



УДК 577.112.7:616

## УНІКАЛЬНІ АЛЬТЕРНАТИВНІ СПЛАЙС-ВАРІАНТИ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-2 МИШІ ТА ЛЮДИНИ

*Д. О. Мінченко, І. В. Божко,  
Н. М. Липова, В. Г. Михальченко, О. Г. Мінченко*

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна  
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза є одним із ключових ензимів регуляції метаболізму глюкози, оскільки цей біфункціональний ензим контролює не лише гліколіз і глюконеогенез, а й значною мірою метаболізм глюкози, зокрема її фосфорилування. 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-2 (PFKFB-2) відіграє важливу роль у регуляції гліколізу не лише у міокарді, а і в деяких інших органах (нирці, головному мозку та легені). У результаті проведених досліджень у клітинах гліоми людей і в різних органах миші виявлено ряд нових унікальних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, що утворюються в результаті делецій або/і вставок як у каталітичних ділянках 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази, так і в С-кінцевій регуляторній зоні. Альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 із клітин гліоми та миші містили різної довжини вставки після 2-го екзону, але сплайс-варіант миші мав ще делецію у 6-фосфофрукто-2-кіназній ділянці та вставку на С-кінці. Інші сплайс-варіанти миші мали делеції у 6-фосфофрукто-2-кіназній або фруктозо-2,6-бісфосфатазній ділянках, а один із сплайс-варіантів мав делецію всіх каталітичних доменів. Отримані результати свідчать про важливу роль альтернативного сплайсингу в регуляції гліколізу шляхом утворення різних монофункціональних ізоформ ензиму.

**Ключові слова:** PFKFB-2, мРНК, альтернативні сплайс-варіанти, клітини гліоми людини, головний мозок, миша.

### ВСТУП

Біфункціональний ензим 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (PFKFB) [6-фосфофрукто-2-кіназа (EC 2.7.1.105); фруктозо-2,6-бісфосфатаза (EC 3.1.3.46)] – це родина надзвичайно важливих, ключових ізоензимів. PFKFB контролюють інтенсивність метаболізму глюкози, зокрема гліколізу, як у нормальних умовах, так і при різних патофізіологічних станах організму, шляхом синтезу та розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату, алостеричного активатора фосфофруктокінази-1 та інгібітора фруктозо-1,6-бісфосфатази [1–7]. Можна припустити, що поєднання двох

ферментативних активностей у структурі однієї молекули біфункціонального ензиму сприяє більш оперативній регуляції рівня фруктозо-2,6-бісфосфату у клітинах та обумовлено надзвичайною його важливістю в регуляції гліколізу й деяких інших процесів метаболізму глюкози. Відомо, що зниження рівня фруктозо-2,6-бісфосфату в клітинах призводить до пригнічення гліколізу й активації глюконеогенезу [2, 8, 9].

Численними дослідженнями встановлено, що при гіпоксії та у злоякісних пухлинах спостерігається виражена активація гліколізу, причому посилюється активність і експресія майже всіх ензимів гліколізу, але головним чином це стосується ключових ензимів цього шляху метаболізму глюкози і, насамперед, це пов'язано з активацією 6-фосфофрукто-1-кінази (фосфофруктокінази-1) [3–5]. Відомо, що регуляція активності фосфофруктокінази-1 є багатогранною і має тканино-специфічний характер, але найважливішим регулятором її активності є фруктозо-2,6-бісфосфат, рівень якого контролюється PFKFB [1, 2, 5]. Посилена експресія PFKFB та її активація в умовах гіпоксії і у злоякісних пухлинах приводить до збільшення рівня фруктозо-2,6-бісфосфату й активації гліколітичного розщеплення глюкози, а пригнічення активності PFKFB низькомолекулярним інгібітором, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propan-1-one (ЗПО) суттєво пригнічує гліколіз, а також має цитостатичну дію на трансформовані клітини [4, 7, 10–13]. Крім того, було чітко продемонстровано, що цей низькомолекулярний інгібітор здатний пригнічувати активність і рекомбінантною PFKFB, знижувати транспорт глюкози та зменшувати внутрішньоклітинну концентрацію фруктозо-2,6-бісфосфату, лактату, ATP, NAD<sup>+</sup> та NADH, а також проявляти суттєвий вплив на проліферацію кількох ліній клітин аденокарциноми та гематопоетичних клітин людини [7].

Відомо, що синтез ізоензимів PFKFB кодують чотири незалежних гени, які локалізуються в різних хромосомах. Детальне вивчення експресії генів PFKFB показало, що у різних тканинах і лініях трансформованих клітин виявляється експресія всіх чотирьох або кількох ізоензимів PFKFB, але величина їхньої експресії має тканино-специфічний характер [10, 11, 14–17]. Один із генів кодує синтез ізоензиму 2-го типу, PFKFB-2, який був виявлений спочатку в серці, але потім і в ряді інших органів [4, 5, 11].

