

ENZIMOLOGIJA. IZOFERMENTAI

Dažniausiai teigiama, kad kiekvieną biologiniuose objektuose vykstančią cheminę reakciją katalizuoja vienas fermentas, apibūdinamas konkrečiu molekulinį ir kinetinių savybių rinkiniu. Tačiau tam tikrais atvejais tą pačią reakciją gali katalizuoti keli fermentai, kurių molekulių struktūra ir kitos savybės skiriasi. Pvz., kai baltymų išskyrimo metodai buvo panaudoti išskirti malato dehidrogenazei (MDH, 1.1.1.40) iš skirtingų šaltinių (pelės kepenų ir *Esherichia coli*), paaiškėjo jog nors pelės kepenų MDH ir *E.coli* MDH katalizuoja tą pačią reakciją (malato oksidaciją iki oksalacetato): L-Malatas + NAD⁺ = Oksalacetatas + NADH + H⁺, tačiau jų fizikinės ir cheminės savybės ženkliai skiriasi.

Izofermentais vadinamos daugybinės (polimorfinės) molekulinės fermentų formos, katalizuojančios tą pačią reakciją, tačiau turinčios skirtingas fizikines-chemines savybes. Skirtingi izofermentai gali katalizuoti tą pačią reakciją viename individe arba tos pačios rūšies atskiruose individuose. Nevienodi izofermentai gali katalizuoti tą pačią reakciją skirtingose tos pačios ląstelės vietose – pavyzdžiui, mitochondrijų ir citoplazmos izoformos būdingos kreatino kinazei, malato dehidrogenazei, aminoacil-tRNR sintetazėms, tioredoksino reduktazei, superoksido dismutazei ir t.t.

Izofermentų sąvoka pirmą kartą pateikta Mark'o ir Muller'io 1959 metais. Istoriskai buvo naudojami įvairūs terminai apibrėžti izofermentams: izofermentai, izoenzimai, izozimai, heterofermentai, homojofermentai. Buvo priimta vadinti izofermentus pagal jų pasiskirstymą audiniuose. Tačiau izofermentų specifiškumas audiniui nėra absoliutus. Be to, jų pasiskirstymas audiniuose keičiasi, organizmams augant ir vystantis. Izozimai arba izofermentai ir jų subvienetai neturėtų būti žymimi atsižvelgiant į jų paplitimą audiniuose, (e.g. smegenų tipas, širdies tipas), nes galima painiava dėl rūšinių skirtumų – homologiškos formos gali būti būdingos tik tam tikriems audinams vienoje rūšyje ir būti kartu tame pačiame audinyje kitose rūšyse.

Dažniausiai izofermentus koduoja skirtingi genai, esantys įvairiose genomo vietose arba sudarantys skirtingas to paties lokuso aleles.

1964 metais Tarptautinės Biochemikų Sąjungos Biocheminės nomenklatūros komiteto rekomenduota vienos organizmų rūšies "daugybines fermentų formas" vadinti izofermentais (isoenzymes, isozymes). Gali skirtis įvairūs tą pačią reakciją katalizuojančių tos pačios rūšies individų fermentų požymiai – kinetika, ketvirtinė struktūra, giminingumas substratui, kofermentams, jautrumas slopikliams, temperatūros poveikiui, optimalus pH, vieta ląstelėje.

Grupė	Daugybinės fermento formos kilmės priežastis	Pavyzdys
1	Genetiškai nesusiję baltymai	Mitochondrijų ir citozolio malato dehidrogenazė
2	Dviejų ar daugiau polipeptidinių grandinių heteropolimerai (hibridai)	Laktato dehidrogenazės izofermentai
3	Genetiniai variantai (alelofermentai)	Žmonių gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė
4	Konjuguoti baltymai arba skirtingi profermento brendimo produktai	Fosforilazė b, glikogeno sintazė a Iš chimotripsinogeno susidaranti chimotripsinų šeima
5	Vieno subvieneto polimerai	Glutamato dehidrogenazė: 1000 kDa ir 250 kDa
6	Skirtingos konformacijos formos	Alosterines fermentų modifikacijos

1976 m. Tarptautinės Biochemikų sąjungos Biologinės nomenklatūros komisija sugriežtino izofermentų sąvoką, nes rekomendavo izofermentais vadinti tik pastovias fermentų formas, kurių polimorfizmo genetinė priežastis nustatyta – to paties fermento formas, koduojamas skirtingų genų. Izofermentai elektroforezės metu migruoja skirtingai. Todėl IUPAC-IUBCBN 1976 m. rekomenduota skaitmeninė nomenklatūra, pagal kurią izofermentai numeruojami pagal jų elektroforezinį judrumą, suteikiant Nr. 1 izofermentui, greičiausiai judančiam anodo link.

Tarp metodų, taikomų skirtingoms izofermentų savybėms įvertinti, elektroforezė taikoma dažniau, lyginant su kitais metodais – chromatografija, kinetikos tyrimais, cheminės struktūros nustatymu. Taip yra todėl, kad, (1) vertinant fermentų heterogeniškumą, svarbu išvengti įvairių valymo procedūrų sukeltamų artefaktų; (2) elektroforezės metodas yra jautrus, greitas ir plačiai taikomas, todėl yra daug lengvai prieinamos naudingos informacijos mokslinėje literatūroje. Kinetikos ir struktūros tyrimų duomenys nėra taip lengvai prieinami ir standartizuoti.

