

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ НЕТРОПСИНА И HOECHST 33258 С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ

П. О. Вардеванян *, М. А. Парсаданян, А. П. Антонян, В. Г. Саакян

УДК 535.34:547.963.32

Ереванский государственный университет,
0025, Ереван, ул. А. Манукяна, 1, Армения; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

(Поступила 26 сентября 2017)

Спектрофотометрическим методом исследовано взаимодействие желобково связывающихся соединений — пептидного антибиотика (полиамида) нетропсина и флуоресцентного красителя (бис-бензимидазола) Hoechst 33258 — с двухцепочечной ДНК и с синтетическим двухцепочечным полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU). Получены спектры поглощения указанных комплексов лигандов с нуклеиновыми кислотами (НК). Спектральные изменения при комплексообразовании отдельных лигандов с указанными НК выявляют схожесть связывания каждого из этих лигандов и с ДНК, и с РНК. На основании спектроскопических измерений определены параметры связывания нетропсина и Hoechst 33258 с ДНК и poly(rA)-poly(rU) — K и n , а также термодинамические параметры ΔS , ΔG и ΔH . Выявлено, что связывание Hoechst 33258 с обеими НК сопровождается положительным изменением энтальпии, в то время как в случае нетропсина изменение энтальпии отрицательное. При этом вклад энтропийного фактора в образование комплексов более выражен в случае Hoechst 33258.

Ключевые слова: абсорбционная спектроскопия, спектр поглощения, нетропсин, Hoechst 33258, ДНК, poly(rA)-poly(rU), термодинамические параметры.

The interaction of the groove binding compounds — peptide antibiotic netropsin and fluorescent dye (bis-benzimidazole) Hoechst 33258 — with the double-stranded DNA and synthetic double-stranded polynucleotide poly(rA)-poly(rU) has been studied by spectrophotometry. The absorption spectra of these ligand complexes with the nucleic acids have been obtained. Spectral changes at the complexation of individual ligands with the mentioned nucleic acids reveal the similarity of binding of each of these ligands with both DNA and RNA. Based on the spectroscopic measurements, the parameters of netropsin and Hoechst 33258 binding with DNA and poly(rA)-poly(rU) — K and n , as well as the thermodynamic parameters ΔS , ΔG , and ΔH have been determined. It is found that the binding of Hoechst 33258 with both nucleic acids is accompanied by a positive change in enthalpy, while in the case of netropsin the change in enthalpy is negative. Moreover, the contribution of the entropy factor to the formation of the complexes is more pronounced in the case of Hoechst 33258.

Keywords: absorption spectroscopy, absorption spectrum, netropsin, Hoechst 33258, DNA, poly(rA)-poly(rU), thermodynamic parameters.

Введение. Большой класс соединений, связывающихся с ДНК неинтеркаляционным способом, представляют производные лекситропсинов (нетропсин, дистамицин) или бис-амидинов [1—7]. Эти лиганды локализуются в одном из желобков (в большинстве случаев в малом) двухцепочечной ДНК (дц-ДНК) и непосредственно взаимодействуют с парами аденин-тимин (АТ) или гуанин-цитозин (ГЦ), а также краями желобка. Желобковое связывание не вызывает больших конформационных изменений в структуре ДНК, этот тип можно отнести к соответствию “ключ к замку”. Большинство из желобково связывающихся лигандов имеют форму полулуны, такая геометрия особенно подходит

SPECTROSCOPIC STUDY OF THE BINDING OF NETROPSIN AND HOECHST 33258 WITH NUCLEIC ACIDS

P. O. Vardevanyan *, M. A. Parsadanyan, A. P. Antonyan, V. G. Sahakyan (Yerevan State University, 1 A. Manoogian Str., Yerevan, 0025, Armenia; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am)

к контурам малого желобка ДНК [3, 8]. Желобковое связывание обычно стабилизируется гидрофобными силами, поскольку отсутствие структурных изменений в молекуле ДНК не вызывает больших изменений свободной энергии комплекса. При связывании этих лигандов ароматические кольца взаимодействуют со вторым углеродом аденина. На клеточном уровне эти лиганды ингибируют клеточный цикл в фазе G2-M [9, 10].

