

ТЕРМОДИНАМИКА И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ*

Обзор

© 2015 Квиньн Жао

*Medical Institute, CRRC, POB 2619, Beijing 100068,
PR China; E-mail: qinyizhao@gmail.com*

Поступила в редакцию 08.05.14

После доработки 26.08.14

Непременным условием функционирования всех ферментов в клетке является высокоточная регуляция их активности. Имеющиеся представления об аллостерии и вкладе динамики в регуляцию ферментов основаны на экспериментальных моделях и базируются главным образом на эмпирических наблюдениях. В настоящем исследовании мы предложили теоретическую модель термодинамической регуляции ферментативной активности. Главная наша идея состоит в том, что регуляция активности ферментов заключается в регулировании относительного содержания активных конформационных состояний в реакционном буфере. В обзоре рассматриваются и обсуждаются теоретические основы и экспериментальные подтверждения предложенной нами модели. Мы пришли к заключению, что основные принципы регуляции активности ферментов базируются на законах термодинамики и могут быть описаны в рамках представлений о кривой распределения активных конформационных состояний белковых молекул.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляция активности ферментов, термодинамика, активная конформация, кривая распределения.

Регуляция ферментов — это одно из центральных положений в биологии, и в основе современных знаний о ней лежит аллостерический регуляторный механизм. Представления об этом механизме были впервые сформулированы на основе наблюдений за кооперативным связыванием кислорода с гемоглобином [1–3]. Впоследствии все основные достижения в этом вопросе стали именоваться аллостерической регуляцией. Однако в сущности аллостерический механизм продолжает оставаться экспериментальной моделью, и все объяснения, сделанные на его основе, обречены оставаться чисто эмпирическими. Поэтому невозможно избежать споров о выборе между моделями ферментативной регуляции MWC и KNF [2, 3]. Хорошо обоснован тот факт, что регуляция ферментов связана с динамикой белка (т.е. с изменяемостью молекулы белка и ее термодинамическими свойствами), однако эта взаимосвязь (т.е. термодинами-

ческий механизм регуляции) не может быть подвергнута анализу в рамках теории аллостерии. Также в рамках эмпирической модели невозможно дать количественное описание этой регуляции. Поэтому для разрешения подобных проблем было необходимо создание теоретической модели.

В последние 10 лет идея динамической регуляции ферментативной активности привлекает большое внимание, поскольку открывает много перспективных направлений и возможностей для исследования [4–10]. Однако отсутствие теоретических основ для согласования белковой динамики с термодинамикой препятствует созданию теоретической модели регуляции ферментативной активности, основанной на термодинамических представлениях.

К счастью, согласование белковой динамики с термодинамикой ранее уже было выполнено [11–14]. Это дает нам возможность построить динамическую модель функционирования фермента и создать модель его аллодинамической регуляции [15, 16]. Эта чисто теоретическая термодинамическая модель может помочь ответить на многие теоретические вопросы, относящиеся к ферментативной регуляции. Главная мысль заключается в том, что на динамику белковой

Принятые сокращения: REC — комплекс фермент-регулятор, MWC — Монод, Вейман, Шенже, KNF — Кошланд, Немети, Филмер.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-126, 28.12.2014.

молекулы влияет множество различных факторов, физических или химических, а изменение динамики молекулы фермента может менять количество возможных активных конформационных состояний, которые молекула белка приобретает в растворе, и тем самым может осуществляться регуляция его каталитической активности. В представленной статье обсуждаются теоретические основы, доказательства и некоторые проблемы, касающиеся предложенной модели.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ТЕОРИИ ДИНАМИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ

Для получения полного представления о термодинамическом механизме регуляции активности ферментов суммируем основные факты и базовые принципы теории.

1) В растворе молекулы любого белка или фермента находятся во многих конформационных состояниях, большинство из которых являются неактивными. Равновесие между ними устанавливается согласно законам термодинамики. В самом простейшем случае существует лишь один активный конформер.

2) Относительное содержание каждого конформера меняется в зависимости от различных условий и устанавливается в соответствии с тепловым равновесным состоянием. Содержание каждой отдельной конформационной формы может быть рассчитано из данных по конформационной стабильности белка с использованием функции распределения этих конформационных состояний [14].

3) Термодинамическое состояние одной конформации, такое как энергетический уровень, также варьирует в зависимости от различных условий [14].

4) Изменения в динамике всей белковой молекулы могут в той или иной степени распространяться на ее различные участки в процессе термодинамической реорганизации белка. Это может приводить к конформационным изменениям в отдельных участках молекулы, но не обязательно изменяет конформацию всей молекулы белка.

