



УДК 577.152.193*1.04+577.152.111*27.04

АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМ-*c*-ОКСИДАЗЫ, ИЗОФЕРМЕНТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СУБЪЕДИНИЦ *Cox1*, *Cox2*, *Cox4* И *Cox6* ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ КУМЖИ *SALMO TRUTTA* L.

© 2016 г. О. В. Мещерякова[#], М. В. Чурова, А. Е. Веселов, Н. Н. Немова

Институт биологии Карельского научного центра РАН
185910, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

Поступила в редакцию 16.04.2015 г. Принята к печати 07.07.2015 г.

У однолетней молоди кумжи *Salmo trutta* L. из рек бассейна Онежского озера исследованы особенности изменения некоторых параметров митохондрий белых мышц (объема митохондрий, активности цитохром-*c*-оксидазы (СОХ, КФ 1.9.3.1) и уровня экспрессии генов субъединиц *Cox1*, *Cox2*, *Cox4* и *Cox6*, активности и кинетических характеристик изоферментов митохондриальной лактатдегидрогеназы (mtLDH, КФ 1.1.1.27) при адаптации к сезонному снижению температуры с 16 до 6°C. Показано увеличение активности СОХ в 1.5 раза, повышение уровня экспрессии генов ядерных субъединиц *Cox4* и *Cox6* и увеличение активности митохондриальных изоферментов LDH, имеющих низкое сродство к лактату. Обсуждается возможная роль митохондриальных и ядерных субъединиц цитохром-*c*-оксидазы в повышении эффективности работы фермента на этапах биогенеза молекул и дальнейшей модуляции его активности, а также регуляция образования пирувата для поддержания необходимой скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях при низкой температуре.

Ключевые слова: цитохром-*c*-оксидаза, экспрессия генов, митохондриальная лактатдегидрогеназа, константа Михаэлиса–Ментен, холодовая адаптация, кумжа.

DOI: 10.7868/S0132342316010103

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что у многих видов животных при понижении температуры среды в значительной степени активируется биогенез митохондрий с одновременным изменением их ряда физико-химических, биохимических и молекулярно-генетических параметров. Этот эффект, направленный на компенсацию уровня метаболизма, особенно ярко проявляется у эктотермных организмов, в частности у рыб, температура тела которых зависит от температуры внешней среды [1]. Снижение температуры среды приводит к повышению капилляризации мышечной ткани у рыб, повышению уровня диффузии кислорода в клетку и увеличению плотности митохондрий. Это, в свою очередь, компенсирует снижение скорости реакций

окислительного фосфорилирования и образование АТФ.

Координация холодовой функциональной активности митохондрий обусловлена реализацией целого комплекса механизмов, среди которых можно выделить два основных: во-первых, это — активация синтеза митохондриальных белков, обеспечивающая, главным образом, повышение концентрации аэробных метаболических ферментов с необходимой эффективностью [2] и, во-вторых, изменение структурно-функциональных свойств мембраны митохондрий (повышение ее текучести) за счет изменения фосфолипидного и жирнокислотного состава, регулирующее работу мембранных ферментов, транспорт кислорода и метаболитов [3].

Цитохром-*c*-оксидаза (СОХ, КФ 1.9.3.1) — ключевой фермент дыхательной цепи митохондрий, в структуру которого входят субъединицы, кодируемые ядерным и митохондриальным геномами. Число полипептидных цепей в молекуле СОХ зависит от эволюционной ступени, занимаемой организмом [4, 5]. СОХ рыб, как и млекопи-

Сокращения: СОХ — цитохром-*c*-оксидаза; mtLDH — митохондриальная лактатдегидрогеназа; *a3*-CuВ — двухядерный центр цитохром *c* оксидазы гем *a3* и атом меди; CuА — атом меди, входящий в активный центр цитохром *c* оксидазы.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (8142) 77-27-51; факс: +7 (8142) 76-98-10; эл. почта: o-mesch@yandex.ru).

тающих, состоит из 13 субъединиц: трех, кодируемых митохондриальным геномом (СОХ 1, 2, 3), и десяти минорных (СОХ 4, 5а, 5b, 6а, 6b, 7, 7а, 7b, 7с, 8), которые кодируются ядерным геномом. Известно, что субъединицы, кодируемые митохондриальным геномом, непосредственно принимают участие в катализе. Ядерные субъединицы формируются вокруг каталитического центра молекулы и участвуют в регуляции активности фермента и стабилизации его структуры [6–8]. На примере различных физиологических состояний у млекопитающих подробно изучена регуляция активности фермента за счет изменения уровня экспрессии субъединиц различных типов. В отличие от млекопитающих, у рыб не наблюдается строгой согласованности и стехиометричности в уровне экспрессии митохондриального и ядерного геномов и четкой взаимосвязи с изменением активности фермента, предположительно, из-за прямого воздействия температур на стабильность транскриптов, полипептидов и посттрансляционные процессы. На примере теплолюбивых видов рыб: данио, золотой рыбки и хромомуса, — обнаружено, что увеличение активности СОХ при понижении температуры не связано с увеличением экспрессии митохондриальных каталитических субъединиц, а регулируется на уровне транскрипции некоторых ядерных субъединиц, участвующих в модуляции активности фермента [9, 10]. У холодоустойчивых видов рыб, обитающих в Субарктическом и Арктическом регионах, вопрос об экспрессии генов субъединиц СОХ практически не изучен. Также до конца не исследован механизм регуляции митохондриальных реакций при низких температурах за счет изменения каталитических свойств изоферментных систем. Например, температурная зависимость величины константы Михаэлиса–Ментен для митохондриальной малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37) исследована, главным образом, на примере теплолюбивых рыб. При этом она определена только для смеси изоферментов митохондриальной фракции малатдегидрогеназы без выделения ее отдельных изоформ и дифференцированного определения их свойств [11]. Кинетические свойства изоферментов недавно открытой митохондриальной лактатдегидрогеназы (mtLDH, КФ 1.1.1.27) не изучены. Температурная зависимость исследована только для цитоплазматической LDH [12].

