

## INTERACTION ENTRE PIGMENTS ET ACIDES NUCLEIQUES

### Etude sur l'interaction de l'Actinomycine D avec les nucléosides par Dichroïsme Circulaire

Yves COURTOIS, Wilhelm GUSCHLBAUER et Pierre FROMAGEOT

Service de Biochimie, Département de Biologie, C.E.N. Saclay,  
Gif-sur-Yvette, France

Received 5 May 1969

The interaction of Actinomycin C<sub>1</sub> (AM) with purine nucleosides was investigated by circular dichroism. While dG and dGMP show identical interactions, rG, rGMP and 8-aza-GMP show lower tendency for complex formation. ara-G shows no complex formation. 6-Thio-GMP shows the strongest affinity for AM in accordance with previous results. Substitution on N-7 (methylation, protonation) or C-8 (8-Br-rG, 8-SH-rG) eliminate completely the complexing capacity. Another type of weaker complexes is formed by dA, dAMP and rIMP, indicated by the appearance of a positive band at 440 nm. It is concluded that in these complexes both the electron donor capacity of the purine base as well as the steric flexibility of the sugar around the glycosidic linkage determine their complexing capacity.

### 1. Introduction

La structure des paires G-C et diaminopurine-T au sein d'un polydésoxyribonucléotide à deux brins, permet la fixation spécifique de l'actinomycine [1-3]. Des associations non spécifiques entre l'actinomycine et les nucléosides ont aussi été mises en évidence [4]. La dispersion optique rotatoire permet de distinguer la fixation de l'actinomycine au DNA natif de celles avec dG ou avec le DNA dénaturé. En effet, l'amplitude de tous les effets Cotton de l'actinomycine est accrue dans le complexe actinomycine - DNA [5-7] alors que dans les complexes entre l'actinomycine et dG ou le DNA dénaturé, l'amplitude du minimum à 400 nm est la seule à être considérablement augmentée. Dans la région 450-500 nm, le complexe avec dG ne provoque que des modifications discrètes de l'activité optique de l'actinomycine. Nous avons étudié ces modifications par dichroïsme circulaire. En effet, si le pouvoir rotatoire et le dichroïsme circulaire (DC) sont deux aspects différents d'un même phénomène [8,9], le dichroïsme circulaire ne mesure que des différences d'absorption et élimine ainsi, dans le visible, la contribution du nucléoside. On peut étudier alors les seules modifications spécifiques de l'activité optique de l'actinomycine.

### 2. Matériel et méthodes

rG, dG, 5'-rGMP, 5'-dGMP, 5'-rIMP, 8-aza-GMP sont des produits Biochemicals Inc. Le 7-méthyl-guanosine (7-MrG) est un produit de la Cyclochemical Corporation. Le 8-bromo-guanosine (8-Br-rG) et le 8-mercaptopurine-guanosine (8-SH-rG) ont été préparés au laboratoire par J.F. Chantot. L'arabinosyl-guanine (ara-G) est un don du Dr. Privat de Garilhe. Le 6-thio-GMP a été préparé par J.L. Darlix. L'actinomycine C<sub>1</sub> (AM) est un don de Rhône-Poulenc.

Tous ces composés ont été dissous dans un tampon cacodylate 10<sup>-2</sup> M, EDTA 10<sup>-4</sup> M, NaCl 0,25 M à pH 7,2. Toutes les expériences ont été faites à la température ordinaire grâce à un Dichrographe Roussel Jouan II dans des cellules Opticell de parcours optiques différents.

### 3. Résultats et discussion

Dans la fig. 1, on a porté les spectres DC de l'actinomycine libre et liée à dG et au DNA [5]. Pour obtenir une concentration optimale du complexe avec dG, on a utilisé un rapport molaire AM/dG de 1/25 [10,11].

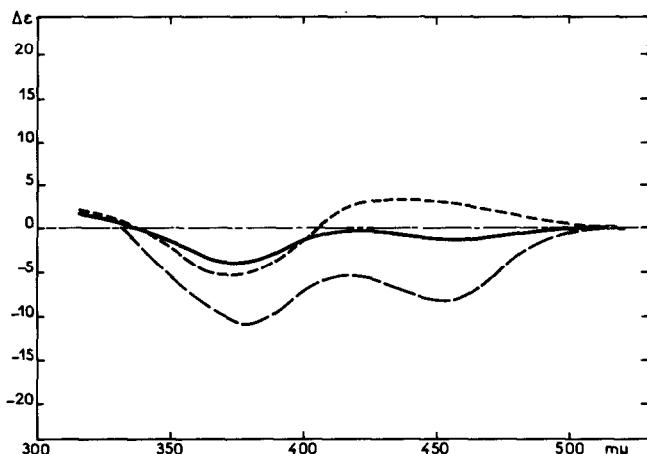


Fig. 1. Spectres DC de l'actinomycine seule (—) à la concentration de  $0,31 \cdot 10^{-4}$  M à pH 7; de l'actinomycine en présence de DNA (— · —) avec un rapport AM/DNA = 1/15; de l'actinomycine en présence de dG (---) avec un rapport AM/dG = 1/25.

