

# THE HISTORY OF BIOCHEMISTRY

УДК 577.112+577.15

doi: <https://doi.org/10.15407/ubj92.05.134>

## ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ, МЕХАНІЗМУ ТА РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ У РОБОТАХ НОБЕЛІВСЬКИХ ЛАУРЕАТІВ. К. АНФІНСЕН, С. МУР, В. СТАЙН, С. ПРУЗИНЕР, Є. СКОУ, Д. БОЙЄР, Д. ВОКЕР

Р. П. ВІНОГРАДОВА, В. М. ДАНИЛОВА, С. В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: valdan@biochem.kiev.ua

Отримано: 17 травня 2020; Затверджено: 25 червня 2020

Від часу встановлення протейнової природи ензимів у 40-і роки ХХ ст., про що йшлося в нашій попередній статті, молекулярна структура і конкретний механізм їх дії залишались невідомими. Ці завдання постали перед дослідниками наступних поколінь, які досягли значних успіхів в їх вирішенні. Так, у 1960 р. американські біохіміки С. Мур і В. Стайн встановили повну послідовність амінокислот в ензими рибонуклеазі. Це був один із перших протейнів і перший ензим, в якому було встановлено первинну структуру. За це відкриття в 1972 р. їм було присуджено половину Нобелівської премії з хімії; другу половину за вирішення цієї ж проблеми отримав Крістіан Анфінсен. Роботи нобелівських лауреатів з хімії за 1997 р. – Єнса Крістіана Скоу (відкриття ензиму  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -активованої АТРази) та Пола Бойєра і Джона Вокера (відкриття механізму дії  $\text{H}^+$ -АТР-синтази – найважливішого ензиму біоенергетики) були величезним кроком вперед у розшифруванні механізму дії ензимів – найважливіших компонентів метаболізму в живих організмах. Друга половина ХХ ст. відзначена ще одним видатним відкриттям у галузі біології та медицини – виявленням і дослідженням протейнів – пріонів, які спричиняють спонгіоформні нейродегенеративні енцефалопатії в людей та тварин, за яке американський біохімік Стенлі В. Прузинер у 1997 р. отримав Нобелівську премію з фізіології і медицини. Це відкриття має велике теоретичне значення для біохімічної науки. Розробка нових методів дослідження і особливо їх апаратурне оформлення стали основою для розвитку цих робіт із хімії протейнів, що привело до значних наукових досягнень в цій галузі біохімії та молекулярної біології – «золотої ери» біохімії протейнів.

*Ключові слова:* К. Анфінсен, С. Мур, В. Стайн, С. Прузинер, Є. Скоу, Д. Бойєр, Д. Вокер, рибонуклеаза,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -активована АТРаза,  $\text{H}^+$ -АТР-синтаза, пріони.

**Е**нзими – це біологічні каталізатори-протейни, які утворюються в живих клітинах і мають властивість активувати тисячі хімічних реакцій, з яких складається клітинний обмін. Існування життя зумовлено наявністю протейнів із функціями ензимів, а характер обміну речовин у кожній клітині – наявністю певних ензимів. Різні зміни умов існування організму

спричиняють зміни в ензиматичному апараті клітин.

Каталітична дія ензимів дуже специфічна, ефективна і відбувається за низької температури порівняно з хімічними реакціями і каталізаторами, які використовують у промисловості. Тому механізм дії ензимів цікавить не тільки біологів-біохіміків, але й хіміків. Це необхідно як для ро-

зуміння біохімічних процесів, що відбуваються в живих організмах, так і для створення нових сучасних каталізаторів для хімічної промисловості.

Із часу виникнення цивілізації і дотепер *ензими* широко використовуються людиною в різних галузях промисловості, зокрема у виробстві, виробництві спирту, хлібопеченні, сироварінні, виробництві органічних кислот, амінокислот, чаю, вітамінів, антибіотиків тощо. Дія різних фізіологічно активних речовин, що використовуються в медичній, ветеринарній і агрохімічній практиці, зокрема деяких лікарських речовин, стимуляторів росту рослин, гербіцидів, фунгіцидів, інсектицидів і т.п., полягає в тому, що ці сполуки стимулюють або інгібують ті чи інші ензиматичні процеси. Саме тому дослідження їх впливу має велике значення не тільки для з'ясування механізму дії ензимів, але й для медицини і сільського господарства в цілому.

У ранній період становлення і розвитку ензимології головну увагу науковців було сконцентровано на вивченні ензимів травлення і бродіння; значно пізніше було виявлено важливість внутрішньоклітинних ензимів.

Ще в XVII ст. *Ван Гельмонт* (нід. *Jan Baptist van Helmont*) запропонував термін *ферменти* (від латинських слів *fermentation* – бродіння, *fermentum* – бродило, закваска). Термін *ензими* з'явився пізніше, його запропонував *Вільгельм Кюне* (нім. *Wilhelm Kühne*) в 1876 р. для позначення так званих «неорганізованих» ферментів, що секретуються клітинами тварин (*пепсин*, *трипсин*, *амілаза* тощо). Термін походить від грецької мови ἐν- «в» і ζύμη – «дріжджі», тобто «в дріжджах». Спочатку терміни *ферменти* і *ензими* позначали, начебто, різні сполуки. Але в 1897 р. *Едуард Бухнер* опублікував роботу «Спиртове бродіння без дріжджових клітин», в якій навів експериментальне свідчення того, що екстракт дріжджів здійснює спиртове бродіння так само, як і незруйновані дріжджові клітини. За цю роботу Е. Бухнер був удостоєний Нобелівської премії з хімії в 1907 р. [1]. Зараз терміни «ферменти» і «ензими» використовуються як синоніми, частіше – термін «ензими».

Як ми вже згадували в нашій попередній роботі [2], перший кристалічний ензим – *уреаза* було одержано Дж. Самнером у 1926 р. Вже в 1930 р. Дж. Нортроп ізолював кристалічний *пепсин*, а в 1931 р. Дж. Нортроп разом із М. Кунітцем – кристалічний *трипсин*. Всі очищені

ензими були простими протеїнами. *Роботи цих авторів довели протеїнову природу ензимів, а Дж. Самнер і Д. Нортроп в 1946 р. отримали Нобелівську премію з хімії.* Від того часу ензимологами було проведено велику роботу з виділення кристалічних ензимів.

Проте молекулярна структура і конкретний механізм дії ензимів залишались невідомими. Ці завдання постали перед дослідниками наступних поколінь і певних успішних результатів ними було досягнуто. Так, у 1960 р. американські біохіміки *С. Мур* і *В. Стайн* встановили повну послідовність амінокислот у *рибонуклеазі*. Це був *один з перших протеїнів і перший ензим, для якого було встановлено первинну структуру, тобто послідовність всіх амінокислот.* За це відкриття в 1972 р. С. Муру і В. Стайну було присуджено половину Нобелівської премії з хімії; другу половину було присуджено *Крістіану Анфінсену* за вирішення цієї ж проблеми, а саме «*for work on ribonuclease, especially concerning the connection between the amino acid sequence and the biologically active conformation*».

Оскільки К. Анфінсен був першим в списку лауреатів, то з ним першим і познайомимось.

### Крістіан Бемер Анфінсен



Крістіан Анфінсен (1916–1995) [3]

Американський біохімік **Крістіан Бемер Анфінсен** (англ. *Christian Boehmer Anfinsen*) народився 26.03.1916 р. в маленькому промисловому містечку Монессен недалеко від Піттсбурга (штат Пенсільванія). Його батько, Крістіан Бемер Анфінсен, інженер-механік і мати Софія Рассмуссен були іммігрантами з Норвегії. У 20-х роках ХХ ст. родина переїхала до Філадельфії,

де Крістіан Ансфінсен-молодший вступив до Свортмор-коледжу і де він зацікавився хімією. Пізніше, в 1964 р. К. Ансфінсен скромно відзначав, що в ті роки всі студенти, крім нього, були геніями. Після отримання ступеня бакалавра з хімії в 1937 р. Крістіан продовжив навчання в Пенсільванському університеті, де в 1939 р. отримав ступінь магістра з органічної хімії. Цього ж року він отримав стипендію Американсько-Скандинавського фонду і поїхав до Карлберзької лабораторії в Копенгагені (Данія), де працював під керівництвом фізико-хіміка Кая Ліндерстрома-Ланга (дан. *Kaj Linderstrom-Lang*). Саме він допоміг К. Ансфінсену по-новому подивитись на ензими, як він писав пізніше, «*знявши з цих органічних сполук ... завису таємничості*». Складні політичні обставини, які склались в Європі з початком Другої світової війни, змусили К. Ансфінсена повернутись у 1940 р. до Сполучених штатів [4, 5].

У США К. Ансфінсен отримав стипендію в Гарвардському університеті. За три роки поспіль йому було присуджено ступінь доктора з біохімії і він став викладачем факультету біологічної хімії в Гарвардській медичній школі в Бостоні. У 1944–1946 рр. він працював в Управлінні науково-дослідних і конструкторських робіт США, у 1947–1948 рр. був молодшим дослідником Американського онкологічного товариства при біохімічному відділенні Нобелівського медичного інституту в Швеції, який було відкрито в 1947 р. завдяки підтримці Рокфеллеровського товариства і Національного інституту охорони здоров'я США. В ньому він працював під керівництвом біохіміка, пізніше нобелівського лауреата з фізіології і медицини за 1955 р. «*за відкриття, що стосуються природи і механізму дії окислювальних ензимів*», Акселя Хуго Теодора Теорелля (швед. *Axel Hugo Teodor Theorell*). Наприкінці 40-х років А.Х.Т. Теорелль разом з Брайтоном Чансом з Пенсільванського університету встановив механізм перетворення алкоголю до ацетальдегіду за дії алкогольдегідрогенази [6].

Після повернення до США К. Ансфінсен став ад'юнкт-професором у Гарварді, але в 1950 р. він очолив лабораторію клітинної фізіології та метаболізму в Національному кардіологічному інституті, що входив до складу Ради охорони здоров'я США в Бетесді (штат Меріленд), де працював до 1962 р. Саме в цій лабораторії К. Ансфінсен провів дослідження *структури рибонуклеази*, які були відзначені Нобелівською премією.

Ензими зацікавили К. Ансфінсена від самого початку його наукової діяльності. Так, працюючи над докторською дисертацією, він розробляв методи вимірювання активності ензимів у сітківці ока. На той час було відомо, що ланцюг з амінокислот утворює тривимірну структуру, але чому кожний протеїн утворює певну структуру було невідомо. Також не було визначено повну амінокислотну послідовність у жодному ензимі. К. Ансфінсена зацікавило питання, чому і завдяки яким хімічним зв'язкам протеїни згортаються в різноманітні тривимірні структури, а також який взаємозв'язок існує між структурою і функцією ензимів.

На той час Ф. Сенгер у Кембриджському університеті розробив метод дослідження послідовності амінокислот у протеїнах і використав його для встановлення первинної будови *інсуліну* [2]. К. Ансфінсен вважав, що, застосовуючи методи Сенгера, він зможе синтезувати ланцюг з амінокислот і, приєднуючи послідовно різні амінокислоти одну за іншою, буде вимірювати активність на кожному етапі. Так він зможе точно визначити взаємозв'язок між властивостями ензиму і його будовою. Як модель для своїх досліджень він обрав *рибонуклеазу з підшлункової залози бика*. Вибір цього ензиму був вдалим з практичної точки зору, оскільки компанія з упаковки м'яса в Чикаго «Арморінкорпорейшен» змогла надати К. Ансфінсену лабораторію з джерелом сирого матеріалу. К. Ансфінсен і тодішні аспіранти *Майкл Села* (англ. *Michael Sela*) і *Фред Уайт* (англ. *Fred White*) під час експериментів у лабораторії показали, що амінокислотний ланцюг в активному ензимі згортається в спонтанну форму, яку пізніше він назвав «*нативною конформацією*» ензиму. У статті, яку було надруковано в 1954 р., К. Ансфінсен показав, що *послідовність амінокислот у пептидному ланцюзі визначає його нативну структуру*.

