

МЕТОДЫ

УДК 57.088.1

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ НУКЛЕОСОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ МЕТОДОМ ФЁРСТЕРОВСКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

О.В. Чертков^{1,2}, М.Е. Валиева¹, Н.В. Малюченко¹, А.В. Феофанов^{1,2,*}¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

На основе эффекта Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) разработана методика анализа структуры (Cy3, Cy5)-меченных нуклеосом в полиакриламидном геле после электрофореза в нативных условиях. Показано, что корректное применение этой методики требует контроля за неспецифическим межмолекулярным FRET и поглощением флуоресценции. Проведен сравнительный анализ результатов FRET-измерений двух типов нуклеосом и их комплексов с дрожжевым белком FACT, который подтвердил сходство структурных особенностей нуклеосом, выявляемых в геле и в водном растворе. Применение FRET-анализа в комбинации с электрофорезом позволяет не только разделить и визуализировать компоненты сложной смеси, оценив их относительное содержание, но и охарактеризовать структурные отличия этих компонентов *in situ*.

Ключевые слова: нуклеосома, флуоресценция, электрофорез, перенос энергии, микроскопия, эпигенетика

Первым уровнем структурной организации хроматина является нуклеосома, состоящая из участка ДНК длиной 147 пар нуклеотидов (п.н.), уложенного в виде 1,7 витка на поверхности октамера гистонов. Короткие фрагменты ДНК длиной 150–350 п.н., содержащие одиночные нуклеосомы, являются удобной экспериментальной системой для исследования многих сложных процессов, происходящих в ядре, таких как структурные перестройки нуклеосомы под действием белковых факторов [1], АТФ-зависимое ремоделирование хроматина [2], транскрипция [3], репликация [4] и репарация [5] ДНК. Исследования с использованием моонуклеосом проводятся с применением различных физико-химических подходов, начиная от высокотехнологичных, таких как рентгеноструктурный анализ [6], крио-электронная микроскопия [7], spFRET-микроскопия (микроскопия одиночных частиц на основе FRET – Фёрстеровского резонансного переноса энергии) [1, 8–13], и заканчивая более традиционными, но достаточно информативными методами гель-фильтрации [14], футпринтинга и электрофореза [15].

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в нативных условиях является простым и востребованным методом анализа белок-белковых и ДНК-белковых комплексов, позволяющим разделять их в зависимости от заряда и размера. Применительно к исследованию нуклеосом электрофорез используется для визуализации и разделения различных комплексов нуклеосом с белками, анализа про-

дуктов транскрипции и репликации *in vitro* [4], изучения условий образования субнуклеосомных (гексасомы, тетрасомы) и полинуклеосомных частиц. При этом в большинстве исследований окраска разделенных в геле компонентов используется для анализа их относительного количества и состава.

Введение в нуклеосому или анализируемый комплекс двух флуорофоров (донора и акцептора), между которыми реализуется FRET, дает возможность изучать структурные изменения в области расположения меток, что широко используется в исследованиях, проводимых в растворе, и в частности, в spFRET-микроскопии. Современная приборная база технически позволяет проводить измерения FRET и в геле, что способно значительно расширить информативность электрофоретического анализа. В то же время исследования нуклеосом с измерением FRET в геле проводились лишь в единичных случаях, с применением двух пар меток (Cy3B и ATTO647N [9], Alexa 488 и Alexa 594 [10]), и эти подходы требуют дальнейшей детальной разработки.

В настоящей работе описывается новая методика измерения FRET в геле для нуклеосом, меченных донор-акцепторной парой флуорофоров Cy3 и Cy5. На примере нуклеосом и их комплексов с дрожжевым белком yFACT (от англ. yeast и Facilitates Chromatin Transcription) показано, что структурные особенности, выявляемые на основе FRET-анализа в геле, согласуются с результатами исследований аналогичных образцов в водных растворах. Это подтверждает перспективность комбинирования

методик электрофореза с FRET-анализом для структурных исследований компонентов сложных реакционных смесей *in situ*.

