



УДК 577.217.34

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*  
2',3'-O-[4-(N-2-ХЛОРЕТИЛ)-N-МЕТИЛАМИНО]-  
БЕНЗИЛИДЕНОВЫМ ПРОИЗВОДНЫМ AUGU<sub>3</sub> В 70S КОМПЛЕКСАХ  
ИНИЦИАЦИИВенъяминова А. Г., Владимирев С. Н., Дрыгз С. А.,  
Зенкова М. А., Карлова Г. Г., Ямковой В. И.\*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР;

\* Новосибирский государственный университет им. Ленинского комсомола

Изучена аффинная модификация рибосом *Escherichia coli* 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденовым производным AUGU<sub>3</sub> (AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI) в 70S комплексах инициации рибосома·AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI·fMet-тРНК<sup>fMet</sup> и в двойном комплексе рибосома·AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI. Показано, что направленность аффинной модификации рибосом в 70S комплексе инициации зависит от способа получения комплекса. Модификации AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI в комплексе инициации, полученном в присутствии факторов инициации IF-1, IF-2, IF-3, подвергаются белки S5, S7, S9, L1 и L16, а в комплексе, полученном в отсутствие IF-3 и IF-1 (только с помощью фактора IF-2), — белки S5 и S7. В комплексе инициации, полученном неэвзиматически, модифицируются белки S1, S3, L1 и L33; модификации в двойном комплексе подвергается единственный белок S1. Во всех состояниях, где использовались факторы инициации, наблюдалась модификация фактора IF-2.

Систематическое исследование мРНК-связывающего центра рибосом *Escherichia coli* ранее было проведено с помощью алкилирующих производных олигоуридилатов разной длины, содержащих (N-2-хлорэтил-N-метиламино)-фенильный остаток на 3'- или 5'-конце олигонуклеотидного фрагмента [1—3]. Набор модифицируемых белков зависел от точки присоединения реакционноспособной группы к олигонуклеотидному фрагменту. Вырисовывались группы белков, характерные именно для данного типа аффинной модификации. Однако обращал на себя внимание широкий спектр рибосомных белков, подвергающихся модификации каждым из реагентов, и наличие ряда точек модификации, которые появлялись в отдельных экспериментах и исчезали при удлинении или укорочении олигонуклеотидного «адреса» на одно звено. Множественная модификация, наблюдаемая во всех случаях, а также зависимость наборов модифицируемых белков от длины олигонуклеотидного фрагмента не позволяли отнести какие-либо определенные белки к мРНК-связывающему центру рибосом. Следует заметить, что в работах [1, 2] использовался 2—3-кратный избыток дезацилированной тРНК по отношению к рибосомам для насыщения Р- и А-участков, однако, как теперь установлено в экспериментах с тетрациклином, блокирующим связывание тРНК с А-участком рибосомы [4], кодон-антикодонное взаимодействие имело место в основном в Р-участке. При отсутствии кодон-антикодонного взаимодействия в А-участке остаток олигоуридилата мог «скользить» в участке декодирования, давая таким образом гетерогенную смесь комплексов, различающихся расположением олигонуклеотидного фрагмента относительно антикодона тРНК и реакционноспособной группы относительно участка декодирования. Следовательно, неоднозначная посадка аналога мРНК в участке декодирования могла быть одной из причин множественной модификации рибосом в области мРНК-связывающего центра.

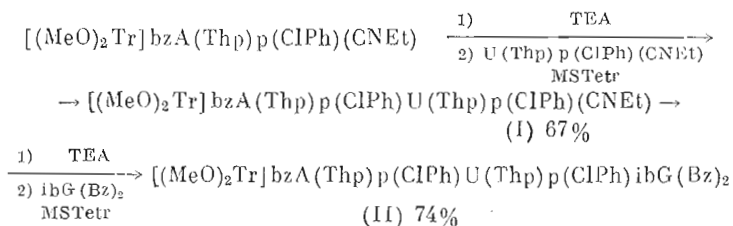
Принятые сокращения: ClPh — *n*-хлорфенил, TEA — N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>, MSTetr — метилтенсульфотетразолид, *ib* — изобутирил. Остальные сокращения соответствуют общепринятым.

Однозначную посадку короткой матрицы в участке декодирования можно реализовать, используя в качестве матриц олигорибонуклеотиды, несущие на 5'-конце иницирующий кодон [5]. С помощью 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденового производного AUGU<sub>6</sub>-(AUGU<sub>6</sub>CHRCI) была проведена аффинная модификация рибосом в 70S комплексе инициации, полученном с помощью факторов инициации [6]. Однако, несмотря на то что в отличие от производных олигоуридилатов AUGU<sub>6</sub>CHRCI был однозначно закреплён на рибосоме за счёт взаимодействия иницирующего кодона с fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>, набор белков, подвергающихся модификации в 70S комплексе инициации, был довольно велик. Вероятно, это было вызвано тем, что химически активная группа не была зафиксирована жестко относительно рибосомы из-за достаточно большого размера свободной части реагента (фрагмента U<sub>6</sub>CHRCI), не закрепленного на рибосоме кодон-антиконовым взаимодействием.

В настоящей работе изучена аффинная модификация рибосом *Escherichia coli* 2',3'-O-[4-(N-2-хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденовым производным AUGU<sub>3</sub>(AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI) в составе 70S комплексов инициации, полученных различными способами.

### 1. Получение AUGU<sub>3</sub> и AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI

Аденилилуридиллигуанозин (AUG) синтезировали модифицированным фосфотриэфирным методом [7] по следующей схеме:



Необходимые для этого синтеза защищенные нуклеозиды и их фосфотриэфиры были получены стандартными методами. Выделение AUG (выход 50%) и его анализ проводили как описано в работе [5].

Гексануклеозидпентафосфат AUGU<sub>3</sub> получали из AUG и (pU)<sub>3</sub> с помощью РНК-лигазы [8] с выходом 20%. Синтез, выделение и доказательство его строения проводили аналогично описанному ранее для AUGU<sub>6</sub> [9].

Бензилиденовое производное AUGU<sub>3</sub> [<sup>14</sup>C]CHRCI было получено из AUGU<sub>3</sub> и 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)[<sup>14</sup>C]бензальдегида в присутствии 2,2-диметоксипропана и трифторуксусной кислоты, как описано в работе [10].

