

7. *Subfragments of the large terminal repeat cause glucocorticoid-responsive expression of mouse mammary tumor virus and of adjacent gene* / N. Hynes, A. J van Ooyen, N. Kennedy et al. // *Ibid.*—N 12.—P. 3637—3641.
8. *Isolation and characterization of the rat tyrosine aminotransferase gene* / T. Shinomiya, G. Scherer, W. Schmid // *Ibid.*—1984.—81, N 5.—P. 1346—1350.
9. *Cochet M., Chang A. C. Y., Cohen S.* Characterization of the structural gene and putative 5'-regulatory sequence for human proopiomelanocortin // *Nature.*—1982.—297, N 5864.—P. 335—339.
10. *Nucleotide sequences.*—Oxford; Washington: IRL press, 1984.—1200 p.
11. *The template RNAs of RNA polymerases can have compact secondary structure formed by long duable helices with partial violation of the complementarity* / V. V. Solov'yev, A. A. Zharkikh, N. A. Kolchanov, V. A. Ratner // *FEBS Lett.*—1984.—165, N 1.—P. 72—78.
12. *Колчанов Н. А., Соловьев В. В., Жарких А. А.* Контекстные методы теоретического анализа генетических макромолекул (ДНК, РНК и белков) // *Молекулярная биология.*—М.: ВИНТИ, 1985.—С. 6—34.—(Итоги науки и техники / ВИНТИ; т. 21)
13. *А. с. 925964 СССР, МКИ<sup>3</sup> С 07 H 19/16, А 61 К 49/00.* Способ получения дезокси-полнуклеотидов / В. П. Кумарев, Л. В. Баранова, В. С. Богачев, М. И. Ривкин // *Открытия. Изобретения.*—1982.—№ 17.—С. 120.
14. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain terminating inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74, N 12.—P. 5463—5467.
15. *Mulvihill E. R., LePennec J. P., Chambon P.* Chicken oviduct progesteron receptor: location of specific regions of high affinity binding in cloned DNA fragments of hormone responsive genes // *Cell.*—1982.—28, N 3.—P. 621—632.
16. *Alberts B., Herrick G.* DNA-cellulose chromatography // *Meth. Enzymol.*—1971.—21, pt D.—P. 198—217.
17. *DNA sequences involved in the regulation of gene expression by glucocorticoid hormones* / B. Groner, N. Kennedy, P. Skroch et al. // *Biochim. et biophys. acta.*—1984.—781, N 8.—P. 1—6.
18. *Calladine C. R.* Mechanisms of sequence-dependent stacking of bases in B-DNA // *J. Mol. Biol.*—1982.—161, N 2.—P. 343—352.
19. *Functional analysis of the steroid hormone control region of the mouse mammary tumor virus* / F. Lee, C. V. Hall, G. M. Ringold et al. // *Nucl. Acids Res.*—1984.—12, N 10.—P. 4191—4206.
20. *Chandler V. L., Maler B. A., Yamamoto K. R.* DNA sequences bound specifically by the glucocorticoid receptor *in vitro* render a heterologous promoter hormone responsive *in vivo* // *Cell.*—1983.—33, N 2.—P. 489—499.
21. *Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding* / R. Renkawitz, G. Schütz, D. von der Ahe, M. Beato // *Ibid.*—1984.—37, N 2.—P. 503—510.

Ин-т цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Получено 16.08.85

УДК 577.214.8

## КОНФОРМАЦИЯ ОПЕРАТОРНОГО УЧАСТКА $O_R 3$ ФАГА $\lambda$ И ЕГО ФРАГМЕНТА В ВОДНЫХ И ВОДНО-ТРИФТОРЭТАНОЛЬНЫХ РАСТВОРАХ

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

**Введение.** В связи с большими успехами химического синтеза ДНК появилась возможность исследовать конформационные свойства не суммарной ДНК, а определенных участков, имеющих функциональное значение. В этой работе мы исследовали один из таких фрагментов: участок  $O_R 3$  правого оператора генома фага  $\lambda$  длиной 17 пар оснований и его фрагмент из 9 пар.

