

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК**НОБЕЛЕВСКИЕ ЛЕКЦИИ ПО ХИМИИ 1982 ГОДА**

539.199

ОТ МАКРОМОЛЕКУЛ К БИОЛОГИЧЕСКИМ АНСАМБЛЯМ *)*A. Kluг*

В живой клетке протекает множество разнообразных биохимических процессов, причем почти во всех них участвуют (или управляют ими) большие молекулы. Главные представители этих молекул — белки и нуклеиновые кислоты. Конечно, эти макромолекулы работают не изолированно; часто они взаимодействуют, образуя упорядоченные агрегаты или макромолекулярные комплексы, подчас столь специфичные по форме и функциям, что они заслуживают названия органелл. Именно в таких биологических ансамблях зачастую проявляются в клетке свойства отдельных макромолекул. Некоторые из этих ансамблей, исследованием которых я был занят более 25 лет, и являются предметом настоящей лекции.

Задача нашего направления в структурной молекулярной биологии — описать биологические структуры на молекулярном, т. е. химическом, уровне. Первые успехи в этой области были достигнуты чуть больше двадцати лет назад, когда в 1962 г. Макс Перутц и Джон Кендрю получили Нобелевскую премию за первые расшифровки структуры белков. В том же году Фрэнсис Крик, Джеймс Уотсон и Морис Уилкинс были также удостоены Нобелевской премии за объяснение структуры двойной спирали ДНК. В своей Нобелевской лекции Перутц напомнил, как сорока годами раньше, в 1922 г., сэр Лоренс Брэгг, учеником которого он являлся, приехал сюда, чтобы поблагодарить академию за Нобелевскую премию, присужденную ему и его отцу, сэру Вильяму, за разработку новой науки — рентгеновской кристаллографии, которая позволяет раскрыть атомную структуру простых соединений и малых молекул. Эти люди были не только моими научными предшественниками; некоторые из них были для меня кем-то вроде старших братьев — ведь основными объектами моей работы были нуклеиновые кислоты и белки, а также взаимодействия между ними и разработка методов, необходимых для изучения больших макромолекулярных комплексов, возникающих благодаря этим взаимодействиям. И я весьма счастлив, что настала моя очередь получить эту высокую награду.

Тот, кто пытается понять, как взаимодействуют нуклеиновые кислоты и белки, должен вначале решить непростую задачу выбора объекта, и нет никакой моей заслуги в том, что первым моим объектом исследования оказался вирус табачной мозаики. Этим я был обязан Розалинде Франклин, которая ввела меня в курс исследования вирусов и с кем я имел счастье

*) Kluг A. From Macromolecules to Biological Assemblies: Nobel Lecture. Stockholm, 11 December 1982.—Перевод А. А. Полежаева.

© The Nobel Foundation 1983.

© Перевод на русский язык,
издательство «Наука», Главная редакция
физико-математической литературы,
«Успехи физических наук», 1984.

встретиться, когда был принят на факультет Дж. Д. Бернала в Лондоне в 1954 г. Она как раз переключилась с изучения ДНК на вирус табачной мозаики, рентгеновское исследование которого было начато Берналом в 1936 г. Именно Розалинда Франклин дала мне пример того, как надо браться за большие и сложные проблемы. Если бы ее жизнь не оборвалась так трагически преждевременно, она, возможно, еще раньше также стояла бы здесь перед вами.

1. ВИРУС ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

Вирус табачной мозаики (ВТМ) — это простой вирус, состоящий из молекул белка одного типа и из РНК — носителя генетической информации.

Простая форма в виде палочки является результатом его конструкции, а именно регулярной спиральной структуры, образованной белковыми молекулами, или субъединицами, в которую заключена единственная молекула РНК. Эта общая картина была уже построена к 1958 г., когда умерла Розалинда Франклин (рис. 1). Ясно, что белок в конечном счете определяет архитектуру вируса, заключающуюся в том, что один виток довольно плоской спирали образован $16 \frac{1}{3}$ субъединицами и соседние витки контактируют. РНК расположена между этими витками, при этом 3 нуклеотидных остатка приходятся на белковую субъединицу; РНК находится на расстоянии 40 Å от оси спирали и, таким образом, отделена от внешней среды белковой оболочкой. Благодаря геометрии расположения белков молекула РНК несколько вытянута и образует одноцепочечную конфигурацию. Вдоль центральной оси вирусной частицы проходит цилиндрический канал диаметром 40 Å. Как мы тогда думали, он является тривиальным следствием упаковки белковых молекул, но потом оказалось, что этот канал играет важную роль в процессе сборки вируса.

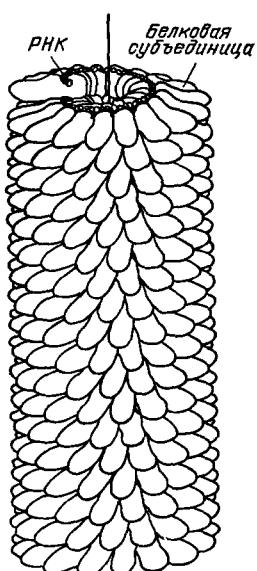


Рис. 1. На рисунке суммированы результаты первого этапа анализа структуры вируса табачной мозаики⁷.

На одну белковую субъединицу приходится три нуклеотида, и один виток спиралы составляет из 16 1/3 субъединиц. Показана только примерно шестая часть длины завершенной частицы.

На первый взгляд рост такой спиральной структуры, как ВТМ, объяснить довольно просто. Каждая белковая субъединица образует одинаковые контакты со своими соседями, так что связи между ними повторяются опять и опять. Субъединицы могут иметь вполне определенное геометрическое строение, так что они могут монтироваться друг с другом единственным образом подобно ступеням винтовой лестницы. Субъединицы будут просто пристраиваться либо по одиночке, либо сразу группами к ступеньке на конце растущей спирали, обволакивая РНК, торчащую там, при этом образуется новая ступенька, и т. д. И поэтому задним числом не кажется слишком удивительным результат классических экспериментов Френцеля — Конратта и Вильямса, которые в 1955 г.⁶ продемонстрировали, что ВТМ может быть повторно собран из его выделенных белковых и нуклеиновых компонентов. Они показали, что после простого их смешивания образовались инфекционные вирусные частицы, которые структурно неотличимы от первоначальных вирусов. Следовательно, вся информация, необходимая для сборки частицы, должна содержаться в ее компонентах, т. е. вирусу придающа «самосборка». Более поздние эксперименты⁷ показали, что повторная сборка весьма специфична для вириальной РНК; при этом она проходит наиболее легко, когда РНК гомологична оболочечному белку.

Все это было весьма неплохо, но существовало несколько фактов, которые давали повод для сомнений. Во-первых, в других экспериментах⁸ было

показано, что чужеродная РНК может включаться в вирусно-подобные палочки, и это сильно ослабляло уверенность в том, что *in vivo* специфичность на самом деле достигалась во время сборки вируса. Другим фактом, относящимся к повторной сборке, который указывал на то, что в построенной схеме остались невыявленные элементы, была чересчур низкая скорость сборки. Необходимо было ждать от 8 до 24 часов, чтобы получить максимальный выход собранных частиц. Это представлялось нам довольно медленным для сборки вируса *in vivo*, так как только после ее завершения нуклеиновая кислота была полностью защищена. Эти сомнения, однако, относились к будущему, и до того, как мы подойдем к их разрешению, я вернусь к структурному анализу вирусов и вирусных белков.

а) Рентгеновский анализ ВТМ — белковый диск

После смерти Франклин Холмс и я продолжали рентгеновский анализ вируса. Образцы для рентгеновского анализа можно приготовить в виде геля, в котором частицы ориентированы параллельно друг другу, но случайным образом повернуты относительно собственной оси. Эти гели дают хорошие рентгеновские дифракционные картины, но в силу их природы трехмерная рентгеновская информация сведена в них в два измерения. Расшифровка этих данных, с целью реконструировать трехмерную структуру, оказалась непростой задачей, и только в 1965 г. Холмс и я получили первые трехмерные фурье-карты с разрешением около 12 Å. Фактически только недавно Холмс с коллегами в Гейдельберге (куда он переехал в 1968 г.) добились разрешения, приближающегося к 4 Å в лучших областях карты электронной плоскости, но существенно худшего в других местах⁹. При таком разрешении нет возможности достаточно определенно идентифицировать отдельные аминокислотные остатки, и неопределенности чересчур велики, чтобы однозначно строить атомные модели. Тем не менее, эта карта в совокупности с детальной картой субъединицы, полученной нами в Кембридже (см. ниже), дает существенную информацию о природе контактов с РНК¹⁰.

Я предвидел эти трудности рентгеновского анализа вируса, и к началу 60-х годов понял, что обойти это затруднение можно было, попытавшись закристаллизовать изолированную белковую субъединицу вируса, расшифровать ее структуру с помощью рентгеновской дифракции и затем соотнести ее со структурой вируса, полученной при низком разрешении. Таким образом, мы начали попытки кристаллизовать белковые мономеры. Для того, чтобы воспрепятствовать естественной тенденции белка агрегировать в спираль, Леберман вводил различные химические модификации, надеясь заблокировать места контактов, но никакие из этих модифицированных белков не кристаллизовались. Другой возможностью было попытаться кристаллизовать малые агрегаты немодифицированных белковых субъединиц. К тому времени было известно, по существу из работы Шрамма и Зилига¹¹, что белок сам по себе, без РНК, может агрегировать помимо спиралей в ряд других форм. Я выбрал условия, при которых белок в основном агрегировал в образование с константой седиментации около 4s, которое было идентифицировано Каспаром как тример¹². Мы почти сразу получили кристаллы, но обнаружили¹³, что они содержат не малые агрегаты, как мы надеялись, а большие, соответствующие агрегатам с константой седиментации 2Os. Рентгеновский анализ показал, что они были составлены из двух наложенных друг на друга слоев или колец, состоящих из 17 субъединиц каждое, и мы назвали эту форму «двухслойный диск» (рис. 3). Нашей первоначальной реакцией было разочарование, что мы имеем дело с такой большой структурой с молекулярным весом 600 000, но затем оно смягчилось тем, что геометрия диска явно имела сходство с геометрией вирусной частицы. Цилиндрические кольца содержали по 17 субъединиц каждое, что сравнимо с 16 $\frac{1}{3}$ единиц, при-

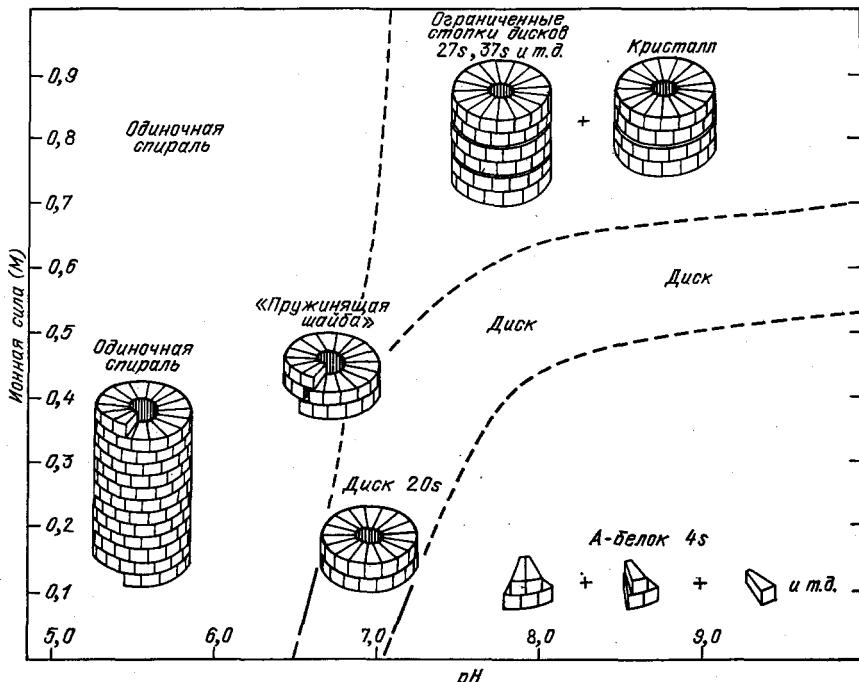


Рис. 2. Диаграмма, на которой указаны области, в которых определенные формы белка ВТМ играют существенную роль в установлении равновесия ¹⁷.

Это не привычная фазовая диаграмма: границы проведены там, где начинают обнаруживаться более крупные агрегаты, что не предполагает резкого изменения более мелких типов. «Пружинящая шайба», показанная на границе между диском 20s и спиралью, определяется не очень надежно; она представляет метастабильное промежуточное состояние, наблюдаемое при переходе дисков в спирали после резкого снижения рН.