Представители семейства лососевых рыб Salmonidae относятся к холодолюбивым видам и приспособлены к влиянию широкого диапазона годовых и суточных температур. Оптимальная регуляция митохондриального метаболизма обеспечивает потребности в необходимом количестве АТФ и определяет адаптивный потенциал и выживание лососевых рыб, особенно в условиях низких температур. В связи с вышесказанным, представляется интересным и важным исследо-

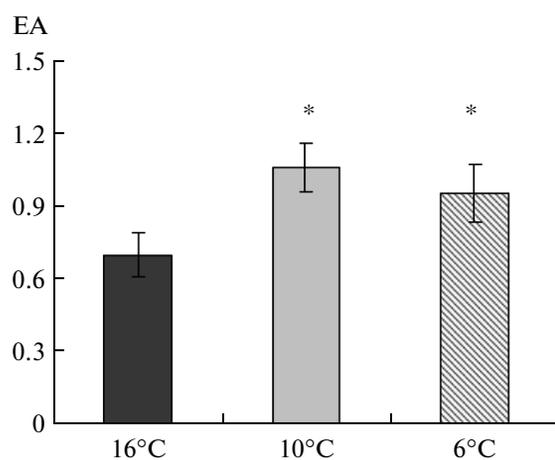


Рис. 1. Активность цитохром *c* оксидазы (EA, к/г) в белых мышцах кумжи, выловленной при температуре воды 16°C (июль), 10°C (октябрь) и 6°C (ноябрь), $M \pm m$. * — различия по сравнению со значением при 16°C достоверны при $p < 0.05$.

вать изменение активности СОХ и уровень экспрессии генов ее субъединиц *Cox1*, *Cox2*, *Cox4* и *Cox6*, а также кинетические параметры изоферментов mtLDH в белых мышцах молоди кумжи *Salmo trutta* L. (возраст 1+) из рек бассейна Онежского озера при адаптации к сезонному снижению температуры воды с 16 до 6°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изменение активности цитохром-*c*-оксидазы и объема митохондрий

Цитохром-*c*-оксидаза (англ. СОХ, КФ 1.9.3.1.) — важнейший фермент дыхательной цепи митохондрий (комплекс IV), катализирует конечный этап переноса электронов с цитохрома *c* на кислород в процессе окислительного фосфорилирования. СОХ представляет собой белок сложный по структуре и регуляции. Цитохром-*c*-оксидаза обычно существует в димерной форме и прочно ассоциирована с молекулами фосфолипидов мембран.

Результаты исследования активности фермента в белых мышцах кумжи при температуре воды 16, 10 и 6°C демонстрируют повышение активности СОХ мышц в 1.5 раза уже при 10°C и удержание этого показателя на этом уровне и при 6°C (рис. 1). Одновременно отмечено увеличение объема митохондрий на 24 и 28% соответственно при 10 и 6°C по сравнению с 16°C.

Активность СОХ различается у различных видов рыб в силу их особенностей биологии, экологии и филогенетического положения [13]. Однако снижение температуры среды вызывает общий эффект — увеличение активности СОХ, что продемонстрировано для многих видов рыб, незави-

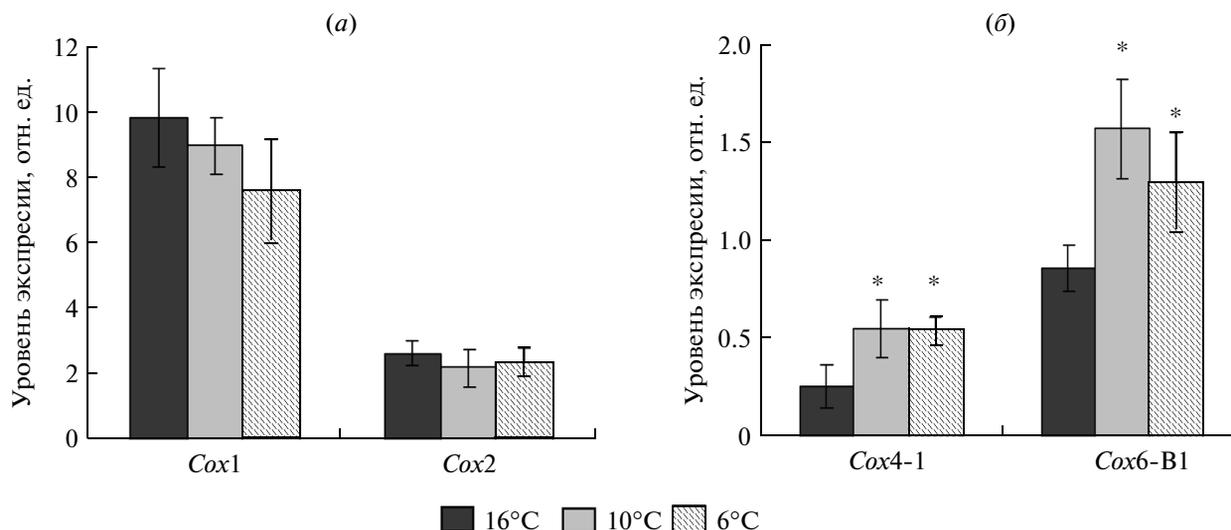


Рис. 2. Уровень экспрессии генов субъединиц цитохром-*c*-оксидазы *Cox1*, *Cox2* (а) и *Cox4-1*, *Cox6-B1* (б) в белых мышцах кумжи, выловленной при температуре воды 16°C (июль), 10°C (октябрь) и 6°C (ноябрь), $M \pm m$. * – различия по сравнению со значением при 16°C достоверны при $p < 0.05$.

