

ANGEWANDTE CHEMIE

95. Jahrgang 1983

Heft 8

Seite 579-650

Vom Makromolekül zum biologischen Molekülverband (Nobel-Vortrag)**

Von Aaron Klug*

1. Einleitung

In einer lebenden Zelle laufen viele biochemische Prozesse ab; an fast allen sind große Moleküle wie Proteine und Nucleinsäuren beteiligt, und viele Prozesse werden von solchen Makromolekülen kontrolliert. Diese Makromoleküle üben ihre Funktionen nicht isoliert aus, sondern sie sind oft in größere geordnete Aggregate oder makromolekulare Komplexe eingebunden, die manchmal so charakteristische Formen und Funktionen haben, daß man sie als Organell bezeichnen kann. Die Eigenschaften der einzelnen Makromoleküle zeigen sich in der Zelle oft nur im Molekülverband. Einige davon habe ich in den vergangenen 25 Jahren untersucht, und sie sind das Thema meines Vortrags.

Es ist das Ziel unseres Gebiets – der strukturellen Molekularbiologie –, die Funktionsweise der biologischen Maschinerie im molekularen, das heißt chemischen Detail zu beschreiben. Dieses Forschungsgebiet nahm vor mehr als 20 Jahren – *Max Perutz* und *John Kendrew* erhielten 1962 den Nobelpreis für Chemie für die erste Aufklärung von Proteinstrukturen – seinen Anfang. Im selben Jahr wurden *Francis Crick*, *James Watson* und *Maurice Wilkins* mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie ausgezeichnet, weil sie die Struktur der DNA-Doppelhelix bestimmt hatten. In seinem Nobel-Vortrag erinnerte *Perutz* damals daran, daß sein früherer Lehrer, *Sir Lawrence Bragg*, 40 Jahre zuvor, 1922, zusammen mit seinem Vater *Sir William Bragg* den Nobelpreis für Physik für die Entwicklung der Rönt-

gen-Kristallographie, durch die man die atomare Struktur einfacher Verbindungen und kleiner Moleküle bestimmen konnte, erhalten hatte. Diese Männer waren nicht nur meine wissenschaftlichen Vorfahren, einige waren für mich auch eine Art ältere Brüder, und ich bin sehr stolz darauf, daß nun auch mir diese hohe Ehrung zuteil wurde. Denn Nucleinsäuren und Proteine sowie die Wechselwirkung zwischen ihnen zählten ebenso zu meinen wichtigsten Arbeitsgebieten wie die Entwicklung von Methoden zum Studium großer Molekülverbände, die aufgrund dieser Wechselwirkungen entstehen.

Wenn man die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Nucleinsäuren verstehen will, muß man mit einem konkreten Beispiel anfangen. Ich habe mir erstes Thema, die Struktur des Tabakmosaikvirus, nicht selbst ausgesucht. Ich hatte das Glück, die inzwischen verstorbene *Rosalind Franklin* zu treffen, als ich 1954 in *J. D. Bernal's* Institut in London eintrat. Sie führte mich in den Problemkreis der Virusstruktur ein, nachdem sie gerade ihr Arbeitsgebiet gewechselt hatte; war sie vorher mit DNA beschäftigt, so studierte sie jetzt das Tabakmosaikvirus. Die Röntgen-Strukturanalyse beider Molekülverbände war von *Bernal* 1936 begonnen worden. *Rosalind Franklin* gab mir ein Beispiel, wie man große und schwierige Probleme anpacken muß. Wäre ihr Leben nicht so kurz gewesen, hätte sie vielleicht schon an dieser Stelle gestanden.

2. Struktur des Tabakmosaikvirus

Das Tabakmosaikvirus (TMV) ist ein einfaches Virus, das nur aus einem einzigen Proteintyp und aus einem RNA-Strang besteht, der die genetische Information trägt. Die einfache Stäbchenform des TMV beruht auf seinem Bauplan, einer regelmäßigen helicalen Anordnung der

[*] Prof. Dr. A. Klug

Laboratory of Molecular Biology, Medical Research Council Centre
University Medical School
Hills Road, Cambridge CB2 2QH (England)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1983. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

Proteinmoleküle, in die ein Molekül der RNA eingebettet ist. Dieser allgemeine Strukturplan war bereits 1958 bei *Rosalind Franklins* Tod bekannt (Fig. 1). Er zeigt klar, daß die Architektur des Virus letztlich durch das Protein bestimmt wird; es ist in einer flachen Helix mit $16\frac{1}{3}$ Untereinheiten pro Windung angeordnet, und aufeinanderfolgende Windungen stehen miteinander in Kontakt. Die RNA hat von der zentralen Achse einen Abstand von 40 \AA ; sie ist somit nach außen durch eine Proteinhülle geschützt. Die Anordnung des Proteins zwingt die einsträngige RNA in eine etwas gestreckte Konfiguration. Das Virus hat in der Mitte ein zylindrisches Loch mit einem Durchmesser von 40 \AA . Wir glaubten damals, dies sei einfach die Folge der Packung des Proteins; später stellte sich heraus, daß die Röhre eine wichtige Funktion bei der Selbstorganisation des Virus spielt.

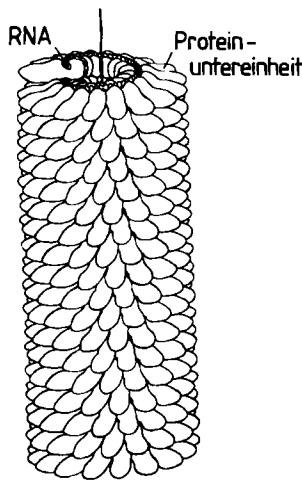


Fig. 1. Modell des Tabakmosaikvirus nach der ersten Stufe der Strukturanalyse [71]. Die Helix enthält $16\frac{1}{3}$ Proteinuntereinheiten pro Windung und drei Nucleotide pro Untereinheit. Die Länge entspricht $1/6$ des vollständigen Virusteilchens.

Auf den ersten Blick scheint das Wachstum einer helicalen Struktur wie der des TMV leicht verständlich. Jede Proteinuntereinheit hat die gleichen Kontakte mit ihren Nachbarn, so daß sich das Bindungsmuster immer wiederholt. Die Untereinheiten haben eine definierte Form, die es ihnen erlaubt, sich wie die Stufen einer Wendeltreppe zu organisieren. Die Untereinheiten könnten sich einzeln oder mehrere gleichzeitig an das Ende der wachsenden Helix anlagern; die herausragende RNA würde umhüllt, und das Virus wäre ein Stück gewachsen. Deshalb war es im nachhinein auch nicht sonderlich überraschend, als *Fraenkel-Conrat* und *Williams* 1955^[6] in ihren klassischen Experimenten zeigten, daß das TMV aus seinen isolierten Bestandteilen – Protein und RNA – wieder zusammengebaut werden kann. Durch einfaches Mischen der Komponenten bilden sich infektiöse Virusteilchen, die strukturell vom Original nicht zu unterscheiden sind. Alle Information über den Bau des Teilchens mußte folglich in seinen Komponenten bereits enthalten sein, d. h. das Virus mußte zur Selbstorganisation fähig sein. Nach späteren Versuchen^[7] ist diese Aggregation ziemlich spezifisch für

virale RNA, der Prozeß verläuft am leichtesten mit der das Hüllprotein codierenden RNA.

Dieses Bild war zwar sehr zufriedenstellend, doch gab es einige Aspekte zu Zweifeln Anlaß. Erstens zeigten andere Versuche^[8], daß fremde RNA-Moleküle in Virus-ähnliche Stäbchen eingebaut werden konnten; damit war es fraglich, ob die Spezifität in vivo wirklich bei der Selbstorganisation auftrat. Außerdem deutete die niedrige Geschwindigkeit darauf hin, daß das Modell noch unvollkommen war. Es dauerte 8 bis 24 Stunden, um eine maximale Ausbeute an fertigen Teilchen zu erhalten. Für eine Aggregation in vivo schien uns das zu langsam, weil die RNA erst am Ende des Prozesses vollkommen geschützt ist. Die Lösung dieser Probleme lag damals noch in der Zukunft; deswegen will ich jetzt erst die Strukturanalyse des Virus und des Hüllproteins beschreiben.

2.1. Röntgen-Strukturanalyse des TMV: Die Proteindoppelscheibe

Nach *Franklins* Tod führten *Holmes* und ich die Röntgen-Strukturanalyse des Virus fort. Man kann die Proben für die Röntgen-Versuche als Gele herstellen, in denen die Stäbchen parallel angeordnet, aber nach einer Zufallsverteilung um die Teilchenachse gedreht sind. Von diesen Geleien bekommt man gute Röntgen-Beugungsbilder, aber aufgrund der fehlenden kristallinen Ordnung ist die dreidimensionale Information auf zwei Dimensionen reduziert. Die Analyse dieser Daten und die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur stellten sich als größeres Unterfangen heraus. Erst 1965 erzielten *Holmes* und ich die erste dreidimensionale Elektronendichtekarte mit einer Auflösung von 12 \AA . *Holmes* wechselte 1968 nach Heidelberg, wo er kürzlich mit seinen Mitarbeitern eine Elektronendichtekarte errechnete, die teilweise eine Auflösung von 4 \AA erreicht, in anderen Bereichen aber deutlich schlechter ist^[9]. Bei einer solchen Auflösung kann man die Seitenketten einzelner Aminosäuren nicht zuverlässig erkennen, und die Unsicherheiten sind zu groß, um eindeutige atomare Modelle zu bauen. Vergleicht man jedoch diese Dichtekarte mit unserer eigenen, hochauflösten Karte der Proteinuntereinheiten (diese wurde in Cambridge berechnet, siehe unten), dann sind viele Einzelheiten der Wechselwirkung zwischen dem Protein und der RNA zu erkennen^[10].

Die Schwierigkeiten bei der Röntgen-Strukturanalyse des Virus waren vorauszusehen, und schon Anfang der sechziger Jahre wurde mir klar, daß man sie umschiffen könnte, wenn es gelänge, das Hüllprotein zu isolieren; seine Struktur müßte dann röntgenkristallographisch bestimmt und mit der schlecht aufgelösten Struktur des intakten Virus in Beziehung gesetzt werden. Wir begannen daher mit den Versuchen, die gereinigte Proteinuntereinheit zu kristallisieren. Das Protein hat eine Tendenz, zu helicalen Strukturen zu aggregieren; *Leberman* modifizierte das Protein chemisch in vielerlei Weise, um die normalen Bindungsstellen zu blockieren, doch auch die modifizierten Proteine kristallisierten nicht. Ein anderer Ansatz bestand darin, kleine Aggregate des nicht-modifizierten Proteins zu kristallisieren. Man wußte schon seit einiger Zeit – vor allem durch die Arbeiten von *Schramm* und *Zillig*^[11] –, daß das isolierte RNA-freie Protein auch anders als helical

aggregieren kann. Ich wählte Bedingungen, unter denen das Protein hauptsächlich in einer Form aggregierte, die eine Sedimentationskonstante von 4S hat und die von Caspar als Trimer identifiziert worden war^[12]. Wir bekamen fast sofort Kristalle, aber sie bestanden nicht aus den erwarteten kleinen Aggregaten, sondern aus großen mit einer Sedimentationskonstante von 20S^[13]. Die Röntgen-Strukturanalyse zeigte, daß dieses Aggregat aus zwei übereinanderliegenden Proteinringen besteht, die jeweils siebzehn Untereinheiten enthalten; wir nannten das eine Doppelscheibe (Fig. 2-4). Diese Struktur mit einem Molekulargewicht von 600 000 erschien uns anfänglich als zu groß, doch war es ermutigend, daß wenigstens die Anordnung der Proteinuntereinheiten in einer Scheibe eng mit der des Virus verwandt war. Die beiden Scheiben enthalten je siebzehn, jede Windung der viralen Helix enthält $16\frac{1}{3}$ Untereinheiten; deswegen schien es wahrscheinlich, daß die Bindungen in den Scheiben denen im Virus ähneln. Durch die Analyse von elektronenmikroskopischen Bildern zeigten wir außerdem, daß die Doppelscheibe polar war, d.h. eine Vorzugsrichtung besaß, denn beide Ringe hatte dieselbe Orientierung, ähnlich wie aufeinanderfolgende Windungen der viralen Helix.

Es war damals die größte Struktur, die mit Röntgen-Methoden im Detail untersucht wurde, und es dauerte etwa zwölf Jahre, bis sie mit hoher Auflösung bekannt war. Außergewöhnliche technische Probleme mußten gelöst werden; wir entwickelten in unserem Labor stärkere Röntgen-Generatoren und spezielle Geräte zur Datenaufnahme von Strukturen dieser Größenordnung (Röntgen-Kameras, rechnergesteuerte Film-Meßgeräte; diese Entwicklungen

waren bereits vorher in London begonnen worden, um schwach streuende Objekte wie Viren zu untersuchen). Wegen der 17fachen Rotationssymmetrie der Scheiben enthielten die Röntgen-Beugungsbilder zusätzliche Information, die wir für die Strukturanalyse ausnutzen konnten^[14]. Das half uns, die Auflösung zu erhöhen, denn die Dichtekarte beruhte anfangs nur auf einem einzigen Schweratomderivat. Die Figuren 3 und 4 zeigen Modelle des Proteins bei einer Auflösung der Karte von 2.8 Å^[15]; die Einzelheiten der Wechselwirkung mit der RNA müssen noch bestimmt werden.

2.2. Proteinpolymorphismus

Die Untersuchungen über die Struktur der Doppelscheibe zeigten, daß sie ziemlich eng mit der Virushelix verwandt ist. Damit stellte sich für mich die Frage, ob die Doppelscheibe nicht eine wichtige biologische Funktion haben könnte. Es wäre leicht gewesen, sie als zufälliges Konglomerat eines „klebrigen“ Proteins oder als eine inaktive Speicherform abzutun. Dagegen standen Caspers detaillierte Betrachtungen über den Polymorphismus des TMV-Proteins; er hatte 1963 vorausgesagt, daß einige der Aggregationsformen Hinweise auf die Funktion des Proteins enthalten^[12]. Lauffer hatte in den fünfziger Jahren mit der quantitativen Untersuchung des Aggregationsverhaltens begonnen^[16], sich jedoch auf einen ziemlich engen Bereich von chemischen Bedingungen beschränkt; das Interesse galt dem Verständnis der Kräfte, die zur Aggregation führen (Entropieeffekte stehen im Vordergrund). Wegen

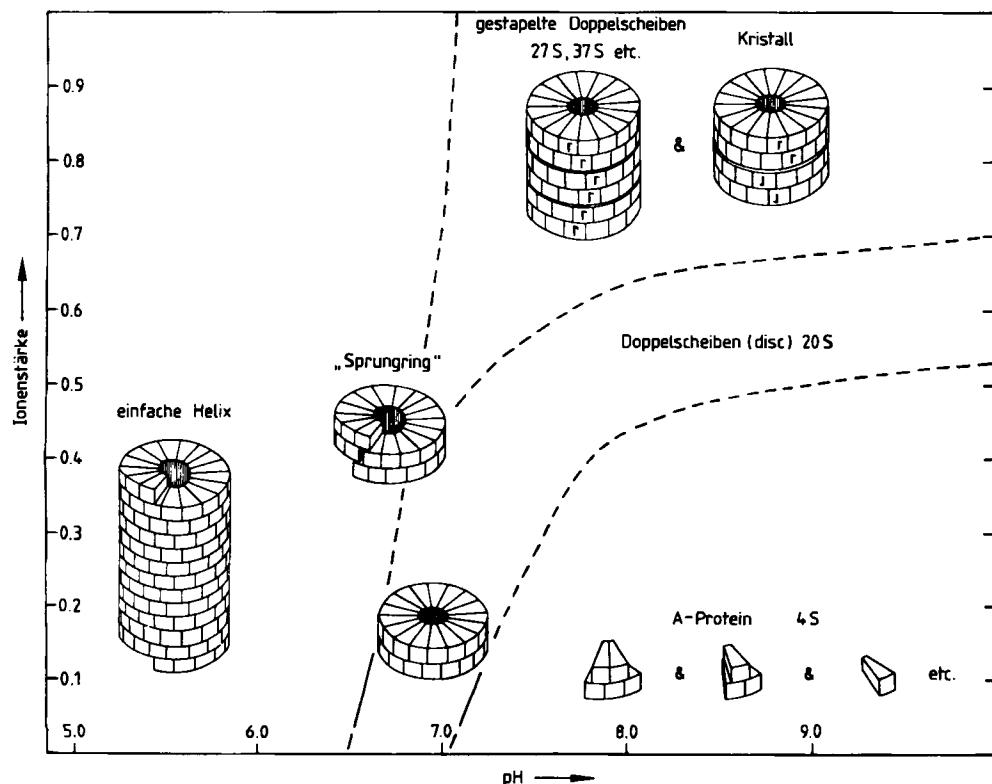


Fig. 2. Bereiche, in denen in Abhängigkeit von pH und Ionenstärke die verschiedenen Aggregationsformen des TMV-Proteins vorliegen [17]. Es handelt sich nicht um ein konventionelles Phasendiagramm. Grenzen sind dort gezogen, wo ein größeres Aggregat sichtbar wird; das bedeutet aber nicht, daß das kleinere Aggregat abrupt verschwindet. Der „Sprungring“ an der Grenze zwischen der 20S-Scheibe und der Helix ist nicht scharf definiert, er stellt einen metastabilen Zwischenzustand dar, der auftritt, wenn die Proteinscheiben durch plötzliches Senken des pH-Wertes in Helices umgewandelt werden.

