

А. В. Кундієва¹, Д. О. Мінченко¹, О. П. Яворовський²,
І. В. Завгородній³, Ю. О. Паустовський², О. Г. Мінченко¹

ВПЛИВ ЕКОТОКСИКАНТА МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЕФІРУ НА ЕКСПРЕСІЮ АЛЬТЕРНАТИВНИХ СПЛАЙС-ВАРІАНТІВ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ У ЩУРІВ

¹ Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України, м. Київ

² Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, м. Київ

³ Харківський національний медичний університет

Вивчення механізмів регуляції найважливіших метаболічних процесів та їх порушень при різних патологіях, а також при дії токсичних речовин і, зокрема, хімічних забруднювачів довкілля є надзвичайно актуальною проблемою медико-біологічних досліджень. Одним із таких процесів метаболізму є гліколіз, регуляція якого знаходиться під багаторівневим контролем. Встановлено, що гліколіз контролюється 6-фосфофрукто-2-кіназою/фруктозо-2,6-бісфосфатазою [6-фосфофрукто-2-кіназа (ЕС 2.7.1.105); фруктозо-2,6-бісфосфатаза (ЕС 3.1.3.46)], біфункціональним ферментом, який відповідає як за синтез, так і за розпад фруктозо-2,6-бісфосфату, ключового регулятора цього шляху метаболізму вуглеводів [1-3]. Саме фруктозо-2,6-бісфосфат і є тим головним алостеричним регулятором фосфофруктокінази -1, ключового ферменту гліколізу [1, 4, 5]. Мономер біфункціонального ферменту 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази (PFKFB) має два активних центри: для 6-фосфофрукто-2-кінази та для фруктозо-2,6-бісфосфатази і два регуляторних домени на N- та C-кінцях молекули, які важливі як для регуляції 6-фосфофрукто-2-кінази, так і фрукто-

зо-2,6-бісфосфатазної активностей [2, 3]. Встановлено, що делеція N-кінцевої частини цього біфункціонального ферменту приводить до втрати 6-фосфофрукто-2-кіназої активності [6]. Це пов'язано з тим, що PFKFB функціонує в клітинах як димер, з'єднаний через N-кінці.

Синтез даного ферменту кодується чотирма різними генами. В тканинах як людини, так і тварин 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза представлена чотирма основними ізоферментами (PFKFB-1, -2, -3 та -4), синтез яких кодують чотири гени — *pfkfb1-4* [1, 3]. Ці гени знаходяться в різних хромосомах і кодують синтез ізоферментів PFKFB, що різняться між собою за кінетичними та регуляторними властивостями, а також за молекулярною масою [7 — 11].

Основні ізоферменти PFKFB розрізняються між собою за співвідношенням кіназної та бісфосфатазної активностей, а також за здатністю фосфорилуватися різними протеїнкіназами [1, 2, 12 — 14]. Треба відмітити, що N- та C-кінці ізоферментів містять сайти фосфорилування для регуляції кіназної та фосфатазної активностей PFKFB. Більше того, характер фосфорилу-

вання як N-кінцевої, так і C-кінцевої регуляторних ділянок, значною мірою визначають співвідношення кіназної та бісфосфатазної активностей PFKFB. Треба відмітити, що базальні рівні експресії основних ізоформ PFKFB в різних органах суттєво відрізняються, причому в багатьох тканинах та лініях клітин виявлена експресія декількох або всіх чотирьох основних ізоферментів PFKFB [15 — 17]. Таким чином, у людини та тварин існують різні тканино-специфічні ізоферменти PFKFB, які, не дивлячись на їх велику структурну подібність і консервативність каталітичних доменів, мають суттєві відмінності у молекулярній масі, кінетичних та регуляторних параметрах.

В останні роки велика увага приділяється вивченню експресії гену 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4, який було ідентифіковано спочатку в сім'яних щурів та людини [2, 7, 8], а потім в інших органах та багатьох лініях ракових клітин різного походження [16, 17]. Було також встановлено, що експресія мРНК PFKFB-4 спостерігається також в нормальній тканині грудної залози, легень, прямої кишки та шлунку людей, але рівень експресії був відносно невеликим [18 — 22]. Незважаючи на низький базальний рівень експресії мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 в нормальній тканині вище згаданих органів, у злоякісних пухлинах грудної залози, легень, шлунку та прямої кишки експресія даної мРНК була значно підвищеною [18 — 22]. Разом з тим треба відмітити, що рівень експресії білка PFKFB-4 у нормальній тканині грудної залози та легень був надзвичайно низьким порівняно з нормальною тканиною прямої кишки та шлунку, хоча різниця в експресії мРНК в цих тканинах була незначною. Наведені вище дані свідчать про те, що ген *pfkfb4* експресується у клітинах різних органів та в різних лініях трансформованих клітин, причому його експресія різко посилюється при злоякісному рості, особливо в злоякісних пухлинах легень та грудної залози [20, 21].