Желобково связывающиеся с ДНК лиганды интересны тем, что обладают способностью влиять на экспрессию генов за счет селективности к определенным последовательностям. С этой точки зрения некоторые соединения, в частности дистамицин А, СС-1065, Hoechst 33258 (H33258), являются антинеопластическими агентами, флуоресцентными красителями ДНК, обладают антибактериальными, антигрибковыми, противовирусными свойствами. Эти вещества могут применяться с другими лигандами для цитотоксичных целей, а также для уменьшения токсичности других лекарств [11—16]. В частности, совместное применение дистамицина А с дукармицином А уменьшает токсичность последнего в 10 раз [17]. Селективное распознавание малого или большого желобка молекулами лиганда во многом обуславливается гидратной оболочкой этих желобков. Особая упорядоченность гидратной оболочки присуща малому желобку ДНК, в котором молекулы воды, соединенные цепочкой, имеют долговременную “оседлую жизнь” [17]. Эта цепочка образует водный “хребет” малого желобка и сшивает его края, что и предопределяет геометрические особенности этого желобка [17]. Связывание лигандов в малом желобке вызывает разрушение упорядоченности водного хребта, что обуславливает энтропийную природу этого процесса. При этом гидратация молекул лиганда, перемещенных из раствора в связанное состояние, может возрастать примерно на порядок, что, однако, является энтропийно невыгодным [17]. Таким образом, очевидно, что селективное связывание лигандов в малом желобке ДНК обусловлено водой, которая стабилизирует комплексы за счет образования водных мостиков между молекулами лиганда и стенками малого желобка [9, 17—19].

Вода играет важную роль в установлении конформаций НК. В частности, А- и В-формы ДНК в основном обусловлены водой, тогда как в физиологических условиях РНК всегда находится в А-конформации [20]. При этом двухцепочечная структура РНК (дц-РНК) намного стабильнее, чем ДНК [2]. В последнее время интерес к РНК возрос, поскольку ее структурная организация играет ключевую роль в различных процессах клеточного цикла, вследствие чего разные виды этой молекулы являются удобной мишенью для изучения метаболических процессов. В связи с этим возрастает роль РНК в области медицинских и химико-биологических исследований, что обусловлено активным участием этой биомакромолекулы не только в экспрессии генов, но и в ферментативных процессах. Интерес к РНК обусловлен и тем, что ее можно использовать в диагностических целях, при изучении инициированных вирусами заболеваний [21—24]. Существует несколько путей, которые регулируют апоптоз с участием РНК, так как известно, что геном различных ретровирусов, в том числе онковирусов, содержит РНК [21—24]. Как и ДНК, РНК имеет большое структурное разнообразие благодаря ее способности к образованию вторичных и третичных структур [21—24]. Тем не менее функциональные аспекты РНК в дц-состоянии нельзя считать полностью установленными, поэтому возникает необходимость исследований в этом направлении. С этой точки зрения одним из подходов может стать сравнительное изучение комплексообразования дц-ДНК и дц-РНК с различными лигандами, которые специфически связываются с ДНК. Удобными представляются синтетические дц-полирибонуклеотиды, не образующие структур более высокого порядка, например poly(rA)-poly(rU), который по структуре похож на природную РНК [25, 26].

Цель данной работы — исследование взаимодействия нетропсина и H33258 с дц-ДНК и синтетическим двуспиральным полинуклеотидом poly(rA)-poly(rU) (А-форма) методом абсорбционной спектроскопии и определение термодинамических параметров связывания.