Майже в той самий час дослідницька група Рокфеллеровського інституту (зараз університет) на чолі із *Станфордом Муром* і *Вільямом Х. Стайном* почала роботу з вивчення *структури РНК-ази*. К. Ансфінсен зрозумів, що ця група може визначити амінокислотну послідовність цього ензиму раніше, ніж це зробить він сам, а тому, окрім синтезу рибонуклеази, її дослідження необхідно проводити ширше і в різних умовах.

У 1954 р. Рокфеллеровський фонд нагородив К. Ансфінсена постдоковою стипендією до



лабораторії Карлсберга в Копенгагені, де він працював раніше у 1939–1940 рр. Тут, під керівництвом *Кая Ліндерстрома-Ланга* він вирішив дослідити всю молекулу РНК-ази, спостерігаючи за нею в різних умовах, що спричинювали денатурацію ензиму. Тоді вже було відомо, що одним із факторів, який підтримує третинну будову протеїнів, є наявність *дисульфідних зв'язків* – містків, які утворюються між сірковмісними амінокислотами – *цистеїнами*. Виходячи з цього, К. Анфінсен частково розкрутив РНК-азу, денатурував її та хімічно зруйнував у ній чотири дисульфідні зв'язки і отримав неактивний ланцюг з амінокислот. Потім він з'ясував, що коли таку неупорядковану структуру перевести в хімічне середовище, подібне тому, в якому РНК-аза знаходиться у фізіологічних умовах в організмі, то активна третинна структура починає відновлюватись. Цей докладний фізичний аналіз структури РНК-ази К. Анфінсен опублікував у журналі «*Biochimica et Biophysica Acta*» в 1955 р. (*Studies on the structural basis of ribonucleases activity/ Anfinsen C.B., Harrington W.F., Hvidt Aa., Linderstrom-Lang K., Ottesen M. and Schellman J.*).

У 1962 р. К. Анфінсен остаточно сформулював свою ідею, яку він назвав «*термодинамічною гіпотезою*» згортання протеїну, яка пояснювала *нативну конформацію амінокислотного ланцюга*. Згідно з його уявленням третинна структура активної РНК-ази формується внаслідок перегрупування амінокислот за фізіологічних умов. Ця природна конформація утворюється тому, що вона є термодинамічно найстабільнішою у внутрішньоклітинному середовищі. Отже, молекула протеїну (ензиму) приймає цю форму внаслідок обмеження пептидних зв'язків і завдяки хімічним і фізичним властивостям амінокислот. *Саме амінокислотна послідовність в поліпептидному ланцюзі визначає третинну структуру ензиму і його функціональну активність*. Таємничий складний процес утворення нативної структури протеїнів можна повністю пояснити хімічними і фізичними взаємодіями між бічними групами амінокислот. К. Анфінсен встановив явище, яке зараз має назву «*протеїновий фолдинг*». Результати цих досліджень він опублікував у 1959 р. в своїй амбіційній книзі «*Молекулярні основи еволюції*». В ній він доводив наукову спорідненість між молекулярною генетикою і хімією протеїнів, оскільки вважав, що містика навколо

ДНК знизилася значення протеїнів для живих істот. Хімія протеїнів не отримала тієї наукової уваги, яку вона заслуговувала. До цієї теми він повернувся в 1984 р., коли опублікував статтю «*Класична хімія протеїнів у світі Слайсинга і Сплайсинга*».

У 1962 р. К. Анфінсен перейшов до Гарвардської медичної школи на посаду професора, але вже в 1963 р. став завідувати лабораторією хімічної біології в Національному інституті артриту, метаболізму і захворювань травної системи. У цьому інституті він досліджував структурно-функціональні зв'язки в різних протеїнах. Він відійшов від досліджень РНК-ази підшлункової залози бика і розпочав роботу з бактеріями золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus*). У 1966 р. К. Анфінсен і його колеги виділили РНК-азу з цієї бактерії методом афінної хроматографії, на той час інноваційної лабораторної технології, яка була вперше розроблена в 1951 р. Деном Хемпстоном Кемпбелом – професором Каліфорнійського технологічного інституту. РНК-аза із стафілокока за будовою була простіша за ензим із підшлункової залози бика: в ній не було дисульфідних зв'язків. Завдяки методу афінної хроматографії К. Анфінсен зміг проаналізувати різні фрагменти тривимірного поліпептидного ланцюга. В усіх експериментах фрагментовані ділянки ланцюга згортались в нативну конформацію. У 1966–1967 рр. він встановив повну послідовність 149 амінокислотних залишків у структурі РНК-ази стафілокока.

У 1968 р. К. Анфінсен розпочав роботу, про яку він розповів у січні 1970 р. в інтерв'ю ізраїльському виданню «*Jerusalem Post*»: «*Ми робимо те, що Ви можете назвати молекулярною інженерією. Ми дивимось на структуру ензиму і, наприклад, якщо ми бачимо фрагмент у ланцюзі, який, здається, не робить нічого, то ми подивимось, що відбудеться, якщо ми відщепимо його. Деякі люди вважають, що найважливіші відкриття в галузі молекулярної біології вже зроблено, що на подвійній спіралі все завершено, але я думаю, що фолдинг протеїну тільки відкрив велике поле діяльності для нас*». Він мав на увазі тих, хто працює в галузі хімії протеїнів.

«*За роботу з дослідження рибонуклеази, особливо за взаємозв'язок між послідовністю амінокислот і біологічно активною конформацією*» Крістіан Анфінсен отримав половину Нобелівської премії з хімії за 1972 р., С. Мур і

В. Стайн розділили другу частину премії за аналогічну роботу. У промові під час презентації нобеліантів член Шведської королівської академії наук Б. Г. Мальстрем поздоровив трьох лауреатів, які озброїли інших дослідників «*підходом для вирішення проблем активності ензимів на молекулярному рівні*». Він також відзначив, що особлива зацікавленість К. Анфінсена була сконцентрована на механізмі, який відповідає за конформацію пептидного ланцюга. «*В серії витончених експериментів він показав, що необхідну інформацію закладено в лінійній послідовності амінокислот пептидного ланцюга і що ніякої додаткової генетичної інформації, більшої, чим та, яку закладено в ДНК, непотрібно*».

Після одержання Нобелівської премії К. Анфінсен звернув свою увагу на інтерферон – протеїн, що утворюється в клітинах людини і який стимулює потужну атаку імунної системи організму на віруси та інші хвороботворні об'єкти. У 1974 р. К. Анфінсен і команда молодих дослідників використали афінну хроматографію для одержання великої кількості інтерферону, який раніше могли одержувати в мізерній кількості. В 1979 р. К. Анфінсен вже керував новою командою дослідників, які визначили повну послідовність амінокислотного складу інтерферону. Результати цих робіт було опубліковано ним у 1980 р. в статті у «Хроніках Нью-Йоркської Академії Наук». Потенціал біомедичних висновків у цій роботі був величезним. Фармацевтичні компанії могли легко виробляти інтерферон і розробляти препарати, які мають ґрунтуватись на його антивірусній властивості. Наразі ліки на основі інтерферону, виготовлені за технологією рекомбінантної ДНК, використовуються для лікування деяких пухлин та інфекційних хвороб, а також розсіяного склерозу, гепатиту С, лейкемії та саркоми Капоші. І все це завдяки геніальним роботам біохіміка і хіміка з великої літери Крістіана Анфінсена.

Провівши 1981–1982 рр. як запрошений науковий співробітник в Інституті Вейцмана в Ізраїлі, К. Анфінсен повернувся до США і став професором біології в університеті Джонса Гопкінса (Хопкінса). Його програма досліджень була зосереджена на «гіпертермофільних бактеріях» – *Pyrococcus turiosus*, які живуть і розмножуються за дуже високих температур. Ці незвичайні бактерії зачарували К. Анфінсена і про них він написав: «Ці божевільні тварини,

здається, насолоджуються життям при 350 °С і 300 атмосферах тиску, і вони повинні мати у своєму складі дивовижні протеїни і нуклеїнові кислоти». Він вважав, що біохіміки можуть використати ці термофільні бактерії з практичною метою, як й інтерферон.

До самої своєї смерті, яка сталася 14 травня 1995 р. від серцевого нападу, К. Анфінсен працював над проектом від Національного наукового фонду для одержання ензимів із термофільних бактерій, які б можна було використовувати для детоксикації речовин і радіоактивних сполук, які забруднюють Світовий океан. І це знов була глобальна проблема.

К. Анфінсен багато часу також приділяв гуманітарній і політичній роботі. Так, він брав участь в організаційній роботі над договором від 1963 р. про заборону ядерних випробувань. У травні 1969 р. разом з нобелівським лауреатом Маршалом Ніренбергом він виступав проти бразильського уряду, який репресував своїх відомих учених. Він виступав за підтримку наукового обміну між США і СРСР. Критикував лідерів Бразилії, Мексики, Туреччини і СРСР за гоніння вчених за політичні погляди. Від 1984 до 1989 р. К. Анфінсен був головою Комітету з прав людини Національної академії наук США. У 1981 р. він із членами цього комітету поїхав до Аргентини з метою визволити 12 вчених, які були засуджені військовим урядом. Про цю місію він написав: «На той момент мого життя я не палив протягом 10 років. Але два тижні, що були проведені в Буенос-Айресі повернули мене знову до тютюну як антидоту проти численних інтерв'ю з родичами і державними службовими особами, які відбувались як вдень, так і вночі».

На початку 1980-х років К. Анфінсен виступив проти потенційних зловживань в біотехнології та генній інженерії. В 1983 р. він зауважив, що «дуже мало зусиль витрачається на використання нових біотехнологій в галузі виробництва продуктів харчування і контролю кількості населення. Ми не хочемо пам'ятати, що кількість хворих у світі дійсно досить мала порівняно з кількістю відносно здорових людей, які лягають спати голодними кожну ніч». У 1992 р. він поставив свій підпис під маніфестом «попередження вчених людству» [3].

Отже, поєднання біомедичних досліджень із політичною діяльністю, пов'язаною із захистом прав людини і досягненням соціальної

рівності, зробили Крістіана Анфінсена під час бурхливого наукового прогресу і соціальних перетворень народним вченим.

За свою наукову кар'єру К. Анфінсен опублікував понад 200 статей і монографій, які головним чином стосуються зв'язку між структурою і функцією протеїнів. Більш того, він також є засновником вчення про молекулярну еволюцію, нового біохімічного напрямку в науці. Так, він запропонував нове пояснення процесу біологічної еволюції на прикладі структури ензимів: амінокислотні послідовності в молекулах ензимів можна поділити на дві групи. Перша група амінокислотних послідовностей необхідна для досягнення певної каталітичної активності, тому в процесі еволюції обов'язково зберігається; друга група амінокислотних послідовностей ензимів є «хімічним рудиментом», вона може змінюватись у процесі еволюції. Його монографію «Молекулярні основи еволюції» в 1962 р. було перекладено на російську мову під редакцією акад. В. О. Енгельгардта [3].

К. Анфінсен був редактором журналу «*Advances in Protein Chemistry*» і членом редакційних рад таких відомих наукових видань, як «*Journal of Biological Chemistry*» і «*Proceedings of the National Academy of Sciences*».

У 1996 р. міжнародне товариство The Protein Society заснувало щорічну премію Крістіана Анфінсена, яку присуджують дослідникам за видатні досягнення в протеоміці (науці про протеїни).

К. Анфінсен був членом Національної академії наук США, Американської академії науки і мистецтв, іноземним членом Данської королівської академії наук і членом ради Вейцманівського інституту наук у Роховаті (Ізраїль). Він мав почесні наукові звання багатьох університетів (Джорджтаунського, Пенсільванського, Брандєйського тощо). У 1981 р. Анфінсен став одним із засновників Всесвітньої культурної ради, яка займається підтримкою розповсюдження знань і розвитку взаємовідносин між людьми, країнами, урядами і різними галузями науки [3, 6, 7].

