

Структурная модель области димеризации генома вируса иммунодефицита человека HIV-1

М. И. Зарудная, А. Л. Потягайло, Д. Н. Говорун

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

E-mail: dhovorun@imbg.org.ua

Предложена и обоснована новая структурная модель области димеризации геномной РНК вируса иммунодефицита человека HIV-1. Она включает двухцепочечный участок, образованный шпильками DIS мономеров, и не менее двух межмолекулярных четырехцепочечных участков. Модель согласуется с имеющимися литературными данными.

Вирионы вируса иммунодефицита человека HIV-1, так же как и других ретровирусов, содержат две гомологичные одноцепочечные геномные РНК, нековалентно соединенные между собой [1]. Наиболее стабильно они связаны на участке, расположенном вблизи их 5'-концов. Считают, что диплоидный геном обеспечивает дополнительную матрицу на случай повреждения одной из геномных РНК. Кроме того, в результате генетической рекомбинации во время обратной транскрипции увеличивается скорость эволюции вируса и улучшает его приспособляемость [2].

Существует несколько представлений о механизмах димеризации генома вируса HIV-1 [3], однако единое мнение по этому вопросу отсутствует, в частности, из-за имеющихся противоречий между результатами экспериментов *in vivo* [3–7] и *in vitro* ([8, 9] и др.).

В настоящей работе мы кратко анализируем современную концепцию процесса димеризации геномной РНК вируса иммунодефицита человека и предлагаем новую модель структуры области димеризации генома HIV-1.

5'-Концевая область геномной РНК HIV-1 содержит ряд важных регуляторных элементов. Ее структура (для центральноафриканского вируса HIV-1_{Mal}) показана на рис. 1. Между шпилькообразными структурами PBS (primer binding site) и

SD (splice donor) находится шпилька с внутренней асимметричной петлей, которую называют SL (stem-loop) 1 или DIS (dimerization initiation sequence). Она содержит в концевой петле самокомплементарную последовательность (GUGCAC в случае изолята Mal) и ответственна за инициацию процесса димеризации [8, 11]. Однако, как показали недавние исследования [12, 13], разветвленная структура 5'-концевой области РНК HIV-1 со многими шпильками (рис. 1), называемая BMH (branched multiple hairpin), не является единственно возможной конформацией и находится в термодинамическом равновесии с более стабильной формой. Эта альтернативная форма, названная LDI (long distance interaction), не обладает способностью димеризоваться, поскольку не содержит шпильки DIS. В форме LDI сигнальный элемент DIS образует двойную спираль с отдаленным участком РНК HIV-1, близким к 5'-концу. Таким образом, необходимым условием димеризации генома HIV-1 является конформационный переход 5'-концевой части РНК из формы LDI в форму BMH. Он может быть индуцирован нуклеокапсидным белком NC или тРНК, которая взаимодействует с доменом PBS [12].

На первой стадии димеризации палиндромы шпилек DIS двух РНК образуют двойную спираль. Такая структура димера получила название «целующихся петель» (kissing loop dimer) [11]. При определенных условиях (присутствие белка NC или повышенная температура [14]) осуществляет-

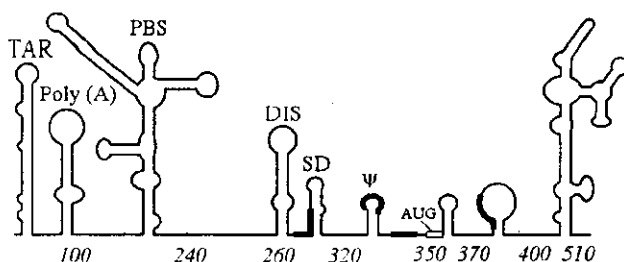


Рис. 1. Структура 5'-концевой части геномной РНК HIV-1_{Mal} [10]. Обозначения: TAR (*trans*-activation response element) — сайт связывания белка Tat; poly(A) — домен, содержащий сигнал полиаденилирования AAUAAA; PBS (primer binding site) — сайт связывания праймера; DIS (dimerization initiation site) — сайт инициации димеризации; SD (major splice donor) — главный донорный сайт сплайсинга; ψ — кор-сигнал упаковки; AUG — кодон инициации трансляции белка GAG. Фрагменты, которые, согласно предлагаемой нами модели, образуют межмолекулярные квадруплексы, выделены утолщенной линией

ся конформационный переход, в результате которого область контакта удлиняется и образуется линейный дуплекс, в котором спарены не только палиндромы концевых петель шпилек DIS, но и участки, формирующие их стебли (рис. 2, участок 260—294 нуклеотида). Следует отметить, что специфическая структура шпильки DIS существенна для ее функционирования: важную роль, в частности, играют такие ее характеристики, как длина и последовательность палиндрома в концевой петле, присутствие пуринов в ее основании, а также наличие внутренней петли в стебле ([15—17] и ссылки в [13]).