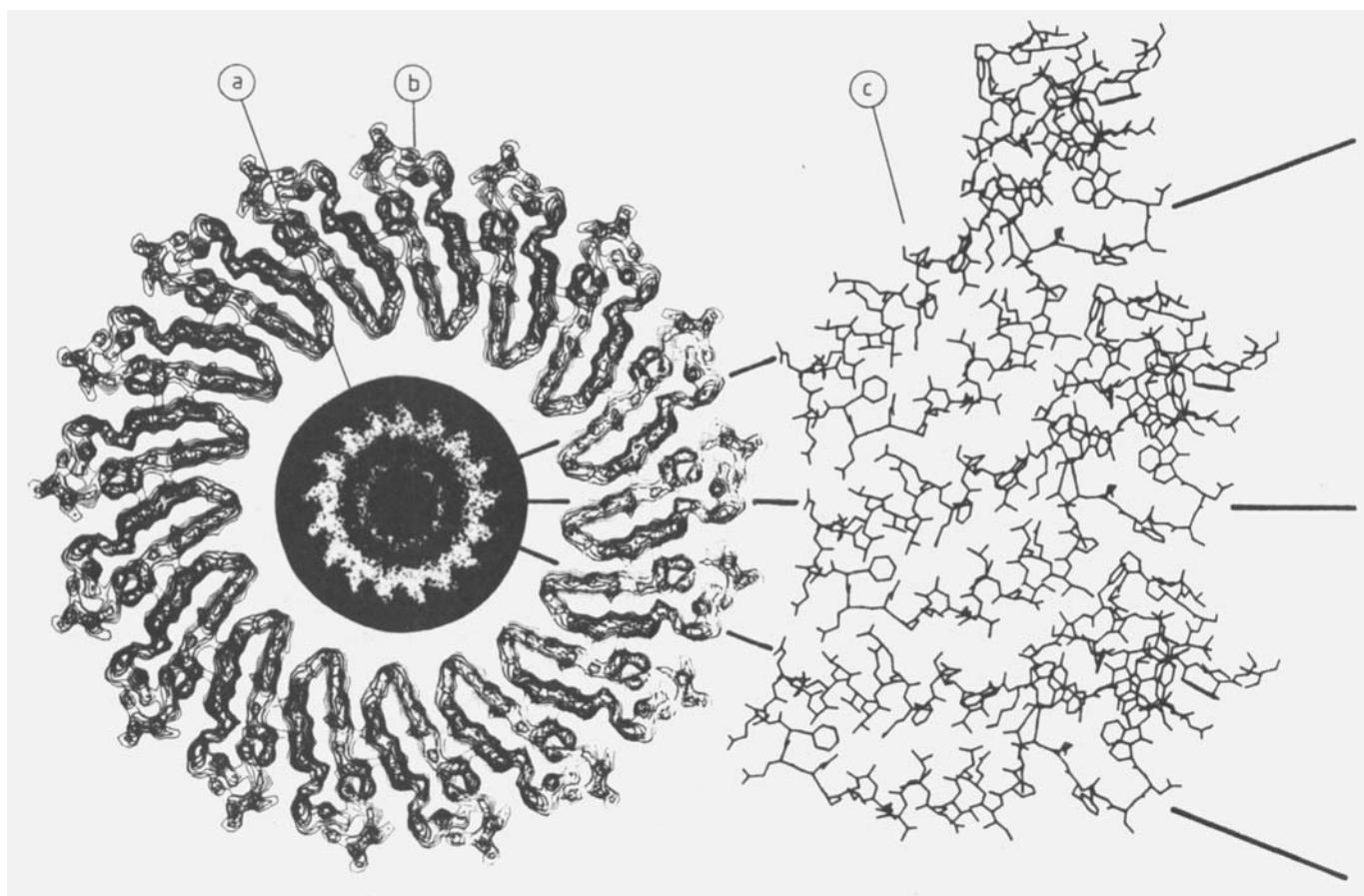
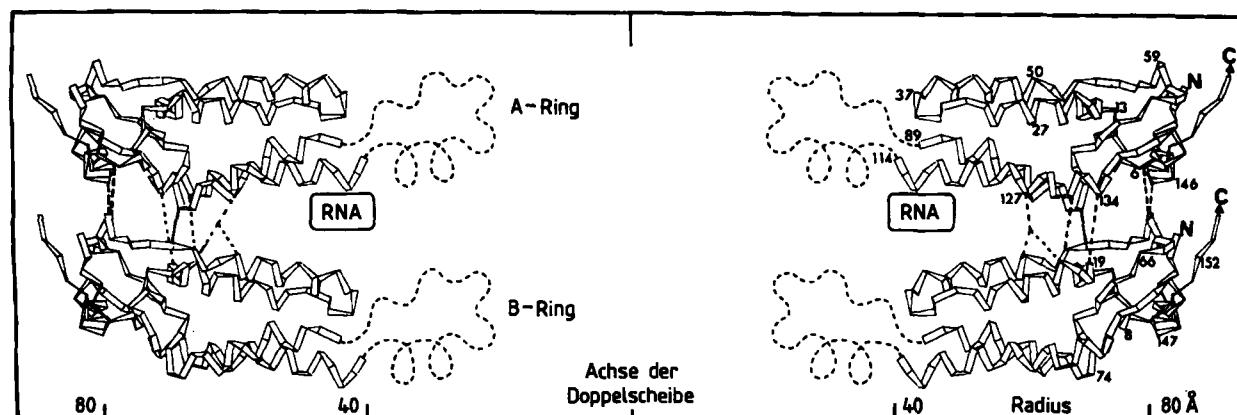


Fig. 3. Aufsicht auf die Proteinscheibe bei zunehmender Auflösung. Vom Zentrum nach außen: ④ rotationsgefiltertes elektronenmikroskopisches Bild bei etwa 25 Å Auflösung [72]; ⑤ Schnitt durch die Elektronendichtekarte bei 5 Å Auflösung, berechnet aus der Röntgenanalyse; längliche α -Helices sind sichtbar [26]; ⑥ Teil des atomaren Modells, das aus der Elektronendichtekarte bei 2.8 Å Auflösung abgeleitet wurde [15].



zeichnet man als A-Protein. Um pH 7 und etwa bei Raumtemperatur ist die bevorzugte Form die Doppelscheibe (Doppelscheibe : A-Protein $\approx 4 : 1$); das Gleichgewicht stellt sich relativ langsam ein. Somit ist der pH-Wert der entscheidende Faktor, der die Aggregation des Hüllproteins kontrolliert. Dies geschieht durch bestimmte Gruppen, nach Caspar^[12] wahrscheinlich durch Carboxygruppen, deren Affinität zu Protonen im A-Protein und in der Doppelscheibe normal ist, im helicalen Zustand aber anormal. Die helicale Struktur kann damit entweder im Virus durch die Wechselwirkung mit der RNA stabilisiert werden, oder im Fall des RNA-freien Proteins durch Protonierung der Carboxygruppen. Diese Gruppen gewährleisten, daß unter physiologischen Bedingungen keine Helix gebildet wird und daß genügend Protein als Doppelscheibe oder als A-Protein vorliegt, um zusammen mit der RNA das Virus aufzubauen.

2.3. Die Rolle der Proteindoppelscheibe

Die Proteindoppelscheibe hat mehrere wichtige Eigenschaften. Sie steht nicht nur in enger Beziehung zum Virus, sondern sie ist auch die vorherrschende Aggregationsform des Proteins unter physiologischen Bedingungen. Darüber hinaus wurden solche Doppelscheiben auch bei anderen helicalen Viren beobachtet. Dies alles festigte meine Überzeugung, daß die Doppelscheibe nicht zufällig entsteht, sondern eine Rolle bei der Bildung des Virus spielt. Wie könnte diese Rolle aussehen?

Vom Standpunkt des Physikers aus muß die Bildung jedes großen Aggregats aus identischen Untereinheiten – z. B. eines Kristalls – in zwei Stufen gesehen werden: Erst Nucleation, dann Wachstum; Biochemiker sprechen auch mitunter von Initiation bzw. Elongation. Der Prozeß der Nucleation, das Starten, ist häufig schwieriger als das Wachstum. Wenn man sich ein einfaches Nucleationsmodell vorstellt, in dem die freie RNA mit einzelnen Proteinuntereinheiten zusammentrifft, dann tauchen mehrere Probleme auf. Mindestens siebzehn Untereinheiten müßten an die flexible RNA gebunden werden, bevor sich die lineare Struktur schließen kann, um die erste Windung der Virushelix zu bilden. Diese Schwierigkeit wäre zu vermeiden, wenn die Scheibe als Schablone dienen könnte, auf der die ersten paar Windungen aufgebaut werden könnten, bis eine Größe erreicht ist, bei der die Struktur stabil ist. Diese Art der Nucleation einer Helix könnte auch einen Mechanismus bieten, mit dem das Protein seine homologe RNA erkennt. Auf der Doppelscheibe gibt es 51 (= 17×3) Nucleotidbindungsstellen, die mit einer speziellen Sequenz von Basen in Wechselwirkung treten können; dies würde zu einer verbesserten Erkennung der RNA führen, wie sie mit nur einigen wenigen Nucleotiden nicht möglich wäre. Es schien also, als erfüllte die Doppelscheibe sowohl die physikalischen als auch die biologischen Anforderungen für die Initiation der Virusbildung und für die Spezifität der Wechselwirkung. Diese Hypothese ist in Figur 5 dargestellt. Wie sich später erwies, waren alle Einzelheiten in dem Schema falsch, trotzdem war der Ansatz richtig. A. N. Whitehead bemerkte einmal, für eine neue Theorie sei es wichtiger, fruchtbar zu sein als wahr.

Der vorgeschlagene Mechanismus der Nucleation erforderte, daß sich die Doppelscheibe in zwei Windungen einer Helix umwandeln müßte, um den Anfang des wach-

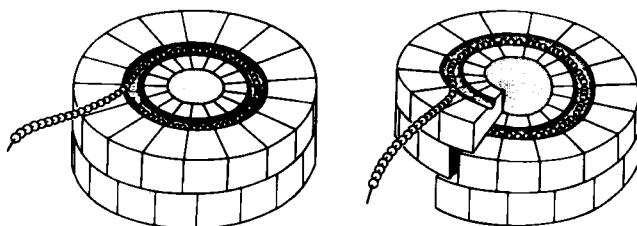


Fig. 5. Überholtes Modell für die Rolle der Proteindoppelscheibe: Eine spezielle Sequenz am Ende der RNA erkennt eine spezifische Bindungsregion im Protein (links); die Doppelscheibe wird danach (rechts) in zwei Windungen einer Helix verwandelt (vgl. aber Fig. 7, die den heute gültigen Mechanismus darstellt).

senden Stäbchens aus RNA und Protein zu bilden. Um zu prüfen, ob das möglich ist, machten wir ein sehr einfaches Experiment, den pH-Sprung^[19]. Bei einer plötzlichen Erniedrigung des pH-Wertes entstehen aus den Doppelscheiben direkt innerhalb weniger Sekunden kurze Helices („Sprungringe“, Fig. 2), die sich aneinanderlagern und Helices mit Fehlstellen bilden. Mit der Zeit verwachsen diese Aggregate zu perfekten Helices; dies geschieht *in situ*, d. h. es ist keine Dissoziation von Proteinuntereinheiten und keine erneute Assoziation notwendig. Dieses Ergebnis ermutigte uns, Versuche mit der RNA selbst, dem natürlichen Substrat des Virusproteins, anzustellen.

Die ersten Experimente zur Rekonstitution des Virus, die Butler und ich durchführten, waren überraschend erfolgreich^[20]. Wenn man die virale RNA und eine Lösung von Proteindoppelscheiben bei pH 7 mischt, entstehen innerhalb von 10 bis 15 Minuten komplettete Virusteilchen. In den früheren Rekonstitutionsversuchen^[6], in denen das Protein in seiner nichtaggregierten Form verwendet worden war, hatte dieser Prozeß Stunden gedauert.

Die Hypothese, daß Proteindoppelscheiben an der *in vivo*-Nucleation beteiligt sind, wurde durch die Ergebnisse anderer Experimente gestützt^[20], in denen RNA aus verschiedenen Quellen benutzt wurde. Dabei zeigte es sich, daß die virale RNA um mehrere Größenordnungen besser von der Proteindoppelscheibe erkannt wird als fremde RNA oder synthetische Polynucleotide einer einfachen Sequenz. Der Aggregationszustand der Doppelscheibe ist demnach notwendig, um die Spezifität der Erkennung zwischen Protein und RNA zu erreichen. Aus A-Protein und fremder RNA hatten sich Virus-ähnliche Stäbchen in saurem Milieu gebildet (siehe oben), unter Bedingungen also, unter denen das Protein allein zu helicalen Stäbchen aggregiert und jede beliebige RNA einfängt.

Wir hatten eine Beschleunigung der Nucleation durch die Proteindoppelscheibe erwartet. Zu unserer Überraschung stellte sich zusätzlich heraus, daß die Doppelscheibe auch das Wachstum beschleunigte. Wir schlossen daraus, daß die Doppelscheibe aktiv am Wachstum beteiligt ist. Dieses Ergebnis wurde von anderen Autoren in Frage gestellt und wird noch immer kontrovers diskutiert^[21, 22], aber neuere Befunde über die Konfiguration der

RNA während ihres Einbaus in das wachsende Virusteilchen (siehe Abschnitt 2.4) machen die Beteiligung der Doppelscheibe bei Nucleation und Elongation verständlich.

Die Aggregationsform der Doppelscheibe lieferte demnach die Elemente, die bei den einfachen Rekonstitutionsexperimenten mit depolymerisiertem Protein gefehlt hatten, nämlich Geschwindigkeit und Spezifität. Wir wußten also, was die Proteindoppelscheibe tut; die nächste Frage war: Wie tut sie es?

