

# ПРИРОДА

№ 1, 2003 г.

Лауреаты нобелевской премии 2002 г.

Есипов С.Е., Арсеньев А.С.

## **По химии - Дж. Б. Фенн, К. Танака, К. Вютрих**

© “Природа”

Использование и распространение этого материала  
в коммерческих целях  
возможно лишь с разрешения редакции



Сетевая образовательная библиотека “VIVOS VOCO!”  
(грант РФФИ 00-07-90172)

[vivovoco.rsl.ru](http://vivovoco.rsl.ru)  
[vivovoco.usu.ru](http://vivovoco.usu.ru)  
[vivovoco.nns.ru](http://vivovoco.nns.ru)  
[www.ibmh.msk.su/vivovoco](http://www.ibmh.msk.su/vivovoco)

# По химии — Дж.Б.Фенн, К.Танака, К.Вютрих

**Н**обелевская премия по химии за 2002 г. присуждена «за разработку методов идентификации и структурного анализа биологических макромолекул», причем два лауреата — американский химик Дж.Б.Фенн и японский инженер К.Танака — удостоены этой награды «за разработку метода мягкой ионизационной десорбции для масс-спектрометрического анализа биологических макромолекул», а третий лауреат — шведский химик-неорганик К.Вютрих — «за разработку ЯМР-спектроскопии для определения третичной структуры биологических макромолекул в растворе».

Коичи Танака (Koichi Tanaka) родился в 1959 г. в г.Тояма (Япония), окончил университет в Тохоку, работает инженером в корпорации «Шимадзу» в Киото.

Джон Б.Фенн (John B.Fenn) родился в 1917 г. в Нью-Йорке (США). В 1940 г. получил докторскую степень по химии, в 1987 г. — звание заслуженного профессора Яальского университета (штат Коннектикут). С 1994 г. преподает в Государственном университете Виргинии (г.Ричмонд, штат Виргиния).

В 50-х годах исследователи показали, что заряженные продукты (ионы), полученные разрушением исходной молекулы в вакууме пучком электронов, можно анализировать методом масс-спектрометрии и по результатам установить строение органического соединения. Тогда основным источником ионизации был электронный удар, а в ионную форму вещество переводили из газообразного состояния, нагрев пробу до 350—400°C. Поэтому анализ неустойчивых при нагревании и трудно летучих соединений представлял определенные трудности. Позже анализируемые образцы химическим синтезом превращали в более стабильные соединения с повышенной летуче-

стью, для ионизации использовали электронный пучок с энергией 70 эВ. Такие усовершенствования обеспечили хорошо воспроизводимые многолинейчатые масс-спектры, однако определить по ним строение неизвестных веществ было невозможно. Это походило на сборку глиняного горшка, разбитого на тысячи мелких осколков.

Дальнейшие исследования были направлены на поиск условий и создание масс-спектрометров, которые позволили бы изучать неустойчивые соединения без предварительной модификации, разрушать их на небольшое количество фрагментов и получать их молекулярные ионы и масс-спектры. Существенной модификации подвергался лишь источник ионов, где анализируемое вещество превращается в заряженные частицы, но опробовались и более мягкие методы: фотоионизация, полевая десорбция, химическая ионизация, бомбардировка быстрыми атомами, плазменная десорбция, лазерная десорбция/ионизация, ионизация при атмосферном давлении. Все эти методы применяются в современной масс-спектрометрии, с их помощью можно только получать (но не фрагментировать) молекулярные ионы для синтетических и природных органических соединений большинства классов.

Применение мягких методов ионизации анализируемых веществ привело к тому, что масс-спектрометрия потеряла свое значение как структурно-аналитический метод, она превратилась в детектор молекулярных масс. Частично эта потеря была восстановлена, когда появился метод тандемной масс-спектрометрии, позволяющий фрагментировать молекулярный ион соударением его с молекулами инертного газа в специальной камере, которая устанавливается на пути движения

иона к анализатору.

Использовать энергию лазера для испарения образца и его ионизации пытались несколько групп исследователей начиная с 80-х годов. Фокусируя узкий луч лазера на небольшой поверхности жидкого или твердого образца, удавалось перевести какое-то его количество в газообразное состояние без деградации. Русский исследователь В.С.Летоков впервые показал, что такой прием пригоден для ионизации небольших полярных молекул, таких как аминокислоты. В 1985 г. немецкие ученые М.Карас и Ф.Хилленкамп в Мюнстере (ФРГ) обнаружили, что используя некоторые абсорбирующие материалы, можно повысить летучесть полярных веществ небольшой молекулярной массы, однако эти условия не подходили для ионизации крупных молекул.