Многочисленные исследования, посвященные структуре молекулы ДНК, показали, что в зависимости от условий среды и нуклеотидной последовательности возможны различные формы спирали. Это разнообразие форм можно разделить на три семейства: А, В и Z. Применение метода кругового дихроизма (КД) показало, что двойная спираль под влиянием внешних условий может менять свою структуру двумя способами. В пределах одного семейства изменение спирали происходит

плавно (например переход В—С), а переход между семействами происходит кооперативно (А—В-, В—Z-переходы) [1]. В наших работах [2, 3] была определена главная количественная характеристика В—А-перехода — длина кооперативности, которая оказалась равной 10—20 парам оснований. Эта величина близка длине исследуемых олигонуклеотидов. При этом может быть существенна роль концов фрагментов.

Цель работы — сопоставление спектров КД 17- и 9-членных олигонуклеотидов и длинной ДНК в условиях существования В- и А-форм и в интервале В—А-перехода, а также выяснение энергетического вклада концов фрагментов при переходе из формы В в форму А. Конформационные свойства этих фрагментов интересны в связи со специфическим взаимодействием их с белком — *cro*-репрессором.

**Материалы и методы.** Дезоксиолигонуклеотиды (нити: 5'ТАТСССТТ-ГССГТГАТА, 3'АТАГГГААСССАСТАТ, 5'ТАТСАССГС, 3'АТАГТГГССГ) синтезировали блочным триэфирным методом в растворе [4]; после удаления всех защитных групп соединения выделяли ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и окончательно очищали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Строение полученных олигонуклеотидов подтверждали по методу Максама и Гилберта [5].

Концентрации дезоксиолигонуклеотидов определяли с помощью фосфодиэстеразы змеиного яда («Worthington», США). Индивидуальные комплементарные нити 17- и 9-членных фрагментов расщепляли до мононуклеотидов в буферном растворе ( $10^{-2}$  М трис-НСl, рН 7,1, 0,1 М NaCl,  $10^{-2}$  М MgCl<sub>2</sub>). Затем по спектрам поглощения определяли оптическую плотность при 260 нм. Используя известные значения молярных экстинкций отдельных нуклеотидов при 260 нм (рН 7) дрА, дрг, дрС и дрТ  $\epsilon = 15300, 11800, 7400, 9300$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> соответственно, были рассчитаны средние молярные экстинкции на остаток для одноцепочечных фрагментов данного нуклеотидного состава. Получены следующие значения: для последовательности ТАТСССТТГССГТГАТА —  $\epsilon_{260} = 10500$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>; для АТАГГГААСССАСТАТ —  $\epsilon_{260} = 11558,8$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>; для ТАТСАССГС —  $\epsilon_{260} = 10066,7$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>; для АТАГТГГССГ —  $\epsilon_{260} = 11533,3$  М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Эти значения использовали для определения концентраций (М) исследуемых фрагментов нуклеотидов.

Дуплексы получали сливанием растворов отдельных комплементарных нитей в эквимольных концентрациях. В экспериментах использовали достаточно высокие концентрации дуплексов олигонуклеотидов  $4-6 \cdot 10^{-4}$  М нуклеотидных остатков. Образцы в водных растворах предварительно нагревали до 80—90 °С и оставляли на ночь при комнатной температуре.

Кривые плавления дуплексов регистрировали на спектрофотометре фирмы «Beckman» (США) при непрерывном нагреве со скоростью 0,5 град/мин.

В—А-переход изучали в водно-трифторэтанольных растворах при температуре —20 °С, чтобы избежать тепловой денатурации дуплексов. А-форму получали следующим образом: сначала смешивали водные компоненты — олигонуклеотид, NaCl, ЭДТА (конечные концентрации см. в подписях к рисункам), смесь нагревали до 80—90 °С и медленно охлаждали до комнатной температуры, затем добавляли трифторэтанол (ТФЭ) до концентрации 85 % (объемные проценты) и охлаждали кювету с раствором в криостате дихрографа до —20 °С.

Спектры КД измеряли на дихрографе MarkIII фирмы «Jobin Ivon» (Франция) в криостате той же фирмы, в кювете с длиной оптического пути 0,1 см. Значения  $\Delta\epsilon$  рассчитывали на моль нуклеотидов.

**Результаты и обсуждение.** Исследовали два синтетических дезоксиолигонуклеотида: операторный участок О<sub>д3</sub> длиной 17 пар оснований



и его фрагмент из 9 пар



С помощью тепловой денатурации были выяснены условия стабильности дуплексов.

