

9. Mills D. R., Kramer F. R., Spiegelman S. Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule // Science.— 1973.— 180, N 4089.— P. 916—927.
10. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. Принципы самоорганизации молекул.— М.: Мир, 1982.— 270 с.
11. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids / C. R. Woese, R. Gutell, R. Gupta, H. F. Noller // Microbiol Rev.— 1983.— 47, N 4.— P. 621—669.
12. Williams A. L., Tinoco J. A dynamic programming algorithm for finding alternative RNA secondary structures // Nucl. Acids Res.— 1986.— 14, N 1.— P. 299—315.
13. Gutell R. R., Fox G. E. A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format // Ibid.— 1988.— 16, suppl.— P. 175—185.

ВНИИ гриппа МЗ СССР, Ленинград

Получено 29.05.90

УДК 577.112

И. А. Жилкин, А. М. Ерошкин

МЕТОД ПОИСКА ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫХ ОБЛАСТЕЙ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ ПО АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Предлагается эмпирический метод предсказания функционально важных областей белков и пептидов. Рассматриваются только такие функционально важные участки, остатки которых располагаются близко в последовательности (линейные или непрерывные функционально важные участки). В основе метода лежит ранее обнаруженная корреляция между локализацией известных непрерывных функционально важных областей в последовательностях белков и низкими значениями профилей сходства этих последовательностей с последовательностями белков человека [1]. Применение предлагаемого метода к большому набору белков позволяет правильно предсказать более половины из известных непрерывных функциональных центров.

Введение. В работе [1] было предложено для анализа полипептидных последовательностей использовать профиль сходства последовательности исследуемого белка или пептида с последовательностями белков человека. Профиль строится следующим образом. Для исследуемого белка и каждого белка из выборки белков человека рассчитывается карта

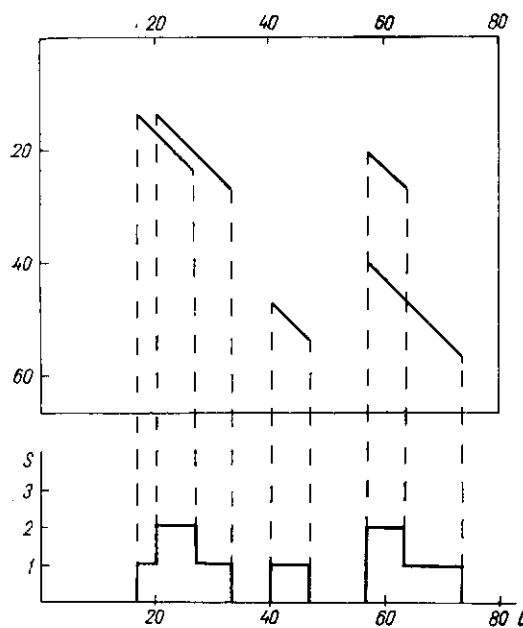


Рис. 1. Схема построения профиля сходства исследуемого белка с одним из белков выборки белков человека по карте локального сходства (горизонтальная ось соответствует исследуемому белку, вертикальная — белку выборки). Отрезки на карте сходства — совпадающие участки; внизу — соответствующий профиль сходства S , l — его длина

Fig. 1. Construction scheme of resemblance profile for investigated protein versus one protein from set of human proteins as based on the map of local resemblance (across — investigated protein down — protein from human protein set). Lines on the resemblance map — coinciding regions. Under the map is the resemblance profile S ; l — investigated protein sequence length.

локального сходства, на основании которой строится профиль сходства этих двух белков (рис. 1). Суммируя профили сходства для всех пар, получаем профиль сходства исследуемого белка с набором белков человека (ниже этот профиль будем называть просто профилем сходства). На наборе белков с различными функциональными свойствами была найдена корреляция между локализацией районов с низким значением профилей сходства, мутабельности и альфа-спиральности и положением в последовательностях непрерывных функционально важных областей. В данной работе на основе этих результатов построен эмпирический метод предсказания непрерывных функционально важных участков белка или пептида по его аминокислотной последовательности.

