

## FORMES MULTIPLES DE LA LYSYL-tARN-LIGASE DE LEVURE ET LEURS SOUS-UNITES

L. DIMITRIJEVIC

*Institut de Biologie Physico-chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, Paris Ve, France*

Received 30 May 1972

When yeast lysyl-tRNA-ligase is extracted in the presence of protease inhibitor (PMSF) a homogeneous species of enzyme is obtained, the subunits of which have a mass of 70 000 daltons. Endogenous degradation produces lighter active species of the enzyme, dimers with subunits in the range 50 000–60 000 daltons. Partial trypsinolysis mimics this degradation, which is therefore thought to occur through proteolysis.

### 1. Introduction

Les préparations de lysyl-tARN-ligase obtenues jusqu'à présent dans ce laboratoire à partir de *Saccharomyces cerevisiae* (souche H<sub>4</sub>) [1] étaient homogènes par centrifugation en gradient de saccharose; celle-ci, effectuée en présence d'alcool déshydrogénase comme marqueur, avait permis d'évaluer la constante de sédimentation à 5,8–6,2 S, et le poids moléculaire à 117.000 [1, 2]. Cependant, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de ces préparations donne principalement deux bandes protéiques, très proches, migrant vers l'anode (fig. 1, gel 1). Et l'on constate, après élution des bandes le mélange d'incubation et dosage de charge du tARN, que ces deux bandes protéiques sont actives.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette hétérogénéité: artefact de l'électrophorèse; existence *in vivo* de plusieurs espèces très proches de l'enzyme; protéolyse partielle de l'enzyme, dont il existe de nombreux exemples, tels que, parmi les aminoacyl-tARN-ligases, la leucyl-tARN-ligase d'*E. coli* [5], ou la tryptophanyl-tARN-ligase de pancréas de boeuf [6].

Notre but étant de déterminer le nombre et la nature chimique des sous-unités de la lysyl-tARN-ligase, nous nous sommes efforcés d'obtenir une préparation d'enzyme homogène en réduisant l'hétérogénéité des cellules due au vieillissement de la culture, et les risques de coupures par des protéases.

### 2. Matériels et méthodes

#### 2.1. Essais enzymatiques

La charge du tARN est mesurée selon la méthode décrite par Berry et Grunberg-Manago [2], avec 400 pmoles de [<sup>14</sup>C]lysine (activité spécifique 117 Ci/mole par essai de 0,05 ml. L'incubation est habituellement effectuée à 20° pendant 2 min.

L'échange ATP-[<sup>32</sup>P] pyrophosphate est effectué dans 0,1 ml du milieu suivant: [<sup>32</sup>P] pyrophosphate de sodium (activité spécifique 400 000 cpm/μmole), 2 mM; ATP, 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 5 mM; lysine, 2 mM; β-mercaptopropanoïde, 5 mM; Tris, pH 8, 100 mM. Au bout d'une heure d'incubation à 37°, on ajoute 5 μl d'EDTA 0,1 M à 20 μl du mélange réactionnel que l'on dépose sur papier Whatman DE-81. Après 6 hr d'élution avec du borate de sodium 0,05 M, pH 7, la tache correspondante à l'ATP est découpée et la radioactivité mesurée dans un compteur Packard Tri-Carb, dans 5 ml de mélange scintillateur à base de toluène (5 g/l de 2,5-diphényloxazole et 0,3 g/l de 1,4-bis-(2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)) benzène).

#### 2.2. Préparation de l'enzyme

Les levures (souche H<sub>4</sub>) ont été cultivées dans le milieu habituel [1] (30 g/l de glucose et 5 g/l d'extrait de levure). Afin d'obtenir des cellules dans le même état physiologique, on a effectué successivement deux précultures qui, de même que la culture finale, sont menées jusqu'au milieu de la phase logarithmique de

croissance. Après centrifugation, 60 g de levure ont été broyées avec une French Press dans 60 ml de tampon phosphate, pH 7, 20 mM et EDTA 0.1 M, contenant 2 mM de fluorure de phénylemethylsulfonium (PMSF), un inhibiteur des protéases à sérine dans leur centre actif [7]. La méthode de purification a été légèrement modifiée par rapport à celle déjà publiée [1]; en effet, notre méthode comporte: Précipitation au sulfate d'ammonium (le fractionnement par la streptomycine étant omis); colonne de DEAE-cellulose et colonne de Bio-Rex 70 [8] remplaçant le fractionnement sur Sephadex A-50 (tableau 1).

