



УДК 577.152.193'1:577.214.622

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СЕКРЕТОРНОГО 28-кДа БЕЛКА ИЗ ОБОНЯТЕЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ КРЫСЫ

© 1998 г. С. Г. Андреева, М. И. Меркулова, Т. М. Шуваева, В. И. Новоселов*,
И. В. Пешенко*, С. В. Новоселов*, Е. Е. Фесенко*, В. М. Липкин#

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино Московской области

Поступила в редакцию 09.06.98 г. Принята к печати 22.06.98 г.

Из библиотеки кДНК обонятельного эпителия крысы выделен клон λ 26.1, содержащий полноразмерный ген 28-кДа белка (1414 п. о.). Реконструированная из нуклеотидной последовательности кДНК аминокислотная последовательность белка содержит 223 а. о. Рассчитанная молекулярная масса белка составляет 24630 Да. Выявлена существенная гомология между аминокислотной последовательностью 28-кДа белка и тиолспецифическими антиоксидантами (пероксиредоксинами). 28-кДа белок принадлежит к ICys-подсемейству пероксиредоксинов и является первым пероксиредоксином, идентифицированным в обонятельном эпителии.

Ключевые слова: тиолспецифические антиоксиданты; пероксиредоксин; клонирование кДНК; обонятельный эпителий.

Недавно из обонятельного эпителия крысы нами был выделен водорастворимый секреторный белок, выявляющийся при SDS-электрофорезе как полипептид с M 28 кДа [1, 2] и обладающий тиолспецифичной антиоксидантной активностью [3]. Иммуногистохимический анализ показал, что 28-кДа белок локализован в обонятельной слизи и апикальных частях опорных и бокаловидных клеток обонятельного эпителия. Исследуемый белок обнаружен также в других тканях, имеющих непосредственный контакт с внешней средой (трахея, бронхи, легкие). Была определена частичная аминокислотная последовательность 28-кДа белка и в банках данных идентифицированы его возможные гомологи.

Анализ гомологичных полипептидов показал, что белок 28-кДа может принадлежать к недавно обнаруженному новому классу так называемых тиолспецифических антиоксидантов или пероксиредоксинов [4, 5]. Представители этого семейства в присутствии тиолов способны предохранять белки и ДНК от повреждений, вызванных действием ряда окислительных систем. Семейство пероксиредоксинов отличается высокой консервативностью и его представители обнаружены в геномах практически всех живых организмов от бактерий до человека [4, 6, 7].

Настоящая работа посвящена выяснению полной аминокислотной последовательности белка 28-кДа и определению его места в семействе пероксиредоксинов.

Ранее методами белковой химии нами была определена N-концевая аминокислотная последовательность 28-кДа белка и проведено его ферментативное расщепление [1, 2]. При разделении полученной смеси ВЭЖХ было выделено несколько пептидов, для трех из которых установлена аминокислотная последовательность. При сравнении аминокислотных последовательностей полученных фрагментов 28-кДа белка со структурами, хранящимися в EMBL и GenBank базах данных, были обнаружены три белка, первичная структура которых содержала искомые участки: продукт гена, регулируемого фактором роста кераноцитов мыши (KRG-1), идентифицированный как селеннесодержащая глутатионпероксидаза (EMBL, шифр Y12883, [8]); белок LTW4 из печени мыши (GenBank, шифр AF004670, [9]) и гипотетический белок ORF6 из миелобластомы человека (Nomura N., Miyajima N., Kawarabayashi Y., Tabata S. 1993, неопубликованные данные, GenBank, шифр D14662). Поскольку перечисленные выше белки чрезвычайно близки по структуре (а KRG-1 и белок LTW4 даже полностью идентичны), то, по-видимому, все они, в том числе изучаемый нами полипептид, являются видоспецифическими изоформами одного и того же белка. Для поиска кДНК 28-кДа белка были синтезированы олигонуклеотиды,

#Автор для переписки (тел.: (095) 336-61-66; e-mail: lipkin@ibch.siocb.ras.ru).

