

ENZYMES IN VIVO AND IN VITRO

N. N. CHERNOV

A brief history of enzyme investigation is outlined. Characteristics of the activity of intracellular and extra cellular enzymes are discussed. Some pathological processes which might be caused by errors in the biosynthesis of enzymes are described. New approaches for studying enzyme structure and regulation are examined in terms of their theoretical basis and medical applications.

Описана история исследований ферментов. Обсуждаются отличительные особенности поведения ферментов внутри клетки по сравнению с изолированными ферментами, а также некоторые патологические состояния, связанные с нарушениями синтеза ферментов. Рассмотрены новые подходы к изучению и использованию ферментов.

ФЕРМЕНТЫ В КЛЕТКЕ И ПРОБИРКЕ

Н. Н. ЧЕРНОВ

Российский университет дружбы народов

“О ферментах как и о людях судят по их поведению.”

В.А. Энгельгардт

Одни и те же люди ведут себя по-разному в различных условиях. Их реакции и поведение в изоляции обычно меняются по сравнению с привычной обстановкой. Эту, быть может, весьма отдаленную аналогию можно применить и к ферментам, катализирующим почти все химические реакции в живой клетке. Наука о ферментах называется энзимологией, а не ферментологией (чтобы не смешивать слова с корнями из латинского и греческого языков).

Термины “фермент” и “энзим” давно используются как синонимы (первый в основном в русской и немецкой научной литературе, второй — в англоязычной). А более ста лет назад они отражали различные точки зрения в теоретическом споре Л. Пастера с одной стороны, и М. Бертелло и Ю. Либиха — с другой, о природе спиртового брожения. Собственно ферментами (от лат. fermentum — закваска) называли “организованные ферменты” (то есть сами живые микроорганизмы), а термин энзим (от греч. en — в и zymē — закваска) предложен в 1876 году В. Кюне для “неорганизованных ферментов”, секретируемых клетками, например, в желудок (пепсин) или кишечник (трипсин, амилаза). Через два года после смерти Л. Пастера в 1897 году Э. Бюхнер опубликовал работу “Спиртовое брожение без дрожжевых клеток”, в которой экспериментально показал, что бесклеточный дрожжевой сок осуществляет спиртовое брожение так же, как и неразрушенные дрожжевые клетки. В 1907 году за эту работу он был удостоен Нобелевской премии.

Мне хотелось бы подробно остановиться на этих хорошо известных фактах по трем причинам. Во-первых, в некоторых изданиях, в частности в переводе яркого, сохранившего свою ценность и поныне, учебника для школьников и учителей Г. Богена “Современная биология” (1970 г.) с замечательным предисловием лауреата Нобелевской премии А. Бутенандта наблюдается путаница с историей определения понятий фермент и энзим.

Во-вторых, мне хочется напомнить нашим соотечественникам и особенно молодежи имя русской женщины Марии Михайловны Коркуновой, по мужу Манассеиной (1843 — 1903), которая в 1871 — 1872 году после стажировки в Вене у профессора Ю. Вайснера опубликовала на русском и немецком языках результаты своих опытов, доказывающих образование спирта в суспензии убитых клеток

дрожжей, на 25 лет опередив Э. Бюхнера, знавшего о ее работах. Имя М.М. Манассеиной упоминается в специальных учебниках по биохимии, но почему-то не вошло в отечественные энциклопедии и справочники. Тем более приятно читать в журнале “Биохимия” (№ 1 за 1994 г.) перепечатанную с разрешения Биохимического общества Великобритании статью британского исследователя Джона Лагнадо, посвященную М.М. Манассеиной, озаглавленную “Первым биохимиком была женщина?”

В-третьих, события столетней давности подчеркивают мысль, которая никогда не покидала энзимологов: ферменты внутри клетки и вне ее ведут себя не совсем одинаково. В учебнике “Энзимология”, опубликованном в 1930 году, Дж.Б.С. Холдейн (сохранены орфография и пунктуация переводчика и редактора русского издания 1934 года С.И. Проница) писал: “Пастер был прав относительно всех фактов, которые он приводил, тем не менее и Либих был прав, полагая, что брожение возможно и в отсутствие жизни. С другой стороны, существуют некоторые катализаторы, как, например, гликолиз с помощью эритроцитов, которые по-видимому зависят от клеточной структуры”.

