

Diss ETH 6374

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE BIOLOGIQUE DES PROTEINES  
DES COMPLEXES RIBONUCLEOPROTEIQUES MESSAGERS

T H E S E

présentée à

I ' E C O L E P O L Y T E C H N I Q U E F E D E R A L E  
Z U R I C H

pour l'obtention

du titre de Docteur ès Sciences Naturelles

par

O l i v i e r C I V E L L I

Dipl. Sc. Nat. ETH

né le 8 mai 1949 à Fribourg (Suisse)

acceptée sur proposition

du Professeur Dr. R. SCHWYZER, Rapporteur

du Professeur Dr. K. SCHERRER, Corapporteur

1979

paru dans FEBS-Letters, Volume 72, n° 1, pages 71-76, Editeur  
North-Holland Publishing Company, Amsterdam

paru dans European Journal of Biochemistry, manuscrit soumis  
pour publication

RESUME

Des études concernant les mécanismes de régulation de l'expression génétique dans les cellules des organismes supérieurs ont montré, que les mRNA eucaryotiques sont, in vivo, associés à des protéines sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (mRNP). Des mRNA spécifiques sont trouvés dans les polyribosomes, donc activement traduits, et libres dans le cytoplasme, inactifs vis-à-vis des mécanismes de traduction. Le spectre des protéines des complexes mRNP renfermant les mRNA codant pour les chaînes de globines de canard diffèrent selon l'état fonctionnel, et donc la localisation subcytoplasmique des mRNP, polyribosomique ou cytoplasmique libre. Nous avons donc entrepris de déterminer si l'association des mêmes séquences messagères à différentes populations de protéines était impliquée dans le maintien de leurs états fonctionnels différents, afin de savoir si ces protéines sont des facteurs de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génétique.

Les mRNP globiniques polyribosomiques et cytoplasmiques libres ont été purifiés à partir de fractions du cytoplasme des réticulocytes de canard. Leur capacité à diriger la synthèse protéique in vitro a été ensuite analysée. A cet effet, deux systèmes acellulaires de biosynthèse protéique ont été mis au point, l'un à partir du germe de blé, l'autre à partir du lysat de réticulocytes de lapin, rendu dépendant de l'addition de mRNA exogènes par un traitement à la nucléase de staphylocoque.

Nous montrons que dans ces deux systèmes acellulaires, les mRNP polyribosomiques dirigent la synthèse des chaînes de globines avec la même efficacité que les mRNA qu'ils renferment. Nous démontrons que les mRNP cytoplasmiques libres, par contre, ne stimulent pas la synthèse protéique, alors que les mRNA que l'on en extrait s'avèrent être des matrices de traduction comparables aux mRNA polyribosomiques. Nos résultats permettent de conclure que le mRNA globinique, sous sa forme de mRNP libre dans le cytoplasme, est inactif, réprimé vis-à-vis des mécanismes de traduction. Cette répression traductionnelle n'est pas l'apanage de tous les mRNP, puisque les mRNP polyribosomiques stimulent la synthèse protéique in vitro, elle est donc liée à un ou plusieurs des facteurs renfermés spécifiquement dans les mRNP libres du cytoplasme.

Afin de caractériser ce(s) facteur(s), les mRNP libres ont été soumis à une force ionique élevée. Nous avons ainsi séparé deux complexes ribonucléoprotéiques d'autres particules ne faisant pas partie intégrante du "core" des mRNP globiniques. Ces deux nouveaux complexes qui ne renferment comme acides nucléiques que les mRNA codants les chaînes de globines, sont, comme les mRNP non traités, inactifs dans la traduction en contraste aux mRNA qu'ils renferment. Nous pouvons donc conclure que le(s) facteur(s) responsable(s) de la répression du mRNA globinique dans les mRNP libres sont associés fortement au mRNA et que la répression traductionnelle qui en découle n'est donc pas le résultat d'une association fortuite entre les mRNP et des composants cellulaires induite durant les étapes de purification des complexes.

Nous avons également déterminé la nature physico-chimique du ou des facteur(s) répresseur(s), en soumettant les mRNP libres à des traitements qui nous permettent de différencier les acides nucléiques des polypeptides. Nos résultats montrent que la répression traductionnelle du mRNP cytoplasmique libre nécessite la présence des protéines pour être effective. Il ne nous est, toutefois, pas possible de déterminer avec exactitude quelle(s) est la ou les protéine(s) responsable(s) de cette activité répressive.

Parallèlement à cette activité de répression traductionnelle, nous montrons que les protéines des mRNP libres dans le cytoplasme sont le support moléculaire d'une autre activité biologique : incubés dans le système acellulaire préparé à partir des germes de blé, les mRNP libres induisent une inhibition de la traduction dirigée par d'autres mRNA exogènes. Nous montrons que cet effet inhibiteur n'est pas spécifique des mRNA exogènes testés et qu'il agit sur le mécanisme de traduction de l'extrait de germe de blé. Toutefois, nos observations montrent principalement que cette activité inhibitrice n'est pas détectable dans le système acellulaire du lysat de réticulocytes de lapin, suggérant qu'il existe dans ce dernier système un facteur capable de contrecarrer l'activité inhibitrice du mRNP cytoplasmique libre.

En conclusion, ce travail démontre que des activités biologiques sont attribuables aux protéines des complexes ribonucléoprotéiques messagers. Il contribue ainsi à confirmer la réalité biologique des mRNP et donne une base moléculaire aux états fonctionnels différents du même mRNA dans le cytoplasme.

## SUMMARY

The globin-specific mRNA of duck reticulocytes can be recovered from two cytoplasmic subcellular fractions, the polyribosomes and the post-polyribosomal supernatant. Globin mRNA in these two fractions are associated with characteristic populations of proteins (forming mRNP complexes), which differ in composition depending on the functional state of the mRNA.

The biological activities of these two classes of mRNP have been assayed in two different cell-free protein synthesizing systems. The polyribosomal mRNP directs globin synthesis as efficiently as the mRNA it contains; the free cytoplasmic mRNP, in contrast, is not translated in vitro, whereas its deproteinized mRNA stimulates protein synthesis as efficiently as the polyribosomal mRNA. Our data are consistent with the presence of a repressor in the free cytoplasmic mRNP, maintaining the mRNA in a translationally inactive state.

We further show that high-salt purified free globin-specific mRNP particles from reticulocyte cytoplasm retain the translational repression of the native complex. Moreover, we present evidence that the translational repression requires the protein components of the complex to be effective. We conclude that the difference in the protein compositions associated with the globin mRNA provides a biochemical basis for the differential activity of the mRNA in vivo, and that a protein factor specific to the free cytoplasmic mRNP and tightly associated with the mRNA is responsible for its translational repression.

In addition we investigate another biological activity associated with the free mRNP, namely an inhibitory effect directed towards a variety of exogenous mRNAs. This latter activity, which acts on the translational machinery of a cell-free system depleted in low MW compounds, is not detected in an acellular system reflecting more closely the natural environment of the globin mRNP.