(a)	PGGLL	KLAPEF	KDINAY	
(б)	MPGGLLLGDEAPNFEANTTI GRIRFHDFLGDSWGILFSHPRDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRNVKLIALSIDSVEDHLAWSKDINAYN			90
(в)	MPGGLLLGDVAPNFEANTTVGRIRFHDFLGDSWGILFSHPRDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRNVKLIALSIDSVEDHLAWSKDINAYN			90
(a)				
(б)	GETPTEKLPFPPIIDDKGRDLAILLGMLDPVEKDDNNMPVTARVWF IFGPDKCLKLSILYPATTGRNFDEILRWVDSLQLTGTQKVPATPVD			180
(в)	CEEPTEKLPFPPIIDDRNELA ILLGMLDPAEKDEKGMPTARVWFVFGPDKCLKLSILYPATTGRNFDEILRWI SLQLTAEKRVATPVD			180
(a)		KGVFT		
(б)	WKKGESVMVPTLSEEEAKQCFPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP			224
(в)	WKDGDSVMVLPT IPEEEAKKLFPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP			224

Рис. 1. Частичная аминокислотная последовательность 28-кДа белка из обонятельного эпителия крысы (а), аминокислотные последовательности селенесодержащей глутатионпероксидазы из кератиноцитов мыши (EMBL, шифр Y12883) и белка LTW4 из печени мыши (GenBank, шифр AF004670) (б), а также гипотетического белка из миелобластомы человека ORF6 (GenBank, шифр D14662) (в). Аминокислотные последовательности, выбранные для синтеза олигонуклеотидных зондов, подчеркнуты.

кодирующие последовательность пептидов в консервативных районах изоформ данного белка (рис. 1). Олигонуклеотидные зонды (I) и (III) (таблица) были использованы для получения фрагмента кДНК 28-кДа белка методом ПЦР из библиотеки кДНК обонятельного эпителия крысы. Олигонуклеотид (II) (таблица) использовали для контроля специфичности синтезируемого фрагмента. Полученный после амплификации фрагмент кДНК имел длину, соответствующую ожидаемой, рассчитанной на основе данных по структурам гомологичных белков. Амплифицированный фрагмент был клонирован в плазмиду pSp65 по сайту *Hind*II. Отбор рекомбинантных клонов проводили при помощи олигонуклеотида (II). В результате были получены два клон. Анализ нуклеотидных последовательностей вставок кДНК этих клонов показал их полную идентичность и высокую гомологию с описанными в литературе белками [4, 6, 8, 9].

Для выделения полноразмерной кДНК изучаемого белка проанализирована библиотека кДНК из обонятельного эпителия крысы пред-

ставительностью около 5×10^5 клонов. В качестве зонда для скрининга библиотеки использовали α - 32 P-меченый ПЦР-фрагмент кДНК этого белка. После ряда последовательных циклов гибридизации было получено четыре индивидуальных клон, дающих положительный сигнал. Для определения нуклеотидной последовательности был выбран клон λ a26.1, содержащий вставку кДНК 28-кДа белка с максимальной длиной (рис. 2).

Полученная нуклеотидная последовательность и выведенная из нее аминокислотная последовательность представлены на рис. 3. Открытая рамка считывания между нуклеотидными основаниями 35 и 709 кодирует полную структуру 28-кДа белка. Все аминокислотные последовательности, выявленные при анализе N-концевой части цепи и пептидов, полученных при гидролизе белка лизинспецифичной протеиназой [1, 2], кодируются этой открытой рамкой считывания. Анализ N-концевой последовательности 28-кДа белка показывает, что N-концевой остаток Met, кодируемый иницирующим ATG-кодоном (положение 35–37), отщепляется в процессе пост-

