

MODELE DE JONCTION B-Z DANS UN OLIGONUCLEOTIDE SYNTHETIQUE COMPORTANT UN SITE APURINIQUE

S. Pochet¹, T. Huynh-Dinh¹, J.-M. Neumann², S. Tran-Dinh²,
J.A. Taboury³, E. Taillandier³ et J. Igoien¹

¹Unité de Chimie Organique, UA-CNRS 487, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

²Service de Biophysique, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France

³Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire, UER Médecine-Biologie, 74 rue Marcel Cachin, 93012 Bobigny Cedex, France.

Abstract: The synthesis of the tridecadeoxynucleotide d(C-G-m⁵C-G-C-G-X-A-C-A-T-G-T), where X is a no-base residue, is described. The NMR, IR and CD studies at various salt concentrations and temperatures of the modified oligomer, show that the B and Z conformations are simultaneously present in the same duplex.

L'étude par diffraction des rayons X d'oligonucléotides comportant des paires de bases d(C-G)_n a permis en 1979 de caractériser une nouvelle forme de l'hélice, appelée hélice gauche Z¹ par opposition à l'hélice droite B. Dès lors de nombreux oligomères ont été synthétisés et cristallisés afin d'étudier la formation de l'hélice Z². L'introduction récente des spectroscopies RMN (¹H, ³¹P) et IR dans l'étude de courts oligonucléotides autocomplémentaires, a permis de suivre en solution ou sous forme de films plus ou moins hydratés les conformations de tels duplexes, de connaître les conditions d'équilibre entre les diverses formes A, B, Z et S (monobrin), ainsi que le mécanisme d'ouverture d'un double brin².

La forme Z est favorisée par l'alternance de purine-pyrimidine telle que d(G-C)_n³, l'introduction de bases modifiées (8-BrG⁴, 7-MeG⁵, 5-MeC⁶, 2-NH₂A⁷), l'addition d'alcool⁸ ou d'ions métalliques (Mg²⁺, Co²⁺, Na⁺, Ni²⁺...) ⁹.

Dans le cas de polymères synthétiques, tels que poly d(G-C) et poly d(m⁵C-G), les structures B et Z ont été détectées simultanément sur la même double hélice au moyen d'anticorps spécifiques à la conformation Z¹⁰. Dans le cas de courts oligomères, l'échange B ⇌ Z étant très rapide, il est difficile d'imaginer qu'une partie de l'hélice bascule à gauche tandis que l'autre reste dans la conformation droite. Les modèles synthétisés jusqu'à présent ^{11,12,13} n'ont pas permis de montrer la présence simultanée des formes B et Z sur

côté et A, C de l'autre). Lorsque la température diminue, les signaux des protons en échange chimique se déplacent vers les hauts champs tandis que de nouvelles résonances apparaissent. On observe (Figure 2) un nouveau pic, relié au méthyle de m^5C dans la forme B, dont le déplacement chimique correspond aux protons méthyles des bases dans les duplexes de forme Z (30% à température ambiante avec 0,1 M NaCl). La forme Z du tridécamère apparaît donc pour une concentration saline beaucoup plus faible que celles observées jusqu'à présent pour de courts fragments d'ADN (>1 M NaCl)^{14,18}.

