БИОФИЗИКА

А. М. МИХАЙЛОВ, член-корреспондент АН СССР Б. К. ВАЙНШТЕЙН

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА ХВОСТОВЫХ ОТРОСТКОВ ФАГОВ Т2 И ДД6 ESCHERICHIA COLI В

Существует большой класс биологических объектов, изучение строения которых возможно лишь посредством электронной микроскопии. Однако электронномикроскопическая фотография представляет собой двумерную проекцию объекта, тогда как наибольший интерес представляет именно знание трехмерной структуры.

В последнее время предложен ряд математических методов восстановления трехмерной, пространственной структуры объектов из их проекций, которые позволили изучить структуры некоторых кристаллов и вирусов (¹⁻⁷). В работе (²) методом двойного преобразования Фурье было изучено строение отростка фага Т4. Нами была осуществлена реконструкция растянутого отростка фага Т6 Е. coli В с помощью другого метода — метода синтеза проектирующих функций (³⁻⁵).

Здесь мы даем описание результатов исследования растянутых отростков фагов Т2 и ДД6.

Исследованные нами бактериальные вирусы относятся к группе сложных вирусов. Основными морфологическими компонентами их являются: головка, содержащая нуклеиновую кислоту; отросток, выполняющий функ-

Таблица 1

Параметр	T2	Т4	T6	дд6
 р/q N с/р, Å Длина хвоста, Å Число асимметр. единиц Внешний диаметр хвоста, Å Диаметр осевого канала, Å Внешний диаметр стержня, Å Диаметр спиральных каналов, Å Расстояние от оси хвоста до центраспиральных каналов, Å Ω ⁴ чехол ¹ стержень отросток 	$\begin{array}{r} 7/2 \\ 6 \\ 40 \\ 960 \\ 144 \\ 165-170 \\ 20-25 \\ 70-80 \\ 20 \\ 40-45 \\ 1,3 \\ 1,5 \\ 1,3 \end{array}$	7/2 6 38 812 144 240 30 100 30 65 —	7/2 6 38 812 144 170 25-30 85 20-30 45 1,5 1,5 1,5 1,3-1,4	7,2 6 41,5 996 144 206 35-40 90-100 30 60-65 1,6 1,6 1,6 1,6
	1 1		1	1

Основные параметры растяпутых хвостовых отростков фагов Т2, Т4, Т6, ДД6 E. coli В

цию введения нуклеиновой кислоты в поражаемую клетку; аппарат прикрепления отростка к бактериальной клетке. Отросток состоит из полого цилиндрического стержня с молекулярным весом $2,3 \cdot 10^6 - 3,2 \cdot 10^6$ и чехла, молекулярный вес которого $7,8 \cdot 10^6 - 8,0 \cdot 10^6$. Чехол отростка является сократительным органом и может находиться как в сокращенном, так и в растянутом, характерном для интактной частицы, состоянии. Бактериофаги Т2 и ДД6 Е. coli В относятся к группе Т-четных фагов (⁸).

15* 955

Негативное контрастирование фага Т2 проводили ФВК. Фаг ДД6 окрашивали 2% раствором уранилацетата. Микрофотографии бактериофагов (рис. 1 см. вклейку к стр. 941) получены на приборе JEM-6С при 50 000-кратным увеличении.

Прежде всего производится определение нараметров спиральной симметрии объекта. Для этого используется методика оптической дифракции от микрофотографий объекта (⁵, ⁹). Нахождение параметров спирали следует начинать с величины N, характеризующей заходность. После этого определяются значения остальных параметров: c, p, q — эта методика



Рис. 2. Четыре сечения элементарного диска хвостового отростка фага ДД6 Е. coli В

описана в (5). Здесь с — величина трансляции спирали; р число асимметричных элементарных единиц, приходящихся на период трансляции с; q число витков непрерывной спиприходящихся на перали. Дифракриол трансляции с. ппонные картины были получены на оптическом дифрактометре Института кристаллографии AH CCCP (¹⁰).

