



УДК 577.112.7:616

СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ, ЕКСПРЕСІЯ ТА РЕГУЛЯЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ

**Д. О. Мінченко, А. Ю. Бобарикіна, А. В. Кундієва
Н. М. Липова, І. В. Божко, О. О. Ратушна, О. Г. Мінченко**

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

Ключовим ферментом регуляції гліколізу 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (PFKFB) є біфункціональний фермент, представлений багатьма ізоформами, синтез яких кодується чотирма різними генами. Детально проаналізовані дані про структурну організацію цих генів, їхню експресію в нормі, при гіпоксії та у злоякісних пухлинах, про альтернативні сплайс-варіанти різних мРНК PFKFB, а також про молекулярні механізми гормональної регуляції експресії різних ізоформ PFKFB та регуляції їхньої ферментативної активності. Узагальнено результати досліджень стосовно молекулярних механізмів регуляції експресії різних ізоформ PFKFB, опосередкованих індукованим гіпоксією транскрипційним фактором (HIF).

Ключові слова: PFKFB, регуляція експресії, мРНК, альтернативний сплайсинг, HIF.

ВСТУП

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)] належать до родини ключових ферментів, що контролюють інтенсивність гліколізу як за нормальних умов, так і за різних патологічних станів організму, шляхом синтезу та розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату, алостеричного активатора фосфофруктокінази-1 й інгібітора фруктозо-1,6-бісфосфатази [1–4]. Встановлено, що рівень фруктозо-2,6-бісфосфату контролюється, головним чином, біфункціональними ферментами PFKFB, які поєднують у собі функції синтезу фруктозо-2,6-бісфосфату шляхом фосфорилювання фруктозо-6-фосфату у другому положенні та його деградації шляхом дефосфорилювання до фруктозо-6-фосфату [2, 5–8]. Таке поєднання двох ферментативних активностей у структурі однієї молекули біфункціонального ферменту може бути обумовлене надзвичайною важливістю фруктозо-2,6-бісфосфату у регуляції гліколізу та ряді інших процесів метаболізму. Відомо, що розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату призводить до пригнічення гліколізу й активації глюконеогенезу [2, 9–11].

Показано, що при гіпоксії та у злюкисних пухлинах має місце активація гліколізу, причому посилюються активність і експресія майже всіх ензимів гліколізу, але найбільше це стосується ключових ензимів такого шляху метаболізму глюкози і, насамперед, це пов'язано з активацією фосфофруктокінази-1 [3, 4, 6]. Відомо, що регуляція активності фосфофруктокінази-1 є багатогранною і має органоспецифічний характер, але найважливішим регулятором її активності є фруктозо-2,6-бісфосфат [1, 4–6]. Посилена експресія PFKFB та її активація за умов гіпоксії та у злюкисних пухлинах призводить до зростання рівня фруктозо-2,6-бісфосфату й активації гліколітичного розщеплення глюкози, а пригнічення активності PFKFB-3 низькомолекулярним інгібітором, 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propan-1-one (ЗРО), суттєво пригнічує гліколіз, а також має цитостатичну дію на трансформовані клітини [4, 9, 12–15]. Більше того, цей інгібітор пригнічує активність рекомбінантної PFKFB-3, знижує рівень транспорту глюкози та внутрішньоклітинну концентрацію фруктозо-2,6-бісфосфату, лактату, АТФ, NAD⁺ та NADH, а також проявляє виражений ефект на проліферацію клітин [9].

Вивчення молекулярних механізмів чутливості процесів гліколізу й експресії генів *pfkfb* у клітинах до гіпоксії є важливою проблемою біохімії та молекулярної біології, оскільки дає змогу з'ясувати вклад різних ізоензимів PFKFB у регуляцію росту злюкисних пухлин і виявити потенційні підходи до розробки протипухлинних препаратів. Відомо, що гіпоксія істотно змінює характер метаболічних процесів у організмі, значно посилює інтенсивність гліколізу, а це сприяє забезпеченню клітин організму енергією за умов зниженого рівня кисню або недостатнього його використання, а також є важливим фактором росту і прогресії злюкисних пухлин. У даній роботі проаналізовані й узагальнені наявні в літературі дані про гени *pfkfb*, механізми регуляції їх експресії при гіпоксії та у злюкисних пухлинах.