Skirtumai tarp įvairių to paties fermento formų gali būti lemiami genetiškai arba atsirasti vėliau, epigenetinių fermento pokyčių dėka. Nors pastarosios formos pagal priimtą apibrėžimą nėra izofermentai, funkcinio požiūriu jos dažnai taip vadinamos. Taigi, praktiškai šis terminas naudojamas plačiau, neatsižvelgiant į fermento formų daugybiškumo priežastis. Plačiaja prasme, apibrėžiant visus tą pačią reakciją katalizuojančius baltymus, natūraliai atsirandančius vienos rūšies organizmuose, vartotinas terminas “**daugybinės fermentų formos**”. Terminas “izofermentas” turėtų būti naudojamas, apibrėžiant daugybines fermentų formas, kurias lemia genetiniai pirminės sekos skirtumai, bet ne epigenetinės modifikacijos.

Pagal apibrėžimą, izofermentų pirminė struktūra tam tikru laipsniu skiriasi. Tačiau izofermentų aktyvaus centro struktūra paprastai yra labai konservatyvi ir panaši. Kuo skiriasi izofermentai vieni nuo kitų?

1. Gali skirtis fermentų, veikiančių tuose pačiuose audiniuose, bet skirtingose biologinėse rūšyse, savybės (kiaulės širdies ir žiurkės širdies ketoglutarato dehidrogenazė, mielių ir kepenų alkoholio dehidrogenazė);
2. Tos pačios rūšies skirtinguose audiniuose gali veikti izofermentai, kurių fiziko-cheminės savybės skiriasi.

Specifiškumo organams pavyzdžiai:

- keturios piruvato kinazės (PK, 2.7.1.40) formos - M_1 -raumenyse, širdyje ir smegenyse, M_2 - būdinga daugeliui kitų audinių (M_2 randama visuose vaisiaus audiniuose, tačiau vystymosi eigoje raumenyse, širdyje ir smegenyse pakeičiama M_1), L - kepenų ir R - eritrocitų. Visos izoformos, išskyrus M_1 , yra alosteriškai reguliuojamos, M_1 nuo M_2 skiriasi tik keletu aminorūgščių, esančių subvienetų kontakto vietoje);
- šarminė fosfatazė kraujo plazmoje ir kita jos forma kepenyse, inkstuose;
- kreatino kinazės (CK, 2.7.3.2) nustatytos MM, BB ir MB formos: homodimeras MM – skeleto raumenyse, BB – smegenyse, širdies raumenyje dažniausia aptinkamas heterodimeras MB kartu su MM, ir kartais BB;
- (HK, 2.7.1.1) heksokinazė-I tik kepenyse, HK-II smegenyse, HK-III skeleto raumenyse.

1. Fermentai iš vieno organo gali egzistuoti daugiau nei vienoje formoje (kepenų heksokinazė ir gliukokinazė);

2. Skirtingos fermentų, katalizuojančių tą pačią reakciją, formos gali veikti skirtingose tos pačios ląstelės dalyse (mitochondrijų ir miofibrilių kreatino fosfokinazė, citoplazmos ir mitochondrijų malatodehidrogenazė; sorbitolio dehidrogenazė (SORDH, 1.1.1.14); vienas

fruktozės-1,6-bifosfatazės izofermentas katalizuoja gliukoneogenezės reakcijas augalų ląstelės citozolyje, kitas - chloroplastų stromoje). Tokių formų specifiškumas kofermentams gali skirtis (citoplazmos dehidrogenazės savitos NADP, mitochondrijų – NAD).

3. Įvairios izoformos audiniuose veikia skirtingu vystymosi periodu (citochromo oksidazės VIa–H ir VI-L formų raiška; kreatinkinazės (CK, 2.7.3.2) aktyvumas didesnis postnataliniu periodu nei suaugusių organizme; iki 20 nėštumo savaitės aktyvesnė alkoholio dehidrogenazės (ADH, 1.1.1.1) ADH₁ forma, vėliau proporcingai gemalo vystymosi laipsniui didėja ADH₂ aktyvumas, po gimimo atsiranda ADH₃ forma (Harry & Hopkinson, 1977);

Izofermentų susidarymas

Izofermentų egzistavimo priežastys skirstomos į dvi kategorijas:

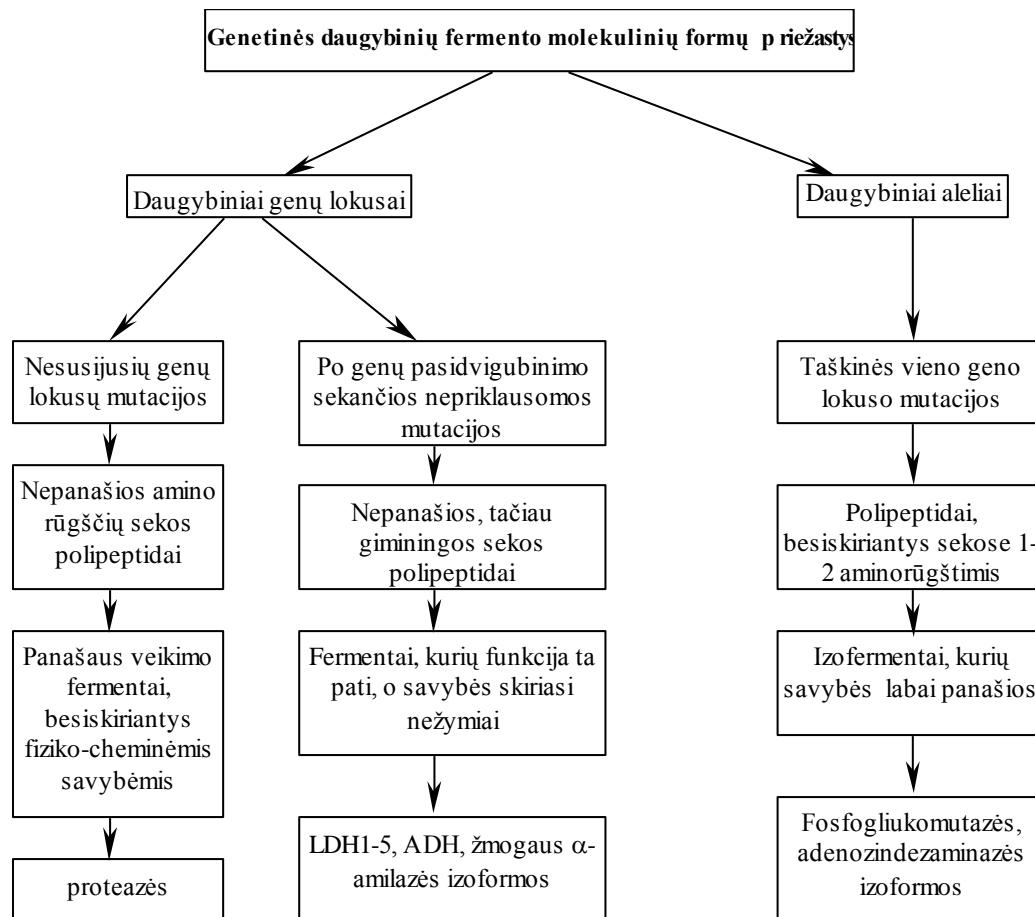
I. Genetinės (pirminės) priežastys lemia pirminių izofermentų egzistavimą. To paties fermento genų polimorfizmas pasireiškia keliomis formomis:

