

DISTRIBUTION CELLULAIRE DES FACTEURS D'ELONGATION EF1 DU GERME DE BLE

B. QUINTARD et R. JULIEN

Laboratoire de Biochimie, U.E.R. des Sciences, 123, rue A. Thomas 87100, Limoges, France

Received 2 July 1975

Summary

Cellular distribution of elongation factors (EF1) from imbibed then redessicated wheat embryos is determined after purification and analytical gel electrophoresis of soluble and ribosome-bound factors.

Two heavy forms (EF1_H, mol. wt, 250 000) are found in cytosol while ribosome-bound factors contain a light form (EF1_L, mol. wt, 45 000) with the greatest activity and a heavy form (mol. wt, 160 000) which might well be an intermediary in the recycling of ribosomal factor EF1_L to soluble factor EF1_H.

1. Introduction

Des études récentes sur le facteur d'élongation EF1 du germe de blé soulignent la multiplicité des formes sous lesquelles cette protéine se présente dans la fraction cytoplasmique [1-4]. La prédominance de deux formes de masse molaire distinctes, l'une proche de 200 000 (EF1_H) l'autre de 50 000 (EF1_L) est cependant admise. Bien qu'elles catalysent toutes deux la formation du complexe Phé-tRNA-ribosome-poly U dépendante, seule la dernière contribuerait à la formation du complexe ternaire Phé-tRNA-EF1_L-GTP [2]. Les nucléotides guanyliques, et en particulier GTP et GDP, en provoquant la conversion de EF1_H en EF1_L [2] ont conduit à postuler, par analogie avec les facteurs T_u-T_s bactériens, l'existence de transitions cycliques entre les deux formes, avec de nombreux intermédiaires, probablement responsables de l'hétérogénéité souvent constatée.

En examinant la distribution et les propriétés des facteurs EF1 libres et liés aux ribosomes, nous apportons dans ce travail la confirmation d'une transition ribosome dépendante entre EF1_H et EF1_L pour la fixation de l'aminocyl-tRNA en présence de poly U. De plus, il semblerait que le ribosome intervienne également pour recycler EF1_L en EF1_H.

2. Matériel et méthodes

Des germes de blé quiescents, imbibés 6 h, puis redesséchés sont utilisés comme sources de tRNA^{Phé} [5] de phénylalaninyl-tRNA synthétase, de ribosomes et de facteurs EF1.

[¹⁴C]Phé-tRNA: il est préparé en présence de l'enzyme purifiée, à pH 8.6 pour un rapport Mg²⁺/ATP optimum de 1.5.

EF1 solubles: ils sont obtenus et testés pour la formation du complexe [¹⁴C]Phé-tRNA-ribosome-poly U, suivant le procédé de Golinska et Legocki [1]. Le milieu utilisé pour la formation du complexe comprend pour un volume final de 0.2 ml: Tris-HCl 50 mM, pH 8.05; acétate Mg 5 mM; KCl 70 mM; DTT 3 mM; 90 µg de ribosomes; 1 à 7 µg de facteur EF1 et 16 pmol de [¹⁴C]Phé-tRNA.

Ribosomes: les ribosomes bruts, mis à incuber une nuit, à 4°C, dans un tampon Tris-HCl, pH 8.5, acétate Mg 5 mM, KCl 1 M, mercaptoéthanol 2 mM, glycérol 20% (v/v) sont ensuite recueillis par centrifugation et conservés à -20°C à 200 A₂₆₀/ml dans un tampon identique ajusté à 50 mM KCl.

EF1 liés aux ribosomes: les protéines présentes dans la solution de lavage des ribosomes sont relarguées par le sulfate d'ammonium (65% de la saturation) puis

redissoutes dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7.7, KCl 10 mM, mercaptoéthanol 3 mM, glycérol 5%, dialysées et fixées sur une colonne d'hydroxylapatite (3 × 3.7 cm). Après le lavage de la colonne par un tampon phosphate 10 mM, pH 7.3, mercaptoéthanol 3 mM, glycérol 5%, les facteurs EF1 sont élués par la même solution ajustée à 250 mM en phosphate de potassium et à pH 7.9.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide: elles sont réalisées suivant les procédés de Jovin et coll. [6] et Weber et Osborn [7].