5) Некоторые внешние факторы, такие как температура, характер растворителя, субстрат, добавление активатора или ингибитора, а также внутренние факторы, например, изменение структуры белка при генетической мутации, оказывают воздействие на конформационную стабильность белковой молекулы и могут контролировать относительное содержание актив-

ных конформаций фермента в состоянии равновесия и их термодинамические характеристики. Соответственно, существуют два возможных механизма воздействия вышеперечисленных факторов на фермент. Во-первых, они могут влиять на термодинамику каждого конформера. Во-вторых, изменение уровней энергии (термодинамического состояния) отдельных конформеров приводит к изменению доли активных конформеров и поэтому влияет на каталитическую активность фермента.

6) Влияние разнообразных регуляторов на фермент может термодинамически складываться (интегрироваться) внутри белковой глобулы. (Здесь мы не будем обсуждать этот процесс, поскольку он подчиняется общепринятым принципам регуляции активности ферментов.)

Основное отличие предложенной нами модели от существующих представлений о вкладе динамической составляющей в регуляцию ферментов заключается в том, что наша модель не подразумевает прямого влияния динамических изменений на каталитическую активность; они оказывают свое воздействие на фермент путем изменения относительного содержания молекул белка, находящихся в активных конформациях.

Важным положением теории является представление о кривой распределения (кривая относительного содержания) активных конформационных состояний фермента. Например, о природе воздействующего на фермент регулятора можно судить по разнице между кривой распределения для свободного фермента и кривой для комплекса энзим–регулятор (REC). В этом случае REC можно рассматривать как новый вид белка. По сравнению со свободным ферментом кривая распределения активных форм для REC смещается в другое положение при определенных рабочих условиях. Это явление, названное «конформационным сдвигом» в направлении новых рабочих условий, наблюдалось во многих экспериментах [17–21].

На рис. 1 приведены графики, иллюстрирующие распределение активных конформаций молекул свободного фермента и REC. Можно видеть, что в данном случае регулятор оказывает на фермент положительное воздействие в условиях области *a* (кривая расположена выше кривой свободного белка) и негативное воздействие в условиях области *b* (кривая ниже кривой свободного белка); свободный фермент выступает здесь в качестве контроля. Другими словами, регулятор проявляет смешанное действие. Кроме того, эффективность действия регулятора также непостоянна. Это заключение следует также из других многочисленных результатов изучения регуляции белков и ферментов.

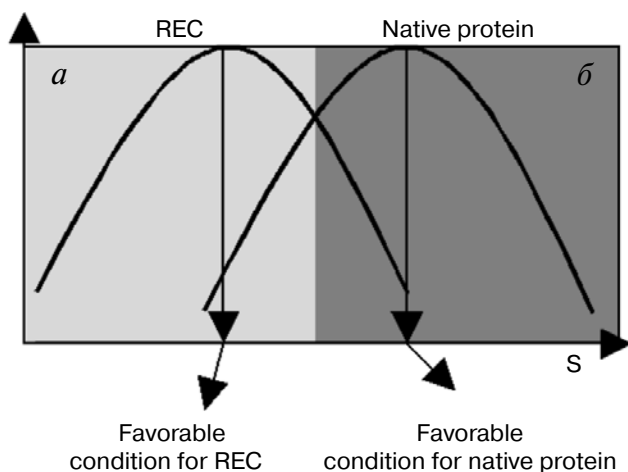


Рис. 1. Кривые распределения активных конформаций свободного фермента и комплекса регулятор–энзим (REC). P – вероятность активных конформаций фермента, S – количественное выражение рабочих условий (t , концентрация соли, мочевины, значение pH и пр.). По сравнению со свободным ферментом кривая распределения для REC претерпела конформационный сдвиг (в большинстве случаев кривые распределения могут выглядеть несколько иначе)

ОСОБЕННОСТИ УРАВНЕНИЯ АРРЕНИУСА ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Температура является универсальным фундаментальным фактором, влияющим на активность ферментов любого типа, и всякая презентуемая модель регуляции ферментов должна содержать кинетическое описание поведения фермента в зависимости от температуры.

Экспериментальные исследования позволяют установить многие характерные особенности ферментативной кинетики. С другой стороны, экспериментальные данные могут быть использованы для оценки профиля кривой распределения активных конформаций и других особенностей ферментативной кинетики (обсуждается ниже).

Стандартное уравнение Аррениуса, описывающее кинетику простых химических реакций, выглядит следующим образом:

$$k = A e^{-\Delta E/k_B T},$$

где k – константа скорости химической реакции, k_B – универсальная газовая постоянная (постоянная Больцмана), A – преэкспоненциальный коэффициент, ΔE – энергия активации химической реакции, T – абсолютная температура (K).