Крім чотирьох основних ізоформ мРНК фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази, синтез яких кодується різними гена-

ми, виявлені додаткові варіанти мРНК, що утворюються з премРНК переважно в результаті альтернативного сплайсингу [23 — 29]. Так, виявлена менша за розміром ізоформа PFKFB-3, яка не фосфорилується протеїнкіназами А та С, в той час як фосфорилування більшої ізоформи протеїнкіназою А та С призводить до активації 6-фосфофрукто-2-кінази без впливу на фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність. Вона відрізняється від основної ізоформи присутністю багатьох копій послідовності AUUA і індукується в пухлинах при злоякісному рості, що сприяє посиленій проліферації клітин [30, 31]. Було виявлено шість альтернативних сплайс-ізоформ PFKFB-3 у мозку людини [23], вісім альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 у серці та мозку щурів [24 — 27] і шість в різних органах мишей [28]. Варіабельна ділянка цих сплайс-ізоформ складається з 7 додаткових екзонів (А-Г) і кодує С-кінцеву частину ензиму PFKFB-3, яка містить сайти фосфорилування для протеїнкінази А та С [2, 13, 29, 30].

Альтернативні сплайс-варіанти виявлені і для мРНК ізоензиму PFKFB-4 [22, 31, 32]. Так, в клітинах меланоми лінії DB-1 була виявлена додаткова ізоформа мРНК PFKFB-4, яка містить вставку між першим та другим ексоном розміром 148 нуклеотидних залишків і являє собою альтернативний сплайс-варіант. Вставка генерує стоп-кодони, в зв'язку з чим, трансляція може починатися лише з метіоніну, що розташований у другому екзоні. В зв'язку з відсутністю N-кінця, даний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 не здатний утворювати гомодимер і проявляти 6-фосфофрукто-2-кіназну активність. Аналогічний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 був виявлений також і в різних органах нормальних мишей, хоча вставка була значно коротшою (17 або 86 нуклеотидних залишків), але результат виявився аналогічним: вставка створює в тому ж самому місці стоп-кодони і кодує аналогічний варіант PFKFB-4 [31, 32]. У мишей було виявлено ще декілька унікальних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4, які здатні кодувати ізоензими зі зниженою 6-фосфофрукто-2-кіназною або фруктозо-2,6-бісфосфатазною активністю і які представляють собою домінант-не-

гативні варіанти PFKFB-4 за 6-фосфофрукто-2-кіназною, або фруктозо-2,6-бісфосфатазною активністю. Більше того, один із альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 мав вставку зі стоп-кодоном між 6-фосфофрукто-2-кіназною та фруктозо-2,6-бісфосфатазною частинами і міг кодувати синтез двох окремих ензимів з однієї матриці: 6-фосфофрукто-2-кіназу та фруктозо-2,6-бісфосфатазу [31]. Ці дані вказують на можливість регуляції рівня фруктозо-2,6-бісфосфату, а значить і гліколізу, не лише шляхом змін в кількості чи активності 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази, а й на рівні альтернативного сплайсингу шляхом утворення варіантів мРНК, що кодують синтез унікальних ізоформ ензиму з 6-фосфофрукто-2-кіназною або фруктозо-2,6-бісфосфатазною активністю [32]. В зв'язку з цим, вивчення експресії генів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази в тканинах різних органів з різною інтенсивністю гліколізу при різноманітних функціональних та патологічних станах організму, зокрема при дії метил-третбутилового ефіру є надзвичайно актуальною темою досліджень.

Метил-третбутиловий ефір (МТБЕ) є екологічно небезпечною хімічною сполукою, що використовується для виробництва неетильованих бензинів, яка здатна накопичуватися у ґрунті, що, в свою чергу, приводить до токсичного забруднення цієї сполукою довкілля і можливого отруєння людей, може ініціювати розвиток ряду патологічних станів (хронічні нефропатії, гіпертрофію печінки, алергічні та респіраторні захворювання, нейротоксичні прояви, в тому числі і виникнення злоякісних новоутворень в нирках, печінці, сім'яниках та лімфовузлах, ініціювати розвиток лейкемій) [33 — 35]. В експериментах встановлено, що повторні інгаляції МТБЕ приводять до порушення функції нирок та збільшення смертності [33]. Одним із механізмів дії МТБЕ може бути виникнення порушень у функціонуванні сигнальних каскадів у клітинах.

В зв'язку з цим, ми провели дослідження з вивчення впливу метил-третбутилового ефіру, глобального хімічного забруднювача довкілля, що має виражену негатив-

ну дію на організм, на експресію мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 та її альтернативних сплайс-варіантів в різних органах щурів з метою виявлення можливих молекулярно-генетичних маркерів токсичної дії на організм екологічно небезпечних хімічних сполук.

