

3. Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Гогоман И. В., Бауман В. К. Влияние 3β-фторвитамина D₃ и 1α,25-дихолевитамина D₃ на аминокислотный состав коллагена кожи цыплят // Докл. АН Украины.— 1992.— № 3.— С. 122—127.
4. Frelstad R. L., Catanese V. M., Rubin D. T. Collagen fractionation-separation of native types I, II, and III by differential precipitation // Anal. Biochem.— 1976.— 71, N 1.— P. 114—118.
5. Троицкий Г. В., Ажицкий Б. Ю. Изoeлектрическое фокусирование белков в самоорганизованных и искусственных pH-градиентах.— Киев: Наук. думка, 1981.— 215 с.
6. Органическая электрохимия / Под ред. М. Бейзера, Х. Лунда.— М.: Химия, 1988.— Т. 1.— 469 с.
7. Бондаренко Л. Б., Яхимович Р. И., Бауман В. К. Влияние 1α-схевитамина D₃ и 24,25-дихолевитамина D₃ на коллагены кости, кожи и хряща цыплят // Биополимеры и клетка.— 1992.— 8, № 5.— С. 38—43.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии
АН Украины, Киев

Получено 09.10.92

УДК 578.2:511:577.113

М. И. Менджул, С. А. Сырчин, А. А. Аверкиев, Б. А. Ребентиш

СПОСОБЫ ЗАЩИТЫ ДНК ЦИАНОФАГА LPP-3 ОТ СИСТЕМ РЕСТРИКЦИИ — МОДИФИКАЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИИ PLESTONEMA BORYANUM

Для проверки наличия модифицированных оснований в ДНК цианофага LPP-3 и цианобактерии *P. boryanum* использовали метод HPLC с помощью установки «System GOLD». Анализ профиля элюции гидролизатов позволил идентифицировать, кроме канонических оснований, присутствие в ДНК *P. boryanum* 5-метилцитозина в концентрации 1,2% и N-6-метиладенина — 4,5%. ДНК LPP-3 содержит 0,8% 5-метилцитозина и не включает N-6-метиладенина. 5-Метилцитозин удалось обнаружить только модифицированным методом гидролиза ДНК фтористоводородной кислотой. Для выявления сайтов специфического метилирования ДНК цианофага LPP-3 и ДНК *P. boryanum* подвергли ферментативному гидролизу рестриктазами-изоизомерами, по-разному реагирующими на метилирование остатков цитозина и аденина в сайтах узнавания. Установлено метилирование по аденину в GATC-последовательностях ДНК *P. boryanum* и по второму цитозину CC(AAT)GG-последовательностей как в ДНК *P. boryanum*, так и в ДНК LPP-3. Делается вывод о наличии у *P. boryanum* систем рестрикции — модификации *dam*- и *dstI*-подобного типа. Защита вирусного генома от систем рестрикции — модификации хозяина осуществляется метилированием последовательности *SmC(AAT)GG* и контрелекцией по сайту *BamHI*. По данным рестрикционного анализа, контрелекции, очевидно, подвержена и последовательность *GG(C/G)CC*.

Введение. LPP-3 — цианофаг, инфицирующий нитчатую цианобактерию *P. boryanum*, является перспективным объектом для изучения процессов регуляции вирусной инфекции у фототрофных прокариот.

Ранее нами показано, что ДНК цианофага LPP-3 устойчива к действию многих эндонуклеаз рестрикции с гексапалиндромными нуклеотидными сайтами узнавания. Кроме того, количество экспериментально наблюдаемых сайтов рестрикции для некоторых пента- и тетрапалиндромных рестриктаз значительно отличается от теоретически ожидаемого для такого типа ДНК [6]. Возможными причинами подобного явления могут быть метилирование генома цианофага LPP-3 либо элиминация потенциально «опасных» сайтов. Метилирование ДНК — наиболее распространенный способ защиты вирусного генома от систем рестрикции — модификации прокариотических хозяев [18]. Чаще всего метилированные основания присутствуют в ДНК в виде 5-метилцитозина и N-6-метиладенина и являются продуктами пострепликативного метилирования. Помимо этого, появляется все больше данных о другом способе защиты вирусной ДНК — контрелекции сайтов узнавания рестриктаз и метилаз хозяина. Такой процесс проходит, вероятнее всего, за счет трансверсий либо транзаций оснований в «опасных» для вируса

© М. И. Менджул, С. А. Сырчин, А. А. Аверкиев, Б. А. Ребентиш, 1993

последовательностях. В связи с этим интерес представляли исследования по выявлению метилированных оснований в ДНК цианофага *LPP-3* и цианобактерии *P. boryanum*, а также специфичности их метилирования для анализа систем рестрикции — модификации у *P. boryanum* и способах защиты от них ДНК цианофага *LPP-3*.