симо от их температурных предпочтений [14–16]. Более высокая активность фермента позволяет компенсировать последствия прямого влияния низких температур на скорость метаболизм рыб. Увеличение активности фермента может происходить путем изменения скорости реакции или за счет изменения количества фермента на грамм ткани. У рыб умеренных и арктических широт холододовая адаптация сопровождается увеличением количества митохондрий и концентрации белка на грамм ткани [15, 17, 18]. Поскольку у исследованной нами кумжи активность фермента увеличивалась сопряженно с повышением объема митохондрий, то можно говорить, что в данном случае адаптивное увеличение активности фермента достигается в т.ч. за счет роста концентрации молекул СОХ.

2. Изменение уровня экспрессии генов некоторых субъединиц цитохром-*c*-оксидазы

В связи с функциональной дифференциацией субъединиц СОХ, большой интерес представляет собой изучение регуляции активности фермента на уровне экспрессии генов различных субъединиц.

Анализ уровня экспрессии генов субъединиц СОХ1 и СОХ2, кодируемых митохондриальным геномом, в мышцах исследуемой кумжи выявил две закономерности: во-первых, избыточную транскрипцию гена *Cox1*, по сравнению с уровнем экспрессии гена *Cox2* и генов ядерных субъединиц *Cox4-1* и *Cox6-B1* и, во-вторых, отсутствие достоверной корреляции с активностью СОХ при понижении температуры для обоих митохондриальных субъединиц (рис. 2а).

В отличие от генов митохондриальных субъединиц, уровень экспрессии генов ядерных субъединиц 4 и 6 коррелировал с увеличением активности фермента и количеством митохондрий. Относительная экспрессия гена *Cox4-1* в белых мышцах кумжи в октябре и ноябре (10 и 6°C) увеличилась в 2 раза по сравнению с таковой в июле (16°C). Уровень экспрессии гена *Cox6-B1* в осенние месяцы был соответственно в 1.8 и 1.5 раза выше, чем в июле (рис. 2б).

Известно, что субъединицы, кодируемые митохондриальным геномом, участвуют в катализе и эволюционно консервативны [8]. Они образуют каталитическое ядро, или “сердцевину” фермента, которое является структурным и иницирующим комплексом. С субъединицей СОХ1 связаны гем *a* и двухядерный центр гем $\alpha 3$ -CuВ. Субъединица СОХ2 включает CuА-центр и участвует в связывании цитохрома *c*. Мы предполагаем, что избыточная экспрессия гена *Cox1* и отсутствие корреляции с активностью фермента при холодной адаптации кумжи свидетельствуют о том, что количество транскриптов каталитической субъединицы СОХ1 не является регулирующим фактором при холододовом повышении активности фермента, однако это может иметь определенное значение на посттрансляционном уровне при сборке каталитического ядра фермента.

Причины избыточной экспрессии гена субъединицы СОХ1, кодируемой митохондриальным геномом, в настоящий момент до конца не установлены, хотя подобное явление отмечено в исследованиях, проведенных как на рыбах [14], так и на млекопитающих [19, 20]. Высокий уровень экспрессии гена может быть связан с необходимостью

стью поддержания определенной концентрации соответствующего полипептида. Известно, что в процессе сборки олигомерных комплексов инициирующие субъединицы, как правило, присутствуют в избыточном количестве, что обеспечивает запуск сборки молекулы. В случае молекулы СОХ такой “затравкой” является каталитическая субъединица СОХ1 [21]. Увеличение ее количества активирует гемсинтазу и встраивание гема *a*, что является ключевым и ведущим событием начала сборки фермента. Это обеспечивает правильное сворачивание СОХ1, ее стабилизацию в мембране и дальнейшее формирование каталитического центра молекулы [22]. Вероятно, поэтому данная субъединица должна присутствовать в достаточном количестве, создавая постоянно доступный пул начального звена сборки олигомера.

Анализ литературы о структуре и функциях ядерных субъединиц СОХ4 и СОХ6В1 показывает, что эти две субъединицы экспрессируются в белых мышцах в относительно небольшом количестве по сравнению с другими субъединицами, но играют важную роль в структуре и регуляции активности фермента [23]. Субъединица 4 (СОХ4) является одной из первых ядерных субъединиц, включающихся в структуру фермента, формируя субансамбль, состоящий из трех субъединиц (1, 4 и 5) с гемом *a* и двухядерным центром гемом $\alpha 3$ -CuВ. На следующем этапе этот комплекс взаимодействует с субъединицей СОХ2 [20]. Установлено, что в клетках млекопитающих свободные субъединицы СОХ1 и СОХ5 всегда присутствуют в избыточном количестве, тогда как концентрация СОХ4 и СОХ2 значительно ниже. Наблюдаемая нами аналогичная картина – избыточная экспрессия субъединицы СОХ1 и относительно низкая СОХ2, СОХ6 и, особенно, СОХ4-1 в мышцах кумжи при всех изученных температурах может указывать, на то, что сборка фермента вне зависимости от температуры регулируется на транскрипционном уровне ограничением экспрессии второй, шестой и, особенно четвертой, субъединицы. При этом, обнаруженная корреляция активности фермента с уровнем экспрессии субъединиц 4 и 6 указывает также на участие этих типов полипептидов в модуляции активности фермента у кумжи при изменении температуры. Схожие результаты – наличие корреляции активности СОХ с количеством мРНК *Сох4* и отсутствие взаимосвязи СОХ1 с экспрессией *Сох1* при снижении температуры воды продемонстрированы ранее в исследованиях на золотой рыбе и хромомусе [9, 10].

