

УДК 577.112:616

ЕКСПРЕСІЯ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-2 ТА ЇЇ АЛЬТЕРНАТИВНИХ СПЛАЙС-ВАРІАНТІВ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

Н. М. ЛИПОВА¹, Д. О. МІНЧЕНКО¹, О. О. РАТУШНА¹, І. В. БОЖКО¹,
К. ТСУЧІГАРА², Г. ЕСУМР², О. Г. МІНЧЕНКО^{1,2}

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

²Науковий центр інноваційної онкології Східного госпіталю
Національного онкологічного центру Японії;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Вивчали експресію двох ізоформ мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 (PFKFB-2) з неоднаковою С-кінцевою частиною молекули в нирках та легенях щурів при експериментальному цукровому діабеті. У щурів з експериментальним цукровим діабетом виявлено зниження експресії обох ізоформ мРНК PFKFB-2 в досліджуваних органах. Більше того, аналізуючи клоновані кДНК PFKFB-2 нирок діабетичних щурів, було виділено чотири нових альтернативних сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2, що відрізняються вставками та делеціями у 6-фосфофрукто-2-кіназній та у фруктозо-2,6-бісфосфатазній частинах молекули PFKFB-2. Три із цих альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 є монофункціональними, оскільки не здатні кодувати синтез функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кінази. Установлено, що експресія альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 як у нирках, так і в легенях щурів змінюється порівняно з контрольними тваринами. Результати роботи свідчать про суттєві порушення синтезу мРНК PFKFB-2 на рівні альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 у нирках та легенях при цукровому діабеті, що може бути доказом складності механізмів регуляції метаболізму глюкози, зокрема гліколізу, а також одним із численних чинників їхнього порушення при цьому захворюванні.

Ключові слова: PFKFB-2, альтернативний сплайсинг, цукровий діабет, легені, нирки, щури.

Гомодимерний біфункціональний ензим 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (PFKFB) є одним із ключових ензимів регуляції метаболізму глюкози, зокрема гліколізу, як у нормі, так і при різних патологічних станах організму – цукровому діабеті та злоякісних пухлинах [1–8]. PFKFB [6-фосфофрукто-2-кіназа (ЕС 2.7.1.105) і фруктозо-2,6-бісфосфатаза (ЕС 3.1.3.46)] має два різні каталітичні центри на обох субодиницях: один із них пов'язаний з 6-фосфофрукто-2-кіназною активністю (включає шість доменів – А, В, С, D, Е та F), а інший – із фруктозо-2,6-бісфосфатазною (включає п'ять доменів – G, H, I, J та K) [1, 9]. PFKFB контролює рівень фруктозо-2,6-бісфосфату у клітинах, тому що одна частина ензиму відповідає за його синтез, а інша – за дефосфорилування [1, 9]. Фруктозо-2,6-бісфосфат – це ключовий регулятор гліколізу, оскільки алостерично активує 6-фосфофрукто-1-кіназу – важливий ензим гліколізу [1, 10, 11]. Більше того, фруктозо-

2,6-бісфосфат істотно впливає також на функціонування ензимів глюконеогенезу [12].

У людини та тварин виявлено чотири гени, що розташовані на різних хромосомах і кодують синтез ізоензимів з відмінними каталітичними та регуляторними властивостями: PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 та PFKFB-4, причому особливості перебігу гліколізу в тих чи інших органах і тканинах визначаються, імовірно, клітинною специфічністю експресії різних генів PFKFB [1, 13–15]. При цьому для мРНК PFKFB-2, PFKFB-3 і PFKFB-4 у клітинах людини, а також у щурів та мишей, відомо кілька альтернативних сплайс-варіантів із різною довжиною С-кінця молекули. Однак у цих сплайс-варіантах каталітичні домени не змінюються не лише у 6-фосфофрукто-2-кінази, але і у фруктозо-2,6-бісфосфатази [16–20]. Водночас, раніше нами було встановлено, що мРНК PFKFB-4 притаманна низка інших альтернативних сплайс-варіантів із різними вставками або делеціями в ділянках, що ко-

дують каталітичні частини 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази. Це спричинює елімінацію частини каталітичних доменів [21, 22]. Унаслідок таких модифікацій первинної структури біфункціональний ензим PFKFB-4 набуває монофункціональності і виявляє лише 6-фосфофрукто-2-кіназну або фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність.

Відомо, що найпотужнішим активатором гліколізу та утилізації глюкози у клітинах є гіпоксія, яка істотно посилює експресію гліколітичних ензимів, переносників глюкози та PFKFB, відповідального за регуляцію як гліколізу, так і глюконеогенезу [7, 13]. Фактори росту також значно активують процеси гліколізу [7, 23]. Вплив гіпоксії на інтенсивність гліколізу опосередковується індукцією залежного від гіпоксії транскрипційного фактора HIF та PFKFB [15, 24–26]. Значне підвищення інтенсивності гліколізу спостерігається у злоякісних пухлинах, що обумовлюється наявністю ефектів в них гіпоксії і посиленою експресією факторів росту, а також опосередковується індукцією транскрипційного фактора HIF та PFKFB [2, 27–31].

Установлено, що інтенсивність перебігу процесів гліколізу істотно змінюється при цукровому діабеті внаслідок порушення метаболізму глюкози, що визначається зміною експресії та активності PFKFB і глюкокінази [32–36]. Вивчаючи механізми регуляції гліколізу при діабеті, автори значну увагу зосередили на вивченні гена *pfkfb1* [5, 6]. У цих експериментах було виявлено зниження синтезу PFKFB-1 у печінці щурів при експериментальному цукровому діабеті, а також рівня фруктозо-2,6-бісфосфату у здорових тварин внаслідок пригнічення експресії PFKFB-1, яке призводить до гіперглікемії та набуття резистентності до інсуліну [5, 32, 33].