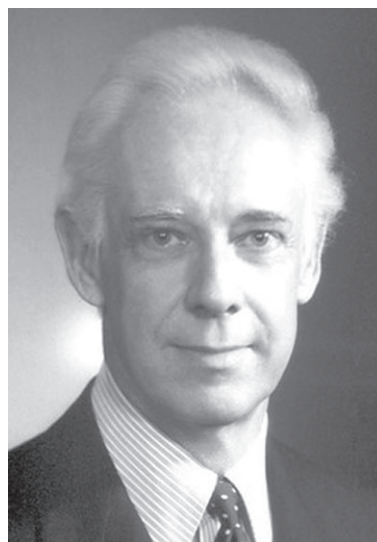
У вільний від роботи час К. Анфінсен займався парусним спортом, слухав музику і грав на фортепіано і віолончелі.

Завершуючи розповідь про К. Анфінсена, ще раз нагадаємо про його видатний внесок у розвиток сучасної біохімії і молекулярної біології, а саме: він дослідив вторинну структуру рибонуклеази, встановив структуру її молеку-

ли – довгий поліпептидний ланцюг, який формує «складки», що з'єднані дисульфідними містками; запропонував спосіб гідролізу окисленої рибонуклеази трипсином із попереднім блокуванням  $\epsilon$ -аміногруп лізину; дослідив залежність біологічної активності ензиму від структури його молекул у просторі, встановив, що за ензиматичну активність відповідає вся молекулярна структура; запропонував хроматографічний метод розділення ензимів на фіксованих аналогах субстрату; розробив метод розгортання ланцюга поліпептиду через відновлення тіогліколевою кислотою дисульфідних зв'язків.

Другу половину Нобелівської премії з хімії за 1972 р. поділили між собою два американські біохіміки *Станфорд Мур* і *Вільям Г. Стайн*.

### Станфорд Мур



Станфорд Мур (1913–1982) [8]

**Станфорд Мур** (англ. *Stanford Moore*) народився 04.09.1913 р. в м. Чикаго (штат Іллінойс) в родині Джона Гоуарда і Рут (Фаулер) Мур. Після його народження батьки переїхали до Нашвіллу (штат Теннессі), де батько викладав право у Вандербілтському університеті. Станфорд виріс в освіченій родині, і рано, завдяки вчителю, ще в середній школі, зацікавився хімією. У 1931 р. Станфорд вступив до Вандербілтського університету і спочатку не знав, що йому обрати – хімію чи авіаційну інженерію. Але після вивчення під керівництвом *Артура Інгерсолла* молекулярної структури хімічних сполук він зупинив свій вибір на *органічній хімії*.

У 1935 р. С. Мур отримав ступінь бакалавра з найвищою відзнакою (*summa cum laude* – лат.)



і стипендію науково-дослідного фонду *Вісконсин Алумені*. Це дало йому можливість продовжити навчання у Вісконсинському університеті, де його безпосереднім керівником був *Карл Пол Лінк*, який перед тим працював в Європі із *Фріцем Преглем* – нобелівським лауреатом з хімії 1923 р. «за винахід методу мікроаналізу органічних речовин». У К. Лінка С. Мур виконав дисертаційну роботу, присвячену дослідженню вуглеводів і похідних бензимидазолу, за яку в 1938 р. отримав докторський ступінь. Ця робота була настільки важливою, що К. Лінк рекомендував С. Мура німецькому хіміку *Максу Бергману*, який приїхав до США для роботи в Рокфеллеровському інституті в Нью-Йорк, як молодого і талановитого вченого. М. Бергман у свій час був помічником великого Еміля Фішера [9] і вважався видатним спеціалістом у галузі хімії протеїнів. Отже, в 1939 р. доля спрямувала С. Мура в Рокфеллеровський інститут на роботу над методом визначення амінокислотного складу протеїнів. Одним із його колег по роботі над цією темою був американський біохімік *Вільям Говард Стайн*.

У 1941 р., коли США вступили в Другу світову війну, С. Мур взяв в Інституті відпустку і пішов служити як молодший офіцер в Управління наукових досліджень і розвитку США, а потім в оперативно-науковий відділ військових сил США на Гавайських островах.

Коли наприкінці війни в 1945 р. С. Мур повернувся з армії, виявилось, що М. Бергман помер і майбутнє молодого вченого в Рокфеллеровському інституті було невизначеним. Директор Інституту *Герберт С. Гассер* (нобелівський лауреат 1944 р. з фізіології та медицині «за відкриття, що має відношення до високодиференційованих функцій окремих нервових волокон») запропонував С. Муру і В. Стайну відновити роботу над розробкою методів кількісного аналізу амінокислот у протеїнах. Вчені отримали в своє розпорядження лабораторію і з ентузіазмом приступили до роботи. На цей час вже було досягнуто певного прогресу у виділенні й очищенні протеїнів. У 1944 р. *Арчер Мартін* (Martin) і *Річард Сінг* (Synge), англійські біохіміки, запропонували для розділення амінокислот метод паперової хроматографії, в якому носієм використовувався фільтрувальний папір. Спочатку вони запропонували метод одновимірної, а пізніше двовимірної хроматографії і в 1952 р. одержали

Нобелівську премію «за відкриття методу розподільної хроматографії» [10]. У той самий час англійський біохімік *Фредерік Сенгер* став використовувати метод паперової хроматографії для з'ясування якісного і кількісного складу амінокислот в інсуліні [2]. Але цей метод був довготривалим і не давав повної уяви про амінокислотний склад протеїнів.

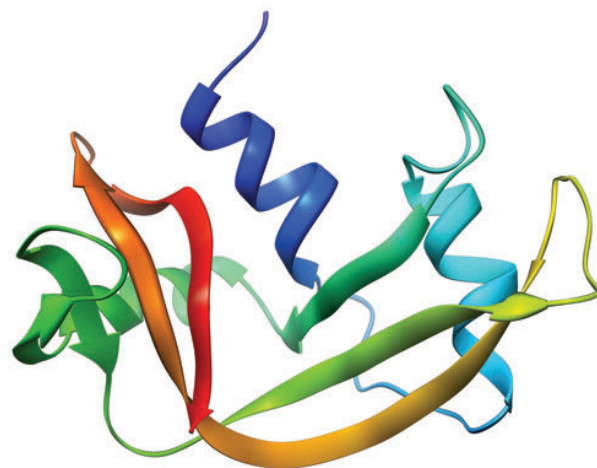
С. Мур і В. Стайн зайнялись пошуком такого методу розділення, який давав би більше інформації про кожну з амінокислот у протеїнах. Вони зупинились на методі *колонкової хроматографії*, який ще на початку століття був запропонований М. С. Цветом. Пропускаючи через колонку з картопляним крохмалем гідролізат протеїнів, С. Мур і В. Стайн вперше в 1948 р. отримали позитивні результати. Але метод колонкової хроматографії є також довготривалим, він займав майже два тижні на експеримент, і тому вчені для досягнення своєї мети стали шукати ефективніші методи. На початку 50-х років ХХ ст. С. Мур і В. Стайн звернули увагу на *метод іонообмінної хроматографії*, в якому також використовується колонка, заповнена іонообмінними смолами, що дає можливість розділяти іони відповідно не тільки до їх заряду, але й за розмірами молекули. Цей аналітичний метод був більш швидким і давав значно якісніше розділення суміші амінокислот. Використовуючи обидва методи колонкової хроматографії, С. Мур і В. Стайн здійснили аналіз амінокислот у багатьох протеїнах [11, 12].

В 1950 р. С. Мур перервав цю роботу, оскільки спочатку шість місяців працював у Вільному університеті в Брюсселі, а потім ще шість місяців провів у Кембриджському університеті (Англія), працюючи із Ф. Сенгером. Після повернення до Рокфеллеровського інституту, С. Мур знову став співпрацювати зі В. Стайном, вивчаючи ензим *рибонуклеазу*. Завдяки роботам Д. Самнера і Д. Норттропа було відомо, що ензими є протеїнами, але відомостей про їхню структуру і механізм дії було спочатку дуже мало [2]. Тому С. Мур разом зі В. Стайном вирішили встановити *взаємозв'язок між будовою і функціонуванням ензиму рибонуклеази*. Для вирішення цієї проблеми необхідно було отримати значну кількість чистого ензиму. В цьому вченим допомогла м'ясопакувальна фірма «*Армор інкорпорейшн*» із Чикаго, яка забезпечила дослідників необхідним матеріалом, а саме, підшлунковою

залозою биків. Першою стадією дослідження всіх протеїнів, і в тому числі рибонуклеази, є їх виділення і очищення. Одержання протеїнів у високоочищеному й індивідуальному стані стало можливим, головним чином, завдяки використанню іонообмінної хроматографії на колонках. Вагомий внесок у розвиток цього методу зробили саме С. Мур і В. Стайн; до того ж вони запропонували фотометричний нінгідриновий метод кількісного визначення амінокислот.

Таким чином, С. Мур і В. Стайн, використовуючи розроблений ними метод іонообмінної хроматографії, отримали достатню кількість високоочищеного препарату ензиму. Потім вони розщепили поліпептидний ланцюг цього ензиму на ділянки, розділили ці ділянки і методом тієї ж іонообмінної хроматографії ідентифікували присутні в них амінокислоти. Цей процес став ще ефективнішим, коли в 1958 р. С. Мур, В. Стайн і Даррел Спекман автоматизували метод іонообмінної хроматографії, створивши добре відомий зараз *аналізатор амінокислот*, який згодом став постійно використовуватись під час досліджень будь-яких протеїнів.

Слід зазначити, що зацікавленість технікою та інженерні знання, які С. Мур отримав в університеті, допомогли йому у конструюванні приладів у науковій роботі та сприяли створенню амінокислотного аналізатора, який став тепер необхідним для роботи в протеїнових лабораторіях усього світу. Завдяки використанню *синтетичних іонообмінників – сульфокатіонітів, коротких колонок і великій швидкості експерименту* стало можливим зменшити час проведення аналізу до декількох годин (замість одного тижня). Тепер вже існують системи, які протягом однієї години дають повний аналіз з автоматичним розрахунком кількості амінокислот у зразках (пробах), які містять усього кілька наномолей амінокислот. І ось у 1960 р. ця група вчених встановила *повну послідовність амінокислот в рибонуклеазі з підшлункової залози бика*. Це був перший ензим і другий протеїн, для якого було встановлено первинну структуру. Одержані результати дали можливість С. Муру і В. Стайну виявити ті амінокислоти, які входять до активного центру рибонуклеази і які безпосередньо взаємодіють з молекулою РНК, розщеплюючи її на фрагменти. *Ензим із підшлункової залози бика має мол. масу 13 683, один поліпептидний ланцюг, який складається із 124 аміно-*



*Структура рибонуклеази А із підшлункової залози бика [13]*

*кислотних залишків*. Роботи С. Мура і В. Стайна стосовно первинної структури рибонуклеази дали можливість у подальшому встановити третинну будову цього ензиму, дослідити механізм його дії, а також здійснити його хімічний синтез (групою Меррифільда).

У 1968 р. С. Мур працював запрошеним професором у медичній школі Вандербілтського університету, після чого повернувся до Рокфеллеровського інституту, де разом з В. Стайном досліджував вже структуру *дезоксирибонуклеази*.

У 1972 р. С. Муру і В. Стайну було присуджено половину Нобелівської премії з хімії «за їх внесок у виявленні зв'язку між хімічною структурою і каталітичною дією активного центру молекули рибонуклеази». Друга половина, як ми зазначали вище, була присуджена К. Анфінсену за роботу, пов'язану з цією ж темою. У промові від імені Шведської королівської академії наук Б. Г. Мальстрем підкреслив, що розуміння каталітичної дії ензиму залежить від встановлення місцезнаходження його активної ділянки. «Завдяки цим дослідженням, – сказав він, – С. Муру і В. Стайну вдалося створити детальну картину активної ділянки рибонуклеази задовго до того, як було встановлено тривимірну структуру цього ензиму» [14].