Полагают, что *in vivo* структурный переход из димера «целующиеся петли» в линейный дуплекс осуществляется во время созревания вирионов [14]. Белок NC и другие белки, образующиеся в результате протеолитического расщепления полипротеинов GAG и GAG-Pro-Pol, необходимы для формирования зрелых стабильных димеров [18]. Конформационные перестройки при созревании вирионов происходят не только в области первоначального контакта мономерных РНК, но и в других областях [19].

Несмотря на то, что шпилька DIS играет важную роль в репликации вируса HIV-1, тем не менее, она не является абсолютно необходимой для этого процесса [1]. Замены оснований или делеции в шпильке могут приводить к дефектам в упаковке вируса, значительному снижению его инфекционности и к уменьшению количества димерных геномов, однако они не влияют на стабильность диме-

ров. Димеры, выделенные из мутантных вирусов, имеют примерно такую же температуру плавления (T_{m2}), как и выделенные из вирионов дикого типа [3—7]. Авторы ряда работ [3, 5, 7] предположили, что контакты между шпильками DIS существенны лишь для инициации процесса димеризации, а стабильность димеров определяется контактами в других областях РНК.

Какие же области РНК HIV-1, кроме шпильки DIS, участвуют в процессе димеризации генома?

Сакагути и др. показали, что фрагменты вирусной РНК (изолят HIVHXB2R) длиной 44 нуклеотида, охватывающие шпильки SD и ψ , и расположенный между ними участок AAAAAUUUGA могут самоассоциироваться *in vitro* [20]. Димеризация значительно стимулируется белком NCp7. Однако не все изоляты вируса HIV-1 содержат палиндром A₄U₄ в 5'-концевой области. Так, в частности, в изоляте Mal последовательность между шпильками SD и ψ представляет собой тракт AAUUUUUGA.

Последовательность AAGCUU, локализованная в концевой петле шпильки поли(A), рассматривалась в качестве возможной области димеризации [3], однако экспериментальная проверка, проведенная Расселом и др. [21], не подтвердила этого предположения. Авторы [21] нашли другие участки, важные для процесса димеризации, а именно — два GU-богатых тракта, расположенных в области U5. По мнению Рассела и др. [21], GU-тракты не играют структурной роли, а могут быть непосредственно вовлечены во взаимодействие между двумя мономерными РНК. Однако, учитывая результаты, полученные недавно Эбинк и Беркут [22], представляется более вероятным, что они все же важны именно для поддержания определенной структуры в области димеризации. Авторы [22] показали, что в разветвленной структуре BMH одноцепочечный участок между шпильками поли(A) и PBS (включающий части GU-богатых трактов) образует двойную спираль с участком, содержащим кодон инициации трансляции (AUG) белка GAG.

Эту спираль назвали дуплексом U5-AUG [22]. Дуплекс фактически замыкает домен, содержащий шпильки PBS, DIS, SD и ψ . По-видимому, такая структура способствует сохранению шпилек и их эффективному функционированию, а ее разрушение должно в определенной мере дестабилизировать шпильки, в том числе и шпильку DIS, и ингибировать димеризацию и другие процессы, что, вероятно, и наблюдали в работе [21]. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что, по данным работы [22], стабилизация дуплекса U5-AUG вследствие мутаций приводит к сдвигу равновесия между конформациями LD1 и BMH в