2.4. Die Wechselwirkung der Proteindoppelscheibe mit der Nucleationssequenz der RNA

Die Spezifität der Nucleation stellt sicher, daß nur die virale RNA vom viralen Protein ausgesucht und eingehüllt wird; die virale RNA muß eine charakteristische Sequenz enthalten, die mit der Proteindoppelscheibe in Wechselwirkung treten kann. *Zimmern* und *Butler* isolierten diese Nucleationsregion, indem sie die RNA mit nur wenig Doppelscheiben mischten – gerade genug für die Nucleation, aber nicht für weiteres Wachstum – und die unbedeckte RNA mit RNase verdauten^[23, 24]. Durch Veränderung des Verhältnisses von Protein zu RNA und der Verdauungsbedingungen konnten sie eine Reihe von RNA-Fragmenten isolieren, die alle eine charakteristische zentrale Sequenz mit variablen Anhängseln an beiden Seiten enthielten. Die Fragmente lagerten sich wieder an das Protein an, wenn es in der Doppelscheibenform vorlag. Unter den RNA-Stücken gab es ein Fragment, das nur etwa 60 Nucleotide enthielt; es war gerade so lang wie der Umfang einer Doppelscheibe; dies schien das kleinste RNA-Stück zu sein, das während der RNA-Verdauung geschützt ist. Wegen der starken Reassoziation dieses Fragments mit der Doppelscheibe schien es wahrscheinlich, daß es den Ursprung der Virusbildung repräsentiert, also den Ort, an dem normalerweise die Nucleation beginnt.

Die eben geschilderten Befunde werfen jedoch eine neue Frage auf: Ursprünglich hatten wir angenommen, daß sich die Nucleationsregion nahe an einem der beiden Enden der RNA befindet; das stellte sich als falsch heraus. Die Nucleationssequenz liegt etwa 1/6 der RNA-Länge vom 3'-Ende entfernt^[25], so daß mehr als 5000 Nucleotide in der Hauptsrichtung des Wachstums umhüllt werden müssen (3'-5') und 1000 Nucleotide in der entgegengesetzten Richtung. Wenn man aber die wachsenden Stäbchen aus Nucleoprotein im Elektronenmikroskop betrachtete^[20], dann fand man die freie RNA immer an einem Ende. Warum wurden nie Stäbchen mit einem Schwanz an beiden Enden beobachtet? Die Lösung dieses Rätsels ergibt sich aus der Struktur der Proteindoppelscheibe, die ich jetzt beschreiben will.

Obwohl die Struktur der Doppelscheibe im Detail erst 1977 aufgeklärt wurde, erhielten wir schon in einem früheren Stadium der Röntgen-Strukturanalyse Hinweise auf die Art der Wechselwirkung des Proteins mit der RNA. Bei einer Auflösung von $5 \text{ \AA}^{[26]}$ konnte der Verlauf der Polypeptidkette und damit das Grundgerüst der Proteindoppelscheibe aufgeklärt werden (Fig. 4). Die Untereinheiten des oberen Rings der Doppelscheibe liegen in einer Ebene senkrecht zur Achse, während die des unteren Rings leicht nach unten gekippt sind, so daß sich die beiden Ringe nur

an der Außenseite der Doppelscheibe berühren. Um das zentrale Loch herum klaffen die beiden Ringe weit auseinander, sozusagen wie geöffnete, zum Biß bereite Kiefer, die ein RNA-Stück schnappen können, wenn es durch das zentrale Loch kommt. Der Eintritt der RNA durch das Zentrum wird außerdem dadurch erleichtert, daß der innere Bereich des Proteins (etwa von der RNA-Bindungsstelle nach innen) ungeordnet und nicht regelmäßig gepackt ist.

Es sah also ganz so aus, als sei die Doppelscheibe so konstruiert, daß die RNA durch das zentrale Loch kommen kann, um sich zwischen die beiden Schichten einzulagern; gefördert wird dieser Prozeß durch die Flexibilität der inneren Proteinregion. Das sich so einlagernde RNA-Stück mußte natürlich die Nucleationssequenz sein, die ziemlich weit von beiden Enden des RNA-Moleküls entfernt ist. Das könnte dadurch erreicht werden, daß sich die RNA nahe der Nucleationssequenz faltet und als „Haarnadelschleife“ (hairpin loop) einfäldelt. Tatsächlich enthält das kleinste RNA-Fragment, das während der Nucleation gegen Nucleaseverdauung geschützt ist, eine Sequenz, die sich zu einem schwach gepaarten doppelhelicalen Stamm mit einer Schleife am Ende falten kann, vergleichbar einer Haarnadel (Fig. 6); dies Modell wurde von Zimmern vorgeschlagen^[24]. Die Schleife und das Ende des Stamms haben die ungewöhnliche Sequenz eines sich wiederholenden Motivs von drei Nucleotiden mit Guanin (G) in einer spezifischen Position und mit Adenin (A) oder manchmal Uracil (U) in den anderen beiden. Da es drei Nucleotidbindungsstellen pro Proteinuntereinheit gibt, sorgt die Wiederholung dieser Triplets dafür, daß eine bestimmte Base auf eine bestimmte Stelle des Proteins trifft. Dies führt zur Erkennung der RNA-Schleife durch die Doppelscheibe während der Nucleation.

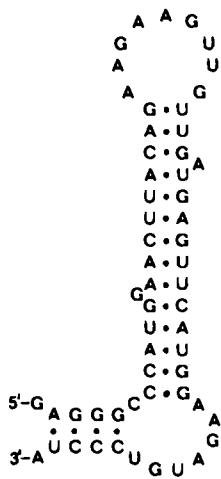


Fig. 6. Modell für die Sekundärstruktur der RNA in der Nucleationsregion [24]. Es zeigt einen schwach gepaarten doppelhelicalen Stamm und eine Schleife am Ende, die wahrscheinlich der Ursprung der Aggregation ist. Die Basensequenz in der Schleife zeigt ein periodisches Motiv von drei Basen, das in der Mittelposition G enthält und A oder U in den Außenpositionen.

2.5. Nucleation und Wachstum

Unser Nucleationsmodell^[27] sah also folgendermaßen aus: Eine RNA-Haarnadelschleife wird durch das Loch in die Doppelscheibe eingefädelt und zwischen den beiden

Schichten eingelagert (Fig. 7); alle Abmessungen passen dafür gut, so daß die RNA-Schleife schließlich an die RNA-Bindungsstellen des Proteins gebunden werden kann. Im Laufe dieses Prozesses öffnet sich der instabile doppelhelicale Stamm der RNA, so daß sich weitere RNA zwischen die Ringe der Proteinscheibe einlagern kann. Auf

Für unser Nucleationsmodell gibt es jetzt jedoch klare experimentelle Beweise. Ihm zufolge ragen beide Schwänze der RNA aus einem Ende des wachsenden Nucleoproteinstäbchens heraus; einer dieser RNA-Schwänze kommt direkt von diesem Stäbchenende, während der andere vom wachsenden anderen Ende des Stäbchens durch

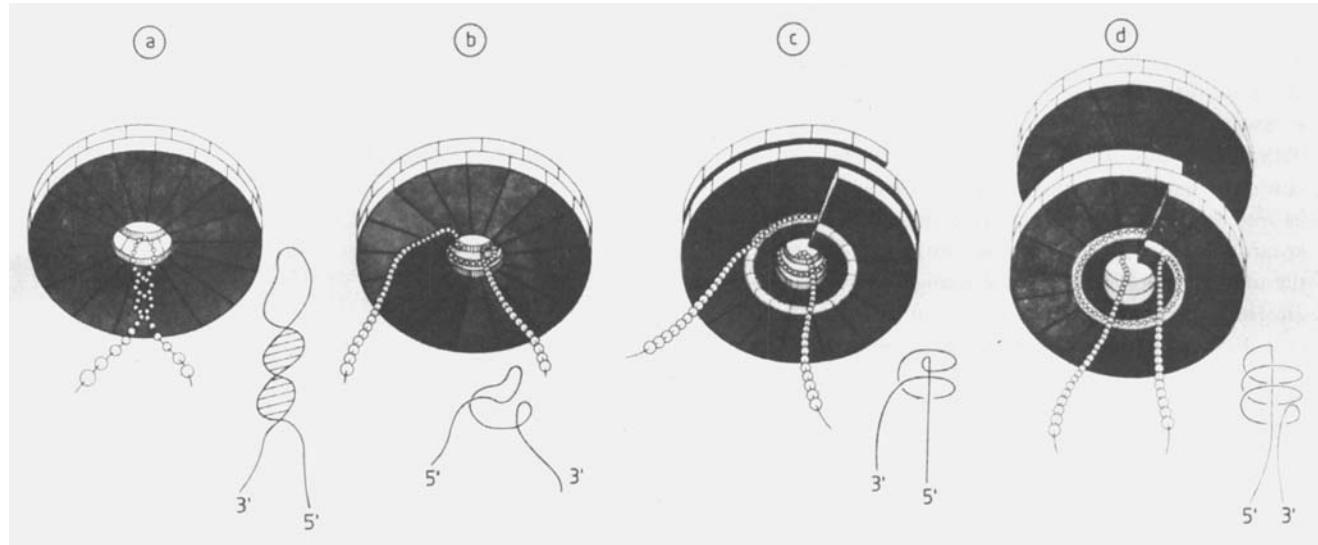


Fig. 7. Nucleation des Virus: Sie beginnt mit dem Eintritt einer Haarnadelschleife der RNA (siehe Fig. 6) in das zentrale Loch der Proteindoppelscheibe und zwischen die beiden Schichten von Untereinheiten **a**. Der obere Teil der Schleife bindet an das Protein und öffnet den doppelhelicalen Stamm **b**; dabei lagert sich die Doppelscheibe in eine kurze Helix um **c**. Damit schließt sich die Öffnung zwischen den beiden Ringen, und die RNA sitzt fest; das ist der Anfang der Nucleoprotein-Helix, die dann schnell bis zu einer minimalen stabilen Größe weiterwachsen kann **d**.

irgendeine – bisher unbekannte – Weise veranlaßt diese Wechselwirkung die Doppelscheibe, sich in eine kurze Helix umzulagern, die die RNA endgültig festhält; nach der schnellen Anlagerung weiterer Doppelscheiben^[23] entsteht so die erste stabile Einheit des Nucleoproteintäbchens.

Die Vorgänge nach der Nucleation können als Wachstum bezeichnet werden. Wie in Abschnitt 2.3 erwähnt, sind die Einzelheiten dieses Prozesses noch umstritten. Wir nehmen an, daß das Virus wahrscheinlich durch Anlagerung von weiteren Proteindoppelscheiben wächst, wie wir schon aus den anfänglichen Rekonstitutionsexperimenten schlossen. Die spezielle Anordnung, die während des Einfädelns der RNA-Schleife entsteht, bleibt während des Wachstums bestehen, indem die RNA immer weiter durch das zentrale Loch hochgezogen wird (Fig. 7). Deshalb müßte das Wachstum im Wesentlichen ähnlich wie die Nucleation verlaufen; allerdings ist jetzt keine spezielle Nucleationssequenz der RNA mehr notwendig, sondern eine „wandernde Schleife“, die jeweils zwischen die Ringe der nächsten Doppelscheibe paßt. Mit diesem Mechanismus lösen wir das schwierige Problem, wie eine komplette Doppelscheibe mit all ihren Untereinheiten beim Helixwachstum mit der RNA in Wechselwirkung tritt. Es gibt inzwischen weitere Hinweise, daß ganze Blöcke von Untereinheiten, ungefähr von der Größe einer Doppelscheibe, auf einmal eingebaut werden^[22]; da aber das Thema noch kontrovers diskutiert wird, will ich mich hier nicht weiter damit beschäftigen.

die zentrale Röhre zurückläuft. Die Gruppe von *Hirth* in Straßburg hat wachsende Stäbchen elektronenmikroskopisch untersucht, bei denen die RNA durch partielle De-naturierung entfaltet ist; viele Teilchen zeigen zwei RNA-Schwänze am gleichen Ende^[28]. Meine Kollegen in Cambridge haben durch hochauflösende Elektronenmikroskopie gezeigt, daß die beiden Schwänze an ihrer Form unterschieden werden können, und daß der längere tatsächlich durch das wachsende Teilchen läuft^[29]. Weitere Experimente ergaben, daß die Faltung der RNA einen wesentlichen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit hat^[29].

2.6. Physikalische und biologische Anforderungen an die Struktur der Doppelscheibe

Wir haben gesehen, daß die Proteindoppelscheibe für die Selbstorganisation des TMV eine Schlüsselfunktion einnimmt. Die Proteinuntereinheit ist so gebaut, daß sie nicht eine unendliche Helix bildet, sondern eine in sich geschlossene, zweischichtige Variante davon, die Doppelscheibe, die zwar stabil ist, sich aber doch leicht in die helicale Form („Sprungring“) umwandeln kann. Die Doppelscheibe ist eine Zwischenstufe im Aggregationsprozeß, die den – von der Entropie her gesehen – schwierigen Schritt der Nucleation der Helix einleitet. Die Nucleation über die Doppelscheibe ermöglicht auch die Erkennung der homologen viralen RNA (und den Ausschluß fremder RNA), indem eine lange Sequenz von Nucleotidbindungsstellen

mit einer speziellen Sequenz der RNA reagieren kann. Die Doppelscheibe ist deshalb eine notwendige Zwischenstufe beim Bildungsprozeß des Virus; sie erfüllt zugleich die physikalische Bedingung der Nucleation und die biologische Bedingung für spezifische Erkennung der RNA. Das TMV baut sich also ohne Einwirkung von außen auf (self-assembling), auch die Einleitung dieses Prozesses bedarf keines äußeren Stimulus (self-nucleating), und schließlich kontrolliert sich auch der Aggregationsprozeß selbst (self-checking).

Man kann mehrere Lehren aus dem Verlauf der TMV-Aggregation ziehen^[11]. Zwischen dem Bauplan einer fertigen Struktur und dem eigentlichen Bauvorgang ist streng zu unterscheiden. Das TMV sieht zum Beispiel aus wie ein helicaler Kristall und könnte durch einfache Anlagerung von einzelnen Untereinheiten gebaut werden; tatsächlich ist der Bauvorgang aber viel komplizierter und geht sehr kontrolliert vorstatten. Weiterhin zeigt sich, wie eng Struktur und Funktion aufeinander bezogen sind, und wieviel ein einziges Proteinmolekül zu leisten vermag. Die Evolution hat einen ausgeklügelten Mechanismus hervorgebracht, um die Selbstorganisation effizient und zielgerichtet zu gestalten, und wir verstehen jetzt die Grundlagen dieses Vorgangs. Wir können daraus schließlich die allgemeine Lehre ziehen, daß die Natur zwar immer wieder unseren eingefahrenen Vorstellungen zuwiderhandelt, uns aber genügend Hinweise gibt, um die Rätsel am Ende doch zu lösen. Einstein pflegte es folgendermaßen auszudrücken: „Raffiniert ist der Herrgott, aber bösartig ist er nicht“.

3. Kristallographische oder Fourier-Elektronenmikroskopie

1955 begannen Finch und ich in London und Caspar, damals in Cambridge, mit der Kristallstrukturanalyse von sphärischen Viren. Diese waren zuvor von Bernal und seinen Mitarbeitern kurz vor und nach dem Krieg untersucht worden, und zwar mit Röntgen-Pulverdiagrammen. Finch und ich arbeiteten am „Turnip Yellow Mosaic Virus“ (TYMV) und seiner leeren Proteinhülle, Caspar am „Tomato Bushy Stunt Virus“ (TBSV). Crick und Watson hatten vorausgesagt, daß sphärische Viren eine kubische Symmetrie haben, und wir zeigten, daß beide Viren Ikosaeder waren. Als Finch und ich später fanden, daß auch das Poliovirus diese Symmetrie hat, begriffen wir, daß hier ein generelles Prinzip zum Vorschein kam; dies führte schließlich dazu, daß Caspar und ich unsere Theorie der Struktur der Virushülle formulierten^[30].

