

Геном эукариотот: на пути прочтения от альфы до омеги

Рецензия на книгу Т. Ю. Колотовой, Б. Т. Стегния, И. Ю. Кучмы
Н. В. Дубининой, А. Н. Головки, Ю. Б. Чайковского и Ю. Л. Волянского
«Механизмы и контроль перестроек генома эукариот»
(Харьков: «Коллегиум», 2004.—263 с.)

В 1984 году особенное внимание отечественных генетиков привлекли две публикации. Одна из них специально написана для журнала «Science» Барбарой МакКлинтон на основе ее Нобелевской речи, посвященной открытию мобильных элементов генома [1]. Во второй — всеобъемлющей монографии московского профессора Р. В. Хесина суммированы многочисленные накопленные к тому времени результаты изучения мобильных элементов, объединенные понятием «Непостоянство генома» [2]. Эти публикации — яркая веха на пути развития генетики, сменившая парадигму исследований от понимания генома как некоей статичной структуры, состоящей из совокупности отдельных генов, изучаемых первоначально по отдельности (стартовая концепция: один ген—один фермент), до восприятия пластичности в организации генома, меняющегося по каким-то законам в зависимости от потребностей клетки и условий ее функционирования. Оказалось, что динамические свойства генома определяют важные биологические функции. Они охватывают и необходимость поддержания гомеостаза клетки за счет возможности развития различных приспособительных реакций, и возникновение генетических заболеваний, включая свои в контроле над поведением генома, например, при раке, и процессы видообразования и эволюции видов.

Спустя 20 лет, в разгар постгеномной эры, оперирующей α -буквой генома, или знанием полного генетического текста многих организмов, в Харькове выходит в свет рецензируемая книга. Это — коллективный труд специалистов, своевре-

менно поставивших цель обобщить и проанализировать результаты, накопленные на пути изучения букв алфавита, с помощью которого написан геном как Книга Жизни.

В качестве уже последующей β -буквы геномного алфавита читатель и может воспринимать проанализированную авторами способность генома к перестройкам своей, казалось бы, первозданно канонической структуры. Как, когда и почему эти перестройки происходят и каковы их биологические последствия, а также существует ли некий перестроечный код и каковы его элементы? Изучение возможности ответить на эти вопросы и составило цель представляемой книги.

Поскольку изменение локализации мобильных элементов в геноме, как выяснилось, вело к расширению разнообразия фенотипов при неизменном геномном составе, стало ясно, что увеличение кодирующей емкости геномов возможно не только на основе увеличения размеров кодирующих последовательностей, но и за счет пространственной комбинаторики элементов генома. Под пристальное внимание попадают помимо мобильных элементов различные *цис*- и *транс*-факторы сайт-специфических процессов геномного уровня, механизмов активации этих факторов, способов их комплексообразования, способов рекрутирования соответствующих факторов к местам локальных перестроек в геноме, способов сайленсинга или того, как сделать эти факторы молчащими. Отсюда ясно, что способность генома к перестройкам должна быть запрограммированной. То, что это действительно так, раскрывает первая глава книги, призванная показать, что иммунный ответ клетки на каждый из

бесконечного числа антигенов — это результат активации лишь определенных *цис-транс*-элементов в свое время и в своем месте. Гипермутационный процесс, сопровождающий локальные перестройки на основе этих элементов, усиливает разнообразие продуктов на выходе перестроек, определяя тем самым возможность отбора наиболее подходящей макромолекулы для данного иммунного ответа.

Другим примером обеспечения большого разнообразия фенотипов и возможности выбора наиболее приспособленного из них к данным условиям является мейотическая рекомбинация. Ей посвящена вторая глава книги. Использование такого объекта, как дрожжи, позволило выявить, что мейотическая рекомбинация является, по сути, реакцией генома на стресс, преодоление которого связывается с возможностью возникновения таких геномных реорганизаций, которые определяют наиболее оптимальный для данных условий фенотип. Описаны закономерности и суммированы данные изучения этого процесса у самых различных организмов.

Однако запрограммированные геномные перестройки — это формат работы генома не только на разнообразие, но и на контроль эффективности использования соответствующего генетического материала. Среди 10 миллионов видов нашей экосистемы есть простейшие организмы, сплошь покрытые волосными образованиями. Они так и называются — реснитчатые. Интересно устроен их геном, представленный макро- и микроядрами. Связано это с тем, что для продления рода они используют два пути: бесполое и половое размножения. Ясно, что при бесполом размножении макроядру, как бы выполняющему роль соматического ядра, не нужны детерминанты пола, и геном реорганизуется так, что все, что не нужно для жизнедеятельности данного организма, из генома выбрасывается. Это происходит по строгим правилам. В книге показано, что данная модель предоставляет уникальные возможности изучения закономерностей и механизмов, осуществляющих процесс, с помощью которого происходит диминуция хроматина.

Как же геном узнает, когда ему надо перестраиваться? В своей Нобелевской речи Б. МакКлинток отметила: «мы ничего не знаем, однако, о том, как клетка чувствует опасность и способствует формированию нужного ответа».

По прошествии 20 лет авторы рецензируемой книги суммировали данные, показывающие, что именно эпигенетические модификации делают ге-

ном чувствительным органом поломок, возникающих в клетке. Эту сформировавшуюся в последнее время обширную область эпигенетических исследований, подробно описанную в книге, можно рассматривать как следующую, согласно принятому клише, γ -букву геномного алфавита. В книге наряду с описанием биологической роли охарактеризована природа этих модификаций как на уровне ДНК, так и на уровне гистонов (гистоновый код), механизмы их возникновения и стирания, а также приведены факты эпигенетического наследования.

Итак, запрограммированные перестройки генома — доказанный факт. Может ли геном вовлекаться в незапрограммированные процессы перестроек? Как показано в книге — может. Во-первых, запрограммированные события с какой-то долей вероятности могут пойти не по первоначально утвержденному сценарию и привести к неожиданному результату. Во-вторых, оказалось, что геном устроен так, что при отклонениях, вызванных какими-то непредвиденными стрессовыми условиями, он реализует механизмы своей пластичности, позволяющие клетке эффективно уклоняться от удара. В специальной главе книги показано, что механизмы этой пластичности основаны на тех же принципах, что и запрограммированные перестройки. (Удивительно, но такое поведение генома напоминает поведение всего организма, развивающего общий адаптационный синдром Селье на основе перестройки работы элементов различных систем организма.) Материал, рассмотренный в книге, поднимает также вопрос о возможности перестроек генома в случае такого процесса, как регенерация печени млекопитающих.

В целом книга охватывает большой экспериментальный материал, выполненный с привлечением различных объектов: дрожжи, дрозофила, растения, реснитчатые, млекопитающие. При компактном изложении подразумевается, что читатель (пусть даже и студент) знаком с основными навыками работы с подобными объектами. В противном же случае отсутствие в книге ряда детализаций (например, почему и как антитела делятся на классы) затрудняет, на наш взгляд, ее восприятие. Такой же эффект вызывает отсутствие в книге списка и расшифровки используемых сокращений как фактически второго языка книги. Более того, имеются технические погрешности: в пределах страницы (22, 23) — ремоделирование и ремоделирование хроматина; *in vitro*, *in vivo* — по-латыни,

ин цис, ин транс — по-русски; вначале используется термин (например, хоминг), ниже в тексте дается его объяснение; вольная передача произношения — белки группы *Polysom b* — это поликаум, а не поликомб, как в тексте (также хоуминг, фэйзинг сайленсинг и т. п.). Иллюстрации книги совершенны, но подписи к ним, к сожалению, — не всегда (не догадаться, что такое Р-нуклеотиды, рис. VIII). Кроме того, индексация материала такого серьезного труда значительно повысила бы КПД его усвоения. Однако все это не отражается на качестве книги.

Рецензируемая работа представляет большой интерес не только в связи с анализом материала, раскрывающего принципы генетической пластичности, но и возможностью постановки новых вопросов, вероятно, важных при изучении новой буквы геномного алфавита. Это, по нашему мнению, касается изучения процесса мутагенеза, сопровождающего геномные перестройки. Описанные свойства «мутагеназ», транслизионных и терминальных полимераз, очевидно, не исчерпывают потенции клетки. Возникает вопрос о способности оснований ДНК к таутомерным переходам как источнике точечных мутаций. В условиях локальности синтеза, отсутствия масштабности редактирования и стрессового статуса клетки такой источник мутаций может стать биологически заметным.