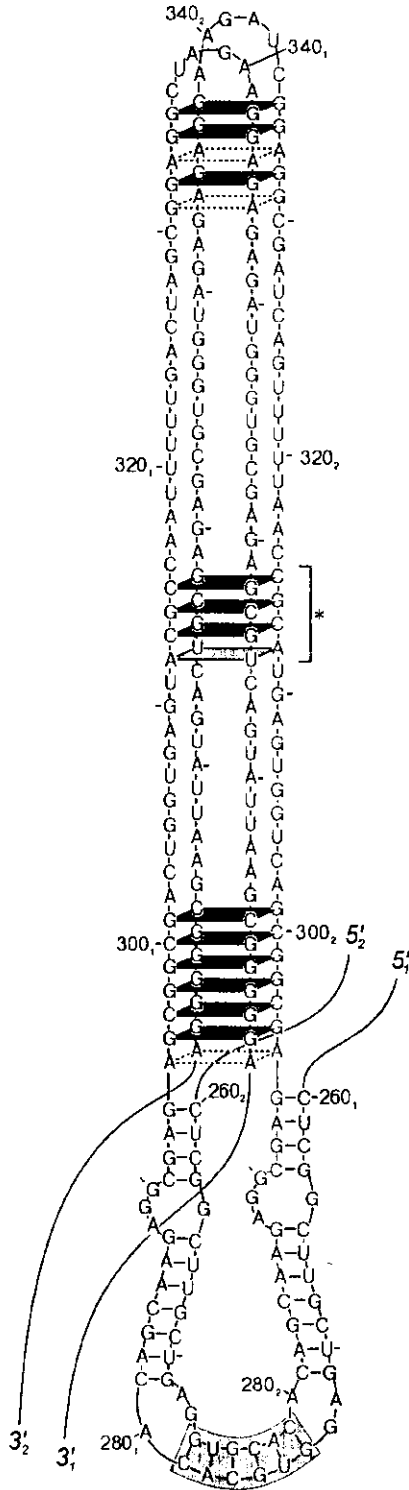


Рис. 2. Структурная модель области димеризации геномной РНК HIV-1_{Mai}. Схема линейного дуплекса взята из литературы [8], самокомплементарные участки выделены. Разные тетрады (G, A и смешанные) выделены разным образом (см. также текст относительно тетрад, обозначенных пунктирной линией, и участка, отмеченного звездочкой)

сторону образования разветвленной структуры. Это, в свою очередь, повышает эффективность процесса димеризации.

Дуплекс U5-AUG не показан на рис. 1, поскольку его существование установлено лишь для изолята HIV-1_{Lai}, однако, как считают Эбинк и Беркут [22], его могут образовывать соответствующие фрагменты геномной РНК всех известных типов вируса HIV.

В начале 90-х годов прошлого столетия рядом авторов было сделано предположение о том, что димеризация геномной РНК вируса HIV-1 может осуществляться посредством образования межмолекулярных четырехцепочечных структур, содержащих пуриновые квартеты [23—26]. В работах [24] и [25] показано, что фрагменты РНК HIV-1 длиной примерно 100 нуклеотидов, расположенные за шпилькой DIS, способны самоассоциироваться *in vitro* с образованием G-квадруплексов — стопкообразных G-тетрад, состоящих из водородосвязанных копланарных гуаниновых остатков [27]. Структурные модели квадруплексов в работах [23—26] не представлены.

Позднее выяснилось, что самоассоциироваться могут также фрагменты РНК HIV-1, включающие шпильку DIS [8, 11]. Преимущество шпильки DIS по сравнению с G-богатым участком (GRS), расположенным за этой шпилькой, в процессе инициации димеризации наглядно продемонстрировано в работе [28]. Авторы в одинаковых условиях исследовали димеризацию ряда фрагментов РНК HIV-1_{Mai} (рис. 1), в том числе фрагментов 1—311 (со шпилькой DIS), 311—415 (с GRS) и 1—615 нуклеотидов (с DIS и GRS). Они показали, что одно- и двухвалентные ионы металлов по-разному влияют на процесс димеризации фрагментов 1—311 и 311—415 нуклеотидов. Образовавшиеся димеры имеют разные $T_{пл}$, а главное — фрагмент 1—311 нуклеотидов димеризуется в 10 раз быстрее, чем фрагмент 311—415. Примечательно, что параметры димеризации фрагмента 1—615 нуклеотидов были примерно такими же, как у фрагмента 1—311.

Эти экспериментальные результаты однозначно свидетельствуют о том, что шпилька DIS имеет приоритетное значение в инициации димеризации 5'-концевой области РНК HIV-1, однако это не исключает участия G-квадруплексов в других стадиях процесса димеризации.

Мы разделяем мнение авторов обзора [1] о том, что G-квадруплексы могут играть определенную роль в созревании или стабилизации димеров, и предлагаем структурную модель области димеризации, включающей как двухцепочечный, так и

четырёхцепочечные участки (рис. 2, изолят HIV-1_{Mal}).