В то время еще не была выяснена белковая природа ферментов. Только-только начинались работы по выделению и очистке индивидуальных ферментов из клеток. При выделении внутриклеточных ферментов следили за их активностью в пробирке, то есть способностью в искусственных условиях превращать добавленный извне субстрат в продукт реакции. Открывали все новые и новые ферменты, и все они неизменно оказывались белками. Периодически в научной литературе появлялись сообщения о том, что удалось открыть новую каталитическую активность, не связанную с белком, однако при дальнейшем исследовании всякий раз оказывалось, что это ферментный белок, способный в ничтожно малом (неопределяемом) количестве катализировать химическую реакцию. Так сложилось представление, что катализ в живой клетке может осуществляться исключительно белками. Поэтому долго не хотели верить в способность некоторых видов молекул РНК осуществлять автокатализ, полагая, что эта функция принадлежит белковой примеси. Только получение активного катализатора путем синтеза его из нуклеотидов доказало существование нового класса биокатализаторов, получивших название рибозимы.

В середине шестидесятых годов казалось, что как только мы изучим структуру и механизм действия ферментов, которые катализируют подавляющее большинство реакций в живом организме, то получим возможность вмешиваться в процессы обмена веществ и корректировать многие его нарушения. Совершенствовались методы очистки ферментов. Автор этих строк 15 лучших лет своей жизни провел в холодной комнате, кропотливо выделяя

различными многостадийными методами чистые ферменты из клеток. Сейчас существует оборудование, позволяющее осуществлять эту процедуру в комфортных условиях, используя всего несколько эффективных стадий очистки. Многие стадии полностью автоматизированы.

Динамику нарастания количества обнаруживаемых в природе ферментов можно представить следующим образом:

Год	1930	1947	1957	1962	1972	1975	1994
Число ферментов	80	200	660	880	1770	2140	3200

Мы смеем думать, что знаем все ферменты, катализирующие химические реакции основных метаболических процессов в клетке, но возможны еще сюрпризы. Доказательством может служить относительно недавнее открытие нового фермента, синтезирующего в нашем организме важный эндогенный регулятор – оксид азота (газ NO) – из хорошо известной аминокислоты аргинина.

Энзимологами всего мира была проделана огромная работа. Установлены аминокислотные последовательности в молекулах многих ферментов, созданы компьютерные базы данных, позволяющие установить гомологии (идентичные последовательности) в строении различных ферментов. При этом оказалось проще идентифицировать последовательности нуклеотидов на уровне гена, чем последовательности аминокислот на уровне закодированного этим геном белка. Следует отдать должное английскому исследователю Ф. Сенгеру, единственному ученому, дважды получившему Нобелевскую премию по химии: в 1958 году за разработку метода определения первичной структуры белков и в 1980 году (совместно с У. Гилбертом и П. Бергом) за экспресс-метод установления последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот.

К настоящему времени для сотен ферментов полностью определена трехмерная пространственная структура с высоким разрешением (0,15 – 0,20 нм) расположения отдельных атомов. Изучены кинетические характеристики и механизмы действия многих ферментов. Результатом всей этой деятельности явился пессимизм в середине восьмидесятых годов. Венгерский энзимолог Петер Фридрих в 1984 году в интересной и содержательной книге “Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы” писал: “Многие биологи придерживаются мнения, что энзимология пережила себя, горячие точки биохимии уже не связаны с энзимологией, и поэтому энзимологи постепенно окажутся в стороне от общего прогресса”. “Не пора ли сказать: “Энзимология сделала свое дело, она является уже завершенной главой биохимии, и биохимик-энзимолог должен уступить место биохимику-технологу или клеточному биологу”, – продолжили эту мысль в

1986 году редакторы русского перевода книги С.Е. Северин и Н.Б. Гусев.