Кривые плавления дуплексов длиной 17 и 9 пар оснований, полученные в одинаковых условиях в 0,1 М растворе NaCl, существенно различаются (рис. 1). Температура плавления ( $T_{пл}$ ) дуплекса длиной 17 пар оснований равна 60 °С, а дуплекса длиной 9 пар оснований — только 40 °С. Это различие в  $T_{пл}$  на 20 °С связано с длиной олигонуклеотидов, поскольку стабильность двойной спирали падает с уменьше-

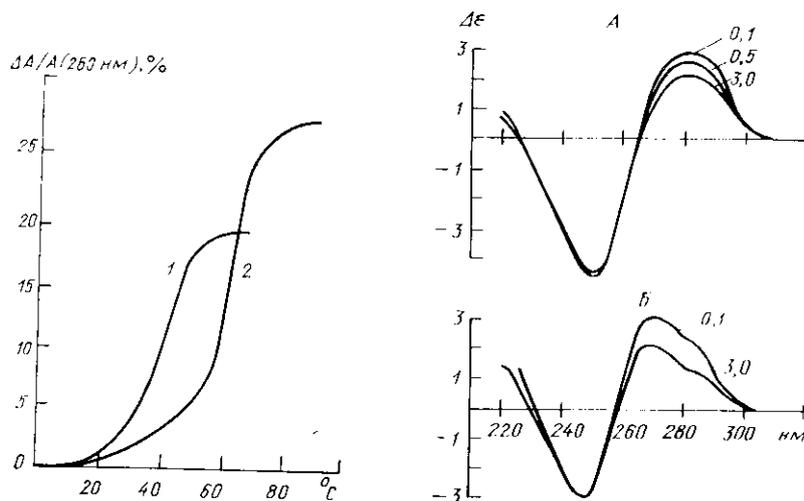


Рис. 1. Кривые плавления дуплексов длиной 9 пар оснований (1) и 17 пар оснований (2) в 0,1 М NaCl.

Fig. 1. Melting curves for the 9 base pairs duplexes (1) and the 17 base pairs duplexes (2) in 0.1 M NaCl.

Рис. 2. КД-спектры дуплексов длиной 9 пар оснований (А) и 17 пар оснований (Б) в водных растворах при разных концентрациях NaCl (М).

Fig. 2. CD spectra for the 9 base pairs duplexes (A) and the 17 base pairs duplexes (B) in aqueous solution at different NaCl concentrations (M).

нием ее длины, когда полимер много короче длины кооперативности перехода спираль—клубок [6]. Характерной особенностью кривых плавления коротких дуплексов является отсутствие верхнего плато.

Из кривых плавления следует, что олигонуклеотиды в 0,1 М NaCl при температуре ниже 8 °С находятся в двуяжевом состоянии. Все эксперименты в водных растворах проводили при температуре 1 °С.

Спектры КД дуплексов длиной 17 и 9 пар оснований в 0,1 М NaCl имеют формы и амплитуды полос, близкие таковым В-формы ДНК (рис. 2). С ростом концентрации NaCl амплитуда положительной полосы уменьшается, а отрицательной — в области 250 нм — остается постоянной. Аналогичные изменения КД под действием соли наблюдаются для длинной ДНК, что ранее интерпретировали как структурный переход в пределах В-семейства [1]. На основании сопоставления спектров КД можно утверждать, что оба дуплекса в 0,1 М NaCl имеют В-подобную конформацию, а с ростом концентрации соли происходит непрерывный переход в сторону более закрученной С-формы. Таким образом, поведение коротких фрагментов в пределах В-семейства по спектрам КД не отличается от длинной ДНК.

А-форму ДНК обычно получают при низкой ионной силе ( $2-5 \cdot 10^{-4}$  М NaCl) в растворах вода — неэлектролит, когда происходит частичное обезвоживание молекул [7]. В условиях образования А-формы на коротких фрагментах необходимо контролировать двуяжевое состояние молекул. Стабильность двойной спирали олигонуклеотидов в 85 %-ном растворе ТФЭ при низкой ионной силе значительно падает,  $T_{пл}$  оказывается близкой 0 °С. Чтобы избежать денатурации, понижали температуру образца до -20 °С. Кроме того, использовали

более высокие концентрации ионов Na ( $2 \cdot 10^{-3}$  М), чем для природной ДНК.

В этих условиях спектры КД дуплексов длиной 17 и 9 пар оснований в 85 %-ном растворе ТФЭ аналогичны спектрам А-формы ДНК и синтетических полинуклеотидов (рис. 3).