Двухцепочечный участок (260—294 нуклеотида) соответствует линейному дуплексу, в который превращается метастабильный димер «целующиеся петли» при созревании вирионов. G-квадруплексы образованы двумя молекулами РНК HIV-1, свернутыми в шпильки. В результате этого цепи квадруплексов направлены антипараллельно. В модели, показанной на рис. 2, в образовании квадруплексов участвуют фрагменты 295—301, 331—335, 342—346 и 376—382 нуклеотида (рис. 1), но квадруплексы могут быть также образованы и другими фрагментами, поскольку за шпилькой DIS расположено много G-богатых трактов. Множественные G-богатые тракты имеются в 5'-концевой области и других изолятов HIV-1 и для них тоже могут быть построены подобные структуры области димеризации, состоящие из линейного дуплекса, образованного шпильками DIS, и квадруплексов.

Как видно из рис. 2, наряду с G-тетрадами квадруплексы содержат также тетрады G·C·G·C. Существование квадруплексов, включающих смешанные тетрады, такие как G·C·G·C, A·T·A·T и G·T·G·T, установлено экспериментально (см. обзор в [29]). Образование тетрад G·A·G·A и A·A·A·A в квадруплексах с цепями, ориентированными антипараллельно, пока еще экспериментально не подтверждено, однако допускается теоретически [29, 30] — эти тетрады обозначены на рис. 2 пунктиром. Возможность включения смешанных тетрад и тетрад из других оснований в квадруплексы увеличивает количество разнообразных четырехцепочечных структур, которые могут образовывать ДНК и РНК. На самом деле, между двумя квадруплексами, изображенными на рис. 2, могут существовать и другие четырехцепочечные участки, включающие разные тетрады, например, участок, отмеченный звездочкой; кроме того, одноцепочечные области могут быть свернуты в шпильки.

Следует отметить, что по данным электронной микроскопии область димеризации мономерной РНК в вирионе охватывает примерно первые 600 нуклеотидов ([28] и ссылки в ней), при этом РНК контактируют в нескольких местах [1]. Кроме того, вне области димеризации они ориентированы параллельно ([24] и ссылки в ней). Как видно из рис. 2, наша модель удовлетворяет всем этим требованиям. Предположение о том, что именно образование квадруплексов обуславливает параллельную ориентацию мономерных РНК в димере, высказывалось в работах [9, 24].

Наличие многочисленных G-богатых трактов, расположенных за шпилькой DIS, и возможность

стабилизации G-тетрад тетрадами, образованными разными основаниями, обеспечивает сохранение структуры линейный дуплекс—квадруплексы при различных мутациях. По-видимому, лишь обширные и множественные мутации G-богатых трактов могут предотвратить ее образование. Устойчивость этой структуры обеспечивается, вероятно, и за счет ее сложного строения. Дуплекс и прилегающий к нему квадруплекс могут стабилизировать друг друга. Стабилизация квадруплекса в составе структуры дуплекс—квадруплекс наблюдалась в работе [31].

Мы предполагаем, что квадруплексы образуются во время созревания вирионов либо наряду с формированием линейного дуплекса, либо сразу же после его образования под действием нуклеокапсидного белка. Увеличение локальной концентрации G-богатых трактов при сближении мономерных РНК вследствие образования димера должно способствовать формированию межмолекулярных квадруплексов. Примечательно, что *in vitro* белок NC_p15 может стимулировать димеризацию фрагмента 311—415 нуклеотидов (изолят Mal) [32], не содержащего шпильки DIS и образующего, согласно [24], межмолекулярные квадруплексы. Участие нуклеокапсидного белка в образовании G-квадруплексов может быть, например, связано с необходимостью расплетать двухспиральные участки, включающие G-богатые тракты.

Наличие структуры, показанной на рис. 2, может помочь ответить на некоторые вопросы. Например, почему в отличие от системы *in vitro*, где даже единичные замены в палиндроме шпильки DIS полностью или значительно ингибируют димеризацию [33], *in vivo*, как показано в работе [3], мутации в самокомплементарной последовательности вызывали, в основном, лишь задержку во времени появления инфекционного вируса по сравнению с вирусом дикого типа, а РНК, выделенная из мутантных вирионов, была полностью димерной и такой же стабильной, как в случае вирионов дикого типа. Как следует из рис. 2, нарушение водородных связей между палиндромами двух молекул РНК должно лишь незначительно сказываться на стабильности структуры линейный дуплекс—квадруплексы и практически не должно влиять на структуру всей РНК HIV-1. Последнее подтверждается результатами, полученными в работе [13]. Невозможность образования димера «целующиеся петли» вследствие мутаций в палиндроме может лишь замедлить процесс димеризации, но не исключить ни образования линейного дуплекса, ни квадруплексов, поскольку, как предполагают Хутов и Беркут [13], димеризация РНК HIV-1,

