

УДК 577.32

В.В. Костюков, А.В. Семанин, ст. преподаватель,

Л.Н. Дымант, проф., д-р физ.-мат. наук

Севастопольский национальный технический университет

Студгородок, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: ldimant@sevgtu.sebastopol.ua

СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШПИЛЕЧНЫХ КОНФОРМАЦИЙ

ДЕЗОКСИГЕКСАНУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ 5'-d(GCATGC) и 5'-d(GCTAGC): АНАЛИЗ МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Методами молекулярной динамики исследованы шпильчатые формы дезоксирибонуклеотидов d(GCATGC) и d(GCTAGC) в водно-солевом растворе при температуре 298 К. Моделирование проведено во временном диапазоне до 2 нс. Изучены внутренняя подвижность шпильчатых структур, их энергетика и гидратация. Показана стабильность шпильчатых конформаций при данных условиях окружающей среды.

Введение. Дезоксирибонуклеотидные последовательности могут образовывать разнообразные неканонические вторичные структуры в однострочной и дуплексной формах. К ним относятся шпильчатые структуры ДНК, имеющие важные биологические функции. Образование шпилек часто наблюдается при ренатурации молекул ДНК, содержащих палиндромные последовательности. Также шпильки встречаются в нативных нуклеиновых кислотах на участках инициации репликации ДНК некоторых фагов и вирусов, в промоторных участках генов. Одноцепочечные ДНК вирусов также могут образовывать шпильчатые структуры. Обнаружено образование шпилек ДНК как промежуточной формы в процессе рекомбинации [1]. Шпильчатые структуры ДНК участвуют в связывании ДНК с белками [2]. Существуют свидетельства того, что некоторые наследственные, а также раковые заболевания человека могут быть связаны с наличием в молекуле ДНК повторяющихся участков из нескольких нуклеотидов, которые склонны к образованию шпильчатых структур [3]. Обнаружено, что ядерный белок p53, который принимает участие в процессах репарации, регуляции клеточного цикла и инициации апоптоза (запрограммированной смерти клеток) при повреждении генетического материала клетки, специфичен к шпильчатым структурам одноцепочечных ДНК [4].

Шпилька состоит из двустороннего участка – стебля, образованного обычно уотсон-криковскими парами, который замыкается с одного конца петлей из неспаренных оснований. Конформация петли шпилек зависит от различных факторов: стэкинг-взаимодействия азотистых оснований внутри петли и с соседними азотистыми основаниями петли, стерических ограничений при замыкании петли, типа пар оснований на стыке петля-стебель, образования водородных связей между основаниями в петле, характера гидратации петли и стебля [5]. Размер петель варьирует в достаточно широких пределах. Исследования показали возможность образования стабильных однонуклеотидных петель в том случае, если они замыкаются так называемыми «разделенными» парами азотистых оснований (sheared base pairs) при боковой (side-by-side) ориентации оснований в паре. Такие мини-петли с «разделенными» пурино-пуриновыми парами оснований встречаются в нескольких биологически важных шпильках. Например, шесть контагиозных d(GCA) петель обнаружено в теломерах линейной хромосомы *Lividans*, d(AAA) и d(GAA) петли найдены на 5'- и 3'-концах однострочной ДНК *Parvovirus*, установлено также существование d(GAA) и d(GGA) петель в экструзионных шпильках промоторного участка бактериофага N4. В нативных ДНК как важные структурные элементы идентифицированы также d(ANC) петли. В частности, инвариантная d(AAC) петля найдена в начале репликации фага M13, а d(ATC) петля обнаружена в экструзионной шпильке ДНК pBR322 на участке связывания с топоизомеразой II [2].