Описание алгоритма. Для исследуемого белка или пептида строится профиль сходства и анализируется расположение его минимумов. Пусть главный минимум профиля сходства приходится на остаток с номером M_1 . Формируем область $(M_1 - K; M_1 + K)$ длиной $2K + 1$ остатков, которая будет первой предсказанной функционально важной областью исследуемого белка (число K — параметр метода, определяющий размер предсказываемой области). Затем ищем следующий по величине минимум. Пусть он приходится на остаток с номером M_2 . Формируем область $(M_2 - K; M_2 + K)$. Если данная область пересекается с ранее определенными областями (в данном случае с областью $(M_1 - K; M_1 + K)$), то она не рассматривается. Иначе фиксируем, что область $(M_2 - K; M_2 + K)$ является второй предсказанной функционально важной областью исследуемого белка и т. д. Для белка предсказываются одна или несколько областей. Их количество мы определим зависящим от длины последовательности следующим образом:

$$N = [l/50] + 1,$$

где l — длина аминокислотной последовательности, $[l/50]$ — целая часть от деления. Такая формула выбрана исходя из того, что средний размер экзонов — около 50 остатков [32], и один экзон обычно соответствует одному функциональному домену. Так как число функционально важных участков в белках, очевидно, невелико, для длинных аминокислотных последовательностей количество предсказываемых областей будем ограничивать некоторым числом N_0 (второй параметр метода).

Набор белков человека и белков с известными функциональными центрами. Набор белков человека, используемый в данной работе, существенно расширен по сравнению с набором в работе [1]. Он содержит 330 белков различных функциональных классов, различных семейств общей длиной более 110 000 остатков. Из близкородственных белков в набор включали лишь одного представителя.

В выборке белков и пептидов с известными непрерывными функционально важными участками (таблица) использовано большинство белков, приведенных в работе [1]. Исключен из рассмотрения ряд белков, таких как калмодулин, кальций-связывающий белок и некоторые другие, функционально важные участки которых являются центрами связывания ионов или простых молекул. Такие участки скорее являются «биохимическими центрами», а не функционально важными областями, связанными с уникальными свойствами конкретной молекулы. Выборка пополнена новыми структурами, данные о которых получены в последнее время [2—7, 10—13, 15—20]. Всего в этом наборе 35 белков, содержащих в целом 39 функционально важных областей. В выборку включены как зрелые формы белков и пептидов, так и некоторые предшественники. Отличие этих двух наборов состоит в том, что в составе предшественника пептид-продукт часто неактивен. Тем не менее с точки зрения основной задачи — выделения в аминокислотных последовательностях ограниченных участков, важных для целевой функции некоторой большей последовательности, — эти два случая мы разделять не будем.

Выбор параметров метода. Предлагаемый метод имеет два варьируемых параметра: K , определяющий размер предсказываемой области, и N_0 — максимальное количество предсказываемых областей. Будем считать, что экспериментальный функциональный центр найден, если предсказываемый район перескается с ним хотя бы по одному остатку. Назовем полнотой предсказания функциональных центров белков выборки отношение числа найденных экспериментальных функциональных участков ко всему их числу в выборке; долей правильно предсказанных областей — отношение числа правильно предсказанных областей к числу всех предсказанных областей

Белки с экспериментально локализованными функционально важными участками
Proteins with experimentally localised functionally important regions