### 3. Résultats

On constate que les conditions de culture et de broyage influent sur le résultat de la purification: lorsque les levures sont receuillies en phase stationnaire et que les cellules sont broyées sans PMSF, la séparation sur colonne de DEAE-cellulose fournit deux pics d'activité. La fraction la plus importante se reconvertit à nouveau en deux espèces moléculaires séparées sur Bio-Rex 70. Lorsque l'on prend des précautions spéciales de culture et de broyage (extraction en présence de PMSF) on n'obtient, au contraire, qu'une seule fraction active à chaque étape de purification. C'est cette dernière préparation que nous appelons ci-après "enzyme natif".

#### 3.1. Agrégation

L'enzyme natif ne pénètre pas dans le gel de polyacrylamide au cours de l'électrophorèse (fig. 1, gel 2), même lorsque la concentration de gel est abaissée à 3% en acrylamide et l'électrophorèse faite à pH 9.5, 8.3, ou 2.3. Ceci suggère que cette préparation, contrairement aux précédentes, s'agrège facilement. Il pourrait s'agir d'un artefact de la technique; cependant, on trouve le même résultat par filtration sur gel de Sephadex G-200, élué avec un tampon phosphate 0.02 M, pH 7.4, plus KCl, 0.1 M: l'enzyme natif, à l'inverse des autres préparations est entièrement exclu du gel. Sa constante de sédimentation, en gradient de saccharose ou de glycérol, est largement supérieur à 16 S (limite mesurable dans les conditions utilisées), même en présence de NaCl 1 M, ce qui semble exclure que l'agrégation de l'enzyme soit de nature purement électrostatique.

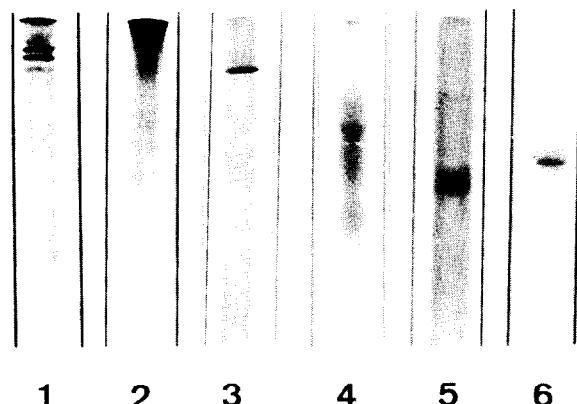


Fig. 1. Electrophorèse de la lysyl-tARN-ligase sur gel de polyacrylamide. Pour les gels 1, 2, 3 et 4 l'électrophorèse est effectuée sur gel à 7.5% d'acrylamide selon la méthode habituelle [3] avec des échantillons de 20 à 25 µg. Pour les gels 5 et 6 l'électrophorèse est effectuée en présence de SDS (0.1%) selon la méthode classique [4] les échantillons (25 µg protéines/0.1 ml) sont dissociés avant électrophorèse par incubation 5 min à 60°, en présence de SDS (1%) et de β-mercaptopropanoïde (1%). Les protéines sont colorées au blue de Coumassie.

Gel 1: Enzyme préparé sans PMSF à partir de levures récoltées au début de la phase stationnaire ("enzyme dégradé").

Gel 2: Enzyme préparé avec PMSF, à partir de levures récoltées en phase exponentielle ("enzyme natif").

Gel 3: Enzyme natif dans le milieu de charge du tARN (mêmes concentrations de tARN, d'ATP et de lysine que dans la fig. 3).

Gel 4: Enzyme natif partiellement digéré par la trypsine. La digestion de la lysyl-tARN-ligase (250 µg/ml) est effectuée à 20° dans un volume de 0.1 ml avec 0.5 µg/ml de trypsine dans un tampon Tris-Cl, pH 8, 0.2 M. La digestion est arrêtée au bout de deux minutes par 2 µg d'inhibiteur de trypsine du soja (Koch Light, Gde Bretagne). Dans ces conditions l'activité de charge est 90% de l'activité de l'enzyme natif.

Gel 5: Enzyme dégradé après dissociation.

Gel 6: Enzyme natif après dissociation.