### 2. Связывание AUGU<sub>3</sub>, AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI и fMet-мРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомами

Аффинную модификацию рибосом AUGU<sub>3</sub> [<sup>14</sup>C]CHRCI изучали в составе комплексов, приведенных в табл. 1. Для определения степени связывания f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомами в комплексах (I) и (II) использовали свободный олигонуклеотид AUGU<sub>3</sub>, поскольку на примере комплекса (III) было показано, что бензилиденовый фрагмент не влияет на матричные свойства AUGU<sub>3</sub> на стадии инициации. Это хорошо согласуется с данными работы [5], где было показано, что AUGU<sub>6</sub>CHRCI стимулирует связывание f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> в комплекс инициации в такой же степени, как и AUGU<sub>6</sub>. Данные по связыванию f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> приведены в табл. 1. Степени связывания f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомами в условиях, аналогичных условиям образования комплексов (I)–(III), но в отсутствие матрицы, не превышали 0,1 моль/моль 70S рибосом. Факторы инициации значительно стимулировали связывание f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомами в комплексы (I) и (III) (степень неэнзиматического связывания f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомами в буфере с 5 мМ Mg<sup>2+</sup> составляла не бо-

**Исследуемые комплексы и связывание fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомой  
в составе соответствующих комплексов**

Комп- лекс	Компоненты	Степень связыва- ния f[ <sup>35</sup> S]Met- тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> с рибосо- мой (моль f Met- тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> / /моль рибосом)
(I)	70S, fMet-тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> , AUGU <sub>3</sub> CHRCI IF-1, IF-2, IF-3 (5 мМ Mg <sup>2+</sup> )	0,45 *
(II)	70S, fMet-тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> , AUGU <sub>3</sub> CHRCI (10 мМ Mg <sup>2+</sup> )	0,38 *
(III)	70S, fMet-тРНК <sub>f</sub> <sup>Met</sup> , AUGU <sub>3</sub> CHRCI, IF-2 (5 мМ Mg <sup>2+</sup> )	0,41 * (0,40 **)
(IV)	70S, AUGU <sub>3</sub> CHRCI (10 мМ Mg <sup>2+</sup> )	

\* Определено с использованием AUGU<sub>3</sub>.\*\* Определено с использованием AUGU<sub>3</sub>CHRCI.

более 0,05 моль/моль 70S рибосом). С другой стороны, уровень неэнзиматического связывания f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомами в комплексе (II) в буфере с 10 мМ Mg<sup>2+</sup> практически совпадает с уровнем связывания в присутствии факторов инициации в буфере с 5 мМ Mg<sup>2+</sup>. На основании данных, изложенных выше, можно заключить, что как энзиматическое, так и неэнзиматическое AUGU<sub>3</sub>CHRCI-направляемое связывание fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> в комплекс инициации специфично. Поскольку степень связывания AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI в этих комплексах примерно в 1,5 раза превышала степень связывания fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>, в отдельном эксперименте исследовали аффинную модификацию рибосом в составе двойного комплекса 70S·AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI (комплекс (IV)).

### 3. Аффинная модификация рибосом в составе комплексов (I)—(IV)

Модификацию рибосом в составе комплексов (I)—(III) проводили после отделения соответствующих комплексов от избытка несвязавшегося AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI гель-фильтрацией. Поскольку двойной комплекс при гель-фильтрации диссоциирует, алкилирование в составе комплекса (IV) вели без предварительного выделения. Как было показано в работе [11], наличие свободного реагента не должно приводить к значительной неспецифической модификации рибосом, так как эффективность алкилирования подобными реагентами вне комплекса по сравнению с реакцией в комплексе низка.

Для аффинной модификации рибосомы комплексы (I)—(IV) инкубировали при 37° С в течение 2 ч (за это время ~ 55% реагента превращалось в активную промежуточную частицу — этилениммониевый катион [12]). После модификации комплексы подвергали центрифугированию в линейном градиенте концентрации сахарозы (10—30%) в условиях диссоциации рибосом на субчастицы. При этом не связавшееся ковалентно с рибосомами бензилиденное производное AUGU<sub>3</sub> полностью отделялось от субчастиц. Для того чтобы проанализировать распределение радиоактивной метки между рРНК и белками, модифицированные субчастицы центрифугировали в линейном градиенте концентрации сахарозы (5—20%)

Степень модификации рибосомных субчастиц AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI в составе комплексов (I) — (IV) и распределение радиоактивной метки между рРНК и белками

Комплекс	Субчастица	Степень модификации (моль реагента/моль субчастиц)	Распределение <sup>14</sup> C-метки между рРНК и белками, %	
			рРНК	белки *
(I)	30S	0,08	58	42
	50S (30S+50S)	0,04		
(II)	30S	0,04	74	26
	50S (30S+50S)	0,02		
(III)	30S	0,06	0	100
	50S	0,04	60	40
(IV)	30S	0,03	19	81
	50S	0,02	13	87

\* В составе 50S субчастиц белки и/или 5S рРНК.

в условиях диссоциации субчастиц на компоненты (в присутствии EDTA и додецилсульфата натрия). Степени модификации рибосомных субчастиц, а также данные по распределению радиоактивной метки между рРНК и белками приведены в табл. 2, из которой видно, что модификации AUGU<sub>3</sub>CHRCI в комплексах (I)—(IV) подвергаются обе рибосомные субчастицы, причем степень модификации 30S субчастиц в 1,5—2 раза превышает степень модификации 50S субчастиц. Степень модификации субчастиц, алкилированных в составе комплексов (I) и (III), в 1,5—2 раза превышает степень модификации субчастиц в составе комплекса (II). Распределение метки <sup>14</sup>C между рРНК и белками, как видно из табл. 2, зависит от способа получения комплекса.

#### 4. Анализ рибосомных белков, модифицированных аффинным реагентом

Для идентификации модифицированных белков их экстрагировали из рибосом 67% уксусной кислотой, выдерживали 1 ч при 37° С для гидролиза бензилиденовой связи в остатках реагента, ковалентно связанных с белками, и анализировали двумерным гель-электрофорезом. На рис. 1 приведены диаграммы распределения радиоактивной метки между рибосомными белками, модифицированными реакционноспособным аналогом матрицы в составе комплексов (I)—(IV). Видно, что наборы белков, модифицируемых в составе этих комплексов, существенно различаются.