Матеріали і методи досліджень

Досліди проводили на щурах-самцях Wistar, вагою 180 — 200 г. Метил-третбутиловий ефір вводили щурам у дозі 500 мг/кг щоденно протягом 1 місяця. Тотальну РНК виділяли із 100 — 200 мг тканини, застосовуючи метод екстракції з використанням гуанідину, фенолу та хлороформу, як було описано раніше [15, 16]. Спочатку проводили екстракцію тканин щурів 1 мл розчину ізотіюціанату гуанідину (Ultra Pure), який містив 4 М ізотіюціанату гуанідину, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM EDTA та 100 mM 2-меркаптоетанолу. Потім до лізату тканин поступово додавали 0,1 мл 2 М ацетату натрію, pH 4,0, 1 мл водонасиченого фенолу та 0,2 мл суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (49:1), перемішуючи після додавання кожного із реагентів. РНК осаджували рівним об'ємом ізопропанолу. Осади РНК промивали 75 % етанолом і розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз. В частині експериментів РНК з різних органів щурів виділяли з допомогою комерційного препарату Трізол (TRIzol Reagents), який містить ізотіюціанат гуанідину, буфер та фенол. 100-200 мг тканини подрібнювали, додавали 2 мл Трізолу і гомогенізували. Через 10 хв додавали хлороформ у співвідношенні 1:5 (лізат : хлороформ) для розділення водної та фенольної фаз, ретельно перемішували протягом 20 сек та центрифугували при охолодженні. Відбирали водну фазу, вимірювали її об'єм і додавали рівний об'єм ізопропанолу (C₃H₈O), перемішували, залишали на 2 год при -20 °C для осадження РНК і центрифугували при 12000g протягом 15 хв. Супернатант зливали, а осад РНК промивали 70% етанолом для видалення залишків ізопропанолу. Осад РНК розчиняли у воді, і концентрацію РНК вимірювали на спектрофотометрі.

Зворотну транскрипцію та полімеразну ланцюгову реакцію проводили як описано раніше [36]. Для зворотної транскрипції (ЗТ) ви-

користували тотальну РНК, виділену з печінки та легень шурів. В реакційну суміш, загальним об'ємом 20 мкл, вносили 0,5 мкг тотальної РНК, 5 нмоль (oligo dT₁₅)-праймера, 4 мкл 5 х буфера, 1 мкл 100 мМ ДТТ, 10 мкмоль суміші всіх чотирьох dNTP, 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл), 1 мкл зворотної транскриптази RevertAid H Minus M-MuLV з активністю 200 од./мкл, отриманої із фірми Fermentas (Німеччина). Денатурацію РНК проводили при +65°C протягом 5 хвилин одразу після додавання (oligo dT₁₅)-праймера, охолоджували і після цього додавали інші компоненти реакційної суміші. Синтез проводили при +42°C протягом однієї години. Реакцію зупиняли шляхом інкубації при 70°C протягом 5 хв, охолоджували і використовували або зберігали при -20°C. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції брали в реакцію 1 мкл синтезованої кДНК (реакційної суміші).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в об'ємі 20 мкл як описано раніше [36]. Реакційна суміш містила 10 мкл HotStarTaq Master Mix Kit ("QIAGEN", Німеччина), 1 мкл препарату кДНК, по 1 мкл прямого та зворотного праймерів та 7 мкл вільної від нуклеаз води. Перед початком ампліфікації реакційну суміш прогрівали при 95°C протягом 15 хв для активації Taq-полімерази. Ампліфікацію проводили при таких умовах: денатурація — 94°C, 30 сек; асоціація праймерів — 55°C, 30 сек; синтез — +72°C, від 0,5 до 2 хв; 35 циклів; на заключному етапі проводили інкубацію при +72°C протягом 7 хв для повного завершення синтезу всіх ланцюжків і зупиняли реакцію, охолоджуючи до 4°C. Проводили полімеразну ланцюгову реакцію в ампліфікаторі "MasterCycler Personal" ("Eppendorf", Німеччина). Кількість взятої для аналізу РНК оцінювали за синтезом фрагменту β -актину.

Для ампліфікації кДНК PFKFB-4 шурів використовували декілька пар специфічних праймерів: три прямих олігонуклеотидних праймери: 5' — GGGATGGCGTCC-CACGGGAAC — 3' (M1), 5'-TATCTGTGTGGATCCTGAGG — 3' (M2) або 5' — AGCGTGGAAGGTC-CTCAACG — 3' (M3) та три зворотних праймери: 5' — CAAGGCA-CACTGCTTCCTG — 3' (M5) або 5'

— GTCAAGGAAGTAGGCCAG -3' (M6=Fr14) або 5'-GATTCTCAGCAGCAGGTCAG -3' (M7). Ці олігонуклеотиди відповідають послідовностям 32-53, 366-385, 991-1010 (прямі праймери) та 358-340, 1246-1229 or 1637-1618 (зворотні праймери) зчитаної кДНК PFKFB-4 щура (GenBank номер NM_019333). Для ампліфікації кДНК PFKFB-4 альтернативного сплайс-варіанта EU404101 був використований прямий праймер: 5'-CAGTTCATCAGTGACCAGAAC -3' (M8) та зворотний праймер: 5'-ACCAGGTCTTCATAGGACGG -3' (M9). Ці олігонуклеотиди відповідають послідовностям 893-913 та 1143-1102 зчитаної кДНК PFKFB-4 щура (GenBank номер NM_019333). Експресію кожної смуги мРНК PFKFB-4 порівнювали з експресією мРНК β -актину. Два інших праймери були використані для аналізу експресії мРНК PFKFB-4 методом кількісної (в реальному часі) ПЛР: 5'-TGCTGTATGAACGGTCACC -3' (прямий праймер M4) та зворотний праймер M7. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають послідовностям 1501-1519 та 1637-1618 зчитаної кДНК PFKFB-4 щура (GenBank номер NM_019333).

