

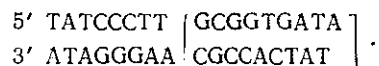
CONFORMATION OF THE O_{R3} OPERATOR OF PHAGE λ AND ITS FRAGMENT
IN AQUEOUS AND AQUEOUS-TRIFLUOROETHANOL SOLUTIONS

V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Shchelkina, B. K. Chernov,
A. P. Yartsev, M. P. Kirpichnikov

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

Circular dichroism method (CD) was used to study conformation of the synthetic deoxy-oligonucleotide of 17 base pairs long, which is an O_{R3} operator of phage λ , and its 9-base pairs fragment



The stability regions of the double-stranded state are determined for these duplexes. Conformations of the short DNA fragments in aqueous solutions of different NaCl concentrations are shown to exist within the limits of B-family. A cooperative change in the CD spectra is observed in trifluoroethanol (TFE) solutions with TFE concentration typical of each oligonucleotide, which is supposed to be due to B-A transition.

The B-form stabilization by terminal base pairs is evaluated using the B-A transition theory. Each terminal base pair stabilizes the B form by the value of ~ 1.7 kcal/mol.

1. *Different conformations of double-stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism* / V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev // *Biopolymers*.—1973.—12, N 1.—P. 89—110.
2. *Minchenkova L. E., Zimmer Ch.* Reversion of the B to A transition induced by specific interaction with the oligopeptide distamycin A // *Ibid.*—1980.—19, N 4.—P. 823—831.
3. *B-A transition in DNA* / V. I. Ivanov, D. Yu. Krylov, E. E. Minyat, L. E. Minchenkova // *J. Biomol. Struct. Dyn.*—1983.—1, N 2.—P. 453—460.
4. *Seth A. K., Jay E.* A study of the efficiency and the problem of sulfonation of several condensing reagents and their mechanisms for the chemical synthesis of deoxyoligo-ribonucleotides // *Nucl. Acids Res.*—1980.—8, N 22.—P. 5445—5449.
5. *Maxam A. M., Gilbert W.* A new method for sequencing DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 2.—P. 560—564.
6. *Веденов А., Дыхне А., Франк-Камеицкий М.* Переход спираль — клубок в ДНК // *Успехи физ. наук.*—1971.—105, № 3.—С. 479—519.
7. *The nature of the B-A transition of DNA in solution* / G. Malenkov, L. Minchenkova, E. Minyat et al. // *FEBS Lett.*—1975.—51, N 1.—P. 38—42.
8. *The B to A transition of DNA in solution* / V. Ivanov, L. Minchenkova, E. Minyat et al. // *J. Mol. Biol.*—1974.—87, N 4.—P. 817—833.

Ин-т молекуляр. биологии АН СССР, Москва

Получено 19.07.85

УДК 577.214.6

**СПЕЦИФИЧЕСКОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *cro*-РЕПРЕССОРА
С МОДЕЛЯМИ ОПЕРАТОРНЫХ УЧАСТКОВ.
ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОМ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА**

**М. П. Кирпичников, А. П. Ярцев,
Л. Е. Минченкова, Б. К. Чернов, В. И. Иванов**

Введение. Взаимная адаптация структур белка и нуклеиновой кислоты — один из центральных вопросов в проблеме белково-нуклеинового взаимодействия. Примеры возможных изменений ДНК можно найти в двух недавних рентгеноструктурных работах: «наматывание» ДНК на октамер гистонов происходит путем довольно резких изломов — «кинков» [1], а комплексообразование рестриктазы *EcoRI* с синтетическим дуплексом, содержащим посредине сайт рестрикции, вызывает как

«кинки», так и переход краев дуплекса в А-подобную форму [2]. Косвенный, но зато более «быстрый» метод кругового дихроизма (КД), также выявил существенные изменения конформации двойной спирали при ее связывании с такими регуляторными белками, как *lac*- и *tet*-репрессоры, белок-активатор *SAP* [3—6]. Интересно, что в каждом случае наблюдали специфические изменения спектров КД, причем для комплекса с *SAP*-белком изменение КД было качественно иным даже по сравнению с комплексами репрессоров.