Как было показано в работе [13], фактор IF-3 для связывания fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> в комплекс инициации с синтетической матрицей не обязателен. Если 70S комплекс инициации получать из предварительно образованного 30S комплекса инициации, то фактор IF-1, по-видимому, также не обязателен [14]. В связи с этим можно было ожидать, что состояние (I) будет идентично состоянию (III) (см. табл. 1). Однако из рис. 1 видно, что окружение матрицы в этих комплексах существенно различается. Эти различия могут быть объяснены конформационными изменениями в 30S субчастицах, происходящими под действием IF-3 [15—17].

Изменение контактов мРНК с 30S субчастицей, индуцируемое фактором IF-3, было обнаружено также при исследовании прямых УФ-сшивок MS2 РНК с 30S субчастицей в составе комплекса MS2 РНК·30S [18]. Как показано в нашей работе, окружение матрицы в комплексе (II), полученном при неэнзиматическом связывании fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>, в еще большей степени отличается от окружения ее в комплексах инициации (I) и (III). Мы считаем, что эти различия могут быть также вызваны конформационными изменениями рибосом, индуцированными факторами инициации. Разли-

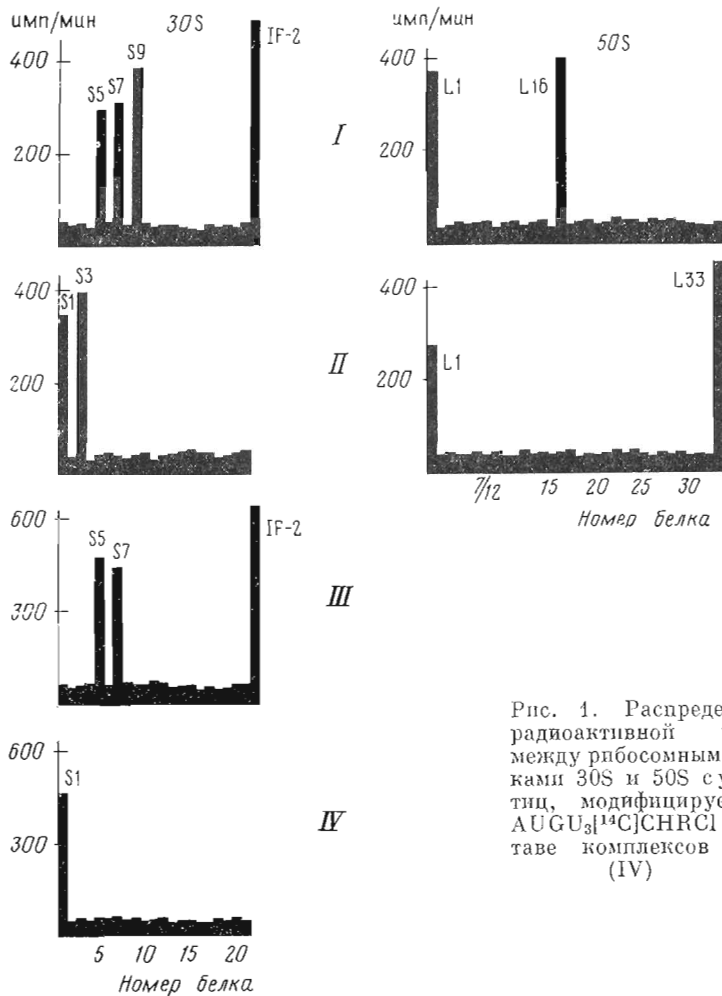


Рис. 1. Распределение радиоактивной метки между рибосомными белками 30S и 50S субчастиц, модифицируемыми  $AUGU_3[^{14}C]CHRCI$  в составе комплексов (I) — (IV)

чия в окружении матрицы на рибосоме ранее были обнаружены Понгсом с соавт. [19] при исследовании аффинной модификации рибосом реакционноспособными аналогами иницирующего кодона AUG в составе комплексов, аналогичных комплексам (I) и (II).

В составе комплекса (IV) модификация подвергался в основном белок S1. Модификация этого белка наблюдалась также в составе комплекса (II), полученного неэнзиматически, в то время как в составе комплексов (I) (III), полученных с помощью факторов инициации, сколько-нибудь заметная модификация белка S1 не обнаружена. Белок S1 не модифицировался также с помощью  $AUGU_6CHRCI$  в комплексе инициации 70S рибосома ·  $AUGU_6[^{14}C]CHRCI \cdot fMet\text{-}tPNC_r^{Met}$  (комплекс (Ia)) [5], полученном в присутствии всех факторов инициации (табл. 3), а также в претранслокационном комплексе рибосома ·  $AUGU_6[^{14}C]CHRCI \cdot tPNC_r^{Met}$  (в Р-участке) ·  $fMetPhe\text{-}tPNC_r^{Phe}$  (в А-участке) (комплекс (V)), полученном при добавлении к комплексу (Ia) тройного комплекса  $Phe\text{-}tPNC_r^{Phe} \cdot EF\text{-}Tu \cdot GTP$  [20] (табл. 3). Однако, с другой стороны, белок S1 модифицировался в значительной степени в аналогичном претранслокационном комплексе, при образовании которого (на первой стадии) не использовались факторы инициации (комплекс (Va)) [21] (табл. 3). Отсутствие модификации белка S1 реагентами  $AUGU_nCHRCI$  (где  $n = 3$  или 6) в комплексах, полученных с помощью факторов инициации (комплексы (I), (III), (Ia), (V)), и модификация этого белка в комплексах, полученных в отсутствие факторов инициации (комплексы (II), (IV), (Va)), позволяют высказать следующее предположение. Вероятно, белок S1 при функционировании в процессе инициации

Рибосомные белки, модифицируемые  $AUGU_nCHRCI$  (где  $n = 3$  и  $6$ ) в составе различных комплексов

Комплекс	Модифицируемые белки	Ссылка	Комплекс	Модифицируемые белки	Ссылка
(I)	S5, S7, S9, L1, L16		(Ia)	S4, S12, S13, S14, S15, S18, S19, S20/L26	[6]
(II)	S1, S3, L1, L33		(V)	S13, L10	[20]
(III)	S5, S7		(Va)	S1, S5, S11, L1	[21]
(IV)	S1		(VI)	S7	[21]

циации трансляции (этот белок участвует во взаимодействии 30S субчастиц с факторами инициации и матрицей [22—24]) претерпевает конформационные изменения, в результате чего реагирующая группа аналога матрицы оказывается в области расположения нереакционноспособных боковых радикалов аминокислот белка S1.