Гени *pfkfb* та їхня експресія. PFKFB – це родина ізоензимів (PFKFB-1, PFKFB-2, PFKFB-3 та PFKFB-4), синтез яких кодують чотири незалежних гени: *pfkfb1*, *pfkfb2*, *pfkfb3* та *pfkfb4*. Ці гени містяться у різних хромосомах і кодують синтез ізоензимів з різними кінетичними та регуляторними властивостями [3, 4, 6]. Схематичне зображення структурної організації основних ізоформ PFKFB представлено на рис. 1. PFKFB-1 був виявлений спочатку у печінці, тому він називається PFKFB печінки. PFKFB-2 був виявлений спершу в серці, тому він має назву серцевого, а PFKFB-3 виявлений майже в усіх органах і отримав назву „всюдисущого” (ubiquitous). PFKFB-4 був виявлений у сім'яниках і називається PFKFB сім'яників [4, 6, 16–18]. Поряд із тим, більш детальне вивчення їхньої експресії показало наявність експресії всіх чотирьох або кількох ізоензимів PFKFB не лише в одних і тих самих органах, а й у клітинах [12, 13, 19–21].

Ген *pfkfb1*. Ген *pfkfb1* є найбільшим із усіх чотирьох генів *pfkfb* і локалізується в геномі людини, щура та миші у Х-хромосомі (Хр11.21 – у людини та Хq22-q31 – у щура) [3, 5, 6]. Він охоплює ділянку розміром близько 60 тисяч пар нуклеотидних залишків (п.н.з.), що включає 17 екзонів, 12 із яких кодують каталітичні ділянки ізоензиму PFKFB-1: шість екзонів (2–7) кодують 6-фосфофрукто-2-кіназу, а інших шість (8–13) – фруктозо-2,6-бісфосфатазу [4, 6]. На рис. 2 представлена тривимірна структура PFKFB, де наочно видно 6-фосфофрукто-2-кіназну та фруктозо-2,6-бісфосфатазну частину мономера даного ензиму. Ген *pfkfb1* спочатку був виявлений у печінці, де спостерігається виражена його експресія. У зв'язку з цим кодований ним ізоензим назвали печінковим, але потім його експресію було виявлено у скелетних