Репрессор *cro* фага λ — один из самых малых белков — регуляторов генной активности. Его структура в кристалле известна, и предложены модели комплекса с операторным участком [7]. В последних гипотетических моделях предполагается, что оператор должен как-то «согнуться», чтобы достичь лучшей комплементарности с белком [8]. Изучена структура *cro*-репрессора в растворе [9—10] и участка наиболее прочного связывания его в геноме фага λ — O_{R3} [11,12]. Недавно метод ЯМР был применен для изучения специфического комплекса *cro* — O_{R3} . В результате были получены данные, свидетельствующие о появлении излома в середине участка связывания [13].

В этой статье мы описываем изучение комплексов *cro*-белка с синтетическим оператором O_{R3} (17 пар оснований) и его 9-членным фрагментом методом кругового дихроизма. Мы обнаружили, что только в случае комплексов *cro*-белка с моделями мест специфического связывания спектр КД не является суммой спектров КД ДНК и белка. Изменение КД в специфических комплексах *cro*-белка с ДНК не похоже ни на один из опубликованных случаев: *lac*-, *tet*-репрессоров и *SAP*-активатора, а также на те изменения КД O_{R3} (и его фрагмента), которые мы наблюдали при В—А-переходе и при действии солей (см. предыдущую статью [12]).

Материалы и методы. *Cro*-белок выделяли из сверхпродуцента *E. coli*, содержащего рекомбинантную плазмиду *pTR214* [14], и очищали, как описано ранее [15]. Концентрацию растворов белка определяли спектрофотометрически, используя в качестве коэффициента экстинкции (на моль аминокислотного остатка) величину 4330 [10].

Олигонуклеотиды синтезировали блочным триэфирным методом в растворе [16], их последовательность подтверждали методом Максама — Гилберта [17]. Концентрации олигонуклеотидов в растворе определяли после гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда спектрофотометрически. Соответствующие коэффициенты экстинкции даны в [12].

Комплексы *cro*-белка с синтетическим оператором O_{R3} и его фрагментом изучали методом кругового дихроизма на приборе Mark III («Jobin Ivo», Франция). Ранее показано [12], что оба дуплекса: 17-членный и его 9-членный фрагмент в 0,1 М растворе NaCl при температуре ниже 8°C находятся в двуспиральном состоянии и имеют В-подобную конформацию. Именно в этих условиях мы работали с комплексами *cro*-белка. Остальные условия даны в подписях к рисункам.

Результаты и обсуждение. Спектры КД комплекса *cro*-белка с O_{R3} и его фрагментом длиной 9 пар отличаются от спектров КД несвязанных дуплексов в области, где свободный белок имеет незначительный КД (>250 нм) (рис. 1). Интенсивная отрицательная полоса при длинах волн короче 250 нм обязана, в основном, α -спиралям *cro*-белка и не меняется при комплексообразовании.

Сильнее всего КД меняется в области положительной полосы обоих дуплексов: 260÷30 нм. В районе 280÷285 нм наблюдается большой провал, максимум сдвигается в коротковолновую часть, а для O_{R3} в составе комплекса амплитуда КД в максимуме становится больше, чем в максимуме КД свободного дуплекса (рис. 1). Эти изменения не могут быть обусловлены собственным КД свободного белка: хотя у *cro*-белка и есть отрицательная полоса КД точно при 280 нм, ее величина столь мала ($\Delta\epsilon_{280} = 0,003$ [10]), что при максимальной концентрации белка в наших опытах ее зарегистрировать не удается. Более того, по мере добавления *cro*-белка к дуплексам изменение КД достигает насыщения.

Это подтверждает, что КД меняется именно в результате комплексования.

Стехиометрия комплексов непосредственно следует из данных КД-титрования (рис. 2). Интересно, что и для целого оператора O_{R3} и его 9-членного фрагмента получается одно и то же соотношение: 1 димер *cro* на 1 дуплекс. Фрагмент длиной 9 пар лишь на «полпары» больше половины O_{R3} (17 пар). Поэтому можно было ожидать, что с димером *cro*-белка свяжутся две молекулы 9-членного фрагмента. Опыт (рис. 2, б), однако, показывает, что это не так. Возможно, что присоединение к белку одного дуплекса длиной 9 пар осно-