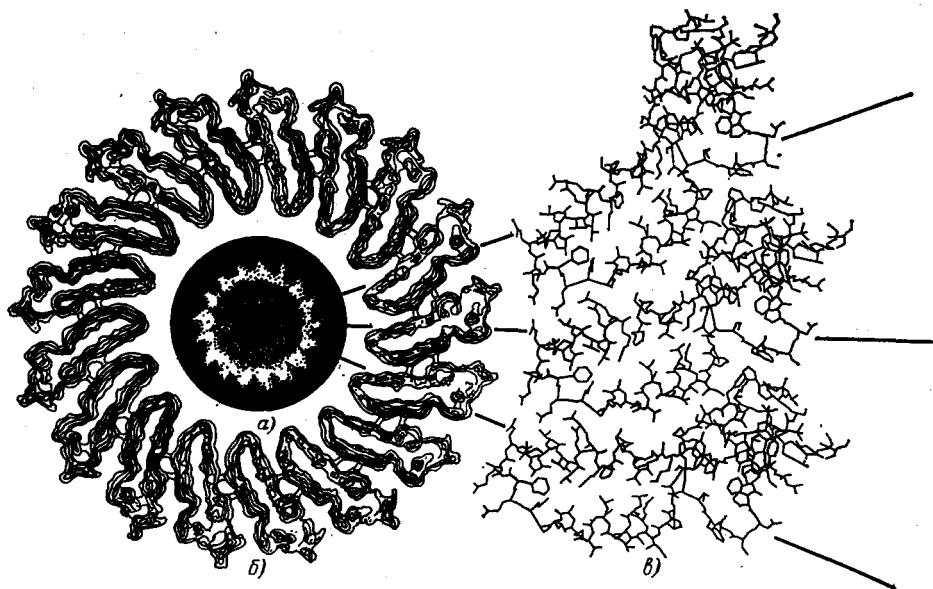


Рис. 3. Вид диска сверху при последовательном улучшении разрешения.

От центра к периферии расположены: изображение, полученное на электронном микроскопе при разрешении около 25 Å, после ротационной фильтрации ⁷² (а); сечение карты электронной плотности диска, полученной методом рентгеноструктурного анализа, с разрешением 5 Å, демонстрирующее палочкообразные α -спирали ¹⁸ (б), часть атомной модели, построенной на основе карты с разрешением до 2,8 Å (в) ¹⁵.

ходящихся на виток спирали вируса, так что латеральное связывание внутри дисков, по всей видимости, было таким же, как и в вирусе. Мы также показали, анализируя электронные микрофотографии, что диск был полярным, т. е. что его два кольца были обращены в ту же сторону, что и соседние витки вирусной спирали.

Это была первая очень большая структура из тех, что были когда-либо детально исследованы с помощью рентгеноструктурного анализа, и потребовалось около двенадцати лет, чтобы добиться существенного улучшения его разрешающей способности. Значительные технические трудности были

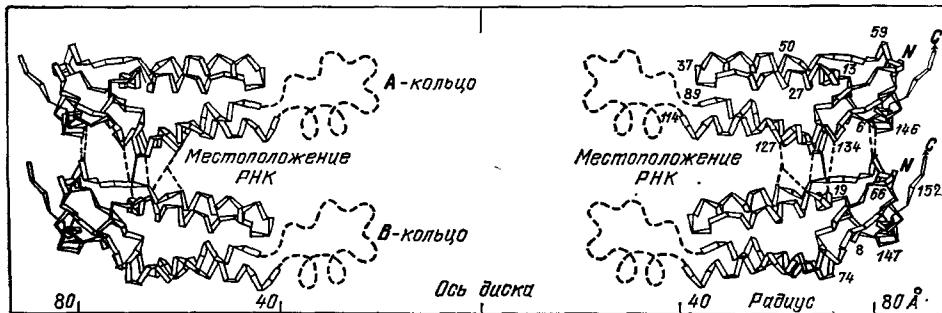


Рис. 4. Сечение диска, проходящее через его ось, построенное на основе результатов рентгеноструктурного анализа с разрешением до $2,8 \text{ \AA}^{14}$.

Ленты показывают расположение полипептидной цепи белковых субъединиц. Можно видеть, что субъединицы двух колец касаются по малой площади на внешней стороне диска, но, приближаясь к центру, расходятся, образуя «челюсти». Штриховыми линиями схематично показаны подвижные части белка в диске, расположенные от места связывания РНК до края центрального отверстия.

преодолены только после того, как в нашей лаборатории были разработаны более мощные рентгеновские трубы и специальные приборы (камеры; денситометры, связанные с компьютером) для сбора данных о структурах такой величины. (Фактически мы начали делать более совершенные рентгеновские трубы еще в Лондоне для использования на слабо дифрагирующих объектах, подобных вирусам.) Вращательная симметрия диска 17-го порядка также дает дополнительную информацию в рентгеновских данных, которая использована при окончательном анализе¹⁴, для улучшения разрешения карты, первоначально построенной на основе только одной производной тяжелого атома. Карта с разрешением в $2,8 \text{ \AA}$ была интерпретирована в терминах детальной атомной модели белка (рис. 3 и 4), хотя еще предстояло установить характер взаимодействия между белком и связанной с ним РНК.

б) Полиморфизм белков

Эти результаты, касающиеся структуры диска и показавшие, что она имеет весьма непосредственное отношение к спирали вируса, заставили меня задуматься: а не выполняет ли диск некую жизненно важную биологическую функцию? От этого вопроса нетрудно было отмахнуться: ведь диск мог быть побочным продуктом агрегации липких белков или формой их запасания. Полиморфизм белка ВТМ впервые в некоторых деталях был рассмотрен в 1963 г. Каспаром¹², который предвидел, что некоторые агрегационные состояния могут пролить свет на то, как функционирует белок. Количественные исследования агрегации, начатые Лауффером в 50-х годах¹⁶, были сконцентрированы на довольно узком диапазоне условий, причем главным образом ставилась задача понять, какие силы обусловливают агрегацию (в основном они энтропийного характера). Из-за отсутствия цельной картины в ранних наблюдениях, Дуран, Финч и я начали систематическое исследование агрегационных состояний, в результате которого стали ясны основные

закономерности^{17,18}. Результаты могут быть суммированы в виде фазовой диаграммы (см. рис. 2).

При низких или кислотных рН, белок сам по себе образует спирали произвольной длины, которые по своей структуре весьма напоминают вирус за тем исключением, что в них отсутствует РНК. При рН выше нейтральной белок в основном существует в виде смеси малых агрегатов, начиная с тримеров и крупнее, которые находятся в быстром равновесии друг с другом; его обычно называют А-белком.¹⁹ Около рН = 7 и примерно при комнатной температуре доминирующей формой является диск, который находится в относительно медленном равновесии с А-формой в отношении 4:1. Таким образом, основным фактором, контролирующим состояние агрегации оболоченного белка, является рН. Регуляция опосредована группами (вероятно, как показал Каспар¹², карбоксильными кислотными остатками), которые аномально связывают протоны в спиральном состоянии, но не в А-форме. Следовательно, спиральная структура может быть стабилизирована либо, в случае вируса, взаимодействием РНК с белком, либо, в случае свободного белка, протонированием кислотных групп. Таким образом, эти группы выступают в роли «отрицательного ключа», гарантирующего, что при физиологических условиях спираль не образуется, и поэтому есть достаточно белка в виде дисков, или А-белка, для взаимодействия с РНК во время сборки вирусной частицы.

в) Роль диска

Следовательно, дисковый агрегат белка имеет ряд важных свойств. Он не только имеет непосредственное отношение к спиральной структуре вируса, но также является доминирующей формой белка при «физиологических» условиях; более того, дисковые формы были найдены и для других спиральных вирусов. Это укрепило мое убеждение в том, что дисковая форма не случайна, а должна играть существенную роль в сборке вируса. В чем же могла быть эта роль?

В сборке любого агрегата из одинаковых единиц, такого, например, как кристалл, можно с физической точки зрения выделить два этапа: сначала образование зародыша и затем последующий рост, или, на более биохимическом языке, инициация и продолжение. Процесс образования зародыша или начало роста часто происходит с большим трудом, чем последующий рост. Так простой способ инициации, при котором свободная РНК взаимодействует с отдельными белковыми субъединицами, как раз и представляет проблему в смысле начала роста. С гибкой молекулой РНК должны связаться как минимум 17 субъединиц, прежде чем собирающаяся линейная структура сможет сомкнуться и образовать первый виток вирусной спирали. Этой трудности можно было бы избежать, если бы уже существующий диск служил матрицей, на которой собирались первые витки вирусной спирали до тех пор, пока не была бы достигнута такая величина, когда структура уже устойчива. Этот способ зарождения спирали мог бы также объяснить механизм узнавания белком своей гомологической РНК. На поверхности диска есть набор из 51 (= 17 × 3) мест связывания нуклеотидов, которые могут взаимодействовать с определенной последовательностью оснований, что приводит к такому эффективному распознаванию, которое было бы невозможно в случае нескольких нуклеотидов. Таким образом, казалось, что диск может удовлетворить как физическим, так и биологическим требованиям к инициации роста вируса и к специфичности взаимодействия РНК и белка. Эта гипотеза проиллюстрирована на рис. 5. Позднее выяснилось, что все детали этой диаграммы неверны, но дух ее был правилен. Как однажды заметил А. Н. Уайтхед, более важно, чтобы идея была плодотворной, чем чтобы она была правильной.

Предложенный выше механизм требовал, чтобы диск был способен переходить в двухвитковую спираль для образования начального участка расту-

щей нуклеопротеидной палочки. Чтобы это проверить, мы поставили очень простой эксперимент, а именно, эксперимент с падением рН¹⁹. Он показал, что резкое снижение рН быстро, в течение секунд, переводит диски в короткие спирали или «пружинные шайбы» (см. рис. 2), последние слипаются друг с другом, образуя более длинные спирали с дырками, которые в последующем заполняются, при этом получаются более правильные спирали.

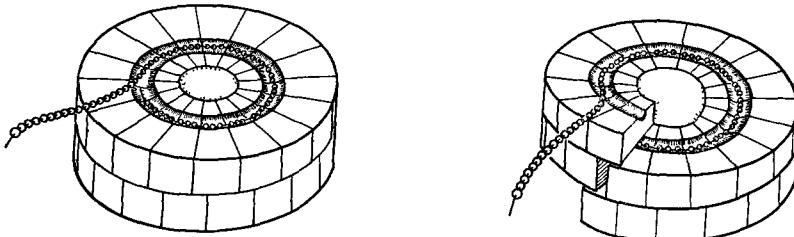


Рис. 5. Первоначальное представление о роли диска: специфическое узнавание особой (терминальной) последовательности ВТМ — РНК вызывает переход диска в два витка спирали.

(По поводу окончательно установленного механизма см. рис. 7.)

Этот переход происходит *in situ*, он не требует диссоциации и последующей реассоциации в другую форму. Успех этого эксперимента вдохновил нас приступить к опытам с самой РНК — естественным «субстратом» вирусного белка.

Первые эксперименты по реконструкции вируса, выполненные Батлером и мной, оказались поразительными²⁰. После того, как при рН = 7 приготовлялась смесь вирусной РНК и белка в виде дисков, в течение 10—15 минут образовывались завершенные вирусные частицы, что являлось разительным контрастом с теми часами, которые были необходимы в ранних экспериментах по повторной сборке, в которых использовался белок в дисагрегированной форме⁶.

Представление о том, что диски участвуют в естественном биологическом процессе инициации роста спирали, подтверждалось и другими экспериментами²⁰, в которых проводилась сборка с использованием РНК из различных источников. Они показали, что диски на несколько порядков охотнее взаимодействуют с вирусной РНК, чем с чужеродными РНК или с синтетическими полинуклеотидами с простой последовательностью. Таким образом, белок должен находиться именно в состоянии диска, чтобы обладать специфичностью во взаимодействии с РНК. В экспериментах, цитированных выше, в которых собирались вирусоподобные частицы, содержащие А-белок ВТМ и чужеродную РНК⁸, реакции проводились при кислотных рН; в этих искусственных условиях сам белок стремился образовать спиральные палочки, и благодаря этому мог захватить любую присутствующую РНК.

Помимо этого предсказанного влияния дисков на скорость инициации, мы, к нашему удивлению, обнаружили, что диски увеличивают и скорость удлинения спирали, и это привело нас к заключению, что они активно участвуют и в процессе роста. Этот результат подвергался сомнению некоторыми другими исследователями, работающими в этой области, и он обсуждается до сих пор^{21,22}. Однако последние данные, касающиеся конфигурации РНК во время включения в растущую частицу, о которых рассказано ниже, сделали более понятными роль дисков как в ее удлинении, так и в зарождении.

Таким образом, дисковая форма белков дала как раз те элементы, которые отсутствовали в простых экспериментах по реконструкции вируса, в которых использовался дисагрегированный белок, а именно, скорость и специфичность. Теперь мы знали, что делает диск, и встал новый вопрос: а как он это делает?

