

DIFFERENCES DE SPECIFICITE ENTRE LES METHYLASES DE MYELOME ET DE FOIE VIS-A-VIS DU tRNA D' *E. COLI* K 12

F. NAU, G. PETRISSANT et J.M. DUBERT

*Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris
et Laboratoire de Physiologie de la Lactation, Centre National de Recherches Zoologiques,
78 Jouy en Josas, France*

Received 15 July 1969

This paper describes an attempt to find a difference between the patterns of methylation of *E. coli* tRNA by extracts of two mouse tissues. Two samples of tRNAs, methylated in two separate experiments with extracts of myeloma and of liver in presence of either ^{14}C or ^3H S-Adenosyl-L-Methionine, were pooled and fractionated together on a RPC column. The results show a difference in the specificities of the two extracts. Chromatography on DEAE Sephadex suggests that the tRNA Met is methylated by the enzymes on the myeloma, while enzymes from liver react very little, if at all, with that particular tRNA species. Studies have been undertaken in order to find out whether similar differences can also be demonstrated in homologous systems.

1. Introduction

A la suite de la découverte dans le tRNA* de nombreuses bases méthylées [1], les enzymes responsables de cette modification, appelés tRNA-méthylases, ont pu être mis en évidence aussi bien chez les microorganismes [2,3] que chez les animaux supérieurs [4]. Ces enzymes fonctionnent en transférant le groupement méthyle de la S-Adénosyl L-Méthionine en des positions bien définies des bases constitutives des chaînes polynucléotidiques après la synthèse de celles-ci.

Divers auteurs ont pu montrer des différences entre les tRNA normaux et les tRNA hypométhylés obtenus à partir de cultures d'*E. coli* K 12 RC^{rel} Met⁻ carencées en méthionine. Ces différences portent tant sur leur comportement chromatographique et leur réponse à certains codons [5-7] que sur leur capacité de fixation des acides aminés [8,9]. On sait d'autre part que

certaines espèces de tRNA issus de tissus tumoraux ont un comportement chromatographique différent de celui des tRNA correspondants extraits de tissus normaux [10-12]. Par ailleurs, il a été démontré que l'activité méthylante de nombreux extraits tumoraux est nettement plus élevée que celle d'extraits de tissus normaux [13]. Nous nous sommes donc proposé de rechercher si les méthylases provenant de tissus différents se distinguaient par leur spécificité vis-à-vis de certaines espèces de tRNA. Dans ce but, nous avons comparé les activités méthylantes d'extraits de myélomes et de foies d'animaux appartenant à une même lignée, en utilisant comme accepteur un tRNA hétérologue, celui d'*E. coli* K 12.

Le présent article suggère que les méthylases extraites d'un myélome de souris sont capables de méthyliser le tRNA Met d'*E. coli* K 12 alors que les enzymes extraits du foie des ces mêmes animaux semblent ne pas avoir d'action notable sur cette espèce de tRNA. Ces résultats n'excluent pas la possibilité que d'autres espèces de tRNA d'*E. coli* soient méthylées spécifiquement par l'un ou l'autre type d'extrait enzymatique.

* Abréviations utilisées: tRNA, ARN de transfert; tRNA Met, ARN de transfert spécifique de la méthionine; SAM, S-Adénosyl-L-méthionine; ME, β mercapto éthanol; RPC, "reversed-phase chromatography"; ATP, Adénosine 5' triphosphate; BD Cellulose, DEAE Cellulose benzoylée.

2. Matériel et méthodes

Le tRNA d'*E. coli* K 12 est soit préparé selon la méthode de Zubay [14] (à l'exception de l'incubation à pH 10,3, qui a été omise), soit d'origine commerciale (Schwarz Bio Research Inc., Orangebourg, N.Y.). La S-Adenosyl-L-Méthionine méthyle- ^3H ou méthyle- ^{14}C provient du Radiochemical Centre, Amersham, England, et la méthionine méthyle- ^{14}C du C.E.A., Saclay, France. Les souris BALBc ainsi que la souche de myélome E2 nous ont été aimablement fournies par le Dr. Lespinats, de l'Institut de Recherches sur le Cancer, Villejuif, France.

2.1. Préparation des extraits

Les extraits utilisés comme source de méthylases sont obtenus par homogénéisation dans un appareil de Potter, à 0°C, dans un milieu contenant: Tris 0,01 M, pH 7,5; ME 0,01 M; glycérol 10% (v/v). Après une centrifugation de 30 mn à $22.000 \times g$ le surnageant obtenu est à nouveau centrifugé à $105.000 \times g$ une première fois 45 mn, puis une seconde fois 120 mn. La concentration en protéines du dernier surnageant est estimée par mesure de son absorption à 260 m μ et 280 m μ . Pour les expériences décrites ci-dessous, les extraits ont été utilisés le jour même.