Материалы и методы. Объектами исследования служили цианофаг *LPP-3* [8, 9] и его хозяин — цианобактерия *P. boryanum* Gom. GALU, штамм 465 (Индия, ун-т, США).

Биомассу цианобактерии *P. boryanum* получали по методикам [7]. ДНК цианобактерии *P. boryanum* выделяли по методу [10] с некоторыми модификациями. Клетки собирали на фильтрах с диаметром пор 0,45 мкм, литическая смесь содержала 5—8 мг лизоцима («Serva», Германия) на 1 мл культуры с концентрацией $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл. В качестве детергента использовали N-лаурилсаркозин («Serva») в конечной концентрации 2 %. Образование сферопластов контролировали под световым микроскопом. ДНК экстрагировали дважды фенолом с последующей очисткой водной фазы эфиром. Затем ее осаждали двумя объемами абсолютного этанола при -20°C , после чего дважды промывали 70 %-м этиловым спиртом и растворяли в TE-буфере.

Вирусный лизат цианофага *LPP-3* получали по ранее описанным методикам [5]; ДНК цианофага *LPP-3* — фенольно-детергентным методом [4].

Химический гидролиз ДНК HClO_4 осуществляли по методу [1].

Для гидролиза ДНК фтористоводородной кислотой использовали модифицированный метод [13] (33 %-я HF, 80°C в течение 2 ч).

ВЭЖХ гидролизатов проводили по модифицированному методу [22]; разделение продуктов химического гидролиза исследуемых ДНК и стандартных оснований — на хроматографической системе HPLC «System GOLD» фирмы «Beckman» (США), применяя колонку C-18 RPC с мобильной фазой 25 mM KH_2PO_4 — изопропанол. В качестве стандартов применяли синтезированные основания HPLC-чистоты. Идентификацию пиков и расчеты концентраций осуществляли с помощью компьютерной программы, входящей в «System GOLD» [25, 26].

Для ферментативного гидролиза ДНК использовали эндонуклеазы рестрикции НПО «БИОТЕХ» (Россия), фирм «Pharmacia» (Швеция) и «Sigma» (США). ДНК гидролизовали в буферных смесях, рекомендованных фирмой-изготовителем.

Электрофорез продуктов ферментативного гидролиза проводили в 1 %-й агарозе, а также в 5 %-м и 8 %-м ПААГ по [4].

Бесклеточные экстракты получали ранее описанным методом ультразвуковой дезинтеграции [3] с последующим ультрацентрифугированием при 108 000 *g* в течение 2 ч.

Метиллазную активность частично очищенных экстрактов *P. boryanum* определяли по методу [15], используя в качестве донора метильных групп S-аденозил-L-(метил- ^3H)метионин «Amersham» (Англия) (555 ГБк/ммоль). Кислотосодержащий буфер с S-аденозилметионином нейтрализовали добавлением равного объема 200 mM трис- HCl-буфера, pH 8,7. Реакционная смесь содержала 185 кБк S-аденозилметионина на 20 мкг ДНК. Время инкубации составляло 3 ч при 37°C . Активность проб измеряли на сцинтилляционном счетчике «Beckman» LS 7800 (фильтры GF/C, «Whatman»).

Результаты и обсуждение. Ранее разработанные методы выявления модифицированных оснований ДНК с помощью тонкослойной хроматографии хорошо зарекомендовали себя для объектов с относительно высоким их содержанием [2, 12]. Поэтому мы использовали наиболее чувствительный метод обнаружения и идентификации модифицированных оснований в ДНК — ВЭЖХ продуктов химического гидролиза. Стандартный метод гидролиза клеточной и вирусной ДНК, проведенного с помощью хлорной кислоты, не позволил нам идентифицировать в ней 5-метилцитозин. Последнее может быть связано с процессами де-

заминирования, что заставляет исследователей искать другие способы гидролиза ДНК. Среди них можно назвать ферментативный гидролиз ДНК [17] и химический гидролиз с помощью фтористоводородной кислоты [13]. Нами был выбран метод химического гидролиза ДНК HF.