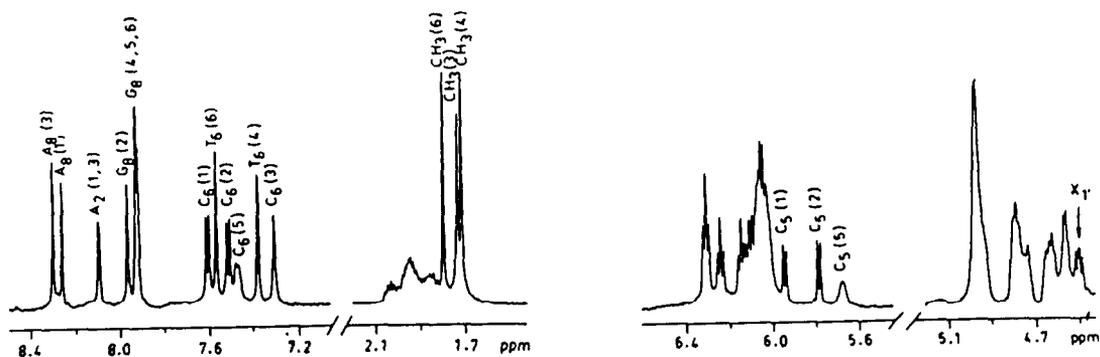


Figure 1

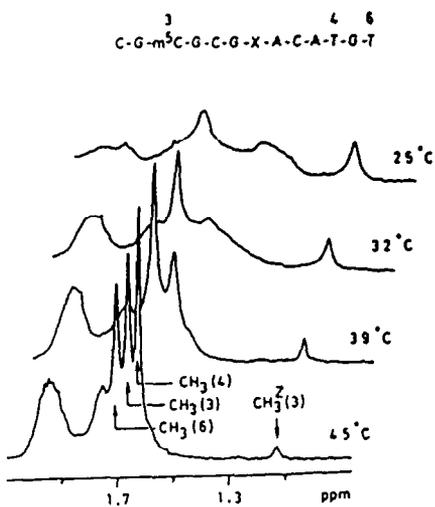


Figure 2

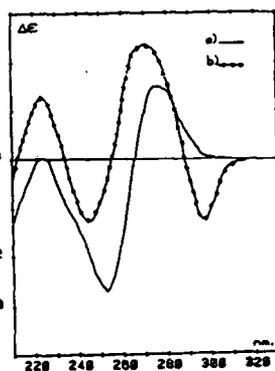


Figure 3

- a) 0,1 M NaCl
b) 4 M NaCl

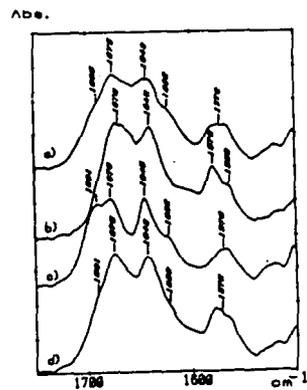


Figure 4

- a) 1 b) $d(C-G-m^5C-G)$
c) $d(A-C)_n$ d) $b+c$

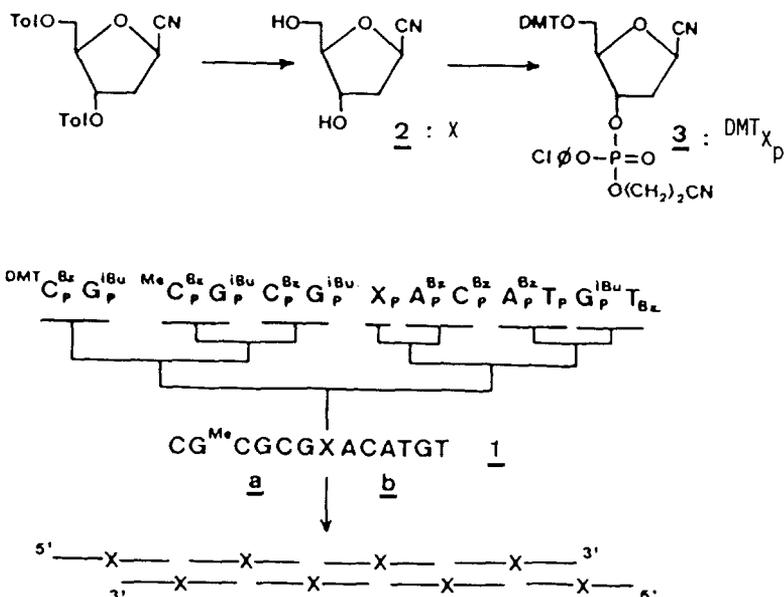
L'étude par dichroïsme circulaire¹⁹ indique pour une concentration de 0,1 M NaCl la prédominance de la forme B²⁰. A 4 M NaCl, on obtient un mélange des formes B et Z que l'on peut attribuer aux parties b et a respectivement (Figure 3).