Считается также, что усиление экспрессии СОХ4 является направленной адаптацией к изменению парциального давления кислорода в клетках высших организмов [24]. Низкие температуры вызывают увеличение капилляризации мышечной ткани у рыб и повышение диффузии кислорода в клетки, что вместе с активацией фермента приво-

дит к увеличению уровня окислительного фосфорилирования в митохондриях. Установлено, что кислород участвует в регуляции экспрессии генов ядерных субъединиц СОХ4 и СОХ5, а также митохондриальных СОХ1 и СОХ2 посредством сигнальной трансдукции [8].

Увеличение уровня экспрессии субъединицы СОХ4 может влиять не только на сборку фермента, но на его активность. Регулирующее действие на активность фермента связано с формированием в структуре этой субъединицы аллостерического центра для связывания АТФ. При этом молекулы АТФ выступают отрицательным модулятором. Фермент, содержащий в своем составе изоформу СОХ4-1 данной субъединицы, активируется при низком соотношении АТФ/АДП [5, 23], которое характерно для метаболизма при более низких температурах.

Субъединица СОХ6В включается в структуру на одном из последних этапов сборки фермента. При участии субъединиц 3, 5в и 6А она обеспечивает формирование уникального контактного сайта для димеризации двух комплексов на внутренней мембране митохондрий, а также связывает субстрат цитохром *c* [5, 23, 25]. Наблюдаемое нами почти двукратное увеличение экспрессии гена *Сох6-В1* у кумжи при снижении температуры указывает на участие этой субъединицы в регуляции активности фермента путем увеличения количества активных димеров.

3. Активность и кинетические характеристики изоферментов *mtLDH*

Формированию особого адаптивного потенциала у лососевых рыб способствовало возникновение и закрепление у них в процессе эволюции тетраплоидии: удвоенное количество генных локусов по сравнению с диплоидными видами привело к формированию большого набора вариантов субъединиц и/или изоферментов, в т.ч. и митохондриальных, дифференцированных по своим каталитическим и кинетическим характеристикам. Лактатдегидрогеназа (англ. LDH, КФ 1.1.1.27, *L*-лактат: NAD⁺-оксидоредуктаза) – фермент, катализирующий одну из важнейших реакций общих путей метаболизма клетки, – взаимопревращения лактата и пирувата. У рыб и высших животных LDH представлена, главным образом, в виде серии из пяти изоферментов – гомо- и гетеротетрамеров, состоящих из субъединиц А и В. У лососевых и других тетраплоидных видов рыб экспрессируется вдвое больше субъединиц – А', А'', В' и В'', что увеличивает набор их изоферментов до 14–16. Изоферменты с субъединицами А катализируют преимущественно восстановление пирувата, а с субъединицами В, главным образом, окисление лактата. Ранее считалось, что фермент присутствует только в цитоплазме, однако в настоящее время для

