

## PARTICULES RIBONUCLEOPROTEIQUES 40 S DES NOYAUX DE FOIE DE RAT. PROPRIETES DES PROTEINES DE CES PARTICULES

Alain SARASIN

*Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer,  
94 Villejuif, France*

Received 26 July 1969

Rat liver 40 S ribonucleoprotein particles, which are different from ribosomal subparticles, were isolated and the protein moiety studied. Disc electrophoresis at pH 4.5 and 8.8 suggests that these particles have a relatively simple protein structure, the proteins having isoelectric points which are near neutrality or slightly acidic. The amino acid composition shows an acidic residue/basic residue ratio of 1/1.39 and an as yet unidentified ninhydrin-positive compound which is probably specific to these 40 S particles.

### 1. Introduction

Les particules ribonucléoprotéiques 40 S isolées par Moulé et Chauveau [1,2] à partir des noyaux de foie de rat correspondent à des substructures cellulaires n'appartenant pas à la série ribosomique. Elles contiennent 11% de RNA; les propriétés de celui-ci ont été étudiées précédemment [2,3]. La présente communication concerne la partie protéique de ces particules: nous décrivons la séparation électrophorétique des protéines sur gel de polyacrylamide et la composition en acides aminés de l'ensemble de leurs protéines.

### 2. Méthodes

Les particules 40 S sont obtenues suivant la méthode déjà décrite [1,2] en employant l'Ultra-Turrax pour détruire la membrane nucléaire [3]. Après leur séparation sur gradient de saccharose (0,3 M – 1 M) les particules sont centrifugées 140 min à 150.000 g (Spinco L, rotor 50) dans du saccharose 0,65 M.

Pour les analyses électrophorétiques, les culots de particules 40 S sont solubilisés dans l'urée 6 M à 0° pendant 16 h. On dépose de 20 à 40 µl de cette solution (100 à 150 µg de protéines) sur les gels de polyacrylamide préparés soit à pH 4,5 et 10% en acryl-

amide, selon la technique de Reisfeld et al. [4] et en présence d'urée 6 M [5], soit à pH 8,8 et 7% en acrylamide selon la technique de Ornstein [6] et en présence d'urée 6 M. Les migrations sont effectuées à la température du laboratoire sous une intensité de 4 mA par tube pendant 50 à 95 min suivant les expériences. Après 1 h de coloration à l'amido-schwarz (0,5% dans l'acide acétique 7%), on décolore 1 h 30 sous 15 mA par tube. La densité optique des gels est lue sur un "densitomètre-enregistreur-intégrateur" (Vernon).

Pour l'analyse en acides aminés, le culot de particules est traité par l'acide perchlorique glacé (PCA) à 5% et le RNA est extrait par PCA 5% à 80° pendant 15 min. Les protéines sont séchées avant d'être hydrolysées par HCl 6 N pendant 20 h à 115° en ampoule scellée sous vide. La séparation et le dosage des acides aminés s'effectuent selon la technique de Moore et Stein [7] sur un "Auto-Analyzer-Technicon" en 22 h. La cystine et la cystéine sont dosées ensemble sous forme d'acide cystéique [8]. Le tryptophane est dosé spectrophotométriquement [9].

### 3. Résultats

La fig. 1 montre le densitogramme de la migration électrophorétique des protéines des particules 40 S à pH 4,5. On peut y distinguer trois grandes bandes

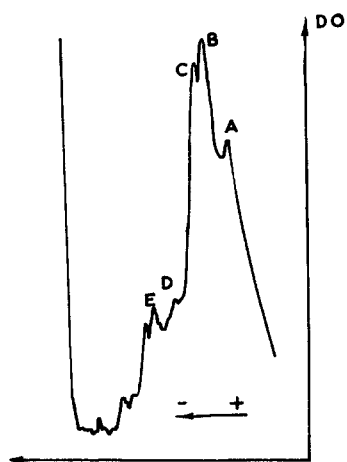


Fig. 1. Densitogramme des protéines des particules nucléaires 40 S, migration pH 4,5; 50 min; 4 mA/tube.

