

POIDS MOLÉCULAIRE D'UN RÉCEPTEUR MEMBRANAIRE D'UDP-GLUCOSE

Gisèle BERTHILLIER, Jacques FROT-COUTAZ et René GOT

Laboratoire de Biochimie des Membranes, Université Claude Bernard - Lyon 1, 69621 Villeurbanne, France

Received 16 May 1975

Revision received 16 June 1975

Summary

Rat liver microsomal membranes have been shown to contain an UDP-glucose binding protein. Its mol. wt was estimated to be 120 000 by gel filtration and by ultracentrifugation in a sucrose gradient. The receptor activity was purified by gel filtration on Sephadex G 200 and analysed by gel-electrofocusing.

1. Introduction

Dans un précédent travail [1], nous avons montré l'existence, dans les membranes microsomiques des hépatocytes de rat, d'une protéine capable de lier, spécifiquement et réversiblement, l'UDP-glucose. Cette protéine pouvait être solubilisée par le Triton X100, sans perte de son activité de fixation. Nous avons pu donner les principales caractéristiques de cette fixation et préciser la nature protéique du récepteur.

Poursuivant ce travail, malgré les très faibles quantités disponibles et les difficultés d'identification de cette protéine, nous avons déterminé son poids moléculaire, par des méthodes d'ultracentrifugation et de filtration sur gel.

2. Matériel et méthodes

Un complexe radioactif est obtenu en incubant l'extract soluble [1], 40 min à 22°C, en tampon Bicine 0.05 M, pH 8,1, contenant $MnCl_2$ (1 mM), en présence d'UDP-glucose $^{14}C(U)$ (Radiochemical Centre Amersham, radioactivité spécifique 260 mCi/mmol). L'essentiel de la radioactivité libre est éliminé par 2 heures de dialyse avec agitation, à température ambiante, contre un volume de tampon Bicine, contenant du Triton X100 (0.1% v/v), égal à 1000 fois le volume

du milieu d'incubation préparé, et renouvelé 4 fois.

Les chromatographies sur gel sont effectuées sur colonne (2 × 34 cm) d'Ultrogel (LKB) AcA 44 (poids moléculaire d'exclusion 130 000), AcA 34 (poids moléculaire d'exclusion 400 000) et de Sephadex G 200, équilibrées contre le tampon Bicine contenant 0.1% de Triton X100. Des fractions de 2 ml sont recueillies, séchées dans les pots de comptage et reprises par 0.5 ml de Soluène (2 h à 40°C). La radioactivité est déterminée comme précédemment [1]. Les ultracentrifugations sont effectuées en gradient de Saccharose 5–20% dans l'ultracentrifugeuse Beckman LV 50 (rotor SW 50). Après 15 h de rotation à 39 000 rpm (120 000 g), des fractions de 0.25 ml sont recueillies dans l'appareil Isco et la radioactivité est déterminée comme ci-dessus.

3. Résultats et discussion

La recherche d'une capacité de fixation d'UDP-glucose dans plusieurs dizaines de fractions, provenant d'une chromatographie ou d'une ultracentrifugation, s'avère extrêmement laborieuse et peu sensible du fait de la dilution. En effet, chaque fraction doit être incubée en présence du ligand radioactif et soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex G 50. Aussi avons nous été amené à constituer le com-

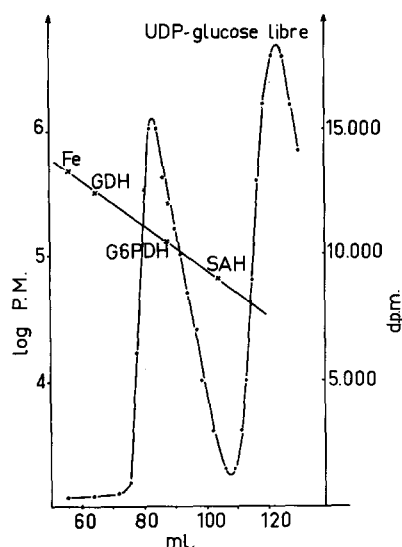


Fig. 1. Chromatographie sur colonne d'Ultrogel Aca 44. On dépose, sur la colonne, 2 ml (2 mg de protéine) du milieu incubé et dialysé (cf. Matériel et Méthodes). L'étalonnage de la colonne est réalisé à l'aide de la ferritine (Fe, poids moléculaire 460 000), qui donne le volume d'exclusion, de la glutamate déshydrogénase (GDH, poids moléculaire 330 000), de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH, poids moléculaire 110 000) et de la serum-albumine humaine (SAH, poids moléculaire 65 000).