L'étude par infrarouge en phase condensée²¹ confirme les résultats obtenus en solution. Quelque soit l'humidité relative (32% à 100%) avec Na^+ , les spectres expérimentaux sont identiques à ceux recalculés par addition du spectre de la forme Z de l'hexamère $d(C-G-m^5C-G)$ et du spectre de la forme B du polymère $d(A-C)_n$. $d(G-T)_n$. Nous donnons à titre

une même hélice, ni de fournir des renseignements sur la jonction entre les deux conformations.

Le but de ce travail est de vérifier l'hypothèse qu'un seul site apurinique (ou apyrimidinique) suffirait à introduire suffisamment de flexibilité dans la chaîne oligonucléotidique pour permettre la transition hélice droite-hélice gauche à ce niveau.

Nous avons donc synthétisé l'oligomère 1 où les deux sous-unités a et b susceptibles d'adopter les conformations B et Z individuellement sont séparées par un résidu glycosidique non hétérocyclique. Les deux sous-unités sont les hexamères suivants: d(C-G-m⁵C-G-C-G)¹⁴ pour la partie Z et d(A-C-A-T-G-T)¹⁵ pour la partie B (schéma 1). Quant au résidu non hétérocyclique, nous avons choisi un dérivé stable du désoxy-ribose: le cyano-1 désoxy-2-D-ribose (2)¹⁶. Non aromatique et donc peu favorable au phénomène de stacking, ce glycosyl-nitrile par sa faible taille devrait nous permettre d'observer simultanément les deux conformations B et Z. Le tridécamère a une structure pseudo-palindromique décalée qui s'apparie en un modèle d'hélice de grande longueur. Cet oligomère (65 mg) a été synthétisé en phase liquide par la méthode au phosphotriester selon le schéma 1.



Le spectre RMN¹⁷ (500 MHz) à 69°C montre les protons des bases ainsi que le signal du proton H-1' du résidu apurinique X sous forme d'un triplet (δ 4,5 ppm) (Figure 1). L'attribution des signaux a été effectuée par comparaison à haute température avec les spectres des hexamères a¹⁴ et b¹⁵ enregistrés précédemment (75°C/90°C) et par expérience de 2D-NOESY à 45°C, température à laquelle les trois groupes méthyles sont bien séparés. Les déplacements chimiques à haute température des protons du tridécamère sont très proches de ceux des hexamères a et b sous forme de monobrin. Les variations les plus importantes (de 0,03 à 0,07 ppm) se rencontrent pour les protons des bases situées à proximité du résidu X (C, G d'un

d'exemple (Figure 4), la région spectrale 1800-1550 cm^{-1} des vibrations dans le plan des doubles liaisons des bases, région très sensibles aux changements d'empilement des bases lors de la transition $B \rightleftharpoons Z$. En effet, les bandes principales du massif pour le $d(\text{G-C})_n$ se déplacent de 1681 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} (forme B), à 1666 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} (forme Z) et pour le $d(\text{A-C})_n$ - $d(\text{G-T})_n$ de 1678 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} (forme B) à 1656 cm^{-1} , 1632 cm^{-1} (forme Z)²². Par contre les spectres recalculés en utilisant les formes A ou Z du polymère $d(\text{A-C})_n$ - $d(\text{G-T})_n$ ne permettent pas de reproduire le spectre observé avec les bandes à 1675 cm^{-1} et 1643 cm^{-1} .

Cette étude montre donc, parmi d'autres types de jonctions possibles, que les conformations B et Z peuvent être simplement reliées par un seul site apurinique. Les implications biologiques d'une telle structure sont extrêmement importantes et d'autres travaux sont en cours pour confirmer ce résultat.

L'interprétation complète des spectres de RMN, CD et IR sera publiée ultérieurement.