В соответствии с динамической моделью для ферментативных реакций и с функцией распределения конформационных состояний белка уравнение Аррениуса для этих реакций выглядит следующим образом [14]:

$$k = A P e^{-[\Delta E_0 + B_r(T-T_0)]/k_B T} = A P D_T e^{-\Delta E_0/k_B T}, \quad (1)$$

где P – вероятность существования данной активной конформации фермента, T_0 – референсная температура, A – преэкспоненциальный коэффициент при температуре T_0 , ΔE_0 – энергия активации ферментативной реакции при температуре T_0 , D_T – коэффициент, выведенный при анализе термодинамики переходного состояния ферментативной реакции [14].

Полный математический анализ кинетики ферментативной реакции слишком сложен, и мы не сможем обсудить его в рамках этой статьи. Однако в рамках конкретного эксперимента он может быть упрощен. Мы можем выбрать ограниченный диапазон температур и получить уравнение Аррениуса в линеаризованном виде.

Теоретически относительное содержание активных конформационных состояний фермента возрастает, когда динамика его молекул снижается при понижении температуры (например, при денатурации белка в холоде). И наоборот, содержание активных конформаций снижается при повышении температуры, когда динамика молекул белка активизируется (при обратимой термической денатурации белка). Такой теоретический вывод означает, что преэкспоненциальный коэффициент в уравнении Аррениуса может служить для мониторинга изменений в активных конформационных состояниях молекул различных ферментов. Однако экспериментально это пока точно не подтверждено.

РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТЕМ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ОТНОСИТЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ИХ АКТИВНЫХ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ

Существование ферментов в активной и неактивной конформациях предполагается в биохимии уже в течение длительного времени, и функциональная роль этих конформаций достаточно обоснована [22]. Однако подобные представления не были оформлены в связную теорию регуляции ферментов, поскольку равновесие между их активными и неактивными конформациями было невозможно описать количественно без знания функции распределения этих молекулярных форм [14]. Другая причина состоит в

том, что все эксперименты по изучению регуляции ферментов были выполнены без учета вклада термодинамической составляющей в эти процессы, так что термодинамические механизмы ускользали от внимания.

Взаимосвязь между каталитической активностью и рефлексивностью молекулы фермента была хорошо известна и привлекала большое внимание в течение последних 50 лет [23–27]. Современные методы исследования, такие как КД, ЯМР и флуоресцентная спектроскопия, незаменимы для изучения структуры белков и изменения конформации их молекул, не дают возможность дифференцировать активные и неактивные конформационные состояния ферментов [4, 23]. Поэтому невозможно экспериментально измерить относительное содержание активных конформеров фермента. Хотя кривая распределения этих форм может быть выведена теоретически из графика стабильности конформаций белка, этих данных оказывается недостаточно, и приходится искать дополнительные альтернативные экспериментальные подходы.

В рамках термодинамической теории структуры белков активному ферменту соответствует определенное, зависящее от температуры, энергетическое состояние его молекулы (или, в терминах биохимии, определенная конформация белка), что теоретически полностью обосновано [13, 15]. Один из способов подтвердить правильность такого утверждения основывается на изучении ферментативной кинетики. А именно, если активное конформационное состояние фермента изменяется с температурой, то график Аррениуса зависимости активности от температуры не будет прямой линией. И наоборот, зависимость будет линейной при отсутствии влияния температуры на конформацию белка. Хорошо известно, что в широком диапазоне температур график Аррениуса для большинства ферментов нелинеен. Это означает, что относительное содержание активных форм молекулы фермента обычно не равно 100%. Для их 100%-ного содержания требуется выполнение следующих условий: 1) линейный участок графика Аррениуса должен быть достаточно протяженным; 2) кривая распределения активных конформаций должна содержать участок «плато», как на рис. 2, *a* и *b*; 3) фермент должен функционировать в максимально комфортных (оптимальных) условиях, включая присутствие всех возможных активаторов.

Другой тип экспериментальных доказательств изменения доли активных и неактивных конформационных состояний ферментов в растворе основывается на изучении явлений положительной или отрицательной кооперации [28–31]. Если какой-то фактор или регулятор

действует совместно (кооперативно) с термической денатурацией фермента, то он также будет способствовать переходу фермента из активной в неактивную конформацию и наоборот в случае отрицательной кооперации. Например, при низкой температуре небольшие концентрации мочевины и гуанидинхлорида увеличивают стабильность активной конформации белка, чем увеличивают ее относительное содержание