La fixation de dG sur l'actinomycine induit la formation de nouvelles bandes DC dans le spectre du pigment. Le minimum de 378 nm est très peu déplacé, mais son amplitude est augmentée. A 448 nm, la bande négative du pigment fait place à une bande positive dans le complexe. En raison du faible facteur de dissymétrie ( $g'(\lambda) = \Delta\epsilon(\lambda)/\epsilon(\lambda)$ ) de l'actinomycine libre à cette longueur d'onde, on ne peut dire si la bande positive du complexe résulte de la superposition de bandes positives nouvelles dissimulant la contribution négative observée avec le pigment libre, ou de l'inversion de cette dernière contribution. Une inversion analogue de l'activité optique de l'actinomycine dans cette région s'observe en effet par dissolution du pigment dans l'éthanol [12]. Le maximum de la bande positive est alors vers 455 nm, au lieu de 448 nm en présence de dG. Dans cette région du spectre, il apparaît que dG et le DNA conduisent à des activités optiques de signe contraire. Cette résolution apportée par les mesures de DC nous a conduits à comparer l'activité optique de l'actinomycine en présence de divers nucléosides et nucléotides.

La fig. 2 donne les spectres DC de l'actinomycine en présence de concentrations égales de GMP, dGMP, dA, dAMP, IMP et 8-aza-rGMP. Le Thio-GMP et le araG sont utilisés à une concentration inférieure (AM/6-Thio-GMP = 1/8 et AM/araG = 1/10).

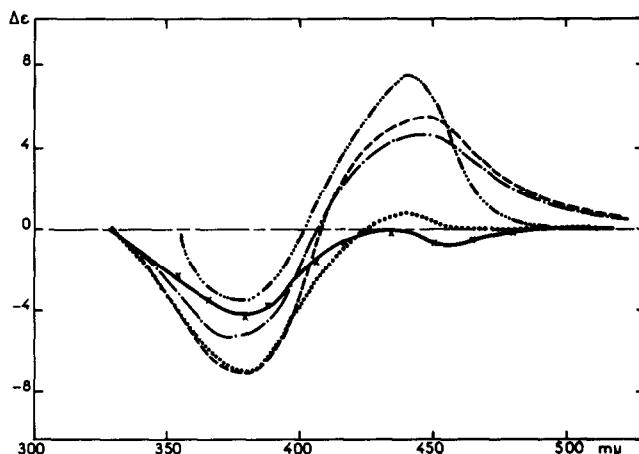


Fig. 2. Spectres de l'actinomycine seule (—) à la concentration de  $0,78 \cdot 10^{-4}$  M; de l'actinomycine en présence de dGMP (AM/dGMP = 1/250) (---) et à la même concentration: 5'GMP, 8-aza-GMP (— · —); 5'dAMP, 5'AMP, 5'IMP (· · · ·); de l'actinomycine en présence de araG (AM/araG = 1/10) (+ + +), et de 6-thio-GMP (AM/6-thio-GMP = 1/8) (— · — · —).

dG, dGMP et rGMP apportent le même type de modification au spectre DC de l'actinomycine; cependant, l'amplitude du minimum à 378 nm est un peu plus petite en présence de rGMP, ce qui peut refléter la différence d'affinité existant entre rGMP et dGMP vis-à-vis du pigment [10]. L'aza-rGMP se comporte exactement comme le rGMP. Le spectre du complexe AM-6-Thio-GMP paraît un peu différent des précédents. On doit penser qu'à pH 7.1, le 6-Thio-GMP présente une bande d'absorption à 341 nm et l'activité optique positive correspondante interfère dans toute cette région du spectre. dA, dAMP, et rIMP dont l'affinité à l'égard de l'actinomycine est faible [4] accroissent l'amplitude de la bande à 378 nm de l'actinomycine complexée et induisent à 440 nm une bande positive de faible amplitude. dA, dAMP et rIMP constituent ainsi un groupe de dérivés puriques formant avec l'actinomycine un complexe différent de ceux auxquels conduit la guanosine et ses dérivés.

