

Terminologia izoenzymów

Marcin Maciaga

Spis treści:

I. Wstęp	1
II. Typy izoenzymów	2
II-1. Genetycznie niezależne białka	2
II-2. Allelozymy	3
II-3. Heteropolimery (hybrydy)	5
II-4. Izoenzymy drugorzędowe	5
III. Nomenklatura izoenzymów	7
IV. Zastosowanie terminologii izoenzymów w praktyce	8
IV-1. Aminotransferaza asparaginianowa (EC 2.6.1.1; AAT).....	8
IV-2. Dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27, LDH)	9
IV-3. Fosfoglukomutaza (EC 2.7.5.1, PGM)	9
V. Uwagi końcowe	10
VI. Piśmiennictwo	11

Isoenzymes terminology

Contents:

I. Introduction	
II. Isoenzymes multiplicity	
II-1. Genetically independent proteins	
II-2. Allelozymes	
II-3. Heteropolymers (hybrids)	
II-4. Secondary isozymes	
III. Isoenzymes nomenclature	
IV. Application of isoenzymes terminology in practice	
IV-1. Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1, AAT)	
IV-2. Lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27, LDH)	
IV-3. Phosphoglucomutase (EC 2.7.5.1, PGM)	
V. Concluding remarks	
VI. References	

I. Wstęp

Z nagromadzonej obszernej literatury przedmiotu wynika, że znaczna część enzymów tworzy tzw. formy wielorakie enzymu (wielorakie postacie enzymu [1]) mimo, że te izoformy katalizują te same reakcje biochemiczne w obrębie komórki, czy też nawet tego samego przedziału subkomórkowego. W 1959 roku Markert i Møller zaproponowali, aby formy wielorakie enzymów, które występują u danego osobnika i które katalizują te same reakcje biochemiczne nazwać izozymami (= izoenzymy) [2]. Jednakże formy wielorakie enzymów mogą również powstać w wyniku różnego rodzaju zabiegów laboratoryjnych, dlatego też w 1976 roku Komisja Nomenklatury Biochemicznej (CBN) Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej

(IUPAC) oraz Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUB-MB) zaleciła, aby terminologię izoenzymów stosować wyłącznie w odniesieniu do form wielorakich enzymu, które występują u danego osobnika, katalizują te same reakcje biochemiczne oraz powstały w wyniku naturalnego zróżnicowania łańcucha polipeptydowego w strukturze pierwszorzędowej [3]. A zatem, izoenzymy są rezultatem różnic uwarunkowanych genetycznie, natomiast nie powstają w wyniku modyfikacji po-translacyjnych.

W najczęściej stosowanej elektroforetycznej metodzie rozdzielania mieszaniny białek wykorzystuje się ich amfoteryczne, czyli kwasowo – zasadowe właściwości. Cząsteczki obdarzone ładunkiem migrują w zewnętrznym polu elektrycznym w kierunku przeciwnie naładowanej elektrody z szybkością zależną od wypadkowej wielkości ładunku białka, siły jonowej buforu oraz wielkości różnicy przyłożonego potencjału. Szczególnie przydatne w badaniach genetycznych okazało się połączenie elektroforezy z techniką sporządzania zymogramów, czyli wywoływania aktywności enzymatycznej bezpośrednio w żelu. Zwłaszcza ogromny przełom nastąpił, gdy dostrzeżono zależność pomiędzy obrazem na zymogramie a źródłem materiału genetycznego z którego pochodził badany enzym. Musiało to znaleźć swoje odzwierciedlenie w terminologii izoenzymów, ponieważ stosowanie m.in. takich terminów jak: genetycznie niezależne białka, allelozymy, heteropolimery, czy izoenzymy drugorzędowe stało się niezbędne do opisu końcowego obrazu na zymogramie.

II. Typy izoenzymów

W aktualnym rekomendacji z 1976 roku Komisji Nomenklatury Biochemicznej wyróżniono trzy przyczyny zróżnicowania izoenzymów: 1) izoenzymy kodowane w różnych loci, czyli genetycznie niezależne białka; 2) izoenzymy będące produktami genów allelicznych, czyli allelozymy oraz 3) izoenzymy uformułowane z polipeptydów kodowanych w różnych loci, czyli heteropolimery (hybrydy) [3]. Jednakże, niemniej ważne są również 4) izoenzymy, które powstają w wyniku wtórnych modyfikacji łańcucha polipeptydowego, czyli izoenzymy drugorzędowe.