Хроматография продуктов гидролиза ДНК *P. boyanum* и *LPP-3* представлена на рис. 1. Анализ профиля элюции гидролизатов позволил идентифицировать, кроме канонических оснований, присутствие

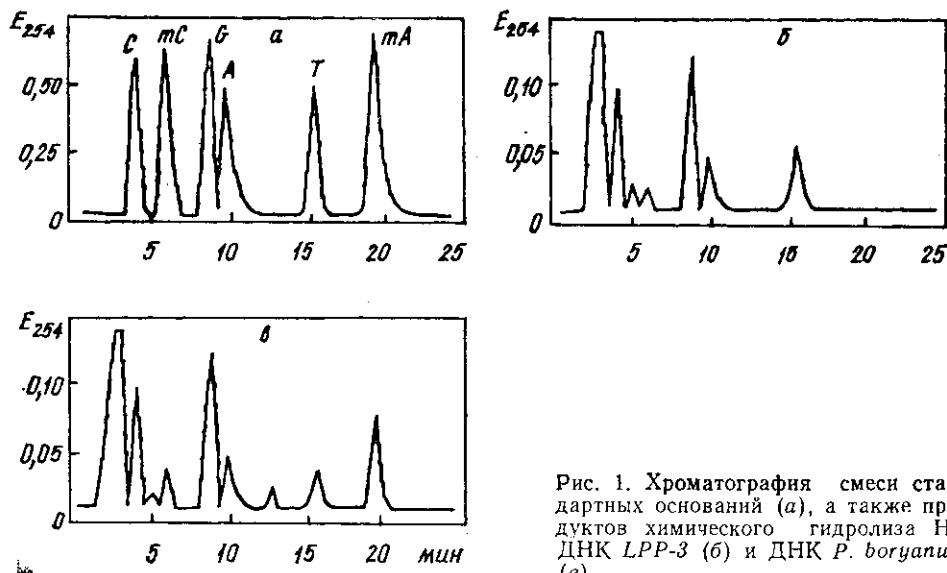


Рис. 1. Хроматография смеси стандартных оснований (а), а также продуктов химического гидролиза HF ДНК *LPP-3* (б) и ДНК *P. boyanum* (в)

в ДНК *P. boyanum* 5-метилцитозина в концентрации 1,2 % и N-6-метиладенина — 4,5 %. ДНК *LPP-3* содержит 0,8 % 5-метилцитозина и не включает N-6-метиладенина.

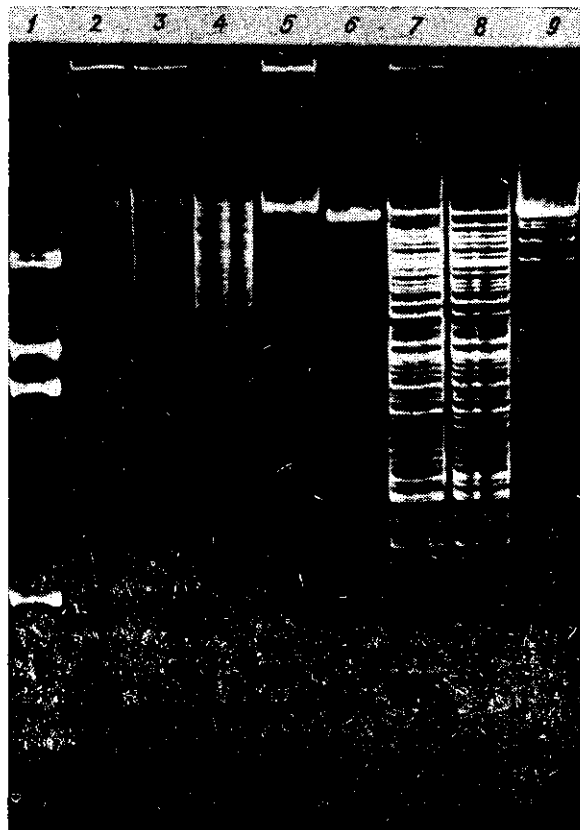
Для обнаружения сайтспецифического метилирования ДНК цианофага *LPP-3* и ДНК *P. boyanum* подвергали ферментативному гидролизу рестриктазами-изошизомерами, узнающими одинаковые палиндромные последовательности, но по-разному реагирующими на метилирование остатков цитозина и аденина в этих последовательностях. Различия, наблюдаемые в электрофоретических профилях продуктов гидролиза ДНК такими рестриктазами, являются тестом на наличие метилированных оснований. Эндонуклеазы рестрикции *MspI* и *HpaII* используются для выявления метилированного цитозина в сайте CCGG. *HpaII* не гидролизует ни mCCGG-, ни CмCCGG-последовательностей, в то время как *MspI* чувствительна только к метилированию 5'-концевого цитозина и расщепляет CмCCGG, но не mCCGG. Характер электрофоретического распределения продуктов ферментативного гидролиза рестриктазами *MspI* и *HpaII* свидетельствуют об отсутствии метилирования ДНК цианофага *LPP-3* и цианобактерии *P. boyanum* по внутреннему цитозину в сайте CCGG.