Однако ни сам автор, ни редакторы перевода не разделяли такой мрачной точки зрения, а видели перспективу дальнейших исследований в переходе от энзимологии *in vitro* (в пробирке) к энзимологии *in vivo* (в организме). То есть в переходе от изучения изолированных ферментов к поиску путей исследования их поведения в целой клетке. Что нового произошло за последние 10 лет? Имеющиеся сведения постепенно убеждают нас в том, что ферменты *in vivo* образуют структурные комплексы и ансамбли как друг с другом, так и с частками клеточных и внутриклеточных мембран, с элементами цитоскелета и/или другими молекулами. Даже секретируемые в просвет кишечника внеклеточные ферменты

α -химотрипсин и трипсин адсорбируются (связываются) на поверхности щеточной каемки эпителиальных клеток кишечника. Функциональное значение существования таких ассоциатов пока не ясно, но можно полагать, что образование межмолекулярных и надмолекулярных комплексов изменяет (регулирует) активность ферментов. Учитывая многообразие и сложность внутриклеточных механизмов регуляции действия ферментов (рис. 1), можно себе представить, как далеки мы от полного понимания согласованности этих механизмов. Помочь разобраться в этих вопросах могут новые направления в энзимологии: 1) разработка методов и подходов для исследования ферментов в интактной (неразрушенной) клетке, 2) изучение поведения ферментов в различных модельных системах, 3) ферментная инженерия (конструирование и