Материалы и методы

В работе использовали: наборы для очистки фрагментов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и экстракции ДНК из геля фирмы Qiagen; ферменты рестрикции, ДНК-лигазу фага T4 и ДНК-полимеразу Taq фирмы New England Biolabs.

Флуоресцентно-меченные ДНК-матрицы с сильной нуклеосомпозиционирующей последовательностью s603 длиной 147 п.н. получали при помощи ПЦР с использованием следующих флуоресцентно-меченных праймеров:

M_Fw 5' – AGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTCTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCT*,

M_Rev 5' – ACCCCAGGGACTT*GAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGGTGGTTAGCCTTGA,

P_Fw 5' – CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCT*CCCTCCTTCCGTGTGTTGTCTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTT,

P_Rev 5' – GATTGGT*GGCACGTAGCTACAATTCTCCGGGAGGCAAGGAATAATGAAGTTTCAGGGACCCCA,

где T* и T# — это, соответственно, Cy3- и Cy5-меченные нуклеотиды. Пары праймеров (P_Fw, P_Rev) и (M_Fw, M_Rev) использовали для получения ДНК-матриц с различным положением меток: соответственно, +13, +91 и +35, +113 п.н. от входа ДНК в нуклеосому.

Выделение и очистку ДНК-матриц, а также лигирование матрицы, меченной по положениям +13 и +91, с промоторным участком длиной 137 п.н. проводили, как описано ранее [11].

В качестве источника коровых гистонов для сборки нуклеосом на матрице, меченной по положениям +13 и +91 (далее нуклеосомы N(+13, +91)), использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [16]. Нуклеосомы N(+13, +91) собирали на ДНК-матрице в ходе диализа против NaCl в уменьшающихся концентрациях по протоколу, описанному ранее [16].

Нуклеосомы с метками в положениях +35 и +113 (далее нуклеосомы N(+35, +113)) собирали на октамере рекомбинантных гистонов лягушки *Xenopus laevis* в ходе диализа против NaCl в уменьшающихся концентрациях по протоколу, описанному ранее [17].

Комплексы N(+35, +113) с yFACT получали, как описано ранее [6] в буфере, содержащем 17 mM HEPES, 2 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,8 mM Na₃EDTA, 0,11 mM 2-меркаптоэтанол, 11 mM NaCl, 1,1% глицерина и 12% сахарозы.

Электрофорез в нативных условиях проводили в 4%-ном ПААГ (акриламид:бисакриламид — 39:1) в буфере, содержащем 44,5 mM Трис-борат, 1 mM EDTA в течение 15–20 мин при 200 В. Нуклеосомы загружали в гель, добавив в раствор с ними 10% сахарозы. FRET-анализ полученного геля выполняли на приборе Typhoon Trio (GE Healthcare, США).

Для измерения сигнала FRET в геле исследуемые образцы подвергали электрофорезу в нативных условиях в 4%-ном ПААГ. После завершения электрофореза изображения распределения флуоресценции Cy3 и Cy5 в геле регистрировали в диапазонах 565–595 нм (сигнал Cy3) и 655–685 нм (сигнал Cy5) при возбуждении лазером с длиной волны 532 нм, контролируя отсутствие насыщения детектора (рисунок, Г и Е).

Интенсивность флуоресценции Cy3 и Cy5 в полосах интересующих компонентов определяли с помощью программы Gel analyzer (<http://www.gelanalyzer.com/index.html>), выбирая для оцифровки идентичные области на изображениях распределения сигналов Cy3 и Cy5. Интенсивности рассчитывали, вычисляя площади под соответствующими пиками с поправкой на базу.

Измеренные значения интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5 (соответственно, I₃ и I₅) использовали для расчёта эффективности FRET (E) с помощью уравнения:

$$E = (I_5 - 0,17I_3) / (I_5 + 0,83I_3) \quad (1),$$

где коэффициенты 0,17 и 0,83 введены для учета перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в диапазоне 655–685 нм.

