

УДК: 577.214:004

Система хранения профилей физических свойств ДНК на примере промоторов *Escherichia coli*

Е. А. Темлякова^a, Т. Р. Дзелядин^b, С. Г. Камзолова^c, А. А. Сорокин^d

Институт биофизики клетки РАН,
142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

E-mail: ^a evgenia.teml@gmail.com, ^b dzhelyadin@gmail.com, ^c kamzolova@icb.psn.ru, ^d lptolik@gmail.com

Получено 21 декабря 2012 г.,
после доработки 25 июня 2013 г.

В данной работе нами представлена база данных, спроектированная для хранения профилей физических свойств вдоль двойной спирали ДНК, и продемонстрировано ее использование для хранения, поиска и анализа промоторных последовательностей *E. coli*. Отличительным свойством предложенной базы данных является то, что весь профиль хранится как единый объект, который с точки зрения СУБД полностью подобен строке или числу. Такие объекты СУБД может сравнивать друг с другом и осуществлять быструю выборку на основании индексов. В базу данных загружена информация о 1227 известных промоторах. Для каждого промотора сохранена нуклеотидная последовательность, а также вычислен и загружен в базу профиль электростатического потенциала промоторной ДНК. Кроме того, каждый промотор связан с генами, транскрипцию которых он регулирует, а также с записями о сайтах посадки транскрипционных факторов, влияющих на функционирование промотора. Организован доступ к базе данных через интернет; исходные коды доступны для скачивания, а содержимое базы данных может быть выслано авторами по запросу.

Ключевые слова: *E. coli*, электростатический потенциал ДНК, базы данных, анализ сигналов

System to store DNA physical properties profiles with application to the promoters of *Escherichia coli*

E. A. Temlyakova, T. R. Dzhelyadin, S. G. Kamzolova, A. A. Sorokin

Institute of Cell Biophysics RAS, 3 Institutskaya street, Puschino, 142290, Russia

Abstract. — Database to store, search and retrieve DNA physical properties profiles has been developed and its use for analysis of *E. coli* promoters has been demonstrated. Unique feature of the database is in its ability to handle whole profile as single internal object type in a way similar to integers or character strings. To demonstrate utility of such database it was populated with data of 1227 known promoters, their nucleotide sequence, profile of electrostatic potential, transcription factor binding sites. Each promoter is also connected to all genes, whose transcription is controlled by that promoter. Content of the database is available for search via web interface. Source code of profile datatype and library to work with it from R/Bioconductor are available from the internet, dump of the database is available from authors by request

Keywords: *E. coli*, electrostatic potential of DNA, database, signal analysis

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2013, vol. 5, no. 3, pp. 443–450 (Russian).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11-04-01436-а

Введение

Наследственная информация любого организма хранится в виде двойной спирали ДНК, образованной последовательностью четырех нуклеиновых оснований: аденина (А), гуанина (Г), цитозина (Ц) и тимина (Т). Последовательность ДНК-символов кодирует аминокислотную последовательность белков — основных строительных элементов клетки. Считывание генетической информации и реализация ее в виде белков происходит в два этапа. На первом, который называется транскрипцией, с ДНК генома снимается РНК матрица. На втором этапе — трансляции, по РНК матрице синтезируются белки. Такой механизм позволяет регулировать скорость производства отдельных белков, так как молекул ДНК в клетке мало (одна или две), а копий РНК матриц для соответствующих фрагментов ДНК может быть синтезировано любое необходимое количество.

В бактериальных клетках этап транскрипции осуществляет белок РНК-полимераза, который связывается с ДНК в специальных областях, называемых промоторами, которые расположены недалеко от начала кодирующей области, с которых фермент инициирует синтез РНК-матрицы. Известно, что именно инициация транскрипции является ключевым этапом в регуляции белкового синтеза в бактериях. Регуляция инициации синтеза РНК осуществляется в основном двумя путями: за счет различной «силы» промоторов, т. е. дифференцированной эффективности взаимодействия самой РНК-полимеразы с разными промоторами, или за счет взаимодействия ДНК со специальными белками — транскрипционными факторами, которые либо увеличивают, либо снижают вероятность связывания РНК-полимеразы с соответствующим промотором.