Более того, не исключено, что подключение данных перестроечных процессов у прокариотов может стать импульсом по-новому взглянуть на проблему и подойти к изучению следующей буквы геномного алфавита у эукариотов. У прокариотов распространено явление белкового сплайсинга. С одной стороны, интенины как факторы, обладающие свойством хоуминга в геноме, возможно, являются элементом перестроечного кода генома. С другой стороны, если интенины окажутся теми белками, которые защищают мишени от связывания с антибиотиками [3], то может открыться еще один путь для изучения связи между сенсорным аппаратом клетки и индукцией геномных перестроек, вероятно, в своем специфическом для эукариотов виде.

Несомненно, что публикация данной книги относится к классу заметных событий в отечественной генетике и является важной для многих специалистов и студентов.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *McClintock B.* The Significance of responses of the genome to challenge // *Science*.—1984.—226.—Р. 792—801
2. *Хесин Р. Б.* Непостоянство генома.—М.: Наука, 1984.—472 с.
3. *Сидоренко С. В., Тишков В. И.* Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // *Успехи биол. химии*.—2004.—44.—С. 263—306.

Е. И. Черепенко,
Д. Н. Говорун
Институт молекулярной
биологии и генетики
НАН Украины

Неэмпирическое квантово-химическое исследование различных структурных форм алкалоида берберина

В. И. Данилов, В. У. Дайлидонис¹, Д. Н. Говорун, Л. А. Заика, Н. Курита², А. И. Потопальский, В. М. Харченко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Институт теоретической физики им. Н. Н. Боголюбова НАН Украины
Ул. Метрологическая, 14-б, Киев, 03143, Украина

² Технологический университет Тохеши, 441-8580, Япония

vid@ipnet.kiev.ua

Представлены результаты неэмпирического квантово-химического исследования энергетических и структурных свойств всех возможных форм алкалоида берберина (катиона и трех таутомеров), обладающих большим разнообразием биологической и фармакологической активности. Катион берберина изучен методом DFT с обменно-корреляционными (комбинированными) (PW91, BLYP PBE/PW91) и гибридными (B3LYP, B3PW91) функционалами, а также более современным методом MP2, учитывающим коррекцию электронов. Молекулярные орбитали представлены атомными базисными системами 6-31G(d, p) и 6-311G(d, p). Аммониевая, карбинольная (псевдооснование) и аминокальдегидная формы рассчитаны методом DFT на уровне теории B3LYP/6-31G(d, p). Обнаружено, что полная оптимизация геометрии независимо от уровня используемой теории приводит к неплоской пропеллер-закрученной и изогнутой пространственной структуре всех форм берберина. Вычисленные значения длин и углов связей находятся в хорошем согласии с экспериментальными рентгеноструктурными данными. Выяснено, что в газовой фазе карбинольная форма является наиболее предпочтительным таутомером, тогда как аминокальдегидная — менее стабильна (на 12,65 ккал/моль). Самым нестабильным таутомером оказалась аммониевая форма — она на 10,65 ккал/моль менее выгодна, чем аминокальдегидный таутомер.

Ключевые слова: берберин, таутомерия, квантово-химические расчеты методами DFT и MP2, пространственная структура

Введение. Алкалоид берберин (катион и три таутомера) обладает большим разнообразием биологической и фармакологической активности. Природный аналог берберина содержится, в основном, в растениях, из которых его выделяют в виде солей гидрохлорида или сульфата. Берберин — изохинолиновый алкалоид, существующий в водном растворе в виде четвертичного аммониевого катиона

или четвертичного аммониевого основания (согласно номенклатуре IUPAC, 9,10-диметокси-5,6-дигидро[1,3]диоксола[4,5-g]изохино[3,2-a]изохинолин-7-илий). Он представляет собой тетразамещенный алкалоид с метилendioксигруппами в положениях C2 и C3 и двумя метоксигруппами в положениях C9 и C10 (рис. 1).

Структурная формула алкалоида берберина, представленная в большинстве статей и монографий, соответствует в действительности катиону $[C_{20}H_{18}NO_4]^+$.

© В. И. ДАНИЛОВ, В. У. ДАЙЛИДОНИС, Д. Н. ГОВОРУН, Л. А. ЗАИКА, Н. КУРИТА, А. И. ПОТОПАЛЬСКИЙ, В. М. ХАРЧЕНКО, 2007

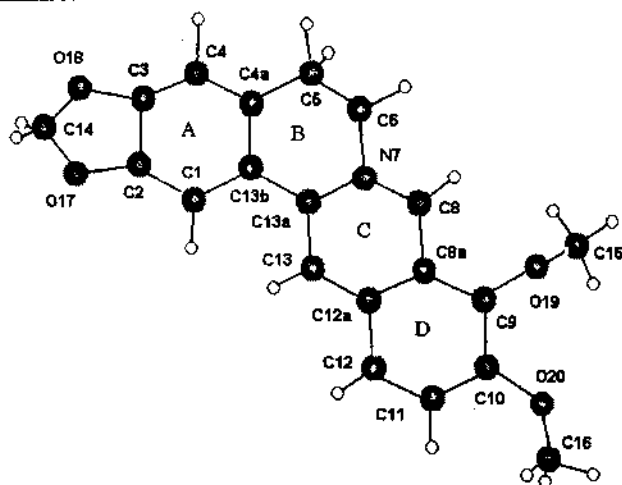


Рис. 1. Структурная формула катиона берберина с нумерацией тяжелых атомов и обозначением конденсированных колец

Берберин проявляет биологическую активность по отношению к большому количеству разнообразных микроорганизмов, включая бактерии, грибки, простейшие и хламидии [1, 2]. Противоопухолевая активность берберина, как считают, определяется его способностью интеркалировать в ДНК, избирательно связываясь с АТ-богатыми ее областями. Как и для других интеркалирующих агентов, такое комплексобразование обусловлено его плоской сопряженной структурой — свойством, облегчающим интеркаляцию и последующий стекинг с соседними парами оснований. Связывание берберина раскручивает двойную спираль ДНК на 11° [3], что согласуется с интеркаляционным способом взаимодействия. Кроме того, результаты компьютерного моделирования комплексов протоберберин—ДНК свидетельствуют о том, что в спираль ДНК интеркалируют только кольца С и D, в то время как кольца А и В находятся за пределами внутренней части спирали, в малом желобке [3].

Одной из наиболее важных молекулярных мишеней для противоопухолевых препаратов является ДНК-топоизомераза, образующая ковалентную связь с обоими тяжами спиральной ДНК, разрывая и высвобождая ее сахаро-фосфатные связи. Берберин принадлежит к структурному классу органических катионов, способных ингибировать ДНК-топоизомеразу, индуцируя диссоциацию комплекса этого фермента с ДНК (так называемое отравление топоизомеразы). Отравляющий эффект топоизомеразы протобербериновыми алкалоидами связывают с противоопухолевой активностью [3].

Берберин-содержащие продукты являются эф-

фективными противоинфекционными агентами широкого спектра действия, для которых мишенью служит малый желобок ДНК. Они составляют перспективную группу соединений для так называемой низкомолекулярной антигенной терапии (SMAT), которая находит все более широкое применение и, в частности, интенсивно поддерживается Агентством обороны США по передовым исследовательским проектам.

В присутствии гидроксильных ионов четвертичные протобербериновые катионы могут существовать в трех таутомерных формах [4]: аммониевой, карбинольной и открытой аминоальдегидной. В щелочном растворе катион берберина превращается в карбинольную форму — свободное основание, называемое псевдооснованием. Иначе говоря, в присутствии аниона OH^- четвертичные протобербериновые катионы алкалоидов превращаются в 8-гидроксипроизводные. Свободные основания являются нестабильными 8-гидроксиаддуктами, их изучают с помощью ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии [7]. Структура свободных оснований подтверждена также масс-спектрометрией. В работе [5] предполагается, что 8-гидроксиаддукт и гидроксид четвертичного алкалоида берберина сосуществуют в растворе.