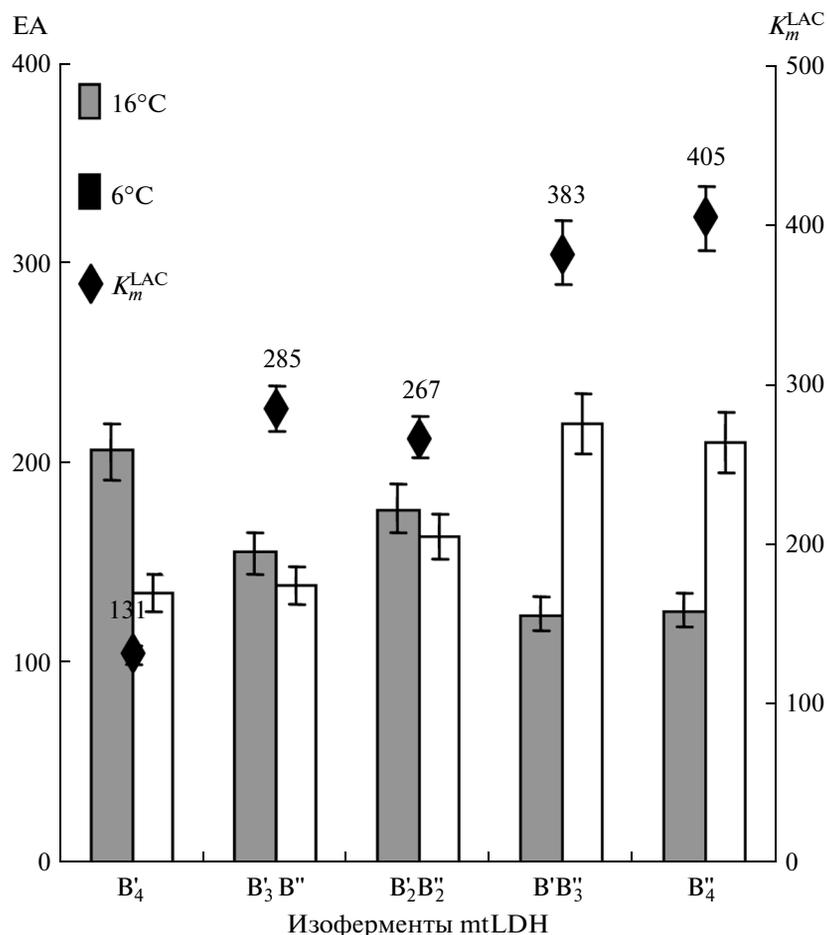


Рис. 3. По левой шкале – активность (EA) изоферментов mtLDH (группа В) в белых мышцах кумжи при 16°C (июль) и 6°C (октябрь) в мкмоль лактата/мин/г ткани, $M \pm m$. * – различия достоверны при $p < 0.05$. По правой шкале – величина кажущейся константы Михаэлиса–Ментен для лактата (K_m^{LAC}) для этих же изоферментов, измеренной при 20°C.

клеток скелетных мышц, сердца и нейронов доказано существование митохондриального лактат-окисляющего комплекса (mitochondrial lactate oxidation complex, mLOC) [26, 27]. Было установлено, что он состоит из мембраносвязанной mtLDH, цитохром-*c*-оксидазы, белка-транспортера лактата МСТ-1 и его шаперона ОХ-47 (CD-147), контролирующего его экспрессию. Пируват, образующийся при окислении поступающего в митохондрии лактата, переносится в матрикс митохондрий с помощью МСТ-1 и там окисляется в цикле трикарбоновых кислот (ТСА).

При анализе изоферментного спектра LDH митохондриальной фракции белых мышц кумжи выявлены преимущественно гомо- и гетероизоферменты группы В: B_4 ($R_f = 0.68$), B_3B'' (0.60), B_2B_2' (0.43), $B'B_3'$ (0.34) и B_4' (0.25). Изоферменты с субъединицами А' и А'' представлены в митохондриальной фракции в следовых количествах. Исследование активности изоферментов группы В при 16 и 6°C демонстрирует их температурную

зависимость (рис. 3). В теплый период (16°C) наиболее высокая активность показана для изофермента B_4 . Его активность летом была в 1.5 раза выше, чем осенью. Гетероизоферменты B_3B'' и B_2B_2' не показали различий в активности при сравнении двух температур. При адаптации к низкой температуре (6°C) достоверно возросла активность изоферментов $B'B_3'$ и B_4' . При этом, общая активность mtLDH при температуре 6°C была выше всего лишь на 10% по сравнению с таковой при 16°C.

Определение величин кажущейся константы Михаэлиса–Ментен (K_m) показало, что исследуемые изоферменты группы В дифференцированы по сродству к субстрату (рис. 3). Наиболее высоким сродством к лактату обладает изофермент B_4 , т.е. насыщается при малых количествах субстрата. Изофермент B_4' имеет втрое большую величину K_m , что указывает на то, что он работает и достигает максимальной скорости при более высоких концентрациях лактата.

Основываясь на полученных нами величинах K_m и активности изоферментов при холодовой адаптации кумжи можно сказать, что увеличение активности изоформ с субъединицами B'' , обладающих низким сродством к лактату, создает условия для увеличения объема окисляемого лактата и повышения образования пирувата без значительного увеличения количества самого фермента. Избирательная активация изоферментов mtLDH с необходимым кинетическими свойствами у кумжи при понижении температуры, вероятно, направлена на повышение скорости окислительного фосфорилирования в митохондриях за счет создания необходимого пула пирувата, являющегося субстратом цикла Кребса. Наши предположения подтверждаются результатами данного исследования по увеличению активности COX, а также сведениями о mLOC [26, 27], которые показывают, что mtLDH сосредоточена на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий и ассоциирована с COX. Такая компартментализация исследуемых ферментов обеспечивает сопряжение эндогенной реакции окисления лактата с экзогенным изменением редокс-потенциала в электронтранспортной цепи митохондрий при окислении цитохрома *c*.

Таким образом, характер изменения исследованных показателей митохондрий свидетельствует о сложной и многоуровневой системе регуляции митохондриального метаболизма у кумжи при адаптации к холоду. Повышение активности COX и особенности экспрессии генов каталитических субъединиц *Cox1*, *Cox2* и ядерных субъединиц *Cox4* и *Cox6* указывают на то, что необходимая эффективность работы фермента может регулироваться на этапах биогенеза молекул за счет изменения количества различных типов субъединиц, а также дальнейшей модуляции активности фермента за счет участия COX4 в его аллостерической регуляции. Установленное нами сопряженное повышение активности COX и активности изоферментов $B''B_3'$ и B_4' с низким сродством к лактату свидетельствует о регуляции уровня метаболизма митохондрий за счет активации изоферментов с необходимыми каталитическими свойствами. Это подтверждает предположения о существовании скоординированного механизма взаимодействия этих двух ферментов в условиях дефицита АТФ, возникающего при низких температурах. Способность поддержания энергетического статуса на необходимом уровне и возможность его быстрой настройки при изменении температуры воды является важнейшим условием адаптации и выживания молоди лососевых рыб при выборе оптимального места обитания и дальнейшей реализации жизненной стратегии роста и развития.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при сезонной адаптации молоди кумжи к холоду ($16^\circ\text{C} \rightarrow 6^\circ\text{C}$) наблюдается увеличение количества митохондрий на 28% и активности цитохром *c* оксидазы, что компенсирует прямое влияние низких температур на скорость метаболизма митохондрий.