PFKFB-2 – це ключовий фермент регуляції гліколізу в міокарді, але не менш важливу роль він відіграє у головному мозку, легені та нирці. Показано, що у серці миші концентрація фруктозо-2,6-бісфосфату підвищується при посиленій фізичній роботі та після стимуляції адреналіном або інсуліном через активацію кіназної активності PFKFB-2 внаслідок фосфорилування специфічною протеїнкіназою трьох консервативних положень у карбоксильному домені – серину-466, треоніну-475 і серину-483 [18, 19]. Було також встановлено, що посилена експресія у серці ізоформи 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2, дефіцитної за 6-фосфофрукто-2-кіназою, приводить до гіпертрофії міокарда, порушує функцію міоцитів і зменшує чутливість клітин до дії інсуліну [20].

Для мРНК різних PFKFB відомо по кілька альтернативних сплайс-варіантів із різною довжиною N- чи C-кінця, а також із різними вставками або делеціями у каталітичних ділянках як 6-фосфофрукто-2-кінази, так і фруктозо-2,6-бісфосфатази, що приводить до елімінації частини каталітичних доменів, хоча альтернативний сплайсинг саме PFKFB-2 вивчений ще недостатньо [21–24].

У зв'язку з цим дана робота була спрямована на виявлення та вивчення унікальних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 у головному мозку миші

у клітинах гліоми людини з метою з'ясувати можливий вклад альтернативного сплайсингу PFKFB-2 у регуляцію гліколізу.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Тварини.** Миші-самці лінії C57BL/6 з масою тіла 20–25 г (10–12 тижнів) були отримані з лабораторії Джексона (The Jackson Laboratory; США). Дослідження на тваринах проводили у відповідності до протоколів Національних Інститутів Здоров'я (НИН, США) для використання експериментальних тварин, затверджених Комітетом використання тварин Університету імені Томаса Джефферсона. Головний мозок, легені та нирки заморожували у рідкому азоті й використовували для виділення РНК. Клітини гліоми людини лінії U87 були отримані від професора Michel Moenner, INSERM U920 Лабораторія молекулярних механізмів ангиогенезу, Університет Бордо 1, Франція, і рослили їх, як описано [25].

**Виділення РНК.** РНК із заморожених органів миші виділяли за допомогою методу, заснованого на руйнуванні тканин гуанідин ізотіоціанатом з подальшою екстракцією фенолом і хлороформом, як описано раніше [11]. РНК осаджували ізопропанолом, промивали 75% етанолом і розчиняли у воді, звільненій від рибонуклеаз.

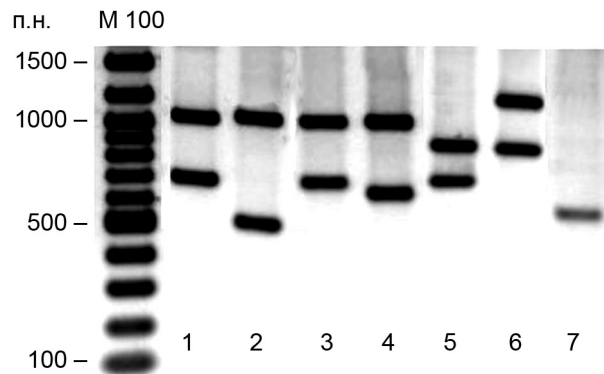
**Синтез кДНК PFKFB-2.** РНК із різних органів миші та гліомних клітин людини (лінія U87) використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК) за допомогою оліго(dT) праймера та зворотної транскриптази („SuperScript II Reverse Transcriptase Kit”; „Invitrogen”, США) згідно з протоколом виробника. Для зворотної транскрипції брали 0,4 мкг тотальної РНК. Для ампліфікації кДНК PFKFB-2 брали 1 мкл продукту реакції зворотної транскрипції, що відповідало 20 нанограмм тотальної РНК, взятої у реакцію) і HotStarTaq Master Mix Kit („QIAGEN”, Німеччина). Ампліфікацію кДНК проводили в апараті „MasterCycler Personal” („Eppendorf”, Німеччина), використовуючи для кДНК миші один прямий 5'-TGCCTCCTGAAGAACTACCATG-3' (1) та два зворотних праймери для двох типів мРНК PFKFB-2: 3'-CTGACTGCATCCTTAGCTG-5' (2) і 3'-CAAGATGGCAAGTTGGGTC -5' (3). Ці олігонуклеотиди відповідають нуклеотидним послідовностям 96–117 (1), 2897–2915 (2) та 1841–1859 (3) опублікованої кДНК PFKFB-2 миші (GenBank номер NM\_008825). Для ампліфікації кДНК людини, використовуючи один прямий 5'-GACATCTGAAGAGCTGCCATG-3' (4) і один зворотний праймер 3'-CAGCATCCGGTGGTGTAAAC-5' (5). Ці олігонуклеотиди відповідають нуклеотидним послідовностям 92–112 (4) та 1641–1661 (5) опублікованої кДНК PFKFB-2 людини (GenBank номер NM\_006212). Праймери були отримані від компанії “Sigma” (США).