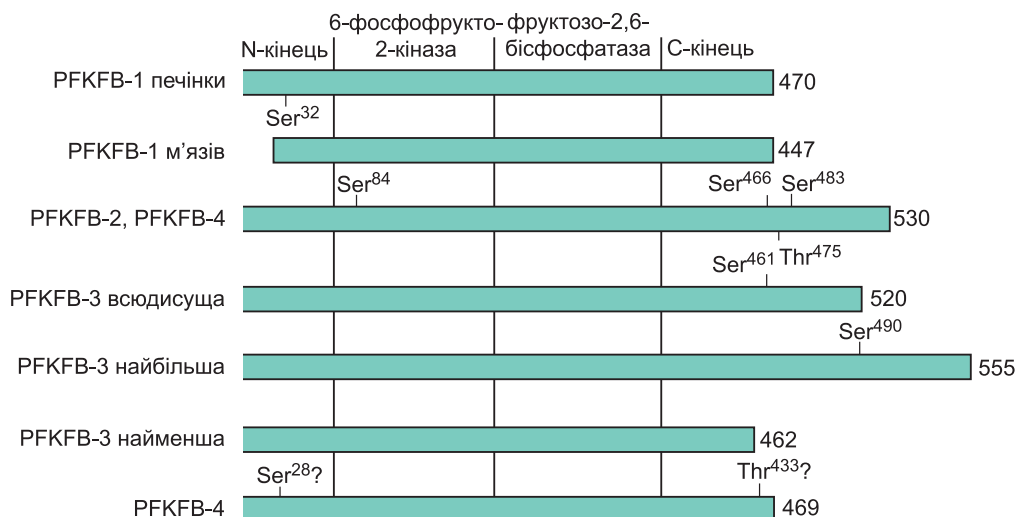


Рис. 1. Схематичне зображення структурної організації різних основних ізоформ 6-фосфофрукто-2-кіназ/фруктозо-2,6-бісфосфатаз: двох варіантів PFKFB-1 (печінки та м'язів), PFKFB-2, трьох варіантів PFKFB-3, в тому числі найбільшого і найменшого альтернативних сплайс-варіантів, а також PFKFB-4. Позначено регуляторні ділянки на N- і С-кінцях та сайти фосфорилювання як ідентифіковані, так і ще не ідентифіковані (для PFKFB-4), але найбільш імовірні за даними комп'ютерного аналізу [16], а також каталітичні ділянки 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази. Справа вказано кількість амінокислотних залишків у різних ізоформах PFKFB

Fig. 1. Schematic representation of structural organization of main PFKFB-3 isoforms: two variants of PFKFB-1 (liver and muscle), PFKFB-2, three variants of PFKFB-3, including largest and smallest alternative splice variants, and also PFKFB-4. The regulatory regions at the N- and C-terminus and phosphorylation sites as well as catalytic regions for 6-phosphofrufructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphatase are shown. The phosphorylation site for PFKFB-4 was not determined yet, but potential site was localized based on the computer search [16]. The number of amino acid residues in different PFKFB isoforms is on the right

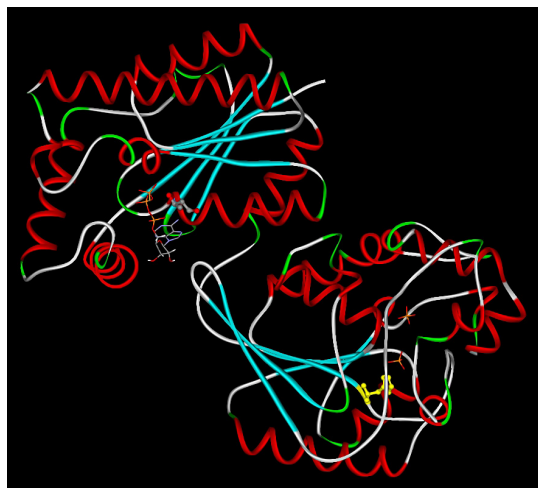


Рис. 2. Тривимірна структура мономеру 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази. Показано місце зв'язування АТФ 6-фосфофрукто-2-кіназою та фруктозо-2,6-бісфосфату фруктозо-2,6-бісфосфатазою. Каталітичні центри 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази формуються β-ланцюгами й оточені α-спіралями

Fig. 2. 3D structure of the 6-phosphofrufructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase monomer. The positions of ATP binding by 6-phosphofrufructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphate by fructose-2,6-bisphosphatase are shown. Catalytic domains of 6-phosphofrufructo-2-kinase and fructose-2,6-bisphosphate are formed by β-sheets surrounded by α-helices

м'язах, міокарді та ряді інших органів [4, 6, 13]. Слід зазначити, що найбільш виражена експресія гена *pfkfb1* має місце саме у скелетному м'язі, тоді як у печінці та міокарді рівень експресії мРНК PFKFB-1 є суттєво меншим [13]. Досить низький рівень експресії мРНК цього ізоензиму було продемонстровано у легенях, нирках і мозку [13].