Подобные данные ранее были получены в работе Понгса с соавт. [19] при использовании в качестве реакционноспособного аналога матрицы производного тетра nukлеотида AUGU, несущего бромацетильную группу на 3'-конце молекулы (AUGU\*). Как и в данной работе, белок S1 модифицировался в комплексах 70S·AUGU\* и 70S·AUGU\*·fMet-тРНК, полученных неэнзиматически, и не модифицировался при энзиматическом связывании fMet-тРНК с 70S рибосомой.

Интересно, что в состояниях (I) и (III), где присутствовали факторы инициации, модифицировался фактор IF-2. Модификация IF-2 в 70S комплексе инициации исключена, так как при связывании 50S субчастицы с 30S комплексом инициации фактор IF-2 диссоциирует в раствор [25, 26]. Следовательно, можно предположить, что либо IF-2 модифицируется в составе 30S инициаторного комплекса (в том случае, если не все 50S субчастицы активны в ассоциации с 30S инициаторным комплексом), либо IF-2, являясь нуклеотидсвязывающим белком, связывается с  $AUGU_3[^{14}C]CHRCI$  в растворе и подвергается модификации в двойном комплексе IF-2· $AUGU_3[^{14}C]CHRCI$  (при условии, что этот комплекс не диссоциирует во время выделения соответствующих комплексов инициации во время гель-фильтрации). Специально этот вопрос в данной работе не исследовался.

#### 5. Селективность аффинной модификации рибосом в участке декодирования

При сравнении данных по аффинной модификации рибосом в составе комплексов инициации (I) и (III) (рис. 1) и изученного ранее комплекса (Ia) [6] (табл. 3) (в составе этого комплекса модификации подвергались белки S4, S12, S13, S14, S15, S18, S19, S20/L26) видно, что при переходе от  $AUGU_6CHRCI$  (комплекс (Ia)) к  $AUGU_3CHRCI$  (комплексы (I) и (III)) набор модифицируемых белков резко сокращается. Следовательно, селективность модификации в комплексе инициации повышается при укорочении свободного, не закрепленного кодон-антикодонными взаимодействиями олигонуклеотидного фрагмента аналога мРНК на один триплет.

Результаты модификации рибосом в комплексах (I)—(III) интересно сравнить с данными по модификации рибосом в составе посттранслокационного комплекса рибосома· $AUGU_6[^{14}C]CHRCI$ ·fMetPhe-тРНК<sup>Phe</sup> (в Р-участке) (комплекс (VI)) [21] (табл. 3), так как комплексы (I)—(III) и (VI) имеют вакантный А-сайт и одинаковый размер свободной части реагента (фрагмент  $UUUCHRCI$ ), не закрепленной на рибосоме кодон-антикодонным взаимодействием. В комплексе (VI) в отличие от комплексов (I)—(III) наблюдалось высокоселективное алкилирование — примерно 80% реагента (от общего количества реагента, пошедшего на модификацию рибосом) ковалентно присоединялось к белку S7 [21], в то время как в комплексах (I)—(III) модификация подвергается несколько белков (рис. 1). Таким об-

разом, несмотря на, казалось бы, идентичное расположение реакционно-способной группы относительно рибосомы, результаты аффинной модификации рибосом в комплексах (VI) и (I)—(III) резко различаются. Следовательно, можно заключить, что посттранслокационное состояние рибосомы (комплекс (VI)) не идентично состоянию рибосом в комплексе инициации независимо от способа получения последнего (комплексы (I)—(III)).

Ранее нами было показано, что селективность аффинной модификации значительно повышается при дополнительном закреплении реакционно-способного аналога матрицы кодон-антикодоновым взаимодействием с аминоктил-тРНК, локализованной в А-участке рибосом [4, 20, 27]. Однако данные по аффинной модификации рибосом в комплексах (I)—(III) и (VI) свидетельствуют о том, что селективность аффинной модификации в большей мере определяется функциональным состоянием рибосом, чем наличием кодон-антикодонового взаимодействия в А-участке.

#### 6. EF-Tu-зависимое связывание *Phe*-тРНК<sup>Phe</sup> в А-участке комплекса (III)

Комплекс (VII) рибосома·AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI·тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> (Р-участок)·fMetPhe-тРНК<sup>Phe</sup> (А-участок) получить не удалось, вероятно, вследствие того что присутствие бензилиденового фрагмента на 3'-конце олигонуклеотида изменяет конформацию связанного с ним нуклеозидного остатка и нарушает его стэкинг-взаимодействие со следующим нуклеозидным остатком [28].

Ранее при исследовании матричных свойств AUGU<sub>6</sub>CHRON (оксипроизводного AUGU<sub>6</sub>CHRCI) было показано, что синтез трипептида, направляемый этим аналогом, происходит с таким же выходом, как и в случае AUGU<sub>6</sub> [5]. На этом основании было высказано предположение, что либо динуклеотидное кодон-антикодоновое взаимодействие является достаточным для EF-Tu-зависимого связывания аминоктил-тРНК с рибосомой в А-сайте, либо при взаимодействии с рибосомой происходит исправление конформации 3'-концевого нуклеозидного остатка AUGU<sub>6</sub>CHRCI, связанного с бензилиденовым фрагментом. В экспериментах с AUGU<sub>3</sub>CHRCI оказалось, что при степени связывания f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup> с рибосомой в комплексе (III), равной 0,4, EF-Tu-зависимое связывание [<sup>3</sup>H]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> в А-участок практически не наблюдалось. В то же время, как показала хроматографический анализ продукта транспептидации в комплексе (VII), при добавлении EF-Tu·GTP·Phe-тРНК<sup>Phe</sup> к комплексу (III) происходило образование дипептида f[<sup>35</sup>S]Met[<sup>3</sup>H]Phe. Уровень синтеза составлял 0,1 моль дипептида/моль рибосом при 25° С за 12 мин, т. е. количество образовавшегося дипептида по крайней мере на порядок превосходило степень связывания [<sup>3</sup>H]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с рибосомами.