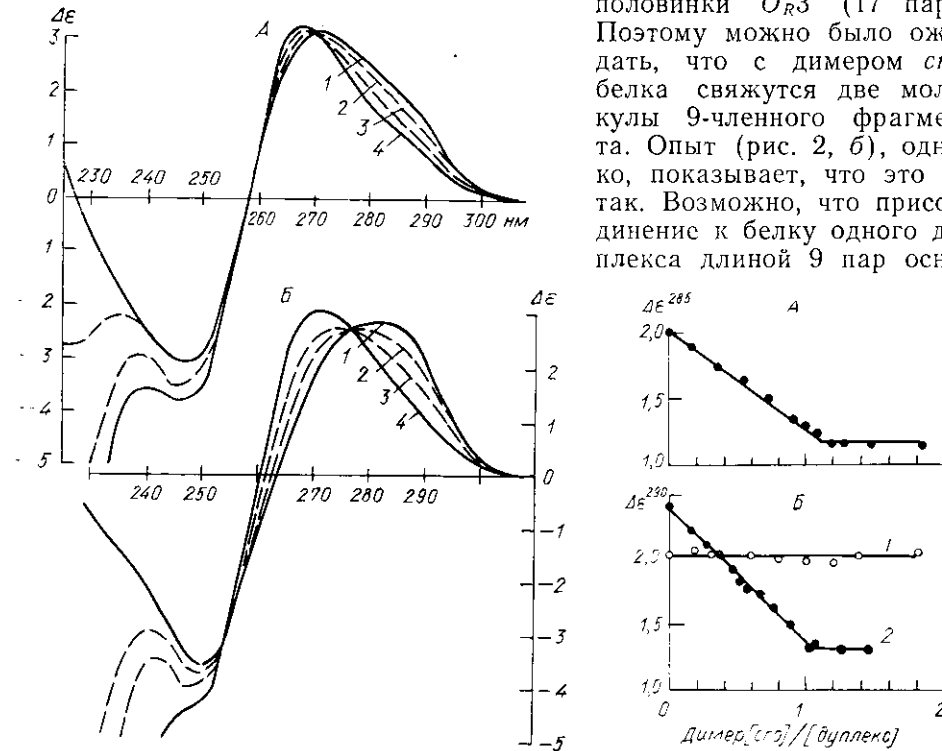


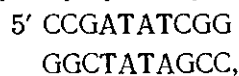
Рис. 1. КД-спектры для операторного участка O_{R3} (А) и его фрагмента длиной 9 пар оснований (Б) и их комплексов с *cro*-репрессором при разных концентрациях его в растворе. Концентрация O_{R3} $5 \cdot 10^{-4}$ М (фосфатов), фрагмента — 10^{-3} М (фосфатов). Отношение концентрации димеров *cro*-белка к концентрации дуплексов для O_{R3} : 1—0; 2—0,37; 3—0,73; 4—1,1. То же для фрагмента из 9 пар оснований: 1—0; 2—0,3; 3—0,51; 4—1,05. Температура $+1^\circ\text{C}$; 0,1 М NaCl для O_{R3} и 0,01 М NaCl для фрагмента из 9 пар оснований. КД рассчитан на моль нуклеотидов.

Fig. 1. CD spectra of the O_{R3} (A) and the 9 base pairs duplex (B) and their complexes with *cro*-protein. The O_{R3} concentration — $5 \cdot 10^{-4}$ M (P). The 9-mer concentration — 10^{-3} M (P). The ratio of dimeric *cro*-protein to the duplex for O_{R3} : 1—0; 2—0.37; 3—0.73; 4—1.1. For the 9-mer: 1—0; 2—0.3; 3—0.51; 4—1.05. Temperature $+1^\circ\text{C}$; 0.1 M NaCl for the O_{R3} and 0.01 M NaCl for the 9-mer. The CD is calculated per mol of nucleotides.

Рис. 2. КД-титрование *cro*-белком O_{R3} (А); ДНК из тимуса теленка (1) и фрагмента из 9 пар оснований (2) в 0,1 М NaCl (Б).

Fig. 2. CD titration of the O_{R3} (A), calf thymus DNA (open circles) and the 9 base pairs duplex (B) by *cro*-protein in 0.1 M NaCl.