Дослідження промоторної ділянки і 5'-кінцевої частини гена *pfkfb1* у печінці та скелетних м'язах показало наявність змін у структурі даного гена в цих органах. Встановлено, що ген *pfkfb1* у процесі ембріогенезу перебудовується: у скелетних м'язах він є видозміненим, причому відрізняється від гена клітин печінки тільки по першому екзону [3, 5, 6]. У скелетних м'язах ген *pfkfb1* кодує ізоензим PFKFB-1 м'язового типу, який має вкорочену на 23 амінокислотних залишки і змінену N-кінцеву ділянку порівняно з ізоензимом печінки. Це означає, що дана ізоформа PFKFB не може проявляти 6-фосфофрукто-2-кіназної активності, оскільки не здатна формувати гомодимер [3, 5, 22]. Більше того, перший екзон ізоформи PFKFB-1 скелетних м'язів не містить серин-32, що фосфорилується сАМФ-залежною протеїнкіназою. PFKFB функціонує як гомодимер, який формується через N-кінці, а при вкороченні N-кінця PFKFB не може проявляти 6-фосфофрукто-2-кіназної активності через відсутність можливості формування гомодимера [4, 22]. Встановлено, що фосфорилування N-кінця ізоензиму PFKFB-1 печінки сАМФ-залежною протеїнкіназою веде до інактивації кінази й активації фруктозо-2,6-бісфосфатази [4, 6]. У фіброblastах був виявлений ще один тип промотору, з якого синтезується третій тип мРНК, що відрізняється своїм 5'-кінцем від попередніх, але продуктом трансляції даної мРНК є ізоензим м'язового типу [23].

Крім того, було показано, що промотор гена *pfkfb1* скелетних м'язів містить ТАТА блок, два сайти зв'язування транскрипційного фактора NF-1 та один сайт HNF-6. У проксимальній частині промотора гена PFKFB печінки також знайдено можливі сайти зв'язування транскрипційного фактора NF-1. У проксимальній ділянці промоторної зони гена *pfkfb1* лясця виявлено стерол-регуляторний елемент (SRE), з яким зв'язується SREBP-1 α (протеїн, що зв'язується зі стерол-регуляторним елементом) і активує промотор даного гена [24]. І хоча було виявлено два можливих стерол-регуляторних елементи, функціонально активним виявився елемент, розташований ближче до промотора (-56/-48), оскільки саме цей фрагмент промотора зв'язував SREBP-1 α в експериментах по „гель-шифту” [24]. Більше того, встановлено, що мутація стерол-регуляторного елементу повністю усувала зв'язування SREBP-1 α та трансактивацію транскрипції з промотора гена *pfkfb1*. SREBP-1 належить до родини транскрипційних факторів, задіяних у регуляції метаболізму холестеролу та жирних кислот, і є важливим медіатором дії інсуліну та глюкагону не лише на експресію PFKFB-1 у печінці, а й на експресію глюкокінази та ряду генів ліпогенезу, що вказує на його ключову роль у регуляції метаболізму глюкози і ліпідів у печінці, у контролі гомеостазу глюкози [24, 25].

Недавно при дослідженні експресії PFKFB-1 у сітківці ока щура виявлено нову ізоформу мРНК даного ензиму, яка була подібною до PFKFB-1 печінки, а не скелетних м'язів [26]. Аналіз 5'-кінцевої ділянки мРНК PFKFB-1 зі сітківки щурів показав наявність змін кількох нуклеотидних залишків із заміною одного амінокислотного залишку, порівняно з ізоформою PFKFB-1 печінки, але ця заміна амінокислотного залишку в N-кінцевій регуляторній ділянці PFKFB-1 сітківки є надзвичайно важливою, оскільки в ній у 32-му положенні міститься аланін, а не залишок серину, що є сайтом фосфорилування в ізоформі PFKFB-1 печінки [26]. Подібна ізоформа PFKFB-1 печінки була також створена в лабораторних умовах шляхом введення мутації, а саме

заміною нуклеотидів у комплементарній ДНК PFKFB-1, яка забезпечувала кодування залишку аланіну або аспарагінової кислоти у 32-му положенні замість залишку серину [27]. Генетичні конструкції нативної та мутантної ізоформ PFKFB-1 печінки експресували у бактеріях, виділяли і досліджували їхні кінетичні властивості. Встановлено, що мутантна ізоформа PFKFB-1 печінки, яка містила залишок аланіну замість залишку серину у 32-му положенні, має характеристики нефосфорильованої ізоформи ензиму [27].