В своїй нобелівській лекції С. Мур і В. Стайн зазначили, що «існує дуже небагато макромолекул, про які можна говорити з такими деталями, які описано для молекул рибонуклеази або гемоглобіну. Таке знання взаємозв'язку між структурою і функцією є обов'язковим для



раціонального підходу до складного синергізму живих систем».

Після одержання Нобелівської премії С. Мур продовжив дослідження ензимів у Рокфеллеровському інституті. Ідентифікуючи функціональні групи активних центрів ензимів, С. Мур разом із В. Стайном відкрили важливий принцип: *функціональні групи амінокислот, які формують активний центр ензимів, мають аномально високу реакційну здатність порівняно з такими самими амінокислотами у вільному стані*. С. Мур ніколи не був одружений, він всього себе віддавав науковій роботі. Останні роки він страждав від аміотрофічного бічного склерозу – прогресуючого захворювання центральної нервової системи. Доглядати за ним не було кому з рідних, і тому 23 серпня 1982 р. у віці 68 років він покінчив із собою в своєму домі в Нью-Йорку.

С. Мур твердо вірив в те, що *«пізнання людиною людини має вищий пріоритет у дослідженнях, ніж пізнання людиною Всесвіту»*. Крім Нобелівської премії, С. Мур разом з В. Стайном отримав нагороду за досягнення в галузі хроматографії та електрофорезу (1964 р.), медаль Теодора Уільяма Ричардса Американського хімічного товариства (1972 р.), медаль Ліндстрема–Ланга (Копенгаген, 1972 р.). С. Мур мав почесні ступені університетів Брюсселя і Парижа, був членом Американської асоціації сприяння розвитку науки, Американської національної академії наук, Американського хімічного товариства, Американського товариства біологічної хімії і Американської академії наук і мистецтв та ін. [8].

Багаторічним колегою і співавтором в науковій роботі Станфорда Мура був американський біохімік і прекрасний хімік-аналітик *Вільям Стайн*, який і поділив з ним половину Нобелівської премії з хімії в 1972 р.

### **Вільям Говард Стайн**

**Вільям Говард Стайн** (англ. *William Howard Stein*) народився 25.06.1911 р. в Нью-Йорку в родині бізнесмена Фріда М. Стайна і Беатріс (Борг) Стайн. Батьки намагались прищепити сину любов до медицини і фундаментальних наук. Вільям вчився в школі Лінкольна – прогресивному учбовому закладі при вчительському коледжі Колумбійського університету, а коли вчився в останніх двох класах школи, він одночасно хо-



*Вільям Стайн (1911–1980) [15]*

див на заняття до академії Філіпс-Екзестер в Андовері (штат Массачусетс), яка давала класичну англійську освіту. Школа також сприяла розвитку у хлопчика інтересів до мистецтва, музики, літератури і хімії.

У 1929 р. Вільям вступив до Гарвардського університету і за чотири роки отримав ступінь бакалавра з хімії. Вирішивши спеціалізуватись у галузі хімії, він продовжив освіту в аспірантурі Гарвардського університету, але в перший рік встигав так погано, що його ледь не виключили з аспірантури, і він, навіть, думав залишити кар'єру вченого. Але потім вирішив переключитись на біохімію і в 1934 р. перейшов до відділення біохімії професора *К. Кларка* Коледжу лікарів і хірургів Колумбійського університету в Нью-Йорку. В цьому коледжі В. Стайн знайшов ту мотивацію для інтелектуальної діяльності, якої йому не вистачало раніше; і він, за його словами, *«в короткий термін опанував велику кількість літератури»*. За дисертацію, присвячену дослідженню амінокислотного складу протеїну *еластину*, йому в 1938 р. було присуджено докторський ступінь. Його дисертація була кроком вперед у дослідженні таких складних структур, як протеїни.

Після отримання докторського ступеня В. Стайн був прийнятий до Рокфеллеровського інституту медичних досліджень (від 1965 р. – Рокфеллеровський університет) і залишався в ньому до останніх днів свого життя. Від 1954 р. він працював в ньому на посаді професора біохімії. Розпочинав свою наукову діяльність

В. Стайн під керівництвом *Макса Бергмана*, про якого він потім говорив як «*про одного із самих великих спеціалістів ХХ ст. в галузі хімії протеїнів*». У цьому Інституті доля звела його зі *Станфордом Муром* і вони почали спільні дослідження в галузі аналітичної хімії протеїнів і ензимів. Перед ними постало завдання розробити ефективніші методи аналізу амінокислот у протеїнах. Результати роботи, які отримали С. Мур і В. Стайн, великою мірою визначили обличчя сучасної біохімії.

Під час Другої світової війни С. Мур пішов до армії, а В. Стайн з колегами працював над проектами, пов'язаними з військовими завданнями для управління наукових досліджень і розвитку США. У 1945 р. вони обидва повернулись до наукової роботи в галузі досліджень кількісного і якісного аналізу амінокислот в протеїнах у Рокфеллеровському інституті. Про їхню спільну роботу над встановленням послідовності амінокислот в структурі рибонуклеази з підшлункової залози бика ми писали вище.

Отже, на 1960 р. С. Муром і В. Стайном вже було встановлено первинну структуру рибонуклеази, яка має в своєму складі 1876 атомів С, Н, N і S, складається із 124 амінокислотних залишків, а мол. маса її дорівнює 13 683. Завдяки одержаним ними результатам інші вчені Рокфеллеровського університету в 1967 р. змогли встановити тривимірну конфігурацію рибонуклеази та підтвердити передбачення С. Мура і В. Стайна щодо розташування активного центру цієї молекули [16].

У 1972 р. В. Стайну разом із С. Муром було присуджено половину Нобелівської премії з хімії «за внесок у виявлення зв'язку між хімічною структурою і каталітичною дією активного центру молекули рибонуклеази», тобто за дослідження, які вони проводили понад 30 років. В сумісній нобелівській лекції нобеліанти відзначили: «на базі знань структури великих ензимів отримують обґрунтовані принципи розуміння того, як за «задумом» природи каталізатори слугують певним цілям».

Інтерес В. Стайна до розповсюдження наукової інформації сприяв тому, що вчений присвячував значну частину свого часу «*Journal of Biological Chemistry*», в якому він працював редактором, членом редакційної ради і 6 років був головою цієї ради.

У 1969 р. В. Стайн тяжко захворів і, незважаючи на те, що в нього розвився параліч і він

був прикутий до крісла-гойдалки, він зберіг живий інтерес до наукових досліджень до останніх днів життя. Пішов із життя В. Стайн 2 лютого 1980 р. в 68 років.

Крім тих нагород, які В. Стайн отримав разом із С. Муром, слід відзначити, що в 1968–1969 рр. він був головою Комітету з біохімії США, опікуном лікарні Монтефіор і членом консультативної ради медичної школи Ходасса Європейського університету в Єрусалимі [17].

Обидва вчених, Станфорд Мур і Вільям Стайн, прожили по 68 років. Здається не так багато, але завдяки їхній кропіткій роботі з встановлення хімічної структури рибонуклеази і дезоксирибонуклеази було закладено фундамент для широкого фронту робіт із вивчення первинної структури багатьох протеїнів. Розробка нових методів дослідження і особливо апаратурне оформлення їх стали основою для розвитку робіт з хімії протеїнів в усьому світі, що сприяло одержанню значних наукових досягнень в цій галузі біохімії та в молекулярній біології – «золотої ери» біохімії протеїнів.

У 1997 р. Нобелівську премію з фізіології і медицини отримав американський біохімік і невролог, 55-річний тричі професор (з неврології, вірусології і біохімії) *Стенлі В. Прузинер* за сенсаційне відкриття в галузі біохімії протеїнів та інфекційних хвороб, а точніше – «за відкриття пріонів, нового біологічного принципу інфекції».

Хто ж такий цей дослідник і яке саме сенсаційне відкриття він зробив?

### Стенлі Прузинер

**Прузинер Стенлі Бенджамін** (англ. *Stanley Benjamin Prusiner*) народився 28.05.1942 р. в Де-Мойн (штат Айова) в родині єврейських емігрантів із Російської імперії Лоренс (Лоуренс) і Міріам (Спігель) Прузинер. Його батько був архітектором, а під час Другої світової війни служив у ВМС США, брав участь у випробуванні першої американської водневої бомби [19].

У 1952 р. родина Прузинер переїхала до Цинциннаті (штат Огайо). Після закінчення середньої школи Стенлі вступив до Пенсільванського університету, де одержав ступінь бакалавра з хімії. Продовжив навчання в Медичній школі при цьому самому університеті і став доктором медицини. Від 1968 р. він працював три роки в Національному інституті здоров'я США, а в 1972 р. зайняв посаду ординатора-невролога



Стенлі Прузинер (нар. 1942) [18]

в Медичній школі Каліфорнійського університету в Сан-Франциско. В 1980 р. С. Прузинер став професором неврології, а в 1988 р. – професором біохімії [19].

Саме працюючи в Каліфорнійському університеті, Стенлі Прузинер зацікавився пошуком інфекцій, які спричинюють енцефалопатії, такі як хвороба *Крейцфельда–Якоба*. На той час вважали, що цю хворобу спричинює вірус, і він почав шукати цей вірус [19]. Аби оцінити значення роботи С. Прузинера, слід зануритися в історію. Ще задовго до його народження, в 1920 р. німецький нейрофізіолог *Ганс Герхард Крейцфельд* (правильніше *Кройцфельд*) описав незвичайне захворювання в людей: порушення поведінки і зору, координації рухів, епілептичні приступи і внаслідок цього смерть [20]. Через рік його співвітчизник і колега, невропатолог *Альфонс Марія Якоб* також описав це захворювання і пов'язав його з ураженням рогів спинного мозку і пірамідальної системи. Так світ дізнався про *губчасту енцефалопатію*, яка отримала назву *хвороба Крейцфельда–Якоба (ХКЯ)* в людей, а у тварин – *коров'ячий сказ*, або *скреїті (свербець) – хвороба овець та кіз*, відома в Англії від 1732 р.

Наступним дослідником таких хвороб у людей був американський педіатр і вірусолог словако-угорського походження *Деніел Карлтон Гайдушек* (англ. *Daniel Carleton Gajdusek*) [21]. У 1957 р. він вивчав розвиток дітей і населення в Австралії та Новій Гвінеї, яка знаходилось під австралійським протекторатом. Там він познайомився з *Вінсентом Зігасом*, працівником ав-

стралійської служби охорони здоров'я, який розповів Д. Гайдушеку про незвичайне *плем'я форе*, людей, які живуть високо в горах Нової Гвінеї і розвиток яких знаходився на рівні кам'яного віку. Багато членів цього племені страждали смертельним дегенеративним захворюванням мозку, який вони називали «куру» і яке ніколи не було досліджене. Слово «куру» перекладається як «трясіння, дрижання» або «порча». Разом з В. Зігасом Д. Гайдушек провів із племенем майже рік, опанував їхню мову і вивчав незвичайне захворювання. Д. Гайдушек і В. Зігас спочатку вважали, що збудником «куру» є вірус. Але вони не змогли виділити хвороботворний агент, щоб спричинити захворювання в тварин традиційними вірусологічними методами. Оскільки, як правило, хворіли члени однієї родини, вчені припустили складну генетичну природу захворювання. Але в 1959 р. спеціаліст із захворювання нервової системи в тварин Уільям Хадлоу проаналізував результати досліджень «куру» і виявив, що ця хвороба подібна до «свербця», дегенеративного захворювання овець. «Свербець» («скреїті») характеризується виключно довгим інкубаційним періодом. Звичайно між зараженням тварин і появою в них певних симптомів захворювання проходять роки. Тому його збудник отримав назву «повільного вірусу». Хоча ця хвороба передавалась від однієї тварини до іншої, вірусу «свербця» не було виявлено.