Эксперимент. Использованы poly(rA)-poly(rU), нетропсин, ДНК тимуса теленка и H33258 (Sigma, США). Связывание нетропсина и H33258 с poly(rA)-poly(rU) и ДНК тимуса теленка исследовано в водном растворе, содержащем 0.1 М NaCl и 0.01 М *трис*-буфер, pH 7.4. Маточные растворы всех препаратов разбавлены до получения рабочих растворов указанным буфером.

Концентрации ДНК, poly(rA)-poly(rU), нетропсина и H33258 определены спектрофотометрически с использованием следующих коэффициентов экстинкции ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$): для ДНК $\varepsilon_{260}(P) = 6600$ [27], для poly(rA)-poly(rU) $\varepsilon_{260}(P) = 7140$ [27], для нетропсина $\varepsilon_{296}(P) = 21500$ [28], для H33258 $\varepsilon_{343}(P) = 42000$ [29]. Спектрофотометрическое титрование проведено на спектрофотометре Pye Unicam SP8-100 (Великобритания). Измерения проведены в термостатированных ячейках с 1-см кварцевыми кюветами с герметически закрывающимися крышками.

Изотермы адсорбции построены на основании анализа спектров поглощения комплексов ДНК–лиганд и poly(rA)-poly(rU)–лиганд в координатах Скэтчарда, как описано в [20]. Изотермы связывания лигандов с ДНК и poly(rA)-poly(rU) получены при трех температурах (20, 30 и 40 °C), при которых ДНК и poly(rA)-poly(rU) находятся в двуспиральном состоянии. Методом наименьших квадратов через экспериментальные точки построены кривые согласно формуле [20]:

$$\frac{r}{C_f} = K \left[\frac{1-nr}{1-(n-1)r} \right]^n (1-(n-1)r), \quad (1)$$

а также определены константы связывания (K) и число пар оснований нуклеиновой кислоты (НК), которые становятся исключенными при связывании одной молекулы лиганда (n). В формуле (1) C_f и C_b — концентрации свободного и связанного лигандов; C_p — концентрация НК, $r = C_b/C_p$.

Результаты и их обсуждение. Вещества семейства лекситропинов, в том числе нетропсин и дистамицин, являются специфически связывающимися с ДНК соединениями, чем обусловлен большой интерес к ним [30]. Эти лиганды предпочтительнее связываются в малом желобке ДНК, в АТ-богатых участках, однако в этом случае важное значение имеет последовательность этих оснований. В частности, с 5'-ААТТ и 5'-АТАТ эти лиганды связываются предпочтительнее, чем с 5'-ТТАА и 5'-ТАТА [10].

Большой размер лигандов приводит к тому, что длина участка связывания составляет 5–6 пар оснований [31]. При этом внедрение некоторых лигандов в малый желобок ДНК сопровождается высоким сродством и экзотермической энтальпией или благоприятной энтропией связывания. В целом взаимодействие характеризуется компенсационным механизмом энтальпия—энтропия.

Особенности связывания лигандов с ДНК отражаются на их оптических характеристиках, что позволяет спектроскопическими методами изучать молекулярные механизмы взаимодействия лигандов с НК. Кроме того, на основании результатов спектроскопических исследований можно с достаточной большой точностью проводить термодинамический анализ исследуемой системы. Для установления особенностей связывания нетропсина и Н33258 с РНК проведены спектрофотометрические измерения комплексообразования этих лигандов с poly(rA)-poly(rU).