Ген *pfkfb2*. Детальні структурні дослідження гена *pfkfb2* показали, що у геномі людини та миші він перебуває у 1-й хромосомі (1q31 – у людини), а в геномі щура – у 13-й хромосомі (13q24–q25). Встановлено також, що послідовність гена *pfkfb2* людини охоплює ділянку розміром 22 485 п.н.з. і він є найменшим із усіх генів *pfkfb*. Даний ген містить 20 екзонів, 12 із яких (з 3-го по 14-й) є кодуєчими для синтезу каталітичних ділянок PFKFB-2, але не має класичного ТАТА елемента [28]. PFKFB-2 людини відрізняється від ізоензимів, кодованих іншими генами *pfkfb*, також тим, що ініціюючий кодон АТГ в її мРНК міститься у другому екзоні.

Встановлено, що 15-й екзон, який кодує синтез С-кінцевої регуляторної ділянки PFKFB-2 і має декілька сайтів фосфорилування для протеїнкіназ, присутній в ізоензимі серця щура, але відсутній у бика [28, 29]. Показано, що ген *pfkfb2* щура кодує 5 варіантів екзона 1, які використовуються для синтезу чотирьох різних типів мРНК PFKFB-2 [30].

Основна ізоформа мРНК PFKFB-2 серця людини складається з 2141 н.з. [28]. Ізоформи PFKFB-2 серця людини, бика та щура мають тотожні каталітичні та зв'язуючі субстрат сайти, а також важливі регуляторні сайти (Ser29, Ser 466, Thr475 та Ser483) [4, 28].

Встановлено, що PFKFB-2 не є винятково серцевим ізоензимом і він посилено експресується не лише в серці, але й у мозку та легені. Інколи його називають нирковим ізоензимом PFKFB, хоча у нирці, печінці, скелетних м'язах і сім'яниках мишей виявляється досить низький рівень експресії мРНК PFKFB-2 [13].

PFKFB-2 є ключовим ензимом регуляції гліколізу в серці. Було показано, що у серці мишей 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 – серин-466, треонін-475 і серин-483 [4, 31–33]. Встановлено, що посилена експресія PFKFB-2, дефіцитної за 6-фосфофрукто-2-кіназою, у серці призводить до гіпертрофії міокарда, порушує функцію міоцитів і зменшує чутливість клітин до дії інсуліну [34].

Ген *pfkfb3*. Ген *pfkfb3* кодує біосинтез „всюдисущого” ізоензиму, експресію якого було виявлено у багатьох органах [13]. Даний ген у геномі людини міститься у 10-й хромосомі (10p14–p15), в геномі миші – у 2-й хромосомі, а в геномі щура – у 17-й хромосомі (17q12.3) [35, 36]. Структура гена *pfkfb3* добре вивчена. Цей ген охоплює більше 26 тисяч п.н.з., які містять як мінімум 16 кодуєчих екзонів. Основний ізоензим PFKFB-3 520 а.з. і його третинна структура подібна до PFKFB-1 та PFKFB-4 [4, 37].

При дослідженні послідовності 5'-промоторної ділянки гена *pfkfb3* встановлено наявність багатьох сайтів зв'язування різних транскрипційних факторів [38, 39]. Так, у регуляторній ділянці гена виявлено подібний до ТАТА елемент (ТТТААА), який не було описано в інших генах, а також GC-збагачені ділянки і можливі сайти

зв'язування для рецептора естрогенів, транскрипційних факторів SP-1 та AP-2, причому наявність AP-2 та кількох SP-1 мотивів близько до місця ініціації транскрипції є необхідною умовою для базальної транскрипції даного гена [39]. У 5'-кінцевій ділянці гена *pfkfb3* людини ідентифікований HIF-зв'язувальний елемент, який є відповідальним за посилення транскрипції за умов гіпоксії [40, 41].

Експресію PFKFB-3 виявлено у плаценті, мозку, сім'яниках, печінці, легені, серці, нирці, скелетних м'язах та у багатьох лініях трансформованих клітин і злоякісних пухлинах [11–13, 15, 19–21]. Високий рівень експресії PFKFB3 було знайдено в астроцитоматах без істотних змін і рівні мРНК порівняно з умовно нормальною тканиною мозку [42]. Разом з тим, рівень експресії мРНК PFKFB-3 у різних органах мишей коливається у значних межах: найвищий рівень експресії виявлено у скелетних м'язах, значно менший у сім'яниках і легені, ще менший у головному мозку, нирці та серці, а найнижчий – у печінці [13]. Відомо, що „всюдисуща” PFKFB-3, як і більшість її альтернативних сплайс-варіантів, має залишок серину у положенні 461, що відповідає Ser466 у PFKFB-2, фосфорилування якого різними протеїніназами стимулює експресію PFKFB-3 [4, 14, 43, 44].