**Клонування та секвенування кДНК PFKFB-2.** Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом в 1% агарозному гелі, забарвлюючи ДНК бромистим етидієм. Отримані продукти ампліфікації були клоновані у векторі pCRII-TOPO (Invitrogen, США). Клоновані ДНК розщеплювали рестрикційним ензимом EcoRI і отримані продукти аналізували електрофорезом в 1% агарозному гелі, а фрагменти кДНК PFKFB-2 були секвенувані для визначення нуклеотидної послідовності сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2. Ензиматичну реакцію зростання ланцюга для секвенування ДНК проводили за допомогою спеціального набору (Dye terminator cycle sequencing kit; Applied Biosystems Inc., США) та ДНК-термоциклера згідно з рекомендаціями виробника. Продукти реакції секвенування аналізували автоматично в ДНК-секвенаторі (Applied Biosystems Inc.). Аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей проводили у програмі „GENETYX”.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Комплементарні ДНК PFKFB-2, синтезовані зворотною транскриптазою на матриці РНК із різних органів миші, були ампліфіковані за допомогою одного прямого (1) та двох зворотних праймерів (2 або 3), що охоплювали район, починаючи з кінця першого до першої третини 15-го або початку 16-го екзонів і клоновані у векторі pCRII-TOPO. Комплементарні ДНК PFKFB-2, синтезовані зворотною транскриптазою на матриці РНК із клітин гліоми лінії U87, були ампліфіковані за допомогою прямого (4) та зворотного праймерів (5), що охоплювали район, починаючи з кінця першого і майже до середини 15-го екзону й також клоновані у векторі pCRII-TOPO.

Оскільки клоновані комплементарні ДНК PFKFB-2 були фланковані сайтами рестрикції EcoRI, то очищені ДНК отриманих клонів були розщеплені рестрикційним ензимом EcoRI і проаналізовані за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Як видно із даних, представлених на рис. 1, клоновані комплементарні ДНК PFKFB-2 миші мали додатковий сайт рестрикції EcoRI у своїй послідовності, у зв'язку з чим в агарозному гелі було виявлено переважно по дві смужки, але електрофоретична рухливість більшості з них була різною, що вказувало на можливу наявність нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2. Серед клонованих комплементарних ДНК PFKFB-2 із клітин гліоми людини було виявлено лише один варіант, що відрізнявся від основного за довжиною (дані не представлені).

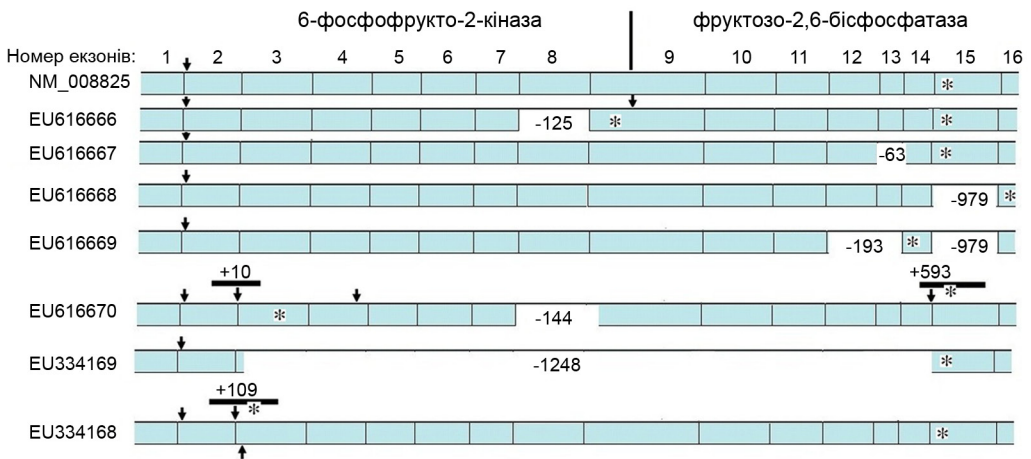


**Рис. 1.** Електрофореграма фрагментів проклованих комплементарних ДНК PFKFB-2 із головного мозку миші, що були ампліфіковані за допомогою праймерів 1 та 3 і містили 15-й екзон (доріжки 3–7) та тих, що були синтезовані за допомогою праймерів 1 та 2 і мали делецію 15-го екзона (доріжки 1 та 2). Зліва представлена електрофореграма фрагментів маркера молекулярної маси M100, а цифрами позначено розмір деяких із них у парах нуклеотидних залишків (п.н.)