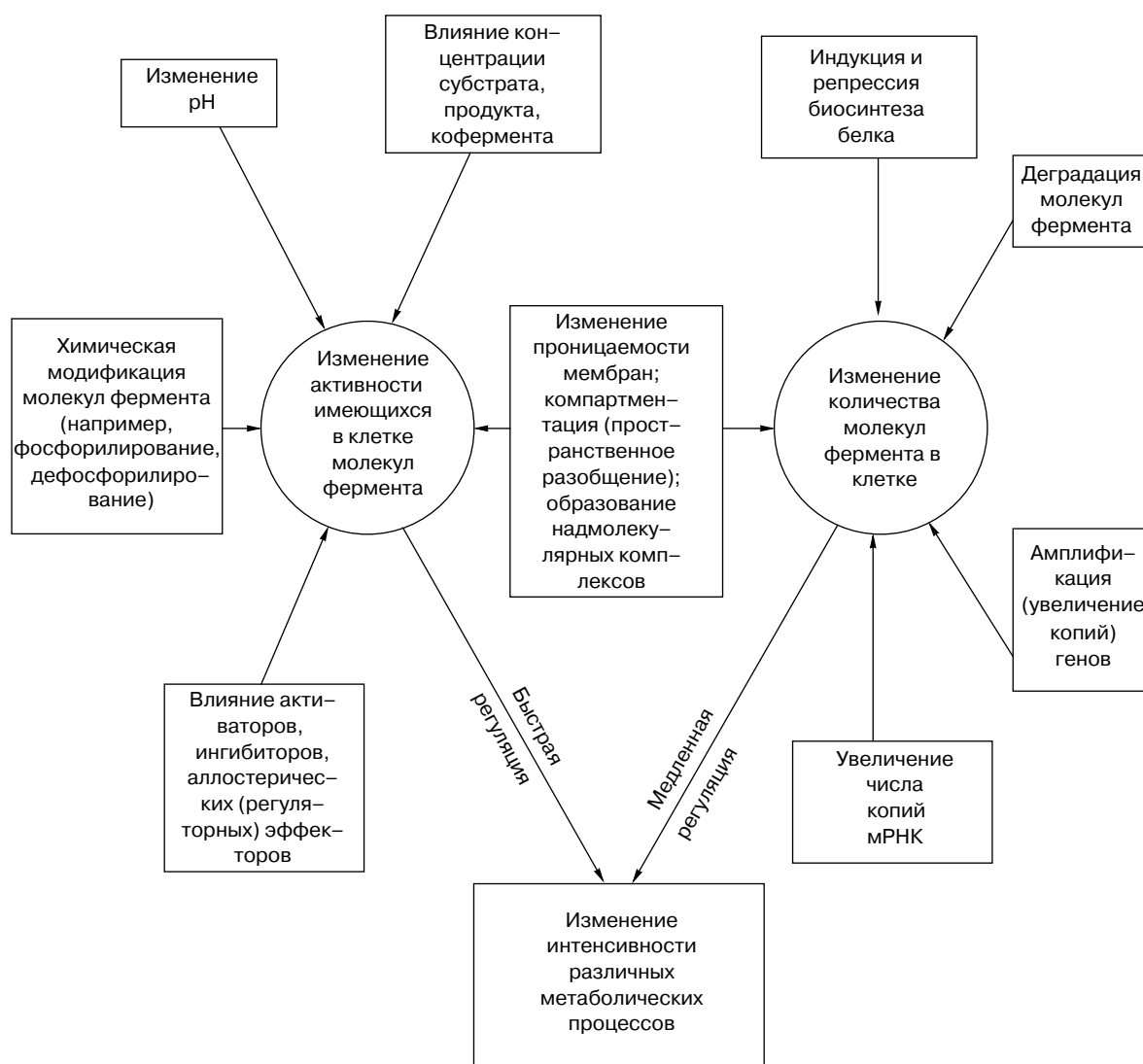


Рис. 1. Схема внутриклеточной регуляции действия ферментов.

реконструкция ферментных комплексов и ансамблей, химическая модификация молекул ферментов, получение искусственных ферментов).

Важную информацию о биологических функциях того или иного фермента дают так называемые “молекулярные болезни”. Термин этот был введен Л. Полингом в пятидесятых годах для обозначения очень редких наследственных заболеваний, вызываемых генетически обусловленными изменениями (нарушениями) строения белковых молекул. О том, что такие болезни существуют, поведал миру А. Гаррод еще в 1908 году. Однако долгое время оставалось тайной то обстоятельство, что их причиной являются мутации в молекуле ДНК и соответствующие замены в аминокислотной последовательности кодируемого белка при переходе с четырехбуквенного языка нуклеиновых кислот (4 азотистых основания) на 20-буквенный язык белков (20 аминокислот). Некоторые из этих мутаций являются летальными (смертельными) еще на эмбриональной стадии, и мы ничего о них не знаем. Другие мутации никак себя не проявляют, и о них мы тоже не догадываемся. В редких случаях удается проследить всю цепочку нарушений: замена нуклеотида в молекуле ДНК → соответствующая аминокислотная замена в белке-ферменте → видоизмененный фермент → отсутствие или нарушение ферментативной реакции → патологические изменения в клетках и тканях → заболевание организма.

Довольно часто нарушения действия фермента не связаны с изменением его каталитической активности. Изменена его способность к регуляции и/или взаимодействию с другими внутриклеточными партнерами протекающей реакции. При определении активности такого фермента в пробирке, в изолированной от клеточного содержимого среде, не всегда удается выявить такие отклонения, поскольку они могут проявляться только внутри клетки. Рассмотрим более подробно один из таких случаев, который характеризует сложные структурно-функциональные взаимоотношения в живом организме.

Существуют ферменты, требующие для проявления своей активности кроме белковой части (апофермента) наличие небелкового компонента (кофермента), предшественником которого часто служат витамины. Активностью обладает только комплекс апофермент–кофермент, называемый холоферментом. Эффект недостаточности такого фермента (вернее, его активности) может наблюдаться в отсутствие кофермента, а также в случае, если затруднено образование активного холофермента. Причины разные, но конечный результат один и тот же.

Студентам-медикам я рассказываю такую гипотетическую историю. К молодому врачу приходит пациент. Жалуется на утомляемость, бессонницу, потерю аппетита и вообще всякого интереса к жизни. Наблюдательный врач сразу замечает характер-