En présence du milieu de charge (tARN-ATP-lysine) l'agrégation de l'enzyme natif ne se produit pas; on n'obtient, dans ce cas, qu'une seule bande protéique sur gel de polyacrylamide (fig. 1, gel 3). L'enzyme, centrifugé en gradient de glycérol en présence de tARN donne une constante de sédimentation de 8,2 S à pH 8 (fig. 2); les marqueurs utilisés étant l'alcool déshydrogénase de levure et la polynucléotide

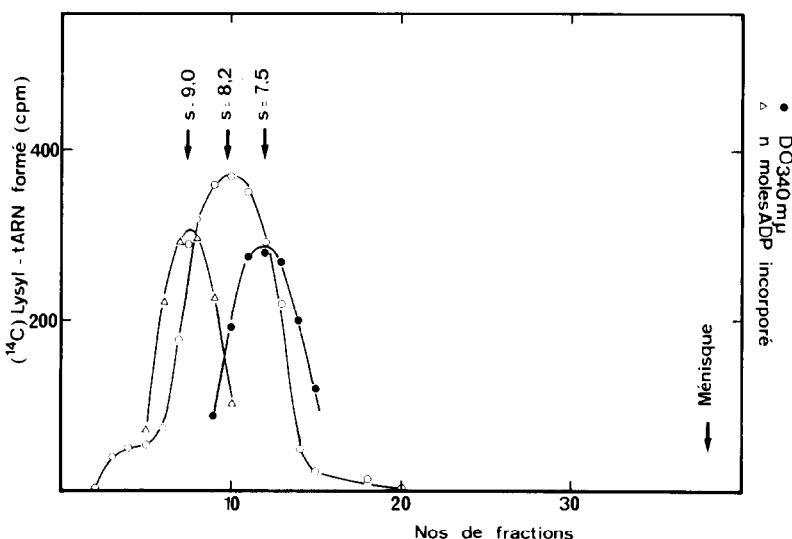


Fig. 2. Sédimentation de la lysyl-tARN-ligase en présence de tARN chargé, en gradient de glycérol. Un gradient linéaire de 10% à 30% de la glycérol est préparé dans un tampon Tris-Cl, pH 8, 100 mM. L'échantillon (175 µl) contient: Tris, 100 mM; MgCl<sub>2</sub>, 10 mM; ATP, 2 mM; lysine, 0.1 mM; tARN total de levure, 10 mg; lysyl-tARN-ligase, 65 µg; alcool déshydrogénase de levure (7.5 S) (Sigma, USA) 50 µg; polynucléotide phosphorylase d'*E. coli* (9.1 S), 30 unité [9]. On centrifuge à 40 000 tpm pendant 15 hr à 4° et l'on recueille des fractions de 120 µl. L'activité de charge (○—○—○) est mesurée sur des aliquotes de 25 µl; la poly-nucléotide phosphorylase (△—△—△) est dosée sur 10 µl par la réaction de phosphorylase (9) et l'alcool déshydrogénase (●—●—●) sur 5 µl [1].

phosphorylase d'*E. coli*. Ceci démontre que le tARN empêche la formation d'agrégats de l'enzyme natif, probablement en formant un complexe enzyme-tARN.

### 3.2. Sous-unité

La dissociation de la lysyl-tARN-ligase a été effectuée en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS) 1% et de β-mercaptopéthanol à 1% à 60° pendant 5 min. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (0,1%) a ensuite permis, en utilisant des marqueurs de sous-unités connues, de déterminer le poids moléculaire des sous-unités de la lysyl-tARN-ligase (fig. 3). Avec l'enzyme natif, on obtient uniquement des sous-unités de poids moléculaire 68 000–70 000 (fig. 1, gel 6). Avec les autres préparations, reconnues comme étant hétérogènes, on obtient deux types de sous-unités: 50 000 et 60 000 (fig. 1, gel 5); il s'agit donc d'un dimère. L'enzyme natif, s'il se trouve *in vivo* sous forme de

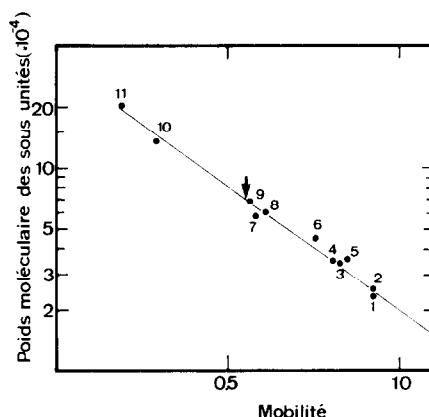


Fig. 3. Poids moléculaire des sous-unités de la lysyl-tARN-ligase native. Les marqueurs utilisés sont: (1) trypsin, 23 300; (2) α-chymotrypsine, 25 000; (3) carboxypeptidase, 34 600; (4) pepsine, 35 000; (5) glycéraldehyde-3-phospho-déshydrogénase, 36 000; (6) ovalbumine, 45 000; (7) pyruvate kinase, 57 000; (8) catalase, 60 000; et sérum albumine: (9) monomère, 68 000; (10) dimère, 136 000; (11) trimère, 204 000. La migration est mesurée par rapport au blue de bromophénol.