Для аналізу результатів ПЛР та їх статистичної обробки використовували спеціальну комп'ютерну програму "Differential expression calculator". Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при значенні $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Дію метил-третбутилового ефіру на інтенсивність експресії мРНК PFKFB-4 у печінці та легенях шурів, яким вводили МТБЕ протягом 1 міс в дозі 500 мг/кг маси тіла, вивчали методом ПЛР в реальному часі. Спочатку синтезували кДНК з допомогою зворотної транскриптази, використовуючи для цього тотальні РНК з печінки та легень шурів. Ці органи були вибрані як мішені дії МТБЕ в зв'язку з тим, що печінка і легені в найбільшій мірі вражаються МТБЕ, хоча по-різному реагують на його токсичну дію, а також тому, що дані органи суттєво відрізняються між собою за рівнем базальної експресії мРНК PFKFB-4. Результати проведених досліджень з аналізу експресії мРНК PFKFB-4 у печінці і легенях нормальних шурів та тварин, яким протягом місяця вводили МТБЕ, методом ПЛР у реальному часі (праймери M4 та M7) представлені на рис. 1. Встановлено, що метил-третбутиловий ефір суттєво посилював експресію мРНК PFKFB-4 у печінці шурів. В той же час, експресія мРНК PFKFB-4 суттєво знижувалась у легенях при довготривалій дії МТБЕ. В зв'язку з тим, що PFKFB є ключовим регулятором гліколізу [37 — 42], виявлені зміни в експресії PFKFB-4 під впливом МТБЕ вказують на те, що ця хімічна сполука може порушувати процеси регуляції гліколізу.

Таким чином, отримані нами ре-

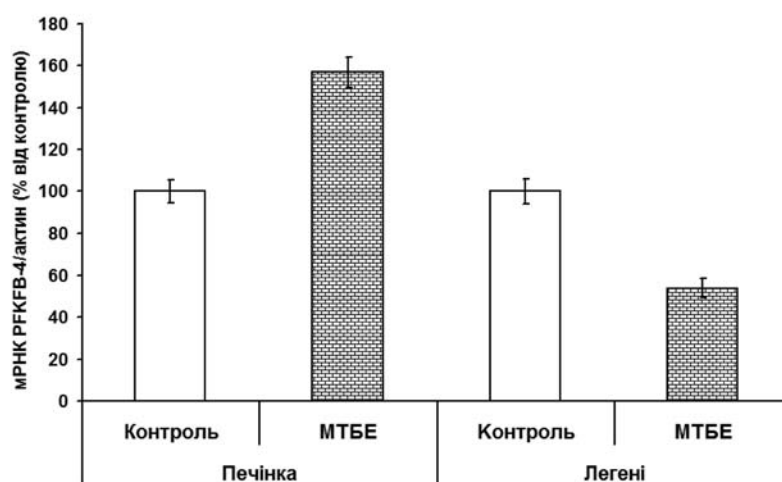


Рис. 1. Експресія мРНК PFKFB-4 у печінці та легенях контрольних шурів і тварин, яким вводили протягом місяця метил-третбутиловий ефір (МТБЕ) за даними кількісної ПЛР з використанням праймерів M4 та M7; $n = 4$). Значення експресії мРНК PFKFB-4 нормалізували по мРНК β -актину.

зультати переконливо свідчать про те, що експресія мРНК PFKFB-4 є досить чутливою до довготривалої дії МТБЕ, причому як у печінці, так і в легенях.

Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР PFKFB-4 в реальному часі показав наявність лише однієї смужки (дані не приводяться), що може свідчити про наявність одного варіанту мРНК PFKFB-4 або про відсутність змін у досліджуваній ділянці мРНК різних варіантів PFKFB-4.

Вплив довготривалого введення щурам метил-третбутилового ефіру на інтенсивність експресії мРНК PFKFB-4 у печінці та легенях досліджували також методом ПЛР, використовуючи іншу пару праймерів, яка охоплювала більшу ділянку фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини PFKFB-4. На рис. 2 представлені результати цих досліджень. Вони узгоджуються з попередніми даними аналізу експресії мРНК PFKFB-4 методом ПЛР у реальному часі: посилення експресії мРНК PFKFB-4 у печінці та зниження експресії даної мРНК у легенях щурів, що отримували протягом місяця МТБЕ.

Результати проведених досліджень також показали, що у печінці та легенях контрольних щурів синтезується одна смужка, що свідчить про відсутність структурних змін у аналізованій ділянці фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини мРНК PFKFB-4 у цих органах контрольних тварин. Разом з тим, у продуктах полімеразної ланцюгової реакції з печінки щурів, яким вводили протягом місяця МТБЕ, з'являється



Рис. 2. Вплив МТБЕ на експресію мРНК PFKFB-4 у печінці та легенях щурів за даними ПЛР з використанням праймерів М3 та М7. Для контролю кількості аналізованої РНК визначали експресію мРНК β -актину.

К – контрольні тварини; М – щури, що отримували МТБЕ в дозі 500 мг/кг маси тіла протягом місяця. Приведені дані типового із 4 експериментів.

більша за розміром додаткова смужка (рис. 2). Результати цих експериментів вказують на можливість індукції під впливом токсичної дії МТБЕ нового варіанту мРНК PFKFB-4 у печінці щурів.

Для ідентифікації додаткового варіанту мРНК PFKFB-4, що з'являється у печінці щурів, яким вводили протягом місяця МТБЕ і про що свідчить поява більшої за розміром додаткової смужки в продуктах полімеразної ланцюгової реакції, ми клонували різні за розміром комплементарні ДНК PFKFB-4 щура, в тому числі і фрагмент, що індукується МТБЕ.

