

Izolacja i właściwości enzymu jabłczanowego plemników śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus*)

Natalia Niedźwiecka

Śledź (*Clupea harengus*) jest bardzo szeroko rozpowszechnionym gatunkiem o ogromnym znaczeniu ekologicznym i gospodarczym. Tarło śledzi odbywa się stałych, ściśle określonych miejscach, głównie estuariach i morskich wodach przybrzeżnych. Interesującym aspektem biologii rozrodu śledzi są unikalne mechanizmy aktywacji plemników: zdolność do falowej inicjacji ruchliwości przez grupy plemników oraz długotrwałe utrzymywanie przez nieruchliwe plemniki potencjału do aktywacji, która następuje w obecności czynników białkowych wydzielanych przez komórki jajowe. Mechanizmy te wymagają specyficznych przystosowań metabolizmu plemników, które można zidentyfikować poprzez m. in. analizy porównawcze aktywności enzymów uczestniczących w najważniejszych szlakach biochemicznych.

Badania aktywności NADP-zależnych dehydrogenaz wykazały wysoką aktywność NAD(P)-zależnego enzymu jabłczanowego (ME) z plemników śledzia (213 nmol/min/mg białka), podczas gdy aktywności IDH i G-6-PDH były niższe niż w plemnikach większości innych badanych gatunków ryb. Ten unikalny profil aktywności enzymatycznej stanowił podstawę do podjęcia dalszych badań ME.

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie izoform enzymu jabłczanowego występujących w plemnikach śledzia i ich charakterystyka biochemiczna. Optymalizacja metodyki oczyszczania ME pozwoliła na wyizolowanie dwóch izoform ME różniących się powinowactwem do koenzymów: NAD-preferującej (masa 61 kDa), której aktywność stanowiła ok. 97% łącznej aktywności całkowitej ME, oraz NADP-specyficznej (64 kDa). Przeprowadzone badania struktury czwartorzędowej pozwoliły ustalić, że NAD-preferujący ME występuje jako mieszanina aktywnych oktamerów i tetramerów, które w niskim pH rozpadają się do nieaktywnych dimerów i monomerów. NADP-specyficzny ME prawdopodobnie jest heksamerem. Uzyskanie przeciwciał przeciw NAD-preferującemu ME umożliwiło stwierdzenie mitochondrialnej lokalizacji tego białka.

Enzym jabłczanowy przeprowadza odwracalną reakcję dekarboksylację jabłczanu do pirogronianu z generacją NADH/NADPH w obecności dwuwartościowych jonów metali, preferencyjnie jonów manganu. Wykazano, że stosunek reakcji dekarboksylacji jabłczanu do karboksylacji pirogronianu różni się w zależności od warunków środowiska reakcji, tj. pH oraz stężenia i rodzaju jonów aktywatorowych, jednak we wszystkich przebadanych warunkach dla obydwu izoform przeważa reakcja dekarboksylacji. W pH 8,0 (wartość zbliżona do fizjologicznego pH mitochondriów) NAD-preferujący ME przeprowadza wyłącznie reakcję dekarboksylacji.

Aktywność ME może być regulowana przez zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Stwierdzono zależny od stężenia hamujący efekt ATP na aktywność NAD-preferującego ME, który może być częściowo odwracany przez fumaran.

Badania *in vitro* aktywacji ME przez kationy dwuwartościowe pozwoliły wykazać antagonistyczny efekt jonów kadmu: zdolność do zarówno nieznacznej aktywacji, jak i inhibicji aktywności ME w zależności od warunków reakcji. Jony kadmu wpływały również na strukturę oligomeryczną NAD-preferującego ME.

Podsumowując, w niniejszej pracy wyizolowano i scharakteryzowano dwie izoformy ME z plemników śledzia różniące się właściwościami kinetycznymi i fizykochemicznymi. Łączna wysoka aktywność ME w plemnikach śledzia może stanowić ważny element adaptacji metabolizmu energetycznego do unikalnej biologii rozrodu tego gatunku.