г) Взаимодействие белкового диска
с начальной последовательностью РНК

То, что именно вирусная РНК выбирается вирусным белком для образования оболочки, обусловлено специфичностью их взаимодействия. Она должна возникать в результате того, что в вирусной РНК есть уникальная последовательность, взаимодействующая с белковым диском. Зиммерн и Батлер выделили участок зарождения, содержащий эту последовательность, давая ограниченные количества дисковых белков, достаточные, чтобы произошло зарождение, но не последующий рост, а затем удалая нуклеазой РНК, не покрытую оболочкой^{23,24}. Меняя отношение РНК: белок и условия обработки нуклеазой, они обнаружили, что могут выделить серию фрагментов РНК, причем все они содержали одинаковую общую последовательность, но отличались величиной участков с обеих ее сторон. Эти фрагменты могут связываться с оболочечным белком, когда он находится в форме диска. Среди множества фрагментов был фрагмент, длиной всего около 60 нуклеотидов — чуть больше, чем необходимо, чтобы полностью связаться с одним диском — и оказалось, что он представляет собой минимальный защищенный участок. Благодаря сильному обратному связыванию этого фрагмента с диском, казалось вероятным, что он представлял собой «источник сборки», откуда начиналась обычная реакция зарождения.

Однако эти эксперименты с РНК в свою очередь породили другую загадку: оказалось, что очевидное предположение о том, что участок зарождения должен быть около одного из концов, неверно. Зарождение происходит на расстоянии около одной шестой длины РНК от 3'-конца²⁵, так что более 5000 нуклеотидов должны обволакиваться белком в основном направлении удлинения (3' — 5'), а 1000 — в обратном. Однако при наблюдении растущих нуклеопротеидных палочек под электронным микроскопом все непокрытые РНК всегда находили только с одного конца: почему же никогда не наблюдали палочек с хвостами с обоих концов? Разгадка этой головоломки была получена после исследования структуры белкового диска, о которой я сейчас и буду говорить. Хотя структура диска была детально раскрыта только в 1977 г., более ранний этап в рентгеноструктурном анализе дал ключ к пониманию, как он может взаимодействовать с РНК. При разрешении в 5 Å²⁶ можно проследить ход полипептидной цепи и установить главное в устройстве диска (см. рис. 3). Субъединицы верхнего кольца диска лежат в плоскости, перпендикулярной к его оси, в то время как те, что расположены в нижнем кольце, повернуты вниз к центру, так что два кольца касаются только по внешней поверхности диска. Поблизости от центрального отверстия они, следовательно, широко расходятся, как пара открытых челюстей, которые могли бы «прикусить» отрезок РНК, проходящий через центральное отверстие. Более того, прохождение через центр было бы облегчено тем, что внутренний участок белка, начиная от места связывания с РНК, как оказалось, не упорядочен и не упакован в регулярную структуру.

Таким образом, создавалось впечатление, что диск был устроен так, чтобы РНК могла проходить через центральное отверстие, эффективно увеличенное благодаря подвижности внутренней петли белка, и расположиться между двумя слоями диска. Понятно, что участком РНК, который окажется внутри диска, будет с необходимостью последовательность зарождения, расположенная довольно далеко от обоих концов молекулы РНК. Однако это может быть только в том случае, если РНК сложится вдвое в точке, находящейся в окрестности места зарождения сборки, и войдет в диск в виде петли шпильки. И на самом деле, последовательность оснований минимального фрагмента, защищенного при зарождении, такова, что он может складываться, образуя слабо спаренную двойную спираль с петлей наверху, т. е. шпильку (рис. 6). Это предположение выдвинул Зиммерн²⁴. Петля и верхняя

часть спиралей имеют универсальную последовательность, содержащую повторяющиеся тройки нуклеотидов, у которых в одном определенном положении находится гуанин Г, а в других двух обычно А или иногда У. Так как на каждую белковую субъединицу приходится три места связывания нуклеотидов, то благодаря такому расположению повторяющихся триплетов в определенное место белковой молекулы попадет вполне определенный нуклеотид, и это вполне может являться причиной распознавания диском петли РНК в процессе зарождения.

д) Зарождение и рост

Итак, гипотеза зарождение сборки²⁷ заключается в следующем: специальная шпилька РНК проникает через центральное отверстие диска в пространстве между челюстями, образованными двумя слоями белковых субъединиц (рис. 7). Все размеры хорошо для этого подходят. В результате открытая петля РНК может связаться с соответствующими местами на белке. По мере связывания РНК между челюстями белкового диска все большая часть довольно нестабильной двойной спирали будет плавиться и открываться. Некоторый, пока неизвестный, фактор этого взаимодействия, видимо, вызывает переход диска в короткий спиральный сегмент, включающий РНК, который после быстрого добавления к нему еще нескольких дисков²⁸ образует первую устойчивую нуклеопротеидную частицу.

Последующие после зарождения события можно назвать ростом, и, как уже говорилось выше, пока еще нет единого мнения, как он происходит. Мы считаем, что, по всей видимости, удлинение в основном направлении роста происходит благодаря добавлению новых дисков, и действительно, наши первые эксперименты по реконструкции указывают на это. Специальная конфигурация, возникающая во время проникновения петли внутрь диска, должна сохраняться по мере роста палочки за счет того, что через центральное отверстие протягиваются новые порции РНК. Таким образом, удлинение может происходить, по существу, по тому же механизму, что и зарождение, только теперь нет необходимости в петле РНК со специфической последовательностью, а все происходит благодаря «путешествующей петле», которая может проникать в очередной подошедший диск. В этом механизме легко преодолевается основная проблема, связанная с тем, что трудно представить, как может взаимодействовать целый диск из белковых субъединиц с РНК в растущей спирали. Сейчас существует еще больше данных в пользу того, что рост происходит за счет включения блоков субъединиц примерно величины диска²², но этот вопрос до сих пор дискутируется, и поэтому я не буду на нем больше задерживаться.

С другой стороны, теперь получены ясные экспериментальные подтверждения нашей гипотезы механизма зарождения. Она предсказывает: 1) что оба хвоста РНК останутся с одной стороны растущей нуклеопротеидной палочки, 2) что один из этих хвостов будет выходить прямо из этого конца палочки, а другой будет проходить от активной точки роста на дальнем ее конце по центральному каналу через всю растущую палочку. Оба этих предсказания теперь подтверждены. Группа Хирта в Страсбурге получила электронные микрофотографии растущих палочек, в которых РНК растянута частичной денатурацией и у многих частиц видны два хвоста, выходящие из одного и того же конца²⁸. В Кембридже мои коллеги использовали элек-

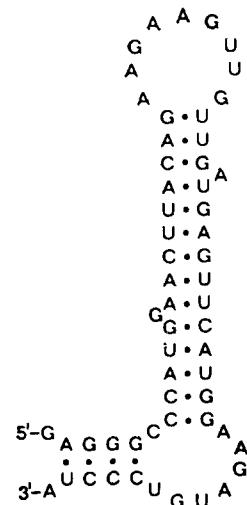


Рис. 6. Предполагаемая вторичная структура РНК в области зарождения²⁴.

Она образует слабо связанный двойной спираль с петлей на верху, вероятно, являющейся подлинным началом сборки. Последовательность в петле и в ее окрестности содержит мотив из трех оснований, у которых Г находится в среднем положении, а А или У в двух других.

тронный микроскоп высокого разрешения, который позволял идентифицировать концы палочки по их форме, и показали, что действительно именно

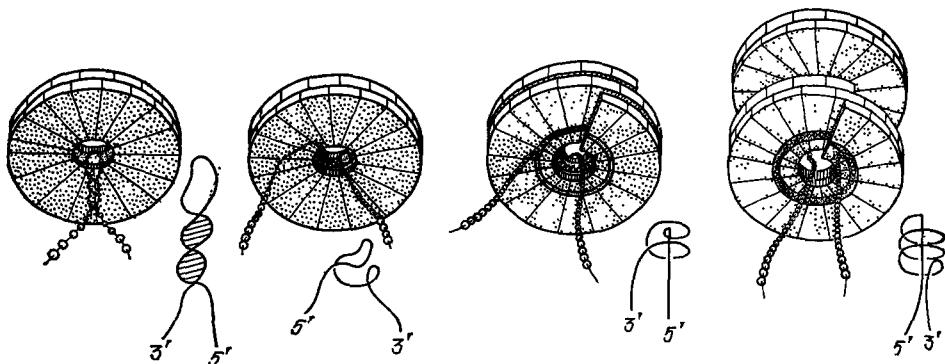


Рис. 7. Зарождение сборки вируса происходит благодаря проникновению шпильки РНК (см. рис. 6) в центральное отверстие белкового диска между двумя слоями субъединиц. Петля на верху шпильки связывается с диском, образуя часть витка, при этом двойная спираль разделяется, что обуславливает переход диска в короткую спираль. Затем, вероятно, «челюсти смыкаются», заключая РНК между витками из белковых субъединиц, и начинается рост нуклеопротеидной спирали (которая может тогда быстро удлиняться до некоторого минимального стабильного размера).

более длинный хвост проходит через растущую палочку²⁹. В других экспериментах было показано, что конфигурация РНК оказывает существенное влияние на скорость сборки²⁹.

е) Конструкция и ее создание: физические и биологические требования

Мы видим, что конструкция белкового диска — ключ к пониманию механизма сборки ВТМ. Белковая субъединица предназначена для того, чтобы образовывать не бесконечную спираль, а ее замкнутый двухслойный вариант — диск, который устойчив, и который может легко переходить в форму пружинной шайбы или короткой спирали. Следовательно, диск представляет собой промежуточную субструктуру, которая позволяет решить трудную в отношении энтропии проблему роста спирали. В то же время зарождение с помощью дисковой субструктуры объясняет механизм узнавания гомологичной вирусной РНК (и неприятие чужеродных РНК) тем, что диск имеет длинную цепочку мест связывания нуклеотидов, которая взаимодействует с собой последовательностью оснований РНК. Таким образом, диск — необходимое промежуточное звено в сборке вируса, которое одновременно удовлетворяет и физическому требованию к зарождению роста спиральной частицы, и биологическому требованию к специфичности узнавания вирусной РНК. ВТМ — это самособирающаяся, самозарождающаяся и саморегулируемая система.

Из истории о сборке ВТМ¹ можно сделать ряд полезных выводов. Во-первых, необходимо различать конструкцию структуры и процесс ее создания, т. е. несмотря на то, что ВТМ выглядит как спиральный кристалл и его конструкция подходит для процесса простого пристраивания субъединиц, его создание на самом деле следует более сложному пути, который находится под сильным контролем. Это иллюстрирует тот факт, что функция весьма непросто связана со структурой, и то, как много может сделать один-единственный белок. Для того, чтобы процесс сборки был эффективен и целесообразен, был использован очень сложный структурный механизм, основы которого мы теперь понимаем. Общая мораль, которая из всего этого следует, — это не просто то, что природа который раз спутала наши привычные

представления, но она также оставила нам достаточно зацепок, чтобы в конце концов догадаться, что происходит на самом деле. Как однажды сказал А. Эйнштейн: «Raffiniert ist der Herr Gott, aber bösartig ist er nicht». — «Бог искусен, но не коварен».

2. КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКАЯ ИЛИ ФУРЬЕ-ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

В 1955 г. Финч и я в Лондоне и Каспар, тогда еще в Кембридже, занялись рентгеноструктурным анализом кристаллов сферических вирусов. Они впервые были исследованы незадолго до и после войны Берналом с коллегами, которые использовали фотографию по методу напыления. Финч и я работали с желтым вирусом мозаики репы и с его пустой оболочкой, а Каспар с вирусом кустистой карликовости томата. Крик и Уотсон предсказали, что сферические вирусы должны обладать одним из типов кубической симметрии, а мы показали, что оба вируса имеют симметрию икосаэдра. Позднее, когда мы с Финчем показали, что вирус полиомиелита тоже имеет эту симметрию, мы поняли, что здесь действует какой-то общий принцип, что со временем позволило Каспари и мне сформулировать нашу теорию структуры вирусной оболочки³⁰.

Когда моя исследовательская группа переехала в Кембридж в 1962 г., мы занялись электронной микроскопией с той энергией, какая только возможна, когда берешься за новый предмет. Одной из главных причин было то, что этот метод давал прямое изображение, во всяком случае мы так думали. Вооруженные теорией устройства вирусов и некоторыми рентгеноструктурными данными, мы имели некоторое представление о том, какими могут быть сферические оболочки вирусов, и думали, что тонкие детали структуры сможем увидеть на электронных микрофотографиях. Таким образом, мы знали, что хотели видеть, но скоро мы обнаружили, что не понимаем, что видим на самом деле: микрофотографии не давали простых прямых изображений образцов. Мы скоро осознали ограниченность электронной микроскопии. Во-первых, были артефакты, порожденные подготовкой образца, а также радиационные повреждения во время наблюдения. Во-вторых, необходимо было использовать искусственные способы усиления контраста, так как большинство атомов в биологических образцах имели слишком малые атомные номера, чтобы самостоятельно обеспечить достаточную контрастность. В-третьих, получающееся изображение зависит от условий работы микроскопа и его фокусировки, а также от имеющихся aberrаций. Помимо всего, из-за большой глубины резкости обычного микроскопа все детали вдоль направления наблюдения накладываются на изображение. Наконец, в случае сильно рассеивающих или толстых образцов в них имеет место множественное рассеяние, что может разрушить даже эту связь между объектом и его образом. По этим причинам те детали, которые можно видеть на необработанном изображении, часто ненадежны, и их нелегко интерпретировать, если не иметь методов, которые исправляют операционные ошибки микроскопа и позволяют разделить вклады, вносимые в изображение различными сечениями образца. Важно также уметь оценивать степень сохранности образца в каждом конкретном случае. Такие методы для обработки изображений на электронных микрофотографиях были разработаны мною и моими коллегами за период около десяти лет. Их цель — извлечь из информации, запечатленной на электронных микрофотографиях, максимальное количество надежной информации о 2- или 3-мерных исследуемых структурах. Некоторые применения этих методов к различным задачам, исследовавшимся в нашей лаборатории за первые 15 лет, собраны в таблице. Электронная микроскопия в сочетании с реконструкцией образов, дополненная, когда это возможно, рентгеноструктурным анализом влажных неповрежденных материалов, дала в настоящее время общепринятые модели структурной организации большого количества биологических систем, как, например,

Таблица

Некоторые результаты применения метода реконструкций изображения, даваемого электронным микроскопом, полученные в лаборатории молекулярной биологии MRC в Кембридже в 1964—1979 гг.

