

INHIBITION COMPETITIVE DE LA Phé:tRNA LIGASE DES EMBRYONS DE BLE PAR L'ACIDE AURINE TRICARBOXYLIQUE

J. R. CARIAS et R. JULIEN

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

Received 17 June 1975

SUMMARY

Aurin tricarboxylic acid (A.T.A.), an inhibitor of protein biosynthesis (initiation and elongation steps), acts also as a competitive inhibitor of phenylalanine, in the ATP-PP_i exchange and tRNA^{Phe} aminoacylation reactions catalysed by cytoplasmic wheat germ phenylalanine:tRNA ligase.

1. Introduction

Si de nombreuses substances sont connues pour leur action inhibitrice des étapes de l'initiation et de l'élongation des chaînes peptidiques [1], rares sont celles, non analogues de substrats, qui agissent sur les réactions catalysées par les amino acides:tRNA ligases, c'est-à-dire l'activation et la charge sur les tRNA des acides aminés. Seule jusqu'ici la Borrelidine, un antibiotique, a été signalée pour son inhibition spécifique de la thréonine:tRNA ligase [2-4].

Dans une étude sur l'acide aurine tricarboxylique (A.T.A.), Siegelman et Apirion [5] ont cependant montré que cette substance, souvent citée comme inhibitrice de l'initiation de la synthèse des protéines [6-9], exerçait également une inhibition sur d'autres étapes de ce processus et en particulier sur l'aminacylation des tRNA.

Nous montrons dans ce travail que dans certaines conditions, l'A.T.A. se présente comme un inhibiteur compétitif de la phénylalanine dans les réactions d'échange et d'aminacylation catalysées par la phénylalanine:tRNA ligase des embryons quiescents de Blé.

2. Matériel et méthodes

Les embryons de Blé proviennent d'une minoterie

locale. Une double chromatographie sur BD-cellulose de tRNA global du germe suivant les procédés de Gillam et al. [10] et Yoshikami et Keller [11] fournit le tRNA^{Phe} de Blé. La Phé-tRNA ligase électrophorétiquement pure est obtenue selon un procédé qui sera publié ultérieurement. Son activité spécifique est de 50 nmol de [¹⁴C]Phé-tRNA formé par minute et par milligramme d'enzyme, dans les conditions d'aminacylation décrites.

Le pyrophosphate ³²P et la L-[¹⁴C]phénylalanine sont fournis par le Commissariat à l'Energie Atomique; l'acide aurine tricarboxylique (sel d'ammonium) est un produit Sigma.

2.1. Test d'aminacylation

L'activité enzymatique est mesurée à son pH optimum dans un milieu réactionnel qui contient pour un volume final de 0.1 ml: HEPES (pH 8.2) 5.5 μmol, 1.5 μmol MgCl₂, 1 μmol ATP, 5 μmol KCl, 0.12 μmol de glutathion réduit, 30 μg de sérum albumine bovine, 30 μg de tRNA^{Phe}, 0.2 μCi de L-[¹⁴C]phénylalanine (250 μCi/μmol) et 0.4 μg d'enzyme purifiée.

Après 3 minutes d'incubation à 37°C, la totalité du milieu est déposée sur un disque de papier Whatman 3 MM qui est ensuite traité selon le procédé de Mans et Novelli [12].

2.2. Réaction d'échange ATP-PP_i

L'activation de la phénylalanine s'observe dans

un milieu réactionnel qui contient pour un volume final de 0.25 ml: HEPES (pH 8.2) 13.75 μmol , 3 μmol MgCl_2 , phénylalanine en quantité variable, 0.5 μmol ATP, 0.5 μmol de pyrophosphate de sodium ^{32}P (0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) et 1 μg d'enzyme.

La réaction est arrêtée après 15 minutes d'incubation à 37°C, la radioactivité incorporée dans l'ATP est déterminée selon le procédé décrit par Lemoine et al. [13].

Par analogie avec l'aminocyclation, le diagramme de Lineweaver et Burk permet de définir un paramètre que l'on peut assimiler à une constante d'échange (le pyrophosphate et l'ATP étant constants) lorsque la phénylalanine constitue la variable du système.