ваний стерически препятствует специфическому присоединению к свободной субъединице димера *cro*-белка второго такого же дуплекса. Известно, что *cro*-белок способен образовывать с ДНК неспецифические комплексы с константой связывания много меньшей, чем при специфическом связывании. В контрольных экспериментах мы добавляли *cro*-белок к неоператорному дуплексу 10 пар оснований



а также к тимусной ДНК. Ни в одном случае не наблюдали изменений в длинноволновой полосе КД (рис. 2, б). Таким образом, метод КД регистрирует только специфические комплексы *cro*-белка с моделями

оператора. В принципе, при специфическом взаимодействии 9-членной «половинки» O_{R3} с мономером *cro*-белка его второй мономер мог бы связывать второй такой же дуплекс неспецифически. Возможно, что это неспецифическое связывание способен регистрировать метод ЯМР [18].

Стабильность комплексов. Добавление NaCl к комплексам O_{R3} и его фрагмента длиной 9 пар при насыщающей концентрации *cro*-белка вызывает возрастание положительной полосы КД, которая приближается по величине к КД свободных олигонуклеотидов.

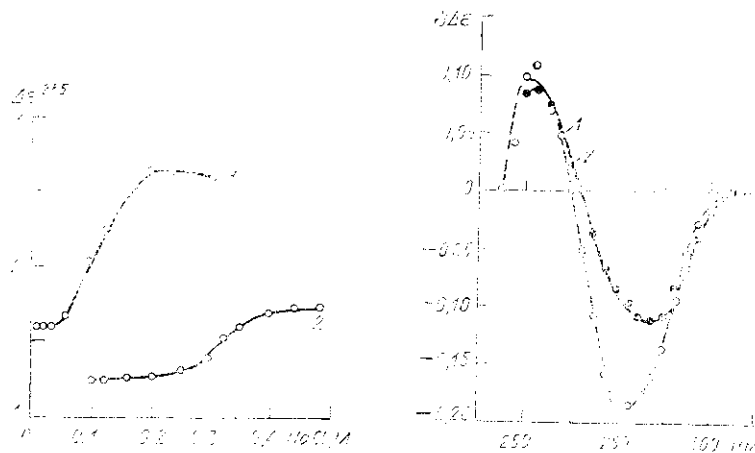


Рис. 3. Диссоциации при увеличении концентрации NaCl комплексов *cro*-белка с фрагментом из 9 пар оснований (1) и O_{R3} (2). По оси ординат отложена величина КД.

Fig. 3. *Cro*-complexes dissociation (1— for the 9 base pairs duplex; 2— for the O_{R3}) on addition of NaCl as revealed by the CD magnitude.

Рис. 4. Дифференциальные КД-спектры дуплексов и их комплексов с *cro*-белком в 0,1 М NaCl: 1— O_{R3} ; 2— фрагмент из 9 пар оснований.

Fig. 4. Differential CD spectra between the non-bound duplexes and their *cro*-complexes in 0.1 M NaCl: (1— for O_{R3} ; 2— for 9 base pairs duplex).

Рост амплитуды КД происходит в узком интервале концентраций NaCl (рис. 3). Из сравнения кривых 1 и 2 следует, что комплекс *cro*-белка с коротким фрагментом 9 пар менее стабилен. Он разрушается при меньших концентрациях NaCl (0,25—0,3 М) по сравнению с комплексом для 17-членного олигонуклеотида (0,5—0,6 М). Отметим, что для этого же дуплекса методом ЯМР [18] наблюдали распад комплекса точно при таких же концентрациях NaCl, как и в наших опытах.

Таким образом, с ростом длины специфического олигонуклеотида его комплекс с *cro*-белком упрочняется. Еще более прочный комплекс образуется с 58-членным рестрикционным фрагментом, содержащим 17-членный оператор O_{R3} ; для его разрушения требуется 1,5 М NaCl [19].