Ранее в работе Люрмана с соавт. [29] было исследовано EF-Tu-зависимое связывание Phe-тРНК<sup>Phe</sup> с комплексом рибосома·AUGUU·fMet-тРНК<sub>f</sub><sup>Met</sup>. Было показано, что кодон-антикодоновое взаимодействие по двум основаниям недостаточно для удержания Phe-тРНК<sup>Phe</sup> в А-участке (она диссоциирует из комплекса с рибосомой) и только очень малая доля Phe-тРНК<sup>Phe</sup> за время нахождения в А-участке успевает принять участие в реакции транспептидации. Образовавшаяся fMetPhe-тРНК<sup>Phe</sup> также диссоциирует из комплекса, так как не может удержаться в А-участке за счет динуклеотидного кодон-антикодонового взаимодействия. Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, диссоциировавшая из рибосомы, может связываться в А-участке многократно, т. е. происходит так называемый «recycling» Phe-тРНК<sup>Phe</sup> [29]. Поскольку уровень синтеза дипептида, как доказано в работе [29], прямо пропорционально зависит от времени, в итоге при достаточно длительной инкубации «recycling» Phe-тРНК<sup>Phe</sup> может привести к количественному синтезу дипептида. По-видимому, в случае AUGU<sub>3</sub>CHRCI и ранее в случае AUGU<sub>6</sub>CHRON [5] наблюдалась аналогичная ситуация, что объясняет наличие продуктов транспептидации при отсутствии надежно регистрируемого EF-Tu-зависимого связывания Phe-тРНК<sup>Phe</sup> в А-участке рибосом.

В табл. 3 суммированы все данные по аффинной модификации рибосом  $AUGU_nCHRCI$  ( $n = 3$  и  $6$ ). Белки S7 и S9 ранее были отнесены к 3'-области участка декодирования на основании данных, полученных с помощью алкилирующих производных олигоуридилатов с аналогичной реакционной способной группой на 3'-конце [3]. Белки S3 и S9 наиболее часто модифицировались реакционноспособными производными олигоуридилатов с модифицирующей группой на 5'-конце и на этом основании были отнесены к 5'-области участка декодирования [4, 27]. Следует отметить, что к этой же области был отнесен белок S4 [30]. Белки S3 и S5 были найдены Таубином и Эдсоном при использовании фотоактивируемых аналогов гекса-, гепта- и октаденилатов с реакционноспособной группой на 3'-конце [31]. Белок S1, как упоминалось выше, был обнаружен Поингсом с соавт. [19] среди модифицируемых как 3'-, так и 5'-реакционноспособными производными иницирующего кодона AUG. Тот факт, что некоторые белки, в частности S1, S3 и S9, модифицируются аналогами матрицы с реакционноспособной группой как на 3'-, так и на 5'-конце, не удивителен, поскольку минимальное расстояние между 3'- и 5'-областями декодирующего участка порядка 12—24 Å, а диаметр одного белка (если представить его в виде шара) составляет в среднем 30 Å [32].

Однако спектр рибосомных белков, отнесенных к 3'-области декодирующего участка рибосомы по результатам аффинной модификации рибосом  $AUGU_nCHRCI$  (где  $n = 3$  и  $6$ ), довольно широк, и трудно представить, чтобы все эти белки одновременно участвовали в формировании декодирующего участка рибосомы. По-видимому, в различных функциональных состояниях рибосом вследствие конформационных изменений, потенциально возможных при взаимодействии рибосомы с факторами трансляции, расщеплении GTP, трансэпидидации и транслокации, в формировании 3'-области декодирующего участка рибосом могут принимать участие разные белки. Однако не все белки, находящиеся в области декодирующего участка, способны модифицироваться  $AUGU_n$  [ $^{14}C$ ]CHRCI, поскольку этиленмониевый катион ( $AUGU_n$  [ $^{14}C$ ]CHR<sup>+</sup>) вступает в реакцию только с нуклеофильными центрами. Иными словами, белок, находящийся в контакте с реагирующей группой, не будет модифицироваться, если эту группу окружают лишь неактивные боковые радикалы этого белка. В то же время случайное сближение реагента с тем или иным белком в результате внутренних движений в рибосоме может привести к очень эффективной реакции, т. е. аффинная модификация в отдельных случаях может выявить маловероятный, функционально незначимый контакт. Изменение условий модификации скорее всего исключит возникновение такого контакта. Поэтому оптимальным, на наш взгляд, является изучение аффинной модификации рибосом аналогами мРНК в нескольких функциональных состояниях или в одном и том же функциональном состоянии, но полученном различными путями. Если выбрать только те белки, которые модифицируются не менее двух раз из восьми исследованных состояний (табл. 3), то вырисовывается группа белков, характерная для исследуемого типа аффинной модификации: S1, S5, S7, S13, L1 и L33.

На модели 30S субчастицы, предложенной на основании результатов электронной микроскопии комплексов субчастицы с антителами к определенным рибосомным белкам [33] (рис. 2), белки S1, S5, S7 и S13 образуют довольно компактную, но протяженную группу на поверхности 30S субчастицы: белки S1 и S5 находятся в области ложбинки, белок S7 расположен в нижней части головки вблизи платформы и белок S13 — в верхней части головки. 5'-Область участка декодирования (белки S3, S4, S9 [4]) расположена ближе к стороне 30S субчастицы, контактирующей с 50S субчастицей. Однако следует отметить, что эта модель является статической и не учитывает возможных изменений в структуре рибосом при взаимодействии с мРНК, тРНК, факторами элонгации и т. д.