Стандартные физико-химические методы не позволяют зафиксировать наличие аминоальдегидной формы [6]. Поэтому большинство исследователей полагают, что альдегидная форма в щелочной среде отсутствует. В то же время многие химические реакции указывают на ее наличие в щелочной среде: очевидно, что альдегидная форма существует в этих условиях в незначительных концентрациях.

Для изучения берберина использованы разные экспериментальные подходы [1]. Наибольший прогресс достигнут в исследовании свойств катиона берберина, при этом его физико-химические свойства, в частности, электронная структура остались неизученными, что может быть важным для процессов его комплексобразования с различными биомолекулами. Совсем недавно появилось первое квантово-химическое исследование катиона берберина [7]. В нем представлены значения длин и углов связей, полученные на уровне теорий HF/6-31G**, HF/6-311G** и V3LYP/6-311G**.

В то же время структурная информация для таутомерных форм берберина в настоящее время отсутствует. Наконец, до настоящего времени так и не выяснено, в какой степени трансформируется

структура берберина при переходе в конденсированную фазу. Таким образом, теоретические исследования в газовой фазе необходимы не только для получения энергетических и структурных характеристик таутомерных форм берберина, но и количественного определения его комплексобразующей способности.

Нами впервые выполнено экстенсивное квантово-химическое изучение энергетических и структурных свойств катиона берберина для выяснения возможных молекулярных механизмов его биологического действия, некоторых физико-химических свойств, а также зависимости полученных результатов от использованного метода и базиса.

Материалы и методы. В этой работе применен метод дискретного преобразования Фурье (DFT) с обменно-корреляционными (комбинированными) (PW91, BLYP PBEPW91) и гибридными (B3LYP и V3PW91) функционалами. Кроме того, расчет пространственной структуры катиона берберина выполнен более совершенным методом MP2, учитывающим коррекцию электронов, в приближении замороженного остова. Геометрию оптимизировали с использованием стандартных базисных наборов 6-31G(d, p) и 6-311G(d, p). Гидроксид берберина может существовать в растворе как равновесная смесь трех таутомерных форм — аммониевой, карбинольной и аминокальдегидной, они изучены методом DFT с функционалом B3LYP/6-31G(d, p).

Расчеты методом DFT проведены с применением функционала PW91/6-311G(d, p) и пакета CA-Che 5.04. Для расчетов с функционалами BLYP/6-311G(d, p), B3LYP/6-311G(d, p), PBEPW91/6-311G(d, p) и V3PW91/6-311G(d, p) использован пакет PC GAMESS (версия 7.0 квантово-химического пакета GAMESS (US)) [8, 9].

Ниже представлены основные результаты наших расчетов методами MP2/6-31G(d, p) и DFT/V3PW91/6-311G(d, p), оказавшиеся наиболее согласующимися между собой и близкими с экспериментальными данными.

Результаты и обсуждение. В таблице суммированы значения длин связей, угла propeller twist (PT) и дипольного момента (D) для катиона берберина, вычисленные методами MP2/6-31G(d, p) и DFT/V3PW91/6-311G(d, p).

Там же приведены их экспериментальные значения для дигидрата бромиды [10], азида и тиоцианата берберина [11], полученные рентгеноструктурным методом.

Следует отметить, что экспериментальные данные для некоторых связей в указанных производных берберина [10—12] отличаются в диапазоне от 0,001 до 0,029 Å.

Сравнение теоретических и экспериментальных значений длин и углов связей (последние в таблице не приведены из-за их отсутствия в [10—12]) показывает хорошее согласие между ними. Из работ [10, 11] следует, что самая короткая длина в солях берберина наблюдается для иминной связи N7-C8 в кольце С, а наиболее длинными являются связи C4-C5 (sp^2-sp^3) и C5-C6 (sp^3-sp^3). Аналогичный вывод позволяют сделать наши теоретические данные (таблица). Согласно экспериментальным данным, конформации катионов всех солей берберина очень подобны между собой. Прежде всего, четвертичные катионы берберина состоят из плоских шестичленных колец. Отклонение от планарности наблюдается только в частично насыщенном кольце В. Оно принимает конформацию изогнутого полукресла, в которой атомы C5 и C6 значительно отклонены от плоскости ароматических колец А и С. Во всех соединениях диоксолановое кольцо C2-O17-C14-O18-C3 незначительно отличается от плоской структуры. В бербериновом катионе две метоксигруппы ориентированы в противоположные стороны относительно друг друга, скорее всего, из-за стерической затрудненности. Метоксигруппа в положении C10 (O20-C16) лежит почти в плоскости кольца D, а метоксигруппа в положении C9 — почти перпендикулярно к нему. По данным расчетов, независимо от теоретического метода четвертичный катион является относительно плоской структурой. В целом теоретические результаты, полученные методами MP2 и V3PW91 (рис. 2), находятся в хорошем согласии с имеющимися экспериментальными данными.

Следует отметить, что в молекуле берберина два ароматических фрагмента (кольцо А и конденсированные кольца С и D) различимы. Согласно экспериментальным данным [10, 11], угол между плоскостями этих двух фрагментов лежит в интервале $10^\circ+16^\circ$. В то же время, по результатам, полученным методами MP2/6-31G(d, p) и DFT/V3PW91/6-311G(d, p), величина этого угла составляет 24° и 21° соответственно. Как видно, теоретически вычисленное значение угла заметно отличается от экспериментального. Это позволяет сделать вывод о том, что при переходе из газовой фазы в кристалл молекула берберина уплощается. Во всех

Значения длин связей (Å) катиона берберина, вычисленные двумя методами, и их экспериментальные величины [10, 11] для производных берберина

Связь	Расчет методом		Эксперимент [10, 11]		
	MP2	DFT/B3PW91	Дигидрат брома берберина	Азид берберина	Тиоцианат берберина
C1-C2	1,379	1,369	1,358	—	—
C1-C13b	1,414	1,416	1,409	—	—
C2-C3	1,399	1,396	1,359	—	—
C2-O17	1,366	1,355	1,376	1,380	1,366
C3-C4	1,382	1,376	1,373	—	—
C3-O18	1,364	1,347	1,370	1,379	1,366
C4-C4a	1,403	1,400	1,397	—	—
C4a-C5	1,505	1,505	1,506	1,504	1,506
C4a-C13b	1,410	1,404	1,390	1,400	1,402
C5-C6	1,516	1,515	1,499	1,509	1,500
C6-N7	1,484	1,479	1,485	1,492	1,484
N7-C8	1,339	1,332	1,320	1,334	1,332
N7-C13a	1,388	1,389	1,393	1,391	1,390
C8-C8a	1,400	1,393	1,395	1,398	1,400
C8a-C9	1,416	1,423	1,417	—	—
C8a-C12a	1,436	1,430	1,424	1,423	1,410
C9-C10	1,404	1,397	1,375	—	—
C9-O19	1,360	1,342	1,358	1,376	1,364
C10-C11	1,419	1,414	1,408	—	—
C10-O20	1,349	1,346	1,349	1,358	1,350
C11-C12	1,381	1,375	1,358	—	—
C12-C12a	1,411	1,430	1,400	—	—
C12a-C13	1,404	1,406	1,398	1,404	1,406
C13-C13a	1,387	1,377	1,368	—	—
C13a-C13b	1,463	1,463	1,470	1,464	1,469
C14-O17	1,440	1,430	1,409	1,433	1,433
C14-O18	1,441	1,434	1,439	1,442	1,430
C15-O19	1,449	1,438	1,414	1,443	1,427
C16-O20	1,438	1,425	1,435	1,431	1,436
PT, °	24	21	—	10—15	—
Дипольный момент, Д	3,917	3,740	—	—	—

экспериментально изученных структурах катионы упакованы в centrosymmetric пары, которые, в свою очередь, образуют столбцы, параллельные одной кристаллографической оси. Пространство между столбцами занято анионами и молекулами воды, что свидетельствует о наличии в кристаллах водородных связей.

Таким образом, в кристаллах действуют значительные силы, оказывающие заметное влияние на пространственную структуру берберина и при-

водящие к компактной пространственной укладке молекул.

Из вышеизложенного следует, что пространственная структура катиона берберина, полученная в результате его квантово-химического изучения, свидетельствует, скорее всего, об интеркаляции в спираль ДНК колец C и D. Это находится в согласии с результатами компьютерного моделирования комплексов протоберберин—ДНК (см. «Введение»).