Нуклеосомы N(+13, +91) выделяли из геля, как описано ранее [1]. spFRET-анализ нуклеосом N(+35, +113) и их комплексов с yFACT в растворе проводили по методике, описанной ранее [1, 11]. Результаты spFRET-измерений представляли в виде распределения нуклеосом по величине E и рассчитывали среднюю по выборке величину E (E_{ср}).

Результаты и обсуждение

Разработку методики измерения FRET в геле проводили с использованием нуклеосом, меченных донор-акцепторной парой флуорофоров Cy3 и Cy5 в двух разных участках нуклеосомы. В нуклеосомах N(+13, +91) метки, введенные в соседние суперспиральные витки ДНК, расположены вблизи входа ДНК в нуклеосому, а в N(+35, +113) — в срединной части нуклеосомы (рисунок, А). Как показано нами ранее, оба варианта мечения обеспечивают высокую эффективность FRET при измерениях методом spFRET-микроскопии в растворе и позволяют надежно выявлять изменения в укладке ДНК на гистоновом коре при воздействии различных факторов [11–13]. Помимо положения меток, N(+13, +91) и N(+35, +113) отличаются по происхождению коровых гистонов: для сборки N(+13, +91) использовали хроматин без гистона H1, выделенный

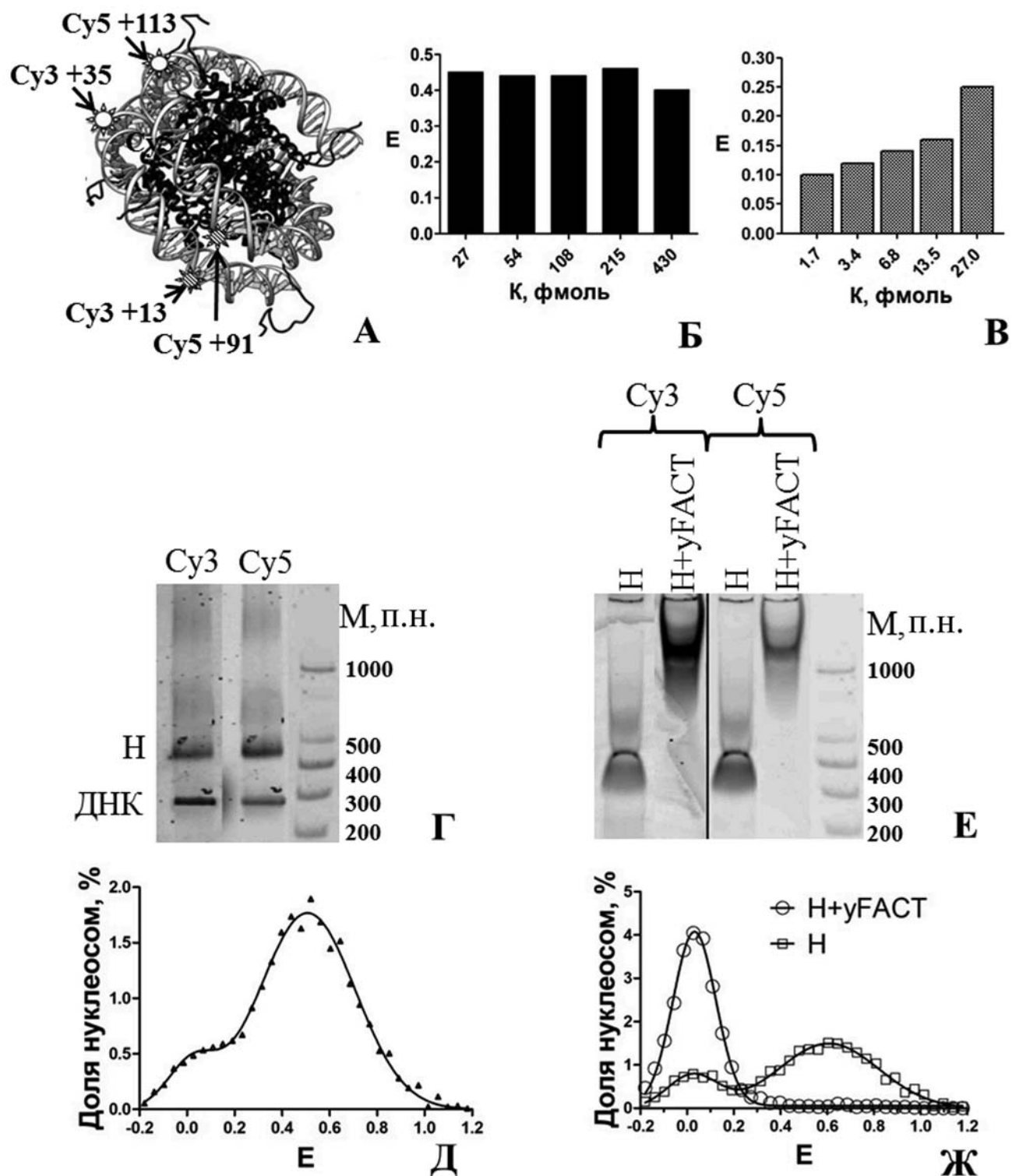


Рисунок. Анализ структуры нуклеосом в полиакриламидном геле методом FRET. А – Структура коровой части нуклеосомы и положения меток Cy3 и Cy5 в центральной части (+35 и +113) и вблизи входа ДНК в нуклеосому (+13 и +91). Октамер гистонов показан черным цветом. Б, В – Измеренные в геле величины E для нуклеосом (Б) и ДНК-матрицы (В), меченых по положениям +13 и +91, при разном количестве K образца, нанесенного на дорожку. Г, Е – Электрофореграммы нуклеосом N(+13,+91) (Г), N(+35,+113) и