1. **Genų lokusų polimorfizmas.** Šiuo atveju to paties fermento izoformos gali būti koduojamos toje pačioje chromosomoje esančiais keliais lokusais (žmogaus 4-toje chromosomoje yra 4 alkoholio dehidrogenazės lokusai), arba skirtingose chromosomose superoksido dismutazės (SOD, 1.15.1.1), SOD_A 21-oje, SOD_B forma 6-oje chromosomoje; adenilatkinazė (AK, 2.7.4.3) – AK₁ – 9-oje; AK₂ – 1-oje chromosomoj) (Harry & Hopkinson, 1977). Tokie daugybiniai lokusai, koduojantys struktūriškai skirtingas polipeptidines grandis, paprastai atsiranda dėl genų padvigubėjimo evoliucijos eigoje. Tokių genų struktūra skiriasi dėl atsiradusių skirtingų taškinių mutacijų.

Pirminių izofermentų susidarymą gali lemti nepriklausoma kiekvieno lokuso raiškos reguliacija arba lokuso raiškos pokyčiai vystymosi metu. Daugeliu atvejų, atskiri polipeptidai, koduojami kelių lokusų, yra kartu sintezuojami toje pačioje ląstelėje. Bet, kai kuriais atvejais, yra galimi sintezės apimties skirtumai skirtingų audinių ląstelėse arba tuose pačiuose audiniuose skirtingu vystymosi periodu (pvz. laktato dehidrogenazė, alkoholio dehidrogenazė). Kai kuriais atvejais kelių lokusų produktai gali susidaryti kartu toje pačioje ląstelėje, bet veikia skirtingose ląstelės vietose. Pavyzdžiui, žinomi keli fermentai, turintys taip vadinamasias “tirpias” ir “mitochondrines” formas – jie veikia citozolyje ir mitochondrijose, atitinkamai. Tokių fermentų formų katalizinės ir kitos savybės panašios, nors juos koduoja atskiri lokusai ir skiriasi jų pirminė struktūra.

2. **Daugybiniai aleliai viename lokuse.** Tokių genų kilmė aiškinama alternatyvių to paties geno formų (alelių) mutacijomis, jie vadinami aleloizofermentais (aloizofermentais, alozimais). Tokios fermentų formos paveldimos kodominantiškai, t.y., pasireiškia abiejų alelių koduojamos formos ekspresija. Pagal aleloizofermentus nustatoma genetinė kilmė. (Pvz., aleliniai placentos šarminės fosfatazės variantai).

Įvairūs homozigotiniai ir heterozigotiniai populiacijos individai gali pasižymėti dideliu aleloizofermentų aktyvumų skirtumu. *Drosophila melanogaster* katabolizmui svarbūs trijų alelių koduojami alkoholio dehidrogenazės izofermentai, kurie žymimi S, F ir F^d (raidės atitinka elektroforezinį judrumą, S – slow, F – fast; F^d panašus į F). Homozigotiniai variantai gali būti keturi: SS, FF, F^dF^d ir NN, heterozigotiniai - SN, FN, FS ir t.t. Aloizofermentų kinetinės savybės (V_{max} ir K_m) skiriasi - todėl bendro ADH aktyvumo kinetinės išraiškos skirtingos kiekvienam genotipui.



Paprastai izofermentai, kuriuos lemia skirtingi lokusai, bendri organizmų rūšiai. Aleloizofermentai būdingi tik kai kuriems rūšies individams, jų paplitimas rūšies viduje ribotas. Genų nulemti izofermentų skirtumai gali lemti paveldimas metabolizmo ligas, individualią reakciją į vaistų poveikį. Tokios fermentų formos paveldimos kodominantiškai, t.y. visų alelių koduojamų formų raiška stebima heterozigotose. Jeigu izofermentas yra monomerinės struktūros (sudarytas iš vienos polipeptidinės grandinės), tuomet heterozigotose pasireikš homozigotose matomų variantų mišinys. Jei izofermentas oligomerinis (sudarytas iš dviejų ir daugiau polipeptidinių grandinių), atsiranda papildomi, "hibridiniai", nematomi homozigotiniuose individuose, izofermentai (2 pav). Aleloizofermentų kinetinės savybės - V_{max} , K_m gali skirtis.