При рассмотрении модели 70S рибосомы [33], образующейся при ассоциации 30S и 50S рибосомных субчастиц, можно видеть, что белок L1 на-



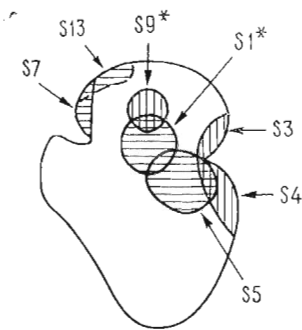


Рис. 2

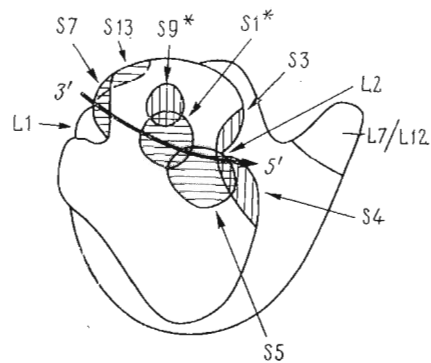


Рис. 3

Рис. 2. Схема расположения участка декодирования на модели 30S субчастицы [33]. Вертикальная интриховка — белки, отнесенные к 5'-области; горизонтальная — белки, отнесенные к 3'-области мРНК-связывающего центра. Белки S1 и S9 на этой модели локализованы согласно данным Мура [32]

Рис. 3. Схема расположения участка декодирования на модели 70S рибосомы [33]. Вертикальная интриховка — белки, отнесенные к 5'-области; горизонтальная — белки, отнесенные к 3'-области мРНК-связывающего центра. Белки S1 и S9 локализованы на этой модели согласно данным Мура [32]. Стрелкой обозначено вероятное направление движения матрицы в процессе трансляции

ходится вблизи белка S7 (рис 3). Локализация белка L33 на модели 50S субчастицы [33] неизвестна. Белок L2, примыкающий к 5'-области участка декодирования [4,30], расположен в области контакта 30S и 50S субчастиц [34]. Если учесть, что производные олигонуклеотидов с алкилирующей группой на 5'-конце модифицировали в трех случаях из четырех белок L7/L12 [2], то можно предположить, что матрица скользит по 70S рибосоме от L1 ребра по наружной стороне 30S субчастицы в районе бороздки, отделяющей головку от тела, в направлении L7/L12 стержня с выходом на сторону 30S субчастицы, контактирующую с 50S субчастицей. Указания на то, что мРНК скользит от стороны 30S субчастицы, примыкающей к белку L1, к противоположной стороне, примыкающей к белку L7/L12, ранее были рассмотрены в работе [35].

Авторы выражают благодарность В. И. Махно (ЛИЯФ АН СССР, Гатчина) за любезно предоставленные 30S и 50S субчастицы, И. Э. Циеленсу (ИОС АН ЛатвССР, Рига) за помощь, оказанную при выделении факторов инициации, В. В. Анциферовой и Е. А. Сычевой за помощь в синтезе AUGU<sub>3</sub>.

### Экспериментальная часть

В работе использовали тРНК<sup>Met</sup> *E. coli* MRE-600 (1200 пмоль/ОЕ<sub>260</sub>) и тРНК<sup>Phe</sup> *E. coli* MRE-600 (1500 пмоль/ОЕ<sub>260</sub>) фирмы Boehringer Mannheim (ФРГ), лейковорин SF (кальциевая соль Citrovorum Factor; Serva, ФРГ), [<sup>3</sup>H]фенилаланин (1,2 Ки/ммоль; «Изотоп»), L-[<sup>35</sup>S]метионин (500 мКи/ммоль) отечественного производства, факторы инициации, выделенные как описано в работе [5], факторы элонгации EF-Tu-Ts производства НПО «Биолар» (г. Олаине), poly(U) (Reanal, ВНР). fMet-тРНК<sup>Met</sup> (1200 пмоль/ОЕ<sub>260</sub>) и Phe-тРНК<sup>Phe</sup> (1500 пмоль/ОЕ<sub>260</sub>) получали как описано ранее [5]. 30S и 50S субчастицы были любезно предоставлены В. И. Махно (ЛИЯФ АН СССР). Активность 70S рибосом, полученных реассоциацией 30S и 50S субчастиц, в poly(U)-зависимом связывании Phe-тРНК<sup>Phe</sup> и в синтезе Phe-Phe составляла 100%.

Для преваритивного выделения олигонуклеотидов использовали силикагель марки Kieselgel 60 (Merck, ФРГ), для ТСХ — пластины DC-Alufolien Kieselgel 60F<sub>254</sub> и системы растворителей: метанол — хлороформ, 1 : 9; ацетонитрил — вода, 4 : 1. Тририбоуридилат (pU)<sub>3</sub> получали гидролизом poly(U) эндонуклеазой из яда кобры как описано в работе [36].

Эндонуклеазу из яда кобры *Naja naja olgiana* (КФ 3.1.27) выделяли по методу [37].

РНК-лигазу (КФ 6.5.1.3) выделяли из биомассы *E. coli* В, инфицированной бактериофагом T4am82, по методу, описанному ранее [8] (концентрация фермента 43,4 мкМ, концентрация белка 8,4 мг/мл).

Аденилилуридиллизуанозин. Смесь 3'-фосфодиэфирного компонента (1,1 экв.) и 5'-ОН-компонента (1 экв.), высушенную упариванием с абсолютным пиридином, рас-

творяли в абсолютном пиридине, к раствору добавляли свежеприготовленный сухой мезигилсульфотетразолид (2,2 экв.) и выдерживали 20—45 мин при 20° С (контроль ТСХ). Реакционную смесь разлагали добавлением NaHCO<sub>3</sub> до 5%, экстрагировали хлороформом и уваривали. Защищенные олигонуклеотиды выделяли хроматографией на силианизированном силикагеле [38], используя градиент концентрации диоксана в воде и последующую экстракцию хлороформом. В результате были получены практически гомогенные защищенные олигонуклеотиды (I) и (II) с выходами 67 и 74% соответственно (см. схему синтеза).

Удаление защитных групп, понообменную хроматографию и анализ проводили согласно [5]. Выход A(3'-5')U(3'-5')G — 50% (в расчете на (II)).