Белок	Длина	Участок	Свойства участка	Ссылка
Иммуноглобулин G, тяжелая цепь, константная область, фрагмент 238—446 (человек)	208	52—55	Тафцин, обладает иммуностимулирующими свойствами	[2]
Предшественник атриального натриуретического фактора (человек)	151	131—150	Сайт связывания со специфическим рецептором	[3]
Предшественник гонадотропин-релизинг гормона (человек)	92	24—33	Активная форма гормона	[4]
		40—49	Участок, стимулирующий освобождение гонадотропина	
Ингибитор α_2 -плазмина (человек)	491	40—44	Пептид, ингибирующий перекрестную реакцию ингибитора с фибриноном	[5]
		473—491	Сайт связывания с плазмином	[6]
Предшественник интерлейкина-1 β (человек)	269	163—171	Пептид активирует Т-клетки	[7]
Тимопоэтин 2	49	32—36	Активный фрагмент	[8]
Гемагглютинин вируса гриппа A/Aichi/2/68, HA ₂ -цепь	221	1—20	Пептид слияния	[9]
Предшественник β_2 -микроглобулина (человек)	119	33—39	Пептид усиливает цитотоксичность лимфоцитов	[2]
Предшественник соматостатина I (человек)	116	109—113	Сайт связывания с рецептором	[10]
Предшественник холецистокинина (человек)	115	96—103	Биологически активный пептид	[11]
Предшественник ангиотензиногена (человек)	485	34—41	Ангиотензин 2	[12]
Пептид, освобождающий гастрин	27	21—27	Активный фрагмент	[13]
Проларатиреоидный гормон (человек)	90	7—36	Синтетический пептид имитирует активность гормона	[14]
Предшественник ксенопина	80	73—80	Биологически активный пептид	[15]
Иммуноглобулин E, C-область (крыса)	429	272—286	Пептид ингибирует связывание IgE с тучными клетками	[16]
Предшественник аполипопротеина E (человек)	317	162—165, 229—236	Участки связывания гепарина	[17]
Термостабильный цАМФ-зависимый ингибитор протеинкиназы (кролик)	75	11—30	Сайт связывания с субъединицей после диссоциации голофермента с цАМФ	[18]
Предшественник основного поверхностного антигена вируса гепатита B	400	21—47	Сайт связывания с клеточным рецептором	[19]
C3d белок системы комплемента (человек)	302	226—231	Сайт связывания с C3d-рецептором	[20]
Предшественник фибриногена, γ -цепь (человек)	437	426—437	Сайт узнавания тромбоцитов	[33]
Большой гастрин (человек)	34	31—34	Пептид обладает активностью интактной молекулы	[21]
Препромелиттин	70	44—69	Активный мелиттин	[22]
Нейротоксин I длинный (<i>Formosan banded krait</i>)	74	26—37	Участвует в проявлении нейротоксической активности	[22]
Нейротоксин I короткий (черная кобра)	60	25—32	То же	[22]
Трансформирующий фактор роста альфа (человек)	50	34—43	Основная часть области связывания рецептора	[23]
Тиоредоксин (<i>Corinebacterium nephridii</i>)	105	23—37	Активный центр	[24]
Предшественник кальцитонина (крыса)	136	85—116	Активная форма гормона	[25]
Фибронектин, домен, связывающий клетку (человек)	108	84—88	Синтетический пептид проявляет активность всего домена	[26]
Основной ингибитор протеаз (бык)	58	13—18, 37—39	Области контакта с ферментом	[27]
Ингибитор Куница (соя)	181	61—66	Петля связывания с ферментом	[28]

Белок	Длина	Участок	Свойства участка	Ссылка
Редуктаза (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	561	130—143	Активный центр	[29]
G-белок вируса везикулярного стоматита	517	17—41	Пептид—рН-зависимый гемоллизин	[30]
Антитромбин 3 (человек)	423	385—423	Активный сайт ингибитора	[31]
β -липотропин (человек)	88	58—62	Область, соответствующая метэнкефалину	[21]
Субтилизиновый ингибитор	113	67—75	Петля связывания с ферментом	[27]

На этапе обучения мы пытались как можно полнее предсказать функциональные центры белков выборки и в то же время обеспечить минимум перепредсказанных областей. С этой целью анализировали зависимость полноты предсказания и доли правильно

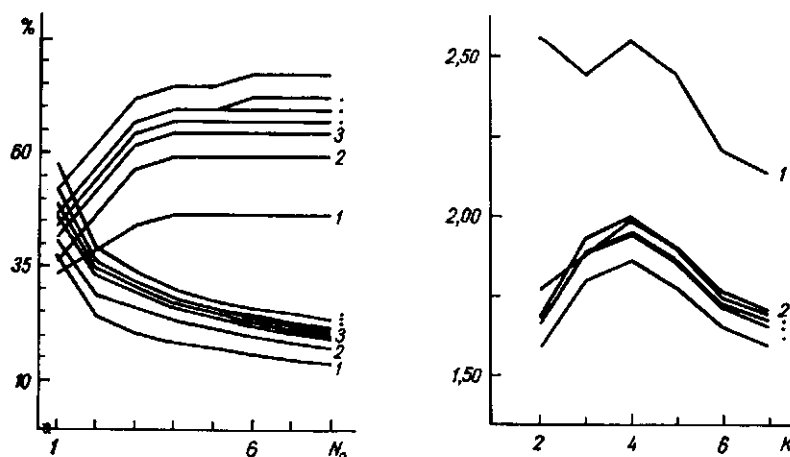


Рис. 2. Зависимость полноты предсказания функциональных центров выборки белков (вверху) и доли правильно предсказанных областей (внизу) от максимального числа анализируемых минимумов профиля сходства N_0 при различных значениях параметра K (указаны справа от соответствующих кривых)

Fig. 2. Correlation between plenitude of functionally important regions prediction (up) and portion of correctly predicted regions (down) as depending upon maximum number N_0 of analysed resemblance profile minima with different values of parameter K (shown to the right of corresponding curve).