**Fig. 1.** Electrophoregram of cloned mouse brain PFKFB-2 complementary DNAs, which contain exon 15<sup>th</sup> and were amplified using primers 1 and 3 (lines 3–7), as well as complementary DNAs, without exon 15<sup>th</sup> which were amplified using primers 1 and 2 (lines 1 and 2). Electrophoregram of molecular weight M100 marker and size of some bands in base pairs (bp) are shown on the left side

Для ідентифікації виявлених варіантів комплементарних ДНК PFKFB-2 миші у препаратах РНК із головного мозку миші та комплементарних ДНК PFKFB-2 людини із клітин гліоми лінії U87 було проведено їхнє секвенування. Аналіз отриманих послідовностей показав, що виявлені варіанти комплементарних ДНК PFKFB-2 миші та людини є альтернативними сплайс-варіантами мРНК даного гена.

Більшість альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, виявлених нами у головному мозку миші, були виділені також із нирки і легені. Ці альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 миші можна розділити на два класи: перший клас, що був синтезований за допомогою праймерів 1 і 3 і містив 15-й екзон, та другий клас, що був синтезований за допомогою праймерів 1 та 2 і мав делецію 15-го ексона. Схематичне зображення нових альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші та людини представлено на рис. 2, із якого видно, що ці сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 різняться між собою як за кількістю і розміром, так і за положенням вставок і делецій у молекулі мРНК PFKFB-2, причому вони були виявлені не лише у регуляторних ділянках з N- та С-кінця, а й також у 6-фосфофрукто-2-кіназній та у фруктозо-2,6-бісфосфатазній частині даної мРНК.



**Рис. 2.** Схематичне зображення структури альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші та людини. Зліва показані номери GenBank основного варіанта мРНК PFKFB-2 миші (NM\_008825) і різних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші й людини. Стрілочками показані місця ініціації трансляції, а зірочками – місця термінації трансляції, причому у двох випадках вони перебувають у послідовності вставок. Цифрами зі знаком (+) позначені вставки, а зі знаком (-) – делеції та їх розмір у кількості нуклеотидних залишків

**Fig. 2.** Schematic representation of alternative splice variants of mouse and human PFKFB-2 mRNA. GenBank numbers of mouse PFKFB-2 main variant (NM\_008825) and different alternative splice variants of mouse and human PFKFB-2 mRNA are shown on the left side. The translation initiation sites are marked by arrows. The translation termination sites are marked by asterisk, and in two cases it is located in inserts at that. Inserts and its size in base pairs are marked as numbers with (+), deletions and its size – as numbers with (-)

Як видно із даних, представлених на рис. 2 і 3, один із альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші (GenBank номер EU61666) порівняно з основною ізоформою мРНК PFKFB-2 (GenBank номер NM\_008825) має делецію восьмого ексона, розміром 125 нуклеотидних залишків, який кодує синтез каталітичних доменів (E та F) 6-фосфофрукто-2-кінази. Делеція восьмого ексона призводить до зміни рамки читування і до передчасної появи стоп-кодону при трансляції даного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2. У зв'язку з цим даний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2, ймовірно, кодує синтез двох поліпептидів: неактивної 6-фосфофрукто-2-кінази, оскільки вона не має двох каталітичних доменів (E і F), і повнорозмірної фруктозо-2,6-бісфосфатази.

Аналогічний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 був виявлений у нирці та легені щура [24]. Більше того, з цих органів щура було виділено ще два сплайс-варіанти з делецією восьмого екзону, але вони мали ще одну або дві вставки [24].

Альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 людини, виявлений у клітинах гліоми лінії U87 (GenBank номер EU334168), має вставку після 2-го екзона, розміром 109 нуклеотидних залишків, що призводить до створення стоп-кодону в нуклеотидній послідовності вставки (рис. 2 та 4). У зв'язку з цим даний сплайс-варіант має послідовність для синтезу вкороченого з N-кінця ізоензиму, що має всі каталітичні домени як для 6-фосфофрукто-2-кінази, так і для фруктозо-2,6-бісфосфатази. Поряд із тим, передбачуваний білковий продукт даної ізоформи PFKFB-2 людини може бути лише монофункціональним з активністю фруктозо-2,6-бісфосфатази, оскільки для прояву 6-фосфофрукто-2-кіназної активності є необхідним утворення гомодимеру через N-кінцеву послідовність [5]. Подібні альтернативні сплайс-варіанти утворюються і з пре-мРНК PFKFB-4, що було продемонстровано на клітинах меланоми людини лінії DB-1 та на різних тканинах миші, але величина вставок була різною [5, 15, 21]. Більше того, було показано, що експресія цього альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-4 у клітинах меланоми була більшою за експресію основного варіанта PFKFB-4 [15].