Имеются многочисленные экспериментальные свидетельства того, что достаточно короткие самокомплементарные олигомеры ДНК могут образовывать шпильчатые структуры в растворе. Недавние исследования процессов самоассоциации самокомплементарных дезоксигексануклеотидов d(GCATGC) и d(GCTAGC), проведенные по данным ¹H-ЯМР-спектроскопии, показали [6], что в растворе, помимо двухспиральных гексамерных дуплексов, формируются также однострочные компактные свернутые структуры типа шпилек со стеблем из двух GC-пар и петлей из двух центральных азотистых оснований АТ или ТА. Об этом свидетельствуют характерные особенности концентрационных и температурных зависимостей химических сдвигов необмениваемых протонов гексамеров [6]. Существенно, что подобные исследования, проведенные с изомерным дезоксигексануклеотидом d(CGTACG), показали обычное для коротких самокомплементарных олигонуклеотидов двухкомпонентное (мономер-дуплекс) равновесие в растворе без заметного содержания структур типа шпилек [7]. Эти результаты коррелируют с данными работы [8], в которой установлена возможность формирования олигонуклеотидными последовательностями шпильчатых структур с двумя основаниями в петле в случае 5'-dCNNG и 5'-dTNNNA центральных участков, т.е. когда первым в центральном звене является пиримидиновое (С или Т), а четвертым – пуриновое (G или А) азотистые основания.

В настоящей работе изучены структурные и энергетические характеристики шпильчатых форм дезоксигексануклеотидов 5'-d(GCATGC) и 5'-d(GCTAGC), проведен их сравнительный анализ. Исследования выполнены методами молекулярной динамики (МД), моделируемая система представляет собой гексамерную шпильку в водной среде при полном представлении в равновесных условиях.

Методика эксперимента. Расчет пространственной структуры и конформационной динамики шпильчатых форм дезоксигексануклеотидов выполнен методами МД при помощи программ X-PLOR, версия 3.851, и NAMD с использованием силовых полей CHARMM22 и CHARMM27. Стартовые конфигурации стебля гексамеров, состоящего из двух G:C-пар, соответствовали классической В-форме ДНК. Положения двух азотистых оснований в петле варьировались таким образом, чтобы сохранялись горизонтальные взаимодействия между ними и вертикальные с азотистыми основаниями C2 и G5 стебля без значительных напряжений в сахаро-фосфатном остове. Олигонуклеотидные цепи терминировались с 5'- и 3'-концов ОН-группами. Нейтрализация избыточных электрических зарядов фосфатов в гексамерах обеспечивалась пятью ионами Na^+ , находящимися в стартовых конфигурациях на расстояниях 6 Å от атомов фосфора вдоль биссектрис углов O1P-P-O2P. Водное окружение моделировали молекулами воды TIP3P, размещенными в кубическом боксе с ребром 35 Å, который первоначально содержал 1432 молекулы воды. При совмещении центров масс водного бокса и шпилек удалялись все молекулы воды, находившиеся на расстояниях, меньших 2,7 Å от неводородных атомов гексамера и ионов Na^+ , в результате моделируемые системы d(GCATGC) и d(GCTAGC) содержали 1299 и 1306 молекул воды соответственно.

Оптимизация геометрии гексамеров осуществлялась средствами программы XPLOR с силовым полем CHARMM22 путем минимизации потенциальной энергии молекулярной системы методом сопряженных градиентов. Диэлектрическая проницаемость среды принималась равной единице. На первом этапе минимизации фиксировались все атомы гексамера и ионы натрия для ускорения релаксации гидратного окружения к равновесному состоянию, второй этап минимизации проводился с фиксацией молекулы гексануклеотида. На окончательном этапе оптимизация геометрии проводилась без каких-либо ограничений на движение атомов в системе с использованием процедуры «отжига» от высокой (600 - 700 К) до стандартной температуры $T = 298$ К. Минимизация и «отжи» выполнялись многократно с различных стартовых позиций, полученных в процессе 50-пс молекулярной динамики на различных участках траектории. Для представления ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий использовались соответственно переключающая (switch) и сдвиговая (shift) функции с расстоянием усечения $r_{\text{cut}} = 12$ Å. После минимизации потенциальной энергии и «отжига» проводилась процедура МД с помощью алгоритма Verlet при постоянной температуре $T = 298$ К. Для возможности использования временного шага $\Delta t = 2$ фс введено ограничение движений атомов водорода в молекулах воды и гексамеров по алгоритму Shake.