Четко выражены характерные для А-формы положения и амплитуды полос: большая интенсивность положительной полосы при 268 нм и небольшая отрицательная полоса в области 240 нм. Значение амплитуды в максимуме для дуплекса длиной 17 пар ( $\Delta\epsilon_{268}=9,6$ ) также

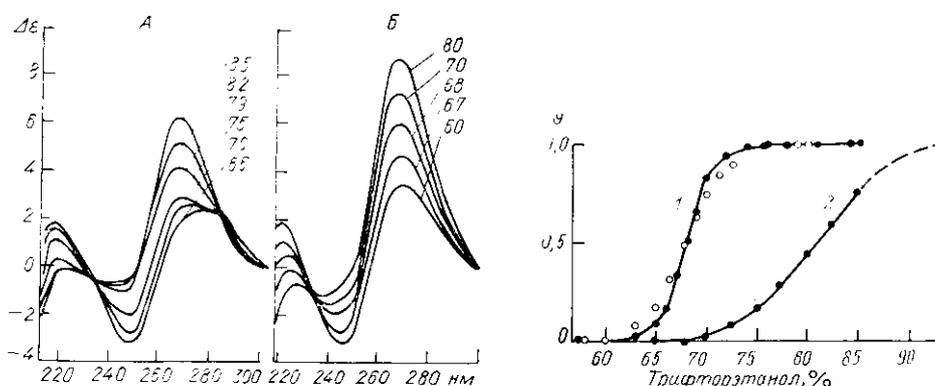


Рис. 3. КД-спектры дуплексов длиной 9 пар оснований (А) и 17 пар оснований (Б) в области В — А-перехода. Условия:  $2 \cdot 10^{-3}$  М NaCl,  $2 \cdot 10^{-4}$  М ЭДТА,  $-20^\circ\text{C}$ . Цифры на кривых указывают процентное содержание ТФЭ.

Fig. 3. CD spectra for the 9 base pairs duplexes (A) and the 17 base pairs duplexes (B) in the region of the B-A transition. Conditions:  $2 \cdot 10^{-3}$  М NaCl,  $2 \cdot 10^{-4}$  М EDTA,  $-20^\circ\text{C}$ . The curves are labelled with TFE concentration.

Рис. 4. Кривые В — А-перехода: 1 — дуплекса длиной 17 пар оснований и ДНК из тимуса теленка (кружки); 2 — дуплекса длиной 9 пар оснований.  $\theta$  — доля звеньев в А-форме.

Fig. 4. B-A transition curves: 1 — for the 17 base pairs duplexes and calf thymus DNA (open circles); 2 — for the 9 base pairs duplexes.  $\theta$  — the A form fraction.

совпадает со значением для длинной ДНК ( $\Delta\epsilon_{270}=10$ ). Для дуплекса 9 пар амплитуда положительной полосы не достигает такой величины. Сходство всех деталей спектра свидетельствует о способности коротких фрагментов в определенных условиях переходить в А-форму.

При добавлении в кювету с образцом в 85 %-ный раствор ТФЭ рассчитанных количеств воды спектры КД принимают вид, характерный для В-формы каждого дуплекса (для сравнения см. В-форму в 0,1 М NaCl, рис. 2). Семейства кривых КД А—В-перехода, как это видно из рис. 3, имеют четкие изодихроичные точки, подтверждающие существование в образце только двух типов спирали: А и В. Переход из А- в В-форму считали завершенным, когда амплитуды положительной и отрицательной полос достигали насыщения и не изменялись при дальнейшем уменьшении содержания ТФЭ.

Кривые В — А-переходов в исследуемых дуплексах (рис. 4) получены путем вычисления доли А-формы при каждом процентном содержании ТФЭ по изменению амплитуды положительной полосы в области 268 нм  $(\Delta\epsilon_{\text{А-фор}} - \Delta\epsilon_i) / (\Delta\epsilon_{\text{А-фор}} - \Delta\epsilon_{\text{В-фор}})$ . Переход в А-форму дуплекса длиной 9 пар оснований (кривая 2) при максимально возможном содержании ТФЭ в образце (85 %) оказался незавершенным, поэтому мы экстраполировали кривую перехода до значения амплитуды  $\Delta\epsilon$  А-формы дуплекса длиной 17 пар оснований.