Группа симметрии указанных фагов — $s_{p/q}N = s_{7/2}6$ (¹¹, ¹²). Симметрически независимой областью спирального объекта является «элементарная группировка» (¹¹), однако удобно проводить восстановлепие «элементарного диска» вы-

сотой c/p, а всю структуру мыслить в виде стопки идентичных дисков. В нашем случае диск состоит из шести асимметричных единиц и имеет симметрию N = 6. Относительный угловой сдвиг при наложении соседних дисков равен $2\pi q/p \approx 103^{\circ}$. Каждый восьмой диск трансляционно равен первому, т. е. расположен точно под ним в той же угловой ориентации (рис. 1). Трансляционно независимая область спиральной структуры, сдвигом которой вдоль оси отростка описывается весь объект (аналог элементарной ячейки в случае трехмерного кристалла) в соответствии с порядком группы $s_{7/2}6$, в данном случае состоит из n = 42 асимметричных единиц.

Одна проекция объекта (направление проектирования перпендикулярно оси спирали), которой является электронномикроскопическая фотография, содержит в себе p' = pN/n' проекций диска. Здесь n' = 2 при четном N и n = 1 при нечетном N. Так как p = 7, N = 6 (табл. 1), то в пашем случае одна микрофотография отростков T2 и ДДб содержит в себе 21 проекцию элементарного диска с угловым интервалом проектирования $\Delta \varphi = 180: 21 \approx 9^{\circ}$.

Как уже указывалось выше, для определения пространственной структуры отростка достаточно определить структуру одного диска. Толщина диска для T2 составляет 40 Å, а для ДД6 42 Å (табл. 1). Мы нашли их структуры в четырех сечениях на высотах z_1 ; z_2 ; z_3 ; z_4 , отстоящих друг от друга по высоте на c/4p, т. е. для T2 и ДД6 соответственно 10 и 10,5 Å.

Обозначим эти сечения $\rho(xyz_i) = \rho_i(xy)$, где j = 1, 2, 3, 4. Проекции (денситограммы) $L_j^{\varphi_t}(\varphi_i)$ характеризует направление проектирования) для данного сечения j выбираются и располагаются в порядке возрастания i из соответствующего набора денситограмм согласно описанной выше поворотной и винтовой симметрии отростков. Результатом синтеза проектирующих функций является функция $\Sigma(xy)$. В работе (⁴) показано, что $\Sigma(xy)$ является сверткой функций $\rho(xy)$ $\frac{1}{|r|}$ и хорошо воспроизводит ис-

комую функцию $\rho(xy)$. Однако вокруг каждой точки xy и пропорционально ρ в данной точке возникает фон, который быстро спадает по мере удаления от областей значений $\rho(xy)$, не равных нулю. Таким образом

$$\Sigma(xy) = \rho(xy) \frac{1}{|r|} \approx \rho(xy) + \phi_{\text{OH}}.$$
 (1)

Выбор граничной изолинии синтеза, т. е. уровня фона, определялся значениями внешних диаметров отростков, полученных по оптической дифракционной картине и положению максимумов градиента функции суммы. Кроме того, известно (¹), что для белковых молекул отношение объема Ω (Å³) к молекулярному весу M обычно имеет значение около

$$\Omega/M \approx 1.3.$$
 (2)

Используя литературные данные молекулярных весов и вычисленные по полученным в результате синтеза моделей объемы чехла, стержня и от-



Рис. 3. Элементарные диски и общий вид моделей отростка фагов ДД6 (a) и T2 (б)

ростка в целом, мы нашли, что Ω/M в нашем случае лежит в пределах 1,1— 1,6 (табл. 1). Это удовлетворительно согласуется с (2) и подтверждает правильность выбора граничной изолинии синтеза.

Расчет $\rho_j(xy)$, т. е. функций Σ_1 , Σ_2 , Σ_3 , Σ_4 из соответствующих проекционных трансформант был произведен на дискретной гексагональной сетке со стороной ~ 12 Å (в масштабе объекта). Получив синтезы сечений $\rho_j(xy)$ (рис. 2), отстоящих на c/4p вдоль оси объекта, мы представили их пластинами этой толщины и, наложив их одна на другую, получили модели элементарного диска высотой c/p. Модели отростков (рис. 3a, 6) получены в результате наложения таких дисков с относительным угловым поворотом на 103°.