На рис. 1 приведены спектры поглощения Н33258 при комплексообразовании с poly(rA)-poly(rU) при $T = 20$ °C в интервале $220 \leq \lambda \leq 500$ нм (аналогичные спектры получены для комплексов Н33258–poly(rA)-poly(rU) при $T = 30$ и 40 °C, а также Н33258–ДНК, нетропсин–ДНК и нетропсин–poly(rA)-poly(rU) при $T = 20, 30$ и 40 °C). Как видно, максимум поглощения Н33258 соответствует $\lambda = 343$ нм. С увеличением концентрации poly(rA)-poly(rU) в растворе интенсивность в максимумах спектров поглощения комплексов уменьшается. Отметим, что при повышении концентрации poly(rA)-poly(rU) в диапазоне $0.33 \leq r \leq 0.05$ (где $r = \text{лиганд/НК}$) во избежание разбавления одновременно в рабочий раствор лиганда добавлялся Н33258 соответствующего объема из маточного раствора. Помимо уменьшения интенсивности максимумов Н33258 в присутствии poly(rA)-poly(rU) имеет место их небольшое смещение в длинноволновую сторону на ~ 5 – 7 нм.

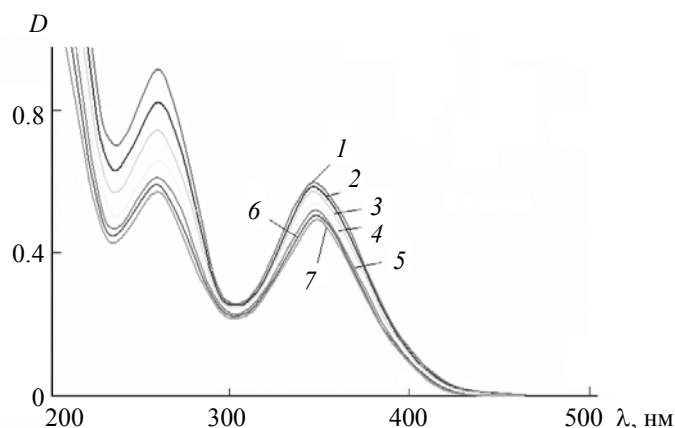


Рис. 1. Спектры поглощения Н33258 (1) и его комплексов (2–7) с poly(rA)-poly(rU) (РНК); исходная концентрация Н33258 $C_0 = 2.2 \cdot 10^{-5}$ моль/л по ходу титрования раствором НК оставалась постоянной; концентрационное соотношение лиганд/НК варьировалось в интервале $-0.33 \leq r \leq 0.05$

Аналогичный эффект наблюдается в случае взаимодействия нетропсина с poly(rA)-poly(rU). Эти спектральные изменения указывают на то, что H33258 образует комплексы с полинуклеотидом, поскольку в области $\lambda \geq 300$ нм НК не поглощают и, следовательно, изменения при ~ 345 нм в спектрах H33258 (а также нетропсина) при комплексообразовании с НК характеризуют специфическое связывание этих лигандов с poly(rA)-poly(rU). Необходимо отметить, что спектральные изменения комплексов нетропсина и H33258 с дц-ДНК и дц-poly(rA)-poly(rU) схожи (поэтому спектры не приведены) и совпадают с данными [8, 32]. Это свидетельствует о том, что специфические к дц-ДНК лиганды могут с той же вероятностью связываться с дц-участками РНК.

На основании спектров поглощения нетропсина и H33258 с дц-ДНК и дц-poly(rA)-poly(rU) построены кривые связывания этих лигандов с указанными НК по формуле (1). На рис. 2 представлены кривые связывания нетропсина и H33258 с poly(rA)-poly(rU) при 20, 30 и 40 °С (аналогичные кривые, полученные при взаимодействии этих лигандов с ДНК, не приводятся). Параметры K и n для комплексов нетропсина и H33258 с ДНК (В-формой) и синтетическим двуспиральным полирибонуклеотидом poly(rA)-poly(rU) (А-формой) при разных температурах рассчитаны по формуле (1) и приведены в табл. 1 и 2. В случае нетропсина значения K в ~ 4 —5, а в случае H33258 в 2—3 раза больше при связывании с В-формой, чем с А: оба лиганда с более гидратированной В-формой образуют более прочные комплексы, чем с менее гидратированной А-формой. Это может быть обусловлено тем, что геометрические размеры малого желобка двуспиральных НК при В- и А-формах различаются: ширина малого желобка А-ДНК намного больше, чем большого [19]. В случае H33258 на значение K влияет также то, что предпочтительными являются последовательности, в которых содержатся ГЦ-пары с обоих концов центральных АТ-пар [25], которые отсутствуют в poly(rA)-poly(rU). Различаются также n : $n \approx 6$ в случае ДНК и $n \approx 8$ в случае poly(rA)-poly(rU), что является результатом различий геометрических характеристик В- и А-форм.