ный симптом – симметричное покраснение кистей рук – признак недостатка одного из витаминов группы В. И думает про себя: “Я тебя, голубчик, быстро вылечу, снова почувствуешь вкус к жизни”. Дело в том, что недостаток или отсутствие этого витамина приводит к недостатку соответствующего кофермента и изменению ферментативных процессов, что сопровождается серьезными нарушениями обмена веществ и тяжелым общим состоянием организма. В большинстве случаев такое состояние быстро улучшается после восстановления пищевой цепочки: витамин → кофермент → холофермент → реакция → эффект. Врач выписывает витамин (обычно поливитамины, так как многие витамины усиливают действие друг друга) и просит зайти через неделю. Через неделю больной приходит – и увы, никакого улучшения. Врач в легком замешательстве: “Возможно, больной не принимал витамин, или препарат был некачественным, а может быть, нарушено всасывание витамина в кишечнике, и лекарство не попадает в организм?” Врач назначает больному внутримышечные инъекции витамина и снова просит зайти через неделю, но через неделю эффект тот же. Врач задумывается: “Витамин в организме бесспорно есть, но, может быть, из него не образуется кофермент?” И назначает инъекции коферментной формы витамина – это дороже, но должно быть эффективнее. Через неделю пациент сообщает, что вроде бы немного полегче, но жить все равно не хочется. Тогда врач, который серьезно изучал в свое время биохимию, понимает, что столкнулся с очень редким явлением. У больного ослаблена способность белка-апофермента соединиться с коферментом. Следовательно, надо повысить концентрацию последнего с тем, чтобы сдвинуть равновесие в сторону образования активного холофермента. И еще через неделю пациент чувствовал себя великолепно.

Примерно так была установлена целесообразность использования в ряде случаев ударной “мега-витаминной терапии” при нарушении кофермент-связывающих участков молекул фермента. Из схемы, приведенной на рис. 2, видно, что один и тот же эффект витаминной недостаточности может наблюдаться при нарушении строения и функционирования различных белков, которые могут принимать участие в последовательных превращениях витамина, попавшего в организм с пищей.

Возможно ли определение активности ферментов непосредственно в клетках организма? Это исключительно сложная задача. Можно приблизительно судить об уровне внутриклеточной активности ферментов (в очень редких случаях), определяя в моче или сыворотке крови непосредственные или отдаленные продукты их деятельности (обычно продукты тут же подвергаются дальнейшим превращениям и определить их уже нельзя). Иногда удается использовать следующий прием. В организм вводят искусственный субстрат определенного фермента,



Рис. 2. Гипотетическая схема превращений молекулы витамина после поступления его с пищей в организм человека. Пунктирными прямоугольниками показано блокирование соответствующей стадии, вызванное нарушением биосинтеза белка.

подобранный с таким расчетом, чтобы продукт его каталитического превращения не подвергался дальнейшим изменениям и полностью выводился из организма в неизменном виде. Часто в таких экспериментах используют радиоактивные изотопы водорода, углерода или фосфора.

Как правило, фермент *in vivo* может катализировать превращение разных субстратов. Совпадает ли субстратная специфичность фермента (избирательность его действия на соединения определенного химического строения) в пробирке и в клетке? Например, фермент гликолиза (реакций последовательного расщепления глюкозы), окисляющий D-глицеральдегид-3-фосфат, может действовать и на другие альдегиды. В мышечных клетках содержание этого фермента очень велико и намного превосходит концентрацию его субстратов (обычно концентрация катализатора низкая). Возможно, это объясняется тем, что необходимо быстро окислить очень активные альдегиды, которые самопроизвольно могут вступать в побочные (нежелательные) химические реакции.

С этим широко распространенным ферментом, называемым глицеральдегидфосфатдегидроге-

назой, легко образуют молекулярные комплексы другие ферменты и внутриклеточные белки. Имеет ли это обстоятельство функциональное значение? Меняется ли субстратная специфичность фермента? Или это неспецифические белок-белковые взаимодействия? Ответить на эти вопросы трудно, так как выделенные из клетки как индивидуальные белки, так и их комплексы могут оказаться артефактом (от лат. *artefactum* — искусственно сделанное), результатом либо распада естественного комплекса, либо, наоборот, нехарактерного объединения изначально изолированных ферментов. Сами методы очистки — разведение, изменение состава среды — могут изменить естественное состояние фермента и его способность к регулирующим воздействиям. Постепенно накапливаются факты, убеждающие нас в реальности существования надмолекулярной структурной организации ферментов в живой клетке. В научной литературе все чаще можно встретить термин “метаболон” (введен в 1985 году П. Шреером) для обозначения комплексов функционально связанных ферментов основных метаболических путей. В этом направлении проводятся интенсивные научные исследования.