Ще один із альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші (GenBank номер EU616670) має також делецію восьмого екзона, але вона поєднана з делецією 19 нуклеотидних залишків дев'ятого екзона, в результаті чого рамка зчитування

```

      10      20      30      40      50 A      60      70
NM_008825 MSENSTFSPEDCNSSYKPHASNLRRAGKTCSWASYMTNSPTLIVMIGLPARGKTYVSKKLTRYLNWIGVP
EU616666 *****
EU334169 *****
EU616670 *****CEFCMGFLYDQLPNTHCYDWLASPG

      B 80      90      100      C 110      120      130      D 140
NM_008825 TKVFNLGVYRREAVKSYQSYDFFRHDNEEAMKIRKQCALVALEDVKAYFTEESGQIAVFDATNTTRERRD
EU616666 *****
EU616670 *****M*****

      150      160      170      E 180      190      F 200      210
NM_008825 MILNFAKQNAFKVFFVESVCDDPDVIAANILEVKVSSPDYPERNRENVMEDFLKRIECYKVTYQPLDPDN
EU616666 *****
EU616670 *****

      220      230      240
NM_008825 YDKDLSFIKVINVGQRFLVNRVQDYIQSKIVYYL
EU616666 ---GSFFHKGDKCRPEIPGQQSSGLHPE
EU616670 -----VINVGQRFLVNRVQDYIQS*****

```

**Рис. 3.** Амінокислотна послідовність 6-фосфофрукто-2-кіназної частини основної ізоформи (NM\_008825) та різних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші. Зліва показані номери GenBank як основного варіанта, так і різних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші. Каталітичні домени 6-фосфофрукто-2-кінази підкреслені та позначені латинськими літерами від A до F, зірочками – ідентичні до основної ізоформи амінокислотні залишки, а знаком (-) – відсутність амінокислотних залишків унаслідок делецій

**Fig. 3.** Amino acid sequences of 6-phosphofructo-2-kinase part of mouse PFKFB-2 main variant (NM\_008825) and different alternative splice variants. GenBank numbers of mouse PFKFB-2 main variant and different alternative splice variants of mouse PFKFB-2 mRNA are shown on the left side. The catalytic domains of 6-phosphofructo-2-kinase are underlined and marked by Latin letters from A to F, amino acid residues which are identical to main isoform are marked by asterisk (\*) and by (-) – absence of amino acid residues as a result of deletions

NM_006212	MSGASSEQNNSYETKTPNLRMSEKCC-----
EU334168	MSGASSEQNNSYETKTPNLRMSEKCCYEVCCLRPGWSAVTGSWLTATLNS*
	A
NM_006212	SWASYMTNSPTLI VMI <u>GLPARGKTY</u> VSKKLTRYLNWIGVPTKVFNLGVYRRE . . .
EU334168	-----MTNSPTLI VMI <u>GLPARGKTY</u> VSKKLTRYLNWIGVPTKVFNLGVYRRE . . .

**Рис. 4.** Амінокислотна послідовність N-кінцевої частини 6-фосфофрукто-2-кінази основної ізоформи (NM\_006212) та альтернативного сплайс-варіанта (EU334168) мРНК PFKFB-2 людини із клітин гліоми. Каталітичний домен A 6-фосфофрукто-2-кінази підкреслений. Оскільки альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 має вставку, що кодує N-кінцевий поліпептид, то, відповідно, відсутність амінокислотних залишків в основному варіанті позначена знаком (-)

**Fig. 4.** Amino acid sequences of 6-phosphofructo-2-kinase part of mouse PFKFB-2 main variant (NM\_008825) and different alternative splice variants. GenBank numbers of mouse PFKFB-2 main variant and different alternative splice variants of mouse PFKFB-2 mRNA are shown on the left side. The catalytic domains of 6-phosphofructo-2-kinase are underlined and marked by Latin letters from A to F, amino acid residues which are identical to main isoform are marked by asterisk (\*) and by (-) – absence of amino acid residues as a result of deletions

не змінюється, як при делеції лише восьмого екзона (рис. 2 і 3). Але цей сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 має ще дві вставки, одна із яких представлена десятьма нуклеотидними залишками і міститься після другого екзона, вона змінює рамку зчитування і генерує стоп-кодон (рис. 3). Друга вставка у структурі даного сплайс-варіанта є досить великою (593 нуклеотидних залишки), являє собою 14-й інтрон, який і кодує синтез С-кінця, але його амінокислотна послідовність повністю відрізняється від послідовності амінокислотних залишків у основному варіанті PFKFB-2 та є коротшою на чотири нуклеотидних залишки. Таким чином, даний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 може кодувати синтез ізоензиму без N-кінцевої частини та двох каталітичних доменів (E та F) 6-фосфофрукто-2-кінази зі зміненим С-кінцем, у зв'язку з чим передбачуваний ізоензим може проявляти лише фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність, але механізми регуляції його активності мають бути зовсім іншими, оскільки послідовність регуляторного С-кінця є зміненою [4, 18, 19].

