>14</sup>C-amino-acide préparé par voie chimique.

Après incubation des différents substrats en présence de l'enzyme, les substances du milieu réaction-

nel sont séparées soit par chromatographie sur couche mince, soit par électrophorèse sur papier; elles sont localisées soit par leur absorption à 260 m $\mu$  soit par leur radioactivité après exposition au contact de films Kodirex. La détermination quantitative de la radioactivité des différentes substances a été effectuée à l'aide d'un spectromètre  $\beta$  à scintillation liquide dans le mélange: toluène – PPO – POPOP, après découpage en bandes des supports de la chromatographie ou de l'électrophorèse.

### 3. Résultats et discussion

La figure 1 représente un autoradiogramme obtenu après chromatographie sur couche mince du milieu réactionnel lors de l'incubation, en fonction du temps, de *N*-acétyl- $^{14}\text{C}$ -valyl-tARN en présence de la phosphodiesterase du venin. On observe la libération d'un produit dont le  $R_f$  est 0,14, identique à celui de 3'(2')-*O*-(*N*-acétyl-L-valyl)-AMP. Après son isolement et incubation en présence de phosphatase alcaline, on met en évidence une substance qui se comporte en chromatographie et électrophorèse comme 3'(2')-*O*-(*N*-acétyl-L-valyl)-adénosine. Ces analyses montrent que le produit libéré par l'action de la phosphodiesterase correspond à 3'(2')-*O*-(*N*-acétyl-L-valyl)-AMP.

Une étude parallèle conduite avec la polynucléotide phosphorylase de *M. lysodeikticus* et *E. coli* n'a pas permis de mettre en évidence l'attaque de *N*-acétyl-valyl-tARN en présence d'orthophosphate alors que l'on sait que l'extrémité -CCA des tARN non acylés est phosphorolysée.

Dans le matériel digéré par la phosphodiesterase seulement une fraction du tARN total est acylée, celle qui accepte la valine. De ce fait une compétition entre les tARN acylés et non acylés doit avoir lieu. Pour l'étudier, *N*-acétyl- $^{14}\text{C}$ -valyl-tARN a été incubé en présence de quantités croissantes du même tARN non acylé (fig. 2). L'addition d'une quantité équivalente de tARN non acylé réduit la vitesse d'hydrolyse de 30%. On déduit de ces résultats que le tARN chargé avec la valine est hydrolysé à une vitesse au moins égale à celle du tARN non acylé.

L'influence de groupements aminés ou carboxyliques portés par l'acide-amino qui estérifie le tARN a été examinée en utilisant  $^{14}\text{C}$ -valyl-tARN,  $^{14}\text{C}$ -glu-

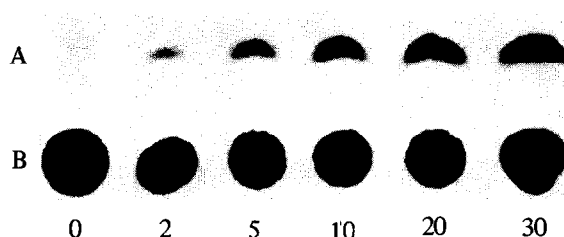


Fig. 1. Autoradiogramme après séparation chromatographique (*n*-butanol: 78; acide acétique: 5 et eau: 17) sur couche mince de silice (Kodak, type K 301R) du milieu réactionnel incubé à 37°C et contenant: 150  $\mu\text{g}$  de tARN de *E. coli* chargé avec  $^{14}\text{C}$ -valine et acétylé; 7  $\mu\text{g}$  de phosphodiesterase du venin; 4  $\mu\text{M}$  de barbital de Na-HCl, pH = 8; 1,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ . 5  $\mu\text{l}$  de ce mélange ont été prélevés pour l'analyse, après 2, 5, 10, 20 et 30 min d'incubation. A: *N*-Ac-Val-tARN ( $R_f$  = 0), B: *N*-Ac-Val-AMP ( $R_f$  = 0,14). Dans ce solvant *N*-Ac-Val-adénosine et *N*-Ac-Valine migrent ensemble ( $R_f$  = 0,71); leur séparation est obtenue par électrophorèse sur papier.