Ген *pfkfb4*. У геномі людини ген *pfkfb4* міститься у 3-й хромосомі (3p21–p22), у геномі миші – в 9-й хромосомі, а у геномі щура – у 8-й хромосомі (8q32) [3, 17, 18]. Вивчення структури гена *pfkfb4* людини показало, що він містить 14 екзонів та 13 інтронів, які охоплюють близько 45 тисяч п.н.з. [45]. Розмір інтронів коливається від 101 до 9840 п.н.з. Послідовність, що зв'язує HIF і відповідає за індукцію експресії гена за умов гіпоксії, міститься на відстані 293–300 п.н.з. від GATA сайту, місця ініціації транскрипції даного гена [46]. Відомо, що у клітинах меланоми лінії DB-1 експресуються дві ізоформи мРНК ізоензиму PFKFB-4 (PFKFB-4 та PFKFB-4s), причому експресія обох ізоформ стимулюється гіпоксією [46]. Встановлено, що мРНК PFKFB-4s являє собою сплайс-варіант.

Експресію мРНК PFKFB-4 виявлено у різних трансформованих клітинах, а також у нормальній тканині та злоякісних пухлинах грудної залози, легені, прямої кишки та шлунка людей [19–21, 47, 48]. Поряд із тим, слід зазначити, що рівень експресії білка PFKFB-4 у нормальній тканині прямої кишки та шлунка значно більший порівняно з нормальною тканиною грудної залози та легені [20, 21, 47]. Отже, ген *pfkfb4* експресується у клітинах різних органів та у різних лініях трансформованих клітин, причому його експресія різко посилюється при злоякісному рості, особливо у злоякісних пухлинах легені та грудної залози [20, 47]. Високий рівень експресії PFKFB-4 у злоякісних пухлинах свідчить про важливу роль цієї ізоформи PFKFB у ефекті Варбурга [29, 20, 47, 48].

Отже, ген *pfkfb4* експресується не лише у сім'яниках, а й у багатьох інших органах та у різних лініях трансформованих клітин. Дія гіпоксії на транскрипцію гена *pfkfb4* відбувається через залежний від гіпоксії елемент у промоторній зоні гена, активність якого контролюється транскрипційним комплексом HIF [19].

Дослідження кінетичних властивостей ізоензиму PFKFB-4 сім'яників щура показало, що даний ізоензим має значно вищу 6-фосфофрукто-2-кіназну активність і активує фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність порівняно з ізоензимами печінки та скелетних м'язів щура (PFKFB-1), а також серця бика (PFKFB-2) [16]. Поряд із тим, фруктозо-2,6-бісфосфатазна активність PFKFB-4 ізоензиму сім'яників щура є найнижчою серед інших ізоформ PFKFB.

Встановлено, що PFKFB-4 сім'яників щура є фосфорильованим *in vivo* і що рекомбінантний PFKFB-4 також фосфорилується в умовах *in vitro*, причому не cAMP-залежною протеїнкіназою, а протеїнкіназою C [16]. Комп'ютерний аналіз потенційних сайтів протеїнкінази C показав, що найбільш імовірними сайтами можуть бути 28-й залишок серину та 443-й залишок треоніну [16].