Олигонуклеотиды, используемые в работе

№	Нуклеотидная структура	Аминокислотная последовательность пептида	Степень вырожденности
(I)	$5'GC^{(G/T)}CCIGAGTTTGC^{(G/T)}AA^{(A/C)}(A/C)G^{(G/A/T/C)}AA^3$	APEFAKRN	64
(II)	$5'TGGAGTAAGGATATIAATGC^{(G/T)}TA^{(T/C)}AA^3$	WSKDINAYN	4
(III)	$5'AGTTCTTTTIGTGAA^{(G/A/T/C)}AC^{(G/A/T/C)}CC^{(T/C)}TT^3$	KGVFTKEL	32



Рис. 2. Схема строения кДНК 28-кДа белка из обонятельного эпителия крысы клона ла26.1. Черный прямоугольник соответствует кодирующей области, белые — 5'- и 3'-нетранслируемым областям. Стрелками обозначены положения на цепи олигонуклеотидных праймеров (I) и (III), использованных для синтеза ПЦР-фрагментов кДНК, и зонда (II), для отбора содержащих их клонов.

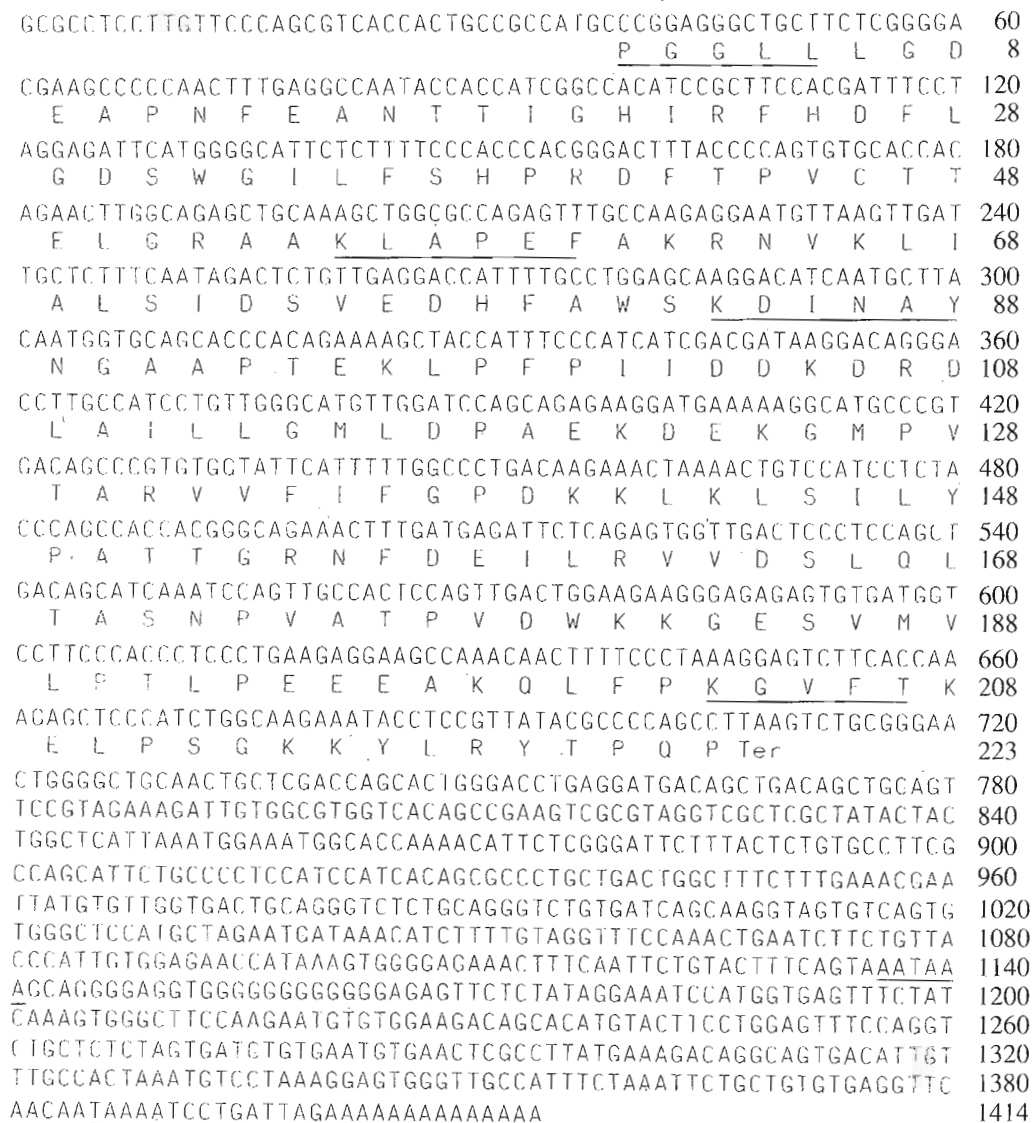


Рис. 3. Нуклеотидная последовательность кДНК 28-кДа белка из обонятельного эпителия крысы и реконструированная полная аминокислотная последовательность белка. Подчеркнуты последовательности, определенные методами белковой химии. В 3'-нетранслируемой области подчеркнуты сайты полиаденилирования. Тер — сигнал терминирования трансляции.

трансляционной модификации (рис. 3). Терминирующий кодон TAA находится в положении 707-709, а на расстоянии 425 и 673 п.о. от него, соответственно в положениях 1136-1141 и 1384-1389 в

3'-нетранслируемой области кДНК расположены два потенциальных сигнала полиаденилирования (рис. 3). Выведенная из нуклеотидной последовательности кДНК первичная структура 28-кДа