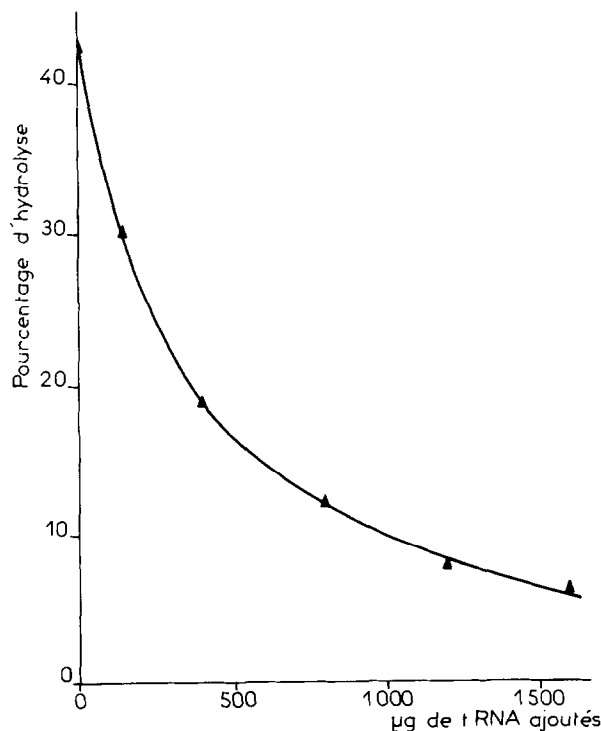


Fig. 2. Inhibition de l'hydrolyse de *N*-acétyl- $^{14}\text{C}$ -val-tARN par tARN non acylé. Dans plusieurs tubes contenant 145  $\mu\text{g}$  de tARN de *E. coli* chargé avec  $^{14}\text{C}$ -valine et acétylé, et 5  $\mu\text{g}$  de phosphodiesterase, on ajoute des quantités croissantes du même tARN non chargé. Quinze minutes après l'incubation à 37°C, la quantité de *N*-acétyl- $^{14}\text{C}$ -val-AMP est déterminée.

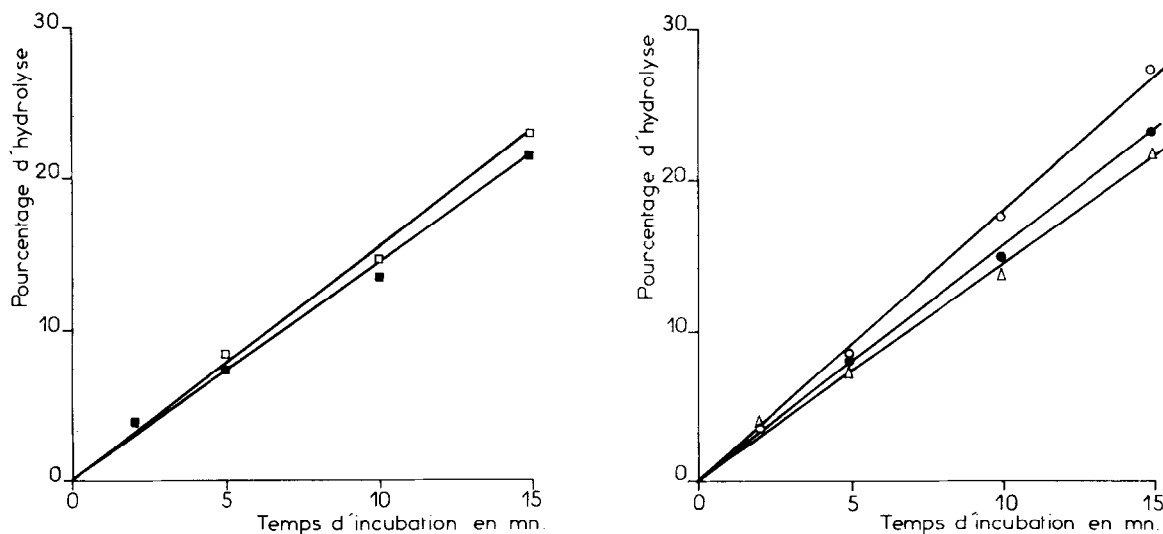


Fig. 3. Influence des groupements  $-NH_2$  et  $-COOH$  sur la vitesse d'hydrolyse. Divers  $^{14}C$ -aminoacyl-tARN de levure (875  $\mu g$ ) substitués ou non, ont été incubés en présence de phosphodiesterase (25  $\mu g$ ) dans des conditions identiques à celles de la figure 1. Hydrolyse de Val-tARN (■ ■ ■), de N-Ac-Val-tARN (□ □ □), de N-Ac-Glu-tARN (● ● ●), de N-Ac-Lys-tARN (○ ○ ○) et de N,N-diAc-Lys-tARN (△ △ △).

tamyl-tARN et  $^{14}C$ -lysyl-tARN, substitués ou non. Les résultats rapportés dans la figure 3 montrent que dans les conditions employées, la vitesse d'hydrolyse n'est pas modifiée par la présence de groupements basiques ou acides du résidu aminoacyl.

Il a été aussi observé qu'un oligopeptidyl-tARN (N-acétyl-phe- $^{14}C$ -val-tARN) est hydrolysé à une vitesse sensiblement identique.

Richards et Laskowski [5] ont montré que le pH optimum pour l'activité de la phosphodiesterase du venin est différent selon que le groupement 3'-OH des oligonucléotides est estérifié ou non par le phosphate. Il est possible que ce type de différence puisse s'observer dans le cas des substrats ci-dessus; mais l'absence de stabilité à pH alcalin de la liaison ester dans les aminoacyl-tARN empêche d'envisager une telle étude.

Mis à part les quelques renseignements ayant trait à l'étude générale de la phosphodiesterase, il ressort de cette étude que l'emploi de cet enzyme offre une mé-

thode simple de préparation des aminoacyl-AMP et des oligopeptidyl-AMP.

### Remerciement

Nous remercions vivement le Professeur Laskowski pour ses précieux conseils.

### Bibliographie

- [1] F.Felix, J.L.Potter et M.Laskowski, J. Biol. Chem. 235 (1960) 1150.
- [2] W.E.Razzel et H.G.Khorana, J. Biol. Chem. 234 (1959) 2114.
- [3] I.R.Lehmann et A.L.Nussbaum, J. Biol. Chem. 239 (1964) 2528.
- [4] A.L.Haenni et F.Chapeville, Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 135.
- [5] G.M.Richards et M.Laskowski Sr., Fed. Proc. 27 (1968) 803.