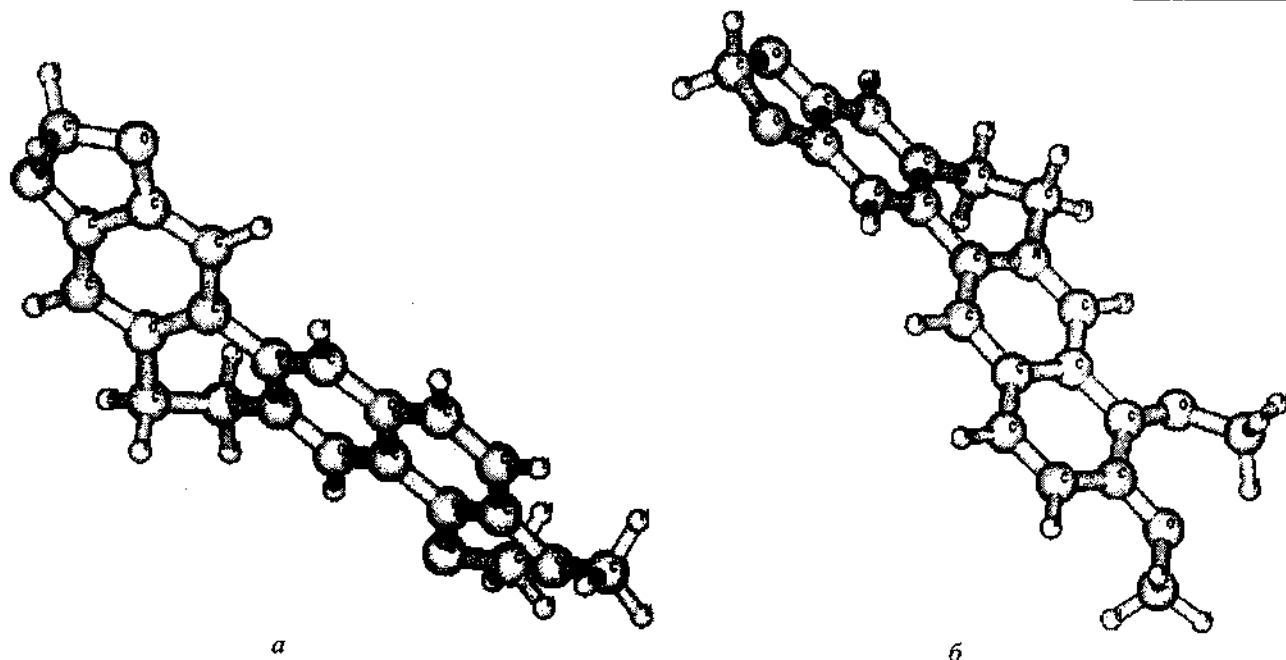


Рис. 2. Пространственные структуры катиона берберина, оптимизированные методами MP2/6-31G(d, p) (a) и V3PW91/6-31G(d, p) (б)

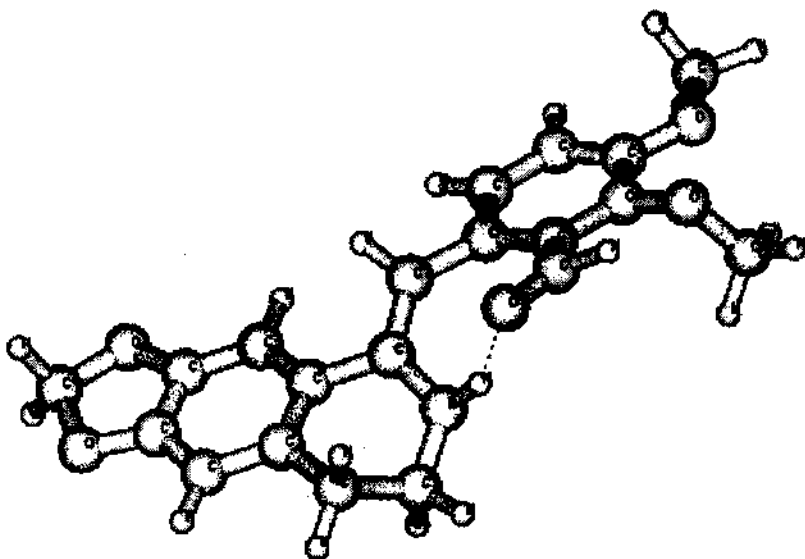


Рис. 3. Пространственная структура карбинольной формы берберина (псевдооснования), оптимизированная методом V3LYP/6-31G(d, p) (пунктиром обозначена внутримолекулярная водородная связь)

Результаты расчетов трех таутомерных форм, выполненных методом DFT/V3LYP/6-31G(d, p), показали, что в газовой фазе энергетически наиболее выгодным таутомером является карбинольная (нейонная, прототропная) форма — так называемое псевдооснование (рис. 3). Из данных рис. 3 следует, что между группой N-H и карбонильным атомом кислорода образуется внутримолекулярная водородная связь. Псевдооснование имеет дипольный момент 3,183 Д.

Следующей по стабильности является аминокальдегидная форма (рис. 4, a). Этот таутомер на 12,65 ккал/моль энергетически менее выгодный. Его дипольный момент составляет 1,915 Д. Поэтому в растворе эта форма будет стабилизироваться в меньшей степени, чем карбинольная.

Наименее выгодным таутомером является аммониевая (ионная, ионотропная) форма (рис. 4, б), которая на 10,65 ккал/моль менее стабильна, чем аминокальдегидная.

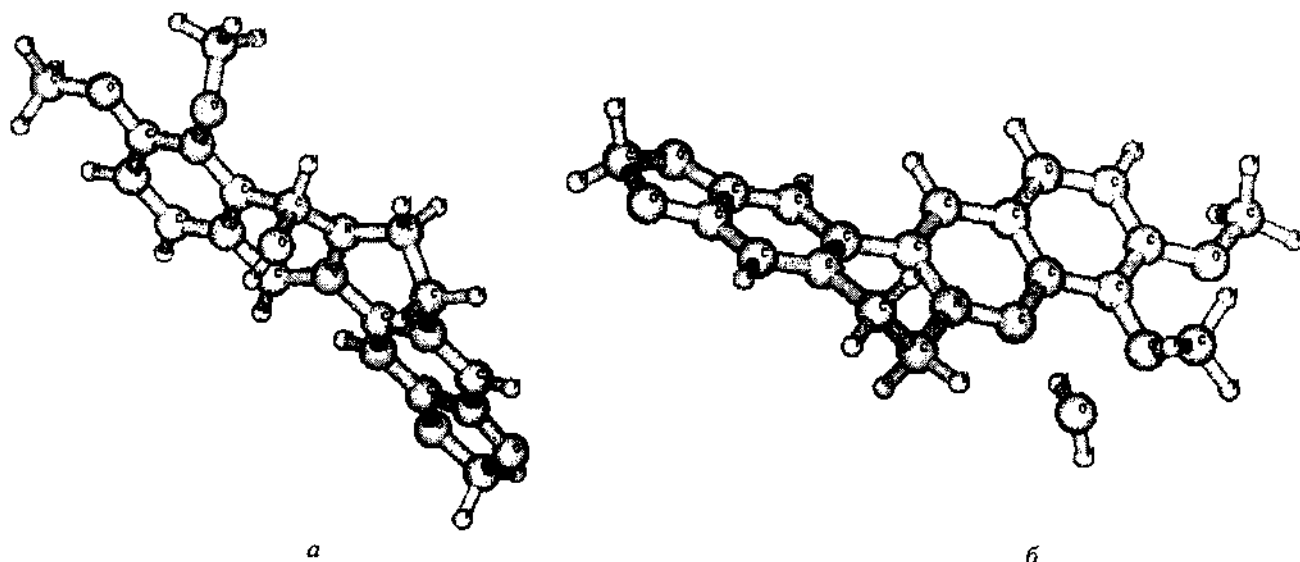


Рис. 4. Пространственные структуры аминокальдегидной (а) и аммониевой (б) форм берберина, полученные методом DFT/B3LYP/6-31G(d, p)

Этот факт не вызывает удивления, поскольку в газовой фазе крайне невыгодно существование цвиттериона гидроксида берберина, имеющего положительный заряд на одном из своих фрагментов (аммониевая форма) и отрицательный — на другом (гидроксид).