II. Posttransliacinės (antrinės) priežastys. Tokių modifikacijų pavyzdžiais gali būti:

- 1) šoninių aminorūgščių grupių modifikacija: sacharidų prijungimas, dezamininimas, acilinimas, Tyr ir Ser fosforilinimas, -SH grupių modifikacija (LDH papildomos izoformos formuojasi, 2-merkantoetanolui nutraukus disulfidinius ryšius), ADP-ribozilnimas;
- 2) dalinė proteolizė, veikiant viduląstelinėms peptidazėms (heksokinazės izoformos),
- 3) agregacija (dažnai skirtingose rūšyse stebimos MDH daugybinių formos susidaro agreguojant 2-17 subvienetų;
- 4) sąveika su nefermentiniais baltymais (pvz., imunoglobulinais) ir su nebaltyminėmis molekulėmis (sialo rūgštimi).

Jei tokias modifikacijas patiria ne visa audinyje ar organizme esančių to paties fermento subvienetų populiacija, o tik jos dalis, atsiranda **antriniai izofermentai**.

Pvz., dezamininant Glu ir Asn karboanhidrazės paviršiuje, susidaro izofermentai - karboanhidrazės formos. Vyrų prostatos rūgštinė fosfatazė keičia aktyvumą, atskėlus sialo rūgštį. Žinduolių Amy₁A lokusas kontroliuoja amilazės sintezę seilių liaukose. Po sintezės profermentas patiria daugybines modifikacijas - polisacharidų prisijungimą ir dezamininimą. Todėl susidaro daug amilazės frakcijų, atsiskiriančių elektroforezės metu.

Antriniai izofermentai susidaro eritrocituose *in vivo*, jiems senstant. Subrendę eritrocitai neturi branduolio, todėl per gana ilgą savo gyvavimo laikotarpį (~120 dienų) jie negali sintetinti naujų baltymų. Laiko bėgyje baltymai patiria dalinę proteolizę ir dezamininimą, todėl kinta eritrocitų fermentų kinetinės ir elektroforetinės savybės (pvz., piruvato kinazės). *In vitro* eritrocitų hemolizės metu dėl tiolgrupių oksidacijos susidaro rūgštinės fosfatazės ir adenozindezaminazės izoformos.

Tokios antrinės modifikacijos paveikia ne visas fermento molekules, arba paveikia jas skirtingu laipsniu. Antrinių izofermentų formavimosi laipsnis ryškiai skiriasi skirtingų audinių ląstelėse. Šios variacijos priklauso nuo pirminės formos sintezės greičio ir ląstelės gyvavimo trukmės.

Tam tikrais atvejais antrinių izofermentų susidarymo priežastimi gali būti **konformacinis izomerizmas**. Šiuo atveju, daugelis baltymų turi vienodą pirminę struktūrą, bet skirtingą tretinę ar ketvirtinę struktūras, nes jų polipeptidinė (-s) grandinė (-ės) gali įgauti dvi ar daugiau stabilias konfigūracijas (pvz., raudonųjų kraujo kūnelių fosfatazė EC 3.1.3.2).

Homomeriniai ir heteromeriniai izofermentai .

Daugelis fermentų yra oligomeriniai baltymai, t.y. jie sudaryti iš dviejų ar daugiau polipeptidinių grandinių ar subvienetų. Tokiuose baltymuose subvienetai gali būti vienodi (tuomet jie sudaro homomerinius izofermentus: pvz., diaforazės izofermentus lemia trys autosominiai lokusai) arba skirtingi (heteromeriniai izofermentai). Elektroforezės metu aptinkamų pirminių izofermentų skaičius priklauso nuo subvienetų skaičiaus izofermento molekulėje ir polipeptidinių grandinių įvairovės. Jei homomerinius fermentus koduoja skirtingi aleliai, heterozigotuose pasireiškiantis izoformų skaičius didėja proporcingai subvienetų skaičiui.

Hibridinės oligomerinių fermentų izoformos susidaro, skirtingiems subvienetams jungiantis į fermento molekulę atsitiktiniais deriniais. Tokios molekulės gali susidaryti, tiek asocijuojant subvienetams, kilusiems iš skirtingų genų lokusų, tiek iš daugybinių to paties lokuso alelių. Galimų izofermentų skaičių nusako formulė:

$$I = (S + n - 1) ! / n !(S-1),$$

kur I - galimų izofermentų skaičius, n - subvienetų skaičius fermento molekulėje, S - subvienetų tipų skaičius. Paprasčiausiu atveju, esant 2 subvienetų tipams, galimos izofermentų formos :

1. Dimerinio fermento atveju - trys izofermentai - pvz. kreatinkinazės (CK) subvienetai M ir B sudaro tris derinius, kurių paplitimas audiniuose skiriasi:

	MM	MB	BB
skeleto raumenyse	98%	2%	-
širdyje	70-80%	20-30%	-
kraujo plazma	95%	5%	-
smegenys			dominuoja
skydliaukė			dominuoja

Asmenų, sergančių paveldimomis raumenų ligomis, CK MB kiekis raumenyse padidėjęs iki 5-15%. Taip pat šios izoformos daugiau atletų raumenyse po intensyvaus fizinio apkrovimo.

2. Trimerio galimi keturios izoformos - pvz., *E. coli* ornitin-karbamoilo transferazė,
3. Tetramero - galimas penkių izomerų egzistavimas.

Geriausiai ištirtas tetramero pavyzdys - **laktato dehidrogenazė** (LDH). Šis fermentas buvo pirmasis, kuriam nustatytas izoformos. LDH turi dviejų rūšių subvienetus - M ir H (MW 35 kDa), koduojamus skirtingų genų, kurių raiška priklauso nuo audinio. Širdies raumenyje pagrindinę dalį sudaro H subvienetai, skeleto raumenyje - M subvienetai.