Слід також відзначити, що посилення гліколізу при цукровому діабеті є надзвичайно важливим чинником зниження рівня глюкози шляхом ослаблення глюконеогенезу, а посилення експресії PFKFB під впливом інсуліну і надекспресія PFKFB у разі введення до організму відповідних аденовірусних генетичних конструкцій зумовлює збільшення рівня фруктозо-2,6-бісфосфату та істотно зменшує рівень глюкози у крові через інгібування інтенсивності її синтезу. Це, у свою чергу, відновлює чутливість клітин до інсуліну [6, 18, 37–39]. Крім того, збільшення експресії PFKFB і вмісту фруктозо-2,6-бісфосфату має важливе значення для посилення метаболізму глюкози шляхом активації глюкокінази та фосфори-

лювання глюкози як через безпосередню дію фруктозо-2,6-бісфосфату на глюкокіназу, так і взаємодію 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази із глюкокіназою [40–42].

PFKFB-2 посилено експресується в серці, легенях, нирках та мозку [14]. Активність ензиму контролюється гормонами шляхом фосфорилування регуляторних сайтів ензиму – Ser29, Ser 466, Thr475 та Ser483 [1]. Відомо також, що експресія PFKFB-2 є надзвичайно важливою для нормального функціонування серця, оскільки підвищення синтезу ізоформи PFKFB-2, дефіцитної за 6-фосфофрукто-2-кіназою, спричинює гіпертрофію міокарда, порушує функцію міоцитів та зменшує чутливість клітин до дії інсуліну [43].

Метою роботи було дослідити експресію мРНК PFKFB-2 у різних органах щурів з експериментальним цукровим діабетом, а також особливостей альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 у контрольних та діабетичних тварин.

Матеріали і методи

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 220 – 240 г. Цукровий діабет індукували одноразовою ін'єкцією до очередини стрептозотоцину (55 мг/кг маси тіла) як було описано раніше [44, 45]. Діабетичними вважали тварин, якщо рівень глюкози у крові перевищував 14 ммоль/л. Тканини контрольних і діабетичних щурів для виділення РНК заморожували в рідкому азоті. Тотальну РНК виділяли зі 100–200 мг тканини, екстрагуючи її гуанідином, фенолом та хлороформом [46, 47]. Спочатку екстракцію тканин щурів здійснили 1 мл 4 М розчину ізотіоціанату гуанідину (Ultra Pure), який містив 50 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 25 мМ ЕДТА та 100 мМ 2-меркаптоетанолу. Потім до лізату тканин поступово додавали 0,1 мл 2 М ацетату натрію (рН 4,0), 1 мл водонасиченого фенолу та 0,2 мл суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (49 : 1), перемішуючи розчин після додавання кожного з реагентів. РНК осаджували рівним об'ємом ізопропанолу. Осад РНК промивали 75%-м етанолом і розчиняли у воді, в якій не було рибонуклеази.

Експресію мРНК PFKFB-2 досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК. Для цього тотальну РНК із різних органів щурів використовували як матрицю для синтезу кДНК із допомогою оліго(dT)-праймера та SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, США) згідно з рекомендацією виробника. Для зворотної транскрипції бра-

ли 0,4 мкг тотальної РНК, а для ампліфікації кДНК PFKFB-2 – 1 мкл продукту реакції зворотної транскрипції, що було рівнозначним 20 нг тотальної РНК, використаної в реакції, і HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина). Ампліфікацію проводили в апараті «MasterCycler Personal» (Eppendorf, Німеччина), застосовуючи один прямий праймер – 5'-TGCCTCCTGAAGAАСТАССАТG-3' (1) – та два зворотних для двох типів мРНК PFKFB-2: 3'-СТGACTGCATCCTTAGCTG-5' (2) і 3'-САAGATGGCAAGTTGGGTC-5' (3). Ці олігонуклеотиди відповідають нуклеотидним послідовностям 171–192 (1) та 1907–1925 (2) опублікованої кДНК PFKFB-2 щура (GenBank-номер NM_080477) та 1617–1635 (3) варіанта кДНК PFKFB-2 щура (GenBank-номер GQ422137). Праймери отримано від компанії Sigma (США).

Для проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі кДНК PFKFB-2 використовували інші пари праймерів: 5'-СТGACTGCATCCTTAGCTG-3' (4) і 3'-САAGATGGCAAGTTGGGTC-5' (5), які відповідали нуклеотидним послідовностям 1503–1522 (4) та 1563–1582 (5) опублікованої кДНК PFKFB-2 щура (GenBank-номер NM_080477), а також 5'-CCGTGCCCTGGATATGCAAG-3' (6) і 3'-САAGTGTTAATCTGAACATG-5' (7), які відповідали нуклеотидним послідовностям 1388–1407 (6) та 1536–1555 (7) варіанта кДНК PFKFB-2 щура (GenBank-номер GQ422137) [28].

Вивчаючи експресію альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, застосовували специфічні для кожного сплайс-варіанта пари праймерів. Для альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона (-125; GenBank-номер GQ422137) були використані такі праймери: 5'-GCTGCCAАТАТТСТGGGACC-3' (прямий) та 3'-GAACAGGAGATCCAGGACCT-5' (зворотний). Прямий праймер починається з 521-го нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – із 774 нуклеотидного залишку (3'-позиція).