Действительно, если начальная структура гидроксида берберина в газовой фазе может быть представлена как $[C_{20}H_{18}NO_4]^+ [OH^-]$, то в результате расчета его конечная оптимизированная структура имеет вид $[C_{20}H_{17}NO_4] \cdot H_2O$. Иначе говоря, чтобы гидроксид берберина не содержал локализованных зарядов на своих различных фрагментах, его гидроксильный ион присоединяет протон из аммониевой формы и образует молекулу воды, тесно связанную (возможно, за счет водородной связи) с фрагментом $[C_{20}H_{17}NO_4]$. В то же время эта форма обладает большим дипольным моментом, составляющим 5,066 Д, что, очевидно, в растворе оказывает на нее значительное стабилизирующее действие.

Хотя структура катиона берберина хорошо известна из рентгеноструктурных данных [10—12], строение свободного основания четвертичного изохинолинового алкалоида до недавнего времени детально не исследовано. Некоторые данные экспериментального изучения свободного берберинового основания представлены в работе [13].

Вычисленные значения длин и углов связей для псевдооснования берберина (8-гидроксицидигидроберберина) хорошо согласуются с эксперимен-

тально определенными величинами. Все длины и углы связей в 8-гидроксицидигидроберберине находятся в границах стандартных значений. Согласно данным расчетов, длина связи C8—OH составляет 1,436 Å, в то время как эксперимент дает величину, равную 1,440 Å.

Теоретическое значение суммы трех валентных углов атома азота составляет 359,99°, тогда как экспериментальное — 353,98°. Этот факт указывает на то, что гибридизация атома азота близка к sp^2 . Частично гидрогенизированный гетероцикл В принимает конформацию искривленного полукресла, тогда как конформация кольца С имеет вид мелкого полукресла, при этом атом С8 отклоняется от плоскости на 0,373 Å. Полуаминоацетальная гидроксильная группа C8—OH находится в аксиальном положении по отношению к кольцу С. Метоксигруппа, присоединенная к атому С9, почти перпендикулярна плоскости кольца D, в то время как другая метоксигруппа размещена почти в его плоскости.

Теоретически вычисленные величины торсионных углов равны 117,0° [C8a—C9—O19—C15], -66,7° [C10—C9—O19—C15], -176,7° [C9—C10—O20—C16] и 1,8° [C11—C10—O20—C16]. Соответствующие экспериментальные значения углов составляют -117,7°; 71,3°; 175,7° и -3,6°.

Таким образом, имеется очень хорошее согласие между теоретическими и экспериментальными данными. Подобно четвертичным бербериновым солям это является общей особенностью четвертич-

них берберінових 8-аддуктов. С достаточной степенью точности диоксолановое кольцо C2-C3-O18-C14-O17 является плоским (среднее отклонение от плоскости равно 0,0511 Å. Угол между ароматическим кольцами А и D равен 148,5°, что близко к данным эксперимента.

В заключение можно сделать вывод о том, что использование современных неэмпирических методов квантовой химии для изучения всех возможных таутомеров алкалоида берберина и его катиона приводит к хорошему количественному согласию структурных параметров с экспериментально полученными значениями.

V. I. Danilov, V. U. Dailidonis, D. M. Hovorun, L. A. Zayika, N. Kurita, A. I. Potopalsky, V. M. Kharchenko

Non-empirical quantum-chemical study of various structural forms of berberin alkaloid

Summary

The results of the extensive theoretical study on the energy and structural properties of all possible alkaloid berberine forms (berberine cation and three tautomeric forms of berberine), displaying a great variety of biological and pharmacological activities, are presented. The DFT method with exchange-correlation (combined) functionals (PW91, BLYP, PBEPW91) and hybrid functionals (B3LYP, B3PW91) as well as MP2 method were used for the berberine cation. Molecular orbitals were represented by the atomic basis sets 6-31G(d, p) and 6-311G(d, p). The ammonium, carbinol (pseudobase) and amino-aldehyde forms were calculated by the DFT method with B3LYP/6-31G(d, p) functional. Full geometry optimization regardless of the theory level was shown to result in the intrinsically non-planar propeller-twisted and buckled spatial structure of all berberine forms. The calculated lengths and angles of bonds were shown to have good correlation with the experimental data obtained by X-ray analysis. From the comparison of relative stabilities of the tautomeric forms, it was elucidated that carbinol form is the most preferable tautomer in gas phase, while amino-aldehyde form is less stable (by 12.65 kcal/mol). The least stable tautomer was the ammonium one, being 10.65 kcal/mol less stable than amino aldehyde tautomer.

Keywords: berberine, tautomerism, pseudobase, quantum chemical calculations, DFT, MP2, spatial structure.

V. I. Данилов, В. У. Дайлідоніс, Д. М. Говорун, Л. А. Зайка, Н. Куріта, А. І. Потопальський, В. М. Харченко

Неемпіричне квантово-хімічне дослідження різних структурних форм алкалоїду берберину

Резюме

Представлено результати неемпіричного квантово-хімічного дослідження енергетичних і структурних властивостей усіх можливих форм алкалоїду берберину (катиона і трьох таутомерів) з великим різноманіттям біологічної і фармакологічної активності. Катіон берберину вивчено методом DFT з обмінно-кореляційними (комбінованими) (PW91, BLYP PBEPW91) та гібридними (B3LYP, B3PW91) функціоналами, а також більш сучасним методом MP2, який враховує корекцію електронів. Молекулярні орбіталі представлено атомними базисни-

ми системами 6-31G(d, p) і 6-311G(d, p). Амонієва, карбінольна (псевдооснова) і аміноальдегідна форми розраховано методом DFT на рівні теорії B3LYP/6-31G(d, p). Виявлено, що повна оптимізація геометрії на різних рівнях теорії призводить до неплоскої пропелер-закрученої і вигнутої просторової структури берберінових форм. Обчислені величини довжин зв'язків і кутів між ними узгоджуються з експериментальними рентгеноструктурними даними. З'ясовано, що карбінольна форма є найвигіднішим таутомером у газовій фазі, а аміноальдегідна — менш стабільна (на 12,65 ккал/моль). Найнестабільнішим таутомером виявилася амонієва форма, яка на 10,65 ккал/моль менш вигідна, ніж аміноальдегідний таутомер.

Ключові слова: берберин, таутомерія, квантово-хімічні розрахунки, DFT, MP2, просторова структура.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Потопальський А. И., Петличная Л. И., Ивасивка С. И. Модификация алкалоида берберина.—Киев: Наук. думка, 1982.—112 с.
2. Birdsall T. C., Kell G. S. Berberine: therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants // *Alt. Med. Rev.*—1997.—2.—P. 94—103.
3. Li T.-K., Bathory E., LaVoie E. J., Srinivasan A. R., Olson W. K., Sowers R. R., Liu L. F., Pilch D. S. Human topoisomerase I poisoning by protoberberines: potential roles for both drug-DNA and drug-enzyme interactions // *Biochemistry.*—2000.—39.—P. 7107—7116.
4. Beke D. Heterocyclic pseudobases // *Adv. Heterocycl. Chem.*—1963.—1.—P. 1047.
5. Marek R., Seckarova P., Hulova D., Marek J., Dostal, Sklenar V. Palmatine and berberine isolation artifacts // *J. Nat. Prod.*—2003.—66.—P. 481—486.
6. Simanek V., Preininger V., Hegerova S., Santavy F. The tautomerism of quaternary salts of isoquinoline type. The effect of the position and nature of electron donating substituents on the spectroscopic and polarographic behaviour of these substances // *Coll. Czech. Chem. Commun.*—1972.—37.—P. 2746—2763.
7. Huang M.-J., Lee K. S., Harley S. J. Nuclear magnetic resonance spectral analysis and molecular properties of berberine // *Int. J. Quant. Chem.*—2005.—105.—P. 396—409.
8. Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K. A., Su S. J., Windus T. L., Dupuis D., Montgomery J. A. General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.*—1993.—14.—P. 1347—1363.
9. Granovsky Alex A. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.
10. Kariuki B. M., Jonson W. Five salts of berberine // *Acta Cryst.*—1995.—C51.—P. 1234—1240.
11. Man S., Potacek M., Necas M., Zak Z., Dostal J. Molecular and crystal structures of three berberine derivatives // *Molecules.*—2001.—6.—P. 433—441.
12. Blasko G., Cordell G. A., Bhamarapravati S., Beecher C. W. Carbon-13 NMR assignments of berberine and sanguinarine // *Heterocycles.*—1988.—27.—P. 911—916.
13. Dostal J., Man S., Seckarova P., Hulova D., Necas M., Potacek M., Tousek J., Dommissie R., Dongen W. V., Marek R. Berberine and coptisine free bases // *J. Mol. Struct.*—2004.—687.—P. 135—142.