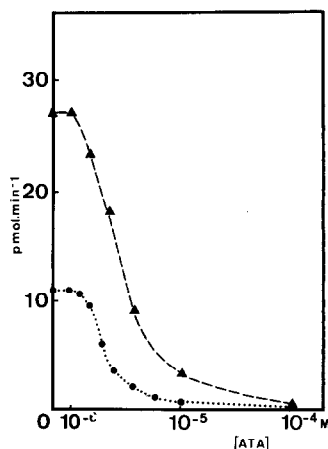


Fig. 1. Effet de l'acide aurine tricarboxylique (A.T.A.) sur l'activité enzymatique au cours de la réaction d'aminocyclation du tRNA^{Phe} . $\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$ infra optimal, 0.75 (●.....●) et optimal 1.5 (▲ — —▲). L'activité enzymatique est exprimée en pmol de $[^{14}\text{C}]\text{Phe}:\text{tRNA}$ formé par minute dans les conditions décrites (2.1.).

3. Resultats et discussion

3.1. Aminocyclation du tRNA^{Phe} en présence d'acide aurine tricarboxylique (A.T.A.)

L'expérience, réalisée pour deux valeurs du rapport

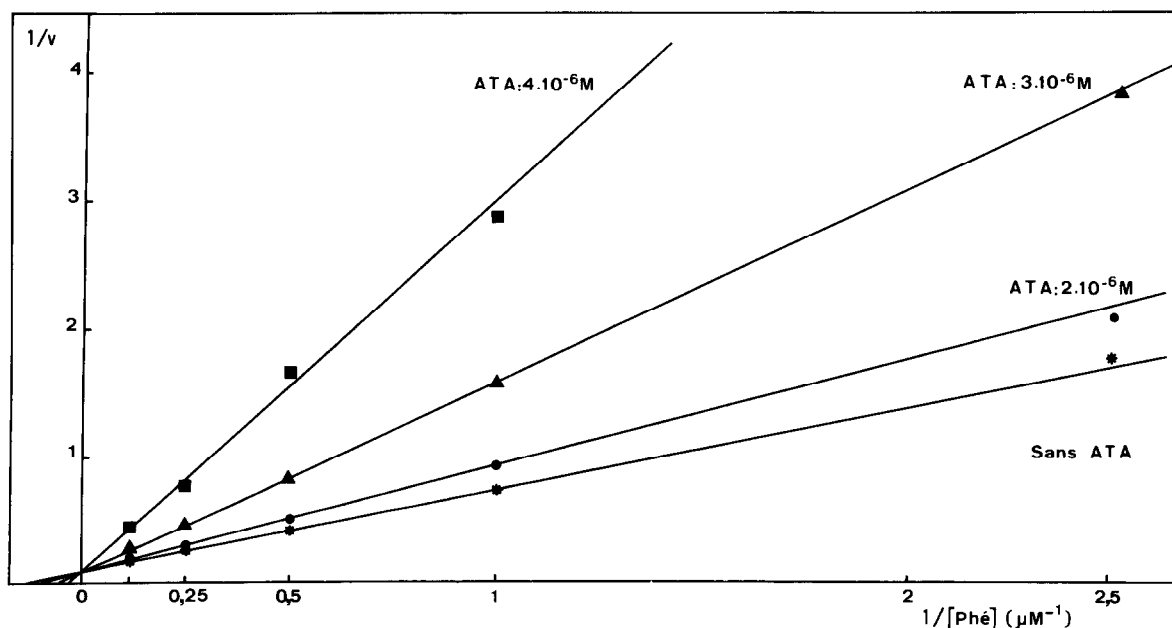


Fig. 2. Détermination des constantes de Michaelis apparentes en présence ou non d'A.T.A. pour la réaction d'aminocyclation du tRNA^{Phe} . Les conditions expérimentales correspondent à celles indiquées au chapitre 2.1. $1/V$ est exprimé en unités arbitraires à partir des mesures de radioactivité en cpm. La concentration de phénylalanine S varie de $4 \cdot 10^{-7}$ M à $8 \cdot 10^{-6}$ M. Les constantes de Michaelis apparentes ont pour valeurs: $6.1 \cdot 10^{-6}$ M (A.T.A. = 0); $8.1 \cdot 10^{-6}$ M (A.T.A. = $2 \cdot 10^{-6}$ M); $16.9 \cdot 10^{-6}$ M (A.T.A. = $3 \cdot 10^{-6}$ M); $28.6 \cdot 10^{-6}$ M (A.T.A. = $4 \cdot 10^{-6}$ M).

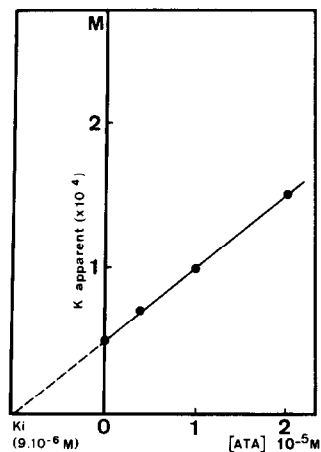


Fig.3. Variation des K_M apparentes en fonction de la concentration d'A.T.A. présente dans le milieu d'aminocyclation. L'effet inhibiteur de l'A.T.A. se manifeste à partir d'une concentration limite ($1.8 \cdot 10^{-6}$ M). La translation de l'axe des ordonnées jusqu'à cette valeur à partir de laquelle le K_M pour la phénylalanine est une fonction linéaire de la concentration d'A.T.A. permet de déterminer K_I .

