

The methods of preparation of tritium-labeled viral RNA are described elsewhere^{2,3}. For elimination of possible interaction of admixtures of cell RNA with DNA preparations both viruses, NDV and Sendai virus, were grown in chick embryos, a cell system highly heterogeneous for mouse fibroblasts. Preparations of Sendai virus RNA used in this work were labeled with ³H uridine; they had a specific activity of $0.6-1.0 \times 10^6$ cpm/ μ g and after equilibrium centrifugation in caesium sulfate density gradients formed homogenous peaks at the density of 1.64–1.68 g/ml. ³H-uridine-labeled ($3-4 \times 10^6$ cpm/ μ g) NDV-specific '18S' RNA complementary to virion RNA was obtained from NDA-infected chick embryo fibroblasts⁵. Molecular hybridization of the viral RNA with cellular DNA was performed in a buffer that contained in 0.5 ml: formamide 50%, NaCl 0.5 M, DNA 2–3 mg and RNA 8000–12,000 cpm. The mixture was incubated at 37°C for 3 days, and thereafter was centrifuged in performed caesium sulfate density gradients 1.32–1.72 g/ml in a Ti50 rotor of a Spinco L2-50 centrifuge at 35,000 rpm and 20°C for 70 h. After fractionation of the gradients, radioactivity of acid-precipitable material of each fraction was determined in a liquid scintillation counter Packard-Tricarb.

Results and discussion. Figure 1 presents the results of experiments *in vitro*. It is seen from the figure that NDV-RNA bands at the density of 1.65 g/ml, and the position of the band does not change after annealing of RNA with DNA from non-infected L-cells. After incubation with DNA from virus-infected L-cells, part of radioactivity

shifts to areas of lower densities that are characteristic of RNA:DNA hybrids. Figure 2 presents the results of experiments *in vivo*. It is seen that, after annealing with DNA from non-infected ascites tumour cells, Sendai virus RNA forms a peak with the density of 1.67 g/ml. After incubation with DNA from tumours of virus-infected animals, the essential part of the radioactive label shifts to the area of RNA:DNA hybrids, the amount of the latter increasing with an increase of durability of infection from 48 to 96 h. Figure 3 presents a melting curve of NDV-RNA annealed with DNA from non-infected and virus infected cells. It is seen that T_m of the latter is about 78°C that is characteristic of true RNA:DNA hybrids. Therefore the data obtained may be interpreted as the formation of DNA-proviruses *in vitro* and *in vivo* systems, i.e. DNA transcripts homologous to RNA of the corresponding viruses. The question whether the proviruses are free or covalently linked to the cell DNA needs further investigation. Possible mechanisms of formation of proviruses, including interaction of infectious and oncogenic viruses, is discussed elsewhere in application to chronically-infected tissue cultures⁶. Here we have obtained the first evidence that formation of proviruses may take place in an acute virus infection caused by infectious RNA viruses.

5 N. V. Kaverin and N. L. Varich, Arch. ges. Virusforsch. 38 (2), 183 (1972).

6 V. M. Zhdanov, Intervirology 6, 129 (1976).

Mise en évidence par dichroïsme circulaire d'une association intermoléculaire pour les complexes NADP(H)-Cu²⁺

Evidence for intermolecular association of NADP(H)-Cu²⁺ complexes by circular dichroism study

D. Larcher, M. Gabriel, C. Morel et J. Torreilles

Laboratoire de Physique Expérimentale, Université Nancy I, C. O. 140, F-54037 Nancy Cédex (France), et Unité 58, INSERM, Université Montpellier I, F-34000 Montpellier (France), 15 septembre 1976

Summary. The presence of a conservative excitonic term in the ultraviolet circular dichroism spectra of NADP(H)-Cu²⁺ complexes in equimolar solution ($5 \cdot 10^{-4}$ M/l) shows the existence of an intermolecular association by formation of a stable Cu²⁺-bridged stacked adduct between the purine moieties of 2 neighbouring dinucleotides.