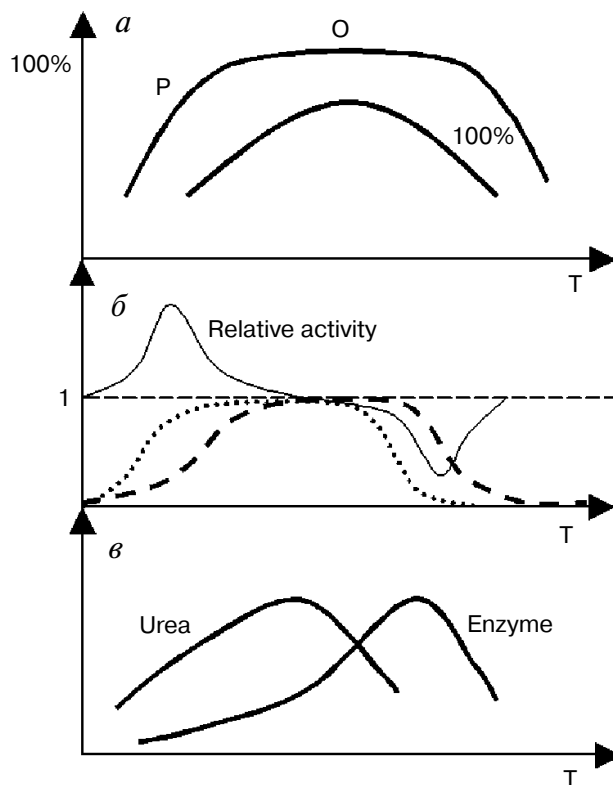


Рис. 2. Кооперативное воздействие температуры и мочевины на ферментативную активность. P – относительное содержание активных конформаций или ферментативная активность, Relative activity – относительная активность (+мочевина/–мочевина), T – абсолютная температура. *a* – Общий вид кривой распределения активных конформаций ферментов, обладающих высокой или низкой термической устойчивостью. Наблюдается плато «O» на кривой распределения для ферментов, обладающих высокой термостабильностью; содержание активных конформеров в этом диапазоне температур не зависит от изменения динамики белковых молекул; *b* – идеальный профиль изменения относительной ферментативной активности и соответствующая кривая распределения активных конформаций для ферментов с высокой термической устойчивостью. Пунктиром и точками обозначены кривые распределения активных конформаций в отсутствие и в присутствии мочевины соответственно (для ферментов, денатурирующих в холоде, характер кривой распределения может быть другим); *v* – общий характер профиля кривых каталитической активности в присутствии или в отсутствие мочевины для ферментов с низкой термической устойчивостью

в растворе и стимулируют ферментативную активность. Однако при высокой температуре эти хаотропные соединения действуют кооперативно с термической дестабилизацией белка, способствуют снижению доли активных конформационных состояний фермента и ингибируют его каталитическую активность. Это заключение было подтверждено рядом исследователей [26, 32]. Существует мнение, что увеличение подвижности молекулы фермента в области его каталитического центра приводит также к изменению каталитической активности [26]. Правомочность такого утверждения вызывает сомнения, поскольку вряд ли изменение в одном участке молекулы может вызвать нарушение стабильности всего белка и изменить соотношение его активных и неактивных конформаций.

Для лучшего понимания особенностей ферментативной регуляции было бы не лишним изобразить на одном рисунке изменения в разнообразных свойствах фермента и катализируемой им реакции. Тогда взаимосвязи между ними проявятся яснее.

Две типичные кривые распределения белковых конформаций представлены на рис. 2, а; конформационные состояния одного типа характеризовались высокой термической устойчивостью, другого — низкой. В этом случае тесты Пейсе [33] давали наиболее наглядные картины.

На рис. 2, б представлен характерный график, отражающий кооперативное действие мочевины и температуры на активность ферментов, имеющих высокую термическую устойчивость. Кооперативные взаимодействия между мочевиной и температурой заметно проявляются в диапазоне низких или высоких температур. В диапазоне с промежуточными значениями температуры наблюдается другая картина; хотя кооперация между мочевиной и температурой в отношении стимуляции подвижности молекулы белка по-прежнему имела место, но она не оказывала влияния ни на относительное содержание активной конформации фермента, ни на его каталитическую активность.

Если термическая устойчивость молекулы фермента, находящегося в активной конформации, была низкой, то кооперативное воздействие мочевины и температуры на активность фермента выражалась в графике другой формы (рис. 2, в). Благодаря совместному воздействию температуры и мочевины на денатурацию белка температурный оптимум ферментативной реакции смещался в присутствии мочевины в область низких температур.

В соответствии с уравнением (1) изменение доли активных конформаций фермента в диапа-

зоне используемых в эксперименте температур могло бы отражаться в величине преэкспоненциального коэффициента в уравнении Аррениуса. Это было справедливо, например, для термочувствительной алкогольдегидрогеназы из *Bacillus stearothermophilus* (htADH) [34]. Было обнаружено, что преэкспоненциальный коэффициент достигал высокого значения — 1025,2, что было удивительно для ферментативной реакции. Авторы статьи пишут о механизме, похожем на тот, который теоретически выведен нами в этой работе. Его сущность представлена на рис. 3, а. При низкой температуре холофермент