Клонування кДНК проводили в плазмідному векторі pCRII-ТОРО. Деякі фрагменти кДНК PFKFB-4 були рекловані для проведення сиквенсу в плазміді pBluescript II SK⁺. Нами була отримана велика

кількість клонів і проведений їх сиквенс. Серед цих клонів були виявлені ті, що відповідали основному варіанту мРНК PFKFB-4 (GenBank accession number NM_019333), а також два додаткових, один із яких відповідав фрагменту, що індукується МТБЕ. Аналіз нуклеотидної послідовності останнього показав наявність вставки розміром 94 пари нуклеотидних залишків після 11-го екзону. Другий варіант мРНК PFKFB-4 виявився коротшим за основного; він мав делецію розміром 22 нуклеотидних залишки в каталітичній ділянці фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини PFKFB-4.

Аналіз структури гену PFKFB-4 щура показав, що виявлена в структурі нового варіанту мРНК PFKFB-4 щура вставка представляє собою послідовність інтрону 11. Отримані результати вказують на те, що метил-третбутиловий ефір порушує вирізання інтрону з пре-мРНК PFKFB-4 у печінці щурів, в результаті чого з'являється новий альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4. Комп'ютерний аналіз амінокислотної послідовності нового альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-4 показав, що включення інтрону 11 в структуру мРНК PFKFB-4 створює новий сплайс-варіант, в якому суттєво змінена послідовність амінокислот і що призводить до передчасної появи стоп-кодону, невдовзі після домену К фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини PFKFB-4 (рис. 3).

Отримані нами результати свідчать про те, що метил-третбутиловий ефір порушує вирізання



Рис. 3. Амінокислотна послідовність С-ділянки PFKFB-4 щура (GenBank номер NM_019333) та її альтернативного сплайс-варіанту (GenBank номер EU404103). Виділені домени I, J та К фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини PFKFB-4 та залишки серину в К-кінцевій частині PFKFB-4.

інтрону з пре-мРНК PFKFB-4 у печінці шурів, в результаті чого з'являється новий альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4, який має видозмінену і сильно вкорочену послідовність амінокислот із-за появи стоп-кодону після домени К С-кінцевої частини PFKFB-4.

Альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4, що містить інтрон 11 як вставку, має всі каталітичні домени як 6-фосфофрукто-2-кінази, так і фруктозо-2,6-бісфосфатази, але практично не має С-кінцевої частини PFKFB-4, яка є дуже важливою в регуляції активності PFKFB і зокрема фруктозо-2,6-бісфосфатазної активності. Є дані про те, що відсутність залишків серину в С-кінцевій частині PFKFB виключає можливість регуляції її активності шляхом фосфорилювання С-кінця даного ензиму [Rider et al., 2004].

Другий варіант мРНК PFKFB-4 має невелику за розміром (22 нуклеотидних залишки) делецію в каталітичній ділянці фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини PFKFB-4. Фрагмент делеції (22 нуклеотидних залишки) є лише невеликою 3'-кінцевою частиною 10-го екзону, розмір якого — 105 нуклеотидних залишків. Виявити даний альтернативний сплайс-варіант в агарозному гелі (рис. 2) не вдалося із-за малої різниці в розмірі між ним та основним варіантом PFKFB-4. Лише сиквенування клонуваних кДНК PFKFB-4 дозволило виявити цей унікальний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4. Даний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 має всі каталітичні домени 6-фосфофрукто-2-кінази, але не має двох важливих каталітичних доменів фруктозо-2,6-бісфосфатази (J та K), що виключає можливість функціонування фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини цього варіанту PFKFB-4. Більше того, ізоензим, що кодується цим альтернативним сплайс-варіантом мРНК PFKFB-4, повинен мати підвищену 6-фосфофрукто-2-кіназну активність із-за відсутності фруктозо-2,6-бісфосфатазної активності. Доцільно відмітити, що хоча даний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 має видозмінену і вкорочену С-кінцеву частину PFKFB-4, яка є дуже важливою в регуляції активності PFKFB, кількість залишків серину на С-кінці значно більша порівняно з основним варіан-

том PFKFB-4 (GenBank номер NM_019333), що може мати важливе значення в регуляції активності PFKFB шляхом фосфорилювання залишків серину на С-кінці даної ізоформи PFKFB [2]. Так, основний варіант PFKFB-4 щура має три залишки серину, а альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 з делецією 22 нуклеотидів (3'-кінцева частина 10-го екзону) має п'ять залишків серину, незважаючи на значно менший розмір С-кінцевої ділянки.

Експресія альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-4 із вставкою 94 нуклеотидних залишки не виявлена ні в печінці, ні в легенях контрольних шурів і індукується під впливом тривалої дії МТБЕ лише у печінці, причому інтенсивність індукції посилюється при збільшенні дози даної токсичної хімічної сполуки (рис. 2). В зв'язку з тим, що цей альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 має видозмінену і надто вкорочену С-кінцеву частину PFKFB-4, можливість регуляції активності даного ензиму шляхом фосфорилювання С-кінця неможлива із-за відсутності залишків серину в цій частині молекули, а вона є надзвичайно важливою в регуляції функції PFKFB і зокрема її фруктозо-2,6-бісфосфатазної активності. Таким чином, даний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 повинен мати знижену фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність і працювати на посилення гліколізу. Ймовірно, що індукція експресії такого альтернативного сплайс-

варіанту мРНК PFKFB-4 при тривалій дії на організм МТБЕ представляє собою адаптаційну реакцію на токсичну дію даної хімічної сполуки шляхом посилення гліколізу.