Als meine Forschungsgruppe 1962 nach Cambridge umzog, wandten wir uns der Elektronenmikroskopie zu, weil man mit dieser Methode schnell neue Probleme angehen und mit ihr ein direktes Bild erzeugen kann; so dachten wir jedenfalls damals. Mit der Theorie der Virusstruktur und einigen Röntgen-Strukturdaten in der Hand hatten wir eine Vorstellung, wie Viren konstruiert sein könnten; wir erwarteten, die Details mit der Elektronenmikroskopie herauszufinden. Wir wußten zwar, wonach wir in den Bildern suchten, doch wurde uns schnell klar, daß wir überhaupt nicht verstanden, was wir in den Bildern sahen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren

nicht einfach Abbildungen der Proben, und wir erkannten rasch die Grenzen der Elektronenmikroskopie. Erstens gab es Artefakte bei der Präparation und Strahlenschäden während der Beobachtung. Zweitens mußte der Kontrast künstlich erhöht werden, weil die meisten Atome in biologischen Proben eine zu niedrige Ordnungszahl haben, um selber einen hinreichenden Kontrast zu erzeugen. Drittens hängt die Abbildung von der Einstellung des Elektronenmikroskops ab, z. B. vom Fokus und von den Aberrationen. Vor allem ist die Tiefenschärfe des Mikroskops so groß, daß alle Strukturen längs der Richtung des Elektronenstrahls übereinander abgebildet werden. Schließlich tritt bei stark streuenden oder zu dicken Proben Vielfachstreuung innerhalb der Probe auf, so daß keine einfache Beziehung mehr zwischen Bild und Objekt besteht.

Tabelle 1. Einige Anwendungen der Elektronenmikroskopie kombiniert mit Bildrekonstruktion im Medical-Research-Council (MRC)-Laboratorium für Molekularbiologie in Cambridge zwischen 1964 und 1979.

Viren und ihre Bestandteile	Organellen	Enzyme
helicale Viren Tabakmosaikvirus (TMV) TMV-Proteindoppelscheibe Paramyxoviren	Mikrotubuli aus Geißeln und Gehirn; Tubulin-„Sheets“	Glutamat-Dehydrogenase
ikosaedrische Viren Polyomavirus Warzenvirus „Tomato Bushy Stunt Virus“ „Turnip Yellow Mosaic Virus“ R 17, Nudaurelia CPMV	Muskelfilamente: Actin, Actin + Tropomyosin, Actin + Myosin + Tropomyosin „Tomato Bushy Stunt Virus“ „Turnip Yellow Mosaic Virus“ Bakteriengeißeln; Bakterienzellwände	Katalase, kristalline und tubuläre Aggregate
Adenovirus-Hexon anomale hexagonale und pentagonale Polyomaröhren	kristalline Ribosomen	Sichelzell-Hämoglobin
Phage T2 und T4 Kopf und röhrenförmige Varianten (Polyheads) Schwanz: kontraktile Scheide und hohler Stift; Endplatte	Chromatin: Kristalle des Nucleosomrumpfes; Histon-Octamere	Purpur-membran (Bacteriorhodopsin)
	Membranproteine (gap junction)	Cytochrom-Oxidase

Aus diesen Gründen ist das Detail, das man im Bild sieht, oft unzuverlässig und nicht ohne weiteres interpretierbar, wenn man nicht Korrekturen für die Aufnahmeverhältnisse des Mikroskops einführt und die Bildkomponenten, die von den verschiedenen Schichten der Probe kommen, voneinander trennt. Außerdem ist es wichtig abzuschätzen, wie gut die Probe im Einzelfall erhalten ist. Die Methoden für die Analyse von elektronenmikroskopischen Bildern habe ich mit meinen Mitarbeitern über etwa zehn Jahre hinweg entwickelt. Das Ziel war es, ein Maximum an zuverlässiger Information über die zwei- und dreidimensionale Struktur des Objekts aus dem Bild herauszufiltern. Anwendungsbeispiele, die im Medical-Research-Council-Laboratorium in Cambridge in den letzten fünfzehn Jahren untersucht wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Elektronenmikroskopie kombiniert mit Bildrekonstruktion, möglichst unterstützt durch Röntgen-Strukturuntersuchungen an hydratisiertem, intakten Material, hat es uns ermöglicht, Modelle für die Struktur vieler biologischer Systeme zu entwickeln, die heute allgemein anerkannt sind (Tabelle 1). Hier will ich nur eine beschränkte

Zahl von Beispielen geben, die die Möglichkeiten der verschiedenen Techniken und die Art der Ergebnisse demonstrieren. Die Theorie und die Methoden sind anderswo ausführlicher beschrieben^[2,3], aber ich möchte hier betonen, daß die Verfahren immer im Zusammenhang mit der Lösung konkreter Probleme ausgearbeitet wurden; trotzdem sind sie sehr allgemein anwendbar.

3.1. Zweidimensionale Rekonstruktion: digitale Bildverarbeitung mit Computern

Unsere Untersuchungen begannen wir an den sphärischen und helicalen Viren, die wir mit dem Negativkontrastverfahren darstellten, das kurz zuvor von *Huxley* sowie von *Brenner* und *Horne* eingeführt worden war^[31]. Bei dieser Methode ist die Probe in eine dünne amorphe Schicht eines Schwermetallsalzes eingebettet, das einerseits die Probe schützt, andererseits ihre Konturen nachzeichnet, da es in diese nicht eindringen kann. Man konnte viele Details erkennen, aber in den meisten Fällen wußte man nicht, wie man sie interpretieren sollte. Viele Leute hielten einfach die Ordnung der Proben für zerstört, weil sie glaubten, daß der Negativkontrast sozusagen nur einen Abdruck des Teilchens hinterließ. Wir begriffen allmählich, daß die mangelnde Klarheit der Bilder nicht so sehr auf der Verzerrung durch das Metallsalz beruhte, sondern auf der Überlagerung von Strukturen der Vorder- und Rückseite der Probe. Mit anderen Worten, das Kontrastmittel hüllte das ganze Teilchen ein und bildete eine Gußform statt nur eines Abdrucks. Diese Interpretation wurde mit zwei Methoden bewiesen. Erstens konnten wir im Fall der sphärischen Viren Modelle bauen und ihre Projektion berechnen und auf verschiedene Weise darstellen; dies er-

klärte die meisten der vorher nicht interpretierbaren Bilder^[32]. Die Eindeutigkeit des Modells wurde dadurch bewiesen, daß man es ebenso wie die Probe im Elektronenmikroskop über große Winkel kippte (vgl. Fig. 10 und^[73]). Zweitens wurde das Verfahren auf helicale Strukturen angewendet, weil sie längs der Achse periodisch sind und sich daher für eine direkte Bildanalyse eignen; dies will ich im folgenden beschreiben.

Figur 8a ist ein elektronenmikroskopisches Bild eines negativ kontrastierten Präparats eines „Polyhead“, einer Variante des Kopfes des Bakteriophagen T4, die hauptsächlich aus dem Kopfprotein besteht. Das Teilchen ist flachgedrückt, so daß die ursprüngliche Röhrenform verloren ging. Das Bild zeigt deutlich einige Periodizitäten, aber man kann sie schwer auseinanderhalten, und jede Interpretation würde sehr subjektiv ausfallen. Mir wurde klar, daß das optische (Fraunhofer-)Beugungsbild des Originals es erlauben würde, alle im Bild enthaltenen Periodizitäten zu analysieren^[33]. Dies ist in Figur 8b dargestellt. Man erkennt deutliche Beugungsmaxima. Sie fallen in zwei Klassen, die von der Vorder- bzw. Rückseite des Präparats kommen. So wurde bewiesen, daß die Negativkontrastierung das vollständige Teilchen abbildet und nicht nur ein Abdruck einer Seite ist^[33]. Da wir es mit einer helicalen periodischen Struktur zu tun haben, liegen die Beugungsmaxima auf einem Gitter und repräsentieren so echte Perioden, die in der Struktur vorhanden sind. In diesem Fall reichen die Beugungsmaxima bis zu einer Auflösung von 20 Å; d.h. die Ordnung des Präparats war bis zu dieser Auflösung über lange Strecken erhalten. Das genügt, um einzelne Proteinmoleküle sichtbar zu machen.

Obwohl die Bilder wegen der Überlagerung der beiden Seiten des Teilchens verwaschen sind, kann jede Seite ein-

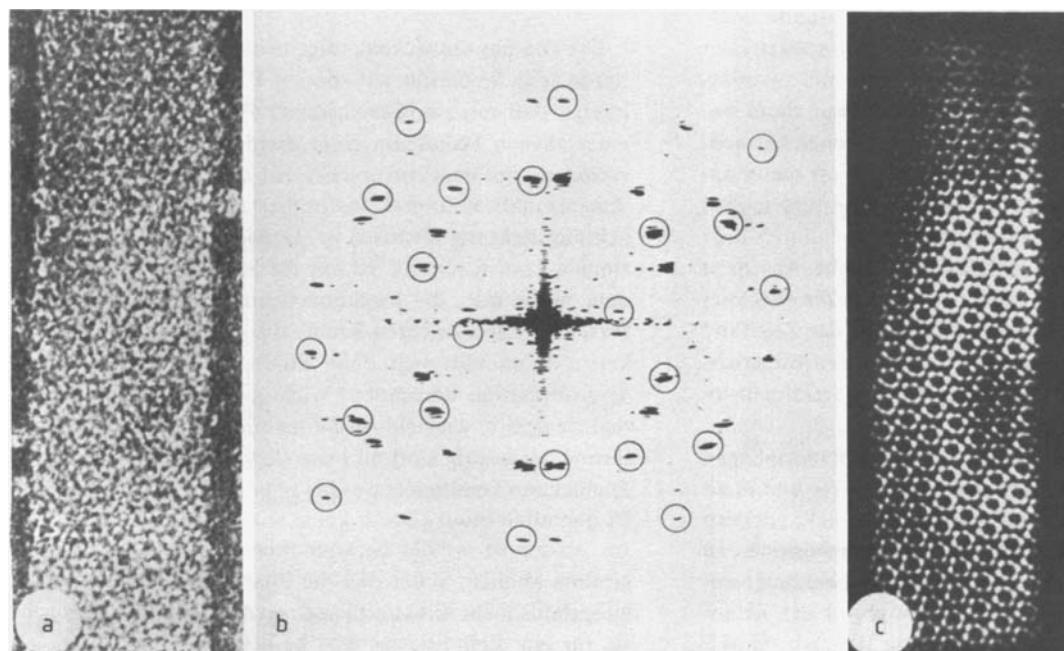


Fig. 8. Optische Diffraktion und Bildfilterung eines röhrenförmigen „Polyheads“, der aus dem Hauptprotein des Kopfes des Bakteriophagen T4 besteht [35]. (a) Elektronenmikroskopisches Bild eines negativ kontrastierten und abgeflachten Teilchens, Vergrößerung: 200000fach. (b) Optisches Beugungsbild von (a); die Kreise zeigen die Reflexe, die von einer Schicht der Struktur kommen. (c) Gefiltertes Bild von (b), hergestellt mit der Filtermaske aus (b). Die Öffnungen der Maske sind so gewählt, daß sich die Mittelung nur lokal über wenige Untereinheiten erstreckt. Man erkennt Einzelmoleküle, die in Hexameren angeordnet sind.

zeln herausgefiltert werden, wenn man eine Maske über das optische Beugungsbild legt, die nur die Reflexe dieser Seite durchläßt^[34]. Das gefilterte Bild (Fig. 8c) läßt sich sofort interpretieren, und man erkennt die Anordnung der einzelnen Proteinmoleküle^[35].

Die Klarheit des so verarbeiteten Bildes liegt zum Teil daran, daß das Untergrundrauschen ebenfalls herausgefiltert wurde. Das Rauschen kommt von den Unterschieden zwischen den Molekülen im Präparat, d.h. von der Unordnung, und dieser Beitrag macht sich überall im Beugungsbild bemerkbar. Effektiv wurde das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert, indem man über viele Moleküle gemittelt hat. Die Mittelung über viele Kopien eines periodischen Motivs ist der wesentliche Punkt der besten Methoden, die bisher zur Analyse biologischer Präparate entwickelt wurden, und auch die dreidimensionalen Methoden, auf die ich später kommen werde, beruhen darauf.

Die Bildanalyse der eben beschriebenen Art besteht aus zwei Hauptstufen. Zunächst stellt man die Fourier-Transformierte des ursprünglichen Bildes her. Die Fourier-Koeffizienten werden dann sortiert oder korrigiert und dann rücktransformiert; damit erhält man das rekonstruierte Bild. Für diese Schritte benutzt man einen Computer; die von *DeRosier* und mir eingeführte Methode der digitalen Bildverarbeitung^[36] ist sehr viel flexibler als unsere ursprüngliche optische Methode und kann auch bei dreidimensionalen Verfahren angewendet werden.

3.2. Dreidimensionale Bildrekonstruktion

Das erste, im vorigen Abschnitt schon erwähnte Beispiel (Fig. 8) ist relativ einfach; im Wesentlichen sind nur die Beiträge zweier überlappender Schichten voneinander zu trennen. Wir haben gesehen, daß die Methode der Fourier-Analyse eine Überlagerung im reellen Raum in unterschiedliche Klassen von Reflexen im Fourier-Raum überführt. Schon von der einfachen Analyse der sphärischen Viren war aber klar, daß man ein eindeutiges und zuverlässiges Bild der dreidimensionalen Struktur nur dann bekommt, wenn man das Teilchen von vielen Seiten betrachtet^[32]. Unterschiedliche Blickrichtungen sind oft schon dadurch möglich, daß die Teilchen in der Probe verschieden orientiert sind. Man erreicht das Ziel aber auch durch Kippen der Probe im Elektronenmikroskop (siehe Abschnitt 3.1). Anfangs hatten wir Modelle gebaut, um die verschiedenen Ansichten zu interpretieren. Im Lauf der Zeit fand ich eine Methode, Bilder aus unterschiedlichen Blickrichtungen objektiv so zu kombinieren, daß eine dreidimensionale Rekonstruktion entsteht.

Als *DeRosier* und ich den Schwanz des Bakteriophagen T4 untersuchten, zeigte unsere Analyse, daß das Bild nicht nur Beiträge der Vorder- und Rückseite enthielt, sondern auch der inneren Struktur^[36]. Um in drei Dimensionen zu arbeiten, mußte eine allgemeinere Form der zweidimensionalen Filterung entwickelt werden. Aufgrund der Erfahrungen mit der Röntgen-Strukturanalyse kam ich darauf, daß wir eine dreidimensionale Fourier-Synthese brauchten. Bei der Analyse der Röntgen-Beugungsbilder des TMV hatte ich die Idee, eine helicale Struktur mathematisch aus einem Satz von Zylinderfunktionen aufzubauen; es gibt eine Beziehung zwischen der Zahl der Funktionen

und der Zahl der verschiedenen Ansichten. Jede neue Ansicht ergibt neue Funktionen von höherer Raumfrequenz, so daß man mit hinreichend vielen Ansichten die vollständige Struktur ermitteln kann. Später sahen wir^[36], daß diese Synthese nur ein Sonderfall eines allgemeinen Theorems ist, das die Kristallographen als Projektionstheorem kennen.

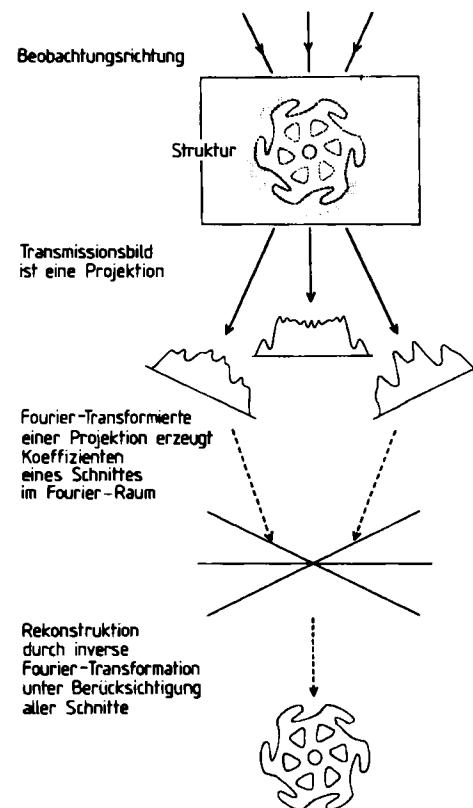


Fig. 9. Allgemeines Schema für die dreidimensionale Rekonstruktion eines Objekts aus einer Schar von zweidimensionalen Projektionen [36].