Природа эффекта КД в комплексах *cro*-белка с моделями операторных участков. Наблюдаемый эффект КД может быть связан с белком или ДНК, или обоими компонентами. Крупномасштабные изменения формы спирали ДНК, такие как при В—А-переходе или при переходе в пределах В-семейства, сильно влияют на спектр КД: в первом случае амплитуда положительной полосы КД растет, во втором — падает [20]. В работе [12] описаны эффекты КД при подобных изменениях формы именно данных операторных дуплексов. Эффект КД при их комплексовании с *cro*-белком не совпадает ни с одним из этих изменений. В отличие от В—А-перехода в водно-спиртовых растворах амплитуда КД в случае комплекса с *cro*-белком падает. В В-семействе с ростом концентрации соли положительная полоса КД располагается друг под другом и не пересекает начальный спектр, а в присутствии *cro*-белка максимум положительной полосы КД сдвигается в коротковолновую область и пересекает исходный спектр свободного дуплекса. Конечно, в комплексе с *cro*-белком

могли бы происходить и такие изменения формы спирали оператора, которые не реализовались в условиях работы [12]. Например, методом ЯМР в работе Кириччинова и соавт. [13] получены данные о том, что при комплексовании *cro*-белка с 17-членным оператором O_{R3} по середине последнего, вероятно, происходит излом. Однако обнаруженный нами эффект КД не может быть объяснен таким изломом, так как подобное изменение происходит и с КД 9-членного фрагмента. Скорее всего такой локальный излом методом КД вообще нельзя определить.

С другой стороны, как мы уже отмечали, в собственном спектре КД *cro*-белка имеется очень слабая отрицательная полоса при 280 нм, которая может принадлежать тирозину белка. Наличие этой полосы не может быть причиной большого эффекта, наблюдаемого в комплексе. Однако при связывании с ДНК находящийся на поверхности тирозин может оказаться в асимметричном окружении и приобрести индуцированный КД в своей полосе поглощения. Дифференциальные спектры КД на рис. 4 имеют минимумы как раз около 280 нм и это изменение могло бы быть обусловлено тирозином *cro*-белка. Подходящим является Туг-26, который, согласно модели комплекса [8], образует специфические связи с оператором.

Важный результат следует из сравнения дифференциальных спектров КД комплексов O_{R3} и его фрагмента с *cro*-белком и свободными дуплексами (рис. 4, кривые 1 и 2). Амплитуда отрицательной полосы КД в случае комплекса фрагмента из 9 пар оснований почти в два раза меньше амплитуды для O_{R3} . Это подтверждает наше предположение о том, что фрагмент образует специфический комплекс только с одной молекулой димера *cro*-белка, а O_{R3} взаимодействует с двумя, и тем самым два Туг-26 участвуют в изменении КД. Также возможно, что изменения при 260 нм в КД комплекса *cro*-белка с оператором определяются гистидином белка, участвующим во взаимодействии с ДНК [8].

Сравнение с другими белково-нуклеиновыми комплексами. Итак, мы интерпретируем изменения КД, происходящие при специфическом комплексовании *cro*-репрессора с оператором как эффекты, главным образом обусловленные наведенной оптической активностью на ароматические аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с ДНК. При этом эффекты, обусловленные изменением формы спирали ДНК в целом, мы считаем в нашем случае практически отсутствующими. Такой вывод согласуется и с данными ЯМР [13], и с предварительными рентгеноструктурными данными [21], из которых следует, что при взаимодействии с *cro*-белком фага λ [13] или *cro*-репрессором фага 434 [21] ДНК участка связывания остается в целом в В-форме.

Интересно сравнить комплексы *cro* с другими белково-нуклеиновыми комплексами. При комплексовании репрессоров *lac* [3] и *tet* [4] со своими участками связывания возникают сходные друг с другом изменения в КД: заметное возрастание в максимуме положительной полосы КД ДНК [3, 4]. В этих случаях можно предположить частичный переход ДНК в А-форму. Интересно, что на дифференциальном спектре КД этих комплексов ясно видна вторая полоса при 280 нм, которая, однако, в отличие от описанного нами случая, положительна. Комплекс белка-активатора *SAR*, напротив, понижает амплитуду КД в области длинноволновой полосы ДНК, причем изменение носит тот же характер, что и при увеличении спирального вращения ДНК [5, 6]. В каждом из этих случаев делается вывод о нелокальном изменении формы участка связывания при взаимодействии с белком. Наши данные говорят об отсутствии такого рода изменений оператора при его комплексовании с *cro*-репрессором.

Таким образом, даже четыре комплекса, изученные до сих пор, демонстрируют разнообразие структурных эффектов, сопровождающих белково-нуклеиновое взаимодействие.