		53
28-кДа	PGG-LLLGDVAPNFEANTTV--G---RIRFHDFLGDSWGILFSPRDFTPVCTTELGRA	
ORF6	MPPG-LLLGDEAPNFEANTTI--G---HIRFHDFLGDSWGILFSPRDFTPVCTTELGRA	
PER1	MP-G-LTIGDTVPNLELDSTH--G---KIRIHDYVNGYVILFSPGDFTPVCTTELAAM	
MSP23	MSSGNAKIGYPAPNFKATAVMPDGOQKDISLSEYKG-KYVVFFFYPLDFTFVCPTEIIAF	
NKEF-A	MASGNARIGKPADEFKATAVV-DGAFKEVKLSDYKG-KYVVLEFFYPLDFTFVCPTEIIAF	
SP-22	A---PAVTQHAPYFKGTAVV-SGEFKEISLDDFKG-KYLVLEFFYPLDFTFVCPTEIIAF	
Y TSA	V---AQVQKQAPTEFKKTAVV-DGVFDEVSLDKYKG-KYVVLAFIPLAFTFVCPTEIIAF	
AhpC	MSLINTKIKP-FKNQAFK-NGEFIEVTEKDTG-RWSVFFFYPADFTFVCPTELGDV	
		113
28-кДа	AKLAPEFAKRNKLIALSIDSVEDHFAWSKDINAYNGAAPTEKLPFPIIDDKDRDLAILL	
ORF6	AKLAPEFAKRNKLIALSIDSVEDHLAWSKDINAYNCEEPTKLPFPIIDDRNRELAILL	
PER1	ANYAKEFEKRGVKLIGISCDVQSHKEWTKDIEAYK---PGSKVTYPIPADPDRSAIKQL	
MSP23	SDRADEFKKLNCQVIGASVDSHFCHLAWINTPKKQ-G--GLGPMNIPLISDPKRTIAQDY	
NKEF-A	SNRAEDFRKLGCEVLGVSVDSQFTHLAWINTPRKE-G--GLGPLNIPLLADVTRRLSEDY	
SP-22	SDKASEFHVDNCEVVAVSVDSHFHSLAWINTPRKN-G--GLGHMNIALLSDLTKQISRDY	
Y TSA	SEAAKKFEEQGAQVLFASDSEYSLLAWTNI PRKE-G--GLGPINIPLLADTNHSLSRDY	
AhpC	ADHYEELQKLGVDVYSVSTDTHTFTHKAWHSS--E---TIAKIKYAMIGDPTGALTRNF	
		172
28-кДа	GMLDPAEKDEKGMPTARVVFIFGPKDKLKSILYPATTGRNFDEILRVVDSLQLTASN-	
ORF6	GMLDPAEKDEKGMPTARVVFVFGPKDKLKSILYPATTGRNFDEILRVVISLQLTAEK-	
PER1	NMVDPEDEKDAQGQ-LPSRTLHIVGPKDVVKSFLYPSCTGRNMDEVVRAVDSLTLTAAKH-	
MSP23	GVLKADE----GI--SFRGLFIIDDKILRQITINDLPVGRSVDEIIRLVQAFQFTDKH-	
NKEF-A	GVLKTDE----GI--AYRGLFIDGKGVLRQITVNDLPVGRSVDEALRLVQAFQYTDH-	
SP-22	GVLLEGP----GL--ALRGLFIDPNGVIKHLVNDLPVGRSVEETLRLVKAQFVEAH-	
Y TSA	GVLIEEE----GV--ALRGLFIDPKGVIRHITINDLPVGRNVDEALRLVEAFQWTDKN-	
AhpC	DNMREDE----GL--ADRATFVVDPQGI IQAIEVTAEGI GRDASDLLRKKIAAQYVAHP	
		223
28-кДа	PVATPVDWKKGESVMVLPPLPELEAKQLFPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP	100.0%
ORF6	RVATPVDWKKDGDVSMVLPPIPEEEAKKLFKPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP	91.5%