При включении процедуры МД с целью исключения вылета молекул воды в окружающий вакуум все молекулы воды, находящиеся на расстоянии менее 5 Å от граней бокса (775 молекул для d(GCATGC) и 772 для d(GCTAGC)), фиксировались. Шпильчатые структуры помещались в бокс по диагонали для обеспечения свободной (нефиксированной) водной оболочки (524 молекулы для d(GCATGC) и 534 для d(GCTAGC)), соответствующей толщине гидратного окружения ДНК – двухмолекулярный слой воды (толщиной ~4 Å). При анализе взаимодействий гексамеров с водой определялось среднее за последние 40 пс молекулярной динамики количество молекул воды, атомы кислорода которых находились на расстоянии не более 3 Å от электроотрицательных атомов олигонуклеотидов (N, O), т.е. способных образовывать со шпильчатыми структурами водородные связи.

Максимальное время эволюции систем составило 2 нс. Координаты всех атомов записывались через каждую 1 пс. При вычислении среднеквадратичных отклонений (СКО) текущих структур относительно начальных за последние 40 пс МД проводилось их совмещение по неводородным атомам стебля (как наиболее устойчивого элемента шпильчатой структуры) методом наименьших квадратов. Анализ геометрических и энергетических характеристик оптимизированных шпильчатых структур а также их конформационных состояний на различных этапах МД проводился непосредственно средствами X-PLOR. Визуализация расчетных структур и теплового движения атомов в молекуле выполнялась с помощью программы VMD.

Результаты и их обсуждение. Рассчитанные в ходе МД шпильчатые структуры представлены на рисунках 1, 2.

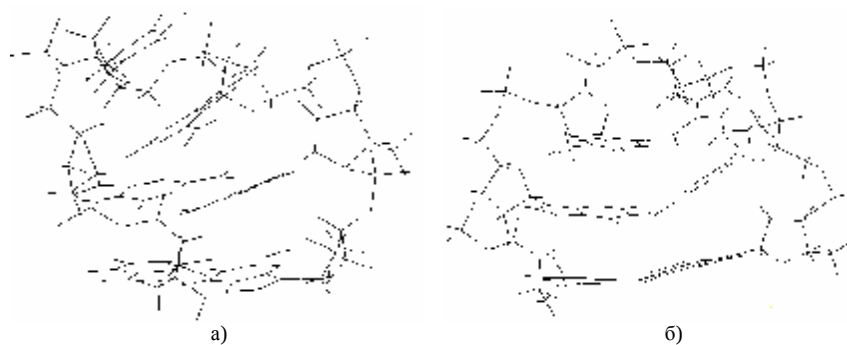


Рисунок 1 – Шпильчатые структуры d(GCATGC), полученные в CHARMM22 (а) и CHARMM27 (б)

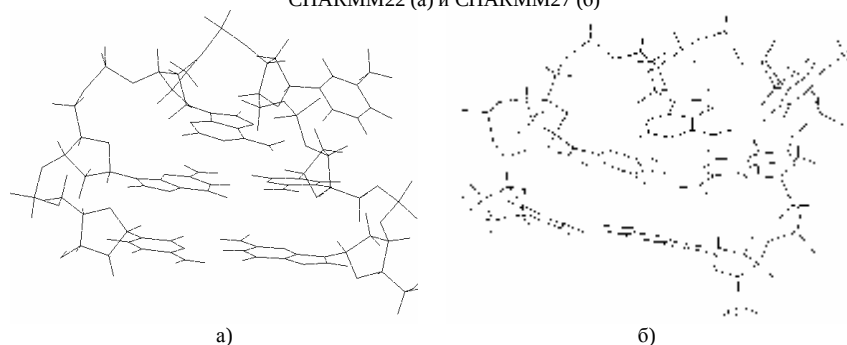


Рисунок 2 – Шпильчатые структуры d(GCTAGC), полученные в CHARMM22 (а) и CHARMM27 (б)

Стебли шпилек представляют собой хорошо сформированные правоспиральные динуклеотидные дуплексы с уотсон-криковским спариванием оснований G:C. Петли шпилек принимают существенно различные конформации (рисунок 3). В гексамере d(GCATGC) при использовании силового поля CHARMM22 наблюдается стопочное расположение петлевых азотистых оснований и существенное изменение ориентации сахарного кольца в нуклеотиде T4 относительно азотистого основания (CHARMM27), что, вероятно, обусловлено стерическими ограничениями на размещение метильной группы

