

PRÉSENCE DE LA ϵ N-TRIMETHYLLYSINE DANS L'ISO-1 ET L'ISO-2 CYTOCHROMES *c* SYNTHÉTISÉS PAR DES SOUCHES DE LEVURE À DÉFICIENCE RESPIRATOIRE (ρ^-)

J. VERDIÈRE et F. LEDERER

Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S., 91 Gif-sur-Yvette, France

Received 23 July 1971

It is shown that the iso-1 and iso-2 cytochromes *c* synthesized by two strains of respiratory deficient strains of yeast (ρ^-) possess one residue of ϵ N-trimethyllysine and do not differ in this respect from the iso-cytochromes produced by ρ^+ strains. This result excludes the possibility that the methylation reaction is linked to respiratory activity or to the ρ^+ factor.

1. Introduction

On sait depuis les travaux de Delange et al. [1] que le cytochrome *c* de *Neurospora* et celui de germe de blé contiennent respectivement 1 et 2 résidus de ϵ N-triméthyllysine. L'iso-1 et l'iso-2 cytochromes *c* synthétisés par une même cellule de levure [2] contiennent également un résidu de ϵ N-triméthyllysine en position 72 [3]. De plus, les travaux de Scott et Mitchell [4] ont montré que la triméthylation de la lysine 72 du cytochrome *c* de *Neurospora* est postérieure à la synthèse complète de la protéine et qu'elle ne se produit qu'à la fin de la phase exponentielle de croissance.

Dans notre laboratoire, à partir d'une souche grande, nous avons récemment séparé par chromatographie sur Amberlite des pics cytochromiques mineurs distincts de l'iso-1 et de l'iso-2 cytochrome *c*, qui ne présentent pas de ϵ N-triméthyllysine [5]. Or on sait que dans toute population de levures grandes ρ^+ , il existe toujours des cellules de génotype petite ρ^- [6]. Selon les souches et les conditions de culture la proportion des cellules ρ^- peut atteindre quelques dizaines de pour cent. Les cellules ρ^- sont caractérisées par une déficience respiratoire tout en produisant, en quantité comparable à la grande, un cytochrome *c* qui présente une activité enzymatique normale après extraction [7]. On pouvait se demander, si, du fait de cette déficience respiratoire, la réaction de triméthyla-

tion ne serait pas perturbée.

Nous avons donc cherché à savoir si les mutants de levure petite sont capables d'effectuer la réaction de méthylation de la lysine 72 et par là-même si l'hétérogénéité moléculaire observée pour les cytochromes de la souche grande était due à une hétérogénéité cellulaire de la population de levure.

2. Materiel et méthodes

Nous avons analysé le cytochrome *c* de quatre souches: deux grandes et deux petites. Nous n'indiquons dans les génotypes que les gènes concernant les cytochromes:

D261	ρ^+	CY1/CY1	CY2A/CY2A
DP31	ρ^+	CY1/CY	cy2A-18/cy2A-18
IL8-8C/R5/3	ρ^-	CY1/CY1	CY2A/CY2A
DP31/V1	ρ^-	CY1/CY1	cy2A-18/cy2A-18

Ces souches ont été décrites par Clavilier et al. [8].

La souche ρ^- IL8-8C/R5/3 tout comme la souche D261 ρ^+ contient essentiellement de l'iso-1 cytochrome *c* (90 à 95% du cytochrome total) [2]. La souche DP31/V1 ρ^- par contre synthétise presqu'uniquement de l'iso-2 cytochrome *c* (jusqu'à 95%) alors que la souche isochromosomique DP31 ρ^+ produit de 60 à 70% d'iso-2 et 30 à 40% d'iso-1 [9].

L'extraction des cytochromes de souche grande a été menée à partir de plusieurs kilogrammes de levure humide, celle des cytochromes de souche petite à partir de 15 g poids sec. L'extraction et la purification des cytochromes ont été menées selon Sels et al. [10], mais chaque échantillon a subi deux chromatographies sur Amberlite, et non une seule.

Le cytochrome lyophilisé a été hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique bidistillé dans des tubes scellés sous vide pendant 24 hr à 110°, l'acide chlorhydrique éliminé ensuite à pression réduite avec un évaporateur rotatif Büchi.

Les analyses d'acides aminés ont été effectuées sur un analyseur Beckman 120 C, dont l'enregistreur est équipé d'une carte de résistance de 4 à 5 mV permettant un dosage précis à partir de 3 à 5 nmoles d'acides aminés. La *εN*-triméthyllysine a été analysée sur une colonne de résine Beckman PA 35 de 0,9 X 38 cm, élue à 30° par du tampon citrate 0,2 M, pH 5,84, contenant 4 g/l de ClNa (débit: 34 ml par hr). Dans

ces conditions, inspirées d'un travail de Hempel et al. [11], la *εN*-triméthyllysine est entièrement séparée de l'histidine et de la lysine.

3. Résultats

Le tableau 1 présente les compositions en acides aminés des cytochromes purifiés à partir des quatre souches.