Пара рестриктаз *MvaI* и *ApyI* узнает на ДНК один и тот же сайт CC(A/T)GG. Рестриктаза *MvaI* гидролизует ДНК по этому сайту независимо от наличия в нем 5-метилцитозина, а рестриктаза *ApyI* — только в случае метилирования цитозина во втором положении и отсутствия метилирования в первом. Как видно из рис. 2, распределение продуктов гидролиза ДНК цианофага *LPP-3*, полученных под действием этих нуклеаз, практически идентично. То же самое отмечается и в случае продуктов рестрикции ДНК *P. boyanum*. Эти данные свидетельствуют о том, что практически во всех CC(A/T)GG-сайтах ДНК цианофага *LPP-3* и ДНК *P. boyanum* цитозин во втором положении метилирован.

Для определения метилированного аденина использовали нуклеазы *Sau3A*, *MboI* и *DpnI*, узнающие последовательность GATC. *Sau3A* расщепляет ДНК в этой последовательности вне зависимости от наличия в ней метилированного аденина, но не гидролизует сайт, содержащий метилированный цитозин, а рестриктаза *MboI* — только неметилированные по остаткам аденина GATC-сайты независимо от присутствия в них метилированного цитозина. Рестриктаза *DpnI* разрезает ДНК исключительно в GmATC-последовательности.

Из рис. 3 видно, что ДНК *P. boyanum* в одинаковой степени гидролизуется рестриктазами *Sau3A* и *DpnI*, но не подвержена рестрикции *MboI*. Эти данные подтверждаются тем, что практически все GATC-сайты, содержащиеся в ДНК *P. boyanum*, метилированы по аденину. Иную картину рестрикции можно наблюдать для ДНК цианофагов *LPP-3*. Так, эндонуклеазы *Sau3A* и *MboI* образовывали совершенно идентичные рестрикты, в то

Рис. 2. Исследование сайтовpecificного метилирования цитозина ДНК *LPP-3* и *P. boyanum*: 1 — маркер *pBR322* / *BstNI*; 2 — ДНК *P. boyanum*; 3—5 — ДНК *P. boyanum*, гидролизованная *ApyI* (3), *MvaI* (4), *BclI* (5); 6 — ДНК *LPP-3*; 7—9 — ДНК *LPP-3*, гидролизованная *ApyI* (7), *MvaI* (8), *BclI* (9)



время как рестриктаза *DpnI* не гидролизовала вирусную ДНК, что свидетельствует об отсутствии метилирования аденина в GATC-сайтах.

Из сравнения количества метилированных CmC (A/T)GG-сайтов рестриктазы *ApyI* и общего количества 5-метилцитозина в исследованных ДНК следует, что почти весь метилированный цитозин сосредоточен в этих сайтах. Это предположение подтверждает близкое к теоретически ожидаемому количество сайтов рестрикции у ДНК *LPP-3* и *P. boyanum* для эндонуклеаз, чувствительных к метилированию цитозина в сайтах узнавания, — *AluI*, *BbvI*, *Sau3A* и *HpaII*. Особо следует отметить сильное отклонение количества сайтов рестрикции для эндонуклеаз *HaeIII*, *CfrI31* и *AvaII* от их теоретически ожидаемого числа. Так, при 53 %-м содержании GC-пар в ДНК *LPP-3* вероятность встречаемости GGCC-сайта равна примерно 200, то же количество можно было бы ожидать и для GGNCC. Однако реально мы наблюдаем 1 и 7 сайтов соответственно. Если бы ингибирование рестрикции было связано с метилированием сайтов узнавания для этих рестриктаз, то количество 5-метилцитозина в этом случае должно было бы быть в 3—5 раз выше экспериментально обнаруженного.