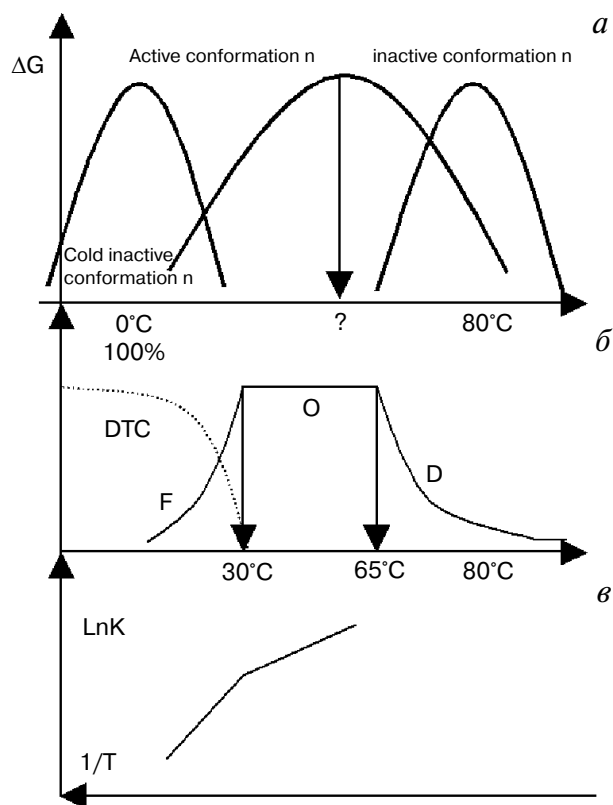


Рис. 3. Диаграммы, отражающие изменение различных свойств htADH. DTC — динамически «замороженная» конформация фермента при низкой температуре. а — График стабильности трех типов конформеров htADH. (График построен в соответствии с кривыми на графиках б и в, отражающими условия стабильности белка и его денатурации, а также с учетом некоторых критических моментов ферментативной реакции.); б — кривая распределения активных конформаций htADH. В температурном диапазоне «F» доля активных конформеров увеличивалась с повышением температуры; в диапазоне «O» — оставалась неизменной и составляла 100%; в диапазоне «D» — снижалась при увеличении температуры. Увеличение подвижности (динамики) молекулы фермента отрицательно влияло на ферментативную активность в диапазонах «F» и «D»; в — график Аррениуса для ферментативной реакции (координатные оси на этой панели помечены отлично от панелей а и б)

htADH будет диссоциировать на субъединицы, а его активность — снижаться (денатурация при охлаждении). При высокой температуре фермент также денатурирует. Поскольку систематического изучения этого явления не было, и данных по разным ферментам нет, то мы представляем здесь кривую термической устойчивости и некоторые свойства только для htADH (рис. 3, б). На рис. 3, б изображена кривая распределения трех конформационных состояний фермента. При низкой температуре htADH была термодинамически нестабильной и легко денатурировала. Однако во временной период, за который проводился эксперимент, фермент находился в своей неактивной динамически «замороженной» конформации (DTC). На рис. 3, в приведен график Аррениуса для ферментативной реакции, катализируемой этим ферментом.

Таким образом, на рис. 3 мы показываем, что в области низких температур доля активных конформаций фермента увеличивается с увеличением температуры, и это отражается на характере графика Аррениуса, который претерпевает перегиб как раз на той температурной границе, когда содержание DTC становится нулевым. В температурном диапазоне «О» доля активной конформации не изменялась, а в диапазоне «D» она снижалась по мере увеличения температуры. Мутационное изменение гена, кодирующего htADH, может влиять на температурный профиль белка, и температура, соответствующая точке перегиба на графике Аррениуса, может стать другой [34]. Представленный рисунок ясно демонстрирует, что изменение относительного содержания активных конформационных состояний фермента тесно связано с регуляцией его каталитической активности.

РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОСРЕДСТВОМ ТЕРМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ АКТИВНЫХ КОНФОРМЕРОВ

Многочисленные экспериментальные данные, касающиеся регуляции ферментативной активности, могут быть теоретически объяснены изменением относительного содержания активных конформационных состояний фермента в растворе. Но остается один вопрос, а именно, поскольку уровень энергии этих активных конформеров изменяется в зависимости от рабочих условий, то может ли это быть связано с регуляцией ферментативной активности. И на этот вопрос мы отвечаем положительно. Показатель D_T в уравнении 1 отражает вклад динамической составляющей активных конформеров в катали-

тическую активность фермента. Из этого же уравнения следует также, что подобный механизм ферментативной регуляции не слишком физиологичен, поскольку недостаточно чувствителен к различным стимулирующим воздействиям.