их комплексов с uFACT (Е). Дорожки Cy3 и Cy5 – распределения флуоресценции соответствующих меток при возбуждении 532 нм и регистрации сигнала соответственно в области 565–595 нм (Cy3) или 655–685 нм (Cy5). Н – нуклеосомы. М – маркеры ДНК с указанием их размеров в парах нуклеотидов (п.н.). Количество нанесенного образца – 54 фмоль на дорожку. Д, Ж – Измеренные методом spFRET-микроскопии в растворе распределения по величине E нуклеосом N(+13,+91), выделенных из геля (Д), а также N(+35,+113) и их комплексов с uFACT (Ж). Символами показаны экспериментальные данные. Сплошные линии – результаты аппроксимации экспериментальных данных суммой двух Гауссовых полос

из эритроцитов цыплят, а для N(+35, +113) — октамер рекомбинантных гистонов лягушки *X. laevis*.

Исследуемые образцы подвергали электрофорезу в нативных условиях в 4%-ном ПААГ, а измерение сигнала FRET в геле выполняли, как описано в разделе *Материалы и методы*. Чтобы исключить влияние на измеряемые интенсивности эффекта перепоглощения флуоресценции, с помощью флуоресцентно-меченных праймеров, несущих одну метку (Cy3 или Cy5), был определен диапазон (27–432 фмоль), в котором интенсивность флуоресценции в полосе на геле линейно зависела от количества нанесенного на дорожку образца (данные не приведены).

Обнаружено, что при возбуждении Cy3 часть флуоресценции этого хромофора проявляется и на изображении распределения флуоресценции Cy5. Это связано с частичным перекрыванием спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 655–685 нм и требует учета при расчете эффективности FRET (уравнение (1)). Прямого возбуждения флуоресценции Cy5 лазером с длиной волны 532 нм не обнаружено.