Die von uns entwickelte allgemeine Rekonstruktionsmethode (Fig. 9) beruht auf diesem Projektionstheorem. Es besagt, daß die zweidimensionale Fourier-Transformierte einer ebenen Projektion einer dreidimensionalen Dichteverteilung mit dem entsprechenden Schnitt durch die dreidimensionale Fourier-Transformierte senkrecht zur Beobachtungsrichtung identisch ist. Daher kann die dreidimensionale Transformierte Schnitt für Schnitt aufgebaut werden, wenn man die zweidimensionalen Transformierten verschiedener Ansichten kennt; die dreidimensionale Rekonstruktion läßt sich dann durch die inverse Fourier-Transformation berechnen. Wichtig ist bei der Methode, daß sie angibt, wieviele Ansichten für eine bestimmte Auflösung notwendig sind und wie sie zur dreidimensionalen Dichtekarte kombiniert werden müssen^[36, 37]. Die Methode ist quantitativ und enthält keine willkürlichen Annahmen. Im Ansatz ist sie der herkömmlichen Röntgen-Kristallographie ähnlich, außer daß die Phasen des Röntgen-Beugungsbilds nicht direkt gemessen werden können, wogegen sie für ein digitalisiertes Bild berechenbar sind. Gäbe es keine Strahlenschäden, könnte man die notwendigen Ansichten von einem einzigen Teilchen unter Verwendung eines Elektronenmikroskops mit Kippbühne aufnehmen. In der Praxis muß man mehrere Teilchen in verschiedenen, aber identifizierbaren Orientierungen verwenden. Im allge-

meinen ist es sogar wünschenswert, Daten von mehreren Teilchen zu kombinieren, um Fehlordnungen herauszumiteln.

Die Fourier-Analyse ist nur eine von mehreren Methoden, das mathematische Gleichungssystem zu lösen, das die unbekannte dreidimensionale DichteVerteilung mit den bekannten Projektionen unter verschiedenen Richtungen miteinander verbindet^[37]; sie stellte sich jedoch als das beste Verfahren heraus und wird deshalb auch bei der Computer-Tomographie verwendet. Die Fourier-Methode hat außerdem den Vorteil, daß sie in mehreren Stufen durchgeführt wird: Erst wird die zweidimensionale Transformierte berechnet, dann die dreidimensionale Transformierte aufgebaut; damit ist es möglich, die Daten zu beurteilen, auszuwählen und zu korrigieren, bevor sie für die endgültige Rekonstruktion verwendet werden. Die Methode haben wir in der Zwischenzeit häufig angewendet.

Das erste Beispiel war der Schwanz des Bakteriophagen T4, das Problem, das am Ausgangspunkt unserer Untersu-

chungen stand. Bilder von Teilchen mit helicaler Symmetrie sind am einfachsten zu rekonstruieren, weil sie aus einer einzigen Ansicht berechnet werden können, zumindest bei beschränkter Auflösung, die durch die Helixsymmetrie vorgegeben ist. Die physikalische Ursache ist, daß in einem einzigen Bild formal viele verschiedene Ansichten der periodischen Untereinheit zu sehen sind; wegen dieser Vereinfachung wählten wir den Bakteriophagenschwanz als erstes Beispiel für die dreidimensionale Bildrekonstruktion. Im Allgemeinen ist mehr als eine Ansicht nötig, aber jedes Symmetrieelement reduziert die erforderliche Zahl. Für kleine ikosaedrische Viren genügen typischerweise drei bis vier Ansichten, aber vorher müssen viele Proben untersucht werden, um die notwendige Zahl der Ansichten zu finden und eine Mittelung durchführen zu können^[38]. Figur 10 zeigt zwei elektronenmikroskopische Bilder und die dreidimensionale Rekonstruktion des menschlichen Warzenvirus (HWV), das von *Crowther* und *Amos*^[39] untersucht wurde.

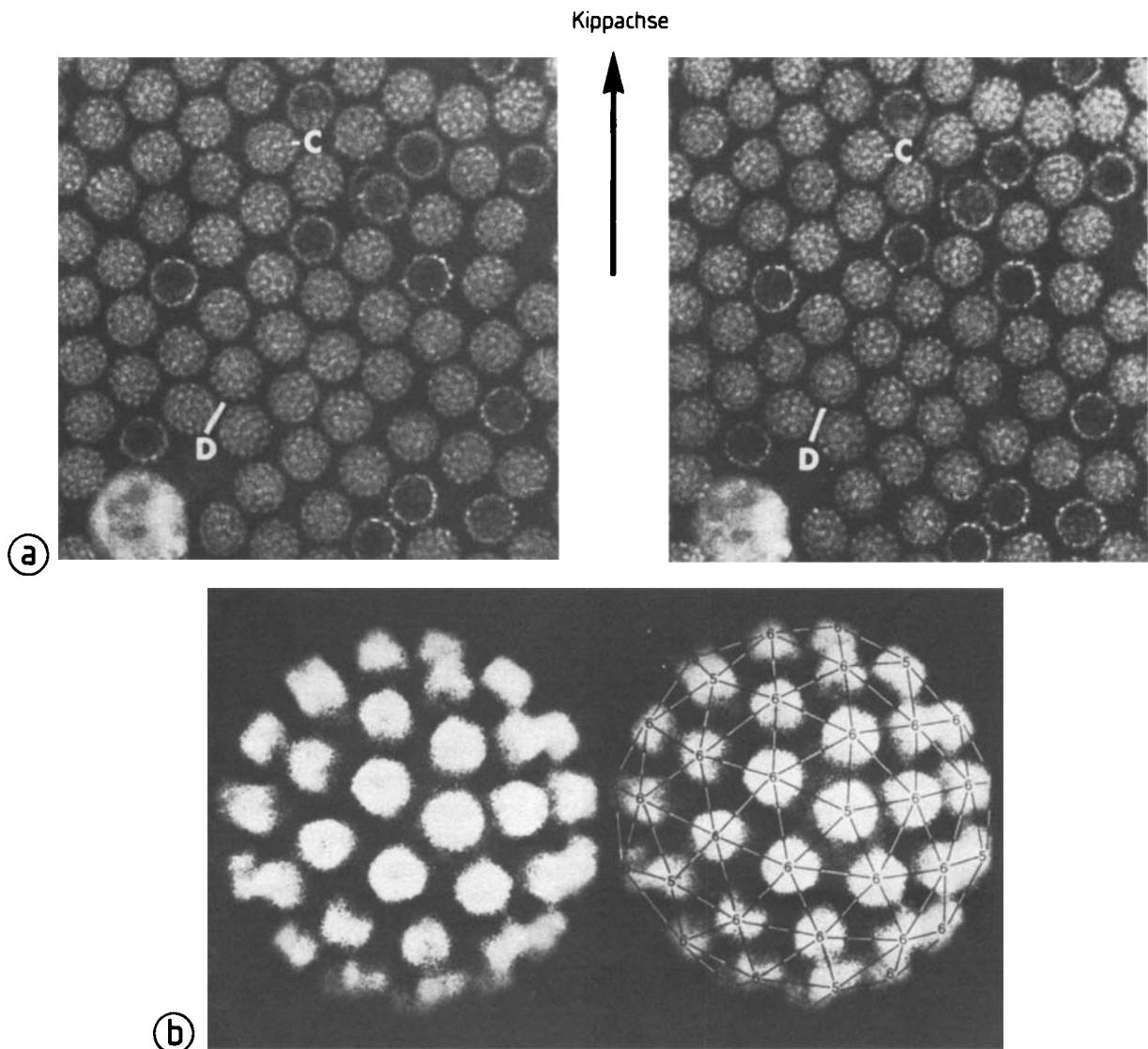


Fig. 10. (a) Zwei elektronenmikroskopische Bilder desselben Felds von negativ kontrastierten und dichtgepackten Teilchen des menschlichen Warzenvirus (HWV), links ungekippt, rechts um 18 ° gekippt [73]; Vergrößerung: 140000fach. (b) Dreidimensionale Rekonstruktion des Virus [39]. Die Linien deuten das ikosaedrische Oberflächennetz an [30]; die fünf- und sechszähligen Symmetriearchsen sind markiert.

3.3. Phasenkontrast-Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie von negativ kontrastierten Präparaten, kombiniert mit irgendeiner Methode der Bildanalyse, erwies sich als ideal, wenn man die Anordnung und Form von kleinen Proteinuntereinheiten in natürlichen oder künstlichen periodischen Aggregaten untersuchen wollte; dies schließt zweidimensionale Kristalle und makromolekulare Aggregate wie Mikrotubuli oder Viren ein^[2]. Die erreichbare Strukturinformation erwies sich als sehr zuverlässig für Auflösungen bis zu 20 oder 15 Å. Es stellte sich aber heraus, daß die Auflösung durch das Korn des Kontrastmittels und durch die Reproduzierbarkeit der Einbettung beschränkt war^[40]. Um eine wesentlich bessere Auflösung, z. B. 10 Å oder besser, zu erreichen, mußte das Protein direkt ohne Kontrastmittel untersucht werden. Bei hoher Auflösung gibt es allerdings ein weiteres Problem, die Strahlenschädigung. Sie kann durch eine niedrigere Elektronendosis verringert werden, doch dann steigt das statistische Rauschen, und das Bild wird immer unzuverlässiger. Diese Schwierigkeit kann zum Teil wieder durch die Abbildung geordneter Teilstrukturen umgangen werden; die Mittelung der Information von mehreren Molekülen ergibt ein statistisch signifikantes Bild. Das erste Problem, beim Weglassen des Kontrastmittels eine Austrocknung des Proteins zu verhindern, läßt sich auf zwei Wegen lösen: Man kann entweder gefrorene hydratisierte Präparate verwenden^[41]; dies wird zur Zeit intensiv untersucht. Oder – und dies ist eine bereits ausgereifte Methode, die von *Unwin* und *Henderson* entwickelt wurde und einen ganz neuen Weg beschreitet – man bestimmt die Struktur von ungefärbten biologischen Präparaten elektronenmikroskopisch unter Verwendung getrockneter Glucose-Lösungen, wodurch das Material geschützt wird^[42,43].

Dabei stellte sich die Frage, wie das ungefärbte Präparat, das für Elektronen effektiv transparent ist, sichtbar gemacht werden kann. In der Lichtmikroskopie von durchsichtigen Proben benutzt man die bekannte Phasenkontrastmethode von *Zernike*. Dabei werden die Phasen der gestreuten Strahlen relativ zu den ungestreuten durch eine Phasenplatte verschoben; dann läßt man den gestreuten und ungestreuten Strahl in der Bildebene miteinander interferieren und erhält so ein Bild. *Unwin* konstruierte eine elektrostatische Phasenplatte für die Elektronenmikroskopie, ganz analog der Phasenplatte der Lichtmikroskopie, aber sie ist schwer herzustellen und zu benutzen^[44]. Eine praktische Methode, einen Phasenkontrast im Elektronenmikroskop zu erzeugen, besteht einfach darin, die Objektivlinse nicht ganz zu fokussieren; diese Technik wurde von *Unwin* und *Henderson* benutzt.

Die Methode, einen Phasenkontrast durch Defokussierung zu erzielen, ergab sich aus einer Studie von *Erickson* und mir über die Bildentstehung im Elektronenmikroskop^[45]. Angeregt wurden wir durch eine Kontroverse über die Natur des ursprünglichen Bildes selbst. Als die dreidimensionale Bildrekonstruktion eingeführt und auf negativ kontrastierte biologische Proben angewendet wurde, gab es Widerspruch von seiten einiger Festkörperphysiker, die an die dynamischen Effekte bei stark streuendem Material gewöhnt waren. Sie bezweifelten die Gültigkeit unserer Annahme, das Bild sei im Wesentlichen eine einfache Projektion der Verteilung des Kontrastmittels und fragten, ob

Vielfachstreuung oder dynamische Streuung diese Annahme nicht verletzen würde. Um das Problem zu untersuchen, begannen *Erickson* und ich mit Experimenten an negativ gefärbten dünnen Kristallen von Katalase, wobei wir die Fokussierung änderten^[45]. Wir fanden, daß eine lineare Theorie der Bildentstehung fast vollständig die Änderungen in der Fourier-Transformierten des Bildes erklärte. Daraus schlossen wir, daß das direkte Bild eine echte Darstellung der Projektion der Elektronendichte des Objekts ist, wenn man richtig defokussiert (in Abhängigkeit von der gewünschten Raumfrequenz). Wird zur Kontrastverstärkung stärker defokussiert, so kann auch hier das Bild entsprechend korrigiert werden.

Obwohl diese Studie auf mittlere Auflösungen beschränkt war, zeigte sie, daß man durch digitale Bildverarbeitung im Nachhinein den Effekt der Defokussierung messen und kompensieren konnte. Wir schlügen vor, auch bei höheren Auflösungen so zu verfahren, um sowohl sphärische Aberration als auch Defokussierung auszugleichen. Außerdem bot sich damit eine bequeme Methode, bei ungefärbten Präparaten einen Phasenkontrast im Elektronenmikroskop zu erzeugen. Das Bild wird mit defokussierendem Objektiv aufgenommen, so daß die gestreuten und ungestreuten Elektronenstrahlen in ihrer Phase zueinander verschoben werden. Die Defokussierung funktioniert nicht wie eine perfekte Phasenplatte im Sinn von *Zernike*, weil die Phasen nicht alle um denselben Betrag verschoben sind; aufeinanderfolgende Bereiche der Raumfrequenzen tragen mit abwechselnd positivem und negativem Kontrast bei. Um das „wahre“ Bild zu erzeugen, muß das aufgenommene Bild verarbeitet werden, um die Phasenkontrastübertragung des Elektronenmikroskops zu korrigieren, damit alle Raumfrequenzen mit dem gleichen Kontrast beitragen.

Um ihre spektakuläre dreidimensionale Rekonstruktion der Purpurmembran von *Halobacterium* mit 7 Å Auflösung zu berechnen^[44], nahmen *Henderson* und *Unwin* eine Serie von Bildern der Membran bei verschiedenen Kippwinkel und bei sehr niedriger Elektronenbestrahlung auf. Die endgültige Dichtekarte war dann der Mittelwert aus etwa 100 000 Molekülen. Der geringe Kontrast in den Bildern wurde durch Defokussierung erzeugt; diese wurde bei der rechnerischen Rekonstruktion kompensiert. So wurde zum ersten Mal die innere Struktur eines Proteinmoleküls durch Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht.

4. Die Struktur des Chromatins

Die Arbeiten über die Struktur der Viren waren nicht nur für sich genommen interessant, sondern auch – wie schon vorher angedeutet –, weil die Probleme bei der Untersuchung großer Molekülverbände zur Entwicklung neuer Methoden und Techniken führten, die dann auf andere Systeme angewendet werden konnten. Ein Beispiel dafür sind unsere neueren Strukturuntersuchungen am Chromatin, die ohne unsere früheren Erfahrungen nicht so schnell vorangekommen wären. Chromatin heißt das Material, das man bei der Extraktion von Chromosomen erhält. Es besteht hauptsächlich aus DNA, die eng mit einer Reihe kleiner basischer Proteine von ähnlichem Gewicht, den Histonen, assoziiert ist. Wir begannen die Chromatinstudien in Cambridge vor etwa zehn Jahren, als die Prote-

inchemiker gerade nachgewiesen hatten, daß es nur fünf Haupttypen von Histonen gibt (die scheinbar größere Vielfalt der Histone wird durch postsynthetische Modifikationen verursacht); damit schien das Strukturproblem mit unseren Methoden lösbar.