Идентичность рестриктов, полученных после гидролиза ДНК *LPP-3* нуклеазами *CfrI31* и *AvaII*, свидетельствует, согласно общепринятым методам определения специфичности рестриктаз, о том, что

Cfr131 гидролизует ДНК *LPP-3* по сайтам *AvaII*. Следовательно, сайты GG(C/G)CC должны быть либо метилированы по последнему цитозину, либо подвергнуты копрелекции. В случае метилирования GG(C/G)CC-сайт должен существовать в виде GG(C/G)Cm(CA/T)GG, т. е. перекрываться *ApyI*-сайтом. Однако данная последовательность содержит GGCC-сайт *HaeIII*, который не ингибируется метилированием. К тому же методом двойных переваров нам удалось установить, что уникальный сайт *HaeIII* является частью последовательности

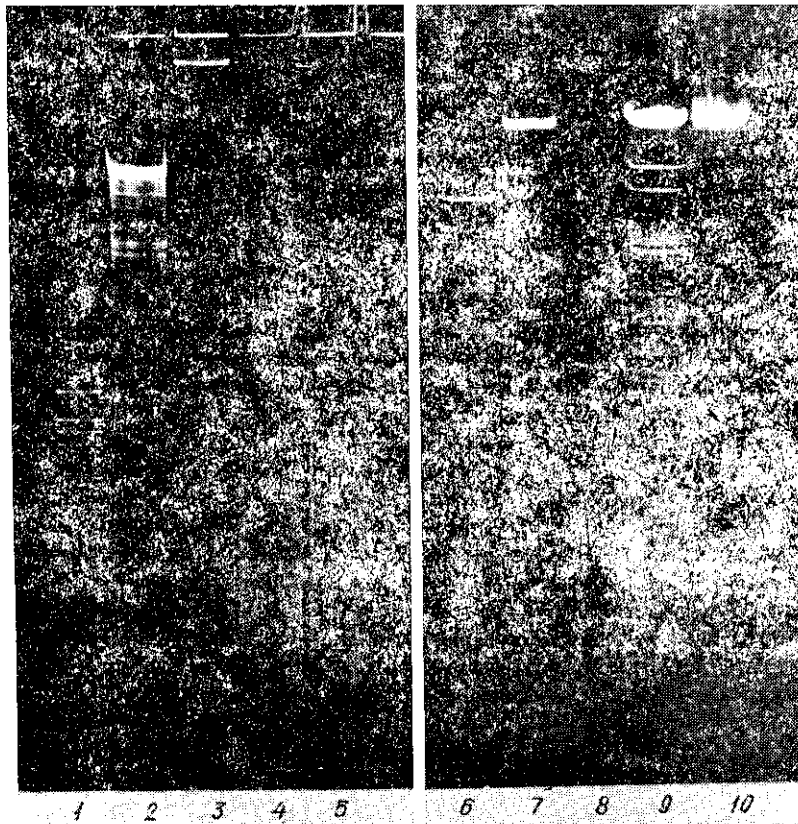


Рис. 3. Исследование сайтспецифического метилирования аденина и ДНК *LPP-3* и *P. boryanum*: 1 — маркер *pBR322/HaeIII*; 2, 3 — ДНК *LPP-3*, гидролизованная *Sau3A* и *DpnI* соответственно; 4, 5 — ДНК *P. boryanum*, гидролизованная *Sau3A* и *DpnI* соответственно; 6 — Маркер *pBR322/BstNI*; 7 — ДНК *LPP-3*; 8 — ДНК *P. boryanum*; 9 — ДНК *LPP-3 MboI*; 10 — ДНК *P. boryanum/MboI*

Eco1471 (AGGCCT). Таким образом, мы вправе предположить отсутствие в ДНК *LPP-3* последовательностей GG(C/G)CC. Причиной этого явления может быть защита от вирусспецифических нуклеаз, образующихся на ранних этапах инфекции [7].

В результате измерения метилтрансферазной активности частично очищенных бесклеточных экстрактов *P. boryanum* были получены следующие данные: при использовании в качестве субстрата реакции ДНК фага лямбда из *dam*⁺- и *dcm*⁺-содержащего хозяина активность проб составляла 3820 ± 800 имп/мин, неметилированной ДНК из эритроцитов цыплят — 29950 ± 2050 имп/мин. Эти сведения подтверждают присутствие сайтспецифических метилаз у *P. boryanum*.