REFERENCES

- 1 A.H.-J. Wang, G.J. Quigley, F.S. Kolpach, J.L. Crawford, J.H. Van Boom, G.A. Van der Marel et A. Rich, *Nature*, 1979, **282**, 680.
- 2a D.J. Patel, S.A. Kozlowski, S. Ituka et K. Itakura, *Biochemistry*, 1984, **23**, 3207 et 3218.
- 2b J. Feigon, A.H.-J. Wang, G.A. Van der Marel, J.H. Van Boom et A. Rich, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 2.
- 2c G.V. Fazakerley, G.A. Van der Marel, J.H. Van Boom et W. Guschlbauer, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 8269.
- 3 T.J. Thamann, R.C. Lord, A.H.T. Wang et A. Rich, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 5443.
- 4 A. Möller, A. Nordheim, S.A. Kozlowski, D.J. Patel et A. Rich, *Biochemistry*, 1984, **23**, 54.
- 5 A. Möller, A. Nordheim, S.A. Nichols et A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 4777.
- 6 M. Behe et G. Felsenfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 1619.
- 7 B.L. Gaffney, L.A. Marky et R.A. Jones, *Tetrahedron*, 1984, **40**, 3.
- 8 S. Brahm, J. Vergne et J.G. Brahm, *J. Mol. Biol.*, 1982, **162**, 473.
- 9a F. Pohl et T.M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, 1972, **67**, 375.
- 9b J.J. Butzow, Y.A. Shin et G.L. Eichborn, *Biochemistry*, 1984, **23**, 4837.
- 9c J.A. Taboury, P. Bourtarpe, J. Liquier et E. Taillandier, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 4247.
- 10 A. Nordheim, M.L. Pardue, E.M. Lafer, A. Möller, B.D. Stollar et A. Rich, *Nature*, 1981, **294**, 417.
- 11 D.J. Patel, A. Pardi et K. Itakura, *Science*, 1982, **216**, 581.
- 12 F. Quadrifoglio, G. Manzini, M. Vasser, K. Dinkelspiet et R. Créa, *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**, 2195.
- 13 T.A. Millican, G.A. Mock, M.A. Chauncey, T.P. Patel, M.A.W. Eaton, J. Gunning, S.D. Cutbush, S. Neidle et J. Mann, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 7435.
- 14 J.A. Cavaillès, J.-M. Neumann, J. Taboury, B. Langlois d'Estaintot, T. Huynh-Dinh, J. Igolen et S. Tran-Dinh, *J. Biomol. Str. and Dyn.*, 1984, **1**, 1347.
- 15 S. Tran-Dinh, J.-M. Neumann, T. Huynh-Dinh, B. Genissel, J. Igolen et G. Simonnot, *Eur. J. Biochem.*, 1982, **124**, 415.
- 16 Le composé 2 est obtenu après détoluoylation du cyano-1 di-o-p-toluoyl-3,5 désoxy-2-D ribose: A. Kolb, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh et J. Igolen, *Tetrahedron*, 1975, **31**, 2914.
- 17 L'oligomère est solubilisé dans D_2O (0,1 M NaCl, 5 mM phosphate, pH 7-8)
- 18 S. Tran-Dinh, J. Taboury, J.-M. Neumann, T. Huynh-Dinh, B. Genissel, B. Langlois d'Estaintot et J. Igolen, *Biochemistry*, 1984, **23**, 1362.
- 19 Les spectres de DC sont enregistrés à 10°C sur un autodichrographe Mark V.
- 20 J.A. Taboury, S. Adam, E. Taillandier, J.-M. Neumann, S. Tran-Dinh, T. Huynh-Dinh, B. Langlois d'Estaintot, M. Conti et J. Igolen, *Nucleic Acids Res.* **12**, 6291.
- 21 Les spectres IR sont enregistrés à 35°C sur un spectromètre Perkin-Elmer 180.
- 22a T.M. Jovin, L.P. McIntosh, D.J. Arndt-Jovin, D.A. Zarling, M.R. Nicoud, J.M. Van de Sande, K.K. Jorgenson et F. Eckstein, *J. Biomol. Str. and Dyn.*, 1983, **1**, 21.
- 22b E. Taillandier, J.A. Taboury, S. Adam et J. Liquier, *Biochemistry*, 1984, **23**, 5703.