Вирусы	Органеллы	Ферменты и т. д.
<p>Сpirальные: ВТМ, белковый диск ВТМ, парамиксовирусы</p> <p>Икосаэдрические: Вирусы полиомиелита, бородавки, TBSV, TYMV, R17, Nudaurelia, CPMV</p> <p>Шестиугольный аденоавирус: Аберрантные шестиугольные и пятиугольные трубочки вируса полиомиелита</p> <p>Фаги T2 и T4: Головка и ее трубчатые варианты (полиголовки)</p> <p>Хвост: оболочка + сердцевина</p> <p>Пластиинки основания</p>	<p>Микротрубочки из жгутиковых дублетов и мозга; тубулиновые листки</p> <p>Мышечные нити: актин; актин + тропомиозин; актин + миозин + тропомиозин (в расслабленном состоянии)</p> <p>Бактериальные жгутики; бактериальные клеточные стенки</p> <p>Кристаллы рибосом</p> <p>Хроматин: кристаллы из нуклеосомных сердцевин, трубочки из гистоновых октамеров</p> <p>Щелевые контакты</p>	<p>Гемоцианин Глутампидегидрогеназа Катализаза; кристаллы и трубочки</p> <p>Пурпурная мембрана (бактериородопсин)</p> <p>Цитохромоксидаза</p>

тех, что перечислены в таблице. В этой лекции я опишу ограниченное число примеров, задача которых продемонстрировать возможности различных методов и сущность результатов, которые можно с их помощью получить. Более полное описание этих методов и их теорию можно найти в ^{2,3}, но мне бы хотелось здесь подчеркнуть, что эти методы возникли благодаря практическим потребностям и развивались в процессе решения конкретных проблем, и тем не менее оказалось, что они имеют широкое применение.

а) Двумерная реконструкция: цифровая компьютерная обработка

Мы начали наши исследования вирусов, как сферических, так и спиральных, используя метод негативного окрашивания, который был разработан незадолго до этого Хаксли и Бреннером и Хорном ³¹. По этому методу образец погружается в тонкий аморфный слой соли тяжелого металла, которая одновременно сохраняет и проявляет форму областей, из которых она вытеснена. Было видно большое количество тонких деталей, но в большинстве случаев было нелегко понять, что они означают. Обычно думали, что образцы просто были разупорядочены, так как предполагалось, что при негативном окрашивании получается отпечаток частицы. Мы постепенно поняли, что путаница возникала не столько из-за разупорядочения, вызванного окрашиванием, сколько из-за того, что возникала суперпозиция деталей от передней и задней частей частицы, т. е. окрашивание обволакивало всю частицу, образуя таким образом скорее не отпечаток, а что-то вроде формы для отливки. Эта интерпретация была подтверждена параллельно двумя разными способами. Первый относился к случаю сферических вирусов. Здесь можно было построить модель и с помощью компьютера или как-либо еще получить ее проекцию, и мы обнаружили, что эта проекция может объяснить многие, если не все детали, непонятные до этого ³². Единственность модели могла быть доказана в экспериментах по вращению, в которых закрепленные образцы и модель поворачивались одинаковым образом на большие углы ³³ (см. ниже, рис. 10). Второй подход был применен к спиральным структурам, которые трансляционно периодичны и поэтому удобны для прямого анализа образов, что я сейчас и проиллюстрирую.

На рис. 8, а показана электронная микрофотография негативно окрашенного образца «полиголовки», являющейся разновидностью головки бактериофага T4, состоящей главным образом из ее основного белка. Частица была расплощена и, таким образом, потеряла первоначальную трубчатую форму. На изображении ясно видны некоторые структурные периодичности, но их трудно различить, и такие интерпретации обычно носят субъективный характер. Я подумал, что оптическая (фраунгоферова) дифракционная

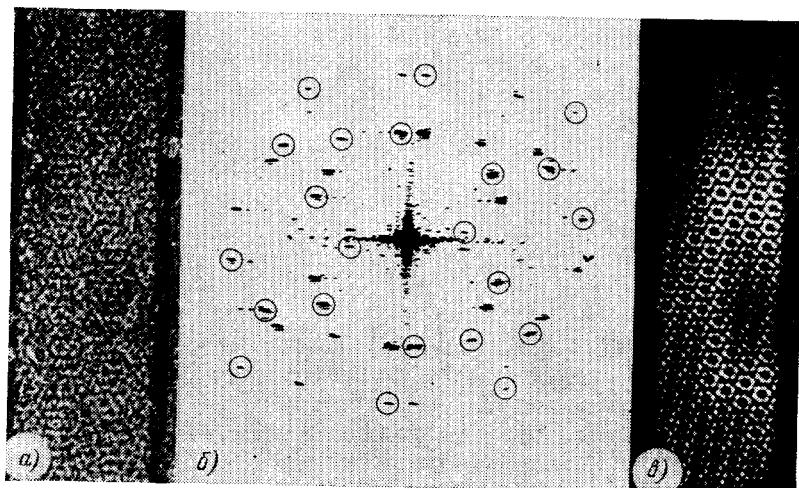


Рис. 8. Оптическая дифракция и фильтрация изображений трубчатых структур, известных как «полиголовки», состоящих из основного белка головки бактериофага T4³⁵.

а) Электронная микрофотография негативно окрашенной уплощенной частицы (200 000*); б) оптическая дифракционная картина рис. а), на которой кругами обведены набор дифракционных пиков, соответствующий одному слою структуры; в) отфильтрованное изображение одного слоя на рис. а) с использованием дифракционной маски, показанной на рис. б). Апертура в маске выбирается таким образом, что усреднение здесь захватывает только несколько соседних клеток. Можно видеть отдельные молекулы, организованные в гексамеры.

картина, полученная на таком изображении, позволит провести объективный анализ всех имеющихся периодичностей³³. Это показано на рис. 8, б. На нем видны ясные дифракционные максимумы; они распадаются на две группы. Это можно объяснить тем, что одну группу порождает передняя, а другую — задняя сторона образца. Таким образом, было установлено, что негативное окрашивание образует полный слепок частицы, а не отпечаток одной стороны³³. Так как она является спирально-периодической структурой, дифракционные максимумы в основном ложатся на решетку, и, следовательно, они отражают истинные повторяющиеся черты, имеющиеся в структуре. В данном случае регулярные дифракционные максимумы наблюдались до масштабов около 20 Å, что указывало на то, что дальний порядок сохранялся и до такой величины разрешения, которой на самом деле достаточно, чтобы различить отдельные белковые молекулы.

Возникающая в изображении путаница обязана суперпозиции ближней и дальней сторон частицы, и любую из этих сторон можно выделить оптической системой с помощью подходящего фильтра, который пропускает только нужные дифракционные лучи³⁴. Отфильтрованное изображение (рис. 8, в) можно естественным образом сопоставить с некоторым определенным расположением белковых молекул³⁵.

Ясность полученного изображения обязана также тому, что фоновый шум в дифракционной картине был отфильтрован. Этот шум возникает из-за смещения отдельных молекул в образце, т. е. разупорядочения, и они слу-

чайным образом влияют на все части дифракционной картины. Мы увеличили на изображении отношение сигнала к шуму за счет усреднения по молекулам, имеющимся в структуре. Эта идея усреднения по многим копиям повторяющегося мотива является центральной для наиболее мощного метода, разработанного к настоящему времени для получения надежных изображений биологических образцов. В трехмерной процедуре, которую я опишу позднее, этот метод тоже может использоваться.

Суть данного типа обработки изображения — в том, что это — двухэтапная процедура, следующая за получением первичного изображения. Вначале производится его фурье-преобразование. Затем коэффициенты Фурье некоторым образом корректируются, после чего обратным преобразованием получают реконструированное изображение. Эти операции легче всего выполнить на ЭВМ, и цифровая обработка образов, впервые предложенная Де-Розьером и мной³⁶, существенно универсальнее, чем наш первоначальный оптический метод, и, в частности, она делает возможным трехмерный анализ.

б) Трехмерная реконструкция изображения

Первый мой пример (см. рис. 8) относился к сравнительно простому случаю, когда задача сводилась к разделению вкладов от двух перекрывающихся слоев кристалла, и мы видели, как метод анализа Фурье разлагает суперпозицию в реальном пространстве на отдельные множества в пространстве Фурье. Однако уже из простого анализа сферических вирусов было ясно, что для того, чтобы получить единственную или надежную картину трехмерной структуры, необходимо иметь возможность рассмотреть образец со множества различных направлений³². Эти различные ракурсы часто получались, когда образец был при наблюдении произвольно ориентирован, но их можно также получить, как говорилось выше, поворачивая образец под микроскопом. Первоначально, как это было описано, различные ракурсы интерпретировались с помощью построения соответствующей модели, но постепенно я понял, что набор изображений, полученных при различных направлениях взгляда, можно объективно объединить, чтобы реконструировать трехмерный образ объекта.

Это произошло, когда Де-Розьер и я изучали хвост бактериофага T4, и наш анализ показал, что в изображение давали вклад не только передняя и задняя поверхности, но и внутренняя структура³⁶. Чтобы работать в трех измерениях, нужно было найти обобщение двумерной процедуры фильтрации, и, проведя сопоставление с рентгеноструктурным анализом, я осознал, что нам необходимо освоить трехмерный фурье-синтез. При анализе рентгеновских дифракционных картин ВТМ я использовал то, что спиральную структуру можно построить математически из набора цилиндрических гармонических функций. Существует связь между числом тех функций, которые можно получить, и числом имеющихся направлений. Каждый новый ракурс дает дополнительные гармоники более высокой пространственной частоты, и, следовательно, если есть достаточно направлений взгляда, можно полностью восстановить структуру. Позднее мы установили³⁶, что этот синтез был всего лишь специальным случаем общей теоремы, известной кристаллографам как проекционная теорема.

Общий метод реконструкции, который мы разработали (рис. 9), основан на проекционной теореме, утверждающей, что двумерное преобразование Фурье плоского сечения трехмерного распределения плотности идентично соответствующему центральному сечению трехмерного преобразования, нормальному направлению взгляда. Таким образом, используя преобразования Фурье различных ракурсов объекта, можно построить сечение за сечением трехмерное преобразование, и тогда трехмерная реконструкция

объекта получалась в результате обратного преобразования Фурье. Важной особенностью этого метода является то, что он указывает, сколько ракурсов необходимо для требуемого разрешения и как их необходимо комбинировать для получения трехмерной картины объекта^{36,37}. Этот процесс является количественным, и он лишен произвольных предложений. Подход подобен тому, что применяется в рентгеновской кристаллографии, однако фазы рентгеновской дифракционной картины непосредственно не могут быть измерены, в то время как здесь их можно вычислить на основе цифрового образа. Если бы ни радиационное повреждение, можно было бы набрать различные ракурсы одной-единственной частицы, используя врачающийся предметный столик микроскопа. Но на самом деле приходится использовать несколько частиц в разных, но определенных ориентациях. В общем, желательно так скомбинировать данные от разных частиц, чтобы погрешности при усреднении выпали.

Метод Фурье — это только один из нескольких способов решения систем математических уравнений, описывающих неизвестное трехмерное распределение плотности, когда известны его проекции в различных направлениях³⁷, но фактически ни один другой метод не оказался лучше. Более того, метод Фурье имеет то преимущество, что он выполняется поэтапно, а именно, получение двумерных преобразований и последующая их рекомбинация в трех измерениях. Как описано выше, при этом есть возможность оценить, выбрать и откорректировать данные, используемые в окончательной реконструкции.