Серед ідентифікованих нами альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші один виявився надзвичайно коротким (GenBank номер EU334169), оскільки в ньому були присутні послідовності лише 1-го, 2-го, короткого фрагменту 3-го, а також 15-го та 16-го екзонів (рис. 2). Таким чином, цей альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 має послідовність для синтезу поліпептиду без жодного каталітичного домену як 6-фосфофрукто-2-кінази (рис. 3), так і фруктозо-2,6-бісфосфатази (рис. 5).

Як видно із даних, представлених на рис. 2 та 5, альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 (GenBank номер EU616667) має делецію 13-го екзона розміром 63 нуклеотидних залишки, що не змінює рамку зчитування, у зв'язку з чим ізоформа PFKFB-2, яка кодується даним сплайс-варіантом, має всі каталітичні домени, але вкорочений на 21 амінокислотний залишок С-кінець, що може змінювати конформацію ізоензиму і механізми регуляції його активності [5].

Два альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 миші, що не мають 15-го екзона (GenBank номери EU616668 та EU616669), можна віднести до іншого класу (рис. 2 і 5). Вони кодують синтез ізоензимів із вкороченим і зміненим С-кінцем, але один із них (EU616669) має ще делецію 12-го та 13-го екзонів, розміром 193 нуклеотидних залишки, що призводить до втрати каталітичного домену „К” фруктозо-2,6-бісфосфатази та С-кінця через передчасну появу стоп-кодону. У зв'язку з цим

передбачуваний ізоензим альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 миші EU616669 може проявляти лише 6-фосфофрукто-2-кіназну активність. У щура аналогічно до альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 миші без 15-го екзона (EU616668), є ізоформа, яка має 15-й екзон (GenBank номер NM\_001033965) і є основою у цих тварин, але 15-й екзон миші відповідає 16-му щурів і, навпаки, 16-й екзон миші відповідає 15-му екзону PFKFB-2 щура. Ця ізоформа мРНК PFKFB-2 щура має два альтернативних сплайс-варіанти з вкороченою регуляторною ділянкою С-кінця, але вони принципово відрізняються від виявленого нами сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 миші, що не має 15-го, 12-го та 13-го екзонів (EU616669) [5].

```

      250      260      270      280      290      300      310
NM_008825 MNIHVHPTIYLCRHGESEFNLLGKIGGDSGLSVRGKQFAHALKFFLEEQEIQDLKVWTSQLKRTIQTAE
EU616667 *****
EU616668 *****
EU616670 *****
EU616669 *****

      320      330      340      350      360      370      380
NM_008825 SLGVTYEQWKILNEIDAGVCEEMTYSEIEQRYPEEFALRDQEKYLYRYPGGESYQDLVQRLEPVMELER
EU616667 *****
EU616668 *****
EU616670 *****
EU616669 *****-----

      390      400      410      420      430      440      450
NM_008825 QGNILVISHQAVMRCLLAYFLDKGADELPYLRCPLHIIFKLTVPVAYGCKVETITLNVDVADVTHRDKPTHN
EU616667 *****-----
EU616668 *****DELPYLRCPLHIIFKLTVPVAY*****EV
EU616670 *****-----
EU616669 -----VAKWKQLL-----
EU334169 -----

      460      470      480      490      500      510      518
NM_008825 FPKSTQTPVRRRNSFTPLSSSNTIRRPKNYSVGSRPLKPLSPLRALDMQEGADQPKTQVSIFPV
EU616667 *****
EU616668 ENLLAEHRHPSMASLTLSS
EU616670 VFYSSRILESLSRGLGFCVPKTNPEFMSMSLYFOEAKMKPFLVLLSEYFFRNLSLES
EU334169 FPKSTQTPVRRRNSFTPLSSSNTIRRPKNYSVGSRPLKPLSPLRALDMQEGADQPKTQVS****

```

**Рис. 5.** Амінокислотна послідовність фруктозо-2,6-бісфосфатазної частини основної ізоформи (NM\_008825) та різних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші. Зліва показані номери GenBank як основного варіанта, так і різних альтернативних сплайс-варіантів даної мРНК. Каталітичні домени фруктозо-2,6-бісфосфатази підкреслені та позначені латинськими літерами від [G] до [K], зірочками – ідентичні до вище розташованої ізоформи PFKFB-2 миші амінокислотні залишки, а знаком (-) – відсутність амінокислотних залишків унаслідок делецій