Через два года эту проблему разрешил К.Танака. Он показал, что для перевода таких высокомолекулярных белков, как химотрипсиноген (25717 Да), карбоксипептидаза А (34472 Да) и цитохром С (12384 Да), в газообразное состояние и формирования ионов необходимо облучать образец лазером с низкой энергией. Танака использовал лазер с длиной волны 330 нм, которая не поглощалась ароматическими аминокислотами белков и пептидов, благодаря чему достигалась минимальная фрагментация макромолекул. Танака растворял анализируемые образцы в глицерине, содержащем коллоидные частицы, именно эта вспомогательная добавка обеспечила основной успех экспериментов. В англоязычной литературе подобную добавку называют матрицей. И хотя матрица Танаки не нашла широкого применения, идею подхватили многие исследовательские группы, в результате был создан метод матрично-акти-



Дж.Б.Фенн

вированной лазерной десорбции и ионизации. Основное требование к матрицам — они должны иметь максимумы поглощения близкие к длине волны используемого лазера. В современных масс-спектрометрах чаще применяется азотный лазер с длиной волны 337 нм. Матрицами для белковой химии служат оксо- и гидроксипроизводные бензойной, коричной и никотиновой кислот.

Комбинация лазерного источника ионизации с времяпролетным масс-анализатором привела к созданию масс-спектрометров, позволяющих определять молекулярные массы до 500 кДа. Большой вклад в повышение разрешающей способности времяпролетных масс-анализаторов внесли русские ученые Б.А.Мамырин, предложивший использовать режим отражения, и А.Ф.Додонов, впервые применивший ортогональный ввод ионов образца. Идеи этих ученых широко используются зарубежными фирмами при изготовлении современных масс-спектрометров для рынка.

В основе работ другого нобелевского лауреата — Дж.Фенна — лежит теория образования заряженных ионов при распылении образца в электрическом поле, раз-



К.Танака

работанная М.Доле в 1968 г. по результатам экспериментов, проведенных Дж.Зелени в 1917 г. Принципиальное отличие такого метода ионизации в том, что в масс-спектрометр вводится не образец для его последующего перевода в газобразное состояние и ионизации, а готовый ион, образующийся в специальной приставке. Она представляет собой пульверизатор, на выходную иглу которого подается напряжение в несколько тысяч вольт, и в зависимости от параметров эксперимента и типа прибора формируются либо кластеры анализируемого соединения с молекулами растворителя, либо «голый» ион вещества, а в случае белков — целый ряд многозарядных ионов.

В лаборатории Фенна в Яале в 1984 г. электропульверизатор был впервые соединен с масс-спектрометром, и четыре года спустя американский химик доложил, что по масс-спектрам многозарядных ионов пептидов и белков можно определять их молекулярные массы с точностью 0.01%. Исследования в Яале были начаты сразу после публикации в 1984 г. работы русских ученых — М.Л.Александрова, Л.Н.Галля, В.Н.Краснова и др. — по ионизации веществ при

атмосферном давлении.

Последующее развитие метода ионизации распылением в электрическом поле направлено на повышение его чувствительности, сокращение объемов анализируемых растворов за счет уменьшения скорости распыляемого потока с десятков микролитров в минуту до нанолитров. По сравнению с методом матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации, разработанным Танакой, метод Фенна более трудоемок и менее производителен, но в сочетании с тандемной масс-спектрометрией дает максимум информации об анализируемом белке, особенно если его строение не известно.