Этот метод нашел много применений. Фактически он был впервые применен для исследования хвоста фага T4, т. е. в задаче, в которой он возник. Частицы со спиральной симметрией наиболее удобны для реконструкции, так как ее можно проделать, имея только один ракурс всей частицы, с ограниченным разрешением, определяемым симметрией спирали. С физической точки зрения дело здесь в том, что единственное изображение спиральной частицы дает много разных ракурсов повторяющейся субъединицы, и именно это упрощение натолкнуло нас использовать хвост фага в качестве первого образца для трехмерной реконструкции образа. В общем случае нужно больше одного ракурса, но любая имеющаяся симметрия уменьшает их необходимое число. Обычно для малых икосаэдральных вирусов достаточно трех

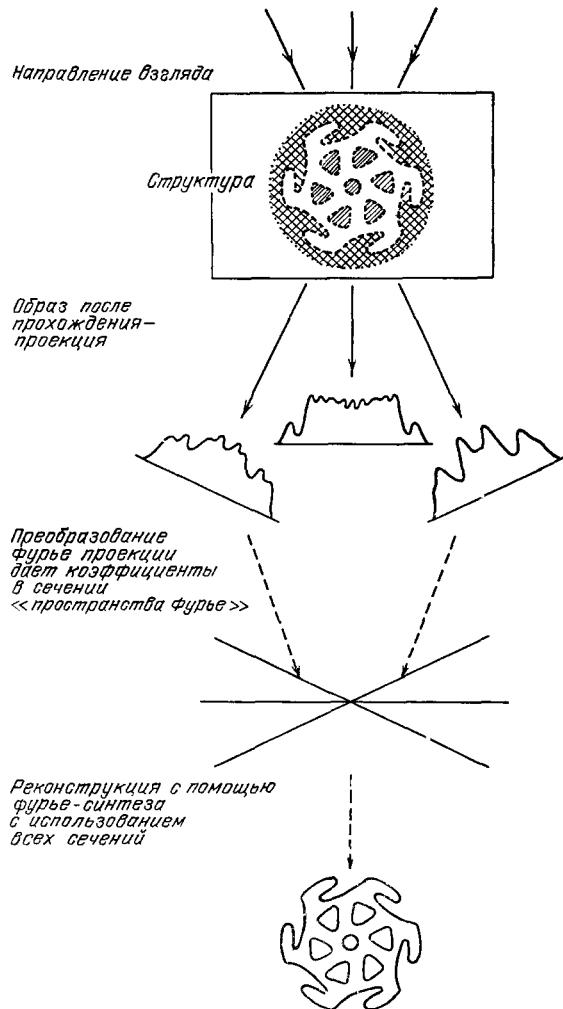


Рис. 9. Схема общего процесса трехмерной реконструкции объекта по набору двумерных проекций³⁶.

или четырех ракурсов, но для многих других образцов нужно проводить предварительное исследование, чтобы определить подходящее число

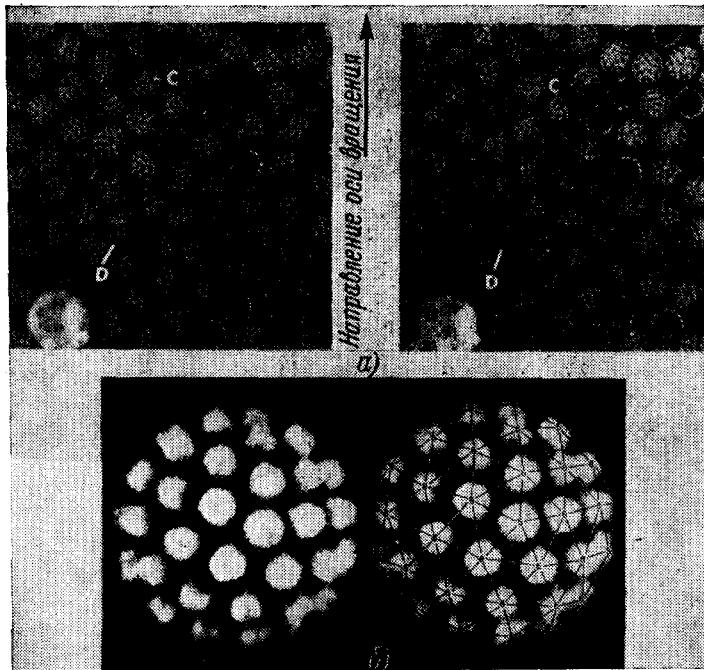


Рис. 10. а) Электронные микрофотографии одного и того же поля негативноокрашенных плотноупакованных частиц вируса бородавки человека до (I) и после (II) поворота образца на угол, близкий 18° ⁷³ (140 000*); б) трехмерный реконструированный образ вируса бородавки человека³⁹. (Рядом показана лежащая в основе икосаэдralьная поверхность решетка³⁰ с отмеченными вертикалями 5-го и 6-го порядка.)

направлений наблюдения и провести усреднение³⁸. Пример Кроутера и Амос³⁹ дан на рис. 10.

в) Фазовоконтрастная микроскопия

Электронная микроскопия в сочетании с тем или иным методом анализа образцов, примененная к негативно окрашенным образцам, оказалась идеальным инструментом для определения расположения и формы малых белковых субъединиц в естественных и искусственных структурах, среди которых — двумерные кристаллы и макромолекулярные ансамбли, такие, как вирусы и микротрубочки². Структурная информация, получаемая этим методом, оказалась весьма надежной для деталей, размеры которых не меньше 20 или 15 Å. Однако стало ясно, что этот масштаб ограничен зернистостью негативного окрашивания и тем, насколько точно оно повторяет поверхность образца⁴⁰. Чтобы получить более высокое разрешение, лучше 10 Å, нужно отказаться от окрашивания и смотреть непосредственно на белок. При высоком разрешении возникает другая проблема: радиационное повреждение. Его можно уменьшить, снизив интенсивность облучающего пучка, но тогда увеличивается статистический шум и первичное изображение становится все менее и менее надежным. Однако эту трудность можно достаточно хорошо преодолеть, если рассматривать упорядоченные множества молекул, так, чтобы можно было усреднить информацию от разных молекул, как было описано выше, и получить статистически значимую картину.

Первую проблему отказа от негативного окрашивания, избежав при этом дегидратации, можно решить двумя способами. Первый, в настоящее время широко изучаемый способ,— это использовать замороженные гидратированные образцы⁴¹. Другой, проверенный метод — это метод Анвина и Хендersonа, которые в своем радикальном подходе к определению структуры неокрашенных биологических образцов с помощью электронного микроскопа^{42, 43} для сохранения материала использовали высушенный раствор глюкозы.

Но тогда возникает вопрос: каким образом можно увидеть этот неокрашенный образец, эффективно прозрачный для электронов? В световой микроскопии прозрачных образцов используется хорошо известный метод фазового контраста Зернике. Там фазы рассеянных лучей относительно нерассеянного смещаются с помощью фазовой пластинки, а затем рассеянные и нерассеянный лучи интерферируют в плоскости изображения, в результате чего оно проявляется. Анвин сконструировал устройство для электростатического фазового контраста в электронной микроскопии, вполне аналогичное фазовой пластинке, используемой в световой микроскопии⁴⁴, но его не просто изготовить или использовать. Практический способ получения фазового контраста в электронной микроскопии — это просто зафиксировать изображение при расфокусированных линзах объектива, и именно этот метод использовали Анвин и Хендerson.

Метод дефокусированного фазового контраста вырос из академического изучения формирования изображения в электронном микроскопе, проведенного Эриксоном и мной⁴⁵. Мы его предприняли из-за путаницы, которая возникла относительно природы первичного изображения. Когда был предложен метод трехмерной реконструкции образа и применен к биологическим частицам, погруженным в негативный краситель, различные исследователи, работающие в области материаловедения и привыкшие к динамическим эффектам в сильно рассеивающих средах, высказывали возражения относительно предположения о том, что возникающий образ, в сущности, представлял собой просто проекцию распределения красителя. Они спрашивали, справедлива ли эта гипотеза при наличии множественного или динамического рассеяния. Чтобы ответить на этот вопрос, Эриксон и я предприняли экспериментальное изучение негативно окрашенных тонких кристаллов каталазы при изменении глубины фокусировки⁴⁶. Мы обнаружили, что линейная (или первого порядка) теория формирования изображения могла бы объяснить почти полностью все изменения в преобразовании Фурье изображения. Мы пришли к выводу, что прямое изображение при использовании подходящей величины дефокусировки, зависящей от интересующего диапазона частот, является действительной проекцией плотности объекта. Когда использовались большие величины дефокусировки с целью увеличения контраста, для получения действительной картины изображение можно было скорректировать.

Это исследование, хотя и было ограничено средними величинами разрешения, продемонстрировало на практике, что цифровая обработка изображения a posteriori может быть использована для измерения и компенсации эффектов дефокусировки, и мы предположили, что этот подход мог бы быть непосредственно распространен на высокое разрешение для компенсации как эффектов сферической aberrации, так и дефокусировки. Он также дал удобный способ получения фазового контраста в электронном микроскопе в случае неокрашенных образцов. Изображение фиксировалось при расфокусированных линзах объектива, при этом менялись фазы рассеянных лучей по отношению к нерассеянному (или нулевого порядка). Однако дефокусировка действует не так, как обычная фазовая пластинка, аналогичная пластинке Зернике, так как не все фазы меняются в одинаковую меру, и последовательные полосы пространственных частот вносят свой вклад в контраст изображения попаременно то с положительным, то с отрицательным знаком. Для получения «правильного» изображения, необходимо обработать изобра-

жение, даваемое электронным микроскопом, и при этом откорректировать его фазовый контраст так, чтобы все пространственные частоты вносили в контраст вклад одного знака.

Чтобы получить свое эффектное трехмерное реконструированное изображение пурпурной мембранны *Halobacterium* с разрешением около 7 Å⁴⁴, Хендерсон и Анвин зафиксировали ряд изображений при низких дозах облучения разных кусков мембранны, повернутых на различные углы. Финальная картина была результатом усреднения примерно по 100 000 молекул. Слабый контраст на отдельных микрофотографиях, полученный дефокусировкой, был затем усилен и откорректирован с помощью ЭВМ по методу, описанному выше. Это был первый раз, когда внутреннюю структуру белковой молекулы «увидели» с помощью электронного микроскопа.

3. СТРУКТУРА ХРОМАТИНА

Работа над вирусами дала результаты, имеющие не только самостоятельный интерес. Как я указывал выше, трудности в обращении с большими молекулярными агрегатами привели к разработке методов, которые могли быть использованы и для других систем. Недавний пример такого подхода, причем такой, в котором, я думаю, не удалось бы добиться успеха так быстро, не будь у нас предыдущего опыта,— это хроматин. Хроматином называют тот материал, из которого построены хромосомы. Он состоит в основном из ДНК, тесно связанной с таким же по весу количеством небольшого набора довольно осибных белков, называемых гистонами. Мы занялись исследованием хроматина¹ в Кембридже примерно десять лет назад, когда химики, работающие с белками, показали, что существует только пять главных типов гистонов, причем наблюдаемое увеличение их разновидностей происходит благодаря постсинтетическим модификациям. Таким образом, к проблеме структуры уже вполне можно было подступиться.

ДНК — эукариотической хромосомы — это, вероятно, одна молекула, имеющая в длину несколько сантиметров, если ее вытянуть в одну линию, и она должна быть сильно свернута, чтобы образовать компактную структуру, наблюдавшую в хромосоме. В то же время она состоит из отдельных генетических или функциональных единиц, и то, как осуществляется свертывание, организованы гены и управляет их экспрессия, является предметом интенсивных исследований во всем мире. Цель нашей исследовательской группы заключалась в том, чтобы попытаться понять структурную организацию хроматина на разных уровнях и посмотреть, как ее можно соотнести с управлением функциями ДНК.

Большие количества, в которых встречаются гистоны, наводят на мысль, что они играют структурную роль, и в 1972—1975 гг. было показано, что четыре гистона H2A, H2B, H3 и H4 отвечают за первый уровень структурной организации хроматина. Они сворачивают последовательные сегменты ДНК длиной примерно 100 Å в диаметре, называемые нуклеосомами. Так создается цепочка нуклеосом или повторяющихся единиц, и, когда они тесно упакованы, они образуют волокно диаметром примерно 100 Å. Роль пятого гистона H1 поначалу была неясна. Он значительно более вариабелен по своей последовательности, чем другие четыре, являясь видо- и тканеспецифичным. В 1975—1976 гг. мы показали, что H1 участвует на следующем более высоком уровне организации, определяемом сворачиванием нуклеосомного волокна, и, позднее показали, как он осуществляет свою роль.

Сейчас не уместно детально рассказывать, как появилась картина принципиальной организации хроматина⁴, но идея нуклеосомы возникла как результат пересечения нескольких различных направлений работы. Первые указания на регулярную структуру были получены из рентгеноструктурных исследований хроматина, которые показали, что он должен содер-

жать повторяющиеся единицы, хотя и не очень упорядоченные, масштаба примерно 100 Å^{46,47}. Первое биохимическое доказательство регулярности было получено в работе Хевиша и Бургойна⁴⁸, которые показали, что эндогенная нуклеаза из печени крысы может разрезать ДНК на части одинаковой величины, которые, как показал позднее Нолл, используя другой фермент, микрококковую нуклеазу, содержат примерно по 200 пар оснований⁴⁹. Тот факт, что нуклеаза разрезает ДНК в хроматине в регулярно расположенных местах, совершенно не похожий на ее действие на свободную ДНК, объясняется тем, что ДНК свернута таким образом, что только отрезки свободной ДНК между этими свернутыми единицами доступны ферменту. Третьим доказательством, приведшим к идеи нуклеосомы, было наблюдение Корнберга и Томаса⁵⁰, что два высоко устойчивых гистона, H3 и H4, существовали в растворе в виде специфического олигомера — тетрамера $(H3)_2(H4)_2$, который вел себя совсем как обычный глобулярный белок, содержащий несколько субъединиц. На основе этих исследований Корнберг в 1974 г.⁵¹ предложил конкретную модель основной единицы хроматина в виде шарика диаметром примерно 100 Å, содержащего отрезок ДНК из 200 пар оснований, намотанный на белковую сердцевину, состоящую из 8 гистонов, а именно тетрамера $(H3)_2(H4)_2$ и по два H2A и H2B. Пятый гистон H1 был каким-то образом связан извне с каждой нуклеосомой.