2. При анализе уровня экспрессии генов субъединиц *Cox1*, *Cox2*, *Cox4* и *Cox6* показано, что экспрессия генов каталитических субъединиц *Cox1* и *Cox2* не зависит от температуры, при этом количество мРНК *Cox1* значительно превышает количество транскриптов генов других субъединиц. В отличие от каталитических субъединиц уровень экспрессии генов ядерных субъединиц *Cox4* и *Cox6* при понижении температуры коррелирует с увеличением активности фермента.

3. Адаптация молоди кумжи к низкой температуре сопровождается значительным увеличением активности изоферментов mtLDH $B''B_3'$ и B_4' , имеющим низкое сродством к лактату, что указывает на увеличение окисления лактата в пируват при низкой температуре.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Используемые реактивы. Трис (трис(гидроксиметил)аминометан) (MP Biomedicals, Inc., France), соляная кислота (Нева-реактив, Россия), EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (PANreac, Испания), гепарин (Applichem, Германия), сахароза (Нева-реактив, Россия) (PANreac, Испания), тритон X-100, (Acros, Германия), цитохром *c* (Seriva, Германия), двузамещенный фосфат натрия, (Нева-реактив, Россия) (PANreac, Испания), однозамещенный фосфат натрия, (Нева-реактив, Россия) (PANreac, Испания), аскорбиновая кислота, (Вектон, Россия) (PANreac, Испания), глицин (Applichem, Германия), щелочь натрия (Нева-реактив, Россия), D,L-молочная кислота натриевая соль (Диаэм, Россия), NAD (никотинамидадениндинуклеотид окисленная форма) (Applichem, Германия), имидазол (PANreac, Испания), акриламид (Нева-реактив, Россия), метиленакриламид (N,N'-Метиленбисакриламид) (Вектон, Россия), персульфат аммония (Хим реактив, Россия), рибофлавин (Вектон, Россия), феназинметасульфат (ФМС) (Applichem, Германия), нитротетразольевый голубой (Вектон, Россия), реагент "ExtractRNA" (ЗАО "Евроген", Россия), ДНКаза (10 ед/мл) (Силекс, Россия), набор реактивов "MMLV RT kit" (ЗАО "Евроген", Россия), готовая смесь для ПЦР "qPCRmix-HS SYBR" (ЗАО "Евроген", Россия).

Используемое оборудование. Центрифуга высокоскоростная с охлаждением Rotina 35R; Hettich Zentrifugen, Германия, спектофотометр

Таблица 1.

Ген	Последовательности нуклеотидов (5'-3')	Температура отжига, °С	Номер в GenBank
<i>Cox</i>	Прямой: CCCAGCCATCTCCCAATATC Обратный: TTCGGTCTGTGAGTAGCATAG	57	EF609450.1
<i>Cox</i>	Прямой: CCAGGCCAATTCGGTCTTCT Обратный: TACTCCAGGTCGAGAGGCAA	57	HQ167688
<i>Cox4-1</i>	Прямой: TCAATCTGTGTACGTGGGGC Обратный: CACAACCTGGACGTCTGGGA	60	BT043749
<i>Cox6B-1</i>	Прямой: ATTGAGGAGAAGATAAAGAАСТАС Обратный: GGACAGATACTCTTGAGACC	58	BT073270.1
<i>Ef-1</i>	Прямой: GGTGGTGTGGGTGAGTTTGAG Обратный: CAGGCGATGTGAGCAGTATG	57–60	EF406271.1

СФ-2000 (ЗАО “ОКБ Спектр”, Россия), электрофоретическая камера (Реанал, Венгрия), амплификатор “Терцик” (ЗАО “НПФ ДНК-технология”, Москва), прибор для real-time ПЦР i-Cycler с оптической приставкой IQ5 (BioRad, США).

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли из органов только что забитых рыб общепринятым методом дифференциального центрифугирования в 0.01 М Трис-НСI-буфере (рН 7.4) с добавлением 1 мМ EDTA и 2 мМ гепарина, содержащем 0.25 М сахарозу (буфер А). Все этапы выделения митохондрий проводили при температуре 4°С. Извлеченную ткань или орган (около 1 г) гомогенизировали. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 2500 g. Осадок, содержащий обломки клеток, ядра и миофибриллы, отбрасывали, а надосадочную жидкость центрифугировали 10 мин при 10000 g. Полученный осадок, содержащий митохондрии, промывали в 2 мл буфера А, центрифугировали четырежды по 10 мин при 10000 g, каждый раз отбрасывая надосадочную жидкость. Экстракцию митохондриальных ферментов проводили двукратным объемом (по отношению к объему осадка митохондрий) 0.01 М Трис-НСI-буфера (рН 7.5), содержащего 0.1% тритона X-100. Энзиматический контроль выделенной митохондриальной фракции проводили определением цитохром-с-оксидазы по методу Смита [28].