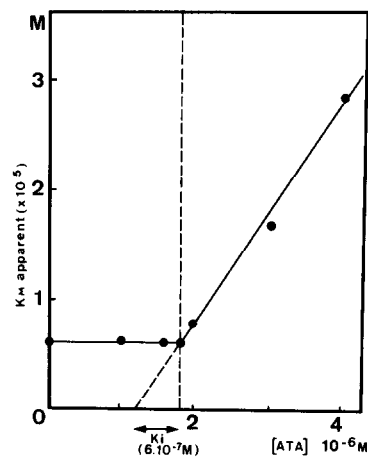


Fig.5. Variation des 'constantes' apparentes d'échange en fonction de la concentration d'A.T.A. Ce diagramme permet de définir la constante K_I ($9 \cdot 10^{-6}$ M).

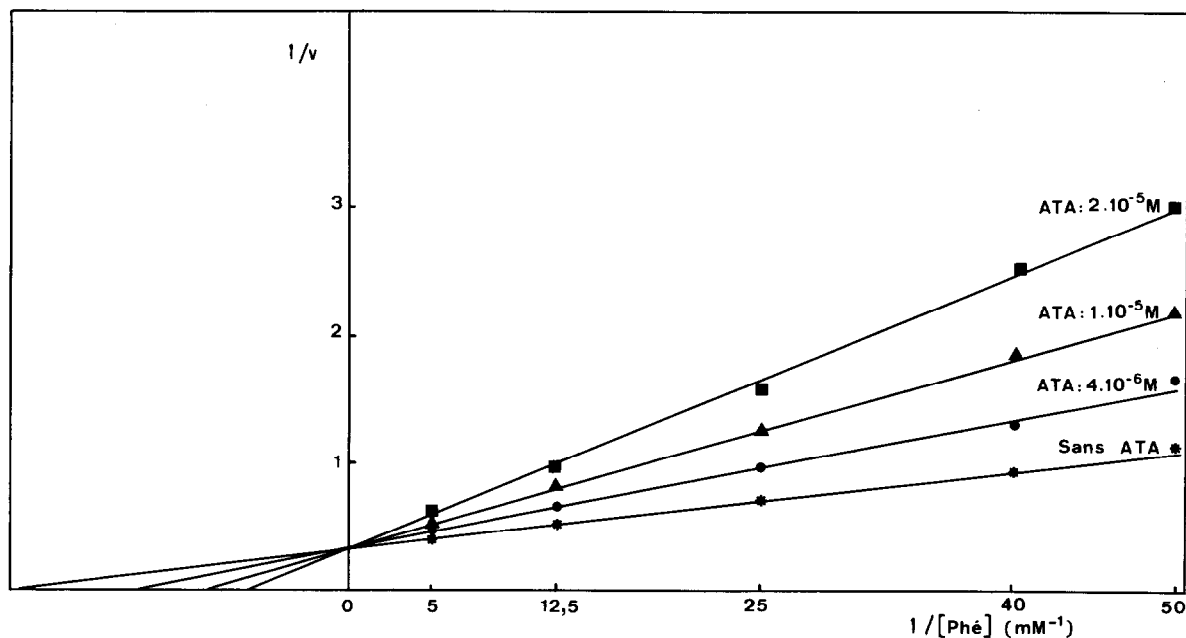


Fig.4. Détermination des 'constantes' apparentes d'échange en présence ou non d'A.T.A. au cours de la réaction d'échange ATP-PP_i 'Phé dépendante'. $1/v$ est exprimé en unités arbitraires (voir fig.2). La concentration de la phénylalanine (S) varie de $2 \cdot 10^{-5}$ M à $2 \cdot 10^{-4}$ M. Dans les conditions expérimentales indiquées au chapitre 2.2., les 'constantes' apparentes d'échange déterminées ont pour valeurs: $5.0 \cdot 10^{-5}$ M (sans A.T.A.); $7 \cdot 10^{-5}$ M (A.T.A. = $4 \cdot 10^{-6}$ M); $1 \cdot 10^{-4}$ M (A.T.A. = $1 \cdot 10^{-5}$ M); $1.5 \cdot 10^{-4}$ M (A.T.A. = $2 \cdot 10^{-5}$ M).