Для вивчення експресії іншого альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-4, що має делецію в ділянці J-домени розміром 22 нуклеотидних залишки, були використані спеціальні праймери (M8 та M9). Встановлено, що цей сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 експресується як у печінці, так і в легенях, і що його експресія суттєво змінюється в обох органах під впливом МТБЕ. Характер змін експресії даного альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-4 при дії МТБЕ є різним у цих двох органах шурів: довготривала дія МТБЕ посилює його експресію в печінці і знижує в легенях (рис. 4 та 5).

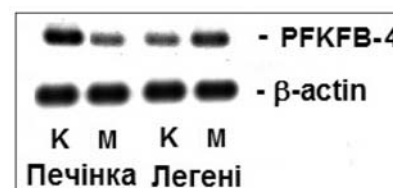


Рис. 4. Вплив МТБЕ на експресію альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-4 у печінці та легенях шурів за даними ПЛР з використанням праймерів M8 та M9. Для контролю кількості аналізованої РНК визначали експресію мРНК β -актину. К — контрольні тварини; М — щури, що отримували МТБЕ протягом місяця. Наведені дані типового із 4 експериментів.

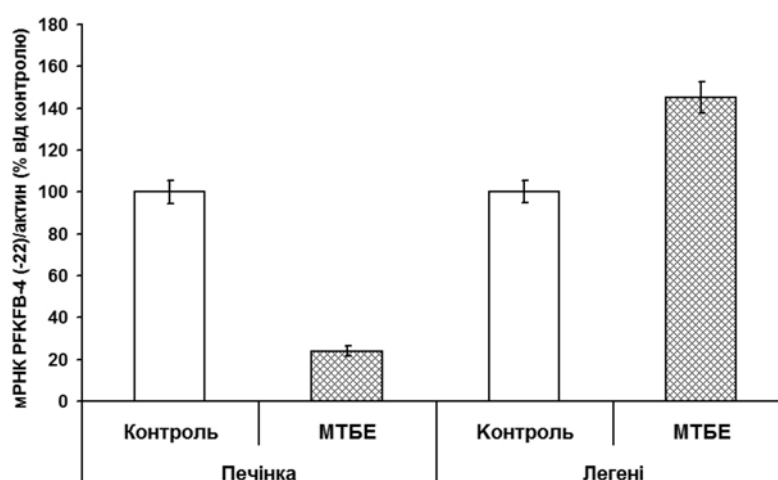


Рис. 5. Кількісна оцінка впливу МТБЕ на експресію альтернативного сплайс-варіанту мРНК PFKFB-4 (делеція 22 нуклеотидних залишків) у печінці та легенях шурів за даними ПЛР з використанням праймерів M8 та M9. Для контролю кількості аналізованої РНК визначали експресію мРНК β -актину. К — контрольні тварини; М — щури, що отримували МТБЕ протягом місяця; n = 4.

Таким чином, основним результатом проведеної нами роботи можна вважати дані про те, що метил-третбутиловий ефір, який є досить токсичною і екологічно небезпечною хімічною сполукою, виражено змінює експресію та сплайсинг PFKFB-4 в легенях та печінці шурів, порушуючи надзвичайно важливу ланку регуляції гліколізу.

Все це дає підставу вважати, що експресія та сплайсинг мРНК PFKFB-4 можуть бути чутливим тестом для визначення токсичної дії на організм не лише метил-третбутилового ефіру, а і ряду інших екологічно небезпечних хімічних сполук.

Важливо відмітити, що дослідження нових альтернативних

сплайс-варіантів PFKFB-4 може також бути дуже корисним в розкритті молекулярних механізмів регуляції гліколізу шляхом змін в альтернативному сплайсингу як при адаптації до дії різних хімічних токсичних речовин, так і при різноманітних патологіях.

Висновки

1. Метил-третбутиловий ефір посилює експресію мРНК PFKFB-4 у печінці і знижує в легенях шурів, причому за даним показником як печінка, так і легені є чутливими до дії МТБЕ.
2. Метил-третбутиловий ефір порушує визнання інтрону з пре-мРНК PFKFB-4 у печінці шурів, в резуль-

таті чого з'являється новий альтернативний сплайс-варіант мРНК, який кодує ізоензим з видозміненим та вкороченим С-кінцем.