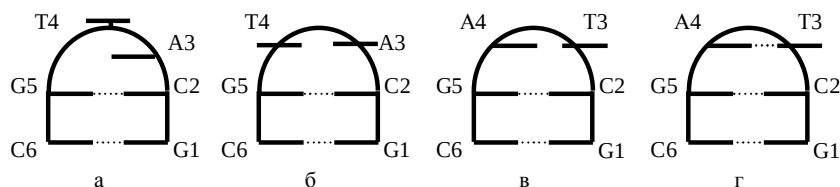


Рисунок 3 – Схемы шпильчатых структур а – d(GCATGC), CHARMM22; б – d(GCATGC), CHARMM27; в – d(GCTAGC), CHARMM22; г – d(GCTAGC), CHARMM27. Пунктиром показаны водородные связи

нуклеотида T4 внутри молекулы. При таких конформациях петли для данной последовательности не образуется водородных связей между петлевыми азотистыми основаниями.

В нуклеотиде d(GCTAGC), рассчитанном в силовом поле CHARMM27, наблюдается одна водородная связь между атомами O2(T3) и N6(A4). Для данного гексамера имеет место смещение петлевых азотистых оснований от оси спирали стебля в сторону 5'-конца гексамера.

Значения пространственных углов по сахарофосфатным остовам, а также гликозидных углов и фазовых углов псевдотвращения для всех звеньев шпильчатых структур представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1 – Значения углов минимизированных по потенциальной энергии шпильчатых структур d(GCATGC)

Углы	CHARMM22						CHARMM27					
	Конечная структура (t = 1,20 нс)						Конечная структура (t = 1,64 нс)					
	G1	C2	A3	T4	G5	C6	G1	C2	A3	T4	G5	C6
$\alpha,^\circ$	—	301,9	302,4	295,4	80,3	284,6	—	279,4	307,4	195,5	270,7	311,5
$\beta,^\circ$	—	142,9	169,7	169,0	239,7	178,0	—	129,8	158,8	133,0	92,9	157,0
$\gamma,^\circ$	170,5	57,1	68,1	51,2	188,9	52,4	66,0	56,5	70,4	76,3	177,8	57,5
$\delta,^\circ$	88,9	131,9	135,0	108,1	115,9	139,5	116,9	121,0	127,1	93,1	97,3	120,5
$\epsilon,^\circ$	252,7	170,4	177,9	230,3	171,5	—	252,0	171,7	267,0	241,0	169,8	—
$\zeta,^\circ$	262,4	272,7	273,8	87,6	262,9	—	257,8	271,1	142,9	301,0	271,9	—
$\chi,^\circ$	174,5	241,7	245,6	56,4	266,1	254,1	234,9	282,8	256,2	286,7	260,9	238,4
$\rho,^\circ$	15,6	143,7	157,7	106,7	118,9	145,9	118,4	126,5	144,9	347,3	95,4	126,8

Таблица 2 – Значения углов минимизированных по потенциальной энергии шпилечных структур d(GCTAGC)

Углы	CHARMM22						CHARMM27					
	Конечная структура($t = 1,24$ нс)						Конечная структура($t = 2,00$ нс)					
	G1	C2	A3	T4	G5	C6	G1	C2	A3	T4	G5	C6
$\alpha,^\circ$	–	298,1	292,1	284,8	79,9	274,7	–	332,4	281,7	276,8	288,9	232,2
$\beta,^\circ$	–	134,0	165,8	183,0	243,6	194,5	–	123,5	114,0	154,7	138,3	181,8
$\gamma,^\circ$	51,3	50,8	46,1	50,2	99,1	49,4	54,5	53,5	175,5	53,1	62,6	54,1
$\delta,^\circ$	139,3	141,9	76,8	140,7	101,7	82,3	137,4	143,0	97,7	147,1	94,4	90,1
$\varepsilon,^\circ$	241,4	186,7	91,0	233,1	307,3	–	205,8	201,3	210,4	220,8	23,5	–
$\zeta,^\circ$	182,6	286,2	302,6	168,3	295,1	–	172,4	276,5	197,4	193,0	64,0	–
$\chi,^\circ$	272,6	240,7	278,2	208,7	295,1	231,7	299,3	290,9	226,5	224,4	314,3	261,0
$P,^\circ$	142,5	150,5	12,7	146,0	102,0	29,1	144,1	154,1	93,4	163,5	94,4	80,5