УДК 577.11

Надійшло до редакції 31.03.06

Филогенетический анализ структурных предпосылок аутогенного контроля экспрессии генов *rplJL* оперона на уровне трансляции представителей γ -протеобактерий

И. В. Крупская, Е. Б. Патон¹

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

i.v.kroupskaya@imbg.org.ua

*Проведен филогенетический анализ структурных предпосылок аутогенной регуляции экспрессии генов *rplJL* оперона у представителей γ -протеобактерий на уровне трансляции. Исследованы структурные предпосылки взаимодействия рибосомного белка L10 с мРНК. Показано, что у представителей γ -протеобактерий аутогенный контроль экспрессии генов L10 белка осуществляется по тому же механизму, что и у *Escherichia coli*, за исключением эндосимбионтов.*

Ключевые слова: аутогенный контроль, экспрессия генов, рибосомный белок L10, мРНК, сайт связывания.

Введение. Аутогенный контроль экспрессии генов, кодирующих рибосомные белки, является типичным для прокариотных организмов [1–3]. Ауторегуляция генов *rplJL*, кодирующих рибосомные белки L10 и L12, осуществляется на уровне трансляции посредством белка-регулятора L10 или же комплексом L8 (L10:4L12) [4, 5]. Белок-регулятор способен конкурентно связываться с последовательностью-мишенью как на мРНК, так и на рРНК. В случае, когда синтез упомянутого белка избыточен по отношению к синтезу рРНК, L10 или же комплекс L10:4L12, связываясь с сайтом-мишенью на мРНК, блокирует трансляцию собственного и сопряженного с ним цистронов [2, 3]. Одновременное блокирование инициации трансляции обоих цист-

ронов (L10 и L12) происходит благодаря связыванию белка L10 с мРНК-мишенью, расположенной в нетранслируемой 5'-области первого из них, и в результате прочного спаривания между удаленными более чем на 500 нуклеотидов от сайта инициации трансляции белка L10 5'-концевыми участками названных цистронов единой мРНК [4, 5]. Полагают, что у *Escherichia coli* лидерная область перед геном *rplJ* может существовать в термодинамически равновесных конформациях — транслационно активной («открытой») и заблокированной («закрытой») [6]. Предполагается, что связывание L10 белка возможно лишь с «закрытой» формой *rplJ*-лидера.

Учитывая уже известные данные [7], цель данной работы состояла в поиске и исследовании структурных предпосылок для осуществления ме-

ханизма аутогенного контроля экспрессии гена *rplJ* у представителей гамма-протеобактерий. Структурный анализ включал поиск и характеристику структуры мРНК-мишени для белка L10; построение модели вторичной структуры лидерной последовательности гена *rplJ*, а также поиск структурных предпосылок для сопряжения трансляции L10 и L12 цистронов за счет спаривания 5'-областей этих цистронов.

Данные о нуклеотидных последовательностях, относящихся к гамма-протеобактериям, получены нами из базы данных NCBI, TIGR Microbial Database, Sanger Centre, Joint Genome Institute, University of Washington, University of Wisconsin. Для поиска генов *rplJL* бактерий с неполностью секвенированными геномами использовали BLAST 2.0 на NCBI BLAST.

Были исследованы гена следующие представители гамма-протеобактерий:

Enterobacteriales: *Buchnera aphidicola* str. APS NC_002528; *Candidatus Blochmannia floridanus* NC_005061; *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* SCRI1043; *Erwinia chrysanthemi* str. 3937; *Escherichia coli* K12 NC_000913; *Klebsiella pneumoniae*; *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi NC_0031; *Salmonella enteritidis* NC_003455; *Salmonella paratyphi*; *Salmonella typhimurium* DT104 NC_002056; *Shigella dysenteriae* M131649; *Shigella flexneri* 2a str. 301 NC_002773; *Shigella sonnei* 53G NC_002809; *Wigglesworthia glossinidia endosymbiont of Glossina brevipalpis* NC_005139; *Yersinia enterocolitica* (type 0:8) NC_002120; *Yersinia pestis* CO92 NC_003143;

Pasteurellaceae: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* NK 1651; *Haemophilus ducreyi* 35000HP NC_002940; *Haemophilus influenzae* Rd KW20 NC_000907; *Haemophilus somnus* 129PT NC_002664; *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E NC_006300 *Pasteurella multocida* NC_001774;

Pseudomonadaceae: *Pseudomonas aeruginosa* PA01 NC_002516; *Pseudomonas fluorescens* SBW25; *Pseudomonas putida* KT2440 NC_002947; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a NC_002759;

Vibrionaceae: *Photobacterium profundum* SS9 NC_006370, *Vibrio cholerae* O1 biovar eltor str. N16961 NC_004982; *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 NC_002088; *Vibrio vulnificus* CMCP6 NC_004459; *Vibrio vulnificus* YJ016 NC_005139;

Xanthomonadaceae: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913 NC_003902; *Xylella*

fastidiosa 9a5c NC_002490; *Xylella fastidiosa* *Temeculal* NC_002144;

Others: *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270; *Colwellia psychrerythraea* 34H; *Coxiella burnetii* RSA 493; *Legionella pneumophila*; *Methylococcus capsulatus* str.; *Shewanella oneidensis* MR-1 NC_004347.

Первичные последовательности ДНК сравнивали с использованием программы CLUSTAL W [8].

Модели вторичной структуры *rplJ* лидера построены с помощью программ RNAFOLD [9] (из пакета программы PC GENE) и RNADRAW [10].

Ранее мы сообщали о высокой степени консервативности структуры сайта связывания регуляторного рибосомного белка L10 с мРНК у семи представителей рода энтеробактерий: *S. marcescens*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. freundii*, *E. cloacae* и *K. pneumoniae* [7]. При поиске сайта связывания белка L10 на мРНК у представителей данного семейства учитывали два обстоятельства.

Во-первых, во всех известных на сегодня как м-, так и рРНКовых мишенях L10 белка прокариотов присутствуют элементы AGA и C-G пара, соседствующая с неспаренным А, а также элемент UUAA (рис. 1), характерный для мРНКовых участков связывания белка L10 так называемого энтеробактериального типа [11–14]. Сайты взаимодействия L10 с мРНК у представителей γ -протеобактерий обладают рядом консервативных структурных элементов и четко выраженным структурным сходством с областью связывания с L10 на 23SPHK (рис. 1). Функциональная значимость этих элементов подробно обсуждалась ранее [7].

Во-вторых, все известные на сегодня мРНКовые мишени белка L10 значительно удалены от сайта инициации трансляции L10-цистрона (примерно на 150 п. н.) и обнаруживают очевидную структурную гомологию с участком связывания на 23S рРНК. На основании проведенного сравнительного анализа нами построена консенсусная модель вторичной структуры сайта связывания белка L10 на мРНК. Как видно из данных рис. 1, все перечисленные выше характерные элементы мРНК сайта связывания L10 белка (на рис. 1 эти последовательности отмечены жирным шрифтом) сохраняются для организмов гамма-протеобактерий.