Die DNA eines Eukaryontenchromosoms besteht wahrscheinlich aus einem einzigen Molekül, das mehrere Zentimeter lang wäre, wenn man es gerade ausstreckte. Es muß also sehr stark gefaltet sein, um die kompakte Form zu erreichen, die man in einem Chromosom sieht. Die DNA ist in diskrete genetische oder funktionelle Einheiten unterteilt, und überall auf der Welt wird zur Zeit intensiv geforscht, um herauszufinden, wie die DNA sich faltet, wie die Gene organisiert sind und wie ihre Expression kontrolliert wird. Wir haben versucht, die Struktur des Chromatins auf den verschiedenen Organisationsniveaus zu verstehen, und eine Verbindung mit den funktionellen Kontrollmechanismen herzustellen.

Die hohe Konzentration an Histonen im Zellkern deutet darauf hin, daß sie eine strukturelle Rolle spielen; 1972 bis 1975 konnte gezeigt werden, daß die vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 für den untersten Grad der Organisation des Chromatins verantwortlich sind. Diese Proteine falten aufeinanderfolgende DNA-Segmente mit einer Länge von etwa 200 Basenpaaren in kompakte Einheiten mit einem Durchmesser von etwa 100 Å, die sogenannten Nucleosomen. Es entsteht so eine Kette von Nucleosomen oder sich wiederholenden Einheiten, und wenn diese eng gepackt sind, bilden sie eine Faser mit einem Durchmesser von etwa 100 Å. Die Rolle des fünften Histons H1 war anfangs nicht klar. Seine Aminosäuresequenz variierte stärker als die der anderen vier; sie war spezifisch für verschiedene Organismen und Zellen. 1975 und 1976 zeigten wir, daß das Histon H1 etwas mit der Faltung der Nucleosomenfaser zur nächsthöheren Organisationsstufe zu tun hat; später fanden wir, wie dieser Prozeß abläuft.

Ich will hier keine Einzelheiten darüber berichten, wie dieses Modell der Chromatinorganisation entstand^[4], aber die Vorstellung vom Nucleosom ist das Ergebnis des Zusammentreffens mehrerer Forschungsrichtungen. Die ersten Hinweise auf eine reguläre Struktur ergaben Röntgenbeugungsexperimente an Chromatin; ihnen zufolge mußte es eine Art periodischer Grundeinheit geben, die nicht sehr geordnet ist und Abmessungen von ungefähr 100 Å hat^[46, 47]. Erste biochemische Hinweise auf diese Ordnung kamen von *Hewish* und *Burgoyne*^[48], die nachwiesen, daß es in der Rattenleber eine Nuclease gibt, die DNA in Vielfache einer Grundeinheit zerlegen kann. Später zeigte *Noll* mit einem anderen Enzym, einer Nuclease aus *Micrococcus*, daß die Grundeinheit etwa 200 Basenpaare enthält^[49]. Die Tatsache, daß die Nuclease die chromosomale DNA – ganz anders als freie DNA – in gleichen Abständen zerschneidet, röhrt von der Faltung der DNA her; zwischen den Falteinheiten sind jeweils nur kurze Stücke für die Nuclease zugänglich. Der dritte Hinweis auf die Nucleosomen kam von der Beobachtung von *Kornberg* und *Thomas*^[50], daß die beiden stark konservativen Histone H3 und H4 in Lösung als Tetramer $(H3)_2(H4)_2$ vorliegen, das sich wie ein normales globuläres Protein aus mehreren Untereinheiten verhält. Aufgrund dieser Befunde schlug *Kornberg* 1974 ein Modell für die Grundeinheit des Chromatins vor^[51]: Eine Kugel mit einem Durchmesser von

100 Å, die ein DNA-Stück aus 200 Basenpaaren enthält, das um einen Proteinkern herumgewickelt ist; dieser Kern besteht aus acht Histonmolekülen, nämlich dem $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramer und je zwei Molekülen H2A und H2B. Das fünfte Histon sollte dem Modell zufolge irgendwie an der Außenseite des Nucleosoms haften. Es war äußerst überraschend, daß die DNA einen Proteinkern umhüllt und nicht umgekehrt.

Als *Kornberg* 1972 nach Cambridge kam, war all dies noch nicht bekannt. Wir begannen mit den Röntgenbeugungsexperimenten, um den Assoziationsprozeß von Histonen und DNA zu verfolgen, denn die Röntgenbeugung an Kernmaterial oder an isoliertem Chromatin war damals die einzige Methode, die geordnete „Verpackung“ der DNA zu studieren. Fast 90% Rekonstitution ließen sich erreichen, wenn man die DNA einfach mit einer ungereinigten Präparation von Histonen mischte. Die Rekonstitutionsversuche, bei denen die DNA mit den vorher gereinigten vier Histonen gemischt wurde, schlugen alle fehl, so als ob die Histone durch die Reinigung denaturiert worden wären. Wir suchten deshalb nach schonenderen Methoden der Extraktion und fanden, daß sich die native Struktur dann leicht herstellen läßt, wenn die vier Histone nur paarweise, H3 und H4 sowie H2A und H2B, isoliert werden. Sobald die Paare getrennt werden, funktioniert die Rekonstitution nicht. Diese Ergebnisse veranlaßten *Kornberg*, die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Histone zu studieren; er entdeckte das Histon-Tetramer $(H3)_2(H4)_2$ ^[50], und in der Folge entwickelte er das Nucleosomenmodell, das ich oben beschrieben habe.

4.1. Die Struktur des Nucleosoms

Die erwähnte Nucleaseverdauung und die Röntgenbeugung an nicht orientierten Proben von Chromatin oder von Nucleosomen in Lösung enthielten zwar bestimmte Eigenschaften der Nucleosomen, doch war eine vollständige Beschreibung der Struktur nur von einer Kristallstrukturanalyse zu erwarten, weil nur sie die dreidimensionale Information enthält. Im Sommer 1975 begannen meine Kollegen und ich mit den Versuchen, die Nucleosomen so zu isolieren, daß man sie kristallisieren kann. Wenn Nucleosomen nach der Nucleaseverdauung gereinigt werden, enthalten sie DNA-Stücke, die im Durchschnitt aus 200 Nucleotidpaaren bestehen; es gibt aber eine ziemlich breite Größenverteilung um diesen Mittelwert, so daß die Präparationen für die Kristallisation nicht homogen genug sind. Die Unterschiede können aber durch weitere Verdauung mit Nuclease beseitigt werden. Die Nuclease aus *Micrococcus* zerschneidet das Chromatin anfangs zwischen den Nucleosomen; bei den herausgeschnittenen Nucleosomen funktioniert sie dann aber als Exonuclease, d.h. sie kürzt die DNA erst auf die Länge von etwa 166 Basenpaaren, und dann, nach einer kurzen „Verdauungspause“^[52], auf die von etwa 146 Basenpaaren. Bei diesem Wert gibt es ein deutliches Plateau in der Verdauungskurve, bevor weiterer Abbau eintritt. Erst während dieser letzten Phase wird das Histon H1 frei^[52], und übrig bleibt ein größeres metastabiles Zwischenprodukt, das aus einem DNA-Stück mit 146 Basenpaaren und acht Histonmolekülen besteht. Die enzymatisch reduzierte Form des Nucleosoms nennt man Nucleosomrumpf (core); dessen DNA-Gehalt ist in vielen Ar-

ten gleich. Das DNA-Stück, das durch die zusätzliche Verdauung entfernt wurde und das ursprünglich ein Nucleosom mit dem nächsten verband, heißt Linker-DNA.

Ein Nucleosomrumpf enthält ein DNA-Stück definierter Länge und hat eine homogene Zusammensetzung von Proteinen. Wir versuchten, diese Rümpfe zu kristallisieren, hatten aber anfangs keinen Erfolg, wahrscheinlich wegen kleiner Verunreinigungen durch Histon H1. Schließlich fand mein Mitarbeiter *Leonard Lutter* einen Weg, ausgesprochen reine Präparationen herzustellen, die dann gute Einkristalle bildeten^[53]. Die Bedingungen für das Kristallwachstum wählten wir unter Berücksichtigung unserer früheren Erfahrungen bei der Kristallisation von Transfer-RNA, weil wir annahmen, daß ein großer Teil der Oberfläche des Nucleosomrumpfs aus DNA bestünde. Die Experimente haben viele Biologen überrascht, da sie zeigten, daß fast die ganze DNA im Zellkern in einer sehr regulären Anordnung vorliegt.

Die Entschlüsselung der dreidimensionalen Struktur eines kristallisierten hochmolekularen Komplexes kann viele Jahre beanspruchen, wie die Erfahrungen mit der Doppelscheibe des TMV lehrten. Wir haben uns deshalb zunächst darauf beschränkt, ein Modell des Nucleosomrumpfs bei niedrigerer Auflösung zu bekommen; dabei arbeiteten wir mit einer Kombination von Röntgenbeugung und Elektronenmikroskopie, unterstützt – wo immer möglich – durch biochemische und physikochemische Versuche. Am Anfang mußten wir die Packung in den Kristallen ermitteln; zu diesem Zweck untersuchten wir elektronenmikroskopische Aufnahmen dünner Kristalle. Wir bekamen Projektionen der Elektronendichte längs der drei Hauptachsen des Kristalls, indem wir die Intensitäten der Röntgenreflexe und die Phasen aus den elektronenmikroskopischen Bildern auswerteten^[53, 54]. Der Rumpf des Nucleosoms stellte sich als flaches scheibenförmiges Objekt heraus, mit Abmessungen von etwa $110 \times 110 \times 57 \text{ Å}$, etwas keilförmig, und deutlich in zwei Schichten geteilt. Wir schlugen ein Modell vor, in dem etwa eindreiviertel Windungen einer DNA-Superhelix mit einer Ganghöhe von 27 Å um ein Histo-

ston-Octamer herumläuft. Eine Windung enthält demnach etwa 80 Nucleotide. Dieses Modell der Organisation von DNA im Rumpf des Nucleosoms erklärte auch die Ergebnisse von Enzymverdauungsversuchen an Chromatin^[53, 55] und zeigte damit, daß wir einen im Wesentlichen nativen Komplex kristallisiert hatten.

In unseren ersten Kristallen waren die Histon-Proteine teilweise proteolytisch verdaut, aber ihre physikochemischen Eigenschaften waren denen der intakten Partikel sehr ähnlich. Wir haben seitdem Kristalle von intakten Nucleosomrümpfen gezüchtet, deren Röntgen-Beugungsbilder bis 5 Å Auflösung reichen, und wir sind zur Zeit mit einer detaillierten Analyse beschäftigt^[56]. Nach und nach züchteten *Daniela Rhodes, Ray Brown* und *Barbara Ruston* Kristalle solcher Rümpfe von sieben Organismen. Alle zeigen im Wesentlichen die gleichen Röntgen-Beugungsdiagramme, was beweist, daß Nucleosomen überall gleich gebaut sind. Der Nucleosomenrumpf enthält eine zweizählige Symmetriearchse, was nicht weiter überraschend ist, da die acht Histone paarweise angeordnet sind und die DNA viele lokale zweizählige Achsen hat. Aus der diffusen Weitwinkelstreuung der Kristalle kann man schließen, daß die DNA im Rumpf der Nucleosomen in der B-Konfiguration vorliegt.

Figur 11 zeigt die Elektronendichtekarte (a) einer der Hauptprojektionen des Kristalls. Die Karte gibt die gesamte Elektronendichte im Nucleosom wieder, d.h. die Elektronendichte der DNA wird nicht von der des Proteins unterschieden. Die Anteile des Proteins und die der DNA können durch Neutronenstreuung im Zusammenhang mit der Methode der Kontrastvariation getrennt werden; *John Finch* und eine Gruppe am Laue-Langevin-Institut in Grenoble begannen mit dieser Untersuchung, als hinreichend große Kristalle zur Verfügung standen^[57]. Sie bekamen Elektronendichtekarten der DNA und des Proteins entlang der drei Hauptachsen (vgl. Fig. 11 (b) und 11 (c)). Die Karte der DNA bestätigt die früher vorgeschlagene Superhelix mit eindreiviertel Windungen, und die Karte des Proteins zeigt, daß das Histon-Octamer selbst eine Keilform hat.

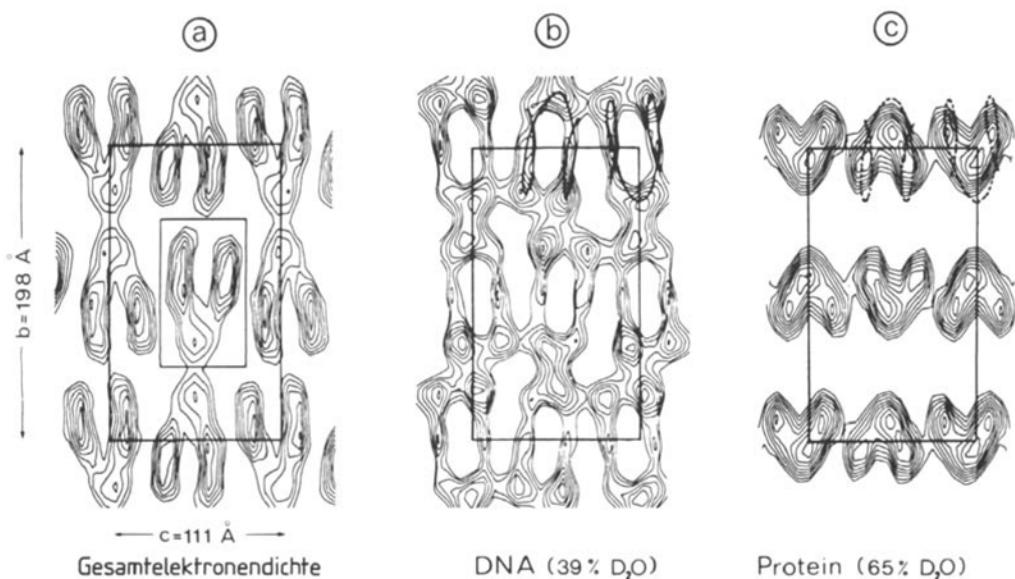


Fig. 11. Projektionen der Elektronendichtevertteilung des Nucleosomrumpfes. (a) Berechnet aus Röntgenbeugungsdaten [56]; (b) und (c) berechnet aus Neutronenbeugungsdaten nach Kontrastvariation [57]. In (b) ist der Verlauf der superhelicalen DNA eingezeichnet, (c) zeigt nur den Proteinkern.

4.2. Dreidimensionale Bildrekonstruktion des Histon-Octamers und räumliche Verteilung der Histone

Eine Alternative zur Unterscheidung von DNA und Protein durch Neutronenbeugung ist die direkte Untersuchung des Histon-Octamers. Dieses Teilchen bildet den Kern des Nucleosoms, und man kann es frei in Lösung bei hoher Salzkonzentration erhalten; die DNA wird dabei verdrängt^[58]. Bei den Kristallisationsversuchen bekamen wir geordnete Aggregate – Hohlzylinder – die wir elektronenmikroskopisch studierten^[59]. Die in Abschnitt 3.2 beschriebene Bildverarbeitung erbrachte eine dreidimensionale Dichtekarte bei niedriger Auflösung und ein Modell des Octamers (Fig. 12a). Um zu prüfen, ob die Ablösung der DNA zu einer Strukturveränderung im Histon-Octamer geführt hatte, wurden Projektionen des Modells berechnet und mit den Projektionen des Proteinkerns der Nucleosomen verglichen, die wir aus den Neutronenbeugungsversuchen erhalten hatten. Die Übereinstimmung der Dichtekarten war gut und zeigte, daß die Struktur des Octamers nicht wesentlich verändert war.