Для стеблей обеих шпилечных структур большинство из представленных параметров соответствует канонической В-форме. В то же время, в обоих силовых полях угол β нуклеотидов C2 шпилек имеет существенно меньшее значение, а в звеньях G5 шпилечной структуры d(GCATGC) угол γ – намного большее значение, чем в дуплексе ДНК В-формы. Для данной шпильки также наблюдаются значительно большие по сравнению с каноническими значения углов ε звеньев G1 и T4. Для гексамера d(GCTAGC) силовые поля дают существенные расхождения значений данного угла для нуклеотида G5. Гликозидные углы χ для всех звеньев шпильки d(GCATGC), за исключением T4 (силовое поле CHARMM22) соответствуют анти-конформации азотистого основания по отношению к сахарному кольцу. В оптимизированной структуре для нуклеотида T4 угол $\chi \approx 56^\circ$. Моделирование с использованием силового поля CHARMM27 такую особенность в отношении звена T4 не выявляет. Значения гликозидных углов звеньев G5 шпильки d(GCTAGC) также соответствуют син-конформации. Что касается фазового угла псевдотвращения P , то его значения для обоих гексамеров варьируют в пределах $12,7...347,3^\circ$, при этом большинство их относится к C2'-эндоконформации.

Различное расположение азотистых оснований практически не влияет на общую энергетику систем (таблица 3), т.е. энергии внутримолекулярного

Таблица 3 – Энергии взаимодействий шпилечных структур

Взаимодействие	E_{total} ккал/моль	E_{vdw} ккал/моль	E_{elec} ккал/моль	E_{total} ккал/моль	E_{vdw} ккал/моль	E_{elec} ккал/моль
CHARMM22						
	d(GCATGC)			d(GCTAGC)		
внутри молекулы	-633,264	-38,393	-687,383	-632,284	-41,763	-683,555
молекулы с водой	-1065,650	-60,997	-1004,654	-1105,233	-67,413	-1037,821
молекулы с Na^+	-241,548	-1,080	-240,468	-243,772	3,071	-246,843
суммарное	-1940,462	-100,470	-1932,505	-1981,290	-106,105	-1968,219
G1 с C2*	-15,258	-7,668	-7,590	-16,322	-8,394	-7,928
C2 с A3	-7,769	-7,226	-0,543	-4,953	-3,367	-1,585
A3 с T4	-9,259	-9,024	-0,235	-0,119	-0,899	0,780
T4 с G5	-2,020	-0,505	-1,515	-2,188	-9,252	7,064
G5 с C6	-20,991	-9,351	-11,640	-19,455	-9,211	-10,244
G1 с C6	-23,507	-0,040	-23,467	-24,382	-0,430	-23,953
C2 с G5	-25,618	0,222	-25,839	-25,869	-0,743	-25,126
CHARMM27						
внутри молекулы	-633,034	-36,185	-691,000	-603,492	-19,291	-682,205
молекулы с водой	-1147,605	-59,540	-1088,065	-1109,440	-74,428	-1035,012
молекулы с Na^+	-160,168	-0,760	-159,408	-200,777	1,062	-201,839
суммарное	-1940,807	-96,485	-1938,473	-1913,709	-92,657	-1919,057
G1 с C2	-8,206	-6,563	-1,643	-2,586	-3,523	0,937
C2 с A3	-8,428	-5,887	-2,541	-4,056	-1,483	-2,574
A3 с T4	0,948	-1,196	2,144	-3,830	-0,429	-3,401
T4 с G5	-9,749	-9,156	-0,592	-3,794	-5,020	1,227
G5 с C6	-17,738	-9,110	-8,628	-3,660	-5,095	1,434
G1 с C6	-22,531	-1,124	-21,408	-25,341	0,021	-25,361
C2 с G5	-24,294	-0,902	-23,392	-22,203	-1,404	-20,798

* Приведены энергии взаимодействия между азотистыми основаниями нуклеотидов взаимодействия (≈ -630 ккал/моль), взаимодействия с водой (≈ -1100 ккал/моль) и ионами Na^+ (≈ -200 ккал/моль) приблизительно одинаковы для всех четырех шпилечных структур. Основными взаимодействиями, стабилизирующими шпилечную структуру данных олигонуклеотидов являются водородные связи в уотсон-криковских парах стебля G1:C6 и C2:G5.