Un troisième groupe est constitué par le 8-Br-rG (1/250), le 8-SH-rG (1/250), le 7-M-rG (1/250), l'araG (1/10). Ces nucléosides sont incapables de modifier le spectre DC de l'actinomycine dans les rapports molaires indiqués. En conséquence, ces analogues de la guanosine ne forment pas de complexes avec l'actinomycine.

Kersten [4], Pullman [13] et Muller [11] ont suggéré que les associations entre actinomycine et monomères puriques pourraient résulter de la formation de complexes de type  $\pi$ , le cycle phénoxazine ayant une capacité acceptrice d'électrons, et les purines des propriétés de donneur d'électrons. Un ordre dans l'affinité des purines nucléosides et de leurs dérivés à l'égard de l'actinomycine a été établi par spectroscopie d'absorption. Cet ordre est parallèle aux capacités de donneur d'électrons des purines considérées. Nos résultats sont en bon accord avec l'ordre indiqué par Pullman; ainsi le 6-Thio-GMP présente l'affinité la plus forte.

Il est intéressant d'observer que le 8-aza-GMP se comporte comme le rGMP. Le 7-MrG et la guanosine protonée [5] possédant une charge positive en N7 ont des capacités de donneur d'électrons réduites et ne forment pas de complexes avec l'actinomycine. Le 8-Br-rG et le 8-SH-rG ne forment pas non plus de complexe. Cette incapacité peut résulter d'un effet inducif négatif exercé par le brome sur le cycle imidazole comme le pK très bas (inférieur à 1) semble le montrer, avec pour conséquence une capacité réduite pour former un complexe. Il est possible aussi que le brome et le SH en 8 créent un encombrement stérique suffisant pour empêcher la formation d'un tel complexe. Cet encombrement modifie la position respective de la base et du sucre [14,16]. Or, on pense que la différence d'affinité, vis-à-vis de l'actinomycine, de rG et de dG, résulte d'une différence dans l'association entre les chaînes polypeptidiques du pigment et les sucres [1]. Il est possible que dans le cas du 8-Br-rG et du 8-SH-rG la position du ribose soit telle que son association avec les chaînes peptidiques de l'actinomycine soit impossible. L'absence de complexe entre l'actinomycine et ara-G supporte ce point de vue, en raison de l'empêchement de libre rotation de l'arabinose autour de la liaison le reliant au cycle purique [15].

Si l'on peut associer la modification du spectre DC de l'actinomycine à des variations dans la distribution électronique du chromophore et dans l'ori-

tation des chaînes peptidiques, il apparaît que la formation des complexes entre monomères puriques et actinomycine, résulte d'une mutuelle adaptation des partenaires avec des associations au niveau de la base purique et des sucres qu'elle porte.

Les résultats du présent travail font partie d'une Thèse de Doctorat d'Etat ès-sciences physiques de l'un des auteurs (Y.C.) - Orsay, 1969.

## References

- [1] E.Reich et I.H.Goldberg, *Progr. Nucl. Acid Res.* 3 (1964) 184.
- [2] W.Muller et D.M.Crothers, *J. Mol. Biol.* 35 (1968) 951.
- [3] A.Cerami, E.Reich, D.C.Ward et I.H.Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57 (1967) 1036.
- [4] W.Kersten, *Biochem. Biophys. Acta* 47 (1961) 610.
- [5] Y.Courtois, W.Guschlbauer et P.Fromageot, *European J. Biochem.* 6 (1968) 106.
- [6] K.Yamaoka et H.Ziffer, *Biochemistry* 8 (1968) 996.
- [7] D.M.Crothers, S.L.Sabol, D.I.Ratner et W.Muller, *Biochemistry* 7 (1968) 1817.
- [8] C.Djerassi, *Optical Rotatory Dispersion* (McGraw-Hill, New York, 1960).
- [9] L.Velluz, M.Legrand et M.Grosjean, *Optical Circular Dichroism* (Academic Press, New York, 1965).
- [10] W.Muller et H.Spatz, *Z. Naturforsch.* 9 (1965) 842.
- [11] M.Gellert, C.E.Smith, D.Neville et G.Felsenfeld, *J. Mol. Biol.* 11 (1965) 445.
- [12] H.Ziffer, K.Yamaoka et A.B.Mauger, *Biochemistry* 8 (1968) 996.
- [13] B.Pullman, in: *Molecular Biophysics* (Academic Press, New York, 1965) p. 164.
- [14] E.D.Reich, Communication personnelle.
- [15] W.Guschlbauer et M.Privat de Garilhe, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, sous presse.
- [16] W.Guschlbauer et Y.Courtois, *FEBS Letters* 1 (1968) 183.