Отличительной особенностью современного этапа исследований механизмов специфического взаимодействия РНК-полимеразы *E. coli* с ее многочисленными, различающимися по структуре и свойствам промоторами является формулирование нового представления о принципах промоторно-полимеразного узнавания. Согласно этому представлению физические свойства промоторов наряду с их нуклеотидной последовательностью играют важную роль в формировании промоторной функции. В рамках этого нового направления мы использовали оригинальный подход поиска новых промоторных детерминант на основе анализа электростатических характеристик ДНК в промоторных фрагментах величиной 400 пар оснований (п. о.) (–270 ÷ +130 п. о. где +1 — точка старта транскрипции).

Расшифровка полного текста геномов большого количества бактерий и бурное развитие биоинформатики позволяет эффективно использовать вычислительные ресурсы при анализе нуклеотидных последовательностей. Развитие высокопроизводительных экспериментальных методов привело к быстрому росту информации о транскрипционных факторах, их местах связывания и взаимном влиянии. В этих условиях для анализа влияния физических свойств ДНК на силу связывания промотора с РНК-полимеразой и скорость инициации транскрипции необходимо грамотно организовывать все имеющиеся данные, как биологические, так и физические, в общую базу данных для более эффективной работы. Именно отсутствие ресурсов, позволяющих связать воедино нуклеотидные последовательности, функциональные и биологические данные с профилями распределения физических свойств ДНК, тормозит развитие исследований ДНК-белкового взаимодействия в современной вычислительной биологии и биоинформатике. В данной работе нами построена уникальная база данных, позволяющая осуществлять поиск фрагментов ДНК как по подобию физических свойств, так и по схожести их биологических функций.

Разработка метода

Основной сложностью при хранении числовых последовательностей (временных рядов, профилей физических свойств вдоль оси спирали ДНК и др.) в базах данных является организация эффективного доступа к данным в соответствии с их свойствами. Создание инфраструк-

туры, осуществляющей такой доступ, является актуальной задачей не только в биоинформатике, но и в финансовых приложениях, в метеорологии и других отраслях науки. Активные попытки разработки систем хранения и эффективной работы с рядами данных в реляционных СУБД предпринимались ранее, см. обзор в [Law et al., 2004]. Основным подходом в таких исследованиях была разработка дополнений к языку запросов SQL, позволяющих трактовать отдельные записи в таблице как элементы ряда (см. например [Sadri et al., 2004]). Однако, этот подход создает трудности в определении принадлежности конкретной записи к определенному временному ряду. Кроме того, он не решает основной задачи: организации эффективного индексирования рядов для ускорения запросов и поиска рядов, близких друг другу. В данной работе был выбран другой подход, связанный с поиском пути создания типа данных, который в состоянии хранить весь ряд сразу. Это позволило избежать необходимости разработки дополнительных типов запросов и реализовать все операции в стандарте SQL.

Для обычных типов данных, таких как строки и числа, высокая скорость поиска и выборки данных достигается с помощью специальных вспомогательных структур, называемых индексом, которые позволяют эффективно вычислить, какие данные соответствуют параметрам запроса в оперативной памяти, без организации физического доступа к данным, хранимым на жестком диске. Для современных баз данных, которые могут содержать терабайты информации, отсутствие возможности провести такие вычисления в оперативной памяти компьютера сделало бы доступ к данным невозможным. Таким образом, для хранения профилей электростатического потенциала в базе данных нам необходимы: тип данных, позволяющий хранить весь профиль в одной ячейке таблицы, и индекс, позволяющий фильтровать профили по степени их подобия друг другу.

В качестве платформы реализации системы хранения профилей была выбрана система управления реляционными базами данных (СУБД) PostgreSQL. Выбор именно этой СУБД обусловлен двумя причинами. Во-первых, эта СУБД предоставляет инфраструктуру для разработки собственных типов данных. Во-вторых, для созданных пользователем типов данных предоставляется инфраструктура построения индексов на базе технологии GiST [Hellerstein et al., 1998], при использовании которой были, например, созданы геоинформационные системы на базе PostgreSQL [Obe et al., 2011].