**Fig. 5.** Amino acid sequences of fructoso-2,6-bisphosphatase part of mouse PFKFB-2 main variant (NM\_008825) and different alternative splice variants of this mRNA are shown on the left side. The catalytic domains of fructoso-2,6-bisphosphatase are underlined and marked by Latin letters from [G] to [K]. Amino acid residues which are identical to upper located mouse PFKFB-2 isoform are marked by asterisk (\*) and by (-) – absence of amino acid residues as a result of deletions

Результати проведених нами досліджень переконливо свідчать про наявність у різних органах миші та в клітинах гліоми лінії U87 альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, у результаті чого утворюються ізоформи ензиму PFKFB-2 з різними регуляторними С-кінцевими послідовностями та різними можливостями



регуляції їхньої активності шляхом фосфорилування [4, 18, 19]. Крім того, деякі альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 можуть кодувати монофункціональні ізоформи даного ензиму з активністю 6-фосфофрукто-2-кінази (EU616666) або фруктозо-2,6-бісфосфатази (EU616669, EU616666, EU616670 та EU334168). Більше того, один із альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 миші зовсім не має каталітичних доменів (EU334169), і його роль, як і роль коротких N-кінцевих поліпептидів і вкороченої внаслідок делеції восьмого екзона 6-фосфофрукто-2-кінази залишається нез'ясованою, хоча можна припустити їхню участь у виключенні 6-фосфофрукто-2-кіназної активності функціональних мономерів PFKFB-2 шляхом утворення зв'язку з їхнім N-кінцем. Відомо, що посилення активності фруктозо-2,6-бісфосфатази призводить до послаблення гліколізу та посилення глюконеогенезу [7, 8, 20]. Можна припустити, що утворення монофункціональних ізоензимів з активністю фруктозо-2,6-бісфосфатази також може приводити до послаблення гліколізу та посилення глюконеогенезу.

Таким чином, у клітинах гліоми людини і в різних органах миші виявлено ряд нових унікальних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, що утворюються в результаті делецій або/і вставок як у каталітичних ділянках 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази, так і в C-кінцевій регуляторній зоні. Функціональна роль як N-кінцевих поліпептидів PFKFB-2 та вкорочених ізоформ фруктозо-2,6-бісфосфатази, так і монофункціональних ізоензимів з активністю фруктозо-2,6-бісфосфатази, що синтезуються альтернативними сплайс-варіантами мРНК PFKFB-2, заслуговують на подальше вивчення в плані розробки можливих підходів до регуляції гліколізу і, зокрема, пригнічення гліколізу, що важливо для створення антипухлинних препаратів.

1. Okar D. A., Lange A. J. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. **Biofactors**, 1999; 10 (1): 1–14.
2. Wu C., Khan S.A., Peng L.-J., Lange A. J. Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes. **Edvans Enzyme Regulation**, 2006; 46: 72–82.
3. 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 Biochemical Sciences**, 2001; 26 (1): 30–35.
4. Rider M. H., Bertrand L., Vertommen D. et al. 6-phosphofrufructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. **Biochemical Journal**, 2004; 381(Pt. 3): 561–579.
5. Мінченко Д.О., Бобарикіна А.Ю., Кундієва А.В. та ін. Структурна організація, експресія та регуляція експресії генів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази. **Біологічні студії/Studia Biologica**, 2009; 3(3): 123–140.
6. Bensaad K., Tsuruta A., Selak M.A. et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell**, 2006; 126: 107–120.
7. Clem B., Telang S., Clem A. et al. Small-molecule inhibition of 6-phosphofrufructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. **Molecular Cancer Therapy**, 2008; 7(1): 110–120.
8. Calvo M. N., Bartrons R., Castaño E. et al. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independence growth in HeLa cells. **FEBS Letters**, 2006; 580 (13): 3308–3314.
9. Atsumi T., Nishio T., Niwa H. et al. Expression of inducible 6-phosphofrufructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. **Diabetes**, 2005; 54(12): 3349–3357.