3. Résultats et discussion

3.1. Purification comparée des formes solubles et des formes liées aux ribosomes du facteur EF1

Les activités des facteurs EF1 formatrices du complexe Phé-tRNA-poly U-ribosome apparaissent, pour les germes de blé utilisés (voir Matériel et méthodes) réparties de façon quasi égale entre les fractions soluble et ribosomique (11080 U contre 13130 U). Le processus de purification utilisé pour l'obtention des EF1 du cytosol en combinant les méthodologies de Golinska et Legocki [1] et de Lanzani et coll. [3]

fournit deux types d'activités factorielles EF1, l'une purifiée 135 fois avec un rendement de 22%, l'autre 270 fois avec un rendement de 15% (table 1). De ces deux activités, éluées de la colonne d'hydroxylapatite (Bio Gel HTP) respectivement par le phosphate de potassium 150 mM et 200 mM (fig.1), la première, comme l'ont noté Lanzani et coll. [3] est beaucoup plus instable que la seconde qui peut être conservée plusieurs semaines à -20°C.

La séparation chromatographique des facteurs liés aux ribosomes (fig.2) fournit, comme précédemment, et bien que l'éluion soit différente (une seule étape au lieu d'un gradient), deux fractions légèrement moins actives que les facteurs solubles, peut être en raison de leur très grande instabilité. En effet, l'activité correspondant au pic A peut être conservée environ une semaine, tandis que celle correspondant au pic B disparaît complètement après 48 h. Les facteurs liés sont purifiés environ 5 et 10 fois respectivement pour les deux formes et avec des rendements de 14 et 8%.

3.2. Distribution cellulaire des facteurs EF1_H et EF1_L

Quatre activités factorielles EF1 catalysant la

Table 1
Purification des facteurs EF1 du germe de blé imbibé puis redesséché

Fractions	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Purification	Rendement %
<i>EF1 Solubles</i>				
1. Surnageant S 105	1385	8	1	100
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ 40-65% sat.	615,5	15,1	1,88	83
3. Séphadex G150	160	50,4	6,3	72
4. Hydroxylapatite	19	365	45,6	62
5. Hydroxylapatite				
pic I	2,25	1081	135	22
pic II	0,8	2162	270	15
<i>EF1 Liés</i>				
1. Surnageant du lavage des ribosomes	130	101	1	100
2. (NH ₄) ₂ SO ₄ 65% sat.	28	183	1,8	39
3. Hydroxylapatite				
pic A	3,7	488	4,83	14
pic B	1,08	1012	10	8

Dans l'activité spécifique une unité d'activité EF1 correspond à 1 pmol [¹⁴C]Phé-tRNA liée au ribosome à 30°C en 10 min dans les conditions décrites par Golinska et Legocki [1].

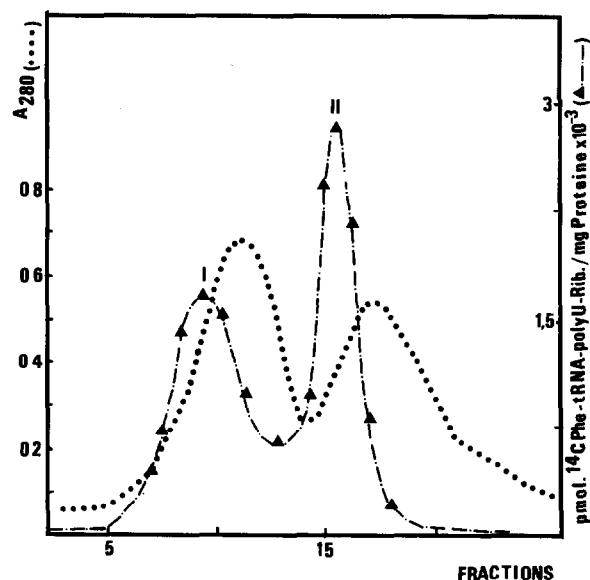
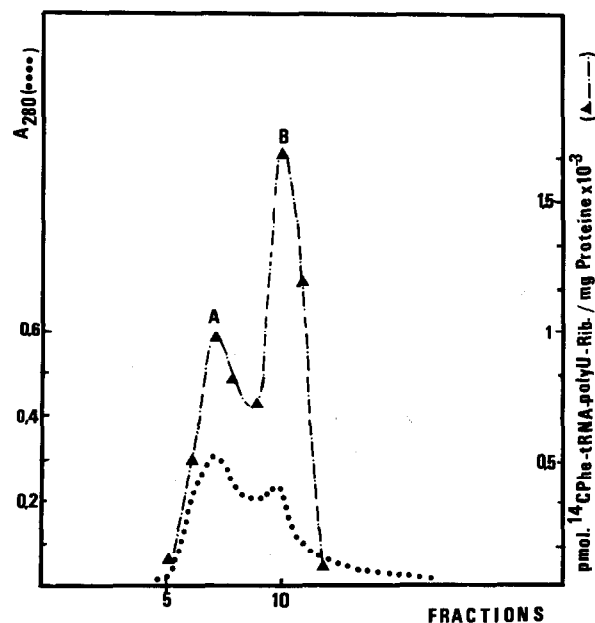