Д. Гайдушек зрозумів, що передача захворювання «куру» може відбуватися «повільним вірусом». Справа в тому, що в племені форе спостерігався ритуальний канібалізм: після смерті родича члени його сім'ї, з повагою до нього, їли його головний мозок. Такий звичай був тим шляхом, що забезпечував пряму передачу вірусу [22].

У 1963 р. Д. Гайдушек почав експерименти з пересаджуванням тканини головного мозку людей, які загинули від «куру», до людиноподібних мавп. Через два роки в експериментальних тварин з'явилися ознаки захворювання. Спочатку він ставив досліди на шимпанзе, але потім перейшов і на нижчих мавп.

Досягнуті успіхи поставили перед Д. Гайдушеком і його колегами питання пошуку інших «повільних вірусів». У 1971 р. було встановлено, що ХКЯ, симптоми якої подібні до «куру», може передаватися і тваринам. Проведені Д. Гайдушеком дослідження «свербця», «куру» і ХКЯ по-



казали, що у всіх цих хвороб є низка загальних рис. Всі вони мають довгий інкубаційний період. Збудники цих хвороб, на відміну від звичайних вірусів, не дають імунної реакції: запалення, підвищення температури, вироблення антитіл і інтерферону тощо, в їхній будові не було виявлено ані молекул ДНК, ані РНК. «Повільні віруси» не інактивуються такими лікувальними засобами, як формальдегід, ультрафіолетове проміння, висока температура, які руйнують нуклеїнові кислоти. Крім того, їх наявність в уражених тканинах не виявили, навіть, за допомогою електронного мікроскопа [22, 23].

Всі наведені факти переконали Д. Гайдушка й інших вчених в тому, що «повільні віруси» є принципово новим хвороботворним агентом, а саме інфекційним протеїном [23]. Залишалось незрозумілим, чим саме зумовлені відхилення в утворенні аномальних за формою або за кількістю клітинних протеїнів. Виявилось, що протеїнові тяжі (або бляхи) знаходяться в мозку людей з хворобою Альцгеймера, а також тих, які страждають на старече недоумство.

У 1976 р. Деніел Карлтон Гайдушек розділив Нобелівську премію з фізіології та медицини з Барухом Самуїлом Бламбергом (американським лікарем і вченим) «за відкриття нових механізмів походження і розповсюдження інфекційних захворювань» [24]. Б. С. Бламберг отримав премію «за дослідження носіїв і вірусу гепатиту і за те, що він отримав дані про можливість утворення раку печінки після зараження вірусом гепатиту В». Д. К. Гайдушек був нагороджений не за те, що відкрив походження «куру», а за те, що його дослідження привели «до розпізнання нової категорії людських хвороб, які спричинюють унікальні інфекційні агенти», – сказав у вітальній промові Ерлінг Норбі з Каролінського інституту. А тепер повернемося до робіт Стенлі Прузинера. Як ми вже зазначили вище, він зіткнувся з «повільним вірусом» у 1972 р., коли став працювати у відділенні неврології Каліфорнійського університету (Сан-Франциско). Через два місяці після початку роботи в нього померла пацієнтка з незворотніми ушкодженнями, які було зумовлено хворобою Крейцфельда–Якоба. Тоді він з'ясував, що вчені до цього часу не були впевнені, що цю хворобу спричинюють саме віруси. І молодий амбіційний лікар вирішив встановити молекулярну структуру збудника ХКЯ. Після детального вивчення літератури С. Прузинер

в 1974 р. відкрив свою лабораторію. Для роботи з вивчення ХКЯ він працював за грантом з глутамінового метаболізму. Перша його стаття про виділення нового агента – протеїну пріона – вийшла тільки в 1982 р. Саме С. Прузинер є автором терміну «пріон». Ця назва складається з двох англійських слів: proteinaceous infection – протеїнова інфекція. Стаття викликала резонанс в медичних колах тому що медицина взагалі консервативна, але передбачити, щоб хвороба передавалась тільки протеїнами? Небагато науковців прийняли цю концепцію відразу. Навіть Д. С. Гайдушек так і не прийняв відкриття С. Прузинера до самої смерті в 2008 р. А наука продовжувала розвиватись.

Через деякий час стало зрозумілим, що пріони – це не нова форма життя, а власні протеїни людини, які стали патогенними завдяки зміні їхньої конформації. Ці зміни можуть бути зумовлені різними факторами – від зовнішньої дії до генетичних змін. Майже через десять років С. Прузинер опублікував велику підсумкову роботу в журналі «Science» (1991 р.) – «Молекулярна біологія пріонових хвороб» [25].

У своїй промові на банкеті після вручення Нобелівської премії С. Прузинер сказав: *«Так звані конформаційні хвороби обумовлені трансформациєю  $\alpha$ -спіральних ділянок молекул протеїну в  $\beta$ -структури (листки) з наступною агрегацією і полімеризацією таких молекул в токсичні для клітин амілоїдні сфероїди і фібрили (внутрішньоклітинні депозити, «бляшки»). Список протеїнів, здатних до формування амілоїдних агрегатів, постійно розширюється. Найвідомішими є  $\beta$ -амілоїд і тау-протеїн (хвороба Альцгеймера), пріонний протеїн ХКЯ,  $\alpha$ -синуклеїн (хвороба Паркінсона), гантингтін (хвороба Гантингтона),  $\beta$ -мікроглобулін (діалізний амілоїдоз). Амілоїдози розвиваються повільно, часто десятиліттями. Амілоїдози поділяються на неінфекційні («вікові» нейродегенеративні захворювання) і інфекційні – трансмісивні спонгіоформні (зубчасті) енцефалопатії – це пріонні хвороби куру, ХКЯ, скрепі (свербець) овець та інші. Пріонними є також спадкові захворювання такі, як синдром Герстманна–Штраусслера–Шейнкера і фатальне родинне безсоння»*.

Що ж являють із себе пріони і чим визначається їхня інфекційність?

Збудник пріонних хвороб – це мутантна (інфекційна) форма звичайного протеїну, який

синтезується в багатьох клітинах, але найактивніше в нервовій тканині. Пріони протеїну свавців С. Прузинер назвав – PrP<sup>C</sup> (PrP<sup>C</sup>) – індекс «С» – cellular, клітинний. Цей «нормальний» пріон може переходити в патологічну форму – PrP<sup>Sc</sup> (PrP<sup>Sc</sup> – «sc» від слова «скрепі»). Остання форма протеїну легко агрегує, вона стійка до протеїнази, до різних фізичних факторів і виникає або спонтанно, або через контакт із такою ж формою – PrP<sup>Sc</sup>. Але контактувати мають протеїни з подібною амінокислотною послідовністю, тому випадків міжвидового зараження мало. Молекулярна маса PrP<sup>C</sup> становить 33-35 кДа і він зв'язується з клітинною мембраною завдяки глікоінозитолфосфатидному закорюванню. Первинна структура цієї ізоформи в різних видів тварин досить подібна: в людини він має 253 амінокислотних залишки, у гризунів – 254, в овець – 256. Біологічно активний, «інфекційний пріон» (PrP<sup>Sc</sup>) має мол. масу 27-30 кДа і мало чим відрізняється за амінокислотною послідовністю від звичайного, клітинного PrP<sup>C</sup>. Тоді яким чином нормальний клітинний, низькомолекулярний протеїн (PrP<sup>C</sup>) стає «інфекційним»? З'ясувалось, що вся справа в третинній конформації цих двох протеїнів. Якщо клітинний пріон у своїй будові має чотири  $\alpha$ -спіралі і не має  $\beta$ -листіків, то в «інфекційному» є чотири  $\beta$ -шари і дві  $\alpha$ -спіралі. Тому останній є структурою гідрофобною, на нього не діють протеїнази і його молекули здатні взаємодіяти між собою, утворюючи агрегати («бляшки», «тяжі») [26]. Що провокує перетворення нормальних протеїнів, які виконують якісь важливі функції в клітинах (можливо пов'язані з клітинним циклом, вродженим імунітетом) в патогенні, поки що не відомо. Вважається, що «інфекційність» пріонів й інших амیلіодних протеїнів виявляється тільки разом з іншими молекулами-модуляторами конверсії нормальних протеїнів у патогенні, наприклад, нуклеїнові кислоти і глікозаміноглікани. Взагалі, протеїни, які здатні до агрегації, зустрічаються не тільки в свавців; їхнє еволюційне коріння сягає давнини. Так, амیلіодні агрегати виявлено у дріжджів та міцелярного гриба, але особливих патологічних властивостей вони не мають.

Таким чином, друга половина ХХ ст. відзначена видатним відкриттям у галузі біології та медицини – виявленням і дослідженням протеїнів пріонів, які спричинюють спонгіоформ-

ні нейродегенеративні енцефалопатії в людей та тварин. Це відкриття має велике теоретичне значення для біохімічної науки саме тому, що конформація пріонного протеїну є носієм певної біологічної інформації, а саме інфекційності, всупереч основному постулату молекулярної біології про те, що спадкова інформація передається тільки завдяки нуклеїновим кислотам. Пріони – це не екзотичний випадок, а загальнобіологічне явище.

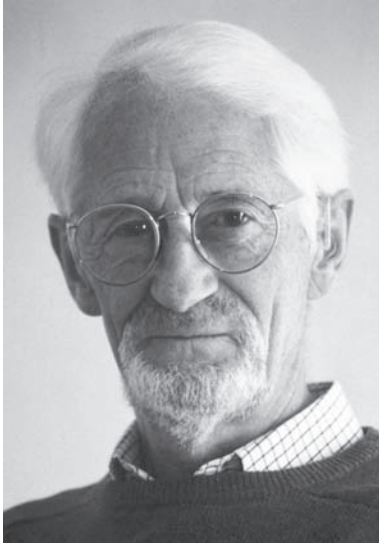
Завершити розповідь про Стенлі Прузинера слід його словами: *«Люди часто запитують мене, чому я став займатися дослідженням такої складної проблеми. Я зазвичай відповідаю, що всього лише декільком вченим випала велика удача досліджувати теми, настільки нові та незвичайні, що тільки невелика кількість людей може оцінити значення таких відкриттів від самого початку. Я – один із тих, дійсно, «везучих» вчених, якому пощастило працювати над такою проблемою – проблемою пріонів».*

Нобелівським лауреатом за 1997 р. з хімії став також біохімік, вчений з Данії Єнс Крістіан Скоу «за відкриття іонтранспортного ензиму, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФ-ази» (for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase). Цю нагороду він чекав довгих сорок років, оскільки перші відомості про відкриття цього ензиму з'явилися ще в далекому 1957 р. в журналі «Biochimica et Biophysica Acta», де він описав властивості цього ензиму і яка стала однією з основних публікацій з біоенергетики. Можна вважати, що Є. Скоу прийшов до біоенергетики разом з виникненням цієї науки.

### Єнс Крістіан Скоу

**Єнс (Йєнс) Крістіан Скоу** (дан. *Jens Christian Skou*) народився 8.10.1918 р. в Лемвічі, містечку на заході Данії. Його батько Магнус Мартінус Скоу разом з братом Пітером торгували лісом і вігуллям, а мати – Ане-Мардрет займалася дітьми (їх було четверо) і брала участь у громадському житті містечка. Коли Єнсу було 12 років, батько помер від пневмонії, і сімейними справами займався дядько з матір'ю.

У 15 років він поїхав до школи-пансіонату в Хаслів, невеличке містечко на острові Зеландія, яку закінчив у 1937 р. Потім Є. Скоу вступив на медичне відділення Копенгагенського університету, який закінчив в 1944 р. Останні роки навчання припали на окупацію Данії німецькими



Єнс Крістіан Скоу (1918–2018) [27]

фашистами. В 1944 р. Є. Скоу вступив до інтернатури при лікарні Х'єрінга на півночі Данії і два роки стажувався головним чином із хірургії, одночасно працюючи в ортопедичній клініці в Оргусі (Орхусі) (дан. Århus). Але в 1947 р. Є. Скоу перейшов до Інституту медичної фізіології при Університеті Оргуса на посаду асистента професора для виконання дисертаційної роботи про знеболювальний і токсичний механізм дії анестетиків. Від 1954 до 1963 р. він був асоційованим професором, від 1963 до 1978 р. – професором відділу фізіології, від 1978 до 1988 р. – професором відділу біофізики Оргуського університету. В 1988 р. пішов на пенсію [28].