Незважаючи на те, що у більшості вивчених організмів різні гени *pfkfb* локалізовані у різних хромосомах, лише ген *pfkfb1* міститься в одній і тій самій хромосомі у трьох видів організмів: людини, миші та щура. Як ген *pfkfb3*, так і ген *pfkfb4*, у людини, миші та щура виявлено у різних хромосомах: ген *pfkfb3* у 10-й, 2-й та 17-й, а ген *pfkfb4* у 3-й, 9-й та 8-й хромосомах, відповідно [17, 18, 35, 36]. У той самий час, ген *pfkfb2* у щура міститься у 13-й хромосомі, але у миші він виявлений у тій же хромосомі, що і в людини, – у 1-й [3]. Більше того, при аналізі величини кодованих різними генами *pfkfb* ізоензимів виявляється цікава закономірність: менші за розміром гени (*pfkfb2* та *pfkfb3*) кодують синтез більших за розміром ізоформ PFKFB, а більші за розміром гени (*pfkfb1* та *pfkfb4*) кодують синтез менших ізоформ PFKFB, хоча навіть великі за розміром ізоформ PFKFB (PFKFB-2 та PFKFB-3) мають сплайс-варіанти, що можуть бути навіть меншими за малі ізоформи або навіть більшими за основні (рис. 1), про що буде сказано пізніше.

При порівнянні амінокислотної послідовності різних ізоензимів з'ясувалося, що більша частина послідовності кіназних та фосфатазних доменів дуже консервативна, а послідовність N- та C-кінців варіює і містить різні сайти фосфорилування. Наприклад, фосфорилування N-кінця ізоензиму печінки протеїнкіназою A інгібує 6-фосфофрукто-2-кіназну активність і активує фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність, а фосфорилування C-кінця ізоензимів серця та „всюдисущого” різними протеїнкіназами підвищує 6-фосфофрукто-2-кіназну активність і знижує фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність [4, 31, 32, 43, 44].

Особливості просторової структури різних PFKFB. Різні PFKFB мають подібні каталітичні центри як для 6-фосфофрукто-2-кінази, так і для фруктозо-2,6-бісфосфатази, але мають суттєві структурні відмінності регуляторних ділянок як з N-кінця, так і з C-кінця молекули, що значною мірою визначає кіназно : бісфосфатазне відношення активностей [4, 28]. Разом з тим, незважаючи на структурну подібність каталітичних центрів 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази, було виявлено досить істотні відмінності між окремими ізоензимами щодо спорідненості до субстратів величини K_m [49]. У структурі 6-фосфофрукто-2-кінази виявлено мотиви, які відповідальні за зв'язування нуклеотидів і які подібні до тих, що характерні для аденілаткінази, малого G-протеїну Ras та EF-Tu родини нуклеотид-зв'язувальних протеїнів [50]. Встановлено, що мутації Lys54, Thr55 та Asp130 у структурі Walker мотивів A та B послідовності 6-фосфофрукто-2-кінази сильно знижують її активність [51]. Крім того, у структурі 6-фосфофрукто-2-кінази було виявлено амінокислотний залишок, який є надзвичайно важливим для зв'язування субстрату і каталізу [52]. Це залишок лізину у 174 положенні, його заміна на гліцин повністю знімала 6-фосфофрукто-2-кіназну активність. І хоча 6-фосфофрукто-2-кіназа зв'язує фруктозо-6-фосфат, а аденілаткіназа – аденозинмонофосфат, вважається, що ці сайти зв'язування є подібними. Рентгеноструктурний аналіз PFKFB-4 щура показав, що домен 6-фосфофрукто-2-кінази структурно подібний до родини білків аденілаткіназа/Ras [53, 54]. Детальне дослідження фруктозо-2,6-бісфосфатазного домену PFKFB виявило його подібність до родини ензимів гістидинових

фосфатаз, включно із кислими фосфатазами та фосфогліцератмутазами як за послідовністю амінокислотних залишків, так і за структурною організацією [4, 53]. Поряд із тим, для прояву 6-фосфофрукто-2-кіназної активності різні ізоензими PFKFB повинні функціонувати як гомодимери, мономери в яких з'єднані через N-кінцеві частини, тоді як аденілатциклаза працює як мономер.