La séquence complète de l'iso-1 cytochrome c de la souche ρ^+ a été publiée par Narita et Titani [12]. De plus Yaoi [13] a montré par des expériences de cartes peptidiques que la structure primaire de l'iso-1 cytochrome c d'une souche grande et d'une souche petite sont probablement identiques. Ceci ne présage en rien l'existence de la *εN*-triméthyllysine dans le cytochrome de la souche ρ^- puisque, d'après Scott et Mitchell [4], la triméthylation de la lysine 72 n'affecte pas la mobilité du peptide chromatographique

Tableau 1
Analyse d'acides aminés des iso-cytochromes.

Souche	Iso-1			Iso-2	
	D261	D261	IL8-8C/R5/3	DP31	DP31/V1
	ρ^+	ρ^+	ρ^-	ρ^+	ρ^-
Lys	16	15,5	16,8	16,0	15,3
His	4	4	4	3	3
Arg	3	3,0	3,4	2,7	2,9
<i>εN</i> Me ₃ Lys	1	1,0	0,8	1,0	0,8
Asp	11	10,2	11,3	13,4	11,6
Thr	8	7,4	7,8	9,5	8,9
Ser	4	4,0	5,3	6,0	8,9
Glu	9	8,8	9,9	9,2	10,9
Pro	4	5,2	4,5	5,5	5,2
Gly	12	12,0	12,1	13,2	13,4
Ala	7	7,0	7,4	6,7	8,4
Val	3	2,5	3,0	2,7	2,8
Met	2	1,9	1,6	2,2	2,5
Ile	4	3,1	3,1	4,6	4,4
Leu	8	8	8	5	5
Tyr	5	4,8	3,5	4,0	3,6
Phe	4	4,4	3,6	3,8	3,8

Les chiffres représentent la moyenne de 2 analyses sauf pour la triméthyllysine des souches ρ^- (1 seule valeur). La leucine et l'histidine ont été prises comme base de calcul pour les acides aminés des colonnes longue et courte respectivement. Le cytochrome de la souche D261 (ρ^+) a été hydrolysé en présence de mercaptoéthanol à 5%. La quantité de *εN*-triméthyllysine a été calculée avec la constante de l'histidine, suivant [1].

correspondant. La séquence complète de l'iso-2 cytochrome *c* de la souche D261 n'est pas publiée, pas plus que celle de la souche DP31, mais en raisonnant par analogie avec la situation pour l'iso-1, on peut supposer que les iso-2 de la souche DP31 et de la petite correspondante DP31-V1 ρ^- ont des séquences identiques.

On voit sur le tableau que l'accord est effectivement satisfaisant entre les compositions des iso-cytochromes de souche grande et de souche petite correspondante. Les différences observées pour la sérine sont probablement dues à une contamination au cours de la purification des petites quantités de protéine à partir des souches ρ^- , alors que les quantités utilisées pour les souches ρ^+ étaient beaucoup plus importantes. Sauf en ce qui concerne la composition du cytochrome de la souche D261, les valeurs de la tyrosine doivent être considérées comme trop faibles par suite de l'oxydation de cet acide aminé au cours de être considérées comme trop faibles par suite de l'hydrolyse chlorhydrique.

Le tableau 1 répond clairement à la question posée au début de cette note. Les chiffres de *eN*-triméthyl-lysine indiquent que l'essentiel sinon la totalité du cytochrome *c* synthétisé par les souches petites ρ^- est effectivement triméthylé. Ce résultat exclut la possibilité que la triméthylation soit tributaire d'une activité respiratoire. Il exclut également l'hypothèse d'un rôle joué par le facteur ρ^+ dans la réaction de triméthylation.

Remerciements

C'est sur la suggestion de Monsieur P. Slonimski que ce travail a été entrepris. Nous lui exprimons ici notre gratitude pour son intérêt et les encouragements qu'il nous a prodigés. Nous remercions Mademoiselle A.M. Simon pour son aide lors des analyses d'acides aminés. Ce travail a bénéficié d'une aide de la D.G.R.S.T. no. 66.001.68.

Références

- [1] R.J. Delange, A.M. Glazer et E.L. Smith, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 1385.
- [2] P.P. Slonimski, R. Acher, G. Père, S. Sels et M. Somlo, *Symp. Intern. sur les Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes*, C.N.R.S., Paris (1965) p. 435.
- [3] R.J. Delange, A.M. Glazer et E.L. Smith, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 3325.
- [4] W.A. Scott et H.K. Mitchell, *Biochemistry* 8 (1969) 4282.
- [5] M. Foucher, F. Lederer, A.-M. Simon, J. Tarin, J. Verdière et P.P. Slonimski, *Travaux non publiés*.
- [6] B. Ephrussi, in: *Nucleo Cytoplasmic Relations in Micro-organisms* (Clarendon Press, Oxford, 1952).
- [7] P.P. Slonimski, *Ann. Inst. Pasteur* 77 (1949) 774.
- [8] L. Clavilier, G. Père et P.P. Slonimski, *Mol. Gen. Genétics* 104 (1969) 195.
- [9] G. Père-Aubert, L. Clavilier, M. Somlo et P.P. Slonimski, *En préparation*.
- [10] A. Sels, H. Fukuhara, G. Père et P.P. Slonimski, *Biochim. Biophys. Acta* 95 (1969) 195.
- [11] K. Hempel, H.W. Lange et L. Birkhofer, *Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 966.
- [12] L. Narita et K. Titani, *J. Biochem. (Tokyo)* 61 (1967) 54.
- [13] Y. Yaoi, *J. Biochem. (Tokyo)* 61 (1967) 54.