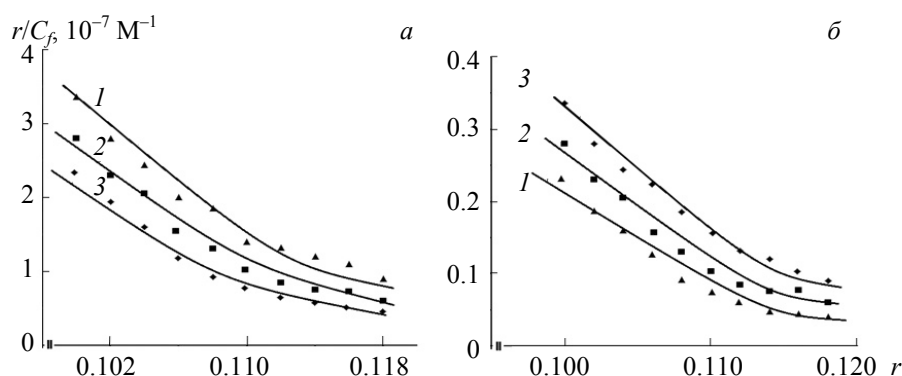


Рис. 2. Изотермы связывания нетропсина (а) и Hoechst 33258 (б) с poly(rA)-poly(rU), полученные при температурах 20 (1), 30 (2) и 40 °С (3)

Определены изменения свободной энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии (ΔS) при образовании комплексов указанных лигандов с НК. Эти параметры определены по общепринятому методу, описанному в работе [21] и подробно проанализированному в [22]. Полученные данные приведены в табл. 1 и 2. В случае комплексов нетропсина с ДНК и РНК ΔH одинаковы ($\Delta H \approx -9.1$ ккал/моль). Что касается ΔS , то при образовании комплексов ДНК–нетропсин оно изменяется больше по сравнению с комплексами РНК–нетропсин. Следовательно, при образовании комплексов нетропсин–НК структура двойной спирали больше изменяется для ДНК.

В случае H33258 ΔH претерпевает положительное изменение. Это указывает на то, что увеличение температуры от 20 до 40 °С приводит к возрастанию значений K . По-видимому, повышение температуры в указанной области способствует благоприятному гидрофобному переносу молекул этого лиганда из водного окружения в малый желобок. Очевидно, что в случае взаимодействия нетропсина и H33258 с дц-ДНК и дц-РНК результаты, с одной стороны, находятся в соответствии, а с другой — расходятся. Вероятно, положительное изменение ΔH обусловлено тем, что H33258 является довольно жесткой молекулой, вследствие чего при образовании комплекса и молекула лиганда, и молекула ДНК практически не претерпевают конформационных изменений.

Т а б л и ц а 1. Термодинамические параметры связывания нетропсина с двуспиральными нуклеиновыми кислотами

$T, ^\circ\text{C}$	$K \cdot 10^{-8}, \text{M}^{-1}$	$-\Delta G, \text{ккал/моль}$	$-\Delta H, \text{ккал/моль}$	$\Delta S, \text{кал}/(\text{моль} \cdot \text{K})$	n
<i>ДНК</i>					
20	5.0±0.2	11.73±0.03	9.1	8.6	6.0±0.1
30	3.0±0.2	11.83±0.04			5.9±0.2
40	1.9±0.2	11.93±0.05			6.0±0.2
<i>poly(rA)-poly(rU)</i>					
20	1.20±0.02	10.9±0.1	9.1	5.9	8.0±0.2
30	0.72±0.03	10.96±0.04			8.1±0.2
40	0.44±0.02	11.02±0.03			8.0±0.2