II-1. Genetycznie niezależne białka

Wielokrotnie wykazano, że wiele enzymów jest kodowanych w dwóch, a nawet większej liczbie loci. Przypuszcza się nawet, że polimorfizm genów może dotyczyć około jednej czwartej wszystkich enzymów [4]. Przyczyną tego zróżnicowania genów mogło być przejęcie w toku ewolucji przez komórkę centralną zróżnicowanego materiału genetycznego z prakomórek, które następnie przekształciły się w organelle komórkowe. Wyjaśniałoby to zarazem, dlaczego w mitochondriach i chloroplastach znajduje się szczątkową informację genetyczną.

Pomimo faktu, że genetycznie niezależne białka są syntetyzowane w tej samej komórce, to w przypadku dużej grupy enzymów izoenzymy różnią się lokalizacją subkomórkową, np. jedna forma enzymu występuje w cytoplazmie, natomiast druga w mitochondriach. Właściwości katalityczne izoenzymu cytoplazmatycznego, czy też mitochondrialnego zwykle są zbliżone, chociaż różnią się one oczywiście

składem aminokwasowym łańcucha polipeptydowego, a zatem i właściwościami fizyko-chemicznymi. Nawet nieduża różnica w wypadkowym ładunku między izoenzymami spowodowana podstawieniami aminokwasów o charakterze zasadowym, np. lizyna na inne o charakterze kwaśnym, np. asparaginian może być dobrze widoczna podczas rozdziału elektroforetycznego.

II-2. Allelozomy

Ze względu na budowę, enzymy można podzielić na monomeryczne i oligomeryczne, czyli enzymy utworzone z dwóch (dimery), trzech (trimery), czterech (tetramery) lub jeszcze większej liczby łańcuchów polipeptydowych (podjednostek). Uwzględniając fakt, że u homozygoty wytwarzany jest tylko jeden rodzaj podjednostek w danym lokus: α bądź β , można przypuszczać, że wszystkie enzymy u tego organizmu niezależnie od ich budowy podjednostkowej będą występować w jednej z dwóch form. Natomiast u heterozygoty, który wytwarza dwa rodzaje podjednostek, zarówno α jak i β różniących się między sobą właściwościami, np. wypadkowym ładunkiem cząsteczki, ale nie do tego stopnia by nie mogły ze sobą zhybrydować, obserwuje się pojawienie się dodatkowych prążków będących kombinacją obu typów podjednostek (Rysunek 1).

Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer
α █	$\alpha\alpha$ █	$\alpha\alpha\alpha$ █	$\alpha\alpha\alpha\alpha$ █
		$\alpha\alpha\beta$ █	$\alpha\alpha\alpha\beta$ █
	$\alpha\beta$ █		$\alpha\alpha\beta\beta$ █
		$\alpha\beta\beta$ █	$\alpha\beta\beta\beta$ █
β █	$\beta\beta$ █	$\beta\beta\beta$ █	$\beta\beta\beta\beta$ █

Rysunek 1. Teoretycznie przewidywany układ prążków (allelozymów) rozdzielonych elektroforetycznie dla heterozygoty, który wytwarza w danym lokus dwa rodzaje podjednostek: α oraz β w zależności od tego, czy enzym jest monomerem, dimerem, trimerym, czy też tetramerym. W przypadku homozygoty, który wytwarza jeden rodzaj podjednostek: α bądź β , należy oczekiwać pojedynczego prążka, przy jednoczesnym braku form pośrednich będących kombinacją obu typów podjednostek.

A zatem, allelozomy są to izoenzymy utworzone z podjednostek kodowanych przez geny alleliczne i tak dla heterozygoty, który wytwarza dwa rodzaje podjednostek α i β , na zymogramie dla enzymu monomerycznego należy oczekiwać pojawienia się dwóch alloenzymów o składzie podjednostkowym α i β , dla dimeru – trzech alloenzymów ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ i $\beta\beta$), trimery – czterech ($\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\beta$, $\alpha\beta\beta$ i $\beta\beta\beta$), z kolei dla tetramery – pięciu alloenzymów ($\alpha\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\beta$, $\alpha\alpha\beta\beta$, $\alpha\beta\beta\beta$ i $\beta\beta\beta\beta$). Natomiast w przypadku homozygoty produkującego wyłącznie jeden typ podjednostki: α bądź β , zarówno dla enzymu monomerycznego, jak i oligomerycznego na zymogramie pojawi się pojedynczy prążek w jednej z dwóch możliwych pozycji, w

zależności od tego, jaką ruchliwością elektroforetyczną charakteryzuje się dana podjednostka. Poniżej przedstawiony wzór pozwala ująć powyższą zależność w sposób matematyczny:

$$n = \frac{(s + p - 1)!}{p! (s - 1)!},$$

gdzie:

n – liczba oczekiwanych allelozymów,
s – ilość różnych syntetyzowanych podjednostek,
p – ilość podjednostek z których utworzony jest enzym.