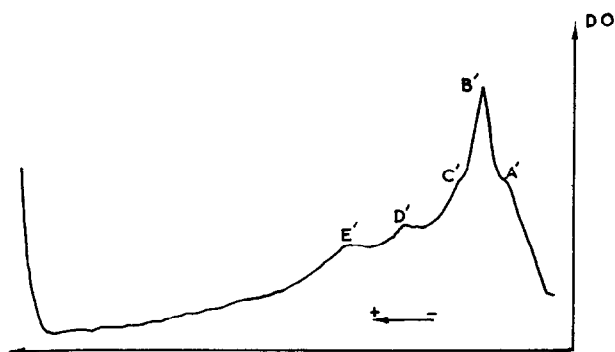


Fig. 2. Densitogramme des protéines des particules nucléaires 40 S, migration pH 8,8; 75 min; 4 mA/tube.

principales A, B et C et quelques composants plus rapides tels que D et E. Par intégration des surfaces du densitogramme, on peut en déduire que B représente environ 50% des protéines totales, A et C environ 25 à 30% et les composants rapides de 10 à 15% suivant les expériences.

Afin de préciser le point isoélectrique des protéines des particules 40 S, nous avons effectué d'autres migrations électrophorétiques à pH 8,8. Le densitogramme d'une telle migration est reproduit fig. 2. On y remarque un grand pic B' représentant 50 à 60% des protéines totales, deux pics A' et C' de part et

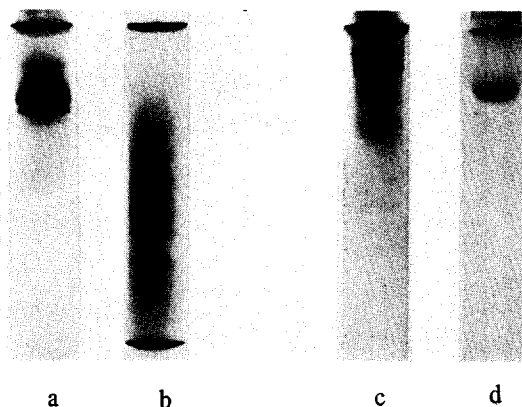


Fig. 3. Comparaison des électrophorogrammes des protéines des particules nucléaires 40 S et des protéines ribosomiques: (a) migration des protéines des particules 40 S: pH 4,5; 95 min; 4 mA/tube. (b) migration des protéines ribosomiques: pH 4,5; 95 min; 4 mA/tube. (c) migration des protéines des particules 40 S: pH 8,8; 95 min; 4 mA/tube. (d) migration des protéines ribosomiques: pH 8,8; 95 min; 4 mA/tube.

d'autre de B' ainsi que des composants plus rapides tels que D' et E'.

La comparaison des profils de migration obtenus aux deux pH permet de supposer qu'il existe une analogie entre les fractions protéiques (A, B et C) migrant à pH 4,5 et celles (A', B' et C') migrant à pH 8,8. Comme de plus les vitesses de migration sont pratiquement les mêmes pour chacune des bandes homologues aux deux pH, on peut en déduire que le point isoélectrique des protéines 40 S est de l'ordre de 6,5-7.

Une preuve supplémentaire de l'absence de parenté entre les particules nucléaires 40 S et les ribosomes cytoplasmiques est apportée par la fig. 3 qui représente les électrophorogrammes obtenus de façon parallèle pour les deux catégories de protéines à pH 4,5 et 8,8. On peut remarquer que la migration à pH 8,8 d'une seule protéine ribosomique est en accord avec les résultats de Brown et al. [10].

Le tableau 1 montre la composition en acides aminés des protéines des particules nucléaires 40 S, calculée soit en mole pour cent, soit en gramme pour cent. Cette composition conduit à un rapport

Tableau 1  
Composition en acides aminés des protéines des particules 40 S.