Концентрирование (Cy3, Cy5)-меченных молекул в геле в процессе электрофореза может в дополнение к внутримолекулярному FRET вызывать появление неспецифического межмолекулярного FRET, который обусловлен пространственной близостью меченых молекул. Для учета этого эффекта нами были измерены величины E при различных загрузках матрицы ДНК и нуклеосом, меченых по положениям +13 и +91 (рисунок, Б и В). Было установлено, что в случае нуклеосом величина E остается постоянной при разных количествах (K) загруженных в гель нуклеосом (27–430 фмоль на дорожку), что указывает на незначительный вклад межмолекулярного FRET в измеряемую величину. Однако в случае свободной ДНК в геле обнаружена явная зависимость величины E от K (рисунок, В). В то же время измерения в растворе показывают, что эффективность FRET для линейной формы свободной ДНК (+13, +91) равна нулю из-за большого расстояния между Cy3 и Cy5 [1]. Таким образом, наблюдаемый для ДНК в геле FRET обусловлен неспецифическими межмолекулярными взаимодействиями, и он проявляется даже при очень низкой загрузке ДНК (1,7 фмоль на дорожку). Основной причиной наблюдаемого межмолекулярного FRET, по-видимому, является очень сильное концентрирование ДНК в электрическом поле при движении в геле. На это указывает высокая локальная яркость сигнала флуоресценции ДНК и маленькая по сравнению с нуклеосомами толщина линий ДНК в геле (рисунок, Г и Е). Кроме того, известно, что при движении ДНК способна ориентироваться вдоль потока, что также может способствовать более плотной упаковке соседних молекул ДНК в геле и усилению межмолекулярного FRET.

Нуклеосомы N(+13, +91) в геле разделяются на две полосы: собственно нуклеосомы и свободную ДНК (рисунок, Г). Это связано с неполной сборкой нуклеосом на ДНК-матрице в исследованном образце. Измеренное значение эффективности FRET для полосы нуклеосомы в геле равнялось 0,47, что близко к величине $E_{\text{ср}} = 0,46$, рассчитанной для нуклеосом N(+13, +91), выделенных из геля и исследованных в растворе методом spFRET-микроскопии (рисунок, Д). В полосе ДНК значение эффективности FRET равно 0,14, что, как обсуждалось выше, определяется неспецифическим межмолекулярным FRET, характерным для свободной ДНК в геле.

Чтобы подтвердить соответствие величин эффективности FRET (а, следовательно, и структурных особенностей), измеренных для нуклеосом в геле, значениям эффективности FRET в растворе, нами был проведен FRET-анализ в геле нуклеосом N(+35, +113) и их комплексов с уFACT. уFACT является хроматин-ремоделирующим белковым комплексом и шапероном гистонов. Ранее для нуклеосом, собранных с использованием хроматина из эритроцитов цыплят, нами было обнаружено, что уFACT способен обратимо и АТФ-независимо раскручивать нуклеосомную ДНК без потери гистонов [1]. Проведенные нами измерения методом spFRET-микроскопии в растворе показали, что аналогичный эффект уFACT реализуется и в случае N(+35, +113), собранных на рекомбинантных гистонах лягушки (рисунок, Ж). На это в распределении комплексов N(+35, +113) с уFACT по эффективности FRET указывают: исчезновение состояния с большими значениями E , характерными для плотноупакованных нуклеосом; появление доминирующего состояния с низкими значениями E , характерными для раскрученной нуклеосомной ДНК (рисунок, Ж). Сходные изменения в эффективности FRET наблюдаются для комплексов N(+35, +113) с уFACT и в геле (рисунок, Е). Так, в геле для N(+35, +113) и их комплексов с уFACT были получены значения E , которые соответственно равны 0,46 и 0,13. Эти значения хорошо согласуются с величинами $E_{\text{ср}}$ 0,49 и 0,08, определенными для N(+35, +113) и их комплексов с уFACT методом spFRET-микроскопии в растворе.