Dla przykładu, jeżeli są wytwarzane dwa rodzaje podjednostek (s = 2), to dla enzymu, który jest tetramerem (p = 4) licznik wyniesie 5! (silnia), natomiast mianownik 4! * 1!, co się równa 5. Oznacza to, że enzym może występować w pięciu różnych formach enzymatycznych.

Jeżeli częstotliwość wytwarzania podjednostek tworzących izoenzymy jest tak sama oraz wydajność katalityczna alloenzymów powstałych w wyniku hybrydyzacji podjednostek jest podobna, to na zymogramie w obrębie tzw. pasma aktywności enzymatycznej lub po prostu pasma enzymatycznego obserwuje się symetryczny rozkład prążków (Rysunek 1). W takim przypadku stosunek intensywności zabarwienia chromoforu u heterozygoty dla dimeru wynosi 1 : 2 : 1, dla trimeru 1 : 3 : 3 : 1, z kolei dla tetrameru 1 : 4 : 6 : 4 : 1. A zatem, u dimeru 50% całkowitej aktywności będzie przypadać na formy homozygotyczne, u trimeru 25%, natomiast u tetrameru już 12.5%. Poniższy wzór dwumianowy Newtona ujmuje tę zależność w sposób matematyczny:

$$(a + b)^2 = \binom{2}{0}a^2 + \binom{2}{1}a^{1}b + \binom{2}{2}b^2,$$

lub w postaci krótszej, posługując się symbolem sumy:

$$(a + b)^n = \sum_{k=0}^n \binom{n}{k} a^k b^{n-k},$$

gdzie $\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$,

a, b – typy różnych podjednostek,
n – ilość podjednostek z których utworzony jest enzym.

Dla przykładu, jeżeli wytwarzane są przez organizm dwie różne podjednostki i nasz enzym jest dimerem, to rozwiązaniem powyższego wzoru będzie $(a + b)^2 = a^2 + 2ab + b^2$, a współczynniki przed literami, które oznaczają skład podjednostkowy izoenzymów oznaczają proporcję w jakiej występują allelozymy, tzn. 1 : 2 : 1. W przypadku większej liczby podjednostek po uzyskaniu rozwiązania dla dwóch podjednostek należy podstawić trzecią, np. $b^2 = (b + c)^2$ i dalej analogicznie liczyć do uzyskania rozwiązania dla wszystkich interesujących podjednostek.

Natomiast, jeżeli na zymogramie obserwuje się asymetryczny rozkład zabarwienia allelozymów w obrębie pasma enzymatycznego, to może to oznaczać, że wydajność katalityczna alloenzymów jest różna, synteza któregoś z polipeptydów ma mniejszy lub większy udział w całkowitej aktywności enzymu, mniejsza stabilność podjednostki, inna wydajność katalityczna w wyniku została zredukowana aktywność enzymatyczna danego allelozymu. Jeżeli na przykład podjednostka jest produkowana z dwa razy większą szybkością od drugiej, co jest wynikiem większej syntezy mRNA, albo duplikacja jednego z genów, to wówczas przy założeniu takiej samej stabilności podjednostek, ich wydajności katalitycznej itd. otrzymamy u heterozygoty rozkład 4 : 4 : 1, natomiast przy syntezie 3 : 1 rozkład 9 : 6 : 1. Wzór 2 również pozwala to policzyć.

II-3. Heteropolimery (hybrydy)

W pewnych przypadkach izoenzymy mogą utworzyć się w wyniku hybrydyzacji podjednostek pochodzących z różnych loci (heteropolimery lub enzymy hybrydowe). Jeżeli do tego loci są polimorficzne, to ilość możliwych kombinacji, a co za tym idzie obraz na zymogramie może być wyjątkowo złożony. Poniższy wzór pozwala to policzyć:

$$i = \frac{(L + h + n - 1)!}{n!(L + h - 1)!},$$

gdzie:

L – liczba loci,
h – liczba heterozygotycznych loci,
n – budowa enzymu.