Активность цитохром-с-оксидазы (КФ 1.9.3.1) определяли, измеряя увеличение количества окисленного цитохрома с [28]. Для получения восстановленной формы субстрата 15 мг цитохрома с и 30 мг аскорбиновой кислоты растворяли в 1 мл 0.1 М фосфатного буфера в течение 2 ч. Полученный восстановленный цитохром очищали от избытка аскорбиновой кислоты на колонке с сефадексом G-25, диаметром 15 мм и высотой 400 мм в 0.02 М фосфатном буфере. При внесении на колонку 1 мл смеси восстановленного цитохрома объем элюата очищенного восстановленного цитохрома составлял 5 мл, скорость выхода

5 мл/мин. Активность фермента выражали в *k*/г ткани (*k*-константа реакции первого порядка). Измерение абсорбции проводили при 550 нм. За 1 единицу активности принимали количество фермента, которое окисляет 1 моль цитохрома с за 1 мин в расчете на 1 г ткани при 20°С.

Определение активности и K_m изоферментов лактатдегидрогеназы. Общую активность митохондриальной лактатдегидрогеназы определяли по скорости реакции лактат → пируват общепринятым методом [29]. Концентрации реагентов: глициновый буфер – 0.1 М рН 10.0; лактат 0.5 М; NAD – 20 мМ рН 6.0; фермент 0.3 Ед./мл. Изменяли изменение поглощение при 340 нм в течение 2–3 мин на спектофотометре СФ-2000. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата лактата в 1 мин в расчете на 1 г ткани при 20°С.

Изоферменты mtLDH разделяли в 6% ПААГ цилиндрической формы в комбинированной имидазол-вероналовой буферной системе с рН 7.8 по Ричардсу [30] в электрофоретической камере для препаративного вертикального электрофореза. Доза вносимого на поверхность геля экстракта – 25 мкл. Схема электрофореза: 150 В – 10 мин, 250 В – 10 мин и 400 В – 3ч. Окрашивание изоферментов проводили тетразолиевым методом. Относительную электрофоретическую подвижность изоферментов (R_f) рассчитывали по движению от анода к катоду.

Методом денситометрии, позволяющей оценить площадь окрашиваемой зоны изофермента в ПААГ, определяли активность каждого изофермента в процентах от общей активности фермента в митохондриальной фракции по денситограмме. Исходя из величины общей активности mtLDH, определенной спектрофотометрически, рассчитывали активности каждого изофермента выражая в мкмоль лактата/мин/г ткани.

Для определения величин кажущейся константы Михаэлиса–Ментен каждый изофермент

выделяли из геля, экстрагировали 0.01 М Трис-НСl-буфером (рН 7.5) и очищали на колонке с сефадексом G-25 диаметром 15 мм и высотой 500 мм в 0.1 М глициновом буфере (рН 9.5). При внесении на колонку 1 мл раствора изофермента объем элюата очищенного восстановленного цитохрома составлял 6 мл, скорость выхода 5 мл/мин, концентрация изофермента 0.45 Ед./мл. Определенные скорости реакции лактат → пируват проводили при 20°C для различных концентраций лактата от 10 мкМ до 1 мМ (шаг 30 мкМ) общепринятым методом [29]. Концентрации реагентов: глициновый буфер – 0.1 М рН 10.0; NAD – 20 мМ рН 6.0; изофермент 0.3 Ед./мл. Величину кажущейся константы Михаэлиса–Ментен (K_m^{LAC}) рассчитывали по методу Э. Корниш–Бодена [31].

Определение уровня экспрессии генов субъединиц цитохром с оксидазы. Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР-анализа в режиме реального времени. Тотальную РНК выделяли из белых мышц кумжи с помощью реагента “ExtractRNA”. Выделение РНК проводили по протоколу от фирмы-производителя. Тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед/мл). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из препарата тотальной РНК с использованием MMLV-обратной транскриптазы и случайных гексонуклеотидов. Амплификацию проводили с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR. Праймеры к нуклеотидным последовательностям генов субъединиц цитохром-*c*-оксидазы и референтного гена фактора элонгации (*Ef-1*) подбирали с помощью программы Beacon Designer 5.01 (Premier Biosoft, США) (таблица). Из-за отсутствия в базе данных нуклеотидных последовательностей для генов кумжи *Cox4-1* и *Cox6-B1* подбирали праймеры к генам лосося (*Salmo salar* L.) и форели (*Oncorhynchus mykiss* Walb.). Протокол ПЦР: денатурация ДНК при 95°C 5 мин; повторяющиеся циклы (45): денатурация ДНК при 95°C 20 с, отжиг праймеров по 30 с при температуре, указанной в таблице, элонгация ДНК при 72°C по 30 с. После ПЦР проводили процедуру плавления фрагментов ДНК (с 59 до 95°C с шагом 0.5°C). Уровень транскриптов изучаемых генов был рассчитан относительно уровня транскриптов референтного гена – *Ef-1*. Относительный уровень экспрессии исследуемого гена (Ratio) вычисляли по формуле [32]:

$$\text{Ratio (test/ref)} = 2^{-\Delta Ct}, \text{ где } \Delta Ct = Ct(\text{test}) - Ct(\text{ref}),$$

где Ct (test) – пороговый цикл для исследуемого гена; Ct (ref) – пороговый цикл для референтного гена.

Статистическая обработка данных. В работе использовали общепринятые методы статистической обработки данных с использованием пакетов программ MS Excel и StatGraphics 2.5 for Windows.