Penkios izoformos: H₄ (LD₁), H₃M (LD₂), H₂M₂ (LD₃), HM₃ (LD₄), H₄ (LD₅) atskiriamos elektroforeze celiuliozės acetate arba chromatografija DEAE celiuliozės ar DEAE-Sephadex kolonėleje: H₄, vyraujanti širdyje forma, turi daugiausiai rūgštinių grupių, elektroforezės metu greičiausiai juda link anodo ir todėl vadinama LD₁. LDH izofermentų kinetinės savybės skiriasi:

- 1) H₄: K_m piruvatui maža (1×10^{-5} M), ją slopina didelė piruvato koncentracija ir pilnai slopina karbamidas, aktyvumo neveikia inkubacija 60°C temperatūroje 30 min, būdingas hidroksibutirato dehidrogenazės aktyvumas.
- 2) M₄ formos K_m didesnė (2.5×10^{-5} M) ir jos aktyvumas nemažėja, esant didelei piruvato koncentracijai, karbamidas veikia nežymiai; inkubacija 60°C temperatūroje 30 min pilnai inaktyvina; fermentas beveik neturi hidroksibutirato dehidrogenazės aktyvumo.
- 3) Heterotetramerų (LD₂₋₄) savybės yra tarpinės, priklausomai nuo subvienetų sudėties.

Pirminiuose spermocituose aptinkama dar viena, visai skirtinga LDH izoforma, sudaryta iš keturių identiškų C subvienetų.

Sudėtingesnė analizė, kai heterozigotose pasireiškia antriniai izofermentai. Antriniai izofermentai gali susidaryti iš įvairių pirminių izofermentų, tiek iš homomerinių, tiek iš heteromerinių, ir išraiška gali būti labai sudėtinga. Tokie kompleksai gali būti išanalizuoti lyginant tos pačios heterozigotos pavyzdžius skirtinguose audiniuose (pvz., raudonieji kraujo kūneliai ir fibroblastai užauginti audinio kultūroje), nes antrinių fermentų formavimasis gali gana stipriai skirtis įvairiuose audiniuose.

Izofermentų nomenklatura buvo paskelbta Webb, E. C. (1964) *Lancet* **1**, 1110; (1964) *Nature (Lond.)* **203**, 821; (1964) *Experientia* **20**, 592; (1964) *Z. Klin. Chem.* **2**, 160; (1964) *Postepy Biochem.* **10**, 525; (1965) *Enzymol. Biol. Clin.* **5**, 124

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/isoen.html#r1>

1964 metais Tarptautinės Biochemikų sąjungos Biocheminės Nomenklatos komisijos (IUPAC-IUBCBN) komiteto rekomenduojama:

1. Pavadinant izofermentus, normalus fermento pavadinimas (sisteminis ar trivialus) naudojamas kartu su numeriu. Numeris suteikiamas, priklausomai nuo elektroforezinio judrumo, mažiausią skaičių suteikiant greičiausiai judančiai link anodo fermento atmainai.

2. Jeigu pagrindinėje zonoje yra keletas elektroforezinių subzonų, numeris suteikiamas pagrindinei zonai su priedais, nurodančiu subzonas (1_a, 1_b, 1_c, 2_a, 2_b, etc.).

3. Tiksliam izofermento apibūdinimui yra nurodomos papildomos savybės: molekulinė masė, stabilumas, subvienetų struktūra. Subvienetai gali būti nurodyti sumažintomis graikiškais ar romėniškais rašmenimis, neatsižvelgiant į pasiskirstymą audiniuose. Mažosiomis lotyniškais raidėmis prieš izoformos pavadinimą gali būti nurodoma jos veikimo vieta ląstelėje – pvz., m-MDH ir s-MDH, m reiškia mitochondrijų, o s – citozolio (s, soluble), atitinkamai.

Antrinių fermentų formų nomenklatūra

Antriniai izofermentai - aiškiai nustatytos, grįžtamos (reversibly convertable) formos, atsirandančios dėl aminorūgščių šoninių grupių kovalentinių modifikacijų tam tikrose sąlygose.

Antrinių izofermentų pavadinimuose nurodoma "o" – original, (-SH) nemodifikuota forma (sudaryta iš nemodifikuotų amino rūgščių liekanų), ir "m"- modified (-SS-), forma.

Oligomeriniai fermentai, sudaryti iš dviejų ar daugiau modifikuotų galinčių formų, žymimi "o" arba "m", pridedant subdalelės numerį kiekvienoje formoje, pvz. O_n , $O_{n-1}m$, $O_{n-2}m_2\dots O_2m_{n-2}$, om_{n-1} , m_n .

Izofermentų biologinė svarba

Izofermentai, koduojami skirtingų genų, tam tikru laipsniu besiskiriantys molekulių dydžiu, polipeptidinių grandinių sudėtimi, paprastai pasižymi skirtingu substrato koncentracijos optimumu, K_m , elektroforeziniu judrumu, atsparumu temperatūrinei inaktyvacijai, jautrumu slopikliams, aktyvumu su substrato analogais, kartais - kitokiu specifiskumu substratams ar kofermentams. Dėl besiskiriančių savybių izofermentai atlieka skirtingą vaidmenį ląstelėje. Paviršiaus krūvių skirtumas molekulėje lemia izofermentų išsidėstymo ląstelėje skirtumus. Tačiau ne visada paprasta suprasti, kaip konkrečiai pasireiškia izofermentų kinetinių savybių skirtumai ląstelėje, ir koks biologinis tokių skirtumų vaidmuo. Priimta teigti, jog izofermentai atlieka specifinį vaidmenį reguliuojant ląstelės metabolizmą. Jie svarbūs subtiliam biocheminių procesų adaptacijos mechanizmui organizmo vystymosi metu ar keičiantis aplinkos sąlygoms.