Na przykład, jeżeli enzym jest tetramerem ($n = 4$) kodowany w dwóch loci ($L = 2$), z których jedno wytwarza dwa rodzaje podjednostek ($h = 1$), to liczba powstałych enzymów hybrydowych wynosi 15 (dehydrogenaza mleczanowa []). Natomiast w przypadku enzymu dimerycznego (dehydrogenaza alkoholowa []) z heterozygotycznością w jednym loci: $L = 3$, $h = 1$, $n = 2$ liczba różnych izoenzymów wynosi 10.

Na ogół produkty genów z różnych loci tworzą charakterystyczne pasma enzymatyczne, jednakże w przypadku dehydrogenazy mleczanowej produkty genów z dwóch loci hybrydują ze sobą tworząc pięć różnych kombinacji. U tego enzymu w toku ewolucji dwa różne geny (niewykluczone, że były one w przeszłości genami allelicznymi) znalazły się w dwóch loci na tym samym chromosomie dzięki temu w komórkach haploidalnych może występować pięć różnych form. Wydaje się ważne, że produkty genów nawet tych z różnych loci w ogóle rozpoznają się i hybrydują ze sobą.

II-4. Izoenzymy drugorzędowe

Genetycznie uwarunkowane różnice w strukturze pierwszorzędowej cząsteczki białka są przyczyną, dla której wyróżniono genetycznie niezależne białka oraz allelozymy. Jednakże, stosowanie wyłącznie

tych terminów, nie zawsze pozwala w pełni zinterpretować uzyskany wynik na zymogramie, ponieważ izoenzymy mogą również powstawać w wyniku wtórnych modyfikacji po-translacyjnych. Z tej przyczyny wprowadzono dodatkowo termin izoenzymy drugorzędowe.

Jednym z typów modyfikacji enzymu, która prawdopodobnie dość często jest przyczyną powstawania izoenzymów drugorzędowych jest deaminacja reszty glutaminy lub asparaginy na powierzchni cząsteczki enzymu. Innymi możliwymi modyfikacjami, które mogą pojawić się w poszczególnych przypadkach są: acetylacja, utlenienie grup sulhydrylowych, dodanie grupy fosforowej, czy też dodanie lub usunięcie grup karbonylowych, metylowych lub reszt glikozydowych. Izoenzymy drugorzędowe mogą również powstawać w wyniku agregacji, polimeryzacji lub przecięcia łańcucha polipeptydowego przez enzym proteolityczny.

Pojawianie się izoenzymów drugorzędowych może być wynikiem zastosowania nieodpowiedniego buforu, ale może być również efektem starzenia się enzymu. Wiele enzymów otrzymanych z czerwonych krwinek, które posiadają niezwykle długi okres życia, charakteryzuje się pojawianiem się izoenzymów drugorzędowych.

Przypuszcza się, że w niektórych przypadkach przyczyną pojawienia się izoenzymów drugorzędowych może być występowanie enzymu w różnych formach izomerycznych. Poszczególne biomolekuły mają tę samą strukturę pierwszorzędową, ale różnią się strukturą wtórną, albo też strukturą trójwymiarową, ponieważ łańcuchy polipeptydowe mogą występować w dwóch lub większej ilości stabilnych formach. A zatem, jeśli ktoś wyizolował jeden izoenzym z całego ich zestawu, to powinna istnieć możliwość odzyskania z niego całego zestawu. Przykładem takiego fenomenu jest kwaśna fosfataza występująca w czerwonych krwinkach.

W przypadku niektórych dehydrogenaz, które współdziałają z koenzymami NAD^+ lub NADP^+ , mogą być również obserwowane różne formy enzymu w zależności od stopnia nasycenia cząsteczki białka koenzymem. W takim przypadku by wyniki były powtarzalne enzym powinien być wysycony koenzymem oraz przechowywany w tym samym buforze. Nasycenie koenzymem może ponadto wpływać stabilizująco na enzym w czasie jego przechowywania lub podczas rozdziału.

Podczas analizy zymogramu należy zwrócić również uwagę na fakt, że sam sposób ekstrakcji enzymu z danej tkanki, a także dalszy sposób postępowania z nim przed elektroforezą mogą mieć wpływ na powstawanie dodatkowych form enzymu. Istnieje bowiem możliwość, że niektóre enzymy mogą wiązać się z innymi biomolekułami i przez to inaczej zachowywać się podczas rozdziału elektroforetycznego. Inną przyczyną może być wpływ enzymów proteolitycznych lub innych enzymów w trakcie ekstrakcji, oczywiście jeśli nie będą przestrzegane podstawowe zasady pracy z enzymem.