PER1	KVATPANWKPGECEVVIAPGVSDDEAKMFPQGFETADLPSKKGYLRFYTKV-	52.0%
MSP23	GEVCPAGWKPG--SDTIKPDVVK--SKEYFSKQK	31.4%
NKEF-A	GEVCPAGWKPG--SDTIKPNVDD--SKEYFSKHN	31.4%
SP-22	GEVCPANWTPPE--SPTIKPHPTA--SREYFEKVNQ	27.3%
Y TSA	GTVLPCNWTPGA--ATIKPTVED--SKEYFEAANK	25.1%
AhpC	GEVCPAKWKEGE--ATLAPSLD-----LVGKI	24.7%

Рис. 4. Сравнение полной аминокислотной последовательности 28-кДа белка с последовательностями некоторых представителей семейства пероксиредоксинов. Условные обозначения: 28-кДа (28-кДа белок из обонятельного эпителия крысы); ORF6 (1Cys-пероксиредоксин, человек, GenBank, D14662); PER1 (ячмень, GenBank, X96551); MSP23 (23 кДа стрессовый белок, мышь, SWISS-PROT, P35700); NKEF-A (белковый фактор А, усиливающий активность естественных киллеров, человек, SWISS-PROT, Q06830); SP-22 (митохондриальная тиоредоксин-зависимая пероксиредуктаза, бык, SWISS-PROT, P35705); Y TSA (тиолспецифический антиоксидант, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, SWISS-PROT, Q04120); AhpC (субъединица С бактериальной алкилгидропероксиредуктазы, *Salmonella typhimurium*, SWISS-PROT, P19479). Жирным шрифтом выделены аминокислотные остатки, инвариантные во всех последовательностях; серым цветом – остатки, идентичные у двух и более представителей семейства пероксиредоксинов, включая белок 28-кДа. Прочерки введены для оптимизации выравнивания. Цифры справа соответствуют степени идентичности (в процентах) приведенных аминокислотных последовательностей относительно последовательности 28-кДа.

белка включает в себя 223 а.о., его N-концевым остатком является Pro, а рассчитанная молекулярная масса – 24630 Да. Белок характеризуется высоким содержанием отрицательно заряженных аминокислотных остатков и имеет изоэлектрическую точку 5.72.