содержащей шпильку DIS с мутациями в самокомплемментарной области, может происходить непосредственно через образование линейного дуплекса без промежуточной стадии — образования димера «целующиеся петли». Однако делеция шпильки DIS или разрушение ее стебля, нарушающие структуру РНК, должны вызывать более значительные дефекты, как это и наблюдалось, например, в работах [6, 7].

В заключение отметим, что при анализе обширной литературы, посвященной димеризации вируса HIV-1 (в списке литературы приведена лишь небольшая ее часть), мы не встретили экспериментальных данных, которые бы опровергали предлагаемую нами модель.

M. I. Zarudnaya, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun

Structural model of dimerization region of human immunodeficiency virus type 1 genome

Summary

A new structural model of dimerization region of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA is proposed and substantiated. It includes two-stranded domain, which is formed by DIS hairpins of monomers and at least two intermolecular four-stranded domains. The model is consistent with the available literature data.

M. I. Zarudna, A. L. Potyahaylo, D. M. Hovorun

Структурна модель області димеризації геному вірусу імунодефіциту людини HIV-1

Резюме

Запропоновано і обґрунтовано нову структурну модель області димеризації геномної РНК вірусу імунодефіциту людини HIV-1. Вона включає двохланцюгову частину, утворену шпильками DIS мономерів, і не менше, ніж дві міжмолекулярні чотириохланцюгові частини. Модель узгоджується з наявними в літературі даними.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Groatorex J., Lever A. Retroviral RNA dimer linkage // *J. Gen. Virol.*—1998.—79, pt 12.—P. 2877—2882.
2. Peliska J. A., Benkovic S. J. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase // *Science.*—1992.—258, N 5085.—P. 1112—1118.
3. Berkhout B., van Wamel J. L. B. Role of the DIS hairpin in replication of human immunodeficiency virus type 1 // *J. Virol.*—1996.—70, N 10.—P. 6723—6732.
4. Haddrick M., Lear A. L., Cann A. J., Heaphy S. Evidence that a kissing loop structure facilitates genomic RNA dimerization in HIV-1 // *J. Mol. Biol.*—1996.—259, N 1.—P. 58—68.
5. Sakuragi J.-I., Panganiban A. T. Human immunodeficiency virus type 1 RNA outside the primary encapsidation and dimer linkage region affects RNA dimer stability *in vivo* // *J. Virol.*—1997.—71, N 4.—P. 3250—3254.
6. Clever J. L., Parslow T. G. Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation // *J. Virol.*—1997.—71, N 5.—P. 3407—3414.