Для использования профилей в качестве индекса базы данных, построенного на базе технологии GiST, необходим эффективный метод сравнения профилей. Такой метод должен удовлетворять нескольким условиям. Во-первых, метод должен позволять добавление новых записей без масштабной перестройки структуры индекса. Например, следует избегать сравнения новой записи со всеми существующими, так как даже при среднем количестве записей такое сравнение будет приводить к огромной вычислительной работе. Во-вторых, структура индекса должна, по возможности, помещаться в оперативной памяти, т. е. объем информации об индивидуальном профиле должен быть минимальным. Всем этим критериям удовлетворяет метод iSAX [Shieh, Keogh, 2008]. Для построения индекса в iSAX мы сперва превращаем числовую последовательность в символьную (SAX), которая гораздо компактнее, но при этом расстояние между двумя символьными SAX-последовательностями не превышает расстояния между числовыми последовательностями [Lin et al., 2007]. Это позволяет использовать SAX-последовательности для отфильтровывания соответствующих им числовых последовательностей.

Мы разработали новый тип данных (ts), позволяющий хранить полные профили любых свойств промотора, например электростатического потенциала, в реляционной базе данных PostgreSQL. Кроме того, для этого типа данных была построена вычислительная инфраструктура, позволяющая осуществлять быстрый поиск профилей на основании их взаимного подобия. Детали реализации и способы использования указанного типа данных были опубликованы в 2012 году [Sorokin et al., 2012]. Использование нового типа данных позволило объединить в одной базе

данных информацию, относящуюся к первичной структуре промоторов и их физическим свойствам; сведения о присутствии сайтов связывания регуляторных белков; о генах, находящихся под управлением данных промоторов, и белковых продуктах, кодируемых этими генами.

Для наполнения созданной базы данных впервые создана компиляция промоторов, находящихся под управлением всех известных сигма-субъединиц РНК-полимеразы, и построено распределение электростатического потенциала вокруг промоторных фрагментов ДНК. Для вычисления профиля электростатического потенциала выбирались фрагменты длиной 400 п. о. вокруг промоторов, входящих в компиляцию, так, чтобы точка старта транскрипции находилась в положении 271 нуклеотида. Электростатический потенциал вычисляли кулоновским методом, описанным ранее [Sorokin et al., 2006; Kamzolova et al., 2005; Kamzolova et al., 2000; Polozov et al., 1999]. Вкратце, приведем наиболее важные для дальнейшего обсуждения детали метода: рассматривается прямолинейная, но неоднородная модель геометрии ДНК, учитывающая вариации расстояния между соседними нуклеотидами в зависимости от динуклеотидного состава; профиль потенциала вычисляется простым суммированием кулоновских вкладов парциальных зарядов атомов. Вклад атомов, расположенных на расстоянии более 100 Å от точки рассмотрения, при этом не принимается во внимание. Учет краевых эффектов производится исключением из рассмотрения 100 Å участка профиля с каждого конца. Использование неравномерной модели ДНК приводит к тому, что при сравнении последовательностей центры пар оснований в разных последовательностях не будут совпадать. Поэтому мы выделяем в каждой последовательности один «опорный нуклеотид», центр которого помещается в начало координат. Иногда выделение такого опорного нуклеотида не представляет труда, например, в промоторах очевидным кандидатом является точка старта транскрипции, но чаще его выбирают произвольно на достаточном удалении от концов фрагмента.

Для хранения в базе данных выбирали фрагмент профиля длиной 720 Å (–540 ÷ 180 Å) относительно точки старта транскрипции. Сведения о положении промоторов на хромосоме *E. coli* и их нуклеотидной структуре взяты из баз данных PromEC (<http://margalit.huji.ac.il/promec/index.html>) [Hershberg et al., 2001] и RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>) [Gama-Castro et al., 2011] и дополнены данными из литературы. Информация о регуляторных взаимодействиях и распознавании промоторов различными сигма-субъединицами загружена из базы данных RegulonDB. Кроме того, в базу данных загружены последовательности и профили электростатического потенциала 1200 промотороподобных фрагментов (псевдопромоторов), получивших наибольший индекс в программе PlatProm [Shavkunov et al., 2009]. Для того, чтобы избежать избыточного перекрытия при наличии в окне шириной 400 п. о. нескольких сигналов, выбирали только один фрагмент (промотор или промотороподобный участок), имеющий наибольшее значение индекса. Полученный набор псевдопромоторов может быть использован для сравнения влияния нуклеотидной последовательности (используемой программой PlatProm) и физических свойств ДНК на точность предсказания промоторов на хромосоме *E. coli*.

Результаты и обсуждения

В данной работе нами построена база данных для хранения профилей свойств фрагментов ДНК, таких, как электростатический потенциал или профиль термодинамической стабильности. Отличительным свойством предложенной базы данных является то, что весь профиль хранится как единый объект, который с точки зрения СУБД полностью подобен строке или числу. Такие объекты СУБД может сравнивать друг с другом и осуществлять быструю выборку на основании индексов.

В целом в базу данных загружена информация о 1227 известных промоторах, находящихся под контролем семи различных сигма-факторов. Для каждого промотора сохранена нуклео-

тидная последовательность, а также вычислен и загружен в базу профиль электростатического потенциала в области $-540 \div +180 \text{ \AA}$ относительно точки старта транскрипции (это приблизительно соответствует области $-150 \div +50$ п. о.). Кроме того, каждый промотор связан с генами, транскрипцию которых он регулирует, а также с записями о сайтах посадки транскрипционных факторов, влияющих на функционирование промотора. Небольшая часть промоторов (87), которые работают под управлением σ^{70} , могут взаимодействовать с еще одной сигма-субъединицей (σ^{24} , σ^{32} или σ^{38}). Наличие такой группы промоторов важно для выявления роли сигма-фактора в первичном (на этапе неспецифического связывания) распознавании промотора РНК-полимеразой.

Следует отметить, что примерно половина (549) промоторов, входящих в компиляцию, не имеет описанных регуляторных взаимодействий. Эти промоторы могут быть использованы в качестве тестовой группы как при анализе влияния транскрипционных факторов на особенности распределения электростатического потенциала в промоторной области, так и для отработки методов идентификации неизвестных сайтов посадки транскрипционных факторов. Нахождение среди них промоторов, сходных по физическим свойствам и нуклеотидной последовательности с сильными промоторами, такими как gnBP1 , совместно с анализом экспрессии регулируемых генов и их биологической функции, позволит выделить новые регуляторные механизмы и лучше понять уже известные регуляторные сети.

Такая организация информации, когда физические свойства ДНК, нуклеотидная последовательность и регуляторные взаимодействия интегрированы в общую структуру, позволяет осуществлять достаточно сложные запросы. Рассмотрим для примера два запроса: «выбрать профиль электростатического потенциала для всех промоторов, активируемых CRP» (рис. 1), или «выбрать 10 промоторов наиболее близких по профилю к gnBP1 » (рис. 2).

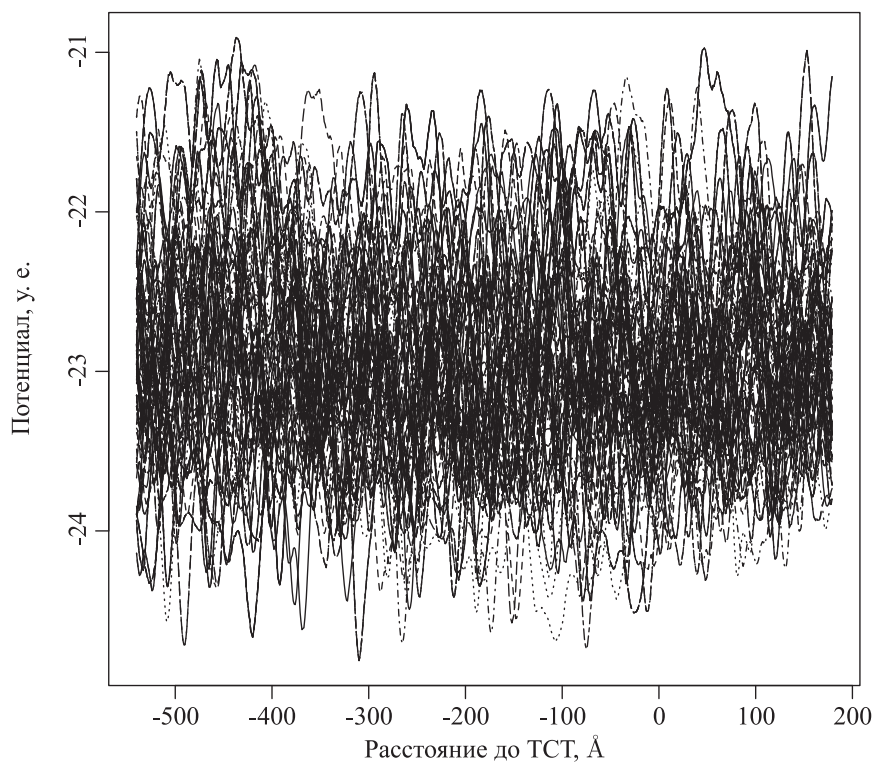


Рис. 1. Профили электростатического потенциала промоторов, активируемых CRP. Ось абсцисс — расстояние вдоль оси спирали ДНК относительно точки старта транскрипции. Ось ординат — величина усредненного по углу значения электростатического потенциала в условных единицах

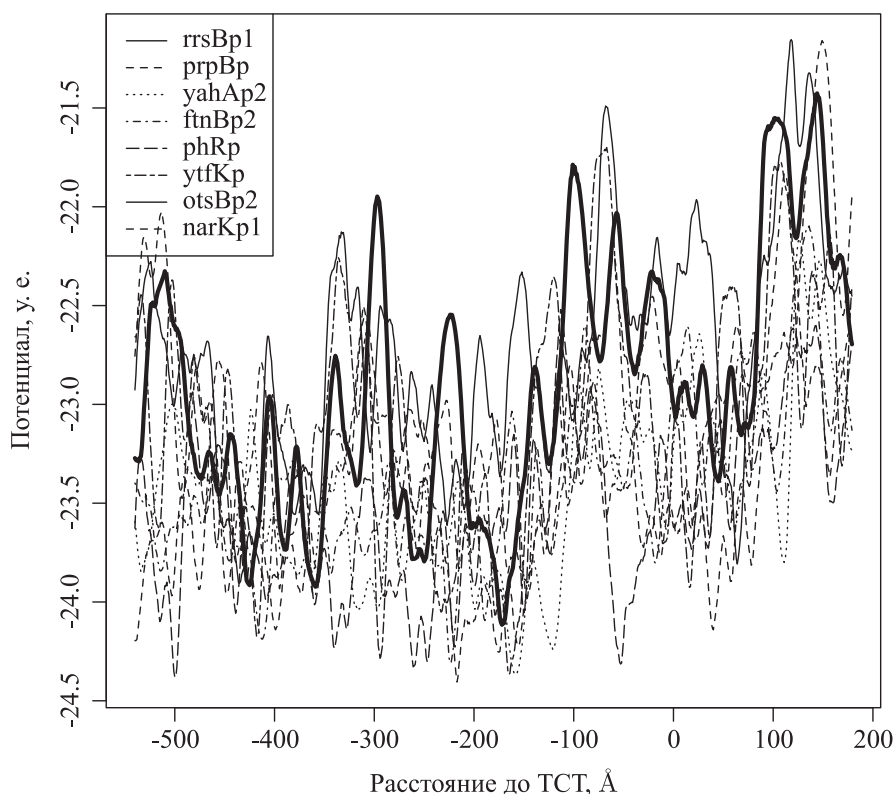


Рис. 2. Профили электростатического потенциала Вокруг ДНК 10 промоторов, наиболее близких по электростатическому профилю к сильному рибосомальному промотору *gtnBP1*. Профиль промотора *gtnBP1* выделен жирной линией; профили *gtnAP1* и *gtnCP1* совпадают с профилем *gtnBP1* и поэтому не показаны. Ось абсцисс — расстояние вдоль оси спирали ДНК относительно точки старта транскрипции. Ось ординат — величина усредненного по углу значения электростатического потенциала в условных единицах

Первый запрос аналогичен тем, которые можно осуществлять в любых современных базах по регуляции транскрипции, таких, например, как RegulonDB, или более специализированных, хранящих специальные свойства ДНК, как DEPPDB [Osypov et al., 2010]. График профилей электростатического потенциала, полученных в результате первого запроса, представлен на рисунке 1. Визуально достаточно трудно выделить характерные паттерны поведения потенциала. Это свидетельствует о том, что чисто биологической информации, в данном случае имени регуляторного белка, недостаточно для выявления характерных черт потенциала в районе промотора. Однако данные такого типа необходимы и активно используются для автоматического анализа и «добычи данных» [Sandve et al., 2008; Conilione, Wang, 2005; Nagaraj et al., 2008].

Рассмотрим второй тип запроса: «выбрать 10 промоторов наиболее близких по профилю к *gtnBP1*». Запросы такого вида без использования дополнительных приложений не может выполнять на сегодняшний день ни одна база данных. Запрос данного типа схож с запросом в базу химических соединений на поиск веществ, фармакологически сходных с заданным. Запросы такого типа весьма актуальны при современной разработке лекарств [Dobson et al., 2009].

Видно, что профили всех выбранных промоторов имеют характерные провалы в областях -400 \AA , -150 \AA и $+50 \text{ \AA}$, и пики в областях -300 \AA , -100 \AA и $+100 \text{ \AA}$ (рис. 2). Такие данные могут помочь в поиске новых регуляторных механизмов.

Рассмотрим найденные промоторы чуть более подробно. Первое, на что необходимо обратить внимание, это то, что два промотора, *gtnAP1* и *gtnCP1*, совпадают по профилю с *gtnBP1* и поэтому не видны. При этом ни промоторы остальных рибосомальных оперонов (*rtnD*, *rtnG*, *rtnH*), ни тандемные промоторы найденных оперонов (*rtnBp2*, *rtnAp2*, *rtnCp2*) в список ближайших не

попали. В то же время в список вошли (в порядке уменьшения подобия потенциала): промоторы нитрат/нитрит антитранспортера *narKp1*, трезалоза-6-фосфат синтазы *otsVp2*, метилцитрат синтазы *prpVp*, рибосомальных субъединиц *rplUp*, рибосомальной метилтрансферазы *mgaZp*, и два промотора нитратредуктазы *narFp1* и *narFp2*. Легко заметить, что в списке преобладают промоторы, регулирующие две биологические функции: синтез компонент рибосомы и транспорт азота. Анализ особенностей регуляции данных функций, вызвавших такое сходство физических свойств промоторной ДНК, может привести к более глубокому пониманию клеточной регуляции.

Для облегчения первичного знакомства с базой данных мы разработали простой интерфейс, обеспечивающий свободный доступ к нашей версии базы данных для всех желающих. Интерфейс расположен по адресу (<http://promodel.icb.psn.ru/eldna/>). Предложенный интерфейс позволяет находить фрагменты, схожие по электростатическому потенциалу с заданным фрагментом последовательности. Хотя это и не позволяет напрямую исполнять запросы описанного в статье вида, однако, зная нуклеотидную последовательность промотора, достаточно легко найти все промоторы, сходные с ним, как представлено на рисунке 2.

Интерфейс состоит из двух полей: поля последовательности, в которое вводится последовательность для вычисления электростатического профиля и сравнения с последовательностями в базе данных, и поля положения опорного нуклеотида (reference base). Алгоритм интерфейса пытается наиболее полно использовать приведенную последовательность, поэтому не всегда адекватно исключает влияние краевых эффектов. Это может приводить к потере деталей потенциала, так как основное влияние на профиль будет оказывать область повышенного потенциала вблизи края фрагмента. Для исключения таких артефактов опорный нуклеотид должен находиться на расстоянии не менее 50 п. о. от края фрагмента.

В процессе работы программой будет вычислен профиль электростатического потенциала в диапазоне от -540 \AA до $+180 \text{ \AA}$ относительно опорного нуклеотида и найдены профили наиболее похожих последовательностей из базы данных. Профили выбранных последовательностей отображаются на графике, а данные о них сводятся в таблицу. Результаты работы могут быть сохранены для работы в среде R/Bioconductor в файле Rdat и в текстовом файле TSV (tab-separated value).

В данной работе нами представлена база данных, спроектированная для хранения профилей физических свойств вдоль двойной спирали ДНК, и продемонстрировано ее использование для хранения, поиска и анализа промоторных последовательностей *E. coli*. Исходные коды приложения доступны по адресу (<http://decima.sf.net/> — PostgreSQL тип данных; <https://github.com/promodel/rsaxdb> — библиотека для доступа к ней из среды R/Bioconductor), структура и содержимое базы данных могут быть высланы авторами по запросу.