Формы кривых 1 и 2 свидетельствуют о кооперативном характере перехода, однако по своим параметрам переходы значительно отличаются друг от друга. Так, точка В — А-полуперехода более длинного (17 пар оснований) дуплекса соответствует 68 %, а короткого (9 пар) — 81 % ТФЭ; ширина В — А-перехода первого составляет 6 %, а второ-

го — 17 % ТФЭ. Неожиданным и интересным является обнаруженный нами факт практически полного совпадения кривых В—А-перехода дуплекса длиной 17 пар оснований и длинной ДНК (рис. 4, кривая 1, кружочки). Это означает, что олигонуклеотид, имеющий длину, близкую длине кооперативности В—А-перехода (10—20 пар) [2, 3], переходит в А-форму, как и длинная ДНК, в том же интервале концентраций ТФЭ. С другой стороны, короткий олигонуклеотид из 9 пар оснований переходит в А-форму при значительно больших концентрациях ТФЭ, т. е. переход по сравнению с дуплексом длиной 17 пар затруднен.

Как можно объяснить наблюдаемое различие В—А-переходов дуплексов длиной 17 и 9 пар оснований? Мы обнаружили корреляцию между длиной олигонуклеотида и его способностью к В—А-переходу: чем короче олигонуклеотид, тем сильнее затруднен переход в А-форму. В коротких олигонуклеотидах относительная концентрация концевых пар больше, чем в длинных. Эти пары на концах дуплекса, возможно, более гидратированы, чем в середине, и стабилизируют В-конформацию. Отметим, что для дуплексов длиной 10 пар оснований кривые В—А-перехода расположены между кривой дуплекса длиной 17 пар и дуплекса 9 пар. Это явление стабилизации В-формы концевыми парами мы назвали эффектом В-фильности концов.

Энергетический вклад концов спирали в В—А-переход. В—А-переход короткого фрагмента затруднен необходимостью затраты дополнительной энергии  $F_S$  двух концов, которые, как мы установили, стабилизируют В-форму ДНК. Условие равновесия имеет вид:

$$n(F_A - F_B) = F_S, \quad (1)$$

где  $n$  — число звеньев цепи;  $F_A$  и  $F_B$  — свободные энергии А- и В-форм длинной ДНК в расчете на одно звено [8]. Пользуясь этим, можно подсчитать энергетический вклад концевых пар.

Предположим, что сохранение только первого ненулевого члена при разложении  $F_A - F_B$  в ряд в окрестности точки полуперехода  $a_\infty = 68\%$  (для длинной ДНК) является достаточно хорошим приближением вплоть до точки полуперехода  $a_9 = 81\%$  для дуплекса длиной 9 пар. Тогда можно подсчитать  $F_A - F_B$  для концентраций ТФЭ, соответствующих В—А-переходу в этом образце

$$F_A - F_B = \frac{RT}{Q} (a_\infty - a_9). \quad (2)$$

В этой формуле параметр  $Q$  ( $\approx 20\%$  ТФЭ) берется из данных по длинной ДНК [3] и определяется следующим образом:

$$Q = \frac{\Delta a v_0}{4}, \quad (3)$$

где  $\Delta a$  — ширина перехода;  $v_0$  — длина кооперативности;  $\Delta a = 6\%$  для тимусной ДНК;  $v_0 \approx 10^1$  определена ранее скрепочным методом и при изучении тройного равновесия (А, В, клубок) в ДНК [2, 3]. Так как  $F_S = n(F_A - F_B)$ , получаем при  $n = 9$ ,  $F_S = 3,5$  ккал/моль.

Короткие фрагменты по своим конформационным свойствам способны к тем же переходам, что и длинная ДНК. В водных растворах NaCl олигонуклеотиды находятся в пределах В-семейства. В 85 %-ном растворе ТФЭ фрагменты, подобно длинной ДНК, принимают А-конформацию. Отличие коротких фрагментов проявляется при В—А-переходе, когда длина фрагмента меньше длины кооперативности перехода. Переход в А-форму короткого дуплекса (9 пар оснований) затруднен по сравнению с дуплексом длиной 17 пар оснований.

Полученные результаты служат необходимой предпосылкой изучения конформационных изменений при образовании комплекса между данными фрагментами ДНК и *cro*-репрессором. Следующая статья посвящена этому вопросу.

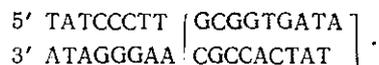
CONFORMATION OF THE  $O_{R3}$  OPERATOR OF PHAGE  $\lambda$  AND ITS FRAGMENT  
IN AQUEOUS AND AQUEOUS-TRIFLUOROETHANOL SOLUTIONS

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  $\lambda$ , 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  $\sim 1.7$  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 deoxyoligonucleotides // *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