Однако в 1972 г., когда Корнберг приехал в Кембридж, все это еще было в будущем. Используя рентгеновскую дифракцию, мы попытались проследить повторное соединение гистонов и ДНК, так как рентгеновская картина, даваемая ядрами или хроматином, очищенным от них, как бы она ни была ограниченной, оказалась единственным способом проследить возникновение упорядоченной упаковки ДНК. Рентгеновские исследования показали, что можно получить почти 90% реконструкции, если ДНК просто смешивать с неразделенным общим препаратом гистонов, однако все попытки реконструировать хроматин, смешивая ДНК с набором всех четырех отдельно выделенных типов гистонов, провалились, как если бы процесс, в котором разделялись гистоны, денатурировал их. Тогда мы стали искать более мягкие методы выделения гистонов и обнаружили, что естественная структура могла быть легко восстановлена, если гистоны попарно находятся вместе: H3 и H4, и H2A, и H2B, но не тогда, когда все они берутся отдельно. Именно эта работа подтолкнула Корнберга к дальнейшему исследованию физиологических свойств гистонов и к открытию⁵⁰ гистонового тетрамера $(H3)_2(H4)_2$, которое в свою очередь привело к идеи нуклеосомы, как было описано выше.

а) Структура нуклеосомы

Такие подходы, как расщепление нуклеазами или рентгеновское рассеяние на неориентированных образцах хроматина или на нуклеосомах в растворе, могли выявить некоторые свойства нуклеосом, но полное описание их структуры можно было получить только из кристаллографического анализа, который дает полную трехмерную структурную информацию. Таким образом, летом 1975 г. мы с коллегами приступили к попыткам приготовить нуклеосомы в форме, удобной для кристаллизации. Нуклеосомы, очищенные от продуктов расщепления микрококковой нуклеазой, содержат в среднем около 200 нуклеотидных пар ДНК, но разброс около среднего довольно велик, и поэтому такие препараты недостаточно гомогенны для кристаллизации. Однако вариабельность в размерах можно устраниć дальнейшим расщеплением микрококковой нуклеазой. Действие микрококковой нуклеазы на хроматин заключается в том, что вначале она разрезает ДНК между нуклеосомами, а затем она действует как экзонуклеаза на отрезанные нуклеосомы, укорачивая ДНК сперва примерно до 166 пар оснований, после чего наступает короткая пауза в расщеплении⁵², а затем примерно до 146 пар

оснований, после чего в расщеплении наблюдается явное плато, до того, как произойдет дальнейшая деградация. Во время этого последнего этапа высвобождается гистон H1⁵², оставляя в качестве основного метастабильного промежуточного продукта частицу, содержащую 146 пар оснований ДНК в комплексе с набором из 8 гистоновых молекул. Эта ферментативно уменьшенная форма нуклеосомы называется сердцевидной частицей, и было обнаружено, что содержание ДНК в ней одинаково для многих различных видов. ДНК, удаленная длительным расщеплением, которая первоначально соединяла соседние нуклеосомы, называется линкер-ДНК (или ДНК-соединитель).

Таким образом, сердцевидная частица содержит четко определенный по длине отрезок ДНК и гомогенна по своему белковому составу. Естественно, мы пытались кристаллизовать препараты сердцевидных частиц, но вначале у нас ничего не получилось, видимо, из-за малых примесей пятого гистона H1. Со временем мой коллега Леонард Люттер нашел способ получать исключительно гомогенные препараты нуклеосомных сердцевидных частиц, которые образовывали хорошие одиночные кристаллы⁵³. В выборе условий для выращивания кристаллов мы основывались на нашем предыдущем опыте по кристаллизации РНК-переносчика, так как мы полагали, что существенная часть поверхности нуклеосомной сердцевины состояла из ДНК. Возможно, эти эксперименты удивили биологов, ярко показав, что почти вся ДНК в ядре организована весьма регулярным образом.

Определение трехмерной структуры на основе кристалла большого молекулярного комплекса — это такой процесс, который, как в случае диска ВТМ, может потребовать многих лет. Поэтому мы сконцентрировали свои усилия на получении картины нуклеосомной сердцевидной частицы при низком разрешении, комбинируя рентгеновскую дифракцию и электронную микроскопию, дополненные, когда это возможно, биохимическими и физико-химическими исследованиями. Мы вначале определили упаковку кристаллов, анализируя электронные микрофотографии тонких кристаллов, а затем получили проекции электронной плотности вдоль трех главных осей кристалла, используя амплитуды рентгеновской дифракции и фазы электронного микроскопа^{53,54}. Нуклеосомная сердцевидная частица оказалась плоским дискообразным объектом, примерно 110 Å на 57 Å, несколько клиновидным и явно распадающимся на два слоя. Мы предложили модель, в соответствии с которой ДНК была намотана примерно на 1 3/4 витка суперспирали с шагом около 27 Å вокруг гистонового октамера. Таким образом, каждый виток суперспирали составляет примерно 80 нуклеотидов. Эта модель организации ДНК в нуклеосомной сердцевине также дала объяснение некоторых результатов по исследованию ферментативного расщепления хроматина^{53,55}, показав, таким образом, что то, что мы закристаллизовали, было на самом деле естественной структурой.

Мы обнаружили, что у первых полученных нами кристаллов гистоновые белки внутри были частично протеолизированы, но их физикохимические свойства оставались весьма похожими на их свойства в интактной частице. С тех пор мы смогли вырастить кристаллы из интактных нуклеосомных сердцевин, которые дают дифракционные картины с разрешением около 5 Å, и в настоящее время они детально анализируются⁵⁶. За эти годы Даниэла Родес, Рэй Браун и Барбара Раштон вырастили кристаллы сердцевидных частиц, подготовленных из семи различных организмов; все они дали совершенно одинаковые рентгеновские картины, что свидетельствует об универсальности нуклеосом. Частица имеет ось симметрии второго порядка, что неудивительно, так как 8 гистонов входят в нее попарно, а ДНК имеет множество локальных осей второго порядка. Большине углы диффузного рентгеновского рассеяния от кристаллов указывают на то, что ДНК в сердцевидной частице присутствует в В-форме.

Карта электронной плотности одной из главных проекций кристалла показана на рис. 11, а. Эта карта дает общую плотность в нуклеосоме, при

этом не делается различия между плотностями, обусловленными ДНК и белком. Можно различить вклады белка и ДНК, если использовать рассеяние нейтронов в сочетании с методом изменения контраста, и такое исследование было начато Джоном Финчем и группой в Институте Лауз — Ланжевен в Гренобле, как только удалось получить достаточно большие кристаллы⁵⁷.

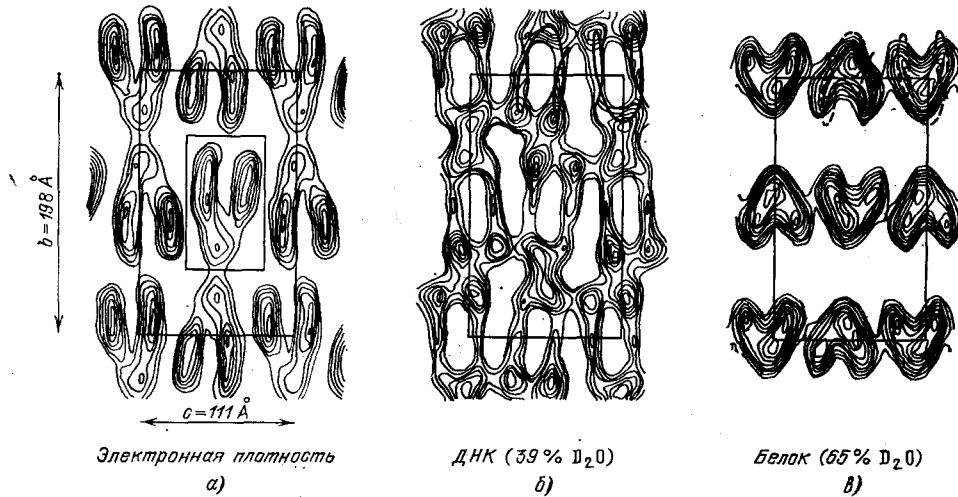


Рис. 11. Карты проекций Фурье нуклеосомной сердцевидной частицы.

а) Карта на основе рентгеноструктурных данных⁵⁶; б), в) карты на основе данных нейтронного рассеяния с использованием изменения контраста⁵⁷ — компонент ДНК (на карту плотности наложено изображение хода суперспирали (б) и компонент белкового ядра (в)).

Они получили карты ДНК и белка для трех главных проекций (рис. 11, б и в). Карта ДНК согласуется с тем, что ожидалось для проекции примерно $1 \frac{3}{4}$ суперспиральных витков, как предполагалось раньше, а карта белка показывает, что гистоновый октамер соответствует форме клина.

б) Реконструкция трехмерного образа гистонового октамера и пространственное расположение внутренних гистонов

Альтернативным подходом к разделению вкладов от ДНК и белка с помощью нейтронной дифракции является непосредственное исследование гистонового октамера. Гистоновый октамер, образующий белковое ядро нуклеосомы, может существовать в свободной форме в концентрированном растворе соли, которая замещает ДНК⁵⁸. Пытаясь его кристаллизовать, мы получили упорядоченные агрегаты — полые трубчатые структуры, которые мы исследовали с помощью электронного микроскопа⁵⁹. Чтобы получить трехмерную карту низкого разрешения и модель октамера (рис. 12, а), мы использовали метод реконструкции образа, описанный выше. В качестве проверки того, что удаление ДНК не привело к изменению структуры гистонового октамера, мы вычислили проекции этой модели и сопоставили их с проекциями белкового ядра нуклеосомы, полученных с помощью нейтронного рассеяния, упомянутого выше. Для всех трех карт наблюдалось хорошее согласие, и это указывало на то, что грубая структура не изменилась.

При том разрешении, который давал анализ (20 \AA), было показано, что гистоновый октамер имеет ось симметрии второго порядка, так же как и сама нуклеосомная сердцевидная частица. Как и нуклеосомная сердцевина, гистоновый октамер — клиновидная частица двустороннего характера. На периферии наблюдается система гребней, образующих более или менее непрерыв-

ную спиральную борозду с внешним диаметром 70 Å и шагом около 27 Å, что делает ее весьма подходящей, чтобы служить катушкой, на которую может быть намотано примерно $1 \frac{3}{4}$ витков суперспирали ДНК (рис. 12, б).

Разрешения карты октамера недостаточно, чтобы определить отдельные гистоновые молекулы, но используя связь, существующую между октамером и суперспиральной ДНК, удается дать интерпретацию в терминах отдельных гистонов⁵⁹. В этой интерпретации использованы результаты Мирзабекова с коллегами⁶⁰ о химическом поперечном связывании гистонов и нуклеосомной ДНК, а также информация о сродстве между гистонами на основе

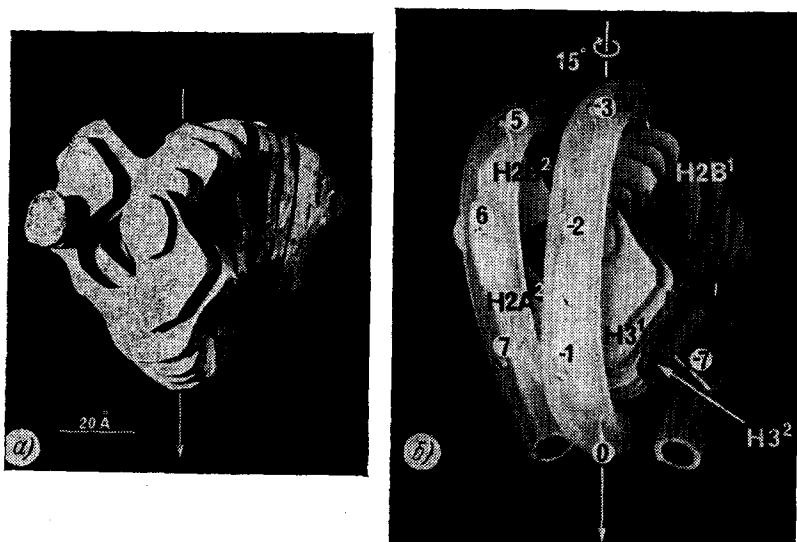


Рис. 12. а) Модель гистонового октамера, полученная реконструкцией трехмерного изображения на основе электронных микрографий⁵⁹ (отмечена ось 2-го порядка, гребни на периферии модели образуют левозакрученную спиральную борозду, в которой могут помещаться от $1 \frac{3}{4}$ до 2 витков суперспирали ДНК); б) структура гистонового октамера рис. а) с намотанными на него двумя витками суперспирали ДНК (для наглядности диаметр трубки, обозначающей ДНК, выбран меньше ее истинных размеров, расстояние вдоль ДНК обозначено номерами от -7 до +7, при этом за начало отсчета принята ось симметрии второго порядка это сделано, чтобы отразить наличие 14 повторений в двойной спирали, содержащей 146 пар оснований нуклеосомной сердцевины, расположение отдельных гистонов в соответствующих местах модели объяснено в тексте).