Исходя из определенной первичной последовательности мРНК *rplJ* лидеров представителей γ -протеобактерий очевидно, что их общая структурная организация (рис. 2, а) консервативна. При

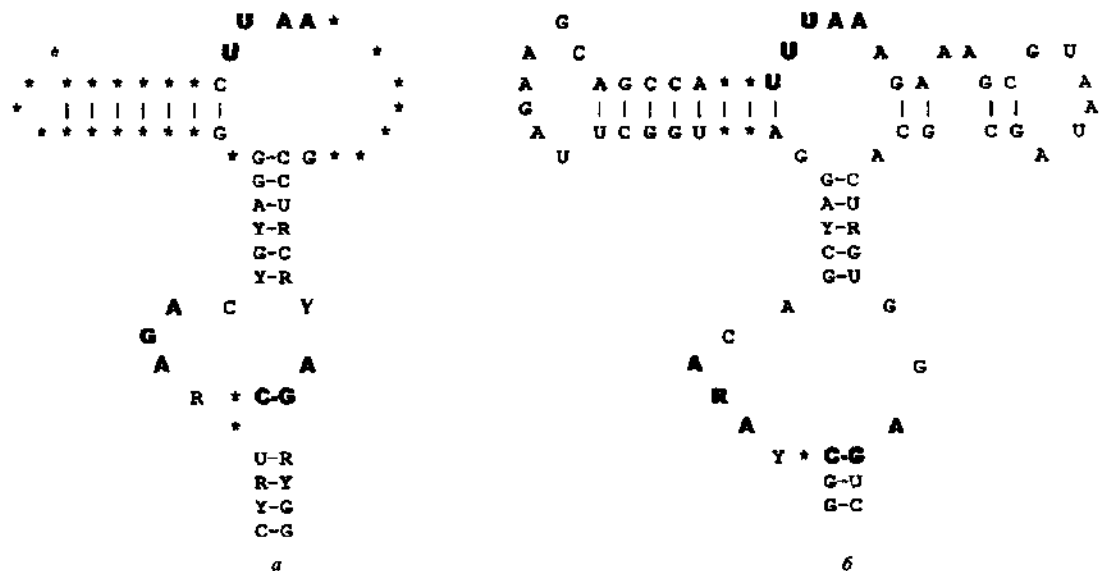


Рис. 1. Вторичная структура сайта связывания регуляторного белка L10 на мРНК и на 23S рРНК: общий консенсус, выведенный для участка связывания L10 на мРНК (а) и 23S рРНК (б). Консервативные нуклеотиды обозначены буквами, переменные — звездочками. Y и R соответственно C, U и G, A

этом сохраняются характерные для *E. coli* [4] пять двухцепочечных (ds) и пять одноцепочечных (ss) участков. Участки dsIV и dsIII наиболее консервативны, что коррелирует с их ключевой ролью в ауторегуляции экспрессии генов *rplJL* [7]. DsIV содержит сайт связывания регуляторного белка L10 (L8). DsIII предположительно может существовать в двух альтернативных формах, соответствующих трансляционно активному и заблокированному состояниям мРНК L10-L12. Последовательности 5'-CC-RUC-3' и 5'-GRUGG-3', которые за счет альтернативного спаривания обеспечивают возможность перестройки структуры лидера мРНК L10-L12, оказались консервативными у всех проанализированных представителей γ -протеобактерий. Таким образом, предположение о конформационном переходе, лежащем в основе регуляции трансляции мРНК L10-L12 как *E. coli* [4], так и шести видов энтеробактерий [15] правомерно и для исследуемых представителей γ -протеобактерий.

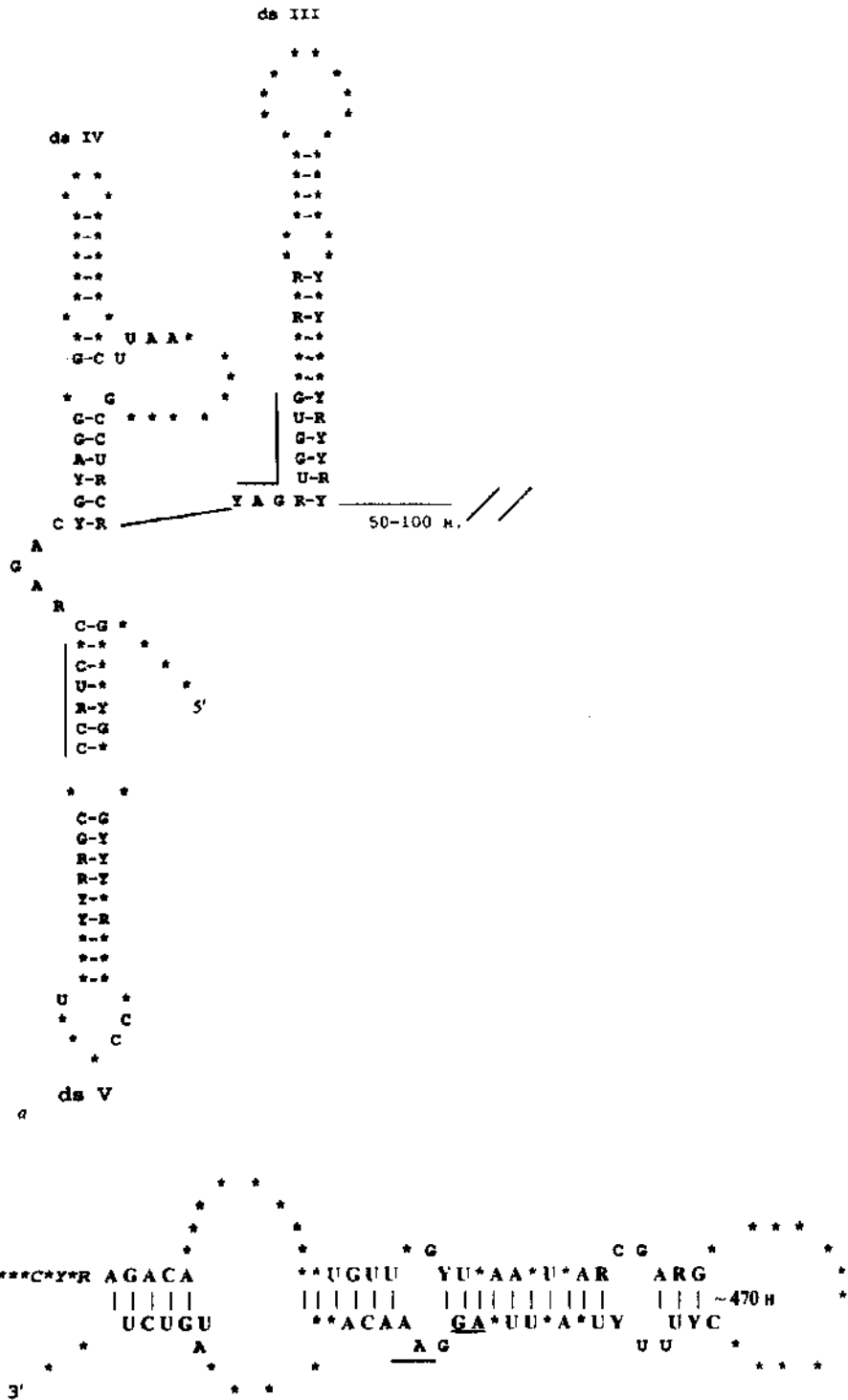
Механизм ауторегуляции трансляции генов *rplJL* оперона предполагает, что связывание белка L10 с лидерной областью мРНК L10-L12 блокирует трансляцию обоих цистронов. Структурной предпосылкой сопряженной трансляции L10 и L12 цистронов у *E. coli* является спаривание удаленных участков 1738—1773 — L10 цистрон и 2256—2290 — L12 цистрон мРНК L10-L12 [16]. Аналогичные области консервативны у всех представителей γ -

протеобактерий, что обеспечивает возможность подобного спаривания (рис. 2, б). Все это позволяет предположить наличие одного и того же механизма сопряжения трансляции названных цистронов у рассматриваемых представителей.

Следует отметить, что у представителей *Pseudomonadaceae* локализация участков, вовлеченных в спаривание и приводящих к блокированию сопряженных цистронов, отличается от остальных представителей γ -протеобактерий. Данный факт можно объяснить филогенетической удаленностью *Pseudomonadaceae* от других групп γ -протеобактерий. Для некоторых представителей γ -протеобактерий не обнаружено структурных предпосылок регуляции трансляции белка L10, например, для *Buchnera sp.*, *S. ruddii*, *X. fastidiosa*, относящихся к организмам-паразитам.