Рис. 3. Отношение количества правильно предсказанных функциональных центров выборки белков (таблица) предлагаемым методом к количеству функциональных центров, выбранных случайным образом в зависимости от размера предсказываемых областей при различных значениях параметра N_0 (указаны справа от соответствующих кривых)

Fig. 3. Ratio of the number of correctly predicted functionally important regions for protein set (table) by suggested method to the number of functionally important regions selected randomly according to size of predicted region with different values of N_0 parameter (shown to the right of corresponding curve)

предсказанных областей от максимального числа анализируемых минимумов N_0 . На рис. 2 приведены два набора графиков. Верхний представляет собой зависимость полноты предсказания функциональных центров выборки от максимального числа анализируемых минимумов N_0 при различных значениях параметра K . Нижний — долю правильно предсказанных областей. Если требуется, синтезируя несколько пептидов (либо другим способом), локализовать функционально важную область белка, то наиболее вероятными кандидатами для экспериментальной проверки могут являться участки, соответствующие нескольким основным минимумам профиля сходства. По-видимому, наиболее оптимально определить значение параметра N_0 , равное 3 или 4. При больших

значениях этого параметра количество перепредсказанных областей растет, а количество правильно предсказанных областей практически не изменяется.

Теперь рассмотрим влияние на качество предсказания параметра K , определяющего размер предсказываемой области. Очевидно, что чем больше размер предсказываемых областей, тем больше функциональных центров выборки будет найдено предлагаемым методом. Но при этом большая часть остатков, относимых методом к функционально значимым, в действительности таковыми являться не будет. Малые размеры областей уменьшают полноту предсказания функциональных центров выборки белков и долю правильно предсказанных областей.

Мы остановились на значении параметра K , равном 4, при этом размер предсказываемой области составляет 9 остатков (рис. 3).

Попытка использовать для предсказания, кроме профиля сходства, другие профили, указанные в работе [1], а также суперпозицию профилей (с некоторыми весовыми коэффициентами) не привела к улучшению качества предсказания. Оптимизация весовых коэффициентов с целью улучшения качества предсказания также не дала ощутимых результатов.

Результаты применения метода. Предсказание функционально важных областей выборки белков (таблица) с использованием параметров $N_0=3$ и $K=4$ дало следующие результаты: предсказано 89 потенциальных функциональных центров, из них 26 указали на экспериментально локализованные, т. е. доля правильно предсказанных областей составила около 30 %. При этом правильно предсказано 24 функциональных центра из 39 (или 61 %). Использование профиля мутабельности вместо профиля сходства в предлагаемом методе дает худшие результаты.

Доля правильно предсказанных областей составляет 22,5 %, а полнота предсказания выборки белков — 48,7 %. Использование же других профилей (альфа-спиральности и бета-поворота) дает еще более низкие результаты.

Несмотря на то, что расчет профиля сходства требует построения нескольких сотен карт локального сходства двух белков, используемый алгоритм быстрого сравнения последовательностей позволяет провести расчет за несколько минут процессорного времени ЭВМ ЕС-1060.

Для оценки достоверности метода проводилось предсказание функциональных центров на основе стохастического профиля, полученного с помощью генератора случайных чисел. Таким способом моделировали случайный выбор потенциального функционального центра. Естественно, использовали те же значения параметров метода, что описаны выше. После 100 предсказаний (каждый раз для всех белков выборки, таблица) оказалось, что в среднем из 89 предсказанных областей 12,98 (с дисперсией 2,46) указали на известные функциональные центры. Таким образом, предлагаемый метод позволяет практически в два раза точнее предсказывать функционально важные области белков и пептидов по сравнению со случайным выбором. Если имеются некоторые предположения об особенностях структурной организации функционального центра (конформация, физико-химические свойства и пр.), то целесообразно из участков, соответствующих выделенным минимумам профиля сходства, рассмотреть в первую очередь те, которые обладают данными свойствами.

Изучение структурно-функциональной организации пептидов и белковых молекул является дорогостоящей и трудоемкой задачей. Предлагаемый метод наряду с другими подходами к анализу структурно-функциональной организации белков может ускорить и упростить проведение подобных исследований.