Проведенные исследования показывают, что в процессе электрофореза в нативных условиях у нуклеосом и их комплексов с белками сохраняются структурные особенности, характерные для водных растворов, а методика измерения FRET в геле позволяет выявить их. При этом в геле происходит разделение компонентов, состояний и комплексов нуклеосом, имеющих различную электрофоретическую подвижность, что дает возможность визуализировать их, оценить относительное содержание, а с помощью FRET-анализа — еще и изучить структурные отличия. FRET-анализ в геле имеет широкий спектр приложений, выходящий

далеко за границы исследований нуклеосом и их комплексов. Однако, как показывает пример свободной ДНК, разработка и применение FRET-анализа в геле требует контроля за неспецифическим

межмолекулярным FRET и перепоглощением флуоресценции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
2. Dechassa M.L., Sabri A., Pondugula S., Kassabov S.R., Chatterjee N., Kladde M.P., Bartholomew B. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 38. N 4. P. 590–602.
3. Kulaeva O.I., Hsieh F.K., Studitsky V.M. RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. N 25. P. 11325–11330.
4. Chang H.W., Pandey M., Kulaeva O.I., Patel S.S., Studitsky V.M. Overcoming a nucleosomal barrier to replication // *Sci. Adv.* 2016. Vol. 2. N 11. e1601865.
5. Pestov N.A., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Studitsky V.M. Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage // *Sci. Adv.* 2015. Vol. 1. N 6. e1500021.
6. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
7. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112. N 43. P. 5787–5795.
8. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
9. Buning R., Kropff W., Martens K., van Noort J. spFRET reveals changes in nucleosome breathing by neighboring nucleosomes // *J. Phys. Condens. Matter.* 2015. Vol. 27. N 6. 064103.
10. Gansen A., Tóth K., Schwarz N., Langowski J. Opposing roles of H3- and H4-acetylation in the regulation of nucleosome structure—a FRET study // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 3. P. 1433–1443.
11. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.
12. Sultanov D., Gerasimova N., Kudryashova K., Maluchenko N., Kotova E., Langelier M.-F., Pascal J., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genetics.* 2017. Vol. 4. N 1. P. 21–31.
13. Valieva M.E., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Kozlova A.L., Kirpichnikov M.P., Hu Q., Botuyan M.V., Mer G., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Stabilization of nucleosomes by histone tails and by FACT revealed by spFRET microscopy // *Cancers (Basel).* 2017. Vol. 9. N 1, 3. DOI:10.3390/cancers9010003.
14. Shimahara H., Hirano T., Ohya K., Matsuta S., Seeram S.S., Tate S. Nucleosome structural changes induced by binding of non-histone chromosomal proteins HMGN1 and HMGN2 // *FEBS Open Bio.* 2013. Vol. 3. P. 184–191.
15. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
16. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.
17. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2AH2B displacement // *Mol. Cell.* 2009. Vol. 35. N 3. P. 365–376.

Поступила в редакцию
24.07.2017 г.

Принята к печати
09.09.2017 г.

METHODS

ANALYSIS OF NUCLEOSOME STRUCTURE IN POLYACRYLAMIDE GEL USING FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER METHOD

O.V. Chertkov^{1,2}, M.E. Valieva², N.V. Malyuchenko², A.V. Feofanov^{1,2,*}

¹Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

On the basis of Förster resonance energy transfer (FRET) effect a method to analyze the structure of (Cy3, Cy5)-labeled nucleosomes in polyacrylamide gel after electrophoresis in native conditions was developed. It is shown that the correct application of the method requires monitoring of nonspecific intermolecular FRET and fluorescence re-absorption. A comparative

analysis of the results of the FRET measurements of two types of nucleosomes and their complexes with yeast protein FACT was performed, which confirmed the similarity of the structural features of nucleosomes detected in the gel and in aqueous solution. An application of FRET analysis in combination with electrophoresis allows one to separate and visualize components of a complex mixture, evaluate their relative content, and, in addition, to characterize the structural differences between these complexes *in situ*.

Keywords: *nucleosome, fluorescence, electrophoresis, energy transfer, microscopy, epigenetics*

Сведения об авторах

Чертков Олег Валерьевич — вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: o_chertkov@mail.ru

Валиева Мария Евгеньевна — аспирантка биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: durnopreyko-maria@gmail.ru

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05, e-mail: mal_nat@mail.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru