



УДК 547.963.3+577.155.2

ХИМИЧЕСКИЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ. 2. ДИЗАЙН И ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РНКаз-МИМЕТИКОВ НА ОСНОВЕ ДИАЗАБИЦИКЛО[2.2.2]ОКТАНА С РАЗЛИЧНЫМ ЧИСЛОМ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ЗАРЯДОВ

© 2000 г. М. А. Зенкова[#], А. В. Власов, Д. А. Коневец,
В. Н. Сильников, Р. Жиже*, В. В. Власов

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

*Институт молекулярной и клеточной биологии, Страсбург, Франция

Поступила в редакцию 13.03.2000 г. Принята к печати 04.05.2000 г.

Предложена процедура, позволяющая получать РНКаз-миметики на основе конъюгатов диазабицикло[2.2.2]октана с имидазолом, несущие различное число положительных зарядов (nDm -серия, где n – число положительных зарядов при нейтральных рН, m – числовой код имидазолсодержащего фрагмента каталитического центра: 1 – гистамин, 2 – метиловый эфир гистидина). Изучена активность 6 соединений этой серии в реакции гидролиза *in vitro* транскрипта тРНК^{Lys} из митохондрий человека в физиологических условиях. Показано, что скорость гидролиза РНК nDm -конъюгатами возрастает с увеличением числа положительных зарядов: наблюдается примерно 30-кратное увеличение скорости гидролиза при увеличении суммарного заряда конструкции от +2 до +4.

Ключевые слова: искусственные РНКазы; моделирование активных центров ферментов; РНК, гидролиз.

ВВЕДЕНИЕ

Рибонуклеазы и химические реагенты, взаимодействующие с гетероциклическими основаниями и фосфатами, широко используются для изучения вторичной и третичной структуры РНК в растворе [2, 3]. Наибольшее распространение в качестве структурных зондов получили рибонуклеазы, поскольку они способны взаимодействовать с РНК быстро и в мягких условиях, а тип расщепления РНК ими легко идентифицировать. Недостатком природных ферментов является то, что при взаимодействии с РНК, они могут разворачивать структуру последней. В связи с этим предпринимаются попытки создания минимальных химических моделей РНКаз – РНКаз-миметиков [4]. Создание синтетических конструкций, обладающих специфичностью природных ферментов и в то же время не вносящих искажений в структуру изучаемой РНК, является актуальной задачей. Как правило, при химическом моделировании биологических катализаторов используются функциональные группы, типичные для активных центров ферментов. В частности, для РНКаз такими группами служат остатки имидазола, кар-

боксильные, гуанидиниевые и аминогруппы в различных сочетаниях [5]. Простейшие соединения, имеющие данные функциональные группы, например имидазол, обладают гидролитической активностью, но проявляют ее только в высоких (1–2 М) концентрациях [6, 7], что связано с их низким сродством к РНК и, вследствие этого, с низкой вероятностью образования необходимой ориентации молекул субстрата и катализатора.

Эффективность действия таких катализаторов может быть значительно повышена путем присоединения их к молекулам, обладающим сродством к РНК. Для этой цели ранее были использованы органические соединения, интеркалирующие в РНК [8, 9], поликатионы, связывающиеся благодаря электростатическим взаимодействиям [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Недавно нами были предложены РНК-гидролизующие химические конструкции [11, 12], содержащие в качестве РНК-связывающего фрагмента бисчетвертичные соли 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, обладающие высоким сродством к фосфат-анионам [13]. В качестве гидролитических фрагментов выступали остатки гистамина

Сообщение 1 см. [1].

[#]Автор для переписки (тел.: (3832) 33-37-61; e-mail: marzen@niboch.nsc.ru).

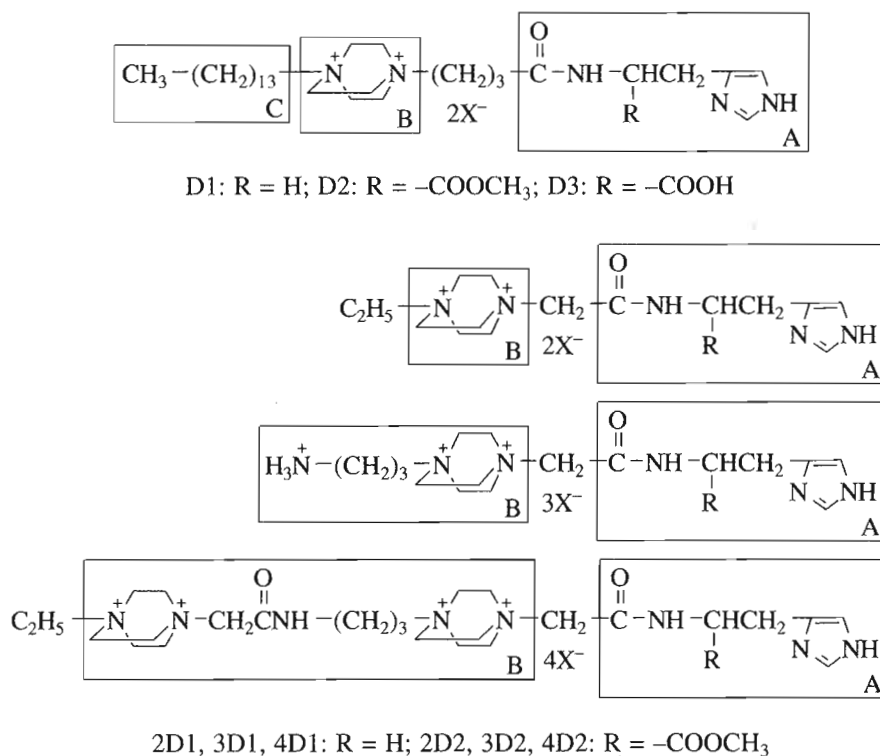


Рис. 1. Синтетические рибонуклеазы серии D и *nDt*: А, В и С – каталитический, РНК-связывающий и гидрофобный фрагменты.

(D1), метилового эфира гистидина (D2) или гистидина (D3) (рис. 1).

Эффективность гидролиза РНК синтетическими рибонуклеазами серии D была значительно ниже, нежели у РНКазы А, однако позиционные направленности гидролиза для обоих случаев почти полностью совпадали [11, 12, 14]. Полученные результаты послужили основанием для детального изучения синтетических рибонуклеаз этой серии.

В данной работе мы синтезировали новую серию химических рибонуклеаз на основе четвертичных солей 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана (I) – соединения *nDt*, где *n* – число положительных зарядов (2–4) при нейтральных значениях рН, а *t* – числовой код имидазолсодержащей группы: 1 – гистамин, 2 – метиловый эфир гистидина, 3 – гистидин. Изучено влияние числа положительных зарядов в синтетических рибонуклеазах на их эффективность и позиционную направленность в различных условиях с использованием в качестве субстрата *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys}.

Конструирование химических рибонуклеаз

Искусственные рибонуклеазы серии *nDt* были синтезированы согласно схеме. Подробное описание синтеза и физико-химических характеристик полученных соединений выходит за рамки

настоящей работы и будет опубликовано отдельно. При разработке стратегии синтеза этих соединений мы стремились получить универсальную процедуру, позволяющую в дальнейшем легко и в широких пределах изменять количество положительных зарядов в молекуле при сохранении основных структурных элементов РНК-связывающего центра. С этой целью была получена бисчетвертичная соль *n*-нитрофенилового эфира 1-(3-азидопропил)-4-карбоксиметил-1,4-ди(азониа)бицикло[2.2.2]октана (V). После проведения конденсации с потенциально гидролитически активным соединением, азидогруппа может быть восстановлена, что обеспечивает конструкции при нейтральных значениях рН дополнительный положительный заряд вследствие протонирования образующейся алифатической аминогруппы. Конденсация полученных соединений с активированным эфиром (IV) приводит к конструкциям с четырьмя положительными зарядами. Использование на этой стадии активированного эфира (V) позволяет получать по аналогичной схеме синтетические конструкции с любым числом положительных зарядов.

Согласно литературным данным [15], наличие гидрофобного остатка в четвертичных солях может приводить к ускорению гидролитического расщепления фосфодиэфирных связей за счет мицеллярного катализа. В отличие от описанных

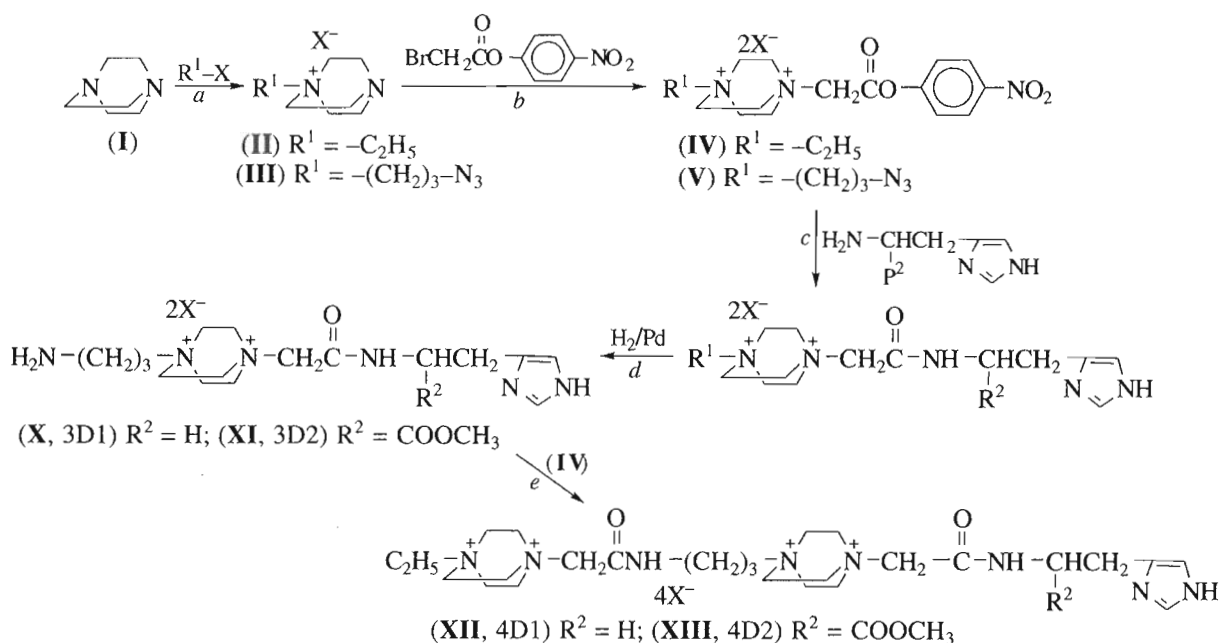


Схема синтеза синтетических рибонуклеаз *nDm*: *a* – DMF, 20°C, 48 ч, 87(III)–90(II)%; *b* – CH₃CN, 20°C, 15 ч, 52(V)–82(IV)%; *c* – DMF, 45°C, 72 ч, 38–40%; *d* – MeOH, Pd/C, 20°C, 95–97%; *e* – DMF, 45°C, 48 ч, 24(XIII)–51(XII)%.

ранее синтетических рибонуклеаз серии D [1], во вновь синтезированных соединениях отсутствует протяженный алкильный остаток, что позволяет исключить из рассмотрения эффекты, связанные с мицеллообразованием.

Изучение гидролитической активности полученных соединений

При исследовании гидролитической активности синтетических рибонуклеаз 2D1, 2D2, 3D1, 3D2, 4D1, 4D2 в качестве субстрата был использован 5'-³²P-меченый *in vitro*-транскрипт тРНК^{Lys} из митохондрий человека с точечной мутацией A9 → C (далее по тексту – тРНК KRW). Выбор в качестве мишени этой тРНК обусловлен рядом ее структурных особенностей. Вторичная структура тРНК KRW вследствие точечной мутации представляет собой клеверный лист [16]. Преимуществом данной модели является то, что в отличие от природных тРНК, *in vitro*-транскрипт тРНК^{Lys} в отсутствие ионов магния обладает конформационно подвижной пространственной структурой. Известно, что биологически значимая структура тРНК с четко выраженными петлевыми участками и стеблями формируется в присутствии ионов Mg²⁺ в концентрациях 10 мМ и более [16]. Для сравнения, в случае тРНК^{Phe} из дрожжей аналогичный эффект достигается при добавлении ионов магния в концентрациях менее 2 мМ [17]. Таким образом, изучение взаимодействия тРНК с химическими РНКазами в растворах с различной ионной силой позволяет четко опреде-

лить влияние вторичной структуры РНК на скорость гидролиза под действием этих соединений.

Меченную по 5'-концу тРНК KRW инкубировали при 37°C в присутствии различных концентраций исследуемых соединений в 50 мМ имидазольном буфере при нейтральном значении pH и различной ионной силе раствора. Типичная картина разделения продуктов гидролиза тРНК KRW данными соединениями представлена на рис. 2; на рис. 3 показаны сайты расщепления тРНК KRW.

Оказалось, что все исследованные соединения обладают одинаковой специфичностью и гидролизуют в основном фосфодиэфирные связи, расположенные в CA- и UA-последовательностях. На долю гидролиза по этим связям приходится около 90% расщеплений. В отсутствие ионов магния наблюдается гидролиз синтезированными конструкциями фосфодиэфирных связей в 4 из 6 CA- и 7 из 8 UA-последовательностей, присутствующих в тРНК KRW (на рис. 2 расщепление по связям C65-A, C72-A и U63-A не видно в связи с тем, что РНК содержит ³²P-метку на 5'-конце). Наиболее эффективный гидролиз тРНК происходит по связям C52-A, C55-A в ТΨС-петле, по связи C20-A – в области перекрестка клеверного листа и по связи U23-A – в антикодонном стебле. Слабый гидролиз РНК наблюдается также и по последовательностям CG, CU и CC. Полученные результаты хорошо коррелируют с данными работы [18], в которой было показано, что 5'-часть молекулы тРНК KRW в физиологических условиях более

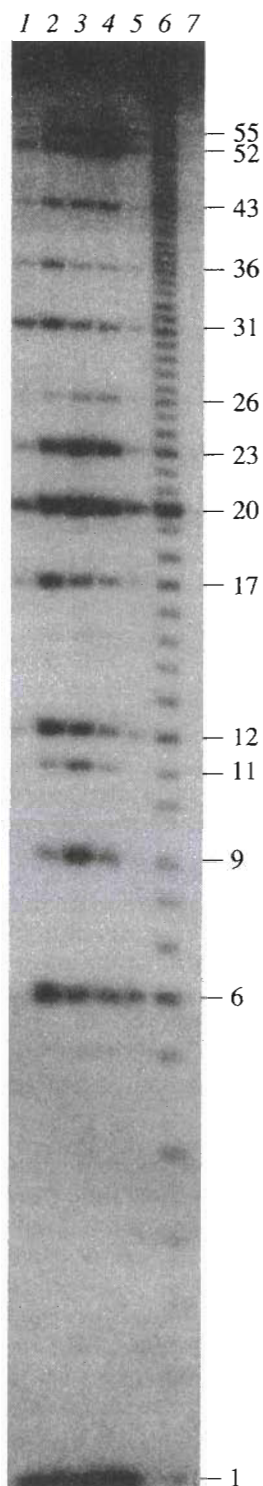


Рис. 2. Разделение продуктов гидролиза *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} соединением 4D2 (XIII) с помощью электрофореза в 15% ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дорожки 1–5 соответствуют концентрации NaCl: 0, 100, 200, 300 и 600 мМ соответственно; дорожка 6 – частичный гидролиз тРНК 2 М имидазолом, дорожка 7 – контроль (инкубация тРНК в отсутствие химических РНКаз). Сайты гидролиза указаны на панели справа.

доступна для химической модификации и гидролиза РНКазами, чем 3'-часть молекулы.

Влияние ионов магния и одновалентных катионов на скорость и специфичность расщепления РНК

Было исследовано влияние ионов Mg^{2+} (1–10 мМ), стабилизирующих биологически значимую пространственную структуру РНК, на реакцию гидролиза РНК искусственными рибонуклеазами. Оказалось, что ионы магния при низкой концентрации незначительно стимулируют гидролиз – в среднем суммарная степень деполимеризации РНК-субстрата возрастала примерно на 20%, что, возможно, связано с изменениями доступности СА- и UA-последовательностей.

При концентрации Mg^{2+} 10 мМ наблюдается небольшое (<20%) подавление гидролиза. При этом по мере увеличения концентрации Mg^{2+} гидролиз по связям в двуцепочечных районах практически полностью ингибируется, тогда как связи после C20, C52 и C55 в петлях тРНК KRW становятся основными участками расщепления.

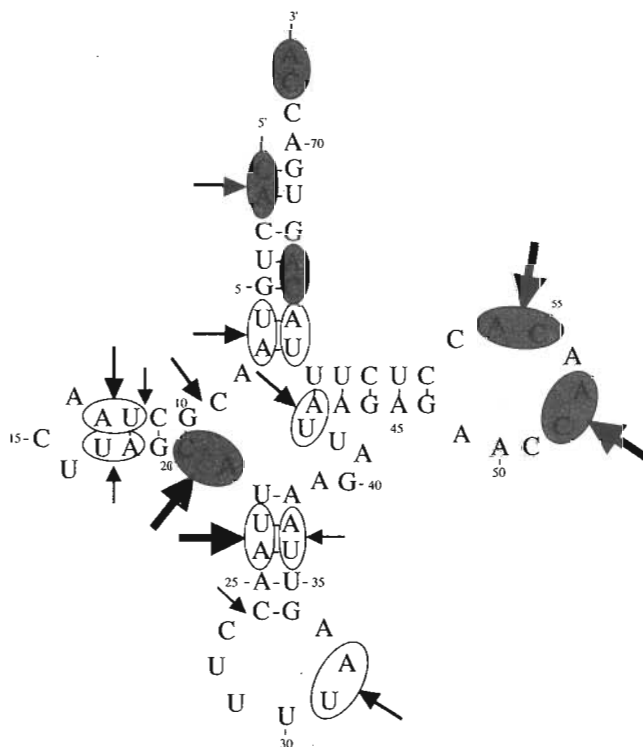


Рис. 3. Вторичная структура тРНК^{Lys} из митохондрий человека, содержащей точечную мутацию А9 → С (тРНК KRW) [16]. Стрелками указаны фосфодиэфирные связи, гидролизуемые химическими РНКазами серии *nDm*. Размер стрелок пропорционален степени гидролиза РНК по данной связи. UA- и СА-последовательности выделены белыми и серыми овалами соответственно.

Добавление в реакционную смесь ионов одновалентных металлов должно вызывать снижение эффективности связывания катионных фрагментов синтетических рибонуклеаз с отрицательно заряженными фосфатами РНК и приводить к уменьшению эффективности гидролиза. Действительно, в случае соединений 2D1, 2D2, 3D1, 3D2, 4D1 повышение концентрации NaCl от 0 до 0.6 М (рис. 4) приводило к значительному подавлению гидролиза РНК. Как и ожидалось, эффективность ингибирования гидролиза в присутствии повышающихся концентраций NaCl падала в ряду $4Dm > 3Dm > 2Dm$. Однако в случае соединения 4D2 наблюдалось некоторое увеличение скорости гидролиза при повышении концентрации NaCl от 0 до 0.2 М, и кривая зависимости эффективности гидролиза от концентрации NaCl приобрела колоколообразный характер с максимумом в области 200 мМ. Аналогичный характер зависимости наблюдался в случае расщепления тРНК KRW соединениями серии D и одной из синтетических рибонуклеаз на основе лизина, содержащей гидрофобный фрагмент [1, 12]. Данный эффект воспроизводим и требует дальнейшего изучения.

Зависимость эффективности гидролиза от строения и концентрации искусственных рибонуклеаз

Все исследованные химические рибонуклеазы показали сходные зависимости скорости гидролиза тРНК KRW от концентрации: скорость расщепления резко уменьшалась при снижении их концентрации. Для соединений 3Dm и 4Dm оптимальной оказалась концентрация 5×10^{-4} М, тогда как при более высоких концентрациях этих химических нуклеаз наблюдалась агрегация РНК. В то же время при концентрациях ниже, чем 1×10^{-4} М, гидролиз РНК не наблюдался. В случае конструкций 2Dm максимальная скорость гидролиза наблюдалась при концентрации 5×10^{-3} М; при концентрациях ниже, чем 1×10^{-3} М, расщепление РНК происходило крайне медленно. Концентрационная зависимость для соединений nDm-серии отличалась от таковой для D-серии. Для химической РНКазы D2 наблюдалась колоколообразная зависимость скорости гидролиза РНК субстрата от концентрации D2 с оптимумом в области 1×10^{-4} М [12], что значительно ниже, чем в случае соединений nDm-серии.

При сходной специфичности действия химические рибонуклеазы серии nDm значительно различаются по скорости гидролиза РНК-субстрата (рис. 5). Скорость гидролиза РНК коррелирует с числом положительных зарядов в синтетических рибонуклеазах. Скорость гидролиза увеличивается примерно в 30 раз в рядах $2D1 < 3D1 < 4D1$ и

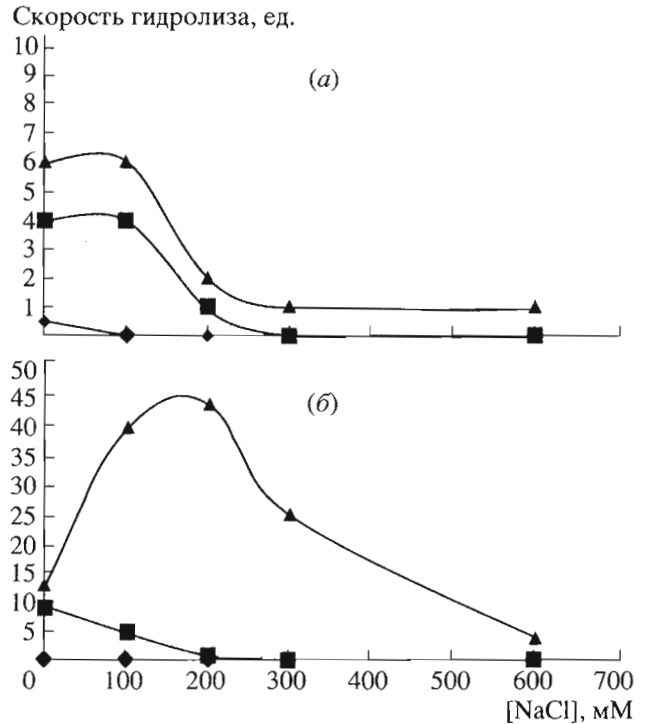


Рис. 4. Зависимость скорости гидролиза *in vitro*-транскрипта тРНК^{Lys} из митохондрий человека с точечной мутацией A9 → С (тРНК KRW) химическими рибонуклеазами серии nD1 (а) и nD2 (б) от концентрации NaCl. Условия реакции указаны в “Эксперимент. части”, зависимости приведены для концентрации химических рибонуклеаз 5×10^{-4} М (♦ – для 2Dm, ■ – для 3Dm, ▲ – для 4Dm).

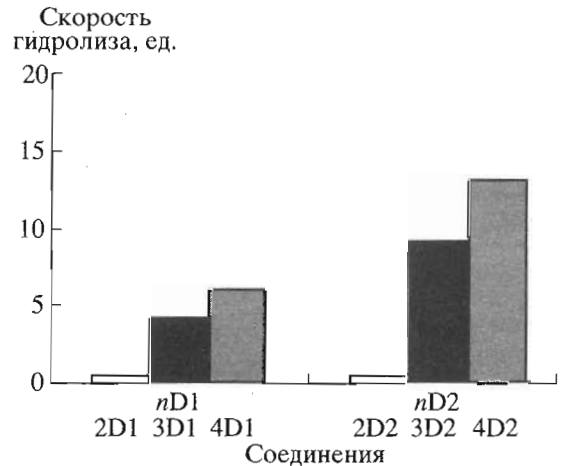


Рис. 5. Влияние суммарного положительного заряда в молекулах искусственных рибонуклеаз nDm на скорость гидролиза РНК-субстрата.

$2D2 < 3D2 < 4D2$. При этом все соединения nD2 гидролизуют РНК-субстрат примерно в 2 раза быстрее, чем соответствующие конструкции nD1. Это хорошо согласуется с результатами по гидро-

лизу РНК соединениями серии D, где конструкция D2 всегда проявляла большую активность, нежели D1.

Ни строение, ни число положительных зарядов в РНК-связывающем центре синтетических рибонуклеаз на основе катионных молекул не влияют на их специфичность. Все исследованные соединения, подобно соединениям серии D, с наибольшей скоростью гидролизуют РНК по связям $CA \geq UA \gg CG, CU, CC$, расположенным в одноцепочечных участках. В то же время строение РНК-связывающего центра оказывает существенное влияние на скорость деполимеризации РНК: происходит примерно двухкратное увеличение скорости гидролиза РНК при замене остатка гистамина на метиловый эфир гистидина в каталитическом домене и примерно тридцатикратное ускорение при увеличении суммарного положительного заряда в РНК-связывающем домене от +2 до +4. Полученные данные в сочетании с расчетами оптимальной линкерной группы между РНК-гидролизующим и РНК-связывающим центрами позволяют нам получить синтетические рибонуклеазы, обладающие биологически значимой РНК-гидролизующей активностью.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ (3000 Ки/ммоль) фирмы Amersham (Англия), а также РНКазу T1 производства Boehringer Mannheim (Германия), бычьую щелочную фосфатазу фирмы Amersham (Англия), T4-полинуклеотидкиназу фирмы Biolabs (Франция), воду, очищенную с помощью системы Milli-Q фирмы Millipore (США). Все буферные растворы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с размером пор 0.22 мкм фирмы Millipore (США). Полиакриламидные гели были проанализированы с помощью системы BioImaging Analyser Fujix BAS 2000, Fuji Photo Film Co. Ltd (Япония).

Введение радиоактивной метки в *in vitro*-транскрипт тРНК^{Lys} из митохондрий человека с точечной мутацией А9 → С. Введение ^{32}P -метки на 5'-конец тРНК проводили в соответствии с процедурой, описанной в работе [19]. На первом этапе тРНК-транскрипт дефосфорилировали с помощью бактериальной щелочной фосфатазы. Для этого 320 пмоль тРНК KRW (8 мкг) растворяли в 50 мкл 50 мМ Трис-НСl, рН 8.1, содержащего 5% формамида и 0.2% SDS, инкубировали в течение 5 мин при 60°C, после чего реакционную смесь помещали в лед. К реакционной смеси добавляли 1 мкл (0.6 ед. акт./мкл) бактериальной щелочной фосфатазы и инкубировали 30 мин при 37°C; реакцию останавливали экстракцией фенолом, дефосфорилированную тРНК осаждали из реакционной смеси этанолом.

На втором этапе ^{32}P -метку вводили в дефосфорилированную тРНК, используя $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и T4-полинуклеотидкиназу. Реакционную смесь (15 мкл), содержащую 80 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 8 мМ MgCl_2 , 4 мМ дитиоэритрит, 0.1 мМ спермидин, 40 пмоль (1 мкг) дефосфорилированной тРНК, 20 мкКи $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и 20 ед. акт. (2 мкл) T4-полинуклеотидкиназы, инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Меченую РНК выделяли с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины. тРНК элюировали из геля 0.5 М ацетатом аммония, содержащим 0.1% SDS. ^{32}P -тРНК осаждали этанолом, растворяли в воде и хранили при -20°C. Полученные таким способом препараты меченой тРНК имели удельную активность 150000–200000 имп./мин пмоль.

Расщепление РНК в присутствии химических рибонуклеаз проводили в течение 10 ч при 37°C. Реакционная смесь (10 мкл) содержала 50 мМ имидазольный буфер (рН 7.0), 0.2 М NaCl, 0.5 мМ EDTA, 0.1 мг/мл РНК-носителя, 0.5–5 мМ химическую рибонуклеазу и 50000 имп./мин ^{32}P -тРНК. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% раствора перхлората лития в ацетоне, осадок РНК отделяли центрифугированием, промывали 100 мкл ацетона и растворяли его в буфере для нанесения на гель, содержащем 4 М мочевины и красители. Продукты гидролиза анализировали с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины. Отнесения сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами частичного гидролиза ^{32}P -тРНК KRW РНКазой T1 и имидазолом [14, 15]. Скорость гидролиза РНК выражали в условных единицах (степень деполимеризации РНК субстрата за 10 ч при 37°C в стандартном 50 мМ имидазольном буфере, рН 7.0).