Kolejną możliwością pojawiania się dodatkowych form enzymatycznych są reakcje chemiczne z innymi komponentami znajdującymi się w ekstrakcie. Dobrze znanym przykładem tego typu reakcji jest utlenianie glutationu przez reaktywne grupy sulhydrylowe. Badanie tego rodzaju polegają na przeprowadzeniu serii doświadczeń, w których enzym jest traktowany różnymi reaktywnymi odczynnikami z następującym po tym rozdziale elektroforetycznym powstałych produktów.

III. Nomenklatura izoenzymów

Formy wielorakie enzymów można rozróżnić za pomocą kilku metod takich jak: elektroforeza, chromatografia, metody immunochemiczne, jak również za pomocą badania kinetyki reakcji, przy czym rozdział elektroforetyczny umożliwia najlepszą identyfikację izoenzymów. W związku z tym Komisja Nomenklatury Biochemicznej zaleciła, aby izoenzymy oznaczać na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej [], natomiast pozostałe metody wykorzystać jako wartościowe uzupełnienie.

Ruchliwość elektroforetyczna izoenzymów w zewnętrznym polu elektrycznym zależy od ich składu aminokwasowego, który nadaje im wypadkowy ładunek, od siły jonowej buforu, w którym przeprowadza się elektroforezę oraz od wielkości różnicy przyłożonych potencjałów między elektrodami. Rozdzielone izoenzymy identyfikuje się bezpośrednio w żelu (zymogram) poprzez inkubację żelu w odpowiedniej dla danego enzymu mieszaninie reakcyjnej. Wówczas w miejscach, w których znajdują się izoenzymy pojawiają się barwne produkty reakcji enzymatycznej świadczące o obecności enzymu. Obecnie opracowano około 800 metod wizualizacji izoenzymów rozdzielonych elektroforetycznie dla ponad 200 różnych enzymów [].

Rozdział elektroforetyczny powinien być prowadzony w ściśle zdefiniowanych warunkach umożliwiających jego powtórzenie. Oznaczając na zymogramie kolejne izoenzymy zaleca się stosowanie trzyliterowych skrótów pochodzących od nazwy zwyczajowej enzymu z następującymi po nich numerami zaczynając od prążków o największej ruchliwości elektroforetycznej w kierunku anody. Na zdjęciach lub diagramach przedstawiających zymogram z rozdzielonymi prążkami powinny być wyraźnie zaznaczone elektrody oraz kierunek elektroforezy. W przypadku, gdy mamy do czynienia ze złożonymi obrazami, tzn. izoenzymy grupują się w pasma enzymatyczne, to zaleca się, aby każde pasmo oddzielnie ponumerować, natomiast alloenzymom w obrębie pasma przyporządkować małe literki, np. 1a, 1b, 1c, 2c, ..., 3d, itd.

Jeśli istnieje taka konieczność oraz jest dostępna bardziej szczegółowa charakterystyka poszczególnych izoenzymów, to obok wyżej opisanych oznaczeń, można również dołączyć, np. masę molekularną, stabilność, czy też strukturę podjednostkową izoenzymu. Zaleca się przy tym, aby podjednostki enzymu były oznaczone małymi greckimi literami. Natomiast odradza się prowadzenia oznaczeń podjednostek na podstawie występowania izoenzymów w różnych tkankach, np. podjednostka M oraz H dehydrogenazy mleczanowej pochodzące produkowane w mięśniach szkieletowych (muscle) i sercu (heart), odpowiednio.

Czasami przy opisie izoenzymów jest niezbędny elastyczny opis, ponieważ odkrycie nowego izoenzymu nie oznacza całkiem, że będzie to ostatni odkryty wariant. Wręcz nawet w niektórych przypadkach można spodziewać się dużej liczby izoenzymów, które nie zostały jeszcze odkryte, np. dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, która występuje u człowieka aż w 50 formach. W takich sytuacjach proponuje się zamiast oznaczeń dotychczas przedstawionych wprowadzić skróty, czy też nazwy, by uniknąć zamieszania ze zmianą oznaczeń lub pomyłki użycia dwóch tych samych liter dla