Наличие сайтспецифического метилирования в ДНК *LPP-3* и *P. boryanum*, а также проявляемая этой цианобактерией метилтрансферазная активность свидетельствуют о существовании у нее систем рестрикции—модификации двух типов — *dam*- и *dcmI*-подобной систем. Защита вирусного генома от *dcmI*-подобной системы хозяина осуще-

ствиться за счет метилирования $CmC(A/T)GG$ -последовательности. Для $CmATC$ -сайта следует отметить, что, поскольку ДНК цианофага *LPP-3* рестрицируется эндонуклеазой *MboI*, то контрелекция должна подвергаться расширенная последовательность, включающая $GATC$. Мы провели рестрикцию ДНК вируса и хозяина всеми известными эндонуклеазами с расширением $GATC$: *BclI* ($TGATCC$), *BglII* ($AGATCT$), *PvuI* ($CGATCG$), *BamHI* ($GGATCC$), *XhoI* ($PuGATCPu$). Все рестриктазы, кроме *BamHI*, гидролизуют как ДНК *LPP-3*, так и ДНК *P. boryanum*. Рестриктаза *PvuI* имела только один сайт на ДНК *LPP-3*. Исходя из полученных данных можно предположить наличие у *P. boryanum* эндонуклеазы рестрикции с сайтом узнавания, подобным *BamHI*. Использование этого подхода позволяет, на наш взгляд, с большей точностью говорить о специфичности систем рестрикции — модификации *P. boryanum*.

Нужно подчеркнуть, что, хотя для *Anabaena variabilis* было также показано наличие dam - и dcm -подобных систем, *LPP-3* в целом отличается от цианофагов *A* и *A.V*-серии. Так, у цианофага *A-4L* полностью отсутствуют последовательности, которые могут быть метилированы хозяином, а вирусы *A-1L* и *AN-10* метилированы по $GATC$ -последовательности и отличаются по $GGCC$: у *A-4L* эта последовательность метилирована, а у *AN-10* подвержена контрелекции [19].

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было установлено: ДНК цианобактерии *P. boryanum* содержит 1,2 % 5-метилцитозина и 4,5 % N-6-метиладенина; ДНК цианофага *LPP-3* — 0,8 % 5-метилцитозина и не включает N-6-метиладенина. *P. boryanum* обладает системами рестрикции — модификации dam - и $dcmI$ -подобного типа. Защита вирусного генома от систем рестрикции — модификации хозяина осуществляется за счет метилирования последовательности $CmC(A/T)GG$ и контрелекции по сайту *BamHI*. Контрелекция, очевидно, подвержена и последовательность $GG(C/G)CC$.

Резюме. Для перевірки наявності модифікованих основ у ДНК цианофага *LPP-3* і цианобактерії *P. boryanum* використано метод HPLC за допомогою установки «System GOLD». Аналіз профілю елюції гідролізатів дозволив ідентифікувати, окрім канонічних основ, присутність у ДНК *P. boryanum* 5-метилцитозину в концентрації 1,2 % та N-6-метиладеніну — 4,5 %. ДНК *LPP-3* містить 0,8 % 5-метилцитозину і не включає N-6-метиладеніну. 5-Метилцитозин вдалося виявити лише модифікованим методом гідролізу ДНК фтористоводневою кислотою. Для виявлення сайтспецифічного метилювання ДНК цианофага *LPP-3* і ДНК *P. boryanum* надавали ферментативному гідролізу рестриктазами-ізошизомерами, по-різному реагуючими на метилювання залишків цитозину і аденіну в сайтах пізнання. Встановлено метилювання по аденіну в $GATC$ -последовностях ДНК *P. boryanum* та по другому цитозину $CC(A/T)GG$ -последовностей як у ДНК *P. boryanum*, так і в ДНК *LPP-3*. Зроблено висновок про наявність у *P. boryanum* систем рестрикції — модифікації dam - і $dcmI$ -подібного типу. Захист вірусного генома від систем рестрикції — модифікації хазяїна здійснюється метилюванням послідовності $CmC(A/T)GG$ і контрелекцією за сайтом *BamHI*. Контрелекції, скоріш за все, піддається і послідовність $GG(C/G)CC$, що підтверджується даними рестрикційного аналізу.

Summary. HPLC method was used to study some peculiarities of cyanobacterium *Plectonema boryanum* and cyanophage *LPP-3* DNA composition. The elution profile analysis of the products of DNA acid hydrolysis enable to identify in DNA *P. boryanum* apart of canonical bases the presence of 4.5 % N-6-methyladenine and 1.2 % 5-methylcytosine, DNA *LPP-3* have 0.8 % 5-methylcytosine and no N-6-methyladenine. The presence of 5-methylcytosine was detected only due to the application of the modified hydrolysis method HF.