Список литературы

- Conilione P., Wang D.* A comparative study on feature selection for *E. coli* promoter recognition // *Int. J. Inf. Technol.* — 2005. — Vol. 11. — P. 54–66.
- Dobson P., Patel Y., Kell D. B.* ‘Metabolite-likeness’ as a criterion in the design and selection of pharmaceutical drug libraries // *Drug Discovery Today.* — 2009. — Vol. 14, No. 1–2. — P. 31–40.
- Gama-Castro S., Salgado H., Peralta-Gil M. et al.* RegulonDB version 7.0: transcriptional regulation of *Escherichia coli* K-12 integrated within genetic sensory response units (Gensor Units). // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — January. — Vol. 39, No. Database issue. — P. D98–105.
- Hellerstein J., Naughton J., Pfeiffer A.* Generalized search trees for database systems // *Readings in database systems.* — 1998. — P. 101.
- Hershberg R., Bejerano G., Santos-Zavaleta A., Margalit H.* PromEC: An updated database of *Escherichia coli* mRNA promoters with experimentally identified transcriptional start sites. // *Nucleic Acids Res.* — 2001. — January. — Vol. 29, No. 1. — P. 277.

- Kamzolova S. G., Sivozhelezov V. S., Sorokin A. A. et al.* RNA polymerase–promoter recognition. Specific features of electrostatic potential of “early” T4 phage DNA promoters // *J Biomol Struct Dyn.* — 2000. — November. — Vol. 18, No. 3. — P. 325–334.
- Kamzolova S. G., Sorokin A. A., Dzhelyadin T. D. et al.* Electrostatic potentials of E.coli genome DNA // *J Biomol Struct Dyn.* — 2005. — November. — Vol. 23, No. 3. — P. 341–345.
- Law Y., Wang H., Zaniolo C.* Query languages and data models for database sequences and data streams // *Proceedings of the Thirtieth international conference on Very large data bases-Volume 30.* — 2004. — P. 492–503.
- Lin J., Keogh E., Wei L., Lonardi S.* Experiencing SAX: a novel symbolic representation of time series // *Data Mining and Knowledge Discovery.* — 2007. — Vol. 15, No. 2. — P. 107–144.
- Nagaraj V., O’Flanagan R., Sengupta A.* Better estimation of protein-DNA interaction parameters improve prediction of functional sites // *BMC biotechnology.* — 2008. — Vol. 8, No. 1. — P. 94.
- Obe R., Hsu L., Ramsey P.* PostGIS in Action. — Pap/psc edition. — Manning Publications, 2011. — April.
- Osyrov A. A., Krutinin G. G., Kamzolova S. G.* DEPPDB — DNA electrostatic potential properties database: electrostatic properties of genome DNA // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology.* — 2010. — Vol. 08, No. 03. — P. 413.
- Polozov R. V., Dzhelyadin T. R., Sorokin A. A. et al.* Electrostatic potentials of DNA. Comparative analysis of promoter and nonpromoter nucleotide sequences // *J Biomol Struct Dyn.* — 1999. — May. — Vol. 16, No. 6. — P. 1135–1143.
- Sadri R., Zaniolo C., Zarkesh A., Adibi J.* Expressing and optimizing sequence queries in database systems // *ACM Transactions on Database Systems (TODS).* — 2004. — Vol. 29, No. 2. — P. 282–318.
- Sandve G., Abul O., Drabløs F.* Compo: composite motif discovery using discrete models // *BMC Bioinformatics.* — 2008. — Vol. 9, No. 1. — P. 527.
- Shavkunov K. S., Masulis I. S., Tutukina M. N. et al.* Gains and unexpected lessons from genome-scale promoter mapping // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — August. — Vol. 37, No. 15. — P. 4919–4931.
- Shieh J., Keogh E.* iSAX: indexing and mining terabyte sized time series // *KDD ’08: Proceeding of the 14th ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining.* — 2008. — August.
- Sorokin A. A., Osyrov A. A., Dzhelyadin T. R. et al.* Electrostatic properties of promoter recognized by E. coli RNA polymerase Esigma70 // *Journal of Bioinformatics and Computational Biology.* — 2006. — April. — Vol. 4, No. 2. — P. 455–467.
- Sorokin A., Selkov G., Goryanin I.* A user-defined data type for the storage of time series data allowing efficient similarity screening // *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* — 2012. — July. — Vol. 46, No. 4. — P. 272–274.