Саме з Оргуським університетом пов'язана вся професійна діяльність Є. Скоу. Вивчаючи механізм дії анестетиків, він виявив, що їхня дія пов'язана зі здатністю розчинятись у шарі ліпідів клітинної мембрани і перекривати натрієві канали. Є. Скоу припустив, що цей канал є протейною молекулою і саме його блокування в нейронах приводить до анестезії.

Справа в тому, що в 1950-х роках англійські дослідники Р. Кейнс (англ. Richard Keynes) і Алан Ллойд Ходжкін (англ. Alan Lloyd Hodgkin) – нобелівський лауреат 1963 р. з фізіології та медицини «за відкриття, стосовно іонних механізмів збудження і гальмування в периферичних і центральних ділянках нервових клітин», виявили, що катіон натрію входить у клітину під час збудження нерва і що при цьому використовується АТР. Вони також показали, що перенесення катіона натрію з клітини уповільнюється,

якщо інгібується синтез АТР. Так почало розвиватися уявлення про ензим АТРази, яку вважали відповідальною за синтез АТР.

У 1957 р. Є. Скоу виявив таку АТРази, яка активується катіонами натрію і калію. Так був виявлений перший іонний насос – ензим, який відповідає за прямий транспорт іонів крізь клітинну мембрану. У 1958 р. на конференції у Відні Є. Скоу дізнався про відкриття серцевого глікозиду убаїну, інгібітора натрій-калієвого насоса. Використовуючи убаїн, він швидко довів зв'язок між ензимом АТРазою й іонним каналом і досконало вивчив властивості цього ензиму.

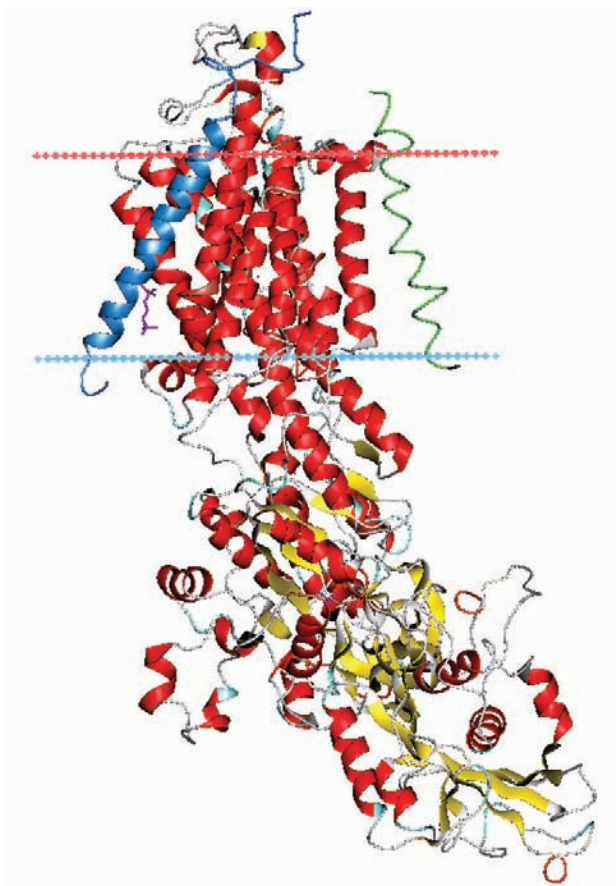
Як же працює цей ензим? Виявилось, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза здатна відкриватися в позаклітинний простір і тоді вона може зв'язати три іони натрію. Коли ензим зв'язується з цими іонами, до нього приєднується молекула АТР. Потім один з фосфат-іонів відщеплюється від молекули АТР і це змінює конформацію ензиму та відкриває вхід до внутрішньоклітинного простору, куди виходять іони натрію. Тепер ензим готовий прийняти два іони калію. Після того як іони калію перекачані в клітину, ензим повертається у вихідний стан і знову готовий прийняти катіони натрію. Коли зв'язуються іони К, то вивільнюється фосфат-іон, який відщепився від АТР. Так, в основному, працює ця «молекулярна машина» під назвою  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТРаза [28].

Отже, Єнс Крістіан Скоу розробив першу схему роботи ензиму і показав властивості проміжного фосфорильованого інтермедіату. Він сформулював принцип конформаційної лабільності  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-ази і показав, що зміна спорідненості ензиму до іонів натрію і калію, що індукується АТР, веде до конформаційних змін в молекулі АТРази, які забезпечують фізичне переміщення іонів крізь мембранний бішар. Завдяки піонерським дослідженням Є. Скоу народилась думка про регуляторну роль АТР, яка є не тільки джерелом енергії, а може бути також модулятором ензиматичної активності. Тепер став зрозумілим механізм перенесення іонів натрію і калію назовні і всередину клітини [29].

Пізніше були відкриті й інші іонні насоси. Всі вони постійно функціонують в живих тканинах. Якщо їх зупинити, то клітина розбухне і, кінець-кінцем, розірветься. Для підтримки роботи іонних каналів необхідна велика кількість енергії – до 1/3 АТР, яка виробляється клітиною.

На роботу іонних насосів впливають різні хімічні речовини. Наприклад, серцеві глікозиди





Структура  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРази [29]

дигіталісу інгібують  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРази, що зумовлює накопичення іонів натрію в клітинах. Використання таких речовин, як лікарські препарати, спричинює посилення активності серцевого м'яза.

Все своє наукове життя Є. Скоу присвятив дослідженню єдиного ензиму –  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРази. Із часом до групи Скоу підключилося багато молодих дослідників, його лабораторія мала контакти із вченими різних країн світу, а він сам багато часу приділяв читанню лекцій за кордоном. Після виходу на пенсію Є. Скоу продовжував наукову роботу: він розробляв комп'ютерну модель загальної реакції, яка відбувається в іонному насосі. Свою останню статтю він опублікував в 2015 р. Улюбленими заняттями його були яхт-спорт і риболовля в фіордах навколо Оргуса, а також класична музика [28, 30].

Пішов із життя Є. Скоу 28 травня 2018 р. у віці 99 років, не доживши до свого століття п'ять місяців.

За своє довге життя він був обраний членом Німецької академії наук Леопольдина, На-

ціональної академії США, Американської академії наук і мистецтв, Європейської організації молекулярної біології, Європейської академії наук, Данської королівської академії наук та ін. [27, 28, 30].

У лабораторії, де в 1957 р. Є. Скоу відкрив натрій-калієвий насос, у співробітництві з групою японських колег було встановлено його кристалічну структуру (2007–2009 рр.).

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТРаза є єдиним ензимом, якому від 1974 р. присвячувались і присвячуються міжнародні конференції, які об'єднують учених, що працюють в цій галузі. Є. Скоу ніколи не виступав як голова цього напрямку, але він завжди був центром інтелектуального притягання.

У 1997 р. Нобелівську премію з хімії «за відкриття ензиматичного характеру синтезу АТФ» (for their elucidation of the enzymatic mechanism underlying the synthesis of adenosine triphosphate (ATP)) отримали ще два дослідники – американський хімік, біохімік-біоенергетик Пол Бойєр і англійський молекулярний біолог, хімік Джон Вокер.

#### Пол Делос Бойєр

**Пол Делос Бойєр** (англ. *Paul Delos Boyer*) народився 31.07.1918 р. в містечку Прово, штат Юта (США), який було засновано мормонами за 70 років до його народження. Як пізніше писав П. Бойєр, в цьому місті, який було добре спланованим, зі стабільними районами, з гордістю за свою історію і духом необмежених можливостей, він прожив перший 21 рік. Його батько, Де-



Пол Бойєр (1918–2018) [31]

лос Бойер, походив з нащадків із Голландії та Німеччини, за професією був лікарем-остеопатом. П. Бойер згадував, що «батько навчив мене логічному мисленню, співчуттю, любові до інших, чесності та дисципліні». Мати – Грейс Гаймон була з французьких гугенотів, померла в 1933 р. у віці 45 років від хвороби Аддісона, коли Полу було 15 років. Її смерть стала причиною того, що П. Бойер вирішив зайнятися вивченням біохімії. А перше знайомство з хімією відбулося тоді, коли Полу на Різдво подарували хімічний набір, який зайняв гідне місце в будинку. Державні школи у Прово були високого рівня. Він розпочав навчання в Паркіровській школі, а закінчив Фаррерівську школу у віці 16 років. У характеристиці було відзначено, що він зарекомендував себе як «видатний учень» [32].

Продовжив освіту П. Бойер у коледжі університету імені Бригама Янга (Бригамському молодіжному коледжі). В коледжі добре навчали хімії і математиці: курс з якісного і кількісного аналізу дав йому уявлення про необхідність і красу точних вимірів, але особливе зацікавлення викликав курс з органічної хімії. Біохімії в учбовій програмі коледжу не було. Влітку Пол, як і його однолітки, підробляв, працюючи офіціантом, службовцем у готелі тощо. Після закінчення коледжу П. Бойер отримав стипендію як аспірант Вісконсинського університету в Медісоні, де навесні 1943 р. захистив дисертацію, присвячену дослідженню ензиму піруваткінази. Оскільки йшла Друга світова війна, П. Бойера було включено до військового проекту, який на базі Станфордського університету займався альбумінами крові. Його основним завданням було винайти спосіб стабілізації розчинів протеїнів і він запропонував метод стабілізації додаванням бутирату. Метод було прийнято і він використовується дотепер. Дослідження у Станфорді дали П. Бойеру досвід роботи з протеїнами. Концентрований сироватковий альбумін із плазми крові був ефективним за лікування шоку під час війни [32].

Наприкінці війни П. Бойера запросили на посаду асистента Міннесотського університету, але його мобілізували служити до флоту США, де у нього була своя лабораторія в медичному інституті ВМФ у Бетесді. Менше ніж за рік (в 1946 р.) він переїхав до Міннесоти, де розпочав вивчати механізми дії ензимів, здобувати знання зі структури і функції протеїнів. Зарплата ви-

кладача була невелика і щоб утримувати родину, де було вже троє дітей, П. Бойер працював ще у вільний час сантехніком, водопровідником, електриком, теслярем та на інших роботах.

У 1955 р. П. Бойер отримав стипендію Гуттенхайма і це дало йому можливість рік пропрацювати в Швеції. Для нього цей рік був особливо корисним, оскільки він проводив дослідження в Інституті Веннер-Грена Стокгольмського університету разом з Оловом Ліндбергом і Ларсом Ернстером, а також у Нобелівському медичному інституті, де працював у науковій групі Акселя Хуго Теодора Теорелла [32]. Останній в тому ж 1955 р. став нобелівським лауреатом з фізіології та медицини.

А сам П. Бойер в 1955 р. отримав премію Американського хімічного товариства за вивчення ензимів. У 1956 р. він став професором фонду Хілла і переїхав до філіалу Міннесотського університету в Міннеаполісі. Більшу частину роботи його групи було присвячено різним ензимам, але це не була АТР-синтетаза. Питання про те, як відбувається окисне фосфорилування, одне із самих складних проблем біохімії, турбувало його весь час.

Використовуючи важкий ізотоп кисню ( $^{18}\text{O}$ ) і радіоактивний фосфор ( $^{32}\text{P}$ ) як зонди, об'єднаними зусиллями співробітників і аспірантів П. Бойер відкрив новий тип фосфорилування протеїну, каталітичного проміжного ланцюга в утворенні АТР із фосфорильною групою, приєднаного до залишку гістидину.