Т а б л и ц а 2. Термодинамические параметры связывания Hoechst 33258 с двуспиральными нуклеиновыми кислотами

$T, ^\circ\text{C}$	$K \cdot 10^{-8}, \text{M}^{-1}$	$-\Delta G, \text{ккал/моль}$	$\Delta H, \text{ккал/моль}$	$\Delta S, \text{кал/}(\text{моль} \cdot \text{K})$	n
<i>ДНК</i>					
20	0.55±0.05	10.5±0.03	+6.0±0.5	56±0.5	6.0±0.1
30	0.85±0.05	11.0±0.04			6.0±0.1
40	1.05±0.05	11.5±0.05			6.0±0.1
<i>poly(rA)-poly(rU)</i>					
20	0.20±0.05	10.0±0.5	+8.5±0.1	62±0.5	6.2±0.2
30	0.33±0.05	10.5±0.5			6.5±0.2
40	0.50±0.05	11.0±0.5			7.1±0.2

Показано, что специфические атомные взаимодействия, такие как водородные связи, вносят не-большой вклад в наблюдаемую свободную энергию связывания [2]. В случае некоторых лигандов при 25 °C связывание носит энтальпийный, в то время как для Н33258 — энтропийный характер, что выявлено из полученных нами данных (табл. 2).

Закключение. Исследования по взаимодействию нетропсина и Hoechst 33258 с двухцепочечными poly(rA)-poly(rU) и ДНК показывают, что метод абсорбционной спектроскопии является достаточно чувствительным и позволяет выяснить молекулярные механизмы взаимодействия макромолекул с низкомолекулярными веществами. Полученные с помощью этого метода данные позволяют провести полный термодинамический анализ комплексообразования лигандов с двухцепочечными ДНК и РНК. Установлено, что специфическое связывание этих лигандов в малом желобке зависит не только от типа пар оснований в нем, но и от геометрических особенностей. Несмотря на то что оба лиганда предпочтительнее связываются с парами аденин-тимин (аденин-урацил) практически одинаковым механизмом, в случае нетропсина это взаимодействие сопровождается отрицательным изменением энтальпии, в то время для Hoechst 33258 — положительным. При этом вклад энтропийного фактора в образование комплексов более выражен в случае Hoechst 33258, что имеет, вероятно, компенсирующее значение для стабилизации комплексов. Полученные данные также позволяют заключить, что ДНК в некоторых случаях является более предпочтительной мишенью для лигандов, чем РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки Республики Армения в рамках научного проекта № 15T-1F105.

- [1] D. Rentzeperis, L. A. Marky, T. J. Dwyer, B. H. Gelerstanger, J. G. Pelton, D. E. Wemmer. Biochemistry, **34**, N 9 (1995) 2937—2945
- [2] A. N. Lane, T. C. Jenkins. Q. Rev. Biophys., **33**, N 3 (2000) 255—306
- [3] S. K. R. Gowda, B. B. Mathew, C. N. Sudhmani, H. S. B. Naik. Biomed. Biotechnol., **2**, N 1 (2014) 1—6
- [4] T. H. Doung, K. Zakrzewska. J. Biomol. Struct. Dyn., **14**, N 6 (1997) 691—701
- [5] Y.-Y. Fang, V. R. Morris, G. M. Lingani, W. M. Southerland. Open Conf. Proc. J., N 1 (2010) 157—163