Les pyridines nucléotides sont des coenzymes intervenant dans de nombreuses réactions enzymatiques d'hydrogénation-déshydrogénation qui mettent en jeu des cations métalliques. L'étude de leurs complexes peut donc aider à mieux comprendre les mécanismes de ces réactions. La RMN ¹H et ¹³C des complexes des métaux de transition a permis de préciser les sites de fixation de l'ion Co²⁺ sur les dinucléotides^{1,2}. Un large excès de ligand est nécessaire pour effectuer ces mesures et dans ces conditions expérimentales aucune différence n'a pu être mise en évidence entre NAD(H) et NADP(H). Par contre, le dichroïsme circulaire (DC) permet l'utilisation de concentrations équimolaires relativement faibles. Ainsi, le groupe phosphate en 2' s'est révélé être un nouveau site de fixation pour Co²⁺³. En utilisant l'ion cuivrique, notre étude conduit au même résultat et, de plus, met en évidence un phénomène d'autoassociation entre deux molécules voisines, exclusivement pour le dérivé phosphorylé en 2'. Toutes les mesures sont effectuées à 25°C en utilisant des concentrations ligand-ion équimolaires. Les solutions sont préparées immédiatement avant chaque expérience. Les

spectres sont obtenus sur un dichrographe «J.Y. Mark III». L'intensité du DC est donnée en d° · cm² · dmole⁻¹. Les dinucléotides ont tendance à former des dimères pour des concentrations élevées voisines de 0,1 M⁴. Pour des solutions millimolaires, ce phénomène n'existe plus et seule une forte interaction intramoléculaire intervient entre la base purique et le résidu nicotinamide ou dihydronicotinamide. Cet effet, dû à un fort couplage des moments de transition des deux chromophores voisins, est parfaitement décelable en DC car il donne naissance à des termes excitoniques⁵.

Lorsque l'on ajoute des ions Cu²⁺ à une solution ($5 \cdot 10^{-4}$ M/l) de dinucléotides oxydés aucun nouvel effet n'est observé pour NAD aux environs de pH 7 dans la région aromatique (figure 1). Au contraire, dans des conditions

1 J. Torreilles et A. Crastes de Paulet, Biochimie 55, 1077 (1973).

2 J. Torreilles, A. Crastes de Paulet et N. Platzer, à paraître.

3 J. Bolard, C. Zentz et G. Chottard, à paraître.

4 R. H. Sarma et R. J. Mynott, J. Am. Chem. Soc. 95, 7470 (1973).

5 D. W. Miles and D. W. Urry, J. biol. Chem. 243, 4181 (1968).

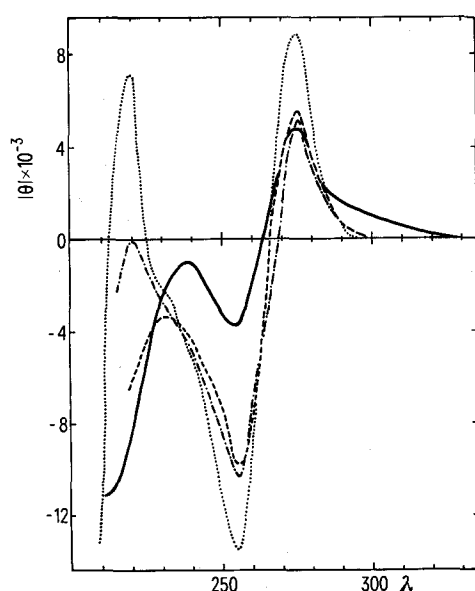


Fig. 1. Spectres de dichroïsme circulaire de NAD et NADP en présence de Cu^{2+} . Les solutions équimolaires ($5 \cdot 10^{-4}$ M/l) sont mesurées à 25°C dans des cuves en quartz de 1 mm: NAD à pH 6,1 (—) et NADP à pH 5,4 (---), 5,9 (.....) et 6,5 (— · —).