С точки зрения структурной биологии различные энергетические уровни активных конформаций фермента можно рассматривать как разные конформеры. На практике очень трудно различить активные конформации фермента и переходное состояние ферментативной реакции, поэтому здесь мы разберем главные свойства обоих. Активные конформеры могут быть выявлены по многим кинетическим критериям: K_{cat} , влиянию изотопов на ферментативную кинетику (KIE — изотопный кинетический эффект), K_m и K_{cat}/K_m [35].

Тепловое энергетическое состояние активных конформеров подвержено изменениям. Это заключение сделано на основании следующих наблюдений: 1) различные субъединицы гемоглобина и даже сам мономер могут связывать кислород с разным сродством [1]; 2) в зависимости от условий кооперативное воздействие эффекторов на фермент может быть как положительным, так и отрицательным, поэтому энергетическое состояние молекул фермента в различных условиях может варьироваться [36, 37]; 3) V_{max} или K_{cat} могут варьироваться у разных генетических мутантных форм фермента; 4) величина KIE для ферментативной реакции варьируется в зависимости от внешних условий [38], 5) диссоциация белкового олигомера на субъединицы может выступать в качестве механизма регуляции ферментативной реакции [39].

Тепловые энергетические уровни активных конформеров изменяются под воздействием субстрата. Например, было установлено, что каталитические константы K_{cat} для трипсина, мутантной формы трипсина (D189>S) и химотрипсин-подобного трипсина (Tr → Ch[S1 + L1 + L2]) были одинаковыми при гидролизе suc-AAPF-SBzl (сукцинилААРФ-тиосульфобензоат). Если же в качестве субстрата был использован sucAAPF-pNA (сукцинилААРФ-пара-нитроанилид), то значения K_{cat} для разных форм трипсина существенно различались между собой [40, 41]. Ряд других наблюдений свидетельствовал о нарушении порядка ферментативной реакции в экстремальных для фермента условиях [42].

Уровень тепловой энергии активных конформеров зависит от общей конформации молекулы фермента в целом. Изучение трипсина и химотрипсина показало, что часть их молекул, образующая петлю на поверхности белковой глобулы вдали от активного центра, играет ключевую

роль в аутопротеолизе предшественников этих ферментов [40].

Несмотря на то, что обсуждаемый в этом разделе статьи динамический механизм имеет большое теоретическое значение в энзимологии, он не играет решающей роли в ферментативной регуляции. В большинстве случаев изменение уровня тепловой энергии активных конформеров происходит в экстремальных нефизиологических условиях, и его биологическая функция ждет своего дальнейшего выяснения.

ЯВЛЯЮТСЯ ЛИ СМЕШАННЫЕ КООПЕРАТИВНЫЕ ВЗАИМОТНОШЕНИЯ УНИВЕРСАЛЬНЫМ СПОСОБОМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ?

Экспериментально было установлено, что механизм регуляции ферментативной активности основан на принципе кооперативной кинетики. В рамках нашей теоретической модели также предполагаются кооперативные взаимоотношения. Из теории вытекает, что субстрат, который первым связывается с одной из субъединиц олигомерного фермента, может выступать в качестве регулятора для других субъединиц и способен повышать (положительная кооперация) либо снижать (отрицательная кооперация) сродство к субстрату у других субъединиц фермента при различных условиях. Таким образом, можно заключить, что явление смешанной кооперации, когда в одних условиях она положительна, а в других — отрицательна, широко распространено в энзимологии.

Большинство ферментов характеризуется положительным кооперативным поведением и лишь некоторые — отрицательным. Только неколькое исследований посвящено смешанной кооперативной кинетике [37]. Это может быть связано с тем, что обычно изучение ферментативной кинетики проводится в физиологических или близких к ним условиях, тогда как смешанное кооперативное поведение фермента проявляется в условиях, далеких от физиологии.

В качестве модели фермента с кооперативной кинетикой нами был использован гемоглобин. Ранее было продемонстрировано положительное кооперативное поведение этого белка в нормальных условиях, а также варибельность коэффициента Хилла при изменении этих условий. Однако не было сообщений, в которых говорилось бы об отрицательном кооперативном поведении гемоглобина в ответ на связывание кислорода [43–46]. Проведенный нами анализ условий, при которых выполнялись эксперименты с гемоглобином, показал, что изучение

связывания кислорода с этим белком в экстремальных условиях не проводилось. Мы считаем, что негативная кооперация между гемоглобином и кислородом могла бы проявиться, например, при низкой или, наоборот, высокой температуре или концентрации соли, при кислых либо щелочных значениях pH. Даже если в этих экстремальных условиях отрицательная кооперация в связывании кислорода и не выявится, она могла бы наблюдаться у мутантных форм гемоглобина.

НЕКОТОРЫЕ ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В этой статье было продемонстрировано, что регуляция ферментативной активности может быть объяснена из законов термодинамики, и представленная нами модель имеет значительное преимущество перед аллостерическим регуляторным механизмом.