3. Виявлено новий альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4, що має делецію в каталітичній частині фруктозо-2,6-бісфосфатази і кодує ізоензим з порушеною фруктозо-2,6-бісфосфатазною активністю та видозміненим і вкороченим С-кінцем, але є збагаченим на залишки серину, які можуть бути потенційними сайтами фосфорилування. Його експресія суттєво змінюється як у печінці, так і у легенях, але в протилежному до основного варіанту мРНК PFKFB-4 напрямку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Okar D. A., Manzano A., Navarro-Sabate A. et al. PFK-2/FBPase 2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate // Trends Biochem. Sci. — 2001. — V. 26, N 1. — P. 30 — 35.
2. Rider M. H., Bertrand L., Vertommen D. et al. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis // Biochem. J. — 2004. — V. 381, Pt. 3. — P. 561-579.
3. Михальченко В. Г., Бобарикіна А. Ю., Ковтун О. О., Мінченко О. Г. Молекулярні механізми регуляції експресії генів 6-фосфотрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази при гіпоксії // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. — 2006. — вип. 11. — С. 18-24.
4. Okar D. A., Lange A. J. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes // Biofactors. — 1999. — V. 10, N 1. — P. 1-14.
5. Kawaguchi T., Veech R. L., Uyeda K. Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia. Roles of fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate // J. Biol. Chem. — 2001. — V. 276, N 30. — P. 28554-28561.
6. Tominaga N., Minami Y., Sakakibara R., Uyeda K. Significance of the amino terminus of rat testis fructose-6-phosphate, 2-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase // J. Biol. Chem. — 1993. — V. 268, N 17. — P. 15951-15957.
7. Manzano A., Rosa J. L., Ventura F. et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3) // Cytogenet. Cell Genet. — 1998. — V. 83, N 3-4. — P. 214-217.
8. Manzano A., Póez J. X., Nadal M. et al. Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene // Gene. — 1999. — V. 229, N 1-2. — P. 83-89.
9. Sakata J., Abe Y., Uyeda K. Molecular cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes fructose-6-phosphate-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase // J. Biol. Chem. — 1991. — V. 266, N 24. — P. 15764-15770.
10. Heine-Suner D., Diaz-Guillen M. A., Lange A. J., Rodriguez de Cordoba S. Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2) // Eur. J. Biochem. — 1998. — V. 254, N 1. — P. 103-110.
11. Kurland I. J., Maghrabi R. E., Correia J. I., Pilakis S. J. Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 267, N 7. — P. 4416-4423.
12. Hue L., Beauloye C., Bertrand L. et al. New targets of AMP-activated kinase // Biochem. Soc. Trans. — 2003. — V. 31, Pt. 1. — P. 213-215.
13. Bando H., Atsumi T., Nishio T. et al. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer // Clin. Cancer Res. — 2005. — V. 11, N 16. — P. 5784-5792.
14. Marsin A., Bertrand L., Rider M. H., Deprez I. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has role in the stimulation of glycolysis during ischemia // Curr. Biol. — 2000. — V. 10. — P. 1247 — 1255.
15. Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. L. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene // J. Biol. Chem. — 2002. — V. 277, N 8. — P. 6183-6187.
16. Minchenko O., Opentanova I., Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo // FEBS Lett. — 2003. — V. 554, N 3. — P. 264-270.
17. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O. et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // FEBS Lett. — 2004. — V. 576, N 1. — P. 14-20.
18. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Ogura T. et al. Expression and hypoxia-responsiveness of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in the mammary gland malignant cell lines. // Acta Biochim. Pol. — 2005. — V. 52, N 4. — P. 881-888.
19. Bobarykina A. Y., Minchenko D. O., Opentanova I. L. et al. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in the gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in the gastric cancers // Acta. Biochim. Pol. — 2006. — V. 53, N 4. — P. 789-799.
20. Minchenko O. H., Ogura T., Opentanova I. L. et al. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in the lung tumor // Укр. біохім. ж. 2005. — Т. 77, № 6. — С. 46-50.
21. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I. L. et al. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors // Biochimie. — 2005. — V. 87, N 11. — P. 1005-1010.
22. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Ochiai A. et al. Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation // Mol. Cell. Biochem. — 2005. — V. 280, N 1-2. — P. 227-234.
23. Kessler R., Eschrich K. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain // Mol. Brain Res. — 2001. — V. 87, N 2. — P. 190 — 195.