Acides aminés	En mole pour 100 moles d'acides aminés (a)	En gramme pour 100 g de protéines (a)
Acide aspartique	10,4 ± 0,1	10,7 ± 0,1
Acide glutamique	11,9 ± 0,2	13,5 ± 0,1
Alanine	5,5 ± 0,2	3,8 ± 0,1
Arginine	6,2 ± 0,2	8,4 ± 0,2
Cystine (b)	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Glycine	14,0 ± 0,6	8,2 ± 0,4
Histidine	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Isoleucine	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Leucine	5,2 ± 0,1	5,2 ± 0,1
Lysine	7,4 ± 0,2	8,4 ± 0,2
Méthionine	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Phénylalanine	5,1 ± 0,1	6,5 ± 0,2
Proline	4,6 ± 0,2	4,0 ± 0,2
Sérine	6,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1
Thréonine	4,6 ± 0,3	4,3 ± 0,2
Tryptophane (c)	0,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Tyrosine	4,0 ± 0,1	5,6 ± 0,2
Valine	5,7 ± 0,1	5,1 ± 0,1
<u>Acides aminés acides</u>		
Acides aminés basiques	1,39 ± 0,04	1,23 ± 0,03

(a) Chaque valeur représente la moyenne de six expériences. L'erreur standard est calculée suivant la formule

$$\text{E.S.} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}.$$

(b) Calculée après oxydation à l'acide performique.

(c) Calculé par spectrophotométrie.

$\frac{\text{acides aminés acides}}{\text{acides aminés basiques}} = 1,39$ , ce qui indique que,

tout au moins globalement, les protéines des particules possèdent un caractère acide, et donc confirme les résultats obtenus par électrophorèse.

D'autre part, il faut signaler dans le chromatogramme d'un hydrolysat de protéines des particules 40 S l'existence régulière d'un composé réagissant avec la ninhydrine et qui est élué entre l'histidine et l'arginine (19 h 30 après l'injection de l'échantillon dans la

colonne). Ce composé ne provient vraisemblablement pas de la dégradation d'un des acides aminés habituellement trouvés dans un hydrolysat acide de protéines. De plus, il ne correspond ni au tryptophane, ni à l'un de ses produits de dégradation susceptibles de se former au cours de l'hydrolyse acide. Pour l'instant, ce composé n'est pas encore identifié (nous nous sommes assuré que ce n'était ni l'ornithine, ni les 1 et 3-méthyl-histidine, ni la canavanine qui sont élués dans la même partie du chromatogramme). Toutefois, il est

intéressant de remarquer que le pic bien qu'inconnu semble être spécifique des protéines des particules: en effet, nous ne l'avons pas retrouvé dans les protéines d'autres structures cellulaires du foie de rat traitées dans les mêmes conditions.

#### 4. Discussion

Nos résultats montrent d'une part le caractère acide des protéines des particules 40 S et d'autre part la relative simplicité de leur structure protéique. Dans ce domaine, il faut préciser que les profils de migration que nous obtenons à pH 4,5, sont identiques à ceux publiés par le groupe de Samarina sur leurs particules 30 S [11]. Ceci suggère donc que l'architecture protéique des particules nucléaires 40 S que nous isolons est très proche sinon identique à celle des "informofers" des auteurs soviétiques.

Les recherches en cours doivent nous permettre de préciser si le pic inconnu trouvé dans le chromatogramme des acides aminés est réellement spécifique des protéines de ces particules. Dans l'affirmative, il pourrait alors constituer un "marqueur" de ces structures, d'où son utilisation dans l'étude plus approfondie de certains problèmes posés par ces particules nucléaires 40 S.

#### Remerciements

Nous remercions vivement Mademoiselle Y.Moulé d'avoir dirigé notre travail avec autant d'intérêt.

#### Références

- [1] Y.Moulé et J.Chauveau, C.R. Acad. Sci. Paris 263 (1966) 75.
- [2] Y.Moulé et J.Chauveau, J. Mol. Biol. 33 (1968) 465.
- [3] Y.Moulé, A.Andrieu et A.Sarasin, en cours de publication.
- [4] R.A.Reisfeld, U.J.Lewis et D.F.Williams, Nature 195 (1962) 281.
- [5] P.S.Leboy, E.C.Cox et G.Flaks, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52 (1964) 1367.
- [6] L.Ornstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 321.
- [7] S.Moore et W.H.Stein, J. Biol. Chim. 192 (1951) 663.
- [8] E.Schram, S.Moore et E.J.Bigwood, Biochem. J. 57 (1954) 33.
- [9] T.W.Goodwin et R.A.Morton, Biochem. J. 40 (1946) 628.
- [10] D.G.Brown, C.Baron et A.Abrams, Biochim. Biophys. Acta 168 (1968) 386.
- [11] J.Molnar, O.P.Samarina et G.P.Georgiev, Mol. Biol. URSS 2 (1968) 795.