Для ампліфікації альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3–4-м екзонами (+55; GenBank-номер GQ422138) використовували прямий праймер 1, описаний вище; зворотний праймер (3'-GTCTGTТАGGССАAGAAGTC-5') починався із 239 нуклеотидного залишку (5'-позиція).

Для вивчення експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона (-125) та вставкою між 9–10-м екзонами (+20) були використані такі праймери: 5'-

GATCCTGATGTCATTTGCTGC-3' (прямий) та зворотний 3'-CCCAGTTTGCTCAGGCTCTGA-5', що відповідають послідовностям нуклеотидів 506–525 та 758–779 опублікованого варіанта кДНК PFKFB-2 щура (GenBank-номер GQ438759).

Для ампліфікації альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона (-125) та двома вставками між 1–2-м (+10) та 13–14-м екзонами (+66) були використані праймери для ділянки із вставкою між 1–2-м екзонами: 5'-ATGCTGTGAGTTCTGCATGG-3' (прямий) та 3'-GAAGCAGTCAAGTCCATAA-5' (зворотний). Прямий праймер починається із 109 нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – із 276 нуклеотидного залишку (3'-позиція; GenBank-номер GQ438758).

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на апараті Stratagene Mx 3000P cycler, застосовуючи SYBRGreen Mix. Одержані результати аналізували, використовуючи спеціальну комп'ютерну програму «Differential expression calculator», а статистичний аналіз здійснювали у програмі Excel.

Експресія мРНК β-актину слугувала додатковим контролем кількості аналізованої РНК. Для ампліфікації кДНК β-актину застосовували такі праймери: прямий 5'-CGTACCACTGGCАТCGTGAT-3' та зворотний 5'-GTGTTGGCGTACAGGTCTTT-3' [48].

Продукти ампліфікації аналізували електрофоретично в 1–2%-му агарозному гелі, забарвлюючи ДНК бромистим етидієм. Гелі аналізували в системі Quantity One BioRad System (США).

Одержані продукти ампліфікації клонували у векторі pCRII-ТОРО (Invitrogen). Клони аналізували, застосовуючи електрофорез в агарозному гелі, а фрагменти кДНК PFKFB-2 секвенували для ідентифікації сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2. Ензиматичну реакцію подовження ланцюга для секвенування ДНК проводили з допомогою спеціального набору Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc.) та ДНК-термоциклера згідно з рекомендаціями виробника. Продукти реакції секвенування аналізували автоматично в ДНК-секвенаторі (Applied Biosystems Inc.).

Результати та обговорення

Експресію PFKFB-2 досліджували в нирках та легнях щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, одержаних шляхом зворотної транскрипції мРНК. Для аналізу відібрали дві ізоформи мРНК PFKFB-2 – основну та додаткову [17], а також, відповідно,

дві пари праймерів із нуклеотидних послідовностей цих ізоформ мРНК. Основну ізоформу ампліфікували із праймерами 1 та 2, а додаткову — із праймерами 1 та 3. Результати проведених нами досліджень наведено на рис. 1. Установлено, що базальний рівень експресії ізоформи мРНК PFKFB-2, яка синтезується за участю праймерів 1 та 2 і відповідає основній ізоформі мРНК PFKFB-2, в нирках і легенях щурів неоднаковий (в легенях значно вищий; рис. 1, А). Базальний рівень експресії додаткової ізоформи мРНК PFKFB-2 у легенях також істотно більший (рис. 1, Б).

Із даних кількісної полімеразної ланцюгової реакції, наведених на рис. 2, випливає, що в нирках щурів з експериментальним цукровим діабетом порівняно з контрольними тваринами спостерігається значне зниження експресії основної (на 45%) і додаткової (на 53%) ізоформ мРНК PFKFB-2. Для з'ясування цього були використані інші пари праймерів: для основної ізоформи мРНК PFKFB-2 — 4,5, для додаткової — 6,7. Водночас, експресія основної ізоформи мРНК PFKFB-2 в легенях щурів з експериментальним цукровим діабетом, хоча і знижується порівняно з контрольними тваринами, але значно менше (на 19%), а додаткової — лише на 13% (рис. 2).

Дані, наведені на рис. 1, Б, також свідчать, що додаткова ізоформа мРНК PFKFB-2 нирок, незважаючи на її менш виражену експресію, виявляється негомогенною. У зв'язку з цим, ми провели детальний аналіз продуктів ампліфікації шляхом їхнього клонування та секвенування. Було виділено ще чотири нові альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 з С-кінцем, ідентичним додатковій ізоформі мРНК PFKFB-2, схематич-

не зображення яких відображено на рис. 3. Один із цих альтернативних сплайс-варіантів (GenBank-номер GQ422138) порівняно з додатковою ізоформою мРНК PFKFB-2 (GenBank-номер AV040530) має вставку між 3–4-м екзонами (55 нуклеотидних залишків), що вносить позачерговий стоп-кодон до кодувальної послідовності. У передбачуваному протеїновому продукті зазначеної ізоформи відсутні два каталітичні домени, а також N-кінцева послідовність 6-фосфофрукто-2-кінази, відповідальної за формування гомодимеру, через що йому притаманна лише фруктозо-2,6-бісфосфатазна активність.

Другому альтернативному сплайс-варіанту мРНК PFKFB-2 (GenBank-номер GQ422137) притаманна делеція 8-го екзона (125 нуклеотидних залишків), який кодує синтез каталітичних доменів Е та Ф. Делеція 8-го екзона зумовлює зміну рамки зчитування і передчасне виникнення стоп-кодону під час трансляції зазначеного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2. Цей сплайс-варіант мРНК PFKFB-2, ймовірно, кодує синтез двох протеїнів: фруктозо-2,6-бісфосфатази та вкороченої 6-фосфофрукто-2-кінази без двох каталітичних доменів (Е та Ф) на С-кінці, у яких відсутня кіназна активність.