2.2. Méthylation *in vitro*

Des expériences préliminaires ont montré que les conditions suivantes donnaient un taux d'incorporation maximal. Le milieu contient: Tris 0,1 M, pH 7,8; ME 0,1 M; KCl 0,25 M; SAM $5,10^{-5}$ M. Les quantités de tRNA utilisées sont spécifiées pour chaque expérience. L'extrait de tissu est ajouté de façon à obtenir un rapport protéines/tRNA de 55/1. Le mélange est incubé 90 mn à 37°C, des aliquotes sont prélevés toutes les 30 mn pour contrôler l'évolution de la réaction.

2.3. Extraction du tRNA

A la fin de l'incubation, du tRNA est ajouté au mélange comme entraîneur en même temps qu'un volume égal de phénol saturé par du Tris 0,1 M, pH 7,5. L'extraction a lieu à la température de la pièce, et le tRNA est récupéré par précipitation alcoolique (au moins 16 h à -20°C).

2.4. Chromatographie

(1) RPC. La préparation des colonnes (0,9 \times 230 cm)

est réalisée selon la technique décrite par Kelmers et al. [15]. L'élution est obtenue par un gradient de NaCl dans un tampon Tris 0,05 M, pH 7,4, MgCl_2 0,01 M, saturé par de l'acétate d'isoamyle.

(2) DEAE Sephadex. Les colonnes (0,9 \times 135 cm) sont éluées par un gradient de chlorure de sodium et de chlorure de magnésium dans un tampon Tris 0,02 M, pH 7,5.

2.5. Réaction d'aminocyclation

Des aliquotes (25 à 150 μl) des fractions obtenus par chromatographie sont incubées pendant 20 mn à 37°C dans un milieu qui contient par ml: Tris 100 μmoles ; MgCl_2 12 μmoles ; ATP 9 μmoles ; glutathion réduit 8 μmoles ; acide aminé radioactif 40 μmoles ; préparation d'aminocycl-synthétases [16] environ 100 μg . Après précipitation par l'acide perchlorique 0,5 N, lavage à l'alcool-éther et dissolution dans l'acide formique concentré, la radioactivité est mesurée dans un compteur Tracerlab à fenêtre mince (efficacité pour le ^{14}C : 15%).

2.6. Mesures de radioactivité

La mesure de la radioactivité due à la méthylation des différentes fractions est réalisée dans un compteur à scintillation liquide Inter technique SL 40, avec correction automatique de l'affaiblissement lumineux.

3. Résultats et discussion

Au cours d'une première expérience ont été incubés séparément dans les conditions décrites ci-dessus: d'une part 3,3 mg de tRNA en présence de SAM^3H (116 mCi/mM) et de 2 ml d'extrait de foie, contenant 180 mg de protéines; d'autre part 0,25 mg de tRNA en présence de SAM^{14}C (34 mCi/mM) et de 0,62 ml d'extrait de myélome E2, contenant 14 mg de protéines.

Après 90 mn, les deux milieux sont réunis, 48 mg de tRNA leur sont ajoutés, et l'isolement du tRNA a lieu selon la technique indiquée plus haut. La fig. 1 montre les résultats de la séparation chromatographique sur colonne de RPC. Les activités spécifiques ont été calculées en tenant compte du rendement du compteur, de l'activité spécifique de la SAM et en admettant une masse moléculaire moyenne de 25.000 pour une molécule de tRNA.

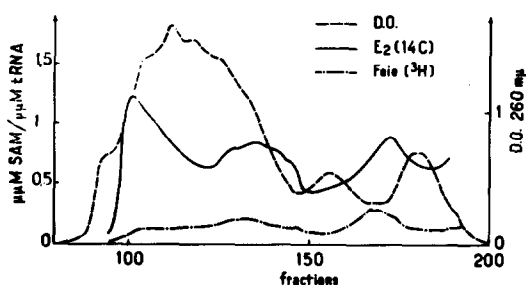


Fig. 1. Chromatographie sur colonne de RPC de tRNA d'*E. coli* méthylés par des extraits de myélome E2 et de foie. Gradient linéaire de NaCl de 0,3 M à 0,9 M en 3.000 ml. Volume des fractions: 12 ml. Vitesse d'élution: 36 ml/h. Température: 22°C.

On remarque que le premier pic d'activité spécifique (tubes 98 à 110) du tRNA méthylé par l'extrait de myélome (^{14}C) correspond à une très faible activité spécifique dans le tRNA méthylé par l'extrait de foie (^3H). D'autre part, le pouvoir accepteur pour la méthionine du tRNA contenu dans la fraction d'activité spécifique maximale est quatre fois plus élevée que celui du tRNA non fractionné.