Отсутствие структурных предпосылок может быть объяснено эндосимбиотическим образом жизни этих организмов [17, 18]. Для эндосимбионтов характерно также отсутствие перед геном *rplK* сайта связывания для белка L1 (неопубликованные данные). Это дает основание полагать, что кластер *rplKAJL* не регулируется белком L1. Гены *rplJL* входят в кластер *rplKAJL* у всех эндосимбионтов, следовательно, правомочно сделать предположение об участии *NusG* гена в регуляции экспрессии генов *rplJL*.

С получением кристаллов РНК и определени-



Схематическое изображение мРНК L10-L12. Консенсусные модели вторичной структуры: а — участка *rplI* лидера мРНК 0; б — мРНК в области сопряженной трансляции L10 и L12 цистронов. Буквами обозначены консервативные нуклеотиды, * — варибельные. Y и R соответственно C, U и G, A

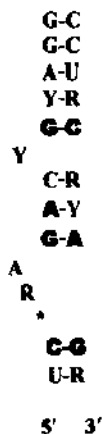


Рис. 3. Консенсусная структура K-turn мотива для мРНК белка L10

ем ее атомной структуры стало возможным идентифицировать ранее неизвестные мотивы РНК, так называемые гибкие молекулярные стержни — kink-turn (K-turn или GA) мотивы, приводящие к крутому изгибу в двойной спирали РНК и являющиеся важным участком для белкового узнавания [19-21]. K-turn — это асимметричная внутренняя петля, фланкированная С-Г парой с одной стороны и G-А парой — с другой. Этот мотив узнается девятью из 31 белка большой субъединицы 23S рРНК: L4, L7Ae, L10, L15e, L19e, L24, L29, L32e и L37Ae. Сайт связывания белка L10 на мРНК аналогичен КТ-42 в 78-й петле 4-го домена 23S рРНК *E. coli* [16]. Нами построена модель консенсусной структуры K-turn мотива для мРНК белка L10 представителей γ -протеобактерий, приведенная на рис. 3. На основании этой модели можно сделать вывод о наличии дополнительных структурных элементов, участвующих в аутогенном контроле экспрессии генов *rpIJL* оперона.

Таким образом, проведенный нами филогенетический анализ аутогенного контроля экспрессии генов *rpIJL* у представителей гамма-протеобактерий подтвердил, что данные гены регулируются по классическому для прокариотов принципу обратной связи и имеют для этого все необходимые структурные предпосылки, а именно: сайт связывания для рибосомного белка L10 на мРНК; вторичную структуру лидерной области, обеспечивающую конформационный переход, лежащий в основе регуляции трансляции мРНК L10-L12, а также условия для сопряженной трансляции L10 и L12 цистронов.

I. V. Kroupskaya, E. B. Paton

Phylogenetic analysis of structural preconditions of autogenous control of gene expression of *rpIJL* operon at the translation level in γ -proteobacteria

Summary

Phylogenetic analysis of structural preconditions of autogenous control regulation of gene expression of *rpIJL* operon at the translation level in γ -proteobacteria has been performed. The structural preconditions of both L10 ribosomal protein and its RNA targets, which determine the possibility and the specificity of L10-RNA interaction have been studied. Phylogenetic comparison provides evidence for similarity of structural preconditions of the feedback regulation mechanism in γ -proteobacteria and *Escherichia coli*, except for the endosymbiontis.

Keywords: autogenous control, gene expression, L10 ribosomal protein, mRNA, interaction site.

I. В. Крупська, Е. Б. Патон

Філогенетичний аналіз структурних передумов аутогенного контролю експресії генів *rpIJL* оперона на рівні трансляції у представників γ -протеобактерій

Резюме

Здійснено філогенетичний аналіз структурних передумов аутогенної регуляції експресії генів *rpIJL* оперона у представників γ -протеобактерій на рівні трансляції. Досліджено структурні передумови взаємодії рибосомного білка L10 з мРНК. Доведено, що у представників γ -протеобактерій аутогенний контроль експресії генів L10 білка відбувається за тим самим механізмом, що й у *Escherichia coli*, за виключенням ендосимбіонтів.

Ключові слова: аутогенний контроль, експресія генів, рибосомний білок L10, мРНК, сайт зв'язування.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Lewis H., Dennis P. Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit B in *E. coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76.—P. 1697—1701.
2. Zengel J. M., Lindahl L. Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli* // Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—1994.—47.—P. 331—370.
3. Nomura M. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components // Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol. Regulation of Gene Expression / Eds I. Both, C. Higgins.—Cambridge: Univ. press, 1986.—P. 199—220.
4. Sor F., Nomura M. Cloning and DNA sequence determination of the L11 ribosomal protein of *Serratia marcescens* and *Proteus vulgaris* L11 operon by heterologous L1 protein // Mol. and Gen. Genet.—1987.—210.—P. 52—59.
5. Clímie S. C., Friesen J. D. Feedback regulation of the *rpIJL-rpoBC* ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure // J. Mol. Biol.—1987.—198.—P. 371—381.
6. Friesen J. D., Tropak M., An G. Mutations in the leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation // Cell.—1983.—32.—P. 361—369.

Патон Е. Б. Особенности регуляции экспрессии генов кластера *rplKALJL* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 5.—С. 5—23.

Thomson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucl. Acids Res.—1994.—22.—P. 4673—4680.

Zuker M., Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamic and auxiliary information // Nucl. Acids Res.—1981.—9.—P. 133—148.

Matzura O., Wennborg A. RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows // Comp. Appl. BioSci. (CABIOS).—1996.—12.—P. 247—249.

Christensen T., Johnson M., Fill N. P., Frisen J. D. RNA secondary structure and translation inhibition: analysis of mutants in the *rplJ* leader // EMBO J.—1984.—3.—P. 1609—1612.

Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Общий механизм регуляции экспрессии в *rplJL* опероне энтеробактерий подтверждается консервативностью структурной организации лидерной области мРНК. Регуляторный консенсус лидерной области мРНК L10-L12 энтеробактерий // Докл. НАН Украины.—1995.—340, № 1.—С. 104—107.

Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Наличие сайта связывания с рибосомным белком L10 в нетранслируемой последовательности перед геном *rplJ* *Thermotoga maritima* указывает на аутогенный контроль экспрессии этого гена // Генетика.—1996.—32, № 1.—С. 139—143.

Патон Е. Б., Живолуп А. Н. Доказательство аутогенной

- регуляции экспрессии гена *rplJ* у *Thermotoga maritima* и возможности перекрестной регуляции экспрессии по этому принципу между *T. maritima* и энтеробактериями // Молекуляр. генетика.—1997.—33, № 10.—С. 1341—1344.
15. Живолуп А. Н., Патон Е. Б. Общий механизм регуляции экспрессии в *rplJL* опероне энтеробактерий подтверждается консервативностью структурной организации лидерной области мРНК. Регуляторный консенсус лидерной области мРНК L10-L12 энтеробактерий // Докл. НАН Украины.—1995.—340, № 1.—С. 104—107.
 16. Petersen C. Long-rang translational coupling in the *rplJL-rpoBC* operon of *Escherichia coli* // J. Mol. Biol.—1989.—206.—P. 323—332.
 17. Charles H., Mouchiroud D., Lobry J., Goncaves I., Rahbe Y. Gene size reduction in the bacterial aphid endosymbiont *Buchnera* // Mol. Biol. Evol.—1999.—16.—P. 1820—1822.
 18. Clark H., Baumann L., Thao M. L., Moran N. A., Baumann P. Degenerative minimalism in the genome of a psyllid endosymbiont // J. Bacteriol.—2001.—183.—P. 1853—1861.
 19. Klein D. J., Schmeing T. M., Moore P. B., Streitz T. A. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif // EMBO J.—2001.—20.—P. 4214—4221.
 20. Matsumura S., Ikawa Y., Inoue T. Biochemical characterization of the kink-turn RNA motif // Nucl. Acids Res.—2003.—31.—P. 5544—5551.
 21. Razga F., Spackova N., Reblova K., Koca J., Leontis N. B., Sponer J. Ribosomal RNA kink-turn motif — a flexible molecular hinge // J. Biomol. Struct. and Dyn.—2004.—22.—P. 183—194.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 22.06.06