Выявить в клетке какой-либо фермент, даже с нарушенной каталитической активностью, можно иммунными методами, получив предварительно высокоспецифичные для данного фермента антитела (по принципу образования комплекса антиген-антитело). Такая техника сейчас хорошо разработана. Еще проще оказалось судить о наличии определенного фермента по соответствующей данному белку нуклеотидной последовательности молекул нуклеиновых кислот.

На основе гибридизационного поиска фрагментов ДНК разработаны чувствительные методы родового выявления возможных наследственных патологий, связанных с нарушениями биосинтеза ферментов. Для этой цели с помощью специальных ферментов — рестриктаз, “разрезающих” молекулу ДНК в строго определенных местах — проводят картирование (идентификацию) участков ДНК, извлеченной из зародышевых клеток, взятых из околоплодной жидкости путем довольно несложной операции. Таким образом, удастся проверить, будет ли синтезироваться интересующий нас фермент и если будет, то нет ли нарушений в его аминокислотной последовательности. Установлено, что белки с подобными нарушениями (ошибки биосинтеза) разрушаются внутри клетки значительно быстрее, чем белки с нормальной последовательностью аминокислот.

Современная биотехнология позволяет оперировать генами и получать штаммы микроорганизмов и линии мышей, у которых отсутствует тот или иной фермент. Наблюдающиеся при этом отклонения помогают проследить функцию отсутствующего фермента. Однако, к удивлению исследователей,

довольно часто не удается выявить изменений у организмов, лишенных какого-либо фермента. Скорее всего, это объясняется либо тем, что неизвестно, где и когда искать нарушения, либо “запуском” в клетке дублирующих механизмов, которые позволяют компенсировать отрицательные последствия, вызванные отсутствием данного фермента.

Технология рекомбинантных ДНК (со встроенными участками чужеродной ДНК), чаще называемая генной инженерией, позволяет уже сейчас получать биокатализаторы, не существующие в природе. Такого же результата можно добиться путем направленного мутагенеза. Для энзимологов весьма плодотворным оказался молекулярно-генетический прием, позволяющий осуществлять строго заданные единичные замены в нуклеотидных последовательностях, кодирующих аминокислотную последовательность белков. Такой метод получения специфических мутаций в нормальных белках называется мутагенез, индуцированный нуклеотидами, или сайт (от англ. site — место) направленный (или сайт-специфический) мутагенез. Применение этого метода показало, что многие мутации несущественны для функционирования белков, но иногда одна единственная аминокислотная замена в белке может изменить его функцию. Путем сайт-специфического мутагенеза удается иногда повысить устойчивость некоторых ферментов к действию высокой температуры, изменениям pH, присутствию пероксида водорода и других денатурирующих агентов.

В сознании специалистов, изучавших биологию до середины семидесятых годов, укоренилось представление о ферментах как о крайне неустойчивых, малодоступных и дорогостоящих соединениях. С тех пор многое изменилось. Усовершенствование способов очистки ферментов снизило их стоимость и повысило доступность. Основные успехи, позволившие широко использовать ферменты, связаны с получением иммобилизованных ферментных препаратов, стабильность которых повышена в сотни и тысячи раз. Достигается такая стабилизация молекул ферментов в результате их “обездвиживания” при соединении с матрицей носителя.

Поиск подходящих матриц и составлял основную сложность технологии воплощения идеи, появившейся еще в конце сороковых годов и реализованной только в начале семидесятых. Как правило, это полимерные молекулы, к которым фермент “пришивается” химическим путем ковалентными связями. В ряде случаев такое соединение возможно за счет электростатических или гидрофобных связей. Способы связывания фермента подбирают с таким расчетом, чтобы сохранить его ферментативную активность. Иногда можно просто инкапсулировать фермент внутри полимерного микроконтейнера, липидного пузырька (липосомы) или обволакивающего гелеобразного соединения. Матрица может быть как растворимой в воде, так и

нерастворимой. Нерастворимые носители позволили использовать ферменты в технологических процессах для производства различных продуктов, которые легко можно отделять от ферментов, а последние использовать вновь и вновь в непрерывном промышленном режиме. Можно иммобилизовать и целые клетки, содержащие технологически нужный фермент. Например, иммобилизованные клетки дрожжей используют при ферментации в производстве этилового спирта. Могли ли мечтать о таких возможностях Л. Пастер и Ю. Либих?