Анализ полученной полной первичной структуры 28-кДа белка выявил его существенную гомологию с пероксиредоксинами. К настоящему

времени идентифицировано более 70 представителей данного семейства. На рис. 4 приведено сравнение аминокислотной последовательности 28-кДа белка со структурами некоторых из них. Единственный в молекуле 28-кДа белка остаток Cys⁴⁶ входит в состав консервативного для всех пероксиредоксинов участка F-T-(P, F)-V-C-(T, P)-T-E, составляющего их каталитический центр, и существен для проявления антиоксидантных

свойств белка [3, 4, 10, 11]. Поскольку в молекуле 28-кДа белка отсутствует второй инвариантный остаток Cys¹⁷⁰ [4, 11] (без учета процессинга N-концевого аминокислотного остатка), то исследуемый белок должен быть отнесен к подсемейству пероксиредоксинов с одним консервативным цистеином (1Cys-подсемейство) или, согласно недавно предложенной для млекопитающих номенклатуре, к пероксиредоксином типа V [12].

Ближайшими гомологами 28-кДа белка (со степенью гомологии более 90%) являются упомянутые выше "селенсодержащая глутатионпероксидаза" и человеческий белок ORF6, а установленная недавно структура белка, идентифицированного как "Ca²⁺-независимая кислая фосфолипаза типа A₂" [13], из легкой крысы была полностью идентичной. Такая высокая консервативность аминокислотных последовательностей сравниваемых белков, несмотря на их разные названия, свидетельствует в пользу отнесения всех этих белков к одному семейству тиолспецифических антиоксидантов – пероксиредоксином типа V, тем более что наши исследования не подтвердили наличия глутатионпероксидазной [3] и типичной фосфолипазной активностей (не опубликовано) у 28-кДа белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, цитрат натрия, хлориды кальция и магния, ацетат натрия, 2-меркаптоэтанол, уксусную кислоту, DMSO (Merck, Германия); агарозу, N,N'-метиленабисакриламид, акриламид, SDS, N,N,N',N'-тетраметиленадидин (Bio-Rad, США); EDTA, тритон X-100, борную кислоту, бромфеноловый синий, ксилолцианоловый голубой (Koch-Light, Англия); дитиотреит, бромистый этидий, поливинилпирролидон, фикоколл-400, глицерин, бычий сывороточный альбумин (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США); мочевины, DE-AE-целлюлозу DE-52, ватман 3ММ (Whatman, Англия); нитроцеллюлозные фильтры BA-85 (Schleicher & Schuel, Германия); мембраны Nubond-N (Amersham, Англия); эндонуклеазы рестрикции фирм Ферментас (Литва), Pharmacia (Швеция), Amersham (Англия), Promega (США), Boehringer-Mannheim (Германия); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli*, полинуклеотидкиназу фага Т4, наборы для ник-транскрипции, ДНК-лигазу фага Т4, ДНК-полимеразу I *E. coli*, плазмиду рSP65, РНКазу А, яичный лизоцим, щелочную фосфатазу из кишечника теленка (Promega, США); протеиназу К (Serva, Германия).

В работе была использована библиотека кДНК из обонятельного эпителия крысы. Клонирование кДНК велось по сайту EcoRI вектора λNM 1149. ДНК фага λ вводили в клетки *E. coli*

(штамм С600 Нf) при помощи фаговой инфекции. Рекомбинантные бактериофаги идентифицировали методом гибридизации фаговых бляшек *in situ* [14] в модификации, предложенной в работе [15]. Фаговую ДНК из индивидуальных клонов выделяли с помощью набора "Wizard Lambda Preps DNA Purification System" (Promega, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Согласно приложенной инструкции, используя набор "Sequencing version 2.0" (USB, США), определяли нуклеотидную последовательность кДНК по методу Сэнгера на двухцепочечной матрице [16]. ПЦР проводили с использованием набора для Taq-ДНК-полимеразы (Perkin Elmer-Cetus, США). Остальные манипуляции с ДНК осуществляли стандартными методами [17].