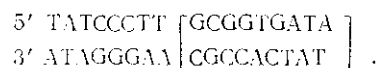
SPECIFIC INTERACTION OF THE *cro*-REPRESSOR
WITH OPERATOR SITE MODELS. CIRCULAR DICHROISM STUDIES

M. P. Kirpichnikov, A. P. Yartsev, L. E. Minchenkova, B. K. Chernoz, V. I. Ivanov

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Summary

The circular dichroism (CD) method was used to study the interaction of the *cro*-repressor of the phage λ with a synthetic O_{R3} operator of 17 base pairs long, and with its 9 base pairs fragment



In both cases addition of *cro*-protein considerably changed the CD spectra in the region of 260-300 nm.

The stoichiometry determined by the CD titration is identical both for O_{R3} and its fragment: one duplex per *cro* dimer.

The interaction of the *cro*-protein with non-operator DNAs reveals no visible CD changes at all.

The spectral changes during specific interaction are quite different from those for the B-A transition and for winding of the DNA within the B-family towards C-form. A conclusion is drawn that the CD changes are mainly induced by the CD effect in Tyr-26 during specific complex formation, the operator DNA conformation being conserved in a B-like form as a whole.

1. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution / T. J. Richmond, J. T. Finch, B. Rushton et al. // Nature.—1984.—311, N 5986.—P. 532–537.
2. Kinked DNA in crystalline complex with *EcoRI* endonuclease / Ch. A. Frederick, J. Grable, M. Melia et al. // Ibid.—309, N 5966.—P. 327–331.
3. Culard F., Maurizot J. C. Lac repressor-lac operator interaction. Circular dichroism study // Nucl. Acids Res.—1981.—9, N 19.—P. 5175–5184.
4. Altschmid L., Hillen W. TET repressor-tet operator complex formation induces conformational changes in the tet operator DNA // Ibid.—1984.—12, N 4.—P. 2171–2180.
5. Martin S. R., Gronenborn A. M., Clore G. M. Specific DNA binding of the cyclic AMP receptor protein to a synthetic oligodeoxyribonucleotide // FEBS Lett.—1983.—159, N 1.—P. 102–106.
6. Fried M. G., Wu H.-M., Crothers D. M. CAP binding to B and Z forms of DNA // Nucl. Acids Res.—1983.—11, N 8.—P. 2479–2494.
7. Structure of the *cro* repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA / W. F. Anderson, D. H. Ohlendorf, Y. Takeda, B. W. Matthews // Nature.—1981.—290, N 5809.—P. 754–758.
8. The molecular basis of DNA-protein recognition inferred from the structure of *cro* repressor / D. H. Ohlendorf, W. F. Anderson, R. G. Fisher et al. // Ibid.—1982.—298, N 5876.—P. 718–723.
9. Kurochkin A. V., Kirpichnikov M. P. Studies of the structure of bacteriophage λ *cro* protein in solution // FEBS Lett.—1982.—150, N 2.—P. 411–415.
10. Bolotina I. A., Kurochkin A. V., Kirpichnikov M. P. Studies of the structure of bacteriophage λ *cro* protein in solution. Analysis of the circular dichroism data // Ibid.—1983.—155, N 2.—P. 291–294.
11. NMR-study of repressor-operator interactions / F. Buck, K. D. Hahn, W. Zemann et al. // Proc. fifth intern. symp. metabolism and enzymology nucl. acids including gene manipulations.—Bratislava, 1984.—P. 27–40.
12. Конформация операторного участка O_{R3} фага λ и его фрагмента в водных и водно-трифторэтанольных растворах / В. И. Иванов, Л. Е. Минченкова, А. К. Щелкина и др. // Биополимеры и клетка.—1986.—2, № 2.—С. 101–106.
13. ^1H NMR study of the interaction of bacteriophage λ *cro* protein with the O_{R3} operator. Evidence for a change of the conformation of the O_{R3} operator on binding / M. P. Kirpichnikov, K. D. Hahn, F. Buck et al. // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 8.—P. 3551–3561.
14. Roberts T. M., Kacich R., Ptashne M. A general method for maximizing the expression of a cloned gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 2.—P. 760–764.
15. Kirpichnikov M. P., Kurochkin A. V., Skryabin K. G. Studies of the structure of bacteriophage λ *cro* protein in solution. Analysis of the aromatic region of the ^1H NMR spectrum // FEBS Letters.—1982.—150, N 2.—P. 407–410.

Окончание см. на 4-й стр. обложки.