*Гексануклеозидпентафосфат AUGU<sub>3</sub>*. Реакционная смесь (объем 2 мл) содержала 1 мМ AUG, 1 мМ (pU)<sub>3</sub>, 2 мМ АТР, 50 мМ трис-НСl (рН 8,7 при 30° С), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотреит, 0,6 мМ РНК-лигазу, 0,2 мг/мл альбумина, 15,5 об.% глицерина. Время реакции 12 ч, температура 30° С. Выделение и анализ проводили аналогично описанному в работе [9]. Выход AUGU<sub>3</sub> 20%.

*2',3'-O-[4-(N-2-Хлорэтил)-N-метиламино]бензилиденовое производное AUGU<sub>3</sub>(AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI)* с уд. акт. 25 мКи/ммоль получали согласно [5].

*Комплекс инициации (I)* получали, инкубируя смесь 5 нмоль 30S субчастиц, 5 нмоль 50S субчастиц, 10 нмоль fMet-тРНК<sup>Met</sup>, 25 нмоль AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI, 0,43 мг IF-1, 0,56 мг IF-2, 0,11 мг IF-3 и 1,74 мкмоль GTP в 5,4 мл буфера А (50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>) в течение 20 мин при 25° С.

*Комплекс (II)* получали в буфере В (50 мМ трис-НСl(рН 7,5), 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>).

*Комплекс инициации (III)* получали, инкубируя смесь предварительно образованного 30S комплекса инициации и 50S субчастиц в течение 20 мин при 20° С. 30S комплекс инициации получали инкубированием смеси 6 нмоль 30S субчастиц, 12 нмоль fMet-тРНК<sup>Met</sup>, 48 нмоль AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI, 1,3 мг IF-2, 0,42 мкмоль GTP в 2,1 мл буфера А при 20° С в течение 10 мин. Перед добавлением к 30S комплексу инициации 6 нмоль 50S субчастиц в 3,36 мл буфера А инкубировали при 37° С в течение 20 мин.

*Комплекс (IV)* получали в буфере В в отсутствие fMet-тРНК<sup>Met</sup> и IF-2.

*Отделение комплексов (I)—(III)* от избытка несвязавшегося реагента проводили гель-фильтрацией на колонке (1,3 × 45 см) с сефадексом G-50, уравновешенным буфером А (для комплексов (I) и (II)) или буфером В (для комплекса (III)). Элюцию вели соответственно этим же буферами со скоростью 36 мл/ч. Фракцию рибосом собирали по поглощению при 260 нм.

*Степень связывания f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sup>Met</sup>* в комплексы (I)—(III) определяли фильтрацией через нитроцеллюлозные фильтры по [39]. В случае комплекса (III) удельная активность [<sup>35</sup>S]Met в 20 раз превышала удельную активность AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI. Для образования комплексов (I) и (II) использовали немецкий олигонуклеотид.

*Комплекс (VII)* получали, инкубируя смесь предварительно образованного комплекса (IIIа) и тройного комплекса EF-Tu·[<sup>3</sup>H]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>·GTP в течение 12 мин при 25° С.

Для получения комплекса (IIIа) 0,23 нмоль 30S субчастиц, 0,46 нмоль f[<sup>35</sup>S]Met-тРНК<sup>Met</sup>, 2,3 нмоль AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI, 125 мкг IF-2 и 16,8 нмоль GTP инкубировали в 67 мкл буфера А при 20° С в течение 10 мин, после чего добавляли 50S субчастицы (0,23 нмоль в 16 мкл буфера А), предварительно прогретые при 37° С в течение 20 мин. Смесь инкубировали 20 мин при 20° С. Полученный комплекс (IIIа) отделяли от избытка несвязавшегося реагента гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50. Степень связывания fMet-тРНК<sup>Met</sup> в комплекс (IIIа) определяли фильтрацией части этого комплекса через нитроцеллюлозные фильтры по [39]; фильтры затем растворяли в этилацетате и просчитывали в диоксановом сцинтилляторе по программе счета <sup>3</sup>H- и <sup>14</sup>C-изотопа. К остальной части комплекса (IIIа) добавляли 2 М MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 10 мМ.

*Тройной комплекс* получали инкубированием 0,28 нмоль [<sup>3</sup>H]Phe-тРНК<sup>Phe</sup>, 0,56 нмоль EF-Tu·Ts и 100 нмоль GTP в 70 мкл буфера В при 0° С в течение 10 мин.

Степень связывания [<sup>3</sup>H]Phe-тРНК<sup>Phe</sup> в комплекс (VII) определяли фильтрацией части реакционной смеси через нитроцеллюлозные фильтры по [39], которые затем растворяли в этилацетате и просчитывали как описано выше.

*Анализ продукта транспептидации* проводили бумажной хроматографией согласно [5].

*Анализ степени алкилирования рибосомных субчастиц*, анализ степени алкилирования рибосомных белков и рРНК, выделенных из субчастиц, выделение белков из модифицированных 70S рибосом и двумерный электрофорез рибосомных белков в полиакриламидном геле проводили так, как описано в работе [1].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кобetz Н. Д. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 14. P. 3465—3481.
2. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Козырева Н. А. // Молекулярн. биолог. 1982. Т. 16. Вып. 4. С. 752—761.