данных о поперечном связывании белков. Не имея трехмерной модели, эти данные нельзя надежно интерпретировать, так как знания о точках контактов гистонов с нитью ДНК не достаточно, чтобы определить пространственное расположение гистонов в нуклеосомной сердцевине. Более того, так как два суперспиральных витка ДНК расположены близко друг к другу, картина поперечных связей между гистонами и ДНК не обязательно непосредственно отражает линейный порядок гистонов вдоль цепи ДНК. Трехмерная карта плотности ограничивает число вариантов и дает возможность сделать выбор.

В предложенной пространственной картине спиральная борозда плотности на карте октамера составлена из определенной последовательности восьми гистонов, в порядке H2A — H2B — H4 — H3 — H3 — H4 — H2B — H2A, с осью симметрии второго порядка посередине. Тетрамер $(H3)_2(H4)_2$ имеет форму смешенного диска или одного витка соленоида, и он соответствует центральному витку суперспирали ДНК. Структура гистонового тетрамера объясняет результаты многих исследований, включая оригинальные наблюдения Фельсенфельда⁶¹, что H3 и H4 в отдельности, в отсутствие

H₂A и H₂B могут сообщать ДНК нуклеосомно-подобные свойства, в частности, образование суперспирали и устойчивость к расщеплению микрококковой нуклеазой, в то время как одни H₂A и H₂B этого делать не могут. Она также объясняет асимметричную диссоциацию гистонового октамера при уменьшении концентрации соли: октамер диссоциирует через промежуточный гексамерный продукт, в тетramer (H3)₂(H4)₂ и два димера H₂AH₂B^{58,62}.

в) Роль H1 и структуры высшего порядка

Эти исследования дали довольно детальную картину внутренней структуры нуклеосомы, но до 1975 г. пока еще не было ясного представления ни о связи между нуклеосомами вдоль нуклеосомной цепи или основного волокна хроматина, ни о следующем более высоком уровне организации. К тому времени уже было известно, что толщина волокон, наблюдавшихся с помощью электронного микроскопа при исследовании образцов хромосом, менялась примерно от 100 до 250 Å в диаметре в зависимости от того, использовались ли при их приготовлении хелатные агенты. Приняв это за основу, мы с Финчем поставили несколько экспериментов на коротких отрезках хроматина, приготовленных мягкой обработкой ядер микрококковой нуклеазой⁶³. В присутствии хелатных агентов естественный хроматин оказался весьма однородными волокнами диаметром 100 Å. После добавления ионов M⁺⁺ они свертывались в более толстые узловатые нити диаметром примерно 250—300 Å, которые имеют поперечные борозды с интервалом примерно 120—150 Å, очевидно, соответствующие виткам упорядоченной, но не идеально регулярной спирали. Так как термин «суперспираль» уже был использован в другом контексте, мы назвали эту структуру соленоидом, так как ее витки были расположены близко друг к другу. На основе этих микрофотографий и соответствующих рентгеновских исследований⁶⁴ мы предположили, что вторым уровнем сворачивания хроматина было закручивание нуклеосомного волокна в спиральную нить, в которой на один виток приходится 6 нуклеосом. Более того, мы обнаружили, что когда те же эксперименты проводятся с хроматином, лишенном H1, образовывались только нерегулярные комки, что указывало на то, что пятый гистон H1 был необходим для образования или стабилизации упорядоченных нитей.

Эти эксперименты показали нам, на каком уровне структурной организации хроматина H1 выполняет свою функцию, но то, как молекулы H1 способствуют сворачиванию 100 Å-волокна в 300 Å-нить, стало ясно позднее, после сопоставления данных из биохимических исследований, кристаллографического анализа и из более тонких наблюдений с помощью электронного микроскопа.

Из наблюдений над течением расщепления хроматина нуклеазой в совокупности с известной рентгеновской структурой нуклеосомной сердцевины, можно понять, где может располагаться H1 в полной нуклеосоме. Я уже упоминал, что при расщеплении хроматина микрококковой нуклеазой образуется промежуточный продукт примерно с 166 парами оснований ДНК, и именно во время перехода от 166 к 146 парам оснований высвобождается H1⁵². Так как 146 пар оснований в частице соответствуют 1 3/4 суперспиральным виткам, мы предположили, что 166 пар оснований в частице составляют два полных витка ДНК⁵⁸. При этом два конца ДНК на нуклеосоме близко сходятся друг с другом, так что оба могут быть связаны с одной и той же единственной молекулой H1 (рис. 13). Частицу, состоящую из гистонового октамера и 166 пар оснований, назвали хроматосомой⁶⁵, и как мы, так и другие исследователи предположили, что она является основным структурным элементом хроматина. Таким образом, в этой частице H1 находится сбоку от нуклеосомы в области входа и выхода суперспирали ДНК.

Такое расположение гистона H1 было выведено логически, но находится ли он действительно там? Хотя молекула H1 чрезвычайно мала, чтобы ее можно было непосредственно видеть в электронном микроскопе, о ее положении можно судить по тому влиянию, какое она оказывает на вид хроматина в промежуточном диапазоне сворачивания между 100 Å-нуклеосомным волокном и 300 Å-соленоидальной нитью. Эти промежуточные этапы были выявлены Тома и Коллером⁶⁶ в систематических исследованиях сворачивания хроматина с увеличением ионной силы. Используя в основном не двухвалентные,

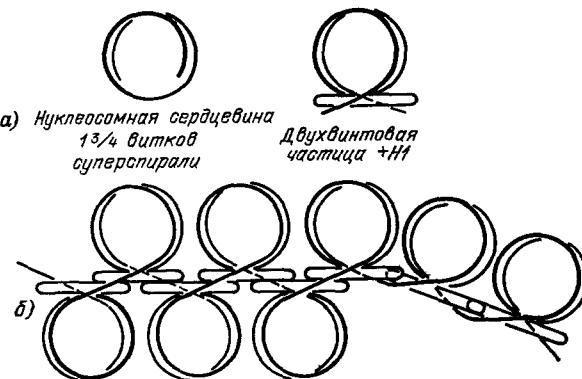


Рис. 13. а) Если 146 пар оснований ДНК в нуклеосомной сердцевине соответствуют $1\frac{3}{4}$ виткам суперспирали, то 166 пар оснований соответствуют примерно двум полным виткам суперспирали (так как частица с 166 парами оснований — минимальная, на которой удерживается гистон H1⁵², то он должен быть расположен так, как показано на рисунке); б) схематический рисунок нуклеосомного волокна при низкой ионной силе, демонстрирующий происхождение зигзагообразной структуры (см. рис. 14; в правой части рисунка показан часто наблюдаемый вариант зигзагообразной структуры: она получается поворотом нуклеосомы на 180° вокруг оси волокна).

а одновалентные соли, они выявили ряд структур, имеющих все большую степень компактности при увеличении ионной силы. Так, начиная с волокон нуклеосом при концентрациях около 1 мкмоль, степень структурирования увеличивалась через семейство промежуточных спиральных структур, пока при 60 мкмоль не образовывалась компактная 300 Å-нить, во всех отношениях подобная той, что первоначально наблюдалась Финчем и мной.

Можно вывести, где расположен H1, если рассмотреть различие в структурах, наблюдаемых при ионной силе в диапазоне 1—5 мкмоль, в присутствии и в отсутствие H1 (рис. 14). В хроматине, содержащем H1, наблюдается упорядоченная структура, в которой нуклеосомы расположены зигзагообразно, при этом их плоские поверхности лежат на подложке. Зигзагообразная форма возникает потому, что ДНК входит в нуклеосому и выходит из нее в близко расположенных местах, что можно было ожидать из сопоставления рентгеновских и биохимических данных, упомянутых в предыдущем разделе (см. рис. 13). В хроматине, лишенном H1, точки входа и выхода расположены более или менее на противоположных сторонах, но в любом случае случайно. И на самом деле, при очень низкой ионной силе, структура нуклеосомы растягивается в линейную форму, в которой уже больше не видны отдельные шарики. Если же H1 присутствует, то это не происходит. Таким образом, мы заключили, что H1 или, строго говоря, его часть, должен быть расположен в районе и стабилизировать его, где ДНК входит в нуклеосому и выходит из нее, как и было предсказано.

В зигзагообразной промежуточной форме области H1 на соседних нуклеосомах оказываются близко расположенными или касаются. Тогда мы предположили, что с увеличением ионной силы все больше областей H1

взаимодействуют друг с другом, постепенно агрегируя в спиральный полимер вдоль оси соленоида, чем и объясняется его форма. И действительно, было показано методом поперечных связей как при низкой, так и при высокой ионной силе, что полимеры H1 существуют⁶¹, но еще остается показать,

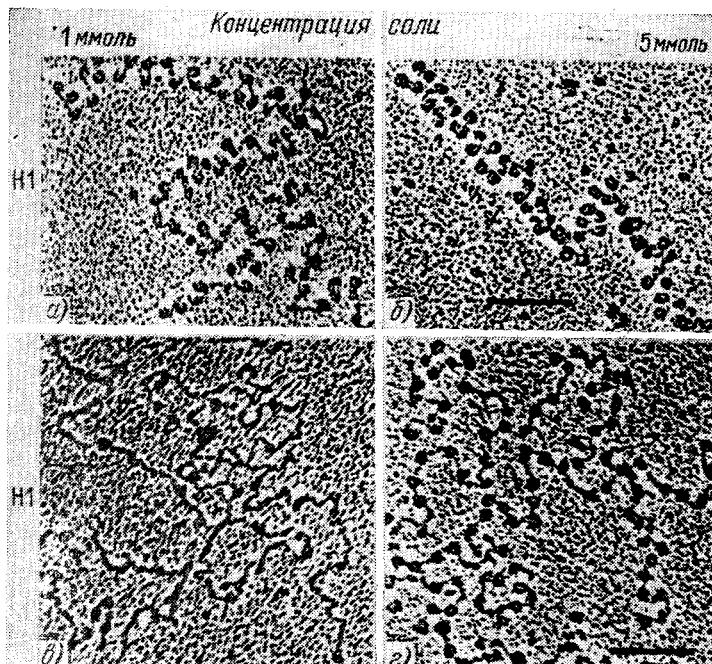


Рис. 14. Вид хроматина с гистоном H1 и без него при низкой ионной силе⁶⁶.

Когда H1 присутствует, то первой наблюдаемой упорядоченной структурой является свободный зигзаг, в котором ДНК входит в нуклеосому и выходит из нее в близко расположенных местах (а); при некоторой более высокой концентрации соли зигзаг становится более плотным (б). В отсутствие H1 порядка в смысле определенного направления волокна не наблюдается. При низкой концентрации соли нуклеосомные шарики больше не видны, структура открывается, образуя нить ДНК, покрытую гистонами (в). При более высокой ионной силе шарики заметны опять, но ДНК входит в нуклеосому и выходит из нее в более или менее случайных местах (г). Отрезок соответствует 100 нм.

что они расположены в центре нити. Однако важным моментом является то, что обнаружена агрегация H1, которая сопровождает и на самом деле может управлять образованием 300 Å-нити.

г) Р о л и г и с т о н о в

Из пространственного расположения молекул, предложенного для гистонового октамера, и их того, что известно о нахождении гистона H1, можно заключить, какие роли играют отдельные гистоны в сворачивании ДНК на нуклеосоме (рис. 15). Тетramer $(\text{H3})_2(\text{H4})_2$ грубо имеет форму одного витка соленоида, и он определяет центральный виток суперспирали ДНК; H2A и H2B пристраиваются в виде двух гетеродимеров H2A-H2B с обеих сторон H3-H4-тетрамера, каждый связывая еще по полвитка ДНК, завершая, таким образом, два витка суперспирали. Наконец, H1 связывается с той областью на двухвиточной частице, в которой сходятся три сегмента ДНК, стабилизируя и «запечатывая» нуклеосому, а также участвуя в сворачивании на следующем уровне организации. Такая временная последовательность событий дала бы структурное объяснение порядку во времени сборки гистонов на вновь синтезируемой ДНК^{68, 69, 70}.