Vienas iš svarbiausių biologinių vaidmenų yra izofermentų dalyvavimas metabolinių kelių erdvės skyryse. Medžiagų apykaitą ląstelėse galima įsivaizduoti, kaip nuoseklių fermentinių reakcijų sekų visumą. Paprastai svarbiausios reakcijų sekos nukreiptos tam tikra viena kryptimi ir katalizuojamos poliizofermentinių sekų (kompleksų), būdingų (savitų) tam tikriems ląstelės erdvės skyriams. Nustatyti poliizofermentiniai kompleksai tokioms metabolinėms fermentinių reakcijų sekoms:

1. gliukozė → glikogenas;
2. glikogenas → gliukozė;
3. glikogenas → piruvatas;
4. gliukozė → piruvatas;
5. glicerinas → glikogenas;
6. glicerinas → piruvatas;
7. oksaloacetatas → gliukozė;
8. oksaloacetatas → glikogenas.

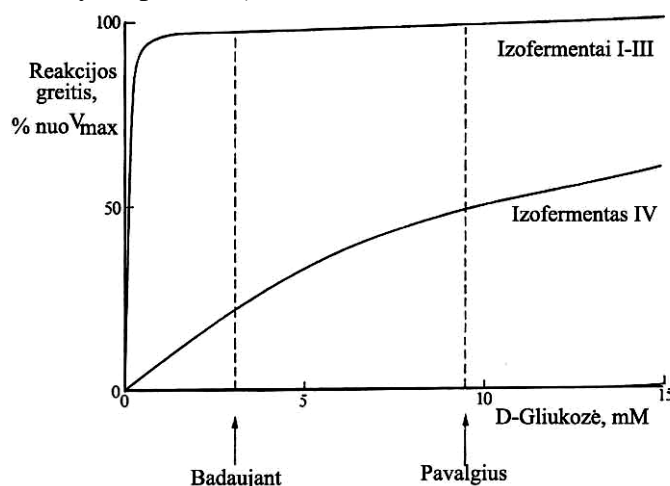
Jei ta pati reakcija vyksta skirtingose iš minėtų grandinių, kiekvienoje sekoje ją katalizuoja kitas izofermentas ar jų rinkinys. Tuo paaiškinamas fermentų izoformų būtinumas ląstelėje. Tokio pobūdžio erdvės skyryna užtikrina specifinį tos ląstelės dalies metabolizmą, metabolitų koncentracijas, leidžia tą pačią reakciją reguliuoti, pritaikant savitiems erdvės skyriaus poreikiams. Audinio izofermentų rinkinys atitinka jo metabolinį savitumą. Šio teiginio iliustracijai tiktų sekantys pavyzdžiai:

1. Izofermentai ir glikolizės reakcijų reguliacija. Trumpalaikė reguliacija pasireiškia greitais izofermentų aktyvumo pokyčiais, nekintant jų kiekiui, ilgalaikė – kintant izofermentų kiekiui.

a) Raumenų aldolazės izofermentas A efektyviai skaido fruktozės-1,6-bifosfatą, kepenų izofermentas B jį sintetuoja.

b) Kepenų ląstelėms būdingas heksokinazės izofermentas IV - gliukokinazė, kuri ima veikti (K_m gliukozei 10 mM), kai gliukozės koncentracija ląstelėje tampa artima jos koncentracijai kraujyje (3-9 mM). Heksokinazės izofermentai I-III yra paplitę visuose audiniuose, jų K_m gliukozei apie 40 μ M. Badaujant, kai gliukozės kiekis kraujyje mažas (10.1 pav.), izofermentai I-III “dirba” maksimaliu pajėgumu, o izofermentas IV – tik 25 proc. maksimalaus greičio. Tačiau pavalgius maisto, kuriame daug sacharidų, gliukozės kiekis kraujyje didėja. Gliukozės perteklius greitai sunaudojamas, nes izofermentas IV tuomet pasiekia 50 proc. pajėgumo (jo aktyvumas du kartus didesnis, nei esant mažai gliukozės (10.1 pav.))

Raumenų ląstelėse gliukozės koncentracija 100 kartų mažesnė, jose gliukokinazės nėra, o heksokinazės K_m gliukozei yra apie 100 μ M.



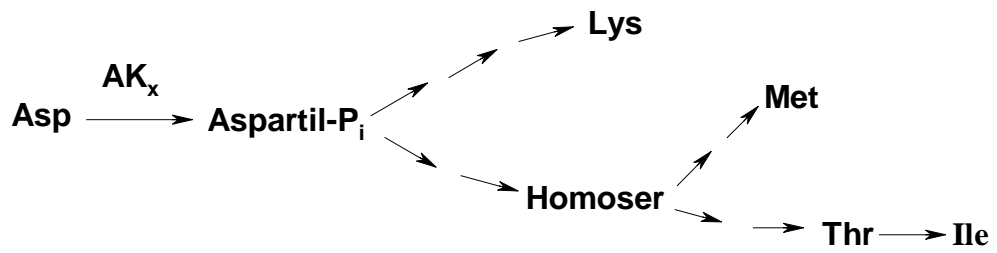
10.1 pav. Kepenų heksokinazės izofermentai efektyviai padeda sunaudoti gliukozės perteklių (Price ir Stevens, 2000).

c) Kepenų piruvato kinazės forma L pasižymi alosterinėmis savybėmis, sigmoidine kinetika, tuo tarpu raumenų izoformai M_1 nebūdinga alosterinė reguliacija fosfoenolpiruvatu.

Ilgalaikės reguliacijos pavyzdžiu gali būti glikolizės greitėjimas kepenyse dėl gliukokinazės ir piruvatkinazės L formos sintezės, kai laikomasi dietos, kurioje gausu angliavandenių.

2. LDH izoformų biologinis vaidmuo. Manoma, kad audiniuose, kuriems būdinga intensyvi aerobinė apykaita (pvz., širdies audiniui) LD_1 izoformos jautrumas piruvatui svarbus, užkertant kelią pieno rūgšties pertekliaus susidarymui; šiuose audiniuose naudingiau piruvatą oksiduoti mitochondrijose. Skeleto raumenyse, kurių energetika pagrįsta anaerobine glikolize, dominuoja nejautri piruvatui izoforma LD_5 , pieno rūgštis susidaro neribotais kiekiais.