3. Кнорре Д. Г., Карпова Г. Г., Кобец Н. Д. // Итоги науки и техники. Общественные проблемы физико-химической биологии. 1985. Т. 4. С. 87—143.
4. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г. // Молекулярная биология. 1987. Т. 21. Вып. 4. С. 942—948.
5. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Берзинь В. М., Грен Э. Я., Циеленс И. Э., Веньяминова А. Г., Репкова М. Н., Ямковой В. И. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 11. С. 1535—1543.
6. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Матасова И. Б., Берзинь В. М., Грен Э. Я., Циеленс И. Э. // Молекулярная биология. 1985. Т. 19. Вып. 4. С. 1079—1085.
7. Sung W. L., Nagar S. A. // Can. J. Chem. 1982. V. 60. № 2. P. 111—120.
8. Ямковой В. И., Веньяминова А. Г., Василенко С. К., Нечаев Ю. С., Бахланов М. М., Чистяков И. Г., Онищенко А. М. Способ получения РНК-лигазы: А.с. 910762 СССР // Б.И. 1982. № 9.
9. Веньяминова А. Г., Франк Л. А., Ямковой В. И. // Биоорганическая химия. 1981. Т. 7. № 1. С. 98—102.
10. Будкер В. Г., Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Кобец Н. Д., Теплова Н. М. // Молекулярная биология. 1976. Т. 10. Вып. 2. С. 340—355.
11. Бенимецкая Л. З., Гринева Н. И., Карпова Г. Г., Пичко Н. П. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 7. С. 903—913.
12. Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1969. № 2. Вып. 1. С. 104—109.
13. Revel M., Lelong J. C., Brawerman G., Cros F. // Nature. 1968. V. 219. № 5158. P. 1016—1021.
14. Hershey J. W. B., Yanov Y., Johnston K., Fakunding J. L. // Arch. Biochem. and Biophys. 1977. V. 182. P. 626—638.
15. Paradies H. H., Franz A., Pon C. L., Gualerzi C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 59. № 2. P. 600—607.
16. Michalski C. J., Sell B. H., Wahba A. J. // FEBS Lett. 1976. V. 71. № 2. P. 347—350.
17. Броуде Н. Е., Кусова К. С., Медведева Н. И., Будовский Э. И. // Биоорганическая химия. 1978. Т. 4. № 12. С. 1687—1689.
18. Broude N. E., Kussova K. S., Medvedeva N. I., Budowsky E. I. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 132. № 1. P. 139—145.
19. Pongs O., Petersen H. U., Grunberg-Manago M., Lanka E., Bald R., Stoffler G. // J. Mol. Biol. 1979. V. 134. № 2. P. 329—345.
20. Babkina G. T., Veniaminova A. G., Vladimirov S. N., Karпова G. G., Yamkovoy V. I., Berzin V. A., Gren E. J., Cielenis I. E. // FEBS Lett. 1986. V. 202. № 2. P. 340—344.
21. Бабкина Г. Т., Владимиров С. Н., Дрыга С. А., Зенкова М. А., Карпова Г. Г. // Молекулярная биология. В печати.
22. Sobura J. E., Chowadhury M. R., Hawley D. A., Wahba A. J. // Nucl. Acids Res. 1977. V. 4. № 1. P. 17—29.
23. Kolb A., Hermoso J. M., Thomas J. O., Szer W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 6. P. 2379—2383.
24. Tai P.-C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 67. № 4. P. 1466—1472.
25. Benne R., Voorma H. O. // FEBS Lett. 1972. V. 20. № 3. P. 347—351.
26. Dubnoff J. S., Lockwood A. H., Maitra U. J. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 9. P. 2884—2894.
27. Gimautdinova O. I., Karпова G. G., Knorre D. G., Frolova S. B. // FEBS Lett. 1985. V. 185. № 2. P. 221—225.
28. Гринева Н. И., Зарытова В. Ф., Кабашева Г. Н., Кнорре Д. Г., Козоровицкий А. Я. // Докл. АН СССР. 1971. Т. 198. № 3. С. 582—584.
29. Hornig H., Woolley P., Luhrmann R. // FEBS Lett. 1983. V. 156. № 2. P. 311—315.
30. Гимаутдинова О. И., Карпова Г. Г., Комарова Н. И., Фролова С. Б. // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 4. С. 499—507.
31. Towbin H., Elson D. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 9. P. 3389—3407.
32. Moore P. V., Capel M., Kjeldgaard M., Engelman D. M. // Structure, function and genetics of ribosomes/Eds Hardesty B., Kramer G. N.Y.: Springer-Verlag, 1986. P. 87—100.
33. Stoffler G., Stoffler-Meilicke M. // Structure, function and genetics of ribosomes/Eds Hardesty B., Kramer G. N. Y.: Springer-Verlag, 1986. P. 28—46.
34. Traut R. R., Tewari D. S., Sommer A., Gavino G. R., Olson H. M., Glitz D. G. // Structure, function and genetics of ribosomes/Eds Hardesty B., Kramer G. N. Y.: Springer-Verlag, 1986. P. 286—308.
35. Спириг А. С. // Молекулярная биология. Структура рибосомы и биосинтез белка. М.: Высш. шк., 1986. С. 139—141.
36. Василенко С. К., Сербо Н. А., Веньяминова А. Г., Болдырева Л. Г., Будкер В. Г., Кобец Н. Д. // Биохимия. 1976. Т. 41. Вып. 2. С. 260—263.
37. Василенко С. К., Райт В. К. // Биохимия. 1975. Т. 40. Вып. 3. С. 578—583.
38. Калашников В. В., Самуков В. В., Шубина Т. Н., Ямщиков В. Ф. // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 5. С. 666—672.
39. Nirenberg M. W., Leder P. // Science. 1964. V. 145. P. 1399—1407.

Поступила в редакцию  
16.III.1987

После доработки  
17.VIII.1987

AFFINITY LABELLING OF THE *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES  
WITH THE 2',3'-O-[4-(N-2-CHLOROETHYL)-N-METHYLAMINO]-  
BENZYLIDENE DERIVATIVE OF AUGU<sub>3</sub> WITHIN 70S INITIATION  
COMPLEXES

VENIAMINOVA A. G., VLADIMIROV S. N., DRYGA S. A., ZENKOVA M. A.,  
KARPOVA G. G., YAMKOV'OV V. I.\*

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,  
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk;  
\* Novosibirsk State University*

Affinity labelling of the *Escherichia coli* ribosomes with the 2',3'-O-[4-(N-(2-chloroethyl)-N-methylamino)benzylidene derivative of AUGU<sub>3</sub>(AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI) has been studied within 70S initiation complexes ribosome·AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI·fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> and binary complex ribosome·AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI. Various ways of the 70S initiation complex formation resulted in differently labelled products. Proteins S5, S7, S9, L1, L16 were thus identified as cross-linked with AUGU<sub>3</sub>[<sup>14</sup>C]CHRCI within an initiation complex obtained in the presence of initiation factors IF-1, IF-2, IF-3, whereas only proteins S5 and S7 were cross-linked within the complex obtained with the sole factor IF-2. Proteins S1, S3, L1 and L33 were labelled within the initiation complex obtained non-enzymatically but only protein S1 within the binary complex. In all complexes formed with use of initiation factors labelling of IF-2 factor was invariably observed.