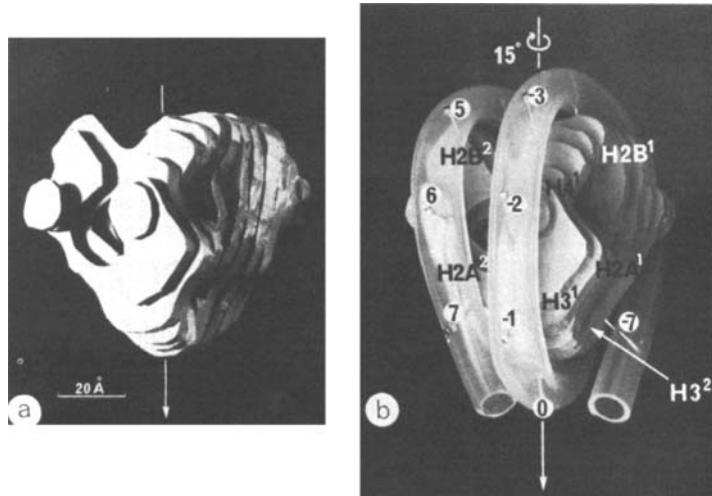


Fig. 12. (a) Modell des Histon-Octamers, berechnet aus der dreidimensionalen Rekonstruktion von elektronenmikroskopischen Bildern [59]. Die zweizählige Symmetriearchse ist eingezeichnet. Die Vorsprünge am Rand des Modells bilden eine linkshändige helicale Rampe, auf die eindreiviertel bis zwei Windungen einer DNA-Superhelix aufgewickelt werden können. (b) Struktur des Histon-Octamers aus (a) mit zwei Windungen der DNA-Superhelix. (Der Deutlichkeit halber ist der Durchmesser des Plastikschauchs etwas kleiner gewählt, als es der DNA entsprechen würde.) Entfernungen längs der DNA sind durch Zahlen –7 bis +7 markiert, wobei die Symmetriearchse als Ursprung dient. Damit sind die 14 Perioden bezeichnet, die in den 146 Basenpaaren des Nucleosomrumpfes Platz finden. Die Anordnung der einzelnen Histonmoleküle im Modell ist im Text beschrieben.

Bei der Auflösung dieser Methode (20 Å) konnte gezeigt werden, daß das Histon-Octamer eine zweizählige Symmetriearchse hat, genau wie der Rumpf des Nucleosoms selbst; außerdem ist auch das Octamer keilförmig und zweigeteilt. An der Außenseite liegt ein System von Vorsprüngen, das eine mehr oder weniger helicale und kontinuierliche Rampe mit einem äußeren Durchmesser von 70 Å und mit der Ganghöhe von 27 Å bildet, eine genau passende Spule, um eindreiviertel Windungen der DNA-Superhelix aufzuwickeln (Fig. 12b).

Die Auflösung der Elektronendichtekarte des Octamers reicht nicht aus, um die einzelnen Histonmoleküle zu er-

kennen, aber wir haben die Beziehung zwischen dem Octamer und der Superhelix der DNA genutzt, um daraus auf die einzelnen Histone zu schließen^[59]. Bei dieser Interpretation halfen uns die Ergebnisse von *Mirzabekov* und seinen Mitarbeitern^[60], die Histone und nucleosomale DNA chemisch quervernetzt haben; weiterhin griffen wir auf Informationen über die Nachbarschaftsverhältnisse zwischen Histonen zurück, die durch Quervernetzung der Proteine erhalten worden waren. Ohne ein dreidimensionales Modell können die Daten nicht sicher interpretiert werden, weil die Kenntnis der Kontaktstellen zwischen Histonen und einem Strang von DNA nicht ausreicht, um die räumliche Anordnung der Histone im Rumpf der Nucleosomen festzulegen. Im übrigen liegen die beiden Windungen der superhelicalen DNA ziemlich nahe beieinander, so daß das Muster der Vernetzungspunkte zwischen DNA und Histonen nicht unbedingt die lineare Anordnung der Histone längs der DNA wiedergibt. Erst die dreidimensionale Elektronendichtekarte engt die Zahl der Möglichkeiten soweit ein, daß man eine Auswahl treffen kann.

In dem vorgeschlagenen Raummodell besteht die helicale Rampe des Octamers aus der folgenden symmetrischen Sequenz von acht Histonen: H2A-H2B-H4-H3-H3-H4-H2B-H2A. Das Tetramer (H3)₂(H4)₂ bildet eine verformte Scheibe, quasi eine einzelne Windung einer Helix, und definiert damit den Drehsinn der DNA-Superhelix. Diese Struktur des Histon-Tetramers erklärt die Beobachtung vieler Forscher, angefangen bei *Felsenfeld*^[61], der fand, daß H3 und H4 allein, ohne H2A und H2B, bei der DNA Nucleosomen-ähnliche Eigenschaften, vor allem die Superhelix und die Resistenz gegen Verdauung durch *Micrococcus*-Nuclease, induzieren; H2A und H2B können dies nicht. Das Modell erklärt außerdem die asymmetrische Dissoziation des Histon-Octamers, wenn die Salzkonzentration erniedrigt wird: Über einen hexameren Zwischenzustand entsteht ein (H3)₂(H4)₂-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimere^[58, 62].

4.3. Die Rolle des Histons H1 und Strukturen höherer Ordnung

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Untersuchungen ergaben ein ziemlich detailliertes Bild der inneren Struktur eines Nucleosoms, aber bis 1975 war weder klar, wie die Verbindung der Nucleosomen entlang der Chromatinkette aussieht, noch kannten wir die nächsthöhere Ebene der Organisation. Es war seit einiger Zeit bekannt, daß die Dicke von Chromosomenfasern bei der elektronenmikroskopischen Beobachtung zwischen 100 und 250 Å schwankte; dies hing von der Gegenwart chelatbildender Liganden bei der Präparation ab. Dies war der Ausgangspunkt für die Experimente, in denen *Finch* und ich kurze Stücke von Chromatin untersuchten, die durch eine kurzzeitige Verdauung des Kernmaterials durch *Micrococcus*-Nuclease entstanden^[63]. In Gegenwart von Chelatliganden erschien das native Chromatin als ziemlich einheitliche Filamente von 100 Å Durchmesser. Gab man Mg²⁺-Ionen dazu, rollten sich die Stücke zu dickeren, unregelmäßigeren Fasern auf; ihr Durchmesser beträgt 250 bis 300 Å, und sie weisen Querstreifen im Abstand von etwa 120 bis 150 Å auf. Dies entspricht offenbar den Windungen einer geordneten, aber nicht vollkommen regulären

Helix oder Superhelix. Da der Ausdruck „Superhelix“ schon in anderem Zusammenhang geprägt worden war, benutzten wir den Begriff „Solenoid“; dieser sollte andeuten, daß die Windungen wie beim Elektromotor dicht beeinanderliegen. Aufgrund der elektronenmikroskopischen Bilder und der Röntgen-Beugungsdiagramme^[64] schlugen wir vor, daß die zweite Ebene der Chromatinorganisation eine helical gewundene Nucleosomenfaser ist, die etwa sechs Nucleosomen pro Windung enthält. Außerdem fanden wir, daß nur unregelmäßige Klumpen gebildet wurden, wenn die gleichen Experimente ohne das Histon H1 durchgeführt wurden. Daraus folgte, daß das fünfte Histon H1 für den Aufbau und die Stabilisierung der geordneten Faserstruktur notwendig ist.

Wir hatten zwar jetzt die Organisationsebene erkannt, auf der H1 seine Funktion bei der Kondensation des Chromatins erfüllt, doch erst später, als wir mehr Hinweise aus der Biochemie, der Kristallstrukturanalyse, und von verbesserten elektronenmikroskopischen Bildern in der Hand hatten, wurde klar, wie das H1-Molekül die Bildung der 300 Å-Faser aus der 100 Å-Faser bewirkt.

Betrachtet man den Zeitverlauf der Nucleaseverdauung und berücksichtigt man die bekannte Struktur des Nucleosomrumpfes, so läßt sich ableiten, wo H1 im intakten Nucleosom lokalisiert sein könnte. Ich habe in Abschnitt 4.1 erwähnt, daß es einen Zwischenzustand bei der Verdauung des Chromatins durch *Micrococcus*-Nuclease gibt, bei dem die DNA-Stücke etwa 166 Basenpaare enthalten. H1 wird bei dem Verdauungsschritt von 166 nach 146 Basenpaaren freigesetzt^[52]. Da die 146 Basenpaare des Nucleosomrumpfes eindreiviertel Windungen der Superhelix entsprechen, folgerten wir, daß das Teilchen mit 166 Basenpaaren zwei komplette Windungen der DNA enthält^[53]. Dies bringt die beiden Enden der DNA am Nucleosom nahe zusammen, so daß sie beide über ein einziges Molekül H1 verbunden werden können (Fig. 13). Ein solches Teilchen aus Histon-Octamer und 166 Basenpaaren wird Chromatosom genannt^[65]; es wird von uns und anderen Gruppen für die Grundeinheit des Chromatins gehalten.

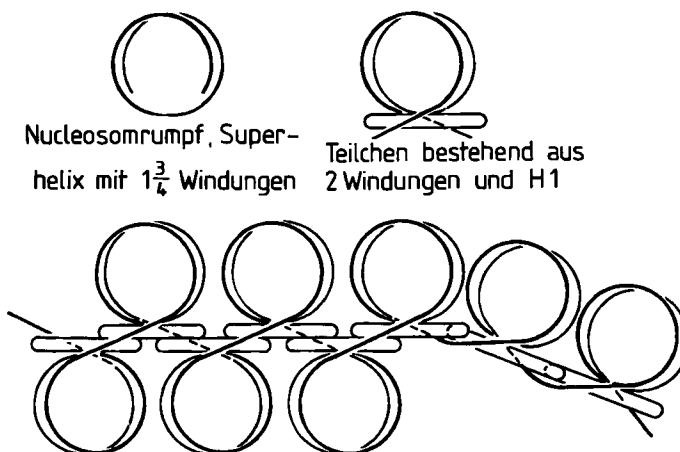


Fig. 13. Oben: Wenn die 146 Basenpaare der DNA im Nucleosomrumpf etwa eindreiviertel superhelicalen Windungen entsprechen, dann umfassen 166 Basenpaare zwei volle Windungen. Da mindestens 166 Basenpaare nötig sind, um das Histon H1 zu binden [52], muß es die angedeutete Position haben. Unten: Das Schema der Nucleosomenfaser bei niedriger Ionenstärke zeigt den Grund für die Zickzackstruktur (vgl. Fig. 14). Im rechten Teil des Modells ist eine Variante der Zickzackstruktur dargestellt, die ebenfalls oft beobachtet wird. Sie entsteht, wenn man ein Nucleosom 180° um die Faserachse dreht.

H1 lagert sich an dieses Teilchen an die Außenseite in der Gegend des Ein- und Austritts der DNA-Superhelix an.

Diese Theorie klingt plausibel, doch blieb zu fragen, ob das Histon H1 wirklich am postulierten Ort zu finden ist. H1 ist zu klein, um es direkt elektronenmikroskopisch zu finden; auf seine Position kann aber geschlossen werden, wenn man seinen Einfluß auf das Aussehen des Chromatins beim Falten der 100 Å-Nucleosomfaser in die 300 Å-Solenoidfaser untersucht. Die Zwischenzustände wurden in einer systematischen Studie von *Thoma* und *Koller* dargestellt^[66], die die Faltung des Chromatins bei steigender Ionenstärke studierten. Sie verwendeten einwertige statt zweiwertige Ionen und entdeckten so eine Reihe von Strukturen, die mit steigender Salzkonzentration zunehmend kompakter werden. Zum Beispiel liegt in 1 mM Salzlösung die Nucleosomenfaser vor; über eine Serie von Zwischenstufen erreicht man schließlich in 60 mM Salzlösung die kompakte 300 Å-Faser, die in jeder Hinsicht der von mir und *Finch* beobachteten gleicht.

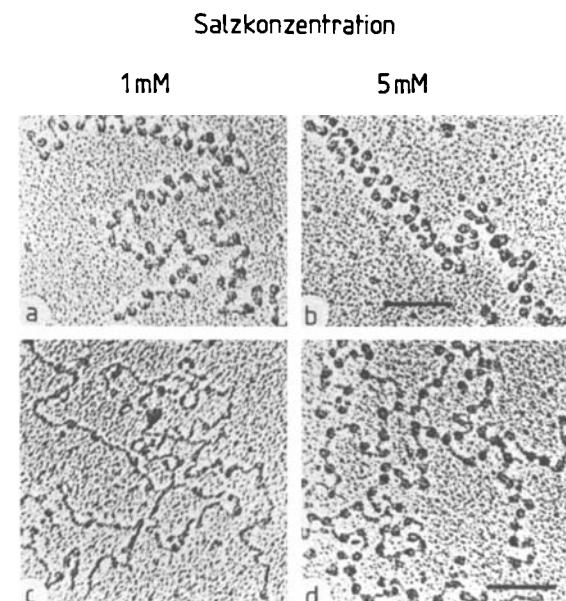


Fig. 14. Elektronenmikroskopische Bilder von Chromatin mit oder ohne H1 bei niedriger Ionenstärke [66]. In Gegenwart von H1 ist die erste erkennbar geordnete Struktur (a) eine lose Zickzackkurve, bei der die Eintritts- und Austrittsstelle der DNA am Nucleosom nahe benachbart sind; bei etwas höherer Salzkonzentration (b) wird das Zickzack dichter. In Abwesenheit von H1 gibt es keine Ordnung im Sinn einer definierten Faserrichtung. Bei niedriger Salzkonzentration (c) sind keine Nucleosomen mehr sichtbar, weil sich die DNA geöffnet hat und nur noch mit einzelnen Histonmolekülen bedeckt ist. Bei etwas höherer Salzkonzentration (d) sind wieder Nucleosomen sichtbar, aber die Eintritts- und Austrittsstellen der DNA sind mehr oder weniger zufällig verteilt. Maßstab = 100 nm.

Man kann auf die Position von H1 schließen, wenn man den Unterschied der Strukturen betrachtet, die bei Ionenstärken zwischen 1 und 5 mM in Gegenwart oder Abwesenheit von H1 entstehen (Fig. 14). In Chromatin mit H1 sieht man eine geordnete Struktur: Die Nucleosomen haben ein reguläres Zickzackmuster und liegen mit ihrer flachen Seite zum Objekträger. Die Zickzackform entsteht dadurch, daß die Ein- und Austrittsstelle der DNA benachbart sind; dies war auch nach den Röntgen- und biochemischen Untersuchungen zu erwarten (Fig. 13). Bei Chromatin ohne H1 liegen die Eintritts- und Austrittspunkte unge-

fähr auf entgegengesetzten Seiten und sind überdies zufällig verteilt. Tatsächlich löst sich die Struktur des Nucleosoms bei sehr niedriger Ionenstärke in eine lineare Form auf, bei der man keine individuellen Kugeln mehr erkennen kann. Dies kann in Gegenwart von H1 nicht geschehen. Wir schlossen daraus, daß H1 oder ein Teil davon sich in der Region befindet, wo die DNA in das Nucleosom ein- und aus dem Nucleosom austritt und diesen Punkt, wie vorhergesagt, stabilisiert.

Bei den zickzackförmigen Zwischenstrukturen liegen die H1-Regionen aufeinanderfolgender Nucleosomen nahe beieinander oder berühren sich sogar. Daraus leiteten wir ab, daß mit zunehmender Ionenstärke immer mehr H1-Regionen miteinander in Wechselwirkung treten, bis sie schließlich zu einem helicalen Polymer längs der zentralen Achse des Solenoids aggregieren und damit die geordnete Form hervorrufen. Polymere von H1 konnten tatsächlich, sowohl bei niedriger als auch hoher Ionenstärke, durch chemische Quervernetzung erhalten werden^[61]; es bleibt jedoch noch zu zeigen, ob sich die H1-Moleküle wirklich im Zentrum des Solenoids befinden. Der wichtige Punkt dabei ist, daß die Aggregation von H1 parallel zur Bildung der 300 Å-Faser verläuft und sie möglicherweise kontrolliert.