1) Наша термодинамическая модель рассматривает такие особенности механизма ферментативной регуляции, которые не могут быть выявлены в рамках аллостерической модели.

2) В рамках аллостерической регуляторной модели трудно объяснить существование отрицательной кооперативности, тогда как термодинамическая модель допускает существование как положительной, так и отрицательной кооперативности при изменении рабочих условий проведения ферментативной реакции.

3) Наша модель рассматривает ферментативную активность, регуляцию активности и кооперативное поведение фермента с точки зрения единого механизма как результат термодинамического преобразования белковой молекулы, тогда как теория аллостерической регуляции не поддерживает такие представления.

4) Исходя из нашей модели, регулированию могут подвергаться все без исключения мономерные и олигомерные ферменты, тогда как теория аллостерии с трудом объясняет регуляцию активности мономерных форм ферментов.

5) Наша модель хорошо объясняет взаимосвязь между динамикой молекулы фермента и его активностью.

6) Наша модель не подразумевает необходимости конформационных изменений молекулы фермента для регуляции его активности, в то время как они составляют основу аллостерического механизма [7].

7) Термодинамическая модель регуляции ферментов предоставляет возможности для количественного описания регуляторного процесса, а концепция аллостерии — нет.

8) Наша модель подразумевает наличие многочисленных аллодинамических участков в белке, подвижность которых может изменяться, и не требует наличия специфического аллостерического центра для каждого регулятора, например, мочевины может воздействовать почти на все участки белковой молекулы.

Поскольку наша модель является теоретической, и ее систематическое экспериментальное изучение не проводилось, это должно быть сделано в дальнейшем. Особое внимание следует обратить на следующие направления этих исследований.

1) Необходимо одновременное изучение преэкспоненциального коэффициента уравнения Аррениуса и энергии активации ферментативной реакции.

2) Должны быть экспериментально изучены кривая распределения активных конформационных состояний и график стабильности фермента.

3) Необходимо измерять термодинамические параметры ферментативной реакции для разных субстратов в широком диапазоне условий ее протекания, в т.ч. и в экстремальных, неблагоприятных для фермента условиях.

4) В будущем стоит уделить внимание изучению взаимосвязи между скоростью изменения конформаций молекулы белка и ферментативной активностью.

5) Необходимо уделить особое внимание суммированию данных по стабильности белка и по устойчивости его активных конформеров.

Автор выражает свою глубокую благодарность профессору В. Матвееву (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) и доктору Женбао Ю (Медицинский институт леди Девис, факультет Онкологии и медицины Университета МакГилла, Канада) за ценные предложения по написанию этой статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hill, A.V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on the dissociation curves, *J. Physiol.*, **40**, iv–vii.
- Koshland, D.E., Nemethy, G., and Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry*, **5**, 365–385.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.P. (1965) On the nature of allosteric transitions – a plausible model, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88–118.
- Tzeng, S.R., and Kalodimos, C.G. (2011) Protein dynamics and allostery: an NMR view, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **21**, 62–67.
- Tsai, C.J., Del Sol, A., and Nussinov, R. (2008) Allostery: absence of a change in shape does not imply that allostery is not at play, *J. Mol. Biol.*, **378**, 1–11.
- Wand, A.J. (2001) Dynamic activation of protein function: a view emerging from NMR spectroscopy, *Nature Struct. Biol.*, **8**, 926–931.
- Cooper, A., and Dryden, D.T. (1984) Allostery without conformational change. A plausible model, *Eur. Biophys. J.*, **11**, 103–109.
- Goodey, N., and Benkovic, S. (2008) Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route, *Nature Chem. Biol.*, **4**, 474–482.
- Taylor, S.S., and Kornev, A.P. (2011) Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 65–77.
- Motlagh, H.N., and Hilser, V.J. (2012) Agonism/antagonism switching in allosteric ensembles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4134–4139.
- Zhao, Q. (2013) Natures of protein thermodynamics and thermodynamics, *Rev. Theor. Sci.*, **1**, 83–101.
- Zhao, Q. (2009) Protein thermodynamic structure, *IUBMB Life*, **61**, 600–606.
- Zhao, Q. (2013) A molecular and biophysical model of the biosignal, *Quantum Matter*, **2**, 9–16.
- Zhao, Q. (2012) Partition function of protein conformational state, *J. Comput. Theor. Nanosci.*, **9**, 745–751.
- Zhao, Q. (2011) Dynamic model of enzymes action, *Protein Pept. Lett.*, **18**, 92–99.
- Zhao, Q. (2013) Alldynamic regulation of protein activity, *Quantum Matter*, **2**, 144–152.
- Lonhienne, T., Gerday, C., and Feller, G. (2000) Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility, *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**, 1–10.
- Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A., and Barnett, B.J. (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds, *J. Biol. Chem.*, **263**, 11820–11825.
- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006) An introduction to TRP channels, *Annu. Rev. Physiol.*, **68**, 619–647.
- Inouye, K., Kuzuya, K., and Tonomura, B.I. (1998) Sodium chloride enhances markedly the thermal stability of thermolysin as well as its catalytic activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1388**, 209–214.
- Kanade, S., Paul, B., Rao, A., and Gowda, L. (2006) The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation, *Biochem. J.*, **395**, 551–562.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme structure and mechanism*, Freeman Press, San Francisco.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Prot. Sci.*, **4**, 2411–2423.
- Bahar, I., Atilgan, A.R., Demirel, M.C., and Erman, B. (1998) Vibrational dynamics of folded proteins: significance of slow and fast motions in relation to function and stability, *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 2733–2736.
- Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, A., and Petsko, G.A. (1998) Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7406–7411.