Взаимодействия между петлевыми азотистыми основаниями весьма слабы, и, как упоминалось выше, только в d(GCTAGC) в силовом поле CHARMM27 между ними наблюдается образование водородной связи (рисунок 3).

Наблюдается сильное вертикальное стэкинг-взаимодействие между азотистыми основаниями G5 и C6; аналогичные контакты между G1 и C2 несколько слабее, а между азотистыми основаниями петли и стебля – еще менее интенсивны.

Компактность шпилек оценивалась с помощью измерения их радиусов инерции R_{gyr} . Для оптимизированной структуры d(GCATGC) при использовании силовых полей CHARMM22 и CHARMM27 получены значения R_{gyr} равные 6,612 и 6,721 Å, а для гексамера d(GCTAGC) – 6,683 и 7,022 Å соответственно.

Анализ СКО (таблица 4) показывает, что в силовом поле CHARMM27 структурные элементы шпилек имеют большую подвижность, чем в CHARMM22, а d(GCTAGC) проявляет большие значения СКО по сравнению с d(GCATGC). Наиболее подвижными являются концевые и петлевые нуклеотиды, а наименее – нуклеотиды C2 и G5, замыкающие петлю.

Таблица 4 – Среднеквадратичные отклонения структурных элементов шпилечных структур (в Å)

Силовое поле	Остов	Основания	Нуклеотиды					
d(GCATGC)								
			G1	C2	A3	T4	G5	C6
CHARMM22	1,402± ±0,041	2,213± ±0,089	0,519± ±0,070	0,509± ±0,073	3,399± ±0,127	2,412± ±0,123	1,018± ±0,071	0,750± ±0,089
CHARMM27	2,264± ±0,092	2,164± ±0,091	1,166± ±0,267	1,478± ±0,143	3,359± ±0,269	3,222± ±0,150	1,687± ±0,068	0,811± ±0,126
d(GCTAGC)								
			G1	C2	T3	A4	G5	C6
CHARMM22	1,475± ±0,061	1,225± ±0,076	1,361± ±0,053	1,051± ±0,055	1,977± ±0,142	1,432± ±0,122	1,116± ±0,078	0,956± ±0,060
CHARMM27	3,376± ±0,322	2,927± ±0,149	1,578± ±0,088	1,014± ±0,069	3,347± ±0,162	3,003± ±0,359	4,052± ±0,397	4,368± ±0,408

Средние количества молекул воды N , атомы кислорода которых находятся на расстоянии не более 3 Å от электроотрицательных атомов (N, O) нуклеотидов в целом, их сахаро-фосфатных остовов и азотистых оснований шпилечных структур представлены на рисунке 4. В среднем на одну шпилечную структуру приходится 52 молекулы воды ближайшей гидратной оболочки, из них приблизительно 40 – на сахаро-фосфатный остов и 12 – азотистые основания. Ближайшая гидратная оболочка шпилек имеет следующие