Tableau 1  
Purification de la lysyl-tARN-ligase de levure.

Etapes	A <sub>280</sub> /A <sub>260</sub>	Activité spécifique (pmole/min/mg protéines)	Activité totale (pmoles/min)
Extrait brut (60 g de levure)	0,5	0,66	4000
I Precipité fractionné au sulfate d'ammonium (40–60% saturation)	0,5	15	8250
II DEAE-cellulose	0,76	30	1425
III Bio-Rex-70	1,3	150	114

L'activité est mesurée par la charge du tARN. Les essais étant faits dans des conditions où la [<sup>14</sup>C]lysine n'est pas en concentration saturante, on n'obtient pas la vitesse maximum de charge. Les étapes I et II du tableau 1 correspondent à celles déjà décrites [1].

Après la précipitation au sulfate d'ammonium, l'enzyme est dialysé et ensuite purifié par chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose (35 × 3 cm) équilibrée avec un tampon phosphate 0,05 M pH 7 et eluée avec un gradient linéaire de tampon phosphate 0,05 M à 0,15 M et EDTA, 1 mM.

La colonne de Bio-Rex 70 (2,5 × 4 cm) est équilibrée dans un tampon phosphate de potassium 0,2 M, pH 7. L'enzyme est adsorbé dans le même tampon et elué par un gradient de phosphate pH 7, de 0,2 à 0,5 M. L'activité est eluée vers 0,4 M. Après les étapes II et III, l'enzyme est concentré par ultrafiltration (Diaflo, membranes XM-50, Aminco Corp., USA).

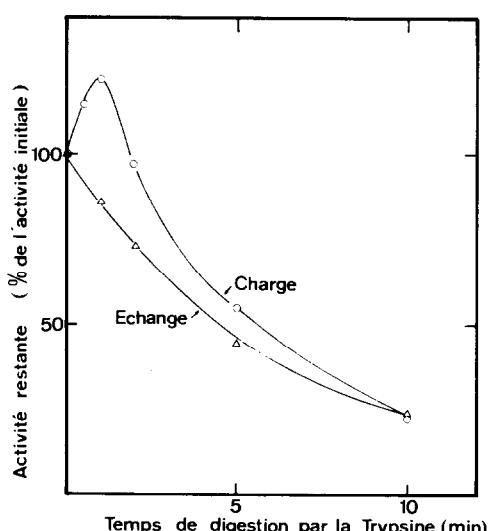


Fig. 4. Perte d'activité au cours de la dégradation par la trypsine. L'enzyme (50 µg/ml) est digéré avec 0,5 µg/ml de trypsine dans un tampon Tris-Cl, pH 8, 0,2 M (volume total 0,3 ml) à 20°. Des aliquotes de 50 µl sont diluées dans le milieu de la réaction (charge ou échange, voir méthodes) contenant 2 µg d'inhibiteur du soja. L'activité de charge est mesurée sur 2 min à 20° et l'activité d'échange sur 1 hr à 37°.

dimère, devrait avoir un poids moléculaire de 135–140 000; c'est d'ailleurs la valeur obtenue récemment par Rymo et coll. [10].

### 3.3. Dégradation trypsique de l'enzyme

La lysyl-tARN-ligase de levure existe donc sous plusieurs formes actives, de poids moléculaires différents. Il est vraisemblable que la diminution de poids moléculaire provient d'une protéolyse partielle par des protéases endogènes qui ne sont pas complètement éliminées au cours de la purification, puisqu'il y a conversion de l'enzyme jusqu'à la dernière étape de celle-ci.

Dans le cas de la méthionyl-tARN-ligase, Cassio et coll. [11] ont démontré qu'une protéolyse partielle par la trypsine produit une forme active modifiée, qui semble identique à celle obtenue par dégradation spontanée de l'extrait brut pendant l'incubation à 37°.