Третій альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 (GenBank-номер GQ438759) також має делецію 8-го екзона (125 нуклеотидних залишків) та ще вставку між 9–10-м екзонами (20 нуклеотидних залишків), яка змінює рамку зчитування і спричинює передчасне утворення нового стоп-кодону. Через це варіант мРНК PFKFB-2 не здатен кодувати ані функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кінази, ані функціонально активної фруктозо-2,6-бісфосфатази, оскільки у

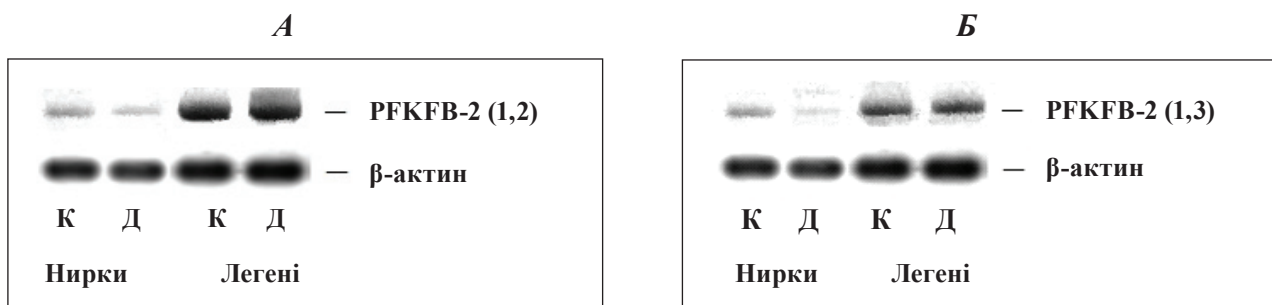


Рис. 1. Експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 у нирках та легенях контрольних (К) щурів і тварин із стрептозотоциновим діабетом (Д). А — Ампліфікацію кДНК PFKFB-2 проводили за допомогою прямого (1) та зворотного (2) праймерів; Б — ампліфікацію проводили за допомогою прямого (1) та зворотного (3) праймерів. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом у 1%-му агарозному гелі, забарвлювали бромистим етидієм і фотографували, а кількість РНК оцінювали за експресією мРНК β -актину

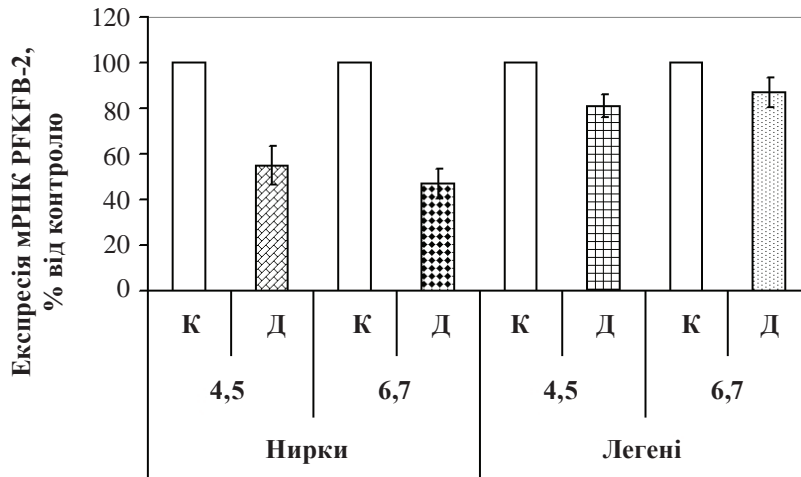


Рис. 2. Аналіз експресії мРНК PFKFB-2 у печінці та легенях контрольних щурів (К) та із стрептозоточиновим діабетом (Д) за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції і двох пар праймерів: 4,5 та 6,7 відповідно. Величину експресії мРНК PFKFB-2 нормалізували за експресією β-актину (n = 3). * Дані порівняно з контролем вірогідні, P < 0,05

фруктозо-2,6-бісфосфатази також відсутні всі необхідні для вияву ензиматичної активності каталітичні домени, зокрема домен G. Значення зазначеного альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2, ймовірно, полягає у виключенні функції утворених транскриптів PFKFB-2. Вірогідно також, що такий сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 виникає внаслідок порушення альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2.

У четвертого альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 (GenBank-номер GQ438758) також виявлено делецію 8-го екзона (125 нуклеотидних залишків) і дві вставки між 1–2-м (10 нуклеотидних залишків) та 13–14-м

екзонами (66 нуклеотидних залишків). Перша вставка змінює рамку зчитування і зумовлює передчасну появу стоп-кодону. Друга вставка теоретично не здатна змінити рамку зчитування, оскільки має 66 нуклеотидних залишків, однак вона містить стоп-кодон у своїй послідовності. Тому цей варіант мРНК PFKFB-2 не спроможний кодувати функціонально активну 6-фосфофрукто-2-кіназу, оскільки в передбачуваному протеїновому продукті немає всіх необхідних для вияву ензиматичної активності каталітичних доменів, а також через відсутність N-кінця для утворення гомодимеру PFKFB-2. Водночас, незважаючи на наявність другої вставки, цей альтернативний сплайс-