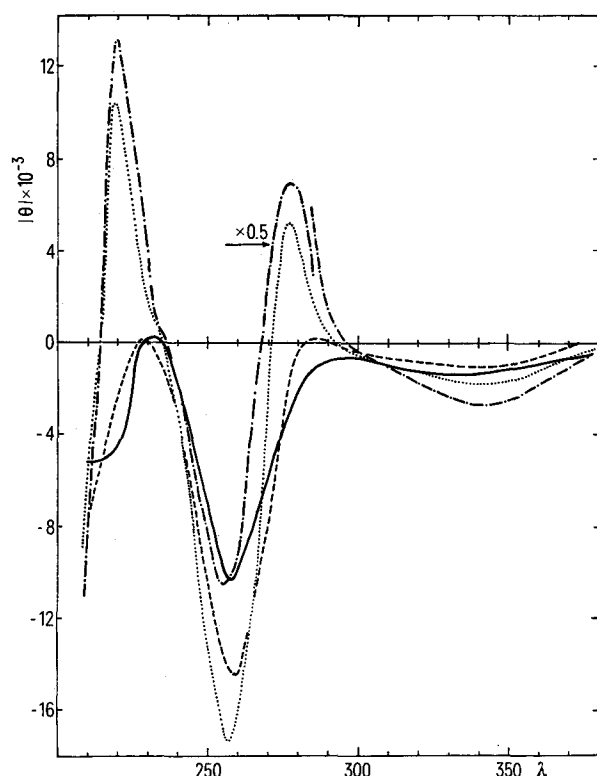


Fig. 2. Spectres de dichroïsme circulaire de NADH et NADPH en présence de Cu^{2+} . Les solutions équimolaires ($5 \cdot 10^{-4}$ M/l) sont mesurées à 25°C dans des cuves en quartz de 1 mm: NADH à pH 6,2 (—) et NADPH à pH 6,1 (---), 6,8 (.....) et 7,5 (— · —).

expérimentales identiques, le spectre correspondant aux solutions NADP-Cu^{2+} est la somme de deux termes excitoniques conservatifs (couplet) sensiblement de même amplitude et situés aux mêmes longueurs d'onde. Le premier correspond à l'interaction intramoléculaire comme pour NAD et le second provient d'une interaction intermoléculaire. Son amplitude est fonction du pH de la solution, passe par un maximum à pH 5,9 (figure 1) et s'annule lorsque la concentration est réduite de moitié. Cette différence de comportement des complexes des dinucléotides avec et sans groupe phosphate en 2' se retrouve lorsqu'ils sont sous forme réduite (figure 2). Dans ce cas, au terme excitonique non conservatif intramoléculaire⁵ s'ajoute comme précédemment un couplet intermoléculaire pour NADPH-Cu^{2+} ; son amplitude est cependant environ 3 fois plus intense que celle de NADP-Cu^{2+} pour le maximum atteint à pH 6,1. Cet effet disparaît rapidement si l'on diminue la concentration des constituants.

Puisque le terme supplémentaire ne perturbe pas l'effet intramoléculaire; il est donc raisonnable d'affirmer qu'il est dû à une interaction intermoléculaire. Ce couplet, situé dans la région des transitions du noyau purine, met en évidence une association entre deux molécules voisines par empilement de deux de ces bases. De même qu'à forte concentration en l'absence de cations métalliques — la forte densité optique interdit des mesures dichroïques — un dimère est donc formé pour lequel l'ion Cu^{2+} sert de lien entre les deux résidus adényliques en se fixant aux groupes phosphates en 2', comme c'est le cas avec Co^{2+} ⁸. La disparition de l'effet en fonction de la concentration montre que les forces qui conduisent à cette autoassociation sont de même nature que celle des mononucléotides à forte concentration, c'est-à-dire essentiellement hydrophobes⁶. Les complexes du mononucléotide diphosphorylé de l'adénine (ADP) et du cuivre(II) présente d'ailleurs les mêmes caractéristiques ce qui met en valeur l'importance du groupe pyrophosphate⁷.

En conclusion, l'étude par dichroïsme circulaire des complexes formés par les pyridines nucléotides avec le cuivre s'est révélée très fructueuse pour mettre en évidence un phénomène d'autoassociation intermoléculaire. Cette autoassociation se produit par empilement de deux nucléotides au niveau des bases adényliques pour des concentrations relativement faibles en présence du cuivre alors que des solutions décimolaires sont nécessaires pour obtenir un phénomène de même type sans métal. Le comportement des complexes de ces dinucléotides rappelle par de nombreux points celui qui est observé pour les complexes métalliques de l'ADP. Nous pouvons donc en déduire que l'existence du groupe pyrophosphate est très importante pour la formation d'une autoassociation entre nucléotides en présence de métal pour de faibles concentrations. La conformation de ce groupe pyrophosphate semble d'ailleurs très importante pour expliquer le rôle biologique de ce coenzyme⁸.

- 6 P. O. P. Ts'O in: *Fine structure of Proteins and Nucleic Acids*, p. 49. Ed. Fasman and Timasheff. M. Dekker, New York 1970.
- 7 M. Gabriel, Thèse Nancy, AO 12677 (1976).
- 8 M. A. Viswamitra, *Nature* 258, 540 (1975).