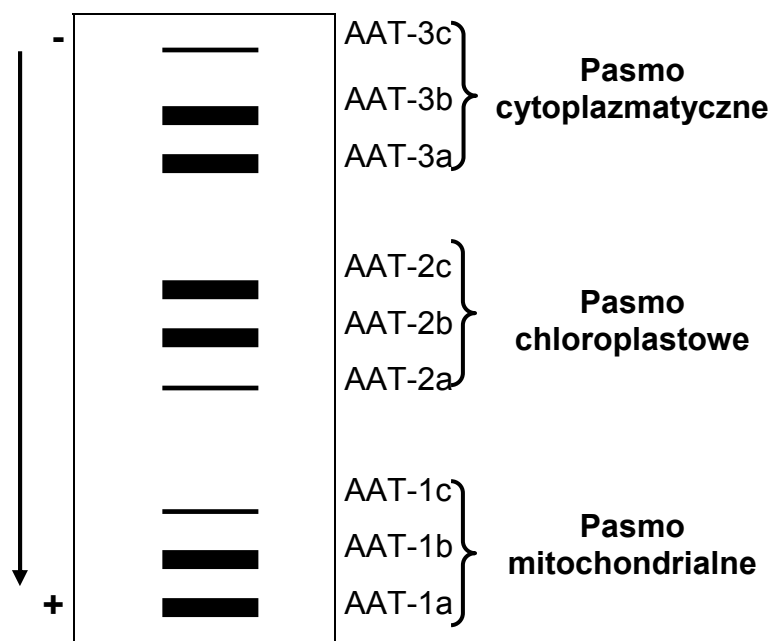
dwóch różnych alloenzymów. Jeżeli dotychczas uważano dwa alloenzymy są różne i odkryto teraz, że są one jednak identyczne, to nazwa, którą stosowano na oznaczenie pierwszego allelozymu powinna być również przyjęta dla drugiego.

IV. Zastosowanie terminologii izoenzymów w praktyce

Aminotransferaza asparaginianowa z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) jest bardzo ciekawym przykładem umożliwiającym jednocześnie omówienie zarówno genetycznie niezależnych białek jak również allelozymów. Ponadto na przykładzie tego enzymu zostaną omówione różnice w intensywności zabarwienia chromoforu pomiędzy alloenzymami w obrębie pasm. Z kolei na przykładzie innego dobrze zbadanego enzymu – dehydrogenazy mleczanowej omówiono powstawanie heteropolimerów, czyli białek uformułowanych z polipeptydów kodowanych w różnych loci, które zhybrydowały ze sobą. Na kolejnym przykładzie – fosfoglukomutaza omówiono izoenzymy drugorzędowe.

IV-1. Aminotransferaza asparaginianowa (EC 2.6.1.1; AAT)

Na zymogramie otrzymanym dla aminotransferazy asparaginianowej (AAT) z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) obserwuje się dziewięć izoenzymów, które są pogrupowane po trzy alloenzymy w trzech pasmach enzymatycznych oznaczonych: AAT-1, AAT-2 i AAT-3 (Rysunek 2). Na podstawie zymogramów AAT z *T. aestivum* dla frakcji subkomórkowych uzyskanych metodami wirowania różnicowego [5] stwierdzono, że pasmo enzymatyczne AAT-1 jest charakterystyczne dla mitochondriów, AAT-2 dla chloroplastów, natomiast AAT-3 dla cytoplazmy (Rysunek 2).



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie zymogramu otrzymanego dla aminotransferazy asparaginianowej (AAT) z *Triticum aestivum* AABBDD (n = 42). Pasma AAT-1 jest charakterystyczne dla frakcji mitochondrialnej, AAT-2 dla chloroplastowej, AAT-3 dla frakcji cytoplazmatycznej.

Heksaploidalna pszenica *T. aestivum* AABBDD ($n = 42$) posiada trzy genomy: A, B i D, każdy z 7 parami chromosomów homologicznych. Stwierdzono, że trzecia para chromosomów homologicznych z genomu A, B i D odpowiada za biosyntezę alloenzymów należących do pasma cytoplazmatycznego (AAT-3), przy czym genom A koduje podjednostkę α , natomiast genom B i D podjednostkę β [5]. Wytwarzane podjednostki α i β aktywnej enzymatycznie jako dimer AAT hybrydują ze sobą na trzy sposoby. Widocznym rezultatem tej hybrydyzacji na zymogramie jest alloenzym w pozycji AAT-3a utworzony z dimerów $\beta\beta$, AAT-3b z $\alpha\beta$ oraz AAT-3c z $\alpha\alpha$ [5]. Obserwowane różnice w intensywności zabarwienia chromoforu dla alloenzymów w poszczególnych pasmach np. prążki w pozycjach AAT-3a:AAT-3b:AAT-3c mają rozkład zbliżony do 4:4:1 związany jest z faktem, że podjednostka β wytwarzana w genomie B i D występuje dwa razy częściej od α wytwarzanej tylko w genomie A [5]. Dla pasma mitochondrialnego oraz chloroplastowego istnieją analogiczne mechanizmy biosyntezy pasm enzymatycznych.