- [6] Ю. С. Бабаян, Л. Е. Ксодо, Дж. Манзини. Биофизика, **33**, N 4 (1988) 716—721
- [7] E. A. Lewis, M. Munde, S. Wang, M. Retting, V. Le, V. Machha, W. D. Wilson. Nucl. Acid. Res., **39**, N 22 (2011) 9649—9658
- [8] В. Зенгер. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, Москва, Мир (1987) 418—520
- [9] R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother. Curr. Opt. Biotechnol., **18**, N 6 (2007) 497—503
- [10] K. Mišković, M. Bujak, M. B. Loncar, L. Glavas-Obrovac. Arh. Hig. Rad. Toxicol., **64**, N 4 (2013) 593—602
- [11] T. Yamori, A. Matsunaga, S. Sato, K. Yamazaki, A. Komi, K. Ishizu, I. Mita, H. Edatsugi. Cancer Res., **59** (1999) 4042—4049
- [12] M. H. David-Cordonnier, M. P. Hildebrand, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, C. Keuser. Eur. J. Med. Chem., **42** (2007) 752771
- [13] B. K. Bhuyan, K. A. Newell, S. L. Crampton, D. D. Von Hoff. Cancer Res., **42** (1982) 3532—3537
- [14] X. Wanga, N. Chub, N. Wanga, L. Q. Chao, C. Jianga, X. Wanga, T. Ikejima, M. Chenga. Bioorg. Med. Chem. Lett., **22** (2012) 6297—6300
- [15] M. Hirota, T. Fujiwara, S. Mineshita, H. Sugiyama, H. Teraoka. Int. J. Biochem. Cell. Biol., **39** (2007) 988—996
- [16] В. В. Костюков, М. П. Евстигнеев. Физика живого, **18**, N 2, (2010) 34—40
- [17] B. Nguen, S. Neidle, D. W. Wilson. Acc. Chem. Res., **42** (2009) 11—21
- [18] N. N. Degtyareva, B. D. Wallace, A. R. Bryant, K. M. Loo, J. T. Petty. Biophys. J., **92** (2007) 959—965
- [19] X. Shi, R. B. J. Macgregor. Biophys. Chem., **125** (2007) 471—482
- [20] П. О. Вардеванян, М. А. Парсаданян, А. П. Антонян, С. Н. Акопян. Журн. физ. химии, **91**, N 6 (2017) 1071—1073
- [21] D. R. Corey. J. Clin. Invest., **117** (2007) 3615
- [22] C. N. N'soukpoue-Kossi, C. Descoteaux, E. Asselin, H. A. Tajmir-Riahi, G. Berube. DNA Cell Biol., **27** (2008) 1
- [23] S. R. Kirk, Y. Tor. Bioorg. Med. Chem., **7** (1999) 1979
- [24] S. Fulle, H. Gohlke. J. Mol. Recognit., **23** (2010) 220
- [25] S. Nafisi, F. Manouchehri, M. Bonsaii. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **111** (2012) 27
- [26] D. Khaitan, M. E. Dinger, J. Mazar, J. Crawford, M. A. Smith, J. S. Mattick, R. J. Perera. Cancer Res., **71** (2011) 3852
- [27] Д. Фрайфельдер. Физическая биохимия, Москва, Мир (1980)
- [28] J. Lah, N. Carl, I. Drobnak, B. Šumiga, G. Vesnaver. Acta Chim. Slov., **53** (2006) 284
- [29] S. Y. Breusegem, F. G. Loontjens, P. Regenfuss, R. M. Clegg. Methods Enzyme J., **340** (2001) 212
- [30] I. H. Stockley. In "Stockley's Drug Interactions", 6th ed., London, Pharm. Press (2002) 1080—1081
- [31] L. Tabernero, N. Verdager, M. Coll, I. Fita, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, J. Aymami. Biochemistry, **32**, N 33 (1993) 8403—8410
- [32] P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, K. V. Pirumyan, A. M. Muradyan, A. T. Karapetian. J. Biomol. Struct. Dyn., **25**, N 6 (2008) 641—646
- [33] J. A. Parkinson, S. E. Ebrahimi, J. H. Mckie, K. T. Douglas. J. Biochem., **33** (1994) 8442—8452