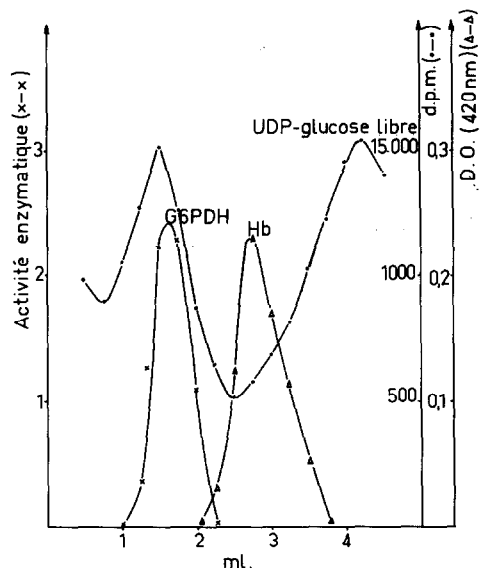


Fig. 2. Ultracentrifugation en gradient de saccharose 5-20%. On dépose, sur le gradient, 0.2 ml (0.2 mg de protéine) du milieu incubé et dialysé (cf. Matériel et Méthodes). L'hémoglobine (Hb) et la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G-6-PSH) sont utilisées comme marqueurs. La concentration en hémoglobine est mesurée à 420 nm. L'activité enzymatique est donnée en unités arbitraires.

plexe radioactif par une seule incubation préalable.

Une dialyse rapide permettait d'éliminer une grande partie du ligand non lié et d'éviter aussi de déposer sur colonne ou sur gradient des quantités de radioactivité trop élevées. Il faut préciser que la dialyse élimine environ 80% de la radioactivité présente initialement sans entraîner une dissociation notable du complexe.

La filtration sur Ultrogel Aca 34 fait apparaître la radioactivité liée au voisinage du volume d'élution, c'est pourquoi nous avons utilisé l'Ultrogel Aca 44. L'étalonnage de la colonne (fig. 1) donne un poids moléculaire apparent de l'ordre de 120 000 pour la protéine réceptrice d'UDP-glucose. La radioactivité libre restant après dialyse est éluée à environ 2 fois le volume d'exclusion. Notons que l'intérêt de l'Ultrogel par rapport au Sephadex réside essentiellement dans une vitesse de filtration nettement supérieure (2 à 3 fois), ce qui permet évidemment un gain de temps considérable et limite ainsi la dissociation du complexe.

L'analyse de l'ultracentrifugation en gradient de

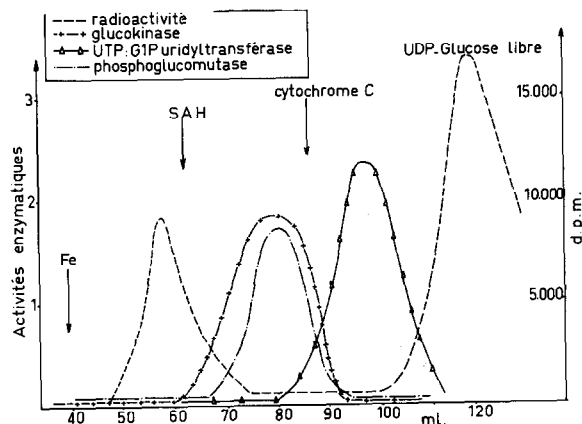


Fig. 3. Chromatographie sur colonne de Sephadex G 200. Mêmes conditions que dans la fig. 1. Les flèches verticales donnent le volume d'élution de la ferritine (Fe), de la serum-albumine humaine (SAH) et du cytochrome c. Les activités enzymatiques, glucokinase, phosphoglucomutase et uridyl-transférase, sont données en unités arbitraires.