Влітку 1963 р. П. Бойер розпочав роботу в новій лабораторії Каліфорнійського університету в Лос-Анджелісі. Тут він зі співробітниками з'ясував, що зв'язаний з ензимом фосфогістидин є проміжною ланкою в циклі фосфорилування лимонної кислоти (цитрату). Це був крок на шляху до майбутнього відкриття.

У 1965 р. П. Бойер прийняв пропозицію стати директором щойно створеного Інституту молекулярної біології в Каліфорнійському університеті в Лос-Анджелісі. Основною метою для створення нового Інституту було посилення фундаментальні дослідження для того, щоб з'ясувати яким чином живі клітини працюють на молекулярному рівні. Дослідження окисного фосфорилування продовжились і вже в 1971 р. він запропонував перший основний постулат у механізмі синтезу АТР: основним етапом, де використовується енергія є не синтез АТР з ADP

і неорганічного фосфату, а процес вивільнення АТР від ензиму.

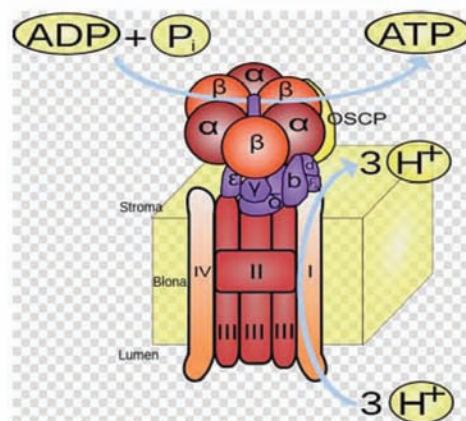
У наступне десятиліття ним було запропоновано дві інші концепції механізму дії АТР-синтази, а саме: три каталітичні сайти ензиму беруть участь у синтезі послідовно й одночасно. Це можна було пояснити, використовуючи ротаційний каталіз. У цей час було успішно досліджено й інші аспекти механізму дії цього ензиму: утворення комплексу з  $Mg^{2+}$ , інгібування АДФ. Подібний механізм та інші властивості синтази, крім синтази мітохондрій ссавців, було виявлено також у хлоропластах, кишковій паличці та в термофільній бактерії Кагави.

Ці роботи П. Бойєра було відзначено нагородою Роуз Американського товариства біохіміків і молекулярних біологів [33].

Що ж із собою являє АТР-синтаза, яка її будова і, головне, як вона працює в клітині, утворюючи велику кількість макроергічної сполуки АТР з точки зору результатів дослідження П. Бойєра?

За його даними вона складається із шести сайтів, які зв'язують нуклеотиди. Три сайти (*a*, *b*, *c*) знаходяться в мембрані дискової частини і мітохондрій, а частина ензиму, яка виступає з мембрани (знаходиться поза нею), складається також із трьох субодиниць –  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ . Під час проходження іонів водню крізь *c*-субодиницю дискової частини у складі мембрани ця частина ензиму починає обертатись. Оскільки  $\gamma$ -субодиниця цієї частини ензиму, що виступає, фіксовано пов'язана з дисковою частиною, то вона обертається також. Верхня частина АТР-синтази, що виступає з мембрани, подібна циліндру і складається з  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиниць (кожні по три). У центрі циліндра знаходиться несиметричної форми  $\gamma$ -субодиниця, обертання якої веде до зміни конформації  $\beta$ -субодиниці. Оскільки  $\gamma$ -субодиниця функціонує як несиметричний вал, то кожна із трьох  $\beta$ -субодиниць вимушена змінювати свою структуру під час її обертів. До однієї з  $\beta$ -субодиниць приєднується молекула АДФ і фосфатон, в другій відбувається синтез АТР, а в третій – вивільнення готової АТР. Внаслідок одного циклу всі три форми міняються місцями і відбувається синтез АТР. Ензим готовий до нового циклу. Таким, в загальних рисах, є механізм роботи АТР-синтази [34, 35].

Отже, обмінно-зв'язувальний механізм, запропонований П. Бойєром для пояснення меха-



Структура  $H^+$ -АТР-синтази [35]

нізму дії АТР-синтази, включає три принципові стадії:

1. Основним етапом, що потребує енергії є не синтез АТР з АДФ і неорганічного фосфату, а процес вивільнення АТР від ензиму.

2. В АТР-синтазному комплексі зв'язування субстратів і вивільнення продуктів реакції відбувається в трьох окремих ділянках ензиму, які не взаємодіють між собою. При цьому кожна каталітична ділянка може існувати тільки в одному з трьох конформаційних станів.

3. Потік іонів водню ( $H^+$ ) крізь протонний канал  $F_0$  за градієнтом електрохімічного потенціалу спричинює обертання  $\gamma$ -субодиниці АТР-синтазного комплексу. Це обертання зумовлює конформаційні зміни в каталітичних ділянках, що дозволяє молекулі АТР вивільнюватись з ензиму, а процесу йти далі [34, 35].

Дві перші стадії отримали багато підтверджень на основі, головним чином, аналізу кінетики процесу і є загальноприйнятими. Підтвердження про обертальний механізм процесу, спряженого між потоком  $H^+$  і синтезом АТР довести було складніше. Це змогла зробити група англійських вчених у лабораторії Джона Вокера в Кембриджі в 1981–1991 рр. Вони провели кристалографічний аналіз структури  $F_1$ -комплексу АТРази мітохондрій бика. Було показано, що в каталітичний комплекс входять три  $\beta$ - і три  $\alpha$ -субодиниці, котрі розташовані, чергуючись подібно часточкам апельсину. Три  $\beta$ -субодиниці відрізняються одна від одної і конформаційно і за зв'язаними з ними нуклеотидами, що підтверджує механізм синтезу АТР за принципом зв'язування – обмін. При цьому  $\gamma$ -субодиниця як



стрижень вставлена в середину каталітичного комплексу. Між  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодинами виявлено високогідрофобні взаємодії, що дає можливість для обертання  $\gamma$ -субодинаці всередині порожнини, утвореної каталітичним центром ензиму. Іншими словами,  $\gamma$ -субодинаця виглядає як молекулярний підшипник, який «змащується» (за обертання) завдяки гідрофобним взаємодіям, що існують в каталітичному центрі ензиму.

Після аналізу кристалічної структури  $F_1$ -комплексу АТРази було знято всі питання стосовно механізму синтезу АТР. Однак остаточний доказ обертання  $\gamma$ -субодинаці в каталітичному центрі ензиму можна було би отримати, якщо б вдалось зареєструвати його візуально. Такий експеримент вдалось провести Масасуке Йошида з колегами в Токійському технологічному інституті в Японії в 1997 р. Вони помітили активний філамент флуоресцентним зондом і «пришили» його до  $\gamma$ -субодинаці АТР-синтазного комплексу. Далі комплекс  $F_1$  було прикріплено до спеціально обробленої скляної поверхні, на якій можливе ковзання. Дослідники припустили, що якщо  $\gamma$ -субодинаця справді здатна обертатися під впливом АТР, то буде обертатися і прикріплений до неї філамент. Оскільки розміри філамента складали близько 1 мкм, його обертання мало бути видно у флуоресцентний мікроскоп. Результати експерименту виявилися приголомшливими. Як тільки до модифікованого комплексу  $F_1$  було додано АТР, активні філаменти почали обертатися по колу із середньою швидкістю 4 оберти за секунду. Оскільки розміри активного філаменту значно перевищували розміри ензимного комплексу, реальна швидкість обертання  $\gamma$ -субодинаці має бути значно більшою. Демонстрація обертального руху  $\gamma$ -субодинаці дозволила остаточно вирішити питання про механізм синтезу АТР в АТР-синтазному комплексі. Автори зняли про це фільм, який став сенсацією в науковому світі [36].

Під керівництвом П. Бойера над проблемою АТР-синтази працювала велика група молодих науковців (в основному аспірантів) з різних країн світу: Туреччини, Ізраїлю, Голландії і з різних університетів США та Великої Британії [32, 33].

Як біохімік він одержав можливість відвідувати різні країни. П. Бойер вважав, що інформація, яку отримує вчений на наукових конференціях і симпозіумах, дуже важлива для прогресу його наукової думки і роботи лабора-

торії. Зустрічі з ученими або візити в лабораторії в Японії, Швеції, Франції, Німеччини, Росії, Італії, Аргентини, Ірану та в інших країнах дали йому можливість обмінюватися інформацією, перевіряти нові ідеї, розширити світогляд, отримати нові перспективи.

Все своє творче життя Пол Бойер фактично присвятив дослідженню щодо з'ясування будови і особливо механізму дії одного єдиного ензиму – АТР-синтази, ензиму, який було названо «полум'яним мотором», одному з найважливіших ензимів.

Саме за «відкриття ензиматичного характеру синтезу АТР-синтази» Пол Бойер разом з англійським біохіміком Джоном Вокером в 1997 р. отримав Нобелівську премію з хімії.

Пішов із життя Пол Бойер 2 червня 2018 р. від дихальної недостатності в Лос-Анджелісі (Каліфорнія, США), не доживши двох місяців до свого 100-ліття. Впродовж життя він був обраний членом Національної академії наук США, Американської академії наук і мистецтв, Американського філософського товариства та інших наукових товариств [33].

У своїй біографії П. Бойер написав: «Дослідження життєвих процесів дало мені глибоку оцінку живої клітини. Прекрасно спостерігати красу, дизайн і елементи управління, відточені за роки еволюції, і здатність людей все більше і більше розуміти життя на планеті Земля. Я твердо вірю, що наші сучасні і майбутні знання всього, чим ми є і що нас оточує, залежить від інструментів і підходів науки».

Разом з П. Бойером Нобелівську премію з хімії в 1997 р. отримав британський молекулярний біолог, хімік, викладач університету Джон Вокер (Уокер) «за встановлення ензимного механізму, який керує синтезом аденозинтрифосфату (АТР)».

### Джон Ернест Вокер

**Джон Вокер**, повністю сер **Джон Ернест Вокер** (англ. *John Ernest Walker*) народився 07.01.1941 р. в Галіфаксі, Йоркшир (Велика Британія). Батько був звичайним каменярем, але талановитим піаністом-любителем і вокалістом. Джон виховувався з двома молодшими сестрами в сільській місцевості і отримав освіту в Растрік гімназії, яка спеціалізувалась на фізичних науках, а останні три роки навчання були присвячені вивченню математики. В 1960 р. Джон всту-



Джон Вокер (нар. 1941) [37]

пив до Оксфордського коледжу Святої Катерини і в 1964 р. отримав ступінь бакалавра з хімії.

У 1965 р. Д. Вокер разом з Е. П. Абрахамом почав дослідження пептидних антибіотиків у школі патології сера Вілліана Данна (Оксфорд) і в 1969 р. отримав ступінь доктора філософії. У цей час він зацікавився молекулярною біологією, чому сприяли дві монографії – «Молекулярна біологія гена» Дж.Д. Вотсона (1965 р.) і «Генетика бактерій» Вільяма Хейза.

Але потім був п'ятирічний період роботи Д. Вокера за кордоном, спочатку в школі фармацевтики при Вісконсинському університеті (1969–1971 рр.), а від 1971 до 1974 р. у Франції в Національному центрі наукових досліджень та Інституті Пастера [37].

На запрошення Фредеріка Сенгера Д. Вокер в 1974 р. розпочав роботу у відділі хімії протеїнів і нуклеїнових кислот у лабораторії молекулярної біології Ради медичних досліджень Кембриджського університету, де і зробив свої видатні відкриття стосовно будови АТР-синтази. Але свою роботу він розпочав із дослідження протеїнів, які кодуються ДНК у деяких бактеріофагах і мітохондріях – органелах, які генерують енергію.