24. Watanabe F., Sakai A., Furuya E. Novel isoforms of rat brain fructose 2-phospho 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase are generated by tissue-specific alternative splicing // *J. Neurochem.* — 1997. — V. 69, N 1. — P. 1 — 9.
25. Watanabe F., Furuya E. Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose 6-phosphate 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase // *FEBS Lett.* — 1999. — V. 458, N 1. — P. 304 — 308.
26. Watanabe F., Furuya E. Alternative splicing of novel exons rat heart type fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — V. 282. — P. 803-810.
27. Mykhalchenko V. G., Minchenko D. O., Tsuchihara K. et al. Expression of mouse 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 mRNA alternative splice variants in hypoxia // *Укр. біохім. ж.* — 2008. — Т. 80, № 1. — С. 19 — 25.
28. Minchenko D. O., Tsuchihara K., Komisarenko S. V. et al. Unique alternative splice variants of mouse PFKFB-3 mRNA: tissue specific expression // *Научный вестник Национального медицинского университета им. О. О. Богомольца.* — 2008. — № 1. — С. 72-78.
29. Chesney J., Mitchell R., Benigni F. et al. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — V. 96, N 6. — P. 3047 — 3052.
30. Atsumi T., Chesney J., Metz C. et al. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers // *Cancer Res.* — 2002. — 62, N 20. — P. 5881 — 5887.
31. Мінченко Д. О., Ковтун О. О., Мінченко О. Г., Биць Ю. В. Родина альтернативних сплайс-варіантів мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-4 // *Науковий вісник Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця.* — 2006. — № 4. — С. 72 — 78.
32. Minchenko D. O., Minchenko O. H. Alternative splicing as a new possible regulator of enzymatic activity of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 / 30th FEBS Congress and 19th IUBMB Conference, 2-7 July, 2005, Budapest, Hungary. *FEBS J.* 2005. — V. 272, Suppl. 1. p. 309.
33. McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review // *Crit. Rev. Toxicol.* — 2007. — V. 37, N 4. — P. 287 — 312.
34. Hutcheon D. E., Arnold J. D., Hove W., Boyle J. Disposition, metabolism, and toxicity of methyl tertiary butyl ether, an oxygenate for reformulated gasoline // *J. Toxicol. Environ. Health.* — 1996. — V. 47, N 5. — P. 453 — 464.
35. Mehlman M. A. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil-refining and petrochemical industry--Part XXII: Health hazards from exposure to gasoline containing methyl tertiary butyl ether: study of New Jersey residents // *Toxicol. Ind. Health.* — 1996. — V. 12, N 5. — P. 613 — 627.
36. Mykhalchenko V. G., Tsuchihara K., Minchenko D. O. et al. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA expression in streptozotocin-diabetic rats // *Biopolymers and Cell.* — 2008. — V. 24, N 3. — P. 260 — 266.
37. Atsumi T., Nishio T., Niwa H. et al. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation // *Diabetes.* — 2005. — V. 54, N 12. — P. 3349 — 3357.
38. Duran J., Navarro-Sabate A., Pujol A. et al. Overexpression of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase in the liver of transgenic mice results in weight gain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2008. — V. 365, N 2. — P. 291 — 297.
39. Duran J., Gmez M., Navarro-Sabate A. et al. Characterization of a new liver- and kidney-specific pfkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2008. — V. 367, N 4. — P. 748 — 754.
40. Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* — 2006. — V. 9, N 5. — P. 535 — 539.
41. Calvo M. N., Bartrons R., Castaño E. et al. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells // *FEBS Lett.* — 2006. — V. 580, N 13. — P. 3308 — 3314.
42. Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumor // *Nat. Rev. Cancer.* — 2008. — V. 8. — P. 705 — 713.

А. В. Кундиева, Д. А. Минченко, А. П. Яворовський,
И. В. Завгородний, Ю. А. Паустовський, А. Г. Минченко

ВЛИЯНИЕ ЭКОТОКСИКАНТА МЕТИЛ-ТРЕТБУТИЛОВОГО ЭФИРА НА ЭКСПРЕССИЮ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СПЛАЙС-ВАРИАНТОВ МРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КИНАЗЫ/ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ У КРЫС

Гликолиз является одним из основных метаболических процессов и изучение механизмов его регуляции, а также нарушений, как при различных патологиях, так и при действии токсических химических загрязнителей окружающей среды, чрезвычайно актуальная проблема медико-биологических исследований. Установлено, что метил-третбутиловый эфир, экологически опасное химическое соединение, выражено влияет на экспрессию ключевого регулятора гликолиза, 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы, бифункционального фермента, который контролирует синтез и расщепление фруктозо-2,6-бисфосфата, аллостерического активатора фосфофруктокиназы-1. Более того, метил-третбутиловый эфир изменяет характер альтернативного сплайсинга мРНК 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-4, создавая варианты мРНК с видоизмененной фруктозо-2,6-бисфосфатазной частью путем делеции каталитических или регуляторных участков в данной части 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-4. Полученные нами результаты убедительно свидетельствуют о том, что экспрессия мРНК 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-4 и изменение характера ее альтернативного сплайсинга является достаточно чувствительным маркером действия на организм метил-третбутилового эфира, поскольку это экологически опасное хи-

мическое соединение существенно изменяет экспрессию мРНК данного фермента и ее альтернативный сплайсинг.

A. V. Kundieva, D. O. Minchenko, O. P. Yavorovsky,
I. V. Zavgorodny, Y. O. Paustovsky, O. H. Minchenko

EFFECT OF ECOTOXICANT METHYL TERTBUTYL ETHER ON THE EXPRESSION OF MRNA 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSO-2,6-BISPHOSPHATASE ALTERNATIVE SPLICE VARIANTS IN RATS

Glycolysis is one of the basic metabolic processes. The study of glycolysis regulation and its disturbances in different pathologies as well as in influence of ecologically toxic chemical compounds is very important problem of medical and biological investigations. We have shown that methyl tertbutyl ether, ecologically toxic chemical compound, significantly changes the expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in rat liver and lung. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, a key regulator of glycolysis, is a bifunctional enzyme which controls synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate, allosteric activator of phosphofructokinase-1. Two new unique alternative splice variants of PFKFB-4 mRNA we have identified. They have deletion or insert in fructose-2,6-bisphosphatase region as well as different length and amino acid sequence of C-terminal part. Moreover, the expression of different alternative splice variants of PFKFB-4 mRNA has shown tissue specificity and significantly changed in rats treated by methyl tertbutyl ether. Results of this investigation demonstrate high sensitivity of PFKFB expression and regulation of alternative splicing to the action of toxic chemical compounds, in particular to methyl tertbutyl ether.