Сравнение выборок проводили с применением непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Степень влияния исследуемых факторов оценивали при помощи многофакторного дисперсионного анализа MANOVA.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования поддержаны проектом Российского научного фонда № 14-24-00102.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. White C.R., Alton L.A., Frappell P.B. // Proc. Biol. Sci. 2012. V. 279. P. 1740–1747.
2. Somero G. // Comprehensive Physiology. Published Online: 1 JAN 2011. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.cp130219/>
3. Болдырев А.А. // Регуляция активности мембранных ферментов // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 6. С. 21–27.
4. Capaldi R.A. // Annu. Rev. Biochem. 1990. V. 59. 569–596.
5. Kadenbach B., Huttemann M. et al. // Free Radical Biology & Medicine. 2000. V. 29. P. 211–221.
6. Carr H.S. // Acc. Chem. Res. 2003. V. 36. P. 309–316.
7. Richter O.M., Ludwig B. // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2003. V. 147. P. 47–74.
8. Fontanesi F.I., Soto I.C., Horn D., Barrientos A. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 2006. V. 291. P. 1129–1147.
9. LeMoine C.M., Genge C.E., Moyes C.D. // J. Exp. Biol. 2008. V. 211. P. 1448–1455.
10. Duggan A.T., Kocha K.M., Monk C.T., Bremer K., Moyes C.D. // J. Exp. Biol. 2011. V. 214. P. 1880–1887.
11. Dong Y., Somero G. // J. Exp. Biol. 2009. V. 212. P. 169–177.
12. Somero G.N. // Comp. Biochem. Physiol. В Biochem. Mol. Biol. 2004. V. 139. P. 321–333.
13. Мещерякова О.В., Чурова М.В., Немова Н.Н. // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 136–142.
14. Battersby B.J., Moyes C.D. // Am. J. Physiol. 1998. V. 275. P. 905–912.
15. Hardewig P., M. van Dijk, Moyes C.D., Pörtner H.O. // Am. J. of Physiol. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1999. V. 277. № 2. P. 508–516.
16. Lucassen M., Koschnik N., Eckerle L., Pörtner H. // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 2462–2471.
17. Guderley H. // Comp. Biochem. Physiol. В Biochem. Mol. Biol. 2004. V. 139. P. 371–382.
18. O'Brien K.M. // J. Exp. Biol. 2011. V. 214. P. 275–285.
19. Williams R., Salmons S., Newsholme E., Kaufman R., Mellor G. // J. Biol. Chem. 1996. V. 261. P. 376–380.
20. Stiburek L.I., Hansikova H., Tesarova M., Cerna L., Zeman J. // Physiol. Res. 2006. V. 55. Suppl. 2. P. 27–41.
21. Fontanesi F., Soto I.C., Barrientos A. // IUBMB Life. 2008. V. 60. P. 557–568.
22. Hyung J., Khalimonchuk O., Smith P., Winge D. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1823. P. 1604–1616.

23. Little A.G., Kocha K.M., Lougheed S.C., Moyes C.D. // *Physiol Genomics*. 2010. V. 42. P. 76–84.
24. Huttemann M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 492 P. 242–246.
25. Ugalde C., Coenen M.H., Farhoud S., Gilinsky S., Koopman W.J., Van den Heuvel L.P., Smeitink J.A., Nijtmans L.G. // *Mitochondrion*. 2002. V. 2. P. 117–128.
26. Hashimoto T., Brooks G.A. // *Med. Sci. Sport Exerc.* 2008. V. 40(3). P. 486–494.
27. Hashimoto T., Hussien R., Cho H.S., Kaufer D., Brooks G.A. // *PLoS ONE*. 2008. V. 3. P. 2915.
28. Smith L. // *J. Methods in Biochem. Analysis*. 1955. V. 2. № 427. P. 427–434.
29. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа, 1980. 324 с.
30. Маурер Г. Диск-электрофорез: теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М.: Мир, 1971. 247 с. Maurer H.R. Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin, N.Y., 1971. 222 p.
31. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 280 с. Cornish-Bowden A. Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press. London, 1976. 206 p.
32. Livak K.J. Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.

Activity of Cytochrome *c* Oxidase (Cox) and Mitochondrial Lactate Dehydrogenase Isoenzymes (mtLDH), Subunits *Cox1*, *Cox2*, *Cox4*, *Cox6* Gene Expression in Brown-Trout *Salmo trutta* L. at the Cold Adaptation

O. V. Meshcheryakova[#], M. V. Churova, A. E. Veselov, N. N. Nemova

[#]Phone: +7 (8142) 772-751; fax: +7 (8142) 76-98-10; e-mail: o-mesch@yandex.ru

*Institute of Biology of Karelian Research Centre Russian Academy of Science,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, 185910 Russia*

Activity of cytochrome *c* oxidase (COX), mitochondria density, subunits *Cox1*, *Cox2*, *Cox4*, *Cox6* gene expression, activities and Michaelis-Menten constants (*K*) of mitochondrial lactate dehydrogenase isoenzymes (mtLDH) were measured in white skeletal muscle of salmon-trout *Salmo trutta* L. during adaptation to seasonal decline temperature from 16° C to 6° C. The 1.5 fold increase of COX activity associated with an increment mitochondria density, the 2 fold increase of nuclear-encoded subunits *Cox4* and *Cox6* gene expression and more high activity of mtLDH isozymes with low lactate affinity were observed. The possible role of mitochondrial- and nuclear-encoded COX subunits expression in improving the enzymes efficiency through COX biogenesis and in further modulation of its activity is discussed. The regulation of pyruvate formation to maintenance oxidative phosphorylation rate at the low temperature is considered.

Keywords: cytochrome c oxidase, gene expression, mitochondria lactate dehydrogenase, Michaelis-Menten constant brown-trout, cold adaptation