Нобелевская премия — достойная оценка заслуг Танаки и Фенна, давших возможность одному из самых информативных методов инструментального анализа — масс-спектрометрии — изучать жизненные процессы или, как это теперь называют, протеомику. ■

© С.Е.Есипов,

доктор химических наук, профессор  
Институт биоорганической химии  
им.М.М.Шемякина  
и Ю.А.Овчинникова РАН  
Москва



**К**урт Вютрих (Kurt Wüthrich) родился 4 октября 1938 г. в г.Ааберг (Швейцария). В 1962 г. закончил университет в Берне и получил диплом лицензиата по специальности химия-физика-математика. Затем методом ЭПР-спектроскопии изучал комплексы металлов в университете Базеля, где в 1964 г. получил степень доктора философии. В 1965—1967 гг. работал в Калифорнийском университете (Беркли, США) и, изучая комплексы ванадия, впервые познакомился с мощностью ЯМР-спектроскопии. С 1967 г. и по настоящий день Вютрих разрабатывает методы ЯМР-спектроскопии для исследования пространственной структуры белков в растворе. Сначала в лабораториях США, а по возвращении в Швейцарию — в отделе биологии Высшей федеральной технической школы в Цюрихе. Здесь он прошел все ступени научной карьеры — от приват-доцента до профессора (1980). Согласно законам Швейцарии, профессор по достижении 65-летнего возраста должен уйти на пенсию. Однако Вютрих, полный физических сил и творческих замыслов, уже переехал в Калифорнию (США), сохранив лабораторию в Швейцарии (она будет существовать до середины 2003 г.). В отделе структурной биологии Института Скриппса он организовал новую группу для исследования пространственной структуры и функции сигнальных клеточных белков высокоскоростными ЯМР-методами. Сегодня благодаря усилиям Вютриха, его учеников и коллег ЯМР-спектроскопия превратилась в мощнейший метод, призванный расшифровать многие тайны живой природы.

Нобелевский комитет присуждает уже третью премию за работы, связанные с ЯМР-спектроскопией, причем второй премией в 1991 г. награжден соотечественник Вютриха Р.Эрнст (см. об этом: Природа. 1992. №1. С.96—99). Вместе с ним нынешний нобелевский лауреат с 1975 г. работал над расшифровкой третичной структуры белков в растворе методом двумерной ЯМР-спектроскопии, а с середины 80-х годов — трехмерной ЯМР-спектроскопии. По-

этому многие специалисты считали, что уже тогда оба швейцарца заслуживали Нобелевской премии. Но понадобилось еще 11 лет, чтобы заслуги Вютриха признали официально. Правда, за это время в его лаборатории были расшифрованы третичные структуры нескольких десятков белков, усовершенствованы многие эксперименты и найден способ изучения пространственной структуры крупных (до 10 кДа) белковых комплексов, находящихся в растворе.

Первый белок, чья третичная структура была установлена в 1983 г., состоял всего из 35 аминокислотных остатков. В клетке же существуют и гораздо большие молекулы и даже огромные белковые комплексы. Однако исследовать их методом ЯМР-спектроскопии не удавалось. Дело в том, что с увеличением размера макромолекулы ее вращение замедляется пропорционально массе и вязкости среды. В результате сигналы в спектре ЯМР уширяются и наконец становятся настолько широкими, что структурную информацию не удается получить. Проблему несколько ослабили хитрости, связанные с помещением белков в обращенные мицеллы, которые в свою очередь находились в переохлажденном органическом растворителе с низкой вязкостью. Использовались и другие подходы, в том числе разделение сложных белков на домены. Но все это работало в исключительных случаях и не позволяло применять ЯМР-спектроскопию для систем с молекулярной массой, превышающей 50—100 кДа.

Решение было найдено в лаборатории Вютриха. В 1997 г. вместе с коллегами он опубликовал схему экспериментов, по которой можно было оптимизировать релаксацию, т.е. при определенных, созданных в опыте, условиях взаимно уничтожать вклады в релаксацию от диполь-дипольных взаимодействий и от анизотропии химического сдвига. Через два года Вютрих предложил использовать передачу поляризации с помощью кросс-коррелированной релаксации. Потенциально обе идеи должны были



К.Вютрих

обеспечить работу с очень большими молекулярными системами, общая масса которых превышала 1000 кДа. Это теоретически уравнивало возможности ЯМР-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа по размерам исследуемой системы, но сохраняло непревзойденные способности первого метода давать информацию о динамике, а значит, и о механизмах работы сложных макромолекулярных машин. В 2002 г. Вютрих получил спектры ЯМР высокого разрешения от комплекса белков с молекулярной массой 900 кДа.