Настоящая работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 99-04-49538 и 96-15-97732) и грантом INTAS № 96-1418.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ждан Н.С., Кузнецова И.Л., Власов А.В., Сильников В.В., Зенкова М.А., Власов В.В. // Биоорганическая химия. 1999. Т. 25. С. 723–732.
2. Kolchanov N.A., Titov I.I., Vlassova I.E., Vlassov V.V. // Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 1996. V. 53. P. 131–196.
3. Giege R., Helm M., Florentz C. // Prebiotic Chemistry, Molecular Fossils, Nucleosides and RNA / Eds D. Söll, S. Nishimura, P. Moore. Oxford: Pergamon Press, 1998. P. 63–80.
4. Власов В.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А. // Молекулярная биология. 1998. Т. 32. С. 62–70.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. М.: Мир, 1982.

6. Bresslow R., Labelle M. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2655–2659.
7. Komiyama M., Yoschinari K. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1989. P. 1880.
8. Podyminogin M.A., Vlassov V.V., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 5950–5956.
9. Lorente A., Espinosa J.F., Fernandez-Saiz M., Lehn J.-M., Wilson W.D., Zhohg Y.Y. // Tetrahedron Lett. 1996. V. 37. P. 4417–4420.
10. Vlassov V.V., Zuber G., Felden B., Behr J.-P., Giege R. // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 3161–3167.
11. Коневец Д.А., Зенкова М.А., Сильников В.Н., Власов В.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 360. С. 554–558.
12. Konevets D.A., Beck I.E., Beloglazova N.G., Sulemenko I.V., Silnikov V.N., Zenkova M.A., Shishkin G.V., Vlassov V.V. // Tetrahedron. 1999. V. 55. P. 503–512.
13. Tabushi I., Kobuke Y., Imuta J. // Nucleic Acids Symp. Ser. 1979. V. 6. P. 175–178.
14. Зенкова М.А., Чумакова Н.Л., Власов А.В., Комарова Н.И., Веньяминова А.Г., Власов В.В., Сильников В.Н. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. С.
15. Menger F.M., Persichetti R.A. // J. Org. Chem. 1987. V. 52. P. 3451–3452.
16. Helm M., Brule H., Degoul F., Cepanec C., Leroux J.-P., Giege R., Florentz C. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 1636–1643.
17. Heerschap A., Walters J.A., Hilbers C.W. // Biophys. Chem. 1985. V. 22. P. 205–217.
18. Helm M., Giege R., Florentz C. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 13338–13346.
19. Perret V., Garcia A., Puglisi J.D., Grosjean H., Ebe J.-P., Florentz C., Giege R. // Biochimie. 1990. V. 72. P. 735–744.

Chemical Ribonucleases. 2. Design and Hydrolytic Activity of the Ribonuclease Mimics on the Basis of Diazabicyclo[2.2.2]octane with a Differing Number of Positive Charges

M. A. Zenkova*[#], A. V. Vlassov*, D. A. Konevets*, V. N. Silnikov*, R. Giege**[#], and V. V. Vlassov*

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akad. Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Instut de Biologie Moléculaire and Cellulaire, Starsbourg, France

A procedure was proposed allowing one to synthesize RNA mimics on the basis of conjugates of diazabicyclo[2.2.2]octane with imidazole bearing a varying number of positive charges (*nDm* series, where *n* is the number of positive charges at neutral pH, *m* is the code of an imidazole-containing fragment of the catalytic domain: 1, histamine; 2, histidine methyl ester). The hydrolytic activity of six compounds of this series was studied under physiological conditions using *in vitro* transcript of human mitochondrial tRNA^{Lys} as a substrate. It was shown that the rate of RNA hydrolysis with *nDm* conjugates rises with an increase in the number of positive charges: an approximately 30-fold acceleration of hydrolysis was observed with an increase in the total charge of the construct from +2 to +4.

Key words: artificial RNases; enzyme active site modelling; RNA, hydrolysis

[#] To whom correspondence should be addressed; phone +7 (3832) 333761; e-mail: marzen@niboch.nsc.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 9. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.