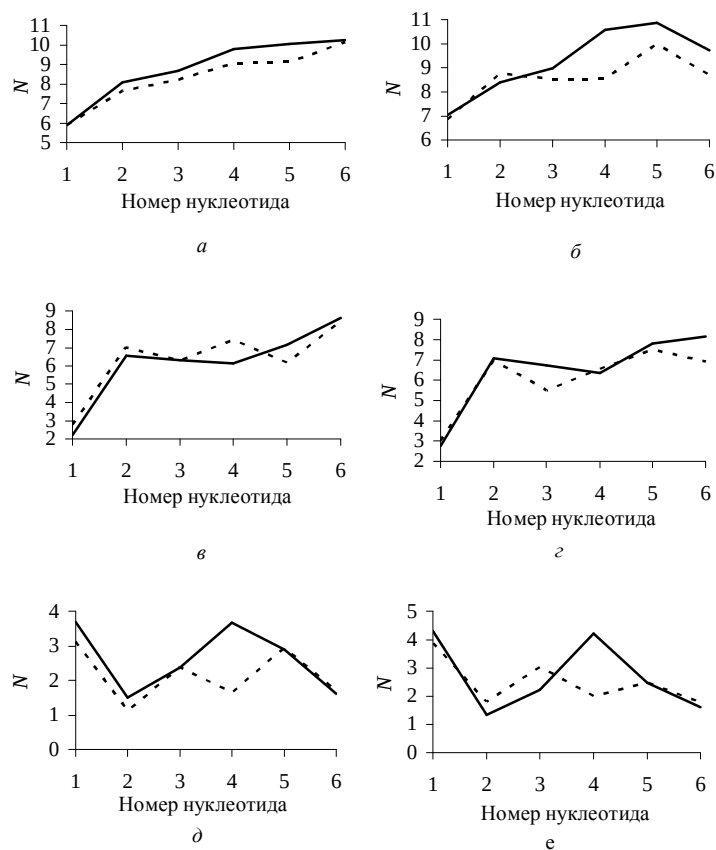


Рисунок 4 – Гидратация структурных элементов ДНК: а, б – нуклеотидов; в, г – сахаро-фосфатных остовов нуклеотидов; д, е – азотистых оснований нуклеотидов d(GCATGC) и d(GCTAGC) соответственно в CHARMM22 (сплошная линия) и CHARMM27 (пунктир)

закономерности гидрофильность нуклеотидов d(GCA TGC) монотонно возрастает от 5'- к 3'-концу; гидрофильность нуклеотидов d(GCTAGC) достигает максимума для G5; d(GCTAGC) проявляет большую гидрофильность, чем d(GCA TGC); гидрофильность обеих шпильчатых структур в CHARMM22 больше, чем в CHARMM27. Данные, полученные в разных силовых полях, наиболее сильно расходятся при определении гидрофильности четвертого (петлевого) нуклеотида, вероятно, из-за его большой подвижности.

Заключение. Проведенное моделирование динамики теплового движения шпильчатых структур дезоксигексануклеотидов d(GCA TGC) и d(GCTAGC) позволило выявить их характерные конформационные особенности, определить вклады различных видов атомных взаимодействий в общую потенциальную энергию и стабилизацию молекулярных систем. Оценена подвижность данных молекул и их отдельных звеньев. Установлен характер гидратации различных структурных элементов шпилек.

Библиографический список

1. Failure of Hairpin-Ended and Nicked DNA to Activate DNA-Dependent Protein Kinase: Implications for V(D)J Recombination / V. Smider, W.K. Rathmell, G. Brown et al. // *Molecular and Cellular Biology*. — 1998. — V. 18. — N. 11. — P. 6853 – 6858.
2. Hairpins in a DNA site for Topoisomerase II studied by ¹H- and ³¹P-NMR / A. Amir-Aslani, O. Mauffret, P. Bittoun et al. // *Nucleic Acids Research*. — 1995. — V. 23. — N. 19. — P. 2850 – 2857.
3. Cummings C.J. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases / C.J. Cummings, H.Y. Zoghbi // *Human Molecular Genetics*. — 2000. — V. 9. — N. 6. — P. 909 – 916.
4. Jajaraman J. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the 53 C-terminus / J. Jajaraman, C. Prives // *Cell*. — 1995. — V. 81. — P. 1021 – 1029.
5. Williamson J.R. Multi-nuclear NMR Studies of DNA Hairpins: 2. Sequence-Dependent Structural Variations / J.R. Williamson, S.G. Boxer // *Biochemistry*. — 1989. — V. 28. — P. 2831 – 2836.
6. Особенности процесса самоассоциации дезоксигексануклеотида 5'-d(GpCpApTpGpC) и его комплексообразования с антрациклиновым антибиотиком дауномицином в водном растворе / А.Н. Веселков, Р.Дж. Итон, В.И. Пахомов и др. // *Биополимеры и клетка*. — 2004. — Т. 20. — № 6. — С. 479 – 492.
7. ЯМР-исследование самоассоциации молекул дезоксигексануклеотидов 5'-d(CpGpTpApCpG) и 5'-d(CpGpCpGpCpG) в водном растворе / А.Н. Веселков, В.И. Пахомов, Р.Дж. Итон и др. // *Биофизика*. — 2000. — Т. 45. — № 1. — С. 20-26.
8. Davison A. Two-base DNA hairpin-loop structures *in vivo* / A. Davison, D.R. Leach // *Nucleic Acids Research*. — 1994. — V. 22. — N 21. — P. 4361 – 4363.

Поступила в редакцию 24.06.2005 г.