В настоящее время ЯМР-спектроскопия позволяет исследовать пространственную структуру макромолекул в растворе, т.е. если еще и не в физиологических условиях, то по крайней мере близких к ним. С помощью этого метода можно проследить за «жизнью» каждого атома не только отдельной макромолекулы, но даже целых молекулярных комплексов. Никаким другим способом нельзя проследить за сложной динамической картиной, которую представляют собой функционирующие молекулы. В ходе этого процесса его участники могут менять свою конформацию в зависимости от ситуации, чтобы обеспечить оптимальное взаимодействие с партнером. И только ЯМР-спектроскопия дает информацию о таких событиях. Это в корне отличает метод от прежних

подходов, когда из сложной системы выбиралась одна или две молекулы, исследовалась их пространственная структура и делались выводы о возможной связи между пространственной структурой и функцией.

Изучить такую связь в живой клетке — значит понять, каким образом хитросплетение специфических взаимодействий между разнообразными макромолекулами создает удивительное явление — жизнь.

Сейчас примерно 20% пространственных структур, представленных в белковом банке данных, получено методом ЯМР. Что же дальше? Достиг ли метод своих пределов в исследовании структуры и функции макромолекул? Или

мы вправе ожидать новых достижений этого метода, изменившего лицо традиционной химии 60—70-х годов и биохимии макромолекул 80—90-х? Видимо, да. Уже начаты работы, позволяющие получать спектры от белков, находящихся в самой клетке. Не исключено, что через 10—15 лет с помощью спектроскопии ЯМР будет построена трехмерная атомная модель живой клетки. Возможны и новые, совершенно неожиданные области применения этого удивительного метода. Без сомнения, лаборатория нынешнего нобелевского лауреата К.Вютриха внесет вклад в развитие ЯМР-спектроскопии в 21-м столетии. ■

© А.С.Арсеньев,

доктор химических наук, профессор

Институт биоорганической химии  
им.М.М.Шемякина  
и Ю.А.Овчинникова РАН  
Москва

## По физиологии и медицине — С.Бреннер, Х.Р.Хорвиц, Дж.Салстон

7 октября 2002 г. Нобелевский комитет по физиологии и медицине в Каролинском институте Стокгольма объявил о присуждении премии С.Бреннеру (S.Brenner), Х.Р.Хорвицу (H.R.Horvitz) и Дж.Салстону (J.Sulston) «за открытие в области генетической регуляции развития органов и запрограммированной смерти клетки».

Тот факт, что онтогенез находится под генетическим контролем, вряд ли мог кого-то удивить даже в далекие уже 70-е годы ушедшего XX в. Такой контроль должен был быть, и нашел его Бреннер, старейший из новых лауреатов (1927 г. рождения). Двое других «нобелевцев», Хорвиц (1947 г. рождения) и Салстон (1942 г. рождения), открыли «гены смерти». Это событие действительно потрясло образованную публику, привыкшую считать, что

в живом организме все призвано поддерживать жизнь и бороться со смертью.

Давно уже было очевидно, что онтогенез невозможен без ликвидации отдельных клеток, участков тканей и даже целых органов, возникающих на определенных этапах индивидуального развития, чтобы затем исчезнуть при формировании взрослого организма. Неясно было лишь, происходит такая ликвидация посредством фагоцитоза или каким-то другим, пока неизвестным путем.

Несомненны заслуги лауреатов в чисто методическом плане. Еще в 70-е годы Бреннер предложил работать на «червячке» — теперь уже весьма знаменитой нематоде *Caenorhabditis elegans*, а его коллеги продемонстрировали огромные преимущества нового объекта биологических исследований. Дело в том, что эта нематода очень

мала (длиной около 1 мм), совершенно прозрачна и живет всего пару недель. Вот почему сравнительно просто удается проследить судьбу каждой из составляющих ее 959 клеток — от оплодотворенной яйцеклетки вплоть до взрослой особи. Применив нехитрый мутаген (метилэтансульфонат), Бреннер получил мутации, останавливающие развитие отдельных этапов онтогенеза, и идентифицировал гены, ответственные за них.

Салстон обратил внимание на то, что взрослая нематода должна была бы состоять из 1090, а не 959 клеток, т.е. 131 клетка исчезает в ходе онтогенеза. Было высказано предположение, что эти клетки погибают, встав на путь запрограммированной смерти (апоптоза). Салстон идентифицировал первый ген клеточного самоубийства — *luc-1*, необходимый для дегградации ДНК в умирающей клетке.