IV-2. Dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27, LDH)

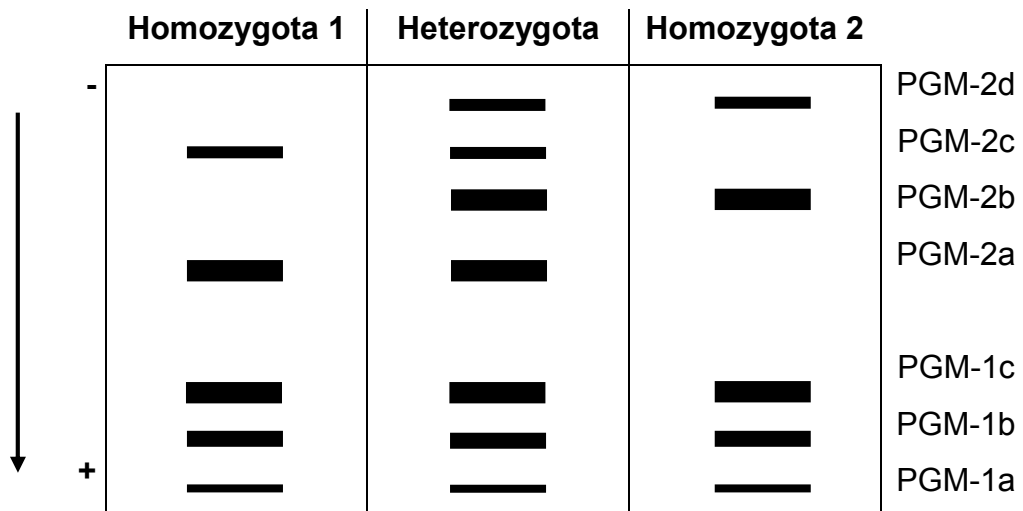
Dehydrogenaza mleczanowa (EC 1.1.1.27, LDH) jest enzymem tetramerycznym, tzn. zbudowanym z czterech łańcuchów polipeptydowych (podjednostek) i katalizuje następującą reakcję enzymatyczną: pirogronian + $\text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{mleczan} + \text{NAD}^+$. U większości żywych organizmów enzym występuje w pięciu formach enzymatycznych, które są kombinacją dwóch rodzajów podjednostek M i H, tj. LDH-1 (HHHH), LDH-2 (HHHM), LDH-3 (HHMM), LDH-4 (HMMM) i LDH-5 (MMMM). Jednakże występowanie izoenzymów LDH w poszczególnych tkankach podlega kontroli i tak np. izoenzymy LDH-4 i LDH-5, które zawierają podjednostkę M występują głównie w mięśniach szkieletowych, podczas gdy LDH-1 i LDH-2 zawierające podjednostkę H w mięśniu sercowym. Przypuszcza się, że podjednostka M charakteryzuje się lepszymi parametrami katalitycznymi w warunkach beztlenowych w których zachodzi glikoliza z równoczesnym nagromadzeniem się mleczanu w mięśniach szkieletowych podczas wysiłku fizycznego. Natomiast podjednostka H charakteryzuje się...

Podjednostka M posiada w neutralnym pH wyższy ujemny wypadkowy ładunek, aniżeli podjednostka H, dlatego też izoenzymy LDH-1 oraz LDH-2, które głównie zawierają podjednostkę M charakteryzują się większą ruchliwością elektroforetyczną w kierunku anody od izoenzymów LDH-4 i LDH-5, które są głównie utworzone z podjednostki H.