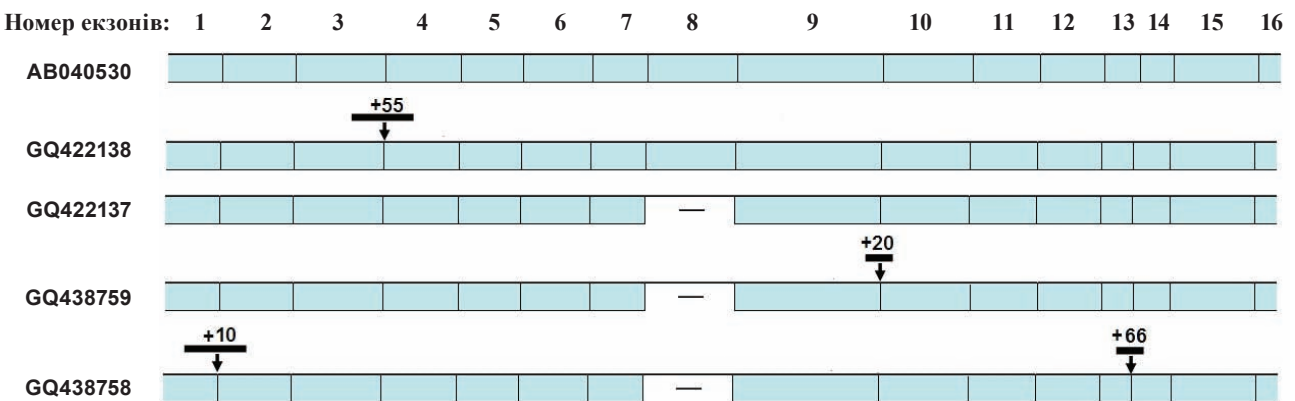


Рис. 3. Схематичне зображення екзонної організації додаткової ізоформи мРНК PFKFB-2 (AB040530) та її нових альтернативних сплайс-варіантів, ідентифікаційні GenBank-номери яких (GQ422137, GQ422138, GQ438758 та GQ438759) наведено зліва. На рис. показано також делецію 8-го екзона (-) та вставки між 1–2-м, 3–4-м, 9–10-м та 14–15-м екзонами, розмір яких становить 10, 55, 20 та 66 нуклеотидних залишків відповідно, які на рисунку позначені як +10, +55, +20 та +66

варіант мРНК PFKFB-2 спроможний кодувати синтез фруктозо-2,6-бісфосфатази як окремого ензиму з усіма каталітичними доменами, необхідними для вияву ензиматичної активності, але із вкороченим С-кінцем порівняно з вище-описаними варіантами.

На рис. 4 наведено результати досліджень щодо експресії цих нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 у легенях щурів з експериментальним цукровим діабетом. Установлено, що рівень експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3–4-м екзонами (55 нуклеотидних залишків) посилюється (на 15%) у легенях діабетичних щурів порівняно з контрольними. Рівень експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона також збільшується (на 21%) у легенях щурів з експериментальним цукровим діабетом. Водночас, експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона і вставкою між 9–10-м екзонами в легенях діабетичних щурів істотно не змінюється, у той час як 4-го сплайс-варіанта із двома вставками підвищується на 29% порівняно з контролем (рис. 4).

Виразеніші зміни в експресії нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 були виявлені в нирках щурів з експериментальним цукровим діабетом (рис. 5). Уста-

новлено, що рівень експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3–4-м екзонами (+55 нуклеотидних залишків), як і сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона, в нирках діабетичних щурів посилюється на 34 та 37% відповідно порівняно з контрольними тваринами. Установлено, що експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзона і вставкою між 9–10-м екзонами порівняно з контролем в нирках діабетичних тварин істотно не змінюється. Водночас, експресія альтернативного сплайс-варіанта з делецією 8-го екзона та із двома вставками (+10 та +66) – значно посилюється (на 48%) у щурів з експериментальним цукровим діабетом (рис. 5).

Результати цих досліджень переконливо свідчать про виражені зміни в експресії гена надзвичайно важливого регуляторного біфункціонального ензиму PFKFB-2 у щурів з експериментальним цукровим діабетом у таких життєво важливих органах, як нирки та легені. Зниження експресії мРНК PFKFB-2 у нирках і легенях щурів з експериментальним цукровим діабетом може свідчити про послаблення в цих органах гліколізу, опосередкованого PFKFB-2. Одержані нами дані стосовно експресії нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 показують, що при діабеті значно