Авторы выражают свою искреннюю признательность В. А. Куличкову за помощь в работе и А. Е. Икулину — за предоставление программы быстрого сравнения последовательностей.

PROTEIN AND PEPTIDE FUNCTIONALLY IMPORTANT REGIONS SEARCH
METHOD BY AMINOACID SEQUENCE

P. A. Zhilkin, A. M. Eroshkin

All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Koltsovo, Novosibirsk Region

Summary

An empirical method for predicting functionally important regions in protein and peptide sequences is suggested. It concerns only linear or continuous regions (those consisting of residues closely placed in the sequence). The method is based on an already obtained correlation between continuous protein regions known to be functionally important and corresponding resemblance profile low values. The method allows predicting correctly more than a half of the known continuous functional centers for the large protein set.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Структурные и физико-химические свойства аминокислот функционально важных участков белков / А. М. Ерошкин, П. А. Жилкин, И. К. Попков, В. А. Куличков // Биофизика.— 1987.— 32, № 6.— С. 972—981.
2. Werner G. H. Synthesis and biological activity of a linear fragment of the atrial natriuretic factor (ANF) // Immunol. Lett.— 1987.— 16, N 3—4.— P. 363—370.
3. Natural and synthetic peptides (other than neuropeptides) endowed with immunomodulating activities / P. W. Shiller, L. Maziak, T. M.-D. Nguyen et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1985.— 131, N 3.— P. 1056—1062.
4. LH-releasing activity and receptor binding of rHGnRH 14—26 analogues / S. C. F. Milton, R. P. Millar, R. C. de L. Milton et al. // Ibid.— 1987.— 143, N 3.— P. 872—879.
5. Ocusada S., Kawasaki K., Sugiyama N. Amino acids peptides. VI. Synthesis of the N-terminal pentapeptide of plasmin inhibitor and its analogue // Chem. Pharm. Bull.— 1985.— 33, N 8.— P. 3484—3487.
6. Binding site of plasmin inhibitor to plasminogen / N. Sugiyama, T. Sasaki, M. Iwamoto et al. // Biochim. et biophys. acta.— 1988.— 952, N 1.— P. 1—7.
7. A short synthetic peptide fragment of human interleukin-1 with immunostimulatory, but not inflammatory activity / G. Antoni, R. Presentini, F. Perin et al. // J. Immunol.— 1986.— 137, N 10.— P. 3201—3204.
8. In vitro effects of thymopoietin fragments on active E-rosette forming cells / L. Denes, A. Rill, O. Nyeki et al. // Ann. Immunol. hung.— 1985.— 25.— P. 177—187.
9. pH-dependent membrane fusion activity of synthetic twenty acid peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin / M. Murata, Y. Sugahara, S. Takahashi et al. // J. Biochem.— 1987.— 102, N 4.— P. 957—962.
10. Rose G. D., Gierasch L. M., Smith J. A. Turns in peptides and proteins // Adv. Prot. Chem.— 1985.— 37.— P. 1—109.
11. Rehfeld J. F. Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitters? // J. Neurochem.— 1985.— 44, N 1.— P. 1—10.
12. Kun-hwa Hsieh, Marshall G. R. Role of the C-terminal carboxylate in angiotensin II activity: alcohol, ketone, and ester analogues of angiotensin II // J. Med. Chem.— 1986.— 29, N 10.— P. 1968—1972.
13. Zachary I., Woll P. J., Rosengurt E. A role for neuropeptides in the control of cell proliferation // Develop. Biol.— 1987.— 124, N 2.— P. 295—308.
14. Freltinger A. L. III, Zull J. E. The role of the methionine residues in the structure and function of parathyroid hormone // Arch. Biochem. and Biophys.— 1986.— 244, N 2.— P. 641—649.
15. Sures I., Crippa M. Xenopsin: the neurotensin-like octapeptide from Xenopus skin at the carboxyl terminus of its precursor // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1984.— 81, N 22.— P. 380—384.
16. Burt D. S., Stanworth D. R. Inhibition of binding of rat IgE to rat mast cells by synthetic IgE peptides // Eur. J. Immunol.— 1987.— 17, N 3.— P. 437—440.
17. Binding of a high reactive heparin to human apolipoprotein E: identification of two heparin-binding domains / A. D. Cardin, N. Hirose, D. T. Blankenship et al. // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1986.— 134, N 2.— P. 783—789.
18. Identification of an inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase / J. D. Scott, E. H. Fisher, J. G. Demaille et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 13.— P. 4379—4383.
19. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus / A. R. Neurath, S. B. H. Kent, N. Strick et al. // Cell.— 1986.— 46.— P. 429—436.
20. Mapping of the C3d receptor (CR2)-binding site and a neoantigenic site in the C3d domain of the third component of complement / J. D. Lambris, V. S. Ganu, S. Hirani et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 12.— P. 4235—4239.

21. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки.— М.: Мир, 1985.— 455 с.
22. Dayhoff M. O. Atlas of protein sequence and structure.— Washington: Nat. Biomed. Res. Found, 1978.— V. 5.— 414 p.
23. Eppstein D. A., March Y. V., Schreiber A. B. Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection // Nature.— 1985.— 318, N 6047.— P. 663—665.
24. Meng M., Hogenkamp H. P. Purification, characterization and amino acid sequence of thioredoxin from *Corynebacterium nephridii* // J. Biol. Chem.— 1981.— 256, N 17.— P. 9174—9178.
25. Calcitonin messenger RNA encodes multiple polypeptides in a single precursor / I. W. Jacob, R. H. Goodman, W. W. Chin et al. // Science.— 1981.— 213, N 4506.— P. 457—459.
26. Pierschbacher M. O., Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of molecule // Nature.— 1984.— 309, N 5963.— P. 30—33.
27. The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures / F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams et al. // J. Mol. Biol.— 1977.— 112, N 3.— P. 535—542.
28. Janin J., Chotia C. Stability and specificity of protein-protein interactions: the case of the trypsin-trypsin inhibitor complexes / Ibid.— 1976.— 100, N 2.— P. 197—211.
29. Fox B. S., Walsh C. T. Mercuric reductase: homology to glutathione reductase and lipoamid dehydrogenase. Iodoacetamide alkylation and sequence of the active site peptide // Biochemistry.— 1983.— 22, N 17.— P. 4082—4088.
30. Schlegel R., Wade M. Biologically active peptides of the vesicular stomatitis virus glycoprotein // J. Virol.— 1985.— 53, N 1.— P. 319—323.
31. Griffith M. J., Noyes C. M., Church F. C. Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III // J. Biol. Chem.— 1985.— 260, N 4.— P. 2218—2225.
32. Traut T. W. Do exons code for structural or functional units in proteins? // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— 85, N 9.— P. 2944—2948.
33. Hantgan R. R. Localization of the domains of fibrin involved in binding to platelets // Biochim. et biophys. acta.— 1988.— 968, N 1.— P. 36—44.

ВНИИ молекуляр. биологии НПО «Вектор»
минмедбиопроста СССР, пос. Кольцово, Новосибир. обл.

Получено 11.12.89

УДК 577.112

Е. В. Кунин, К. М. Чумаков, А. Е. Горбаленя

МЕТОД ПОИСКА СТРУКТУРНЫХ МОТИВОВ В АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ. ПРОГРАММА «SITE» ПАКЕТА «GENBEE»

Предложен метод поиска структурных мотивов в аминокислотных последовательностях, основанный на построении частотного профиля группы выравненных фрагментов последовательностей. На примере сканирования банка аминокислотных последовательностей мотивом, характерным для широкого класса NTP-связывающих белков, рассмотрена работа программы «SITE», написанной на основе предложенного алгоритма. Продемонстрированы преимущества предложенного подхода по сравнению со стандартными программами поиска паттернов в отношении полноты и избирательности извлечения из банка последовательностей, содержащих участки, сходные с рассматриваемым мотивом. Представлена предположительная идентификация NTP-связывающих центров в нескольких белках, где они ранее не были обнаружены. Обсуждается применение разработанного алгоритма для классификации банков аминокислотных последовательностей.

Введение. Один из основных эвристических приемов, используемых при теоретическом анализе структуры и функций биополимеров, — поиск в аминокислотных (нуклеотидных) последовательностях так называемых структурных мотивов и паттернов. В данной работе мы будем рассматривать только мотивы (паттерны), заданные на уровне первичной структуры. Мотив можно определить как относительно короткую аминокислотную последовательность (о нуклеотидных последовательно-

© Е. В. КУНИН, К. М. ЧУМАКОВ, А. Е. ГОРБАЛЕНЯ, 1990