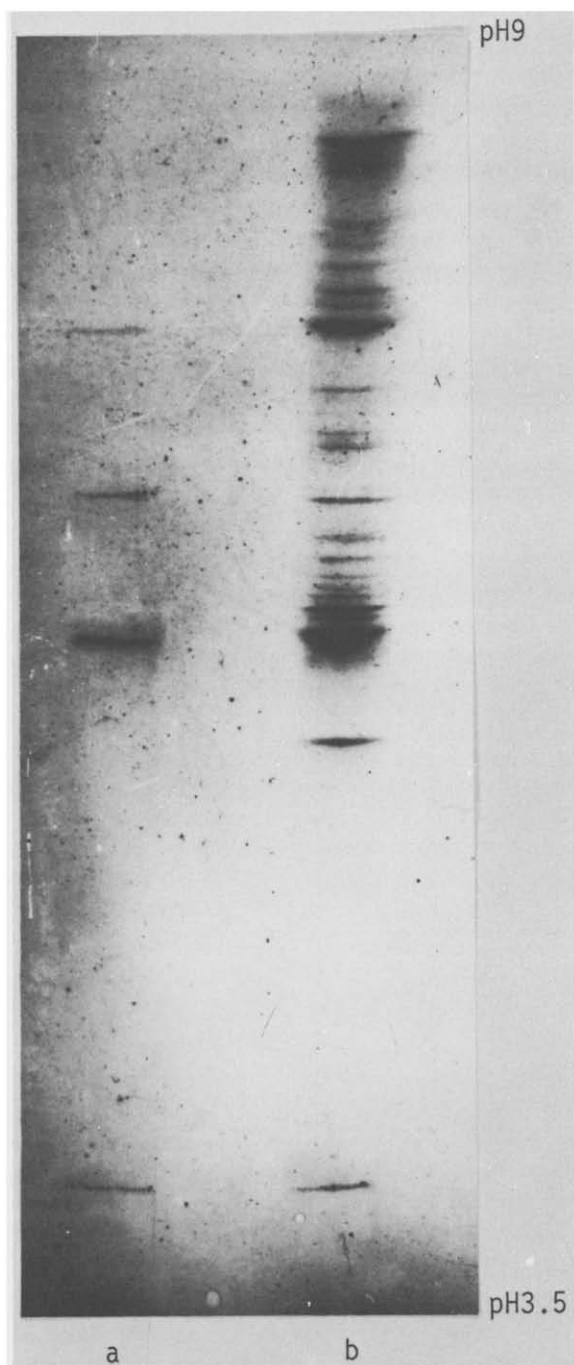


Fig.4. Electrofocalisation en gel d'acrylamide [3]. (a) Extrait soluble; concentration en protéine 28 mg/ml, (b) Fractions 56–60 correspondant au sommet du pic de radioactivité liée obtenu après chromatographie sur Sephadex G 200 (cf. fig.3); la concentration en protéine est amenée à 1,2 mg/ml. Le gradient de pH est établi de 3,5 à 9. Appareil Multiphor (LKB).

saccharose situe le pic de radioactivité liée légèrement en avant du pic d'activité de la glucose 6-phosphate deshydrogénase (fig.2). Le poids moléculaire apparent de 120 000 est ainsi confirmé.

Pour compléter ces résultats, nous avons également réalisé une filtration sur Sephadex G 200. La courbe d'élution de la fig.3 donne sensiblement le même poids moléculaire pour la radioactivité liée.

Toutefois, cette technique présente un intérêt supplémentaire. En effet, les enzymes impliqués dans la voie membranaire de biosynthèse de l'UDP-glucose [2] sont également solubilisés par le Triton X100 et se trouvent, par conséquent dans l'extrait soluble utilisé. Or, ces enzymes, qui ont pour substrat le glucose ou ses dérivés, présentent une certaine affinité pour le dextran constituant le Sephadex, ce qui peut entraîner un retard dans leur élution. On sépare ainsi nettement le complexe radioactif des enzymes. L'électrofocalisation en gel d'acrylamide (fig.4) met en évidence le degré de purification obtenue pour le complexe: on n'y voit apparaître que 4 bandes contre une trentaine pour l'extrait total. Malheureusement, l'électrophorèse en gradient de pH entraînant une dissociation du complexe et la libération de l'UDP-glucose ^{14}C , il n'a pas été possible d'identifier la bande correspondant à la protéine réceptrice.

Références

- [1] Frot-Coutaz, J., Berthillier, G. et Got, R. (1975) FEBS Lett. 52, 81–85.
- [2] Berthillier, G. et Got, R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 362, 390–402.
- [3] Vesterberg, O., Isoelectric Focusing, (1974) (J. P. Arbuthnott ed.) Butterworths, London.