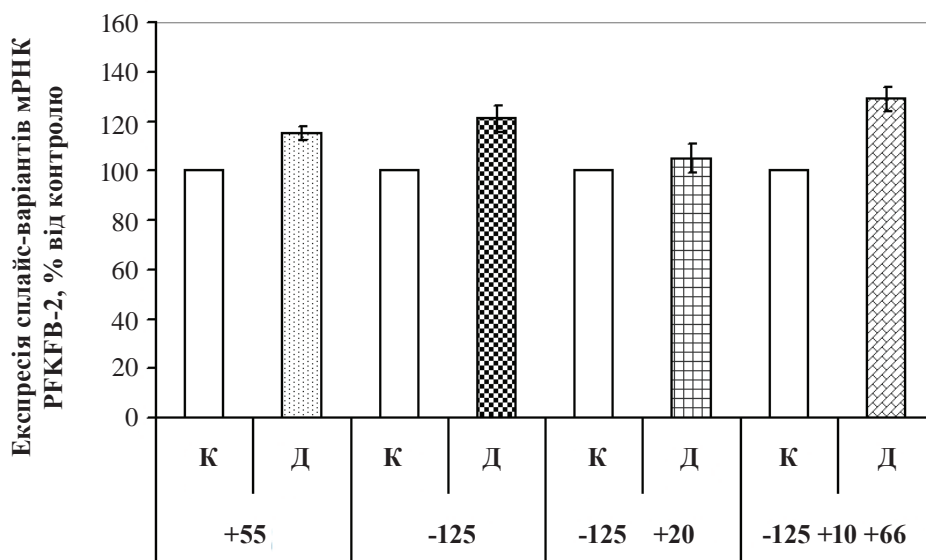


Рис. 4. Експресія альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3–4-м екзонами (+55) та з делецією 8-го екзона (-125), а також із делецією 8-го екзона та вставкою між 9–10-м екзонами (-125+20) або із двома вставками у легенях контрольних щурів (К) та тварин з експериментальним цукровим діабетом (Д) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та специфічних праймерів. Експресію мРНК PFKFB-2 нормалізували за експресією β-актину (n = 3)

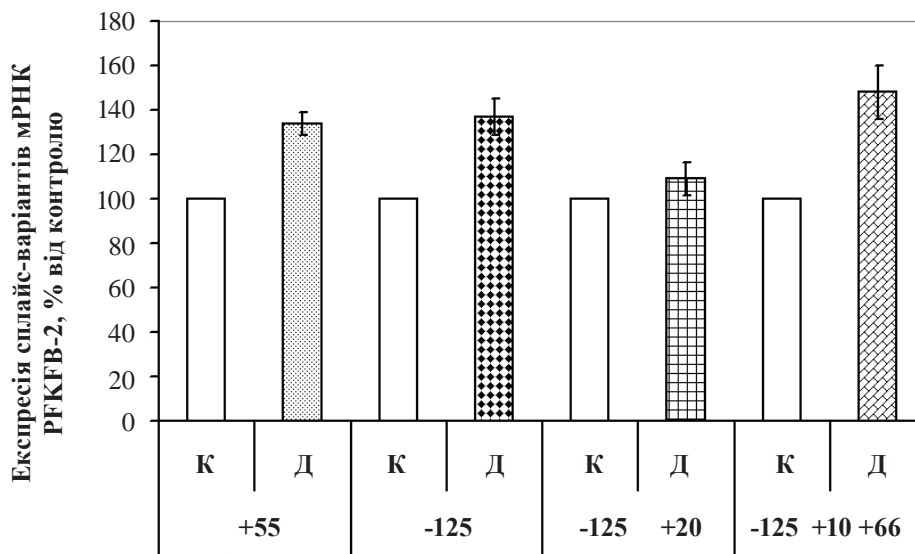


Рис. 5. Експресія альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3–4-м екзонами (+55) та з делецією 8-го екзона (-125), а також із делецією 8-го екзона та вставкою між 9–10-м екзонами (-125+20) або із двома вставками в нирках контрольних щурів (К) і тварин з експериментальним цукровим діабетом (Д) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та специфічних праймерів. Експресію мРНК PFKFB-2 нормалізували за експресією β-актину (n = 3)

порушується альтернативний сплайсинг пре-мРНК PFKFB-2, внаслідок чого утворюються ізоформи, що позбавлені 6-фосфофрукто-2-кіназної активності.

Результати проведених нами досліджень переконливо свідчать про істотні порушення альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 у тварин із цукровим діабетом, що зумовлює утворення альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, які здатні кодувати один монофункціональний ізоензим (сплайс-варіант із вставкою між 3–4-м екзонами) з активністю фруктозо-2,6-бісфосфатази або два поліпептиди, один із яких є фруктозо-2,6-бісфосфатазою – альтернативний сплайс-варіант із делецією 8-го екзона – та сплайс-варіант із делецією 8-го екзона та двома вставками (+10 та +66). Утворення фруктозо-2,6-бісфосфатази спричинює зниження гліколізу і посилення глюконеогенезу [1, 7, 12, 38]. У другому поліпептиді відсутні необхідні для вияву ензиматичної активності каталітичні домени 6-фосфофрукто-2-кінази (сплайс-варіант із делецією 8-го екзона, а також сплайс-варіант із делецією 8-го екзона і вставкою між 9–10-м екзонами). Разом з тим, цьому поліпептиду притаманна N-кінцева частина. Можна припустити, що він утворює димер із біфункціональним мономером ензиму, який не здатен виявляти 6-фосфофрукто-2-кіназну активність через відсутність у одного з компонентів двох каталітичних доменів 6-фосфофрукто-2-кінази,

інгібуючи при цьому утворення фруктозо-2,6-бісфосфату та інтенсивність гліколізу.

Отже, при експериментальному цукровому діабеті в нирках і легенях щурів не лише знижується експресія мРНК PFKFB-2, а також порушується альтернативний сплайсинг пре-мРНК PFKFB-2 у напрямі синтезу монофункціонального ензиму фруктозо-2,6-бісфосфатази та вкорочених фрагментів 6-фосфофрукто-2-кінази за відсутності двох каталітичних доменів. Фруктозо-2,6-бісфосфатаза і N-кінцеві частини 6-фосфофрукто-2-кінази, які синтезуються альтернативними сплайс-варіантами мРНК PFKFB-2 і які здатні брати участь у формуванні та функціонуванні гомодимерної форми ензиму, заслуговують на подальше вивчення в аспекті створення засобів пригнічення гліколізу, що важливо для інгібування злоякісного росту.

Проведені нами дослідження є важливим внеском до молекулярної медицини, оскільки висвітлюють молекулярні основи порушення регуляції обмінних процесів при цукровому діабеті і є підґрунтям для розроблення принципово нових молекулярних підходів до їхньої діагностики, профілактики та лікування захворювання.