Pour rechercher si ces deux observations traduisent une méthylation préférentielle du RNA Mét par l'extrait de myélome, une deuxième méthylation *in vitro* a été réalisée, avec 1 mg de tRNA, 0,75 ml d'extrait de myélome (contenant 56 mg de protéines) et de la SAM ^3H (800 mCi/mM). Le tRNA a été isolé après addition de 100 mg de tRNA entraîneur; environ 17 mg de cette préparation ont été chromatographiés sur une colonne de DEAE Sephadex, selon la technique de Nishimura [17] qui permet d'obtenir une fraction éluée précocement contenant essentiellement le tRNA Met. La position du tRNA Met est détectée par le test d'aminocacylation déjà décrit, et la radioactivité ^3H de chacune des fractions correspondantes est déterminée. Les résultats de cette expérience sont réunis dans la fig. 2. On constate une bonne coïncidence entre la courbe d'activité spécifique due à la méthylation et celle représentant l'emplacement du tRNA Met.

Des études préliminaires avaient montré que les extraits de myélomes étaient deux à quatre fois plus actifs envers le tRNA d'*E. coli* que les extraits de foie, et qu'ils méthylaient essentiellement l'adénine et la

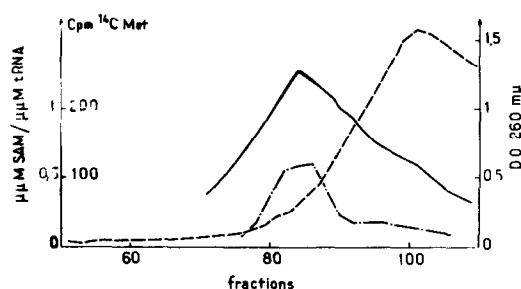


Fig. 2. Chromatographie sur colonne de DEAE Sephadex de tRNA d'*E. coli* méthylé par un extrait de myélome E2. Gradient d'élution: Tris 0,02 M, MgCl_2 0,008 M, NaCl 0,375 M: 500 ml; et Tris 0,02 M, MgCl_2 0,016 M, NaCl 0,525 M: 500 ml. Volume des fractions: 7 ml. Vitesse d'élution: 18 ml/h. Température: 22°C. D.O. 260 mμ: — — —; Activité spécifique ^3H : — — —; tRNA Met: -.-.-.-.

cytosine. Les expériences décrites ci-dessus semblent indiquer qu'il existe en outre une différence entre les spécificités des deux extraits vis-à-vis d'au moins une espèce de tRNA d'*E. coli*, élue précocement dans trois types de chromatographies différents: RPC, DEAE Sephadex et BD Cellulose (résultat non exposé ici). La position de ce tRNA en chromatographie sur DEAE Sephadex suggère fortement qu'il s'agit de tRNA Met [17].

À la suite de ces expériences, des travaux sont en cours pour vérifier la différence de spécificité ainsi mise en évidence en utilisant le tRNA Met purifié comme substrat. Néanmoins seules des études faites sur des systèmes homologues seraient susceptibles de dégager l'éventuelle signification physiologique de différences révélées par l'emploi de systèmes hétérologues.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une convention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (no. 66-00-406), ainsi que de l'aide apportée au Service de Biochimie Cellulaire par le National Institute of Health, le Centre National de la Recherche Scientifique et le Commissariat à l'Energie Atomique.

Références

- [1] P.L.Bergquist et R.E.F.Matthews, *Biochem. J.* 85 (1962) 305.
- [2] E.Fleissner et E.Borek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48 (1962) 1199.
- [3] J.Hurwitz, M.Gold et M.Anders, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 3462.
- [4] P.R.Srinivasan et E.Borek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 49 (1963) 529.
- [5] M.Revel et U.Z.Littauer, *J. Mol. Biol.* 15 (1966) 389.
- [6] J.D.Capra et A.Peterkofsky, *J. Mol. Biol.* 21 (1966) 455.
- [7] J.D.Capra et A.Peterkofsky, *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 591.
- [8] L.Shugart, G.D.Novelli et M.P.Stulberg, *Biochim. Biophys. Acta* 157 (1968) 83.
- [9] L.Shugart, B.H.Chastain, G.D.Novelli et M.P.Stulberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31 (1968) 404.
- [10] W.K.Yang et G.D.Novelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31 (1968) 534.
- [11] R.Axel, I.B.Weinstein et E.Farber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 58 (1967) 1255.
- [12] M.W.Taylor, C.A.Buck, G.A.Granger et J.J.Holland, *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 809.
- [13] E.Tsutsui, P.R.Srinivasan et E.Borek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56 (1966) 1003.
- [14] G.Zubay, *J. Mol. Biol.* 4 (1962) 347.
- [15] A.D.Kelmers, G.D.Novelli et M.P.Stulberg, *J. Biol. Chem.* 240 (1965) 3979.
- [16] K.H.Muench et P.Berg, in: *Procedures in Nucleic Acid Research* (Harper & Row, New York, 1966) pp. 375–383.
- [17] S.Nishimura, S.Harada, U.Narushima et T.Seno, *Biochim. Biophys. Acta* 142 (1967) 133.