IV-3. Fosfoglukomutaza (EC 2.7.5.1, PGM)

Fosfoglukomutaza katalizuje reakcję przeniesienia grupy fosforanowej z węgla w pozycji 1 na 6. U człowieka enzym jest kodowany w trzech loci, tj. PGM_1 , PGM_2 i PGM_3 . Fosfoglukomutaza jest monomerem i występuje we wszystkich tkankach, jednak 90% całkowitej aktywności enzymu przypada na PGM_1 oraz PGM_2 . Wyjątkiem są czerwone krwinki, ponieważ ponad połowa aktywności należy do PGM_2 . Aktywność PGM_3 we wszystkich tkankach jest niska a czerwonych krwinkach i mięśniach szkieletowych prawie nie do wykrycia. Każde z trzech loci jest polimorficzne. Izoenzymy są wrażliwe szczególnie na grupy tiolowe, np. aby zrobić elektroforezę izoenzymów kodowanych w lokus PGM_3 , konieczne należy

dodać merkaptoetanolu w trakcie zabiegów laboratoryjnych by być pewnym właściwego oznaczenia izoenzymów. W związku z tym wiele izoenzymów PGM to izoenzymy drugorzędowe. Dla przykładu izoenzymy z pierwszego lokus, które jest polimorficzne i wytwarza dwa allele, daje w rezultacie u człowieka w czerwonych krwinkach trzy fenotypy (Rysunek 3).



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie zymogramu dla trzech najczęściej spotykanych fenotypów fosfoglukomutazy z pierwszego lokus (PGM₁) z czerwonych krwinek człowieka. Izoenzymami drugorzędowymi są prążki w pozycjach PGM-1b, -1c, które razem z -1a tworzą pierwszą serię prążków (PGM-1), oraz prążki w pozycjach PGM-2c i -2d, które razem z -2a i -2b tworzą drugą serię prążków (PGM-2).

Na zymogramie fosfoglukomutazy z czerwonych krwinek człowieka zostały przedstawione trzy najczęściej spotykane fenotypy izoenzymów będących produktami pierwszego polimorficznego lokus (PGM₁). Przypuszcza się, że prążki PGM-1b i -1c, oraz prążki -2c oraz -2d są izoenzymami drugorzędowymi.

V. Uwagi końcowe

Opracowano różne techniki elektroforetyczne do rozdzielania izoenzymów, m.in. elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (PAGE), elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących z użyciem detergentu soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS-PAGE), ogniskowanie izoelektryczne, czy elektroforeza dwukierunkowa. PAGE jest najczęściej spotykaną techniką, jednak ogniskowanie izoelektryczne jest coraz częściej stosowane. Ogniskowanie izoelektryczne i elektroforeza dwuwymiarowa pozwala lepiej rozdzielić izoenzymy, aniżeli inne metody, jednak uzyskiwane tymi metodami zymogramy mogą być wyjątkowo trudne w interpretacji. Natomiast SDS-PAGE nie najlepiej nadaje się do analizy izoenzymów, gdyż do wizualizacji potrzeba niezdenaturowanego enzymu, chociaż ta technika może być dawać dodatkowe informacje na temat różnicy w masie cząsteczkowej.

Rozdział elektroforetyczny znalazł zastosowanie w biochemii genetycznej do badania kontroli syntezy enzymów, lokalizacji chromosomalnej izoenzymów, czy też tworzeniu map genetycznych

chromosomów. W biochemii populacyjnej do badania struktury populacji, co może być przydatne w systematyce, ewolucjonizmie.

We wszystkich tych dziedzinach terminologia izoenzymów odgrywa ważną rolę. Dobra terminologia umożliwia lepszą komunikację oraz łatwiejszą interpretację.

VI. Piśmiennictwo

- [1] Webb E.C. (1964). Nomenklatura wielorakich postaci enzymów. *Postępy biochemii*: 525-526.
- [2] Markert C., Møller F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45: 753-763.
- [3] Nomenclature of Multiple Forms of Enzymes (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 1-3; *Biochem. J.* 171, 37-39 or *Eur. J. Biochem.* 82: 1-3. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/isoen.html>
- [4] Harris H., Hopkinson D.A. (1976). *Handbook of Enzymes Electrophoresis in Human Genetics*, North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- [5] Manchenko G., P. (2002). *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*, CRC Press.
- [6] Maciąga M., Paszkowski A. (2004). Genetic control of aspartate aminotransferase isoenzymes in *Aegilops* and *Triticum* species. *J. Appl. Genet.* 45(4): 411-417. <http://d-artagnan.webpark.pl>
- [7] <http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1995/mical95c.pdf>
- [8] Tanksley S.D., Orton T.J. (1986). *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.