Аналіз одержаних результатів свідчить:

1. У щурів з експериментальним цукровим діабетом знижується експресія двох ізоформ мРНК PFKFB-2 як у нирках, так і в легенях.

2. Ідентифіковано чотири нові альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 щура, що мають різні вставки та делеції у 6-фосфофрукто-2-кіназній та в фруктозо-2,6-бісфосфатазній частинах молекули PFKFB-2.

3. Установлено, що три із цих альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 кодують синтез лише фруктозо-2,6-бісфосфатази, оскільки в них виявлено делецію двох каталітичних доменів (Е та F) 6-фосфофрукто-2-кінази, в якій передчасно виникає стоп-кодон у мРНК.

4. Показано, що виявлені нами альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 експресуються як у нирках, так і в легенях щурів, причому порівняно з контрольними щурами експресія трьох із них посилюється у тварин з експериментальним цукровим діабетом.

5. Результати цих досліджень свідчать про істотні порушення експресії мРНК PFKFB-2 на рівні альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 у нирках та легенях щурів з експериментальним цукровим діабетом.

кулы PFKFB-2. Три из этих альтернативных сплайс-вариантов мРНК PFKFB-2 могут кодировать синтез только фруктозо-2,6-бисфосфатазы, так как имеют делецию двух каталитических доменов 6-фосфофрукто-2-киназы (Е та F). Показано, что выявленные альтернативные сплайс-варианты мРНК PFKFB-2 экспрессируются в почках и в легких крыс. При этом по сравнению с контрольными крысами изменяется экспрессия у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Результаты данной работы свидетельствуют о существенном нарушении синтеза мРНК PFKFB-2 на уровне альтернативного сплайсинга пре-мРНК PFKFB-2 в почках и легких при сахарном диабете, что может быть, в частности, доказательством сложности механизмов регуляции метаболизма глюкозы и гликолиза и одним из многочисленных факторов их нарушения при этом заболевании.

Ключевые слова: PFKFB-2 мРНК, альтернативный сплайсинг, сахарный диабет, легкие, почки, крысы.

ЕКСПРЕССИЯ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КИНАЗЫ/ ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ-2 И ЕЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СПЛАЙС-ВАРИАНТОВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Н. М. Липова¹, Д. А. Минченко¹,
О. О. Ратушная¹, И. В. Божко¹,
К. Тсучигара², Г. Эсуми², А. Г. Минченко^{1,2}

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;

²Научно-исследовательский центр инновационной
онкологии Восточного госпиталя Национального
онкологического центра Японии;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Проведено изучение экспрессии двух изоформ мРНК 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-2 (PFKFB-2) с различной С-концевой частью в почках и легких крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Показано, что при сахарном диабете отмечается снижение экспрессии обоих изоформ мРНК PFKFB-2 в легких и в почках крыс. Более того, при анализе клонированных кДНК PFKFB-2 из почек диабетических крыс выделено четыре новых альтернативных сплайс-варианта мРНК PFKFB-2, которые имеют различные вставки и делеции в 6-фосфофрукто-2-киназной и в фруктозо-2,6-бисфосфатазной частях моле-

EXPRESSION OF 6-PHOSPHOFRUCTO- 2-KINASE/FRUCTOSE-2,6- BISPHOSPHATASE-2 PFKFB-2 mRNA AND ITS ALTERNATIVE SPLICE VARIANTS IN RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

N. M. Lypova¹, D. O. Minchenko¹,
O. O. Ratushna¹, I. V. Bozhko¹,
K. Tsuchihara², H. Esumi²,
O. H. Minchenko^{1,2}

¹Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Science of Ukraine, Kyiv;

²Research Center for Innovative Oncology, National
Cancer Center East Hospital, Kashiwa, Japan;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Summary

We studied the expression mRNA of 6-phosphofrufructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-2 (PFKFB-2) in the rat lung and kidney in experimental diabetes mellitus. For investigation we select two isoforms of PFKFB-2 with different C-terminus. The level of the expression of both PFKFB-2 mRNA isoforms is decreased in the kidney and lung in rats with experimental diabetes mellitus respect to the control animals. Moreover, four new alternative splice variants of PFKFB-2 mRNA were identified in the rat kidney. These splice variants of PFKFB-2 mRNA have different inserts and/or deletions in 6-phosphofrufructo-2-ki-

nase as well as in fructose-2,6-bisphosphatase part of PFKFB-2. Three alternative splice variants cannot encode active 6-phosphofructo-2-kinase as a result of deletion of two catalytic domains (E and F). They encode fructose-2,6-bisphosphatase. It was shown that these alternative splice variants express in the kidney and lung and that this expression changes in rats with experimental diabetes mellitus with respect to the control animals. The results of this investigation clearly demonstrated that diabetes mellitus significantly affects the expression and alternative splicing of PFKFB-2 in the kidney and lungs and showed the complexity of regulatory mechanisms of glucose metabolism in this disease.

Key words: PFKFB-2, mRNA, alternative splicing, diabetes mellitus, lung, kidney, rats.