Izof fermentų svarba, užtikrinant vienaląsčių organizmų atsaką į pasikeitusias aplinkos sąlygas, iliustruojama *E. coli* aspartokinazės izofermentų, jautrių skirtingiems metaboliniams inhibitoriams, pavyzdžiu. Aspartokinazė yra pirmasis vieno iš nepakeičiamų aminorūgščių sintezės kelių fermentų. *E. coli* ląstelėje yra trys aspartokinazės izofermentai: AK_L , AK_T ir AK_H .



Reguliacija grįžtamo ryšio principu čia veikia per tris aspartokinazės izoformas AK_L , AK_T ir AK_H , kurias specifiskai ir pilnai inhibuoja Lys, Tre ir Homoser, atitinkamai. Taip, esant kurio nors iš galutinių metabolinio kelio produktų, ar homoser pertekliui, sustabdoma pirmoji kelio reakcija, tačiau ji išlaiko tam tikrą aktyvumą, sąlygotą nepaveiktų izoformų ir būtiną kitų kelio produktų sintezei.

Izofermentų vaidmuo signalo perdavimui. Vienas iš svarbių signalo transdukcijos fermentų baltymų kinazė C (PKC) turi net 11 artimų izoformų, kurių skirtingumo vaidmuo intensyviai tiriamas. Visos PKC yra citoplazminės Ser/Thr specifinės baltymų kinazės, kurias aktyvuoja fosfatidilserinas (PS), DAG, kiti fosfolipidiniai tarpininkai ir (įvairiu laipsniu) Ca^{2+} jonai. Formos skiriasi specifiskumu substratams ir jautrumu aktyvatoriams. Pagal tai PKC šeima skirstoma į tris grupes:

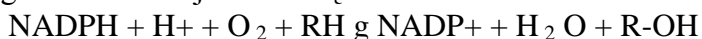
- 1) klasikinės PKC – cPKC ($\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$) – 4 homologiniai subvienetai C1, C2, C3, C4 jungiami kiekvienai izoformai specifinio domenu (variable V). cPKC aktyvuoja PS, DAG, forbolo esteriai (FE) ir Ca^{2+} ;
- 2) naujosios PKC – nPKC ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$) – neturi C2 domeno, jų aktyvacijai reikia PS, DAG ar FE, bet nebūtinai Ca^{2+} ;
- 3) netipinės PKC – aPKC (λ, ζ) – neturi C2 ir pusės C1 subvieneto, jas aktyvina tik PS;
- 4) neseniai aprašyta μ PKC, kurią aktyvina PS ir FE; ji nepriklauso nei vienai iš 3 pagrindinių grupių, turi dvi unikalias hidrofobines sekas N-gale ir skiriasi katalitiniu domenu.

Manoma, kad šie PKC izofermentai atlieka skirtingas funkcijas. Žinoma, kad cPKC βI ir βII susidaro alternatyvaus splaisingo būdu ir skiriasi net 50 aminorūgščių.

Bendras PKC bruožas yra tai, kad jų citoplazminės formos yra neaktyvios, bet jų aktyvuliai yra hidrofobiniai membranų lipidai, kurių sąveikos su PKC padarinys yra PKC perėjimas iš citozolio ar “neaktyvaus” buvimo vietų į įvairias membranas (plazminę membraną, branduolio, kt. organelių) ar jungiasi su ląstelės griaučiais, t.y., keičia vietą ląstelėje. Skirtingi izofermentai aktyvinimo metu specifiskai nukreipiami į kitas vietas - α PKC – iš tarpląstelinio sąlyčio vietų į branduolio pakraštį, βII – iš ląstelės griaučių į branduolio ir ląstelės pakraštį, o ϵ -PKC – iš branduolio ir jo pakraščio į ląstelių sąlyčio vietas ir susitraukiančiąsias struktūras. Manoma, kad kiekviena izoforma turi neaktyviai ir aktyviai būsenai savitas molekules-inkarus, sąveika su kuriomis lemia perėjimą į kitą vietą ląstelėje ir atitinkamų baltymų-taikinių fosforilinimą tose vietose.

Citochromo P450 (CYP) izofermentai

CYPai – endoplazminio tinklo membranos hemoproteinų superšeima. P reiškia pigmentą, kurio su CO sujungta forma sugeria 450 nm ilgio bangos šviesą. CYPai mišrios funkcijos oksidazės ir mono-oksigenazės, katalizuoja didelės grupės įvairios struktūros endogeninių ir egzogeninių junginių pradines skaidymo reakcijas, kurių metu molekulinis deguonis oksiduoja substratą ir susidaro vanduo.



CYPai vadinami polisubstratinėmis mono-oksigenazėmis, nes vienas fermentas gali turėti daug substratų. Šie fermentai svarbūs vaistų ir kitų ksenobiotikų biotransformacijai. Po

hidroksilinimo reakcijos padidėja substratų tirpumas vandenyje ir jie lengviau įjungiami tolimesnes skaidymo reakcijas arba gali būti šalinamai.

Be to, CYPai gali katalizuoti ir N-dealkilinimo, O-dealkilinimo, S-oksidacijos, epoksidacijos reakcijas. CYP izofermentai žymimi raidėmis ir arabiškais skaitmenimis e.g., CYP2D 6, Kiekvienas fermentas yra koduojamas kito geno, tačiau jie turi daugiau nei 40 proc. aminorūgščių sekos homologiją. Žmonių ląstelėse nustatyta bent 21 CYP šeimos nariai.

Šeimos – baltymai, kurių aminorūgščių sekos homologija siekia bent 40% pvz., CYP2, CYP3.

Pošeimės baltymų aminorūgščių sekos homologija siekia 55%, jos nariai žymimi pvz., CYP2D, CYP3A.