Fig.1. Chromatographie sur hydroxylapatite du facteur EF1 soluble. Colonne (1.9 × 6 cm); dépôt de 20 mg de protéines dans un tampon phosphate de K 100 mM, pH 7.3, mercaptoéthanol 3 mM, glycérol 5% (v/v); lavage par le même tampon. Elution en gradient linéaire 375 ml de phosphate de K de 100 à 300 mM, pH de 7.3 à 8 - Fractions de 2.7 ml. Chaque fraction est testée pour son aptitude à former le complexe Phé-tRNA-poly U-rib. dans les conditions décrites dans Matériel et méthodes.



formation du complexe Phé-tRNA-poly U-ribosome peuvent ainsi être isolées des cellules du germe de blé imbibé puis redesséché. Puisque deux d'entre elles sont liées aux ribosomes, et les deux autres solubles, et sachant que la transition entre les formes EF1_H et EF1_L s'accomplit avec la fixation de l'acyl-tRNA au ribosome, la distribution des activités EF1 entre la fraction cytoplasmique soluble et les ribosomes doit correspondre à une distribution cellulaire particulière des formes lourde et légère du facteur EF1.

L'analyse électrophorétique des protéines factérielles de la fraction soluble (planche I, A et C) démontre que c'est bien pour l'essentiel la forme lourde (EF1_H) qui est responsable de l'activité observée dans le cytosol. En effet, les protéines correspondant aux deux activités isolées (fig.1, pics I et II) produisent une seule et même bande électrophorétique dont la masse molaire, estimée par référence à celles de la ferritine (540 000), la catalase (240 000) et de l'aldolase (160 000), est de 250 000. On notera que lorsque l'électrophorèse est conduite dans des conditions dissociantes [7] les deux protéines factérielles se dissocient différemment, l'une (celle qui correspond au pic I d'activité) fournissant quatre bandes de masses égales respectivement à 250 000, 120 000, 90 000 et 50 000 (Planche I B) et l'autre (celle qui correspond au pic d'activité II) quatre bandes de masses égales à 250 000, 180 000, 90 000 et 45 000 (Planche I D).

La dissociation de EF1_H du cytosol fournit donc un facteur EF1_L ainsi que diverses formes intermédiaires, qui peuvent, comme le suggèrent Golinska et Legocki, représenter des dimères et trimères de EF1_L. Les différences observées dans la dissociation des protéines des pics I et II, pourraient résulter de différences dans la structure des facteurs solubles, liées à

Fig.2. Chromatographie sur hydroxylapatite du facteur EF1 lié aux ribosomes. Colonne (3 × 3.7 cm); dépôt de 27 mg de protéines dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 7.7, KCl 10 mM, mercaptoéthanol 3 mM, glycérol 5%; Le lavage de la colonne qui s'effectue par un tampon phosphate de K 10 mM pH 7.3, mercaptoéthanol 3 mM, glycérol 5% élimine plus de 20 mg de protéines non factérielles. L'élution s'effectue par un tampon identique à 250 mM en phosphate de K, pH 7.9 - Fractions de 2 ml. Chaque fraction est testée pour son aptitude à fournir le complexe Phé-tRNA-poly U-rib. dans les conditions décrites dans Matériel et méthodes.