26. Tsou, C.L. (1998) The role of active site flexibility in enzyme catalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 253–300.
27. Daniel, R.M., and Danson, M.J. (2013) Temperature and the catalytic activity of enzymes: a fresh understanding, *FEBS Lett.*, **587**, 2738–2743.
28. Mayr, L.M., and Schmid, F.X. (1993) Stabilization of a protein by guanidinium chloride, *Biochemistry*, **32**, 7994–7998.
29. Bhuyan, A.K. (2002) Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride, *Biochemistry*, **41**, 13386–13394.
30. Yancey, P.H., and Somero, G.N. (1979) Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes, *Biochem. J.*, **183**, 317–323.
31. Baldwin, R.L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.*, **71**, 2056–2063.
32. Zoldak, G., Sut'ak, R., Antalik, M., Sprinzl, M., and Sedlak, E. (2003) Role of conformational flexibility for enzymatic activity in NADH oxidase from *Thermus thermophilus*, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 4887–4897.
33. Pace, C.N., and Tanford, C. (1968) Thermodynamics of the unfolding of β -lactoglobulin A in aqueous urea solutions between 5 and 55, *Biochemistry*, **7**, 198–208.
34. Nagel, Z.D., Dong, M., Bahnsen, B.J., and Klinman, J.P. (2011) Impaired protein conformational landscapes as revealed in anomalous Arrhenius prefactors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10520–10525.
35. Schramm, V.L. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 693–720.
36. Robert, C.A., and Koshland, D.E. (1970) Positive and negative cooperativity in yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, **9**, 3337–3342.
37. Koshland, D.E., and Hamadani, K. (2002) Proteomics and models for enzyme cooperativity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 46841–46844.
38. Kohen, A., Cannio, R., Bartolucci, S., and Klinman, J.P. (1999) Enzyme dynamics and hydrogen tunnelling in a thermophilic alcohol dehydrogenase, *Nature*, **399**, 496–499.
39. Traut, T.W. (1994) Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 125–163.
40. Hedstrom, L., Szilagyi, L., and Rutter, W.J. (1992) Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops, *Science*, **255**, 1249–1253.
41. Hedstrom, L. (2002) Serine protease mechanism and specificity, *Chem. Rev.*, **102**, 4501–4524.
42. Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2010) Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective, *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 471–505.
43. Ogata, R.T., and McConnell, H.M. (1972) Mechanism of cooperative oxygen binding to hemoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 335–339.
44. Bruno, S., Bonaccio, M., Bettati, S., Rivetti, C., Viappiani, C., Abbruzzetti, S., and Mozzarelli, A. (2001) High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin, *Prot. Sci.*, **10**, 2401–2407.
45. Hewitt, J.A., Kilmartin, J.V., Ten Eyck, L.F., and Perutz, M.F. (1972) Noncooperativity of the $\alpha\beta$ dimer in the reaction of hemoglobin with oxygen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 203–207.
46. Gibson, Q.H. (1970) The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3285–3288.

A THERMODYNAMIC AND THEORETICAL VIEW FOR ENZYME REGULATION

Qinyi Zhao

Medical Institute, CRRC, POB 2619, Beijing 100068,
PR China; E-mail: qinyizhao@gmail.com

Received May 8, 2014

Revision received August 26, 2014

Precise regulation is fundamental to the proper functioning of enzymes in a cell. Current opinions about this, such as allosteric regulation and dynamic contribution to enzyme regulation, are experimental models and substantially empirical. Here we propose a theoretical and thermodynamic model of enzyme regulation. The main idea is that enzyme regulation is processed via the regulation of abundance of active conformation in the reaction buffer. The theoretical foundation, experimental evidence, and experimental criteria to test our model are discussed and reviewed. We conclude that basic principles of enzyme regulation are laws of protein thermodynamics, and this can be analyzed using the concept of distribution curve of active conformations of enzymes.

Key words: enzyme regulation, thermodynamics, active conformation, distribution curve