Численные значения основных характеристик, полученных нами для фагов Т2 и ДД6, вместе с нашими данными для фага Т6 (5) и данными Де-Розье и А. Клуга для Т4 (²) приведены в табл. 1. Отростки имеют сходное строение, отличаясь лишь своими размерами. Они имеют цилиндрическую форму, на наружной поверхности которой наблюдается два семейства спиральных желобов, образующих как бы параллелограммы — элементарные ячейки радиальной проекции. На экваторе моделей имеется по шесть элементарных ячеек, соответствующих числу асимметричных единиц в дисках. По оси идет центральный цилиндрический канал, кроме него обнаружено по щесть спиральных каналов, находящихся на некотором расстоянии от оси отростка, что совпадает с соответствующими данными, найденными для фага Т4 (²). Вдоль радиусов отростков наблюдается по два максимума плотности. Один из них непосредственно примыкает к осевому каналу, а второй находится на периферии отростка. Приосевые максимумы соответствуют молекулам белка, образующим стержень фага, а периферийные — чехол. Синтез позволяет предположить, что асимметричные единицы чехла отростков, по-видимому, состоят из двух субъединиц (рис. 2, сечения 1, 4). Разрешение моделей недостаточно для выявления природы мостиков, связывающих стержень с чехлом.

Следует отметить значительное расхождение значений диаметра отростка для фага Т4, полученного Де-Розье и А. Клугом (2R = 240 Å, табл. 1) и литературными электронномикроскопическими данными 2R = 160 - 180 Å (⁸). По-видимому, это можно объяснить тем, что при работе методом двойного преобразования Фурье на первой его стадии – стадии расчета трансформанты Фурье для объекта — приходится сглаживать края экспериментальной микрофотографии введением той или иной специальной функции. Дополнительная ошибка может возникнуть и при обратном преобразовании Фурье, например за счет эффекта обрыва ряда. В нашем же случае такого расхождения не наблюдалось (ср. данные табл. 1) и литературными электронномикроскопическими данными 2R = 160 - 190 Å (⁸, ¹³); для ДД6 2R = 180 - 200 Å (⁸, ¹³)).

Параметры объектов p; N; R_{max} позволяют, работая методом синтеза проектирующих функций, получить разрешение структуры ~ 12 Å. Однако микрофотографии фагов (по данным оптической дифракции) имеют разрешение 20—30 Å. Поэтому мы полагаем, что разрешение моделей отростков фагов T2 и ДД6 E. coli B составляет 20—30 Å.

Институт кристаллографии Академии наук СССР Москва

Поступило

28 X 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Б. К. Вайнштейн и др., Кристаллография, 12, 860 (1967). ² D. J. De Rosier, A. Klug, Nature, 217, 130 (1968). ³ Б. К. Вайнштейн, Кристаллография, 15, 894 (1970). ⁴ Б. К. Вайнштейн, ДАН, 196, 1072 (1971). ⁵ А. М. Михайлов, Б. К. Вайнштейн, Кристаллография, 16, 408 (1971). ⁶ R. A. Crowther, L. A. Amos et al., Nature (London), 226, 421 (1970). ⁷ R. Gordon, R. Bender, G. T. Herman, J. Theoretical Biol., 29, 471 (1970). ⁸ А. С. Тихоненко, Ультраструктура вирусов бактерий, «Наука», 1968. ⁹ А. Klug, D. J. De Rosier, Nature, 212, 29 (1966). ¹⁰ Г. И. Косоуров и др., Кристаллография, 16, 813 (1971). ¹¹ Б. К. Вайнштейн, Дифракция рентисновых лучей на цепных молекулах, Изд. АН СССР, 1963. ¹² А. Klug, F. II. С. Crick, H. W. Wyckoff, Acta crystallogr., 11, 199 (1958). ¹³ Б. Ф. Поглазов, Сборка биологических структур, «Наука», 1970.