7. Laughrea M., Jette L., Mak J., Kleiman L., Liang C., Wainberg M. A. Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization // *J. Virol.*—1997.—71, N 5.—P. 3397—3406.
8. Skripkin E., Paillart J.-C., Marquet R., Ehresmann B., Ehresmann C. Identification of the primary site of the human immunodeficiency virus type 1 RNA dimerization *in vitro* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91, N 11.—P. 4945—4949.
9. Clever J. L., Wong M. L., Parslow T. G. Requirements for kissing-loop-mediated dimerization of human immunodeficiency virus RNA // *J. Virol.*—1996.—70, N 9.—P. 5902—5908.
10. Paillart J. C., Skripkin E., Ehresmann B., Ehresmann C., Marquet R. *In vitro* evidence for a long range pseudoknot in the 5'-untranslated and matrix coding regions of HIV-1 genomic RNA // *J. Biol. Chem.*—2002.—277, N 8.—P. 5995—6004.
11. Laughrea M., Jette L. A 19-nucleotide sequence upstream of the 5' major splice donor is part of the dimerization domain of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA // *Biochemistry.*—1994.—33, N 45.—P. 13464—13474.
12. Berkhout B., Ooms M., Beerens N., Huthoff H., Southern E., Verhoef K. *In vitro* evidence that the untranslated leader of the HIV-1 genome is an RNA checkpoint that regulates multiple functions through conformational changes // *J. Biol. Chem.*—2002.—277, N 22.—P. 19967—19975.
13. Huthoff H., Berkhout B. Multiple secondary structure rearrangements during HIV-1 RNA dimerization // *Biochemistry.*—2002.—41, N 33.—P. 10439—10445.
14. Muriaux D., De Rocquigny H., Roques B.-P., Paoletti J. NCp7 activates HIV-1_{lat} RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 52.—P. 33686—33692.
15. Takahashi K.-I., Baba S., Chattopadhyay P., Koyanagi Y., Yamamoto N., Takaku H., Kawai G. Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type 1 genome // *RNA.*—2000.—6, N 1.—P. 96—102.
16. Lodmell J. S., Ehresmann C., Ehresmann B., Marquet R. Convergence of natural and artificial evolution on an RNA loop-loop interaction: the HIV-1 dimerization initiation site // *RNA.*—2000.—6, N 9.—P. 1267—1276.
17. Lodmell J. S., Ehresmann C., Ehresmann B., Marquet R. Structure and dimerization of HIV-1 kissing loop aptamers // *J. Mol. Biol.*—2001.—311, N 3.—P. 475—490.
18. Shehu-Xhilaga M., Hill M., Marshall J. A., Kappes J., Crowe S. M., Mak J. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of Pol protein // *J. Virol.*—2002.—76, N 9.—P. 4331—4340.
19. Sakuragi J.-I., Iwamoto A., Shioda T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1 // *J. Virol.*—2002.—76, N 3.—P. 959—967.
20. Sakaguchi K., Zambrano N., Baldwin E. T., Shapiro B. A., Erickson J. W., Omichinski J. G., Clore G. M., Gronenborn A. M., Appella E. Identification of a binding site for the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90, N 11.—P. 5219—5223.
21. Russell R. S., Hu J., Laughrea M., Wainberg M. A., Liang C. Deficient dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA caused by mutations of the U5 RNA sequences // *Virology.*—2002.—303, N 1.—P. 152—163.
22. Abbink T. E., Berkhout B. A novel long distance base pairing interaction in human immunodeficiency virus type 1 RNA occludes the Gag start codon // *J. Biol. Chem.*—2003 (in press).

23. Marquet R., Baudin F., Gabus C., Darlix J. L., Mougel M., Ehresmann C., Ehresmann B. Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism // Nucl. Acids Res.—1991.—19, N 9.—P. 2349—2357.
24. Awang G., Sen D. Mode of dimerization of HIV-1 genomic RNA // Biochemistry.—1993.—32, N 42.—P. 11453—11457.
25. Sundquist W. J., Heaphy S. Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus genomic RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90, N 8.—P. 3393—3397.
26. Weiss S., Häusl G., Famulok M., König B. The multimerization state of retroviral RNA is modulated by ammonium ions and affects HIV-1 full-length cDNA synthesis *in vitro* // Nucl. Acids Res.—1993.—21, N 21.—P. 4879—4885.
27. Simonsson T. G-quadruplex DNA structures — variations on a theme // Biol. Chem.—2001.—382, N 4.—P. 621—628.
28. Marquet R., Paillart J.-C., Skripkin E., Ehresmann C., Ehresmann B. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 RNA involves sequences located upstream of the splice donor site // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 2.—P. 145—151.
29. Zarudnaya M. I., Potyahaylo A. L., Kolomiets I. M., Hovorun D. M. Auxiliary elements of mammalian pre-mRNAs polyadenylation signals // Biopolimery i kletka.—2002.—18, N 6.—P. 500—517.
30. Chowdhury S., Bansal M. Modelling studies on neurodegenerative disease-causing triplet repeat sequences d(GGC/GCC)_n and d(CAG/CTG)_n // J. Biosci.—2001.—26, N 5.—P. 649—665.
31. Macaya R. F., Waldron J. A., Beutel B. A., Gao H., Joesten M. E., Yang M., Patel R., Bertelsen A. H., Cook A. F. Structural and functional characterization of potent antithrombotic oligonucleotides possessing both quadruplex and duplex motifs // Biochemistry.—1995.—34, N 13.—P. 4478—4492.
32. Darlix J.-L., Gabus C., Nugeyre M.-T., Clavel F., Barré-Sinoussi F. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1 // J. Mol. Biol.—1990.—216, N 3.—P. 689—699.
33. Paillart J.-C., Marquet R., Skripkin E., Ehresmann B., Ehresmann C. Mutational analysis of the bipartite dimer linkage structure of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA // J. Biol. Chem.—1994.—269, N 44.—P. 27486—27493.

УДК 577. 21

Надійшла до редакції 11.12.01