1. Rider M. H., Bertrand L., Vertommen D. et al. // *Biochem. J.* – 2004. – **381**, Pt. 3. – P. 561–579.
2. Bando H., Atsumi T., Nishio T. et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – **11**, N 16. – P. 5784–5792.
3. Chesney J. // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2006. – **9**, N 5. – P. 535–539.
4. Atsumi T., Nishio T., Metz C. et al. // *Diabetes.* – 2005. – **54**, N 12. – P. 3349–3357.
5. Wu C., Khan S. A., Peng L. J. et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2006. – **291**, N 3. – P. E536–E543.
6. Wu C., Okar D. A., Newgard C. B., Lange A. J. // *Ibid.* – 2002. – **282**, N 1. – P. E38–E45.
7. Denko N. C. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2008. – **8**. – P. 705–713.
8. Smith W. E., Langer S., Wu C. et al. // *Mol. Endocrinol.* – 2007. – **21**, N 6. – P. 1478–1487.
9. Okar D. A., Manzano A., Navarro-Sabate A. et al. // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – **26**, N 1. – P. 30–35.
10. Okar D. A., Lange A. J. // *Biofactors.* – 1999. – **10**, N 1. – P. 1–14.
11. Kawaguchi T., Veech R. L., Uyeda K. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, N 30. – P. 28554–28561.
12. Wu C., Khan S. A., Peng L.-J., Lange A. J. // *Adv. Enzyme Regul.* – 2006. – **46**. – P. 72–88.
13. Minchenko O., Opentanova I., Caro J. // *FEBS Lett.* – 2003. – **554**, N 3. – P. 264–270.
14. Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 8. – P. 6183–6187.
15. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O. et al. // *FEBS Lett.* – 2004. – **576**, N 1. – P. 14–20.
16. Kessler R., Eschrich K. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2001. – **87**, N 2. – P. 190–195.
17. Watanabe F., Furuya E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **282**, N 3. – P. 803–810.
18. Watanabe F., Sakai A., Furuya E. // *J. Neurochem.* – 1997. – **69**, N 1. – P. 1–9.
19. Watanabe F., Furuya E. // *FEBS Lett.* – 1999. – **458**, N 1. – P. 304–308.
20. Minchenko D. O., Tsuchihara K., Komisarenko S. V. et al. // *Sci. Bull. Nation. Bohomoletz Med. Univer.* – 2008. – № 1. – P. 22–31.
21. Minchenko D. O., Mykhalchenko V. G., Tsuchihara K. et al. // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – **80**, № 4. – С. 66–73.
22. Мінченко Д. О., Ковтун О. О., Мінченко О. Г., Биць Ю. В. // *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця.* – 2006. – № 4. – С. 72–78.
23. Lu H., Forbes R. A., Verma A. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 26. – P. 23111–23115.
24. Donti R., Ye G., Wu C., Lange A. J. // *Ibid.* – 2004. – **279**, N 46. – P. 48085–48090.
25. Wenger R. H. // *FASEB J.* – 2002. – **16**, N 10. – P. 1151–1162.
26. Clem B., Telang S., Clem A. et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – **7**, N 1. – P. 110–120.
27. Бобарикіна А. Ю., Мінченко Д. О., Опентанова І. Л. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 2. – С. 49–59.
28. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I. L. et al. // *Biochimie.* – 2005. – **87**, N 11. – P. 1005–1010.
29. Minchenko O. H., Ogura T., Opentanova I. L. et al. // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 6. – С. 46–50.
30. Bobarykina A. Y., Minchenko D. O., Opentanova I. L. et al. // *Acta Biochim. Pol.* – 2006. – **53**, N 4. – P. 789–799.
31. Kessler R., Bleichert F., Warnke J. P., Eschrich K. // *J. Neurooncol.* – 2008. – **86**, N 3. – P. 257–264.
32. Miralpeix M., Carballo E., Bartrons R. et al. // *Diabetologia.* – 1992. – **35**, N 3. – P. 243–248.
33. Inoue H., Kaku K., Matsutani A. et al. // *Endocr. J.* – 1994. – **41**, N 1. P. – 75–82.
34. Mykhalchenko V. G., Tsuchihara K., Minchenko D. O. et al. // *Biopolymers & Cell.* – 2008. – **24**, N 3. – P. 260–266.
35. Arden C., Hampson L. J., Huang G. C. et al. // *Biochem J.* – 2008. – **411**, N 1. – P. 41–51.
36. Duran J., Navarro-Sabate A., Pujol A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – **365**, N 2. – P. 291–297.

37. Wu C., Okar D. A., Newgard C. B., Lange A. J. // *J. Clin. Invest.* – 2001. – **107**, N 1. – P. 91–98.
38. Wu C., Okar D. A., Kang J., Lange A. J. // *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* – 2005. – **5**, N 1. – P. 51–59.
39. Riera L., Manzano A., Navarro-Sabaté A. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – **1589**, N 2. – P. 89–92.
40. Massa L., Baltrusch S., Okar D. A. et al. // *Diabetes.* – 2004. – **53**, N 4. – P. 1020–1029.
41. Wu C., Okar D. A., Stoeckman A. K. et al. // *Endocrinology.* – 2004. – **145**. – P. 650–658.
42. Payne V. A., Arden A., Wu C. et al. // *Diabetes.* – 2005. – **54**. – P. 1949 – 1957.
43. Donti R., Ye G., Wu C., Lange A. J. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 46. – P. 48085–48090.
44. Minchenko A. G., Stevens M. J., White L. et al. // *FASEB J.* – 2003. – **17**. – P. 1514–1516.
45. Obrosova I. G., Minchenko A. G., Frank R. N. et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2004. – **14**, N 1. – P. 55–64.
46. Minchenko A., Bauer T., Salceda S., Caro J. // *Lab. Invest.* – 1994. – **71**, N 3. – P. 374–379.
47. Minchenko A. G., Caro J. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2000. – **208**. – P. 53–62.
48. Minchenko A. G., Armstead V. E., Opentanova I. L., Lefter A. M. // *Endothelium.* – 1999. – **6**. – P. 303–314.

Отримано 08.12.2009