В настоящее время мы имеем достаточно детальную модель нуклеосомы и описание следующего более высокого уровня сворачивания. Таким

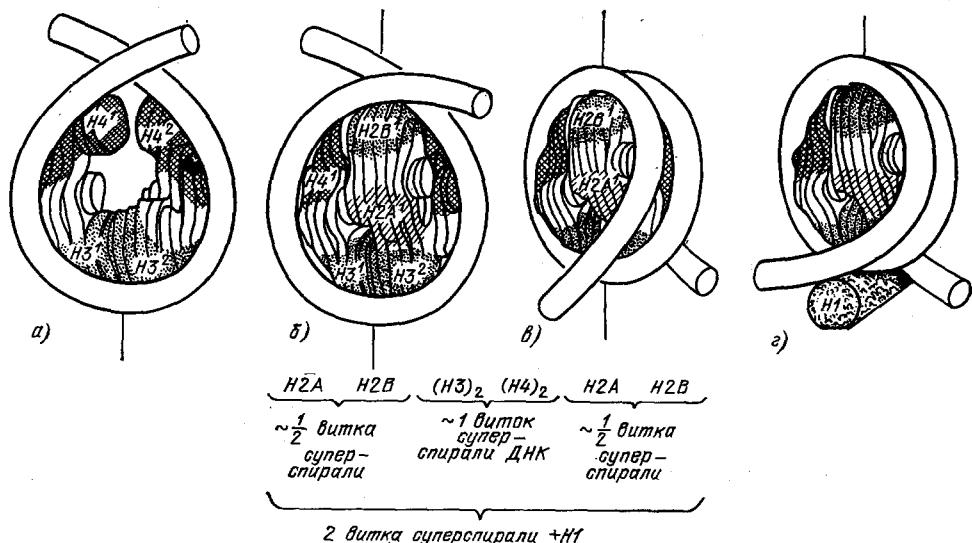


Рис. 15. «Разбитые» изображения нуклеосомы, демонстрирующие роли составляющих ее гистонов.

Пятна на гистоновом ядре указывают расположение отдельных гистоновых молекул, но так как границы между ними не известны, то они не отмечены. а) Тетрамер (H3)₂(H4)₂ имеет вид пружинной шайбы и может служить катушкой для 70—80 пар оснований ДНК, образующих примерно один суперспиральный виток; б) димер H2A. H2B связывается с одной из поверхностей тетрамера; в) каждый из димеров H2A. H2B, расположенных на противоположных поверхностях тетрамера связывает по 30—40 пар оснований ДНК или половину суперспирального витка, в результате чего образуется двухвиточная частица; г) гистон H1 взаимодействует с уникальной конфигурацией ДНК в точке ее входа и выхода, «запечатывая» нуклеосому.

образом, имеется надежная структурная и химическая основа для рассмотрения динамических процессов, протекающих в хроматине в клетке, т. е. транскрипции, репликации и митоза.

4. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Я особо хотел бы выделить работу над хроматином, потому что она может служить современным образцом структурных исследований, пытающихся соединить клеточный и молекулярный уровни. При изучении сложной системы сначала рассекают ее физически, химически или в данном случае ферментативно, а затем пытаются получить детальную картину ее частей с помощью рентгеновского анализа и химических исследований и общую картину всей системы с помощью электронного микроскопа. Однако в некотором отношении вирусы и хроматин, которые я описал в этой лекции, еще относительно простые системы. На очереди значительно более сложные системы: рибосомы, митотический аппарат, и будущие поколения осознают, что их изучение — это грандиозная задача, к которой сейчас только подступают. Я рад, что внес свою лепту в зарождение структурной молекулярной биологии.

Благодарности

Совершенно очевидно, что я не смог бы сделать всего того, что здесь было перечислено, без помощи многих высококвалифицированных и ценных коллег и сотрудников. После смерти Розалинды Франклайн я смог продолжить и развить исследование вирусов с Джоном Финчем и Кеннетом Холмсом, которые тогда были студентами, а потом стали моими сотрудниками.

В течение многих лет я поддерживал трансатлантическое сотрудничество с Дональдом Каспаром и получил много пользы от его советов, критики и интуиций. Я могу упомянуть здесь только некоторые из имен других моих сотрудников в тех областях, в которых я участвовал: в изучении химии и сборки вирусов Рейбен Леберман, Тони Дарем, Джо Батлер и Дэвид Зиммерн; в кристаллографии вирусов Уильям Лонгли, Питер Гильберт, Джон Чэмпиесс, Герард Брикон и Энн Блумер; в электронной микроскопии и реконструкции образов Дэвид Де-Розье, Харольд Эриксон, Тони Кроутер, Линда Амос, Ян Меллема, Нигел Анвин, и везде Джон Финч; в структурных исследованиях РНК-переносчика Брайан Кларк, кто заложил биохимическую основу, без которой работа не могла бы выйти в свет, Джон Робертус, Джейн Лэднер и Тони Джек; в исследовании хроматина Роджер Корнберг, чьи мастерство и интуиция превратили «туманный» проект в ясную проблему, Маркус Нолл, Лен Лютер, а также Даниэла Родес и Рэй Браун, которые плодотворно перенесли свой опыт с t-РНК на нуклеосомы и, наконец, Тим Ричмонд и Джон Финч, которые заняты в проводящихся в настоящее время рентгеноструктурных исследованиях высокого разрешения.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

ОБЗОРЫ

1. Klug A.— *The Harvey Lectures*, 1979, v. 74, p. 141.
2. Crowther R. A., Klug A.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1975, v. 44, p. 161.
3. Klug A.— *Chemica Scripta*, 1979, v. 14, p. 245.
4. Kornberg R. D.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1977, v. 46, p. 931.
Kornberg R. D., Klug A.— *Scientific American*, February 1981, v. 244, p. 48.
5. Butler P. J. G., Klug A.— In: *Horizons in Biochemistry and Biophysics*/Ed. F. Palmieri.— Wiley, 1983 (in press).

ПРОЧИЕ

6. Fraenkel-Conrat H., Williams R. C.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1955, v. 41, p. 690.
7. Fraenkel-Conrat H., Singer B.— *Biochim. and Biophys. Acta*, 1959, v. 33, p. 359.
8. Matthews R. E. F.— *Virology*, 1966, v. 30, p. 82.
9. Strubbs G., Warren S., Holmes K.— *Nature (London)*, 1977, v. 267, p. 216.
10. Holmes K. C.— *J. Supramolec. Structure*, 1979, v. 12, p. 305.
11. Schramm G., Zillig W.— *Zs. Naturforsch. Ser. b*, 1955, Bd. 10, S. 493.
12. Caspar D. L. D.— *Adv. Protein Chem.*, 1963, v. 18, p. 37.
13. Finch J. T., Leberman R., Chang Y.-S., Klun A.— *Nature (London)*, 1966, v. 212, p. 349.
14. Bricogne G.— *Acta Crystallogr. Sect. A*, 1976, v. 32, p. 832.
15. Bloomer A. C., Champness J. N., Bricogne G., Staden R., Klug A.— *Nature (London)*, 1978, v. 276, p. 362.
16. Lauffer M. A., Stevens C. L.— *Adv. Virus Res.*, 1968, v. 13, p. 1.
17. Durham A. C. H., Finch J. T., Klug A.— *Nature (London)*, New Biol., 1971, v. 229, p. 37.
18. Durham A. C. H., Klug A.— *Ibid.*, p. 42.
19. Klug A., Durham A. C. H.— *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1971, v. 36, p. 449.
20. Butler P. J. G., Klug A.— *Nature (London)*, New Biol., 1971, v. 229, p. 47.
21. Fukuda M., Ohno T., Okada Y., Otsukai Y., Taebi I.— *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1978, v. 75, p. 1727.
22. Butler P. J. G., Lomonosoff G. P.— *Biophys. J.*, 1980, v. 32, p. 295.
23. Zimmern D., Butler P. J. G.— *Cell*, 1977, v. 11, p. 455.
24. Zimmern D.— *Ibid.*, p. 463.
25. Zimmern D., Wilson T. M. A.— *FEBS Lett.*, 1976, v. 71, p. 294.
26. Champness J. N., Bloomer A. C., Bricogne G., Butler P. J. G., Klug A.— *Nature (London)*, 1976, v. 259, p. 20.
27. Butler P. J. G., Bloomer A. C., Bricogne G., Champness J. N., Graham J., Guillee H., Klug A., Zimmern D.— In: *Structure-Function Relationships of Proteins*/Ed. R. Markham, R. W. Horne: 3rd John Innes Symp.,— Amsterdam; North-Holland/Elsevier, 1976.— P. 101.

28. Lebeurier G., Micolaieff A., Richards K. E.— Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1977, v. 74, p. 149.
29. Butler P. J. G., Finch J. T., Zimmern D.— Nature (London), 1977, v. 265, p. 217.
30. Caspar D. L. D., Klug A.— Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1962, v. 27, p. 1.
31. Brenner S., Horne R. W.— Biochim. and Biophys. Acta, 1959, v. 34, p. 103.
32. Klug A., Finch J. T.— J. Mol. Biol., 1965, v. 11, p. 403.
33. Klug A., Berger J. E.— Ibid., 1964, v. 10, p. 565.
34. Klug A., DeRosier D. J.— Nature (London), 1966, v. 212, p. 29.
35. DeRosier D. J., Klug A.— J. Mol. Biol., 1972, v. 65, p. 469.
36. DeRosier D. J., Klug A.— Nature (London), 1968, v. 217, p. 130.
37. Crowther R. A., DeRosier D. J., Klug A.— Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A., 1970, v. 317, p. 319.
38. Crowther R. A., Amos L. A., Finch J. T., DeRosier D. J., Klug A.— Nature (London), 1970, v. 226, p. 421.
39. Crowther R. A., Amos L. A.— Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1971, v. 36, p. 489.
40. Unwin P. N. T.— J. Mol. Biol., 1974, v. 87, p. 657.
41. Taylor K. A., Glaeser R. M.— J. Ultrastructure Res., 1976, v. 55, p. 448.
42. Unwin P. N. T., Henderson R.— J. Mol. Biol., 1975, v. 94, p. 425.
43. Henderson R., Unwin P. N. T.— Nature, 1975, v. 257, p. 28.
44. Unwin P. N. T.— Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A., 1972, v. 329, p. 327.
45. Erickson H. P., Klug A.— Ber. Bunsenges. phys. Chem., 1970, Bd. 74, S. 1129; Phil. Trans. Roy. Soc. Ser. B, 1971, v. 261, p. 105.
46. Wilkins M.H.F., Zubay G., Wilson H. R.— J. Mol. Biol., 1959, v. 1, p. 179.
47. Luzzati V., Nicolaieff A.— Ibid., p. 127.
48. Hewish D. R., Burgoyn L. A.— Biochem. and Biophys. Res. Comm., 1973, v. 52, p. 504.
49. Noll M.— Nature (London), 1974, v. 254, p. 249.
50. Kornberg R. D., Thomas J. O.— Science, 1974, v. 184, p. 865.
51. Kornberg R. D.— Ibid., p. 868.
52. Noll M., Kornberg R. D.— J. Mol. Biol., 1977, v. 109, p. 393.
53. Finch J. T., Lutter L. C., Rhodes D., Brown R. S., Rushton B., Levitt M., Klug A.— Nature (London), 1977, v. 269, p. 29.
54. Finch J. T., Klug A.— Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1978, v. 42, p. 1.
55. Lutter L. C.— J. Mol. Biol., 1978, v. 124, p. 391.
56. Finch J. T., Brown R. S., Rhodes D., Richardson T., Rushton B., Lutter L. C., Klug A.— Ibid., 1981, v. 145, p. 757.
57. Finch J. T., Lewit-Bentley A., Bentley G. A., Roth M., Timmins P. A.— Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B, 1980, v. 2901, p. 635.
58. Thomas J. O., Kornberg R. D.— Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1975, v. 72, p. 2626.
59. Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J. T., Thomas J. O.— Nature (London), 1980, v. 287, p. 509.
60. Mirzabekov A. D., Shick V. V., Belyavsky A. V., Bavykin S. G.— Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1978, v. 75, p. 4184.
61. Camerini-Otero R. D., Felsenfeld G.— Nucleic Acids Res., 1977, v. 4, p. 1159.
62. Thomas J. O., Kornberg R. D.— FEBS Lett., 1975, v. 58, p. 353.
63. Finch J. T., Klug A.— Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1976, v. 73, p. 1897.
64. Sperling L., Klug A.— J. Mol. Biol., 1977, v. 112, p. 253.
65. Simpson R. T.— Biochemistry, 1978, v. 17, p. 5524.
66. Thoma F., Koller Th., Klug A.— J. Cell. Biol., 1979, v. 83, p. 403.
67. Thomas J. O., Khabaza A. J. A.— Eur. J. Biochem., 1980, v. 112, p. 501.
68. Worcel A., Han S., Wong M. L.— Cell., 1978, v. 15, p. 969.
69. Senshu T., Fukuda M., Ohashi M.— J. Biochem. (Japan), 1978, v. 84, p. 985.
70. Cremisi C., Yaniv M.— Biochem. and Biophys. Res. Comm., 1980, v. 92, p. 1117.
71. Klug A., Caspar D. L. D.— Adv. Virus Res., 1960, v. 7, p. 225.
72. Crowther R. C., Amos L. A.— J. Mol. Biol., 1971, v. 60, p. 123.
73. Klug A., Finch J. T.— Ibid., 1968, v. 31, p. 1.