Описываемая в этой работе нуклеотидная последовательность депонирована в базах данных EMBL и GenBank под шифром Y17295.

Авторы выражают благодарность проф. Х. Брееру (Universitat Hohenheim, Stuttgart, Германия) за любезно предоставленную библиотеку кДНК из обонятельного эпителия крысы, а также Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов. Работа поддержана Международным грантом INTAS-RFBR (№ 95-1111) и грантом РФФИ № 96-04-48161.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Yu.V., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. // FEBS Lett. 1996. V. 381. P. 12–14.
2. Пешенко И.В., Новоселов В.И., Евдокимов В.А., Попов В.И., Николаев Ю.В., Шуваева Т.М., Липкин В.М., Фесенко Е.Е. // Сенсорные системы. 1996. Т. 10. С. 97–109.
3. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Yu.V., Kamzalov S.S., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. // Free Radic Biol. & Medicine. 1998 (in press).
4. Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G., Rhee S.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 7017–7021.
5. Kim K., Kim I.H., Lee K.-Y., Rhee S.G., Stadtman E.R. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 4707–4711.
6. Chae H.Z., Rhee S.G. // Biofactors. 1994. V. 4. P. 177–180.
7. Rhee S.G., Kim I.H., Chae H.Z., Yim M.B., Uchida K., Netto L.E., Stadtman E.R. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. V. 738. P. 86–92.
8. Munz V., Frank S., Huebner G., Olsen E., Werner S. // Biochem. J. 1997. V. 326. P. 579–585.
9. Iakoubova O.A., Pacella L.A., Her H., Beier D.R. // Genomics. 1997. V. 42. P. 474–478.
10. Новоселов В.И., Пешенко И.В., Евдокимов В.А., Камзалов С.С., Новоселов С.В., Николаев Ю.В.,

- Быстрова М.Ф., Фесенко Е.Е. // Биофизика. 1998. Т. 43. С. 610–616.
11. Chae H.Z., Uhm T.B., Rhee S.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1994. V. 91. P. 7022–7026.
12. Jin D.-Y., Chae H.Z., Rhee S.G., Jeang K.-T. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 30952–30961.
13. Kim T.S., Sundaresh C.G., Feinstein S.I., Dodia C., Skach W.R., Jain M.K., Nagase T., Seki N., Ishikawa K., Nomura N., Fisher A.B. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 2542–2550.
14. Benton W.D., Davis R.W. // Science. 1977. V. 196. P. 180–182.
15. Woo S.L.C. // Methods Enzymol. 1979. V. 68. P. 389–395.
16. Henikoff S. // Gene. 1984. V. 28. P. 351–359.
17. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.

Cloning and Sequencing of a Secretory 28-kDa Protein from Rat Olfactory Epithelium

S. G. Andreeva*, M. I. Merkulova*, T. M. Shuvaeva*, V. I. Novoselov**, I. V. Peshenko**, S. V. Novoselov**, E. E. Fesenko**, and V. M. Lipkin*#

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

Clone λ a26.1 isolated from rat olfactory epithelium contains a full-length 28-kDa protein cDNA (1414 b. p.). The reconstructed protein sequence comprises 223 aa with a calculated molecular mass of 24 630 Da. A substantial homology was revealed between the amino acid sequence of the 28-kDa protein and those of thiol-specific antioxidants (peroxiredoxines). The 28-kDa protein belongs to the 1Cys-subfamily of peroxiredoxines and is the first member of peroxiredoxines identified in the olfactory epithelium.

Key words: thiol-specific antioxidants, peroxiredoxines, cDNA cloning, olfactory epithelium

To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 336-6166; e-mail: lipkin@ibch.siobc.ras.ru.