У 1978 р. Д. Вокер вирішив застосувати методи хімії протеїнів у дослідженні мембранних протеїнів, оскільки він вважав це складною і важливою галуззю. Він багато читав наукової літератури і зупинився на дослідженні АТР-синтази. На той час було відомо, що ензими окисного фосфорилювання із внутрішньої сторони мембрани мітохондрій є великими і складними комплексами, але, незважаючи на всю важливість їх, вони практично не були досліджені з хімічної точки зору. Тому Д. Вокер в

тому ж році розпочав структурні дослідження АТР-синтази з мітохондрій серця великої рога-тої худоби і з еубактерій. Ці дослідження привели до повного послідовного аналізу комплексу, який складається з багатьох структур, що дало нове уявлення про те, як АТР синтезується в біологічному світі. Орієнтуючись на хімічний склад ензиму, Д. Вокер визначив послідовність амінокислот протеїнових одиниць синтази [38]. Працюючи з рентгенівськими кристалографами, Д. Вокер у 1994 р., встановив тривимірну структуру ензиму. Він складається з однієї групи протеїнів (частина  $F_0$ ), яка вбудована у внутрішню мембрану і сполучена протеїновим стрижнем з іншою групою протеїнів. Група протеїнів (частина  $F_1$ ) розміщена в матриці органели. Проходження іонів водню крізь мембрану спричинює обертання частини  $F_0$  і ніжки, і це обертання змінює конформацію протеїнів у частині  $F_1$ . Результати Д. Вокера підтвердили «механізм зміни зв'язування», запропонований П. Бойером, який вважав, що ензим функціонує, змінюючи конформацію протеїнів таким чином, щоб змінити їх хімічну спорідненість до АТР і до молекул попередників.

Саме «за встановлення ензиматичного механізму, який керує синтезом аденозинтрифосфату (АТР)» Джон Вокер разом з Полом Бойером отримав Нобелівську премію з хімії в 1997 р.

У 1988 р. Д. Вокер став директором відділу харчування людини в MRC Dunn у Кембриджі. Завдяки його науковим роботам цей відділ у 2009 р. став займатися біохімією мітохондрій і зосередив свою увагу на перетворенні енергії в мітохондріях здорових і хворих людей. Він також керував групою, яка вивчала склад і функції всіх протеїнів мітохондрій. У 2013 р. він пішов з посади директора відділу біології мітохондрій.

Крім Нобелівської премії Д. Вокер отримав ще багато нагород за свою наукову роботу. В 1999 р. він був посвячений в рицарі. В 1995 р. його було обрано членом Королівського товариства і в 2012 р. нагороджено вищою нагородою товариства – медаллю Коплі. Крім того, Д. Вокер у 1959 р. отримав золоту медаль А.Т. Клеа, в 1994 р. – премію Джонсона Пенсільванського університету, в 1995 р. – медаль і премію Біохімічного товариства і медаль Пітера Мітчелла Європейського біоенергетичного конгресу. Він є членом багатьох міжнародних товариств біохіміків і молекулярних біологів [39].

Насамкінець ще раз слід наголосити, що у 70-80-ті роки ХХ ст. П. Бойер і Д. Вокер стали всесвітньовідомими завдяки своїм роботам над протонним насосом, тобто  $H^+$ -АТФ-синтазою – найважливішим ферментом біоенергетики. Після появи революційної хеміосмотичної теорії Пітера Мітчелла [40] головним завданням біоенергетиків було зрозуміти, як цей фермент перетворює електрохімічний градієнт протонів у хімічну енергію АТФ, тобто синтезує АТФ з АДФ і неорганічного фосфату (а може і зворотний процес). Д. Вокер, використавши електронну мікроскопію і рентгеноструктурний аналіз, зміг з'ясувати будову ферменту і підтвердити правильність гіпотези П. Бойєра про триактний алгоритм його роботи. П. Бойєр передбачив, що внутрішня субодиниця протеїну обертається, послідовно змінюючи при цьому конформацію кожного із трьох каталітичних протеїнів. І це було блискучо підтверджено в Японії в 1997 р.

Роботи нобелівських лауреатів з хімії за 1997 р. – Єнса Крістіана Скоу (відкриття ферменту  $Na^+,K^+$ -активованої АТФазу) та Пола Бойєра і Джона Вокера (відкриття механізму дії АТФ-синтази) були величезним кроком вперед у розшифруванні механізму дії ферментів – найважливіших компонентів метаболізму в живих організмах.

#### **RESEARCH ON STRUCTURE, MECHANISM AND REGULATION OF ENZYME ACTIVITY. WORKS OF NOBEL LAUREATES C. ANFINSEN, S. MOORE, W. STEIN, S. PRUSINER, J. SKOU, P. BOYER, J. WALKER**

R. P. Vynogradova, V. M. Danilova,  
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: valdan@biochem.kiev.ua

Although the protein nature of enzymes was identified in the 40s of the 20<sup>th</sup> century, (we wrote about this in our previous article), their molecular structure and the specific mechanism of action remained unknown. Researchers of the next generations faced the challenges and a major breakthrough was achieved. In 1960, American biochemists S. Moore and W. Stein determined the complete amino acid sequence of enzyme ribonuclease. It was one of the first proteins and the first enzyme whose primary

structure was established. In 1972, for this discovery, they received the Nobel Prize in Chemistry jointly to Christian Anfinsen who worked on the same problem. Works of Nobel Laureates in Chemistry in 1997 - Jens Christian Skou (for the discovery of the  $Na^+,K^+$ -activated ATPase), Paul Boyer and John Walker (for the discovery of the mechanism of action of  $H^+$ -ATP synthase - the most important enzyme for bioenergy) were a huge step forward in the deciphering the mechanisms of enzyme action. The second half of the 20<sup>th</sup> century was marked by another outstanding discovery in the field of biology and medicine - the identification and characterization of prions - the proteins that cause neurodegenerative spongiform encephalopathies in humans and animals. For this work, American biochemist Stanley B. Prusiner received the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1997. This discovery is of great theoretical significance for biochemical science. The development of new research methods and technological advances formed the basis for significant scientific achievements in this field of biochemistry and molecular biology. This was the golden era of protein chemistry.

**Keywords:** C. Anfinsen, S. Moore, W. Stein, S. Prusiner, J. Skou, P. Boyer, J. Walker, ribonuclease,  $Na^+,K^+$ -activated ATPase,  $H^+$ -ATP synthase, prions.

#### **References**

1. Danilova VM, Vynogradova RP, Komisarenko SV. The contribution of the Nobel Prize laureates to the development of dynamic biochemistry and bioenergetics. E. Buchner, A. Kossel, R. Willstätter, O. Meyerhof, A. Hill, O. Warburg, A. Szent-Gyorgyi. *Ukr Biochem J.* 2019; 91(1): 108-126.
2. Danilova VM, Vynogradova RP, Komisarenko SV. The contribution of the Nobel prize winners to the study of protein structure: J. Sumner, J. Nortrop, W. Stanley, L. Pouling, F. Sanger, M. Perutz, J. Kendrew. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(4): 127-153.
3. Regime of access : [https://ru.wikipedia.org/wiki/Christian\\_Boehmer\\_Anfinzen](https://ru.wikipedia.org/wiki/Christian_Boehmer_Anfinzen)
4. Anfinsen Christian. Nobel Prize Laureates: Encyclopedia: A-L: Trans. from English. M.: Progress, 1992. P. 29-32.
5. Anfinsen Christian B. Regime of access : [https://www.krugosvet.ru/enc/nauka\\_i\\_tehnika/himiya/Anfinsen\\_Kristian\\_BeMeR.html](https://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/himiya/Anfinsen_Kristian_BeMeR.html).



6. Regime of access : [https://en.wikipedia.org/wiki/Christian\\_B.\\_Anfinsen](https://en.wikipedia.org/wiki/Christian_B._Anfinsen).
7. Regime of access : [https://spravochnik.ru/himiya/kristian\\_bemer\\_anfinsen\\_amerikanskiy\\_biohimik/](https://spravochnik.ru/himiya/kristian_bemer_anfinsen_amerikanskiy_biohimik/)
8. Stanford Moore. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
9. Danylova TV, Komisarenko SV. Scientific investigations of the Nobel prize winner Emil Fischer as a launching pad for the development of biochemistry: a brief overview. *Ukr Biochem J.* 2018; 90(4): 135-142.
10. Grigorieva MV, Danilova VM, Komisarenko SV. Brownian motion, electrophoresis, chromatography, and macromolecular chemistry: how it all unites Nobel laureates of the first half of the 20<sup>th</sup> century – T. Svedberg, A. Tiselius, R. Synge and H. Staudinger. *Ukr Biochem J.* 2019; 91(5): 70-79.
11. Stanford Moore. Nobel Prize Laureates: Encyclopedia: M-Ya: Trans. from English. M.: Progress, 1992. P. 129-131.
12. Regime of access : <http://www.physchem.chimfak.rsu.ru/Source/History/Persones/Moore.html>.
13. Ribonuclease. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
14. Regime of access : <http://www.chem.msu.su/rus/elibrary/nobel/1972-Moor,Stein.html>.
15. William Howard Stein. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
16. Regime of access : [https://www.krugosvet.ru/enc/nauka\\_i\\_tehnika/himiya/Stan\\_Uilyam\\_Houard.html](https://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/himiya/Stan_Uilyam_Houard.html).
17. Regime of access : <https://uk.wikipedia.org/wiki/HIV>.
18. Stanley B. Prusiner Regime of access : <http://cyclowiki.org/wiki/>
19. Stanley Benjamin Prusiner. Regime of access : <https://eleven.co.il/jews-in-world/science/15831/>
20. Hans-Gerhard Creutzfeldt. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
21. Daniel Carleton Gajdusek. Nobel Prize Laureates: Encyclopedia: A-L: Trans. from English. M.: Progress, 1992. P. 300-303.
22. Regime of access : [https://ru.qwe.wiki/wiki/Daniel\\_Carleton\\_Gajdusek](https://ru.qwe.wiki/wiki/Daniel_Carleton_Gajdusek).
23. Vynogradova RP, Berdyshev GD, Veryovka SV. Biochemistry and genetics of prions, pathogens of spongiform encephalopathy. Kyiv, Phyto Sociocenter, 2000. 56 p.
24. Regime of access : [https://uk.wikipedia.org/wiki/Daniel\\_Carleton\\_Gajdusek](https://uk.wikipedia.org/wiki/Daniel_Carleton_Gajdusek).
25. Regime of access : <https://uk.wikipedia.org/wiki/Prion>.
26. Prion. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
27. Jens Christian Skou. Regime of access : <https://rue.wikipedia.org/wiki/>
28. Jens Christian Skou. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
29. Натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
30. Jens C. Skou. Regime of access : <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1997/skou/facts/>
31. Paul Boyer. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
32. Regime of access : [https://www.krugosvet.ru/enc/nauka\\_i\\_tehnika/himiya/BOER\\_POL.html](https://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/himiya/BOER_POL.html)
33. Regime of access : [https://ru.qwe.wiki/wiki/Paul\\_D\\_Boyer](https://ru.qwe.wiki/wiki/Paul_D_Boyer)
34. ATP synthase. Regime of access : <https://vlab.wikia.org/ru/wiki/>
35. ATP synthase. Regime of access : <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
36. Regime of access : [https://www.researchgate.net/scientific-contributions/39109605\\_Masasuke\\_Yoshida](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/39109605_Masasuke_Yoshida)
37. John E. Walker. Regime of access : <https://uk.wikipedia.org/wiki/>
38. Regime of access : [https://ru.qwe.wiki/wiki/John\\_E.\\_Walker](https://ru.qwe.wiki/wiki/John_E._Walker)
39. John Ernest Walker. Regime of access : <http://ru.knowledgr.com/01059947/>
40. Vynogradova RP, Danilova VM, Komisarenko SV. The Nobel laureates' contributions to the study of carbohydrate metabolism and its regulation. A. Harden, H. Euler-Chelpin, C. F. Cori, G. T. Cori, E. Sutherland, L. F. Leloir, H. Krebs, F. Lipmann, P. Mitchell. *Ukr Biochem J.* 2020; 92(1): 135-163.