10. 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. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277(8): 6183–6187.
11. 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 Letters**, 2003; 554(3): 264–270.
12. Marsin A.-S., Douzin C., Bertrand L., Hue L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277 (40): 30778–30783.
13. 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 Research**, 2002; 62(20): 5881–5887.
14. 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 Letters**, 2004; 576(1): 14–20.
15. Minchenko O.H., Ogura T., Opentanova I.L. et al. Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2005; 280(1–2): 227–234.
16. Bobarykina A. Y., Minchenko D. O., Opentanova I. L. et al. Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. **Acta Biochimica Polonica**, 2006; 53 (4): 789–799.
17. 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). **European Journal Biochemistry**, 1998; 254 (1): 103–110.
18. Marsin A., Bertrand L., Rider M. H., Deprez J. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has role in the stimulation of glycolysis during ischemia. **Currant Biology**, 2000; 10: 1247–1255.
19. Hue L., Beauloye C., Bertrand L. et al. New targets of AMP-activated kinase. **Biochemical Society Transactions**, 2003; 31 (1): 213–215.
20. Donti R., Ye G., Wu C., Lange A. J. Cardiac expression of kinase-deficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase inhibits glycolysis, promotes hypertrophy, impairs myocyte function and reduces insulin sensitivity. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004; 279 (46): 48085–48090.
21. 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: 72–78.
22. Minchenko D. O., Tsuchihara K., Komisarenko S. V. et al. Unique alternative splice variants of mouse PFKFB-3 mRNA: tissue specific expression. **Scientific Bulletin National O.O. Bohomoletz Medical University**, 2008; N 1: 22–31.
23. Watanabe F., Furuya E. Alternative splicing of novel exons rat heart type fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 2001; 282: 803–810.
24. Липова Н.М., Мінченко Д.О., Ратушна О.О. та ін. Експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 та її альтернативних сплайс-варіантів у щурів з експериментальним цукровим діабетом. **Український біохімічний журнал**, 2010; 82(1): 90–99.
25. Dedieu S., Canron X., Rezvani H.R. et al. The cytoprotective drug amifostine modifies both expression and activity of the pro-angiogenic factor VEGF-A. **BMC Medicine**, 2010; 8: 19.

## UNIQUE ALTERNATIVE SPLICE VARIANTS OF MOUSE AND HUMAN 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE-2 mRNA

**D. O. Minchenko, I. V. Bozhko,  
N. M. Lypova, V. G. Mykhalchenko, O. H. Minchenko**

*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine  
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase is a key regulatory enzyme of glucose metabolism. This bifunctional enzyme controls glycolysis and gluconeogenesis as well as glucose phosphorylation and metabolism. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-2 (PFKFB-2) plays significant role in the glycolysis regulation in the heart as well as in some other organs (kidney, brain and lung). Results of this investigation clearly demonstrated that in the glioma cells as well as in some mouse organs are presented several new unique alternative splice variants of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-2. These PFKFB-2 splice variants are a result of deletions or/and inserts in catalytic regions of 6-phosphofructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase as well as in C-terminal regulatory region. Alternative splice variants of PFKFB-2 from glioma and mouse cells contain different inserts after 2<sup>nd</sup> exon but mouse splice variant has also deletion in 6-phosphofructo-2-kinase region and insert in C-terminus. Another splice variants of mouse PFKFB-2 have deletions in 6-phosphofructo-2-kinase or fructose-2,6-bisphosphatase regions, since one splice variant has deletion of all catalytic domains. In conclusion, this study provides evidences that alternative splicing of PFKFB-2 mRNA possibly has a significant role in glycolysis regulation via creation of monofunctional isoforms of this enzyme.

**Key words:** PFKFB-2, mRNA, alternative splice variants, human glioma cells, brain, mice.

## УНИКАЛЬНЫЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СПЛАЙС-ВАРИАНТЫ мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КИНАЗЫ/ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ-2 МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

**Д. А. Минченко, И. В. Божко,  
В. Г. Михальченко, Н. Н. Лыпова, А. Г. Минченко**

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины  
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина  
e-mail: ominchenko@yahoo.com*

6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза является одним из ключевых ферментов регуляции метаболизма глюкозы, поскольку этот бифункциональный фермент контролирует не только гликолиз и глюконеогенез, но в значительной степени и метаболизм глюкозы, в частности ее фосфорилирование. 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза-2 (PFKFB-2) играет важную роль в регуляции гликолиза не только в миокарде, но и в некоторых других органах (почке, головном мозге и легком). В результате проведенных исследований в клетках глиомы чело-

века и в различных органах мыши выявлены новые уникальные альтернативные сплайс-варианты мРНК PFKFB-2, которые образуются в результате делеций или/и вставок как в каталитических участках 6-фосфофрукто-2-киназы и фруктозо-2,6-бисфосфатазы, так и FB-2 из клеток глиомы и головного мозга мыши содержали различной длины вставки после 2-го экзона, но сплайс-вариант мыши имел еще и делецию в 6-фосфофрукто-2-киназной области и вставку на С-конце. Другие сплайс-варианты мышей имели делеции в 6-фосфофрукто-2-киназной или фруктозо-2,6-бисфосфатазной областях, а один из сплайс-вариантов имел делецию всех каталитических доменов. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли альтернативного сплайсинга в регуляции гликолиза путем образования различных монофункциональных изоформ энзима.

**Ключевые слова:** PFKFB-2, мРНК, альтернативные сплайс-варианты, клетки глиомы человека, головной мозг, мышь.

Одержано: 31.05.2010