4.4. Die Rolle aller Histone im Zusammenspiel

Aus der räumlichen Anordnung der Moleküle des Histon-Octamers und aus der Position des Histons H1 kann man die Rolle der verschiedenen Histone bei der Faltung der DNA am Nucleosom erkennen (Fig. 15)^[53]. Das Tetramer $(H3)_2(H4)_2$ hat ungefähr die Form einer einzelnen helicalen Windung und definiert damit die zentrale Schleife der DNA-Superhelix. H2A und H2B kommen als zwei Heterodimere dazu, eines auf jeder Seite des H3/H4-Tetramers. Jedes Heterodimer bindet eine zusätzliche halbe Windung der DNA und vervollständigt damit die zwei Windungen der Superhelix. Schließlich bindet H1 an die Region des Teilchens, wo drei Abschnitte der DNA zusammenkommen; H1 stabilisiert und „versiegelt“ das Nucleosom und induziert darüber hinaus die nächste Stufe der Organisation. Diese nacheinander ablaufenden Ereignisse würden auch den zeitlichen Verlauf der Anlagerung der Histone an neu replizierte DNA erklären^[68-70].

Wir haben hier ein einigermaßen detailliertes Modell des Nucleosoms und eine Beschreibung der nächsthöheren Stufe der Faltung präsentiert. Es liefert einen strukturellen und chemischen Rahmen, innerhalb dessen wir die dynamischen Vorgänge des Chromatins in der Zelle betrachten können, z. B. Transkription, Replikation und Mitose.

5. Schlußbemerkung

Ich habe unsere Arbeiten am Chromatin besonders hervorgehoben, weil sie als Paradigma für die Art von Strukturuntersuchungen dienen können, die die Zusammenhänge zwischen molekularen und zellulären Elementen enthalten. Man studiert erst ein komplexes System, indem man es physikalisch, chemisch oder enzymatisch zerlegt und versucht dann, ein genaues Bild der Teile durch Röntgenbeugung oder chemische Analyse sowie ein Bild der

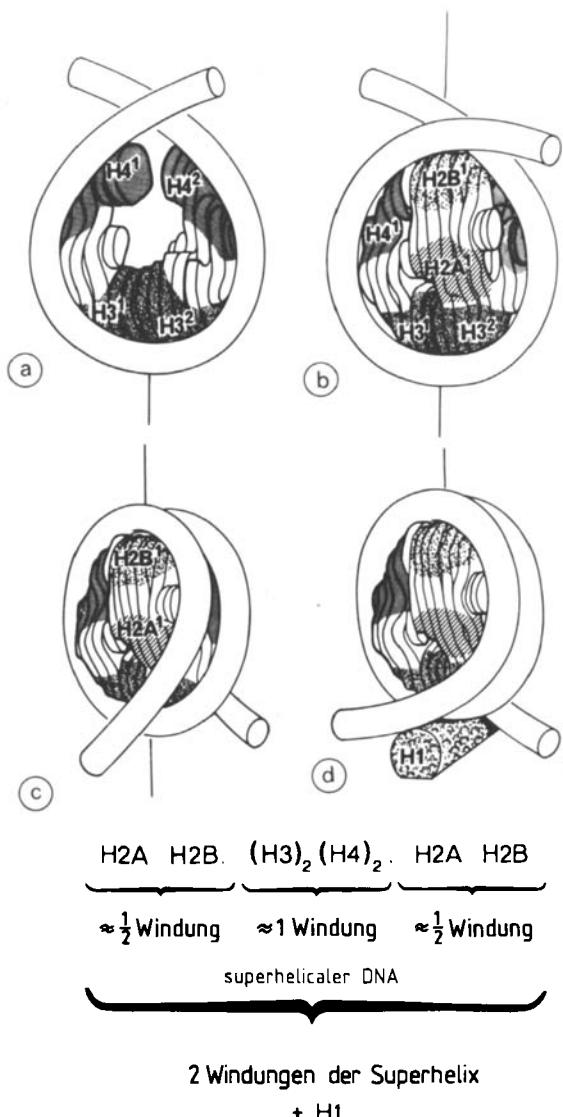


Fig. 15. Anordnung der Histone im Nucleosom. Die Schraffur im Histonkern zeigt die Positionen einzelner Histonmoleküle; die Grenzen zwischen ihnen sind unbekannt und deswegen nicht eingezeichnet. (a) Das $(H3)_2(H4)_2$ -Tetramer hat die Form eines Sprungrings und dient als Spule für 70 bis 80 Basenpaare der DNA, etwa eine superhelicale Windung. (b) Ein H2A-H2B-Dimer lagert sich an eine Seite des Tetramers an. (c) H2A-H2B-Dimere auf gegenüberliegenden Seiten binden je 30-40 Basenpaare DNA, etwa die Hälfte einer superhelicalen Windung, so daß insgesamt zwei Windungen entstehen. (d) Das Histon H1 lagert sich an eine charakteristische Stelle der DNA am Eintritts- und Austrittspunkt und „versiegelt“ so das Nucleosom.

Gesamtstruktur durch Elektronenmikroskopie zu erhalten. Die Viren und das Chromatin, die ich hier beschrieben habe, sind allerdings noch relativ einfache Strukturen. Weitauß kompliziertere Systeme wie z. B. die Ribosomen und der Mitoseapparat warten auf uns, und die Aufklärung solcher Strukturen sollte für zukünftige Generationen eine sehr schwierige, aber interessante Aufgabe sein; gegenwärtig beginnt man gerade, auch solche Probleme aufzugreifen. Es freut mich, daß ich an der Grundlegung der strukturorientierten Molekularbiologie mitwirken konnte.

Es ist klar, daß ich die hier skizzierten Arbeiten nicht ohne die Hilfe von vielen ausgezeichneten und geschätzten Kollegen und Mitarbeitern hätte durchführen können. Nach Rosalind Franklins Tod konnte ich mit John Finch und Kenneth

Holmes, damals Studenten, heute Kollegen, an den Viren weiterarbeiten. Über viele Jahre hatte ich eine transatlantische Verbindung mit Donald Caspar, der mich mit Rat, Kritik und Erkenntnissen unterstützte. Ich kann hier nur einige Namen meiner anderen Mitarbeiter auf mehreren Gebieten nennen: Bei der Untersuchung der Chemie und Aggregation von Viren: Reuben Leberman, Tony Durham, Jo Butler und David Zimmern; bei der Viruskristallographie: William Longley, Peter Gilbert, John Champness, Gerard Bricogne und Anne Bloomer; bei der Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung: David DeRosier, Harold Erickson, Tony Crowther, Linda Amos, Jan Mellema, Nigel Unwin und, während der ganzen Zeit, John Finch; bei der Strukturuntersuchung von Transfer-RNA: Brian Clark, der das biochemische Verständnis und die Methoden einbrachte, ohne die die Arbeit nicht hätte begonnen werden können, Jon Robertus, Jane Ladner und Tony Jack; beim Chromatin: Roger Kornberg, dessen Geschick und Verständnis halfen, aus einem verschwommenen Thema eine klare Problemstellung zu entwickeln, Markus Noll, Len Lutter und Daniela Rhodes sowie Ray Brown, die erfolgreich ihre bei der Untersuchung von tRNA gewonnenen Erfahrungen auf Nucleosomen anwenden, und schließlich Tim Richmond und John Finch, die sich zur Zeit mit den Röntgen-Untersuchungen bei höherer Auflösung beschäftigen.

Eingegangen am 25. April 1983 [A 463]
Übersetzt von Dr. E. Mandelkow, Heidelberg

Übersichten:

- [1] A. Klug: „The Assembly of Tobacco Mosaic Virus: Structure and Specificity“. *Harvey Lect.* 74 (1979) 141–162.
- [2] R. A. Crowther, A. Klug: „Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Image Reconstruction from Electron Micrographs“. *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1975) 161–182.
- [3] A. Klug: „Image Analysis and Reconstruction in the Electron Microscopy of Biological Macromolecules“. *Chem. Scr.* 14 (1979) 245–256.
- [4] a) R. D. Kornberg: „Structure of Chromatin“. *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 931–954; b) R. D. Kornberg, A. Klug: „The Nucleosome“. *Sci. Am.* 244 (1981) 52–64.
- [5] P. J. G. Butler, A. Klug: „The Structure of Nucleosomes and Chromatin“ in F. Palmieri: *Horizons in Biochemistry and Biophysics*. Wiley, Chichester 1983, im Druck.

Originalpublikationen:

- [6] H. Fraenkel-Conrat, R. C. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41 (1955) 690–698.
- [7] H. Fraenkel-Conrat, B. Singer, *Biochim. Biophys. Acta* 33 (1959) 359–370.
- [8] R. E. F. Matthews, *Virology* 30 (1966) 82–96.
- [9] G. Stubbs, S. Warren, K. C. Holmes, *Nature London* 267 (1977) 216–221.
- [10] K. C. Holmes, *J. Supramol. Struct.* 12 (1979) 305–320.
- [11] G. Schramm, W. Zillig, *Z. Naturforsch. B* 10 (1955) 493–498.
- [12] D. L. D. Caspar, *Adv. Protein Chem.* 18 (1963) 37–121.
- [13] J. T. Finch, R. Leberman, Y.-S. Chang, A. Klug, *Nature London* 212 (1966) 349–350.
- [14] G. Bricogne, *Acta Crystallogr. Sect. A* 32 (1976) 832–847.
- [15] A. C. Bloomer, J. N. Champness, G. Bricogne, R. Staden, A. Klug, *Nature London* 276 (1978) 362–368.
- [16] M. A. Lauffer, C. L. Stevens, *Adv. Virus Res.* 13 (1968) 1–63.
- [17] A. C. H. Durham, J. T. Finch, A. Klug, *Nature London, New Biol.* 229 (1971) 37–42.
- [18] A. C. H. Durham, A. Klug, *Nature London, New Biol.* 229 (1971) 42–46.
- [19] A. Klug, A. C. H. Durham, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 36 (1971) 449–460.
- [20] P. J. G. Butler, A. Klug, *Nature London, New Biol.* 229 (1971) 47–50.
- [21] M. Fukuda, T. Ohno, Y. Okada, Y. Otsuki, I. Takebe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 1727–1730.
- [22] P. J. G. Butler, G. P. Lomonosoff, *Biophys. J.* 32 (1980) 295–312.
- [23] D. Zimmern, P. J. G. Butler, *Cell* 11 (1977) 455–462.
- [24] D. Zimmern, *Cell* 11 (1977) 463–482.
- [25] D. Zimmern, T. M. A. Wilson, *FEBS Lett.* 71 (1976) 294–298.
- [26] J. N. Champness, A. C. Bloomer, G. Bricogne, P. J. G. Butler, A. Klug, *Nature London* 259 (1976) 20–24.
- [27] P. J. G. Butler, A. C. Bloomer, G. Bricogne, J. N. Champness, J. Graham, H. Guillet, A. Klug, D. Zimmern in R. Markham, R. W. Horne: *Structure-Function Relationships of Proteins*, Elsevier, Amsterdam 1976, S. 101–110.
- [28] G. Lebeurier, A. Nicolaieff, K. E. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 149–153.
- [29] P. J. G. Butler, J. T. Finch, D. Zimmern, *Nature London* 265 (1977) 217–219.
- [30] D. L. D. Caspar, A. Klug, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27 (1962) 1–24.
- [31] S. Brenner, R. W. Horne, *Biochim. Biophys. Acta* 34 (1959) 103–110.
- [32] A. Klug, J. T. Finch, *J. Mol. Biol.* 11 (1965) 403–423.
- [33] A. Klug, J. E. Berger, *J. Mol. Biol.* 10 (1964) 565–569.
- [34] A. Klug, D. J. DeRosier, *Nature London* 212 (1966) 29–32.
- [35] D. J. DeRosier, A. Klug, *J. Mol. Biol.* 65 (1972) 469–488.
- [36] D. J. DeRosier, A. Klug, *Nature London* 217 (1968) 130–134.
- [37] R. A. Crowther, D. J. DeRosier, A. Klug, *Proc. R. Soc. London Ser. A* 317 (1970) 319–340.
- [38] R. A. Crowther, L. A. Amos, J. T. Finch, D. J. DeRosier, A. Klug, *Nature London* 226 (1970) 421–425.
- [39] R. A. Crowther, L. A. Amos, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 36 (1971) 489–494.
- [40] P. N. T. Unwin, *J. Mol. Biol.* 87 (1974) 657–670.
- [41] K. A. Taylor, R. M. Glaeser, *J. Ultrastruct. Res.* 55 (1976) 448–456.
- [42] P. N. T. Unwin, R. Henderson, *J. Mol. Biol.* 94 (1975) 425–440.
- [43] R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Nature* 257 (1975) 28–32.
- [44] P. N. T. Unwin, *Proc. R. Soc. London Ser. A* 329 (1972) 327–359.
- [45] H. P. Erickson, A. Klug, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 74 (1970) 1129–1137; *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 261 (1971) 105–118.
- [46] M. H. F. Wilkins, G. Zubay, H. R. Wilson, *J. Mol. Biol.* 1 (1959) 179–185.
- [47] V. Luzzati, A. Nicolaieff, *J. Mol. Biol.* 1 (1959) 127–133.
- [48] D. R. Hewish, L. A. Burgoine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52 (1973) 504–510.
- [49] M. Noll, *Nature London* 251 (1974) 249–251.
- [50] R. D. Kornberg, J. O. Thomas, *Science* 184 (1974) 865–868.
- [51] R. D. Kornberg, *Science* 184 (1974) 868–871.
- [52] M. Noll, R. D. Kornberg, *J. Mol. Biol.* 109 (1977) 393–404.
- [53] J. T. Finch, L. C. Lutter, D. Rhodes, R. S. Brown, B. Rushton, M. Levitt, A. Klug, *Nature London* 269 (1977) 29–36.
- [54] J. T. Finch, A. Klug, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42 (1978) 1–15.
- [55] L. C. Lutter, *J. Mol. Biol.* 124 (1978) 391–420.
- [56] J. T. Finch, R. S. Brown, D. Rhodes, T. Richmond, B. Rushton, L. C. Lutter, A. Klug, *J. Mol. Biol.* 145 (1981) 757–769.
- [57] J. T. Finch, A. Lewitt-Bentley, G. A. Bentley, M. Roth, P. A. Timmins, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 290 (1980) 635–638.
- [58] J. O. Thomas, R. D. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2626–2630.
- [59] A. Klug, D. Rhodes, J. Smith, J. T. Finch, J. O. Thomas, *Nature London* 287 (1980) 509–516.
- [60] A. D. Mirzabekov, V. V. Shick, A. V. Belyavsky, S. G. Bavykin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4184–4188.
- [61] R. D. Camerini-Otero, G. Felsenfeld, *Nucleic Acids Res.* 4 (1977) 1159–1181.
- [62] J. O. Thomas, R. D. Kornberg, *FEBS Lett.* 58 (1975) 353–358.
- [63] J. T. Finch, A. Klug, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1897–1901.
- [64] L. Sperling, A. Klug, *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 253–263.
- [65] R. T. Simpson, *Biochemistry* 17 (1978) 5524–5531.
- [66] F. Thoma, Th. Koller, A. Klug, *J. Cell Biol.* 83 (1979) 403–427.
- [67] J. O. Thomas, A. J. A. Khazaba, *Eur. J. Biochem.* 112 (1980) 501–511.
- [68] A. Worcel, S. Han, M. L. Wong, *Cell* 15 (1978) 969–977.
- [69] T. Senshu, M. Fukuda, M. Ohashi, *J. Biochem. Tokyo* 84 (1978) 985–988.
- [70] C. Cremisi, M. Yaniv, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92 (1980) 1117–1123.
- [71] A. Klug, D. L. D. Caspar, *Adv. Virus Res.* 7 (1960) 225–325.
- [72] R. C. Crowther, L. A. Amos, *J. Mol. Biol.* 60 (1971) 123–130.
- [73] A. Klug, J. T. Finch, *J. Mol. Biol.* 31 (1968) 1–12.