The restriction endonucleases-isoschisomers, DNA hydrolysis of which depend on presence of methylated bases in the recognition sites, were used to detect site-specific methy-

lation. The comparison of the products of the DNA LPP-3 and *P. boryanum* fermentative hydrolysis by *MspI* and *HpaII*; *Sau3A*, *MboI* and *DpnI*; *ApyI* and *MvaI* restrictases enable to determined that DNA LPP-3 and *P. boryanum* has a high methylation degree of the inner cytosine in the CC(A/T)GG site and *P. boryanum* on the adenine in the GATC site; CCGG site wasn't methylated in both DNA.

Proceeding from the data obtained a conclusion can be drawn on the presence of dam- and dcmI-like restriction—modification systems in *P. boryanum*. Defence of viral DNA against host R-M systems occur by cytosine methylation in sequence CmC(A/T)GG and counter-selection *BamHI* sites.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрюшкина Н. И., Кирнос М. Д., Маградзе Н. М. и др. Об аналоге цитозина в ДНК, бактериофага *Shigella sonnei* «УФА» // Биоорг. химия.— 1978.— 4, № 9.— С. 1191—1196.
2. Кирнос М. Д., Александрюшкина Н. И., Ванюшин Б. Ф. 5-метилцитозин в пиримидиновых последовательностях ДНК растений и животных: специфичность метилирования // Биохимия.— 1981.— 46, № 8.— С. 1458—1474.
3. Лысенко Т. Г., Шаинская О. А., Геращенко И. В., Сырчин С. А. Сравнение двух методов получения бесклеточных экстрактов цианобактерий для изучения активности дегидрогеназ // Микробиол. журн.— 1989.— 51, № 3.— С. 87—91.
4. Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
5. Менджул М. И., Сырчин С. А., Аверкиев А. А., Бусахина И. В. Сравнение различных методов выделения цианофага LPP-3 и его ДНК // Микробиол. журн.— 1992.— 54, № 2.— С. 70—74.
6. Менджул М. И., Сырчин С. А., Ребенкиш Б. А. и др. Резистентность ДНК цианофага LPP-3 к действию различных эндонуклеаз рестрикции // Там же.— 1993.— 55.
7. Нестерова Н. В., Калинин Т. С., Мельник А. И., Сырчин С. А. Дегградация генома цианобактерий при репродукции цианофагов AS-1L, S-8K, LPP-3 и A-1 // Там же.— 1991.— 53, № 3.— С. 43—49.
8. Нестерова Н. В., Сагун Т. С., Пилипенко В. Г. Идентификация цианофага LPP-3 // V съезд Укр. микробиол. о-ва: Тез. докл.— Киев: Наук. думка, 1974.— С. 163—165.
9. Нестерова Н. В., Сагун Т. С., Сливак Н. Я., Воцелко С. К. Характеристика генома цианофага LPP-3A // Микробиол. журн.— 1982.— 44, № 3.— С. 34—38.
10. Adams D. G. Isolation and restriction analysis of DNA from heterocysts and vegetative cells of cyanobacteria // J. Gen. Microbiol.— 1988.— 781, N 1.— P. 45—55.
11. Bancroft I., Smith R. J. Analysis of restriction endonuclease sites in cyanophages infecting the heterocystous cyanobacteria *Anabaena* and *Nostoc* // J. Gen. Virol.— 1988.— 69, N 3.— P. 739—743.
12. Brown P. T. H. DNA methylation in plants and tissue culture // Genome.— 1989.— 31, N 2.— P. 717—729.
13. Catania J., Keenan B. C., Margison G. P., Fairweather D. S. Determination of 5-methylcytosine by acid hydrolysis of DNA with hydrofluoric acid // Anal. Biochem.— 1987.— 167, N 2.— P. 347—351.
14. Chirikjian I. G. Gene amplification and analysis. Restriction endonucleases and methylases.— New York; Amsterdam; London: Elsevier, 1987.— Vol. 5.— 303 p.
15. Doolittle M. M., Sirotkin K. Bacteriophage T2 and T4, damh and Ecodam methylation: preference at different sites // Biochim. et biophys. acta.— 1988.— 949.— P. 240—246.
16. Hahn D. R., McHenney M. A., Baltz R. Characterization of FP 22 a large streptomycete bacteriophage with DNA insensitive to cleavage by many restriction enzymes // J. Gen. Microbiol.— 1990.— 136, N 12.— P. 2395—2404.
17. Kaneo T., Katoh K., Fujimoto M. et al. Determination of the nucleotide composition of a deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography of its enzymatic hydrolysate: a review. // J. Microbiol. Meth.— 1986.— N 4.— P. 229—240.
18. Kruger D. H., Bickle T. A. Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the DNA restriction systems of their hosts // Microbiol. Rev.— 1983.— 47.— P. 345—360.
19. Lambert G. R., Carr W. G. Resistance of DNA from filamentous and unicellular cyanobacteria to restriction endonuclease cleavage // Biochim. et biophys. acta.— 1984.— 781.— P. 45—55.
20. McClelland M. Selection against dam methylation sites in the genomes of DNA enterobacteriophages // J. Mol. Evol.— 1985.— 21.— P. 317—322.
21. Padhy R. N., Hottai F. G., Coene M. M., Hoet P. P. Restriction analysis and quantitative estimation of methylated bases of filamentous and unicellular cyanobacterial DNAs // J. Bacteriol.— 1988.— 170, N 4.— P. 1934—1939.
22. Pogany G., Jeney A., Major J., Lapis K. Sugar-nucleotides in 5-hexyl-2-deoxyuridine-treated lewis lung tumor cells by HPLC // Chromatogram.— 1989.— 10, N 3.— P. 2—3.
23. Roberts J. R. Restriction enzymes and their isoshizomers // Nucl. Acids Res.— 1988.— 16.— P. 271—313.