Использование иммобилизованных ферментов помогло в познании деталей ферментативного катализа. Оказалось, что путем иммобилизации можно менять не только стабильность ферментов, но их активность, оптимальные значения температуры и pH, субстратную специфичность и само средство к субстрату. Методом иммобилизации удалось исследовать структуру олигомерных (состоящих из нескольких полипептидных цепей) ферментов и ферментных комплексов.

Эти работы подготовили почву для принципиально новых подходов к исследованию ферментов в гетерогенных модельных системах, в той или иной степени имитирующих ситуацию внутри живой клетки. Перспективным оказалось использование микрогетерогенных систем, включающих в себя поверхностно-активные вещества (структурные аналоги природных липидов), воду и органические растворители. В таких системах фермент работает на границе раздела фаз, внутри так называемых “обращенных” (вывернутых наизнанку) мицелл, окруженных органическим растворителем. Появилось новое направление исследований — “мицеллярная энзимология”.

Ученых не очень удивило, что поведение многих ферментов в таких модельных условиях сильно отличается от того, что наблюдалось в водных растворах. Морально энзимологи были готовы к этому изначально. Однако сказать, в какой мере те или иные модельные условия адекватны происходящему в живой клетке, пока не может никто. Хотелось бы заглянуть внутрь клетки и посмотреть своими глазами, как там работают ферменты? Для этого надо уменьшиться в миллион раз... Но мысленно можно вообразить клетку, увеличенную во столько же раз. Тогда диаметр клетки печени составит 20 м, и клетка станет похожей на лекционный зал. Большой экран на стене, если представить его сферическим, будет похож на ядро. Длина митохондрий составит 1,5 м. В таком масштабе молекулы растворимых глобулярных белков будут похожи на шарики диаметром 0,5 — 1,0 см. Эти шарики будут перемещаться, объединяться в комплексы, соединяться с мембранами и внутриклеточными органеллами, с молекулами цитоскелета и другими молекулами. Распознать что-либо будет достаточно сложно, так как клеточное содержимое структурировано, пронизано

конструкциями цитоскелета и мембранными образованиями. Понять внутреннюю логику происходящих и быстро сменяющихся друг друга событий тоже будет довольно сложно. Белковые молекулы похожи друг на друга, все время синтезируются новые молекулы, старые заканчивают свое существование в лизосомах...

Внимательному наблюдателю потребуется немало времени, чтобы разобраться в захватывающе интересной последовательности происходящих в клетке событий. Без эксперимента ему не обойтись. Ферменты ждут своих новых исследователей.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Овчинников Ю.А., Шамин А.Н.* Строение и функции белков. М.: Педагогика, 1983. 128 с.

2. *Пиментел Дж., Кунрод Дж.* Возможности химии сегодня и завтра. Пер. с англ. М.: Мир, 1992. 288 с.

3. *Реннеберг Р.* Эликсиры жизни: Новейшие результаты в области исследования ферментов. Пер. с нем. М.: Мир, 1987. 152 с.

4. *Розенгарт В.И.* Ферменты — двигатели жизни. Л.: Наука, 1983. 160 с.

5. *Коровкин Б.Ф.* Проблемы современной энзимодиагностики. Вестник АМН СССР. 1985. №1. С.12 — 22.

6. *Любарев А.Е., Курганов Б.И.* Принципы пространственно-временной организации клеточного метаболизма. Успехи современной биологии. 1989. Т. 108. С. 19 — 35.

* * *

Николай Николаевич Чернов, доктор биологических наук, профессор Российского университета дружбы народов. Научные интересы связаны с энзимологией. Автор 75 статей.