Mg^{2+}/ATP (optimal: 1.5; infra optimal: 0.75) (fig.1), montre que l'A.T.A. (sel d'ammonium) inhibe la réaction d'aminacylation à partir d'une concentration limite ($1.8 \cdot 10^{-6}$ M).

3.2. Etude cinétique de la fixation de la phénylalanine en présence d'A.T.A. (aminacylation du tRNA)

La cinétique de fixation de la phénylalanine en présence de diverses concentrations d'A.T.A. (1 à $4 \cdot 10^{-6}$ M) montre que la vitesse maximale de la réaction n'est pas influencée par l'inhibiteur alors qu'au contraire la constante de Michaelis augmente (fig.2).

De plus, la représentation graphique des K_M apparents en fonction de la concentration d'inhibiteur est linéaire (fig.3) dès que la valeur limite de la concentration d'A.T.A. est atteinte. L'inhibition est donc bien compétitive, la constante d'inhibition K_I est égale à $6 \cdot 10^{-7}$ M. L'existence d'une valeur limite à partir de laquelle s'exerce l'inhibition pourrait être due à des interactions du colorant avec des sites distincts de ceux impliqués dans le processus enzymatique proprement dit, puisque ce phénomène n'est pas observé dans la réaction d'échange Phé dépendante (voir 3.3.).

3.3. Etude cinétique de la réaction d'échange $ATP-PP_i$ 'Phé dépendante' en présence d'A.T.A.

Pour cette réaction, l'A.T.A. exerce également une inhibition compétitive (fig.4). A l'appui de ce résultat, la représentation des 'constantes' apparentes d'échange en fonction de la concentration d'inhibiteur (0.4 à $2 \cdot 10^{-5}$ M) est linéaire (fig.5) et permet de déterminer la constante K_I . On peut toutefois s'étonner que ce colorant exerce une inhibition de type compétitif sur la fixation de la phénylalanine étant donné la différence d'encombrement stérique entre ces 2 molécules, la présence d'un ou plusieurs noyaux benzéniques ne suffisant pas pour envisager une inhibition par analogie de substrat. En effet, l'acide benzoïque et la tyrosine qui possèdent elles-aussi un noyau benzénique, n'exercent aucune inhibition sur les réactions catalysées par l'enzyme (travaux non publiés).

4. Conclusion

Les résultats présentés dans ce travail montrent qu'on ne devrait pas négliger le rôle inhibiteur de l'acide aurine tricarboxylique sur l'aminacylation du tRNA^{Phé} lorsque ce colorant est utilisé pour bloquer l'initiation de la synthèse protéique dans certains systèmes acellulaires destinés à l'étude de l'élongation des chaînes polypeptidiques sous la direction de l'acide polyuridylique ou d'un ARN messenger naturel. En effet, si l'allongement de la chaîne peptidique dépend d'une aminacylation du tRNA^{Phé}, l'A.T.A., même employée à des concentrations préférentiellement inhibitrices de l'initiation [6] pourrait, suivant la concentration de la phénylalanine, inhiber également l'élongation.

Bibliographie

- [1] Pestka, S. (1971) Ann. Rev. Microbiol. 25, 487.
- [2] Poralla, K. et Zähler, H. (1968) Arch. Mikrobiol. 61, 143.
- [3] Monreal, J. et Paules, H. (1970) Biochim. Biophys. Acta 199, 280.
- [4] Nass, G. et Hassenbank, R. (1970) Mol. Gen. Genetics 108, 28.
- [5] Siegelman, F. et Apirion, D. (1970) Bacteriol. Proceedings, p. 149.
- [6] Siegelman, F. et Apirion, D. (1971) J. Bacteriol. 105, 902.
- [7] Dettman, G. L. et Stanley, W. M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 299, 142.
- [8] Marcus, A., Bewley, J. D. et Weeks, D. P. (1970) Science 167, 1735.
- [9] Lebleu, B., Marbaix, G., Werenne, J., Burny, A. et Huez, G. (1971) Arch. Internation. Physiol. Biochim. Belg. 79, n° 1, 203.
- [10] Gillam, I., Millward, S., Blew, D., Von Tigerstrom, M., Wimmer, E. et Tener, G. M. (1967) Biochemistry 6, 3043.
- [11] Yoshikami, D. et Keller, E. B. (1971) Biochemistry 10, 2969.
- [12] Mans, R. J. et Novelli, G. D. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 94, 48.
- [13] Lemoine, F., Waller, J. P. et Van Rapenbusch, R. (1968) Eur. J. Biochem. 4, 213.