Il a été démontré que l'enzyme natif a tendance à former des agrégats; une fois l'enzyme dégradé par protéolyse endogène, l'agrégation n'a plus lieu. Cette hypothèse se trouve étayée par l'effet d'une protéolyse trypsique partielle. Effectivement, après protéolyse ménagée, l'enzyme pénètre dans les gels de polyacryl-

amide à 7,5% dans des conditions où l'activité reste 90% de celle de l'enzyme natif (fig. 1, gel 4) (Rapport poids/poids ligase/trypsine = env. 500).

Une étude des activités de charge et d'échange ATP/PP<sub>i</sub> en fonction du temps de dégradation par la trypsine (ligase/trypsine = 100) montre que ces deux activités décroissent en même temps et à peu près dans les mêmes proportions (fig. 4). La lysyl-tARN-ligase de levure qui perd simultanément l'activité de charge et d'échange réagit donc différemment de la leucyl-tARN-ligase d'*E. coli* [5], par exemple, dont l'activité d'échange est beaucoup plus stable vis-à-vis des dégradations protéolytiques que l'activité de charge.

#### 4. Discussion

Nous avons montré que selon le mode de préparation, on peut obtenir des lysyl-tARN-ligases de levure dont les propriétés moléculaires sont différentes. Lorsque la préparation est effectuée en présence de PMSF, on obtient un enzyme homogène, qui a fortement tendance à s'agréger et ne pénètre pas dans le gel de polyacrylamide, néanmoins, cette agrégation n'a pas lieu en présence de tARN, le complexe enzyme-tARN pénétrerait alors dans le gel, et l'on observe une bande unique après électrophorèse. Cet enzyme possède un seul type de sous-unités de poids moléculaire 70 000. Ceci est en accord avec les résultats de l'analyse en gradient de glycérol en présence de tARN, ainsi qu'avec les valeurs trouvées par d'autres auteurs [10]. Lorsque, au contraire, la lysyl-tARN-ligase est préparée sans précaution particulière, elle ne s'agrège pas, et l'on trouve deux bandes d'enzyme actif après électrophorèse en gel de polyacrylamide. L'électrophorèse en présence de SDS permet de mettre en évidence deux types de sous-unités, de masse 50 000 et 60 000 daltons.

D'autres auteurs [10] ont noté une hétérogénéité de la lysyl-tARN-ligase (sur colonne d'hydroxylapatite) et l'ont attribué à des changements de conformation de la protéine. Dans notre cas, l'hétérogénéité résulte d'une dégradation de l'enzyme natif par une protéase endogène. Nous avons d'ailleurs pu modifier

les propriétés de l'enzyme natif par un traitement trypsique: l'enzyme traité reste actif, mais ne s'agrège plus et pénètre dans le gel de polyacrylamide. Une protéolyse endogène intervient surtout au cours de la phase stationnaire de la culture de levure. Elle serait responsable des formes d'enzyme à faible poids moléculaire, décrite par divers auteurs, de masse moléculaire 117 000 [1] et 113 000 [12].

#### Remerciements

Nous remercions le Dr. Lagerkvist d'avoir bien voulu nous communiquer son manuscrit actuellement sous presse [ref. 10].

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Centre National de la Recherche Scientifique (G.R. No. 18) d'une participation du C.E.A. ainsi que de l'aide de la Fondation pour la Recherche Médicale Française et de la Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de la Seine).

#### References

- [1] C. Letendre, J.M. Humphreys et M. Grunberg-Manago, Biochim. Biophys. Acta 186 (1969) 46.
- [2] S.A. Berry et M. Grunberg-Manago, Biochim. Biophys. Acta 217 (1970) 83.
- [3] B.J. Davis, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 (1964) 404.
- [4] K. Weber et M. Osborn, J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406.
- [5] P. Rouget et F. Chapeville, European J. Biochem. 14 (1970) 498.
- [6] O. Favorova, V. Stelmastchuk, A. Parin, S. Kchilko et L. Kisselov, 7th FEBS Meeting, Varna, 1971.
- [7] I. Schulze et S. Colowick, J. Biol. Chem. 244 (1969) 2306.
- [8] V. Chlumecka, M. von Tiegerstrom, P. d'Obrennen et C. Smith, J. Biol. Chem. 244 (1969) 5481.
- [9] F.R. Williams et M. Grunberg-Manago, Biochim. Biophys. Acta 89 (1964) 66.
- [10] L. Rymo, L. Lundvik et U. Lagerkvist, J. Biol. Chem., sous presse.
- [11] D. Cassio et J.P. Waller, European J. Biochem. 20 (1971) 283.
- [12] U. Lagerkvist et J. Waldenström, J. Biol. Chem. 240 (1965) 2264.