Bent 50 individualių genų koduoja arabiškais skaitmenimis žymimus izofermentus CYP2D 6, CYP3A 4.

Žmonės turi 21 šeimą, 20 pošeimių ir 57 genus. CYP 1, 2 ir 3 sudaro 70% bendro kepenų CYP kiekio ir lemia 94% vaistų apykaitos.

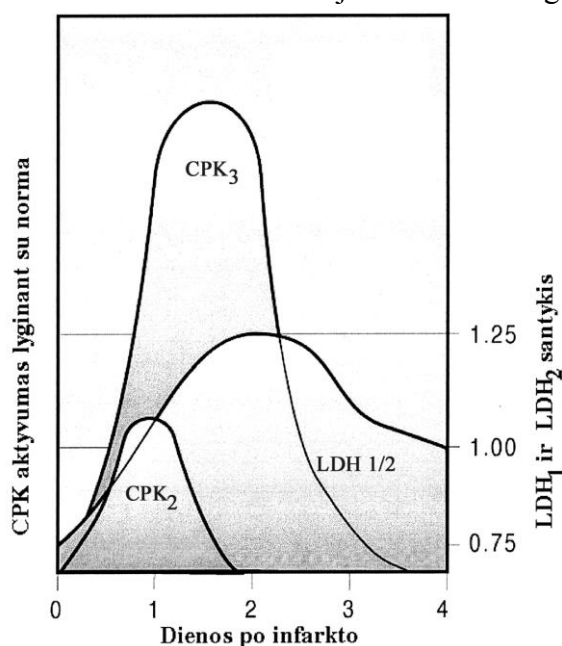
Izofermentų klinikinis panaudojimas

Klinikinei diagnostikai taikomos kreatino kinazės, laktato dehidrogenazės ir šarminės fosfatazės izoformos. Pavyzdžiu gali būti miokardo infarkto diagnostika.

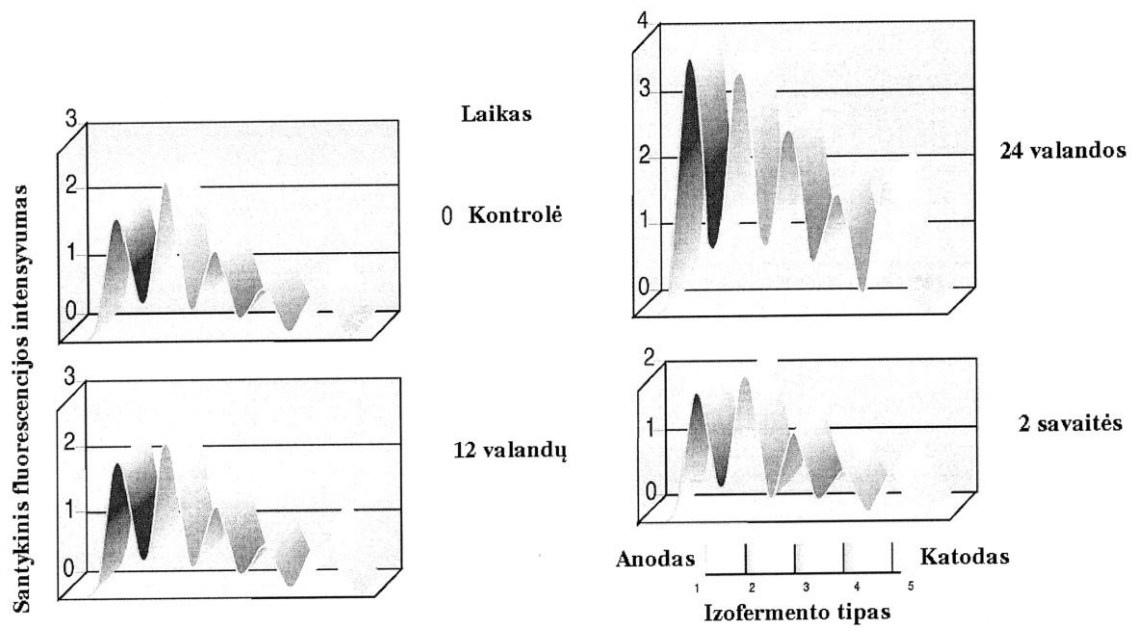
Miokardo infarkto metu pasižeidus širdies audiniui, iš jo į kraujotaką patenka miokardui (žr. psl. 4) būdingos kreatino kinazės ir laktato dehidrogenazės izoformos - MB (CPK₂) bei LDH₁ ir LDH₂. CPK₂ aktyvumas pasirodo kraujyje praėjus 6-18 val nuo infarkto pradžios, tuo tarpu LDH aktyvumas pasiekia maksimumą po 1 ar 2 dienų (10.2 pav.). Normoje LDH₂ fermento yra daugiau nei LDH₁, tačiau infarkto atveju jų santykis pasikeičia. Kai CPK₂ kiekis grįžta į bazinį lygį (po 48-60 val.), LDH₁ būna daugiau nei LDH₂.

LDH izoformų kiekis taip pat savitai kinta kraujo serume po miokardo infarkto (10.3 pav). Padidėjęs LDH₂/LDH₁ santykis stebimas po 24 valandų. Toks izofermentų sąstato vaizdas kartu su CPK padidėjimu būdingas beveik 100 miokardo infarkto atvejų, todėl tokie tyrimai duoda informacijos vertingos diagnostikai bei gydymo veiksmingumo nustatymui.

Padidėjęs LDH₅ iš šarminės fosfatazės kiekis kraujo serume būdingas kepenų pažeidimui.



10.2 pav. Laktato dehidrogenazės ir kreatino kinazės izofermentų kiekio kitimas kraujo serume po miokardo infarkto



10.3 pav. LDH izoformų kiekio pokyčiai kraujo serume po miokardo infarkto