24. Schroeder C., Hurksat H., Meisel A. et al. Unusual occurrence of *EcoP1* and *EcoP15* recognition sites and counterselection of type II methylation and restriction sequences in bacteriophage T7 DNA // *Gene*.— 1986.— 45, N 1.— P. 77—86.
25. Sekulic S., Haddad P. R. Effect of peak tailing on computer optimization procedures for high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.*— 1988.— 459, N 1.— P. 65—77.
26. Sinhalg R. P., Landes J. P. High-performance liquid chromatographic analysis of DNA composition and DNA modification by chloroacetaldehyde // *Ibid.*— 1988.— 458.— P. 117—128.

Ин-т микробиологии и вирусологии
АН Украины, Киев
ВНИИГенетика, Москва

Получено 18.01.93

УДК 577.112+371.24

А. В. Братусь, С. З. Мальченко, Н. А. Чашин

ПРЕДСКАЗАНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМ GUNA- МЕТОДОМ *

В работе предложен новый метод предсказания вторичной структуры белка, основанный на известном в области экспертных систем GUNA-методе. Облучение и предсказание базируются на информации о вторичной структуре 108 белков (около 20 000 аминокислотных остатков) с рентгеноструктурным разрешением менее 0,2 нм. Средняя точность предсказания по использованному в работе банку данных составила для α -спирали — 74 %, β -складки — 67 %, нерегулярной структуры — 71 % и общая — 68 %.

Введение. Известно, что предсказание вторичной структуры белка с точностью 75—85 % позволяет составить общее представление о его пространственной структуре, а увеличение точности — получить довольно близкую к реальной пространственную модель белка [1].

Существующие в настоящее время методы не всегда позволяют достичь необходимой точности, поэтому, несмотря на множество способов предсказания вторичной структуры белка, поиск новых подходов в этом направлении не прекращается.

В предлагаемой работе описывается известный в области экспертных систем GUNA-метод [2] и его приложение к предсказанию вторичной структуры белков.

Материалы и методы. В работе использовали банк данных, содержащий информацию о вторичной структуре 108 белков (20 000 аминокислотных остатков) с рентгеноструктурным разрешением менее 0,2 нм. Эти данные были получены из Брухевенского банка данных пространственных структур белков. Вторичная структура классифицирована по трем конформациям: α -спираль (h), β -складка (e) и нерегулярная (c). Таким образом, каждому аминокислотному остатку присваивается одно из трех состояний вторичной структуры — h , e или c .

Для прогнозирования вторичной структуры белка применен модифицированный GUNA-метод. Суть его состоит в следующем.

Пусть исследуемая предметная область отражается эмпирическими данными в виде таблицы. Формально таблица может быть представлена в таком виде:

$$M = \langle Mod, f_1, \dots, f_n \rangle,$$

где Mod — множество объектов;

$f_i: Mod \rightarrow V_i$ — унарные отношения, определенные в данной предметной области;

$V_i = \{1, 2, \dots, K_i, U_n\}$ — множество значений отношения;

f_i, U_n есть символ неопределенной информации.

* Статья представлена членом редколлегии В. И. Даниловым.