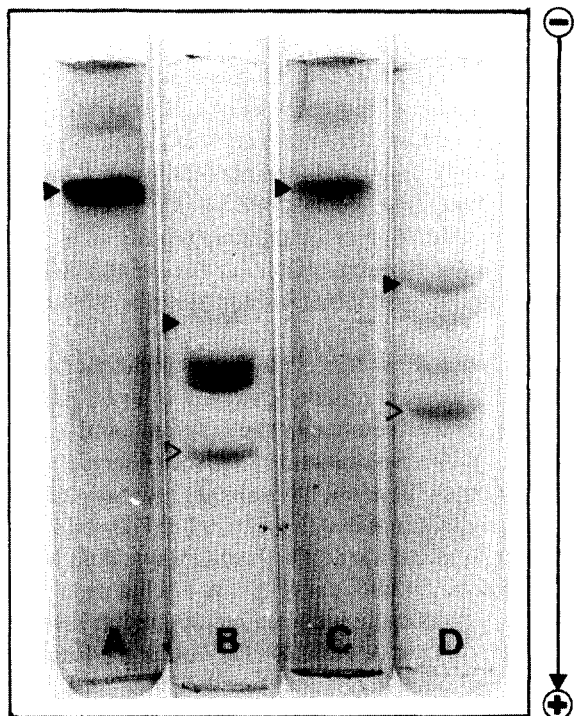


Planche I. Migration électrophorétique sur gel polyacrylamide des facteurs EF1 solubles. *A et C*: Migration électrophorétique selon la technique de Jovin et coll. [6]. Gel de polyacrylamide à 8.6%, pH 8.6, dépôt de 30 μ g de protéines, 4 mA par gel, migration 1 h 30. (A) Protéines correspondant au pic I d'activité (fig.1). (C) Protéines correspondant au pic II d'activité (fig.1). *B et D*: Migration électrophorétique des mêmes protéines (B: pic I) (D: pic II) selon la méthode de Weber et Osborn [7] en présence de SDS 1%, gel de polyacrylamide à 5.2% pH 7.4, dépôt de 20 μ g de protéines, migration 1 h, 4 mA par gel. EF1_H: 250 000 (►); EF1_L: 45 000 (▷).

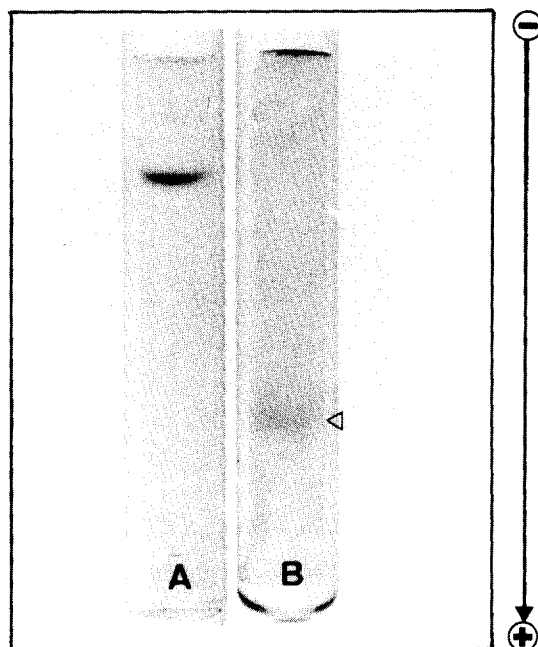


Planche II: Migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide des facteurs EF1 liés aux ribosomes. Gel de polyacrylamide à 10%, pH 8.6, dépôt de 10 μ g de protéines, migration 1 h 40, 4 mA par gel. Conditions non dissociantes (Jovin et coll. [6]). (A) Protéines correspondant au pic d'activité A (fig.2). (B) Protéines correspondant au pic d'activité B (fig.2). EF1_L: 45 000 (<).

et de la BSA (67 000) à 45 000. Puisqu'en présence de SDS, la migration de cette protéine n'est pas affectée, le facteur EF1_L ribosomique pourrait être constitué par un seul polypeptide de masse égale à 45 000 (résultat non publié).

Cependant, la protéine correspondant au pic d'activité A, produit une bande électrophorétique dont la masse s'établit à 160 000. Il apparaît donc qu'une forme lourde du facteur EF1 peut être liée au ribosome. Bien que la présence d'une telle forme ait encore une signification obscure, on peut se demander si cette forme constitue un intermédiaire dans la transition démontrée par Tarrago et coll. [2] de EF1_H vers EF1_L ou bien s'il s'agit d'un intermédiaire dans le recyclage de EF1_L ribosomique en EF1_H ribosomique puis soluble. Dans cette dernière hypothèse, le recyclage de EF1_L en EF1_H résulterait d'interactions nécessitant la participation des ribosomes.

l'étape précise du cycle fonctionnel, et en particulier de leur association éventuelle avec des aminoacyl-tRNA.

L'analyse électrophorétique des protéines factorielles liées aux ribosomes montre que pour l'essentiel, c'est bien la forme légère (EF1_L) qui est responsable de l'activité EF1 ribosomique (Planche II B). La protéine correspondant au pic d'activité B (le plus important) produisant une bande électrophorétique dont la masse s'établit, par référence aux masses du cytochrome (12 000), de la chymotrypsine (25 000)

References

- [1] Golinska, B. et Legocki, A. B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 324, 156–170.
- [2] Tarrago, A., Allende, J. E., Redfield, B. et Weissbach, H. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 353–361.
- [3] Lanzani, G. A., Bollini, R. et Soffientini, A. N. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 335, 275–283.
- [4] Bollini, R., Soffientini, A. N., Bertani, A. et Lanzani, G. A. (1974) *Biochemistry* 13, 5421–5425.
- [5] Yoshikami, D. et Keller, E. B. (1971) *Biochemistry* 10, 2969–2976.
- [6] Jovin, T., Chrambach, A. et Naughton, M. A. (1964) *Anal. Biochem.* 9, 351–369.
- [7] Weber, K. et Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.