Активний центр 6-фосфофрукто-2-кінази у структурі PFKFB формують шість β -ланцюгів в оточенні семи α -спіралей. Відомо, що Walker мотив А міститься на С-кінці першого β -ланцюга і має у своїй структурі Lys 54, який зв'язує γ та β фосфати АТФ, тоді як Thr55 та Asp130 взаємодіють з магнієм [54]. 6-фосфофрукто-2-кіназна активність PFKFB проявляється у складі гомодимера PFKFB, що обумовлено взаємодією шести β -ланцюгових структур мономерів ензиму, в результаті чого формується 12- β -ланцюгова структура, яка і є необхідною для перебігу кіназної реакції (рис. 3). Тривимірна структура місця взаємодії 6-фосфофрукто-2-кіназ мономерів у гомодимері PFKFB-4 представлена на рис. 4. Хоча каталітичні послідовності 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази є досить

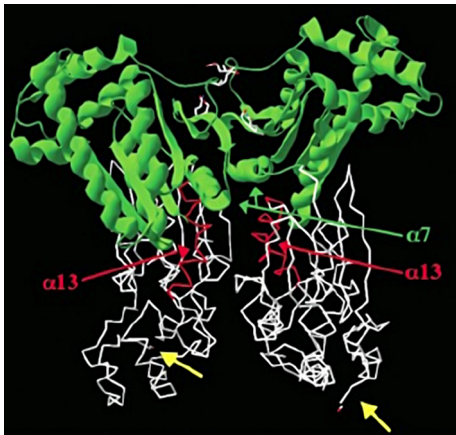


Рис. 3. Тривимірна структура гомодимеру PFKFB-4. Наглядно видно взаємодію N-кінців й активних центрів 6-фосфофрукто-2-кіназ мономерів і стрілками вказано місця взаємодії α -спіралей, а також С-кінці мономерів

Рис. 3. 3D structure of the PFKFB-4 homodimer. Interaction of N-terminus and active domains of 6-phosphofrufructo-2-kinase as well as C-terminus of monomers and molecule ends are clearly shown. The α -helices interactions are indicated by arrows

консервативними і амінокислотні послідовності різних ізоензимів PFKFB дуже подібні, порівняльні дослідження структур активних центрів 6-фосфофрукто-2-кінази PFKFB-1 та PFKFB-4 показали наявність структурних змін між цими двома ізоензимами, що є близькими за своїми розмірами. Встановлено, що важливими для перебігу 6-фосфофрукто-2-кіназної реакції є три амінокислотні залишки у структурі PFKFB – Ser225, Glu208 та Gln224. Два із них (Ser225 та Gln224) змінені в ізоформі PFKFB-1 печінки на Arg і Thr порівняно з ізоензимом сім'яників, чим і визначається різниця у 6-фосфофрукто-2-кіназній активності цих двох ізоформ PFKFB, тоді як третій, Glu208, є консервативним і присутній в обох ізоензимах [4, 49].

На рис. 5 представлено результати порівняння тривимірних структур мономерів PFKFB-1 та PFKFB-4 шляхом накладання однієї структури на іншу. Виявлено подібність 6-фосфофрукто-2-кіназних частин і досить суттєві відмінності конформації фруктозо-2,6-бісфосфатазних частин цих ізоензимів [49]. Крім того, встановлено скручування фруктозо-2,6-бісфосфатазного домену щодо 6-фосфофрукто-2-кіназного домену в PFKFB-1, що забезпечує взаємодію цих двох доменів між собою, а також димерну взаємодію фруктозо-2,6-бісфосфатазних доменів [49]. Така димеризація фруктозо-2,6-бісфосфатазних доменів у PFKFB-1 збільшує їхню конформаційну стабільність і фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність. Наявністю невеликих

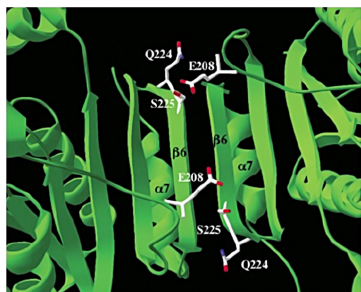


Рис. 4. Тривимірна структура місця взаємодії 6-фосфофрукто-2-кіназ мономерів у гомодимері PFKFB-4, причому у цій взаємодії беруть участь усі шість β -ланцюгових структур мономерів ензиму, в результаті чого формується 12- β -ланцюгова структура, яка і необхідна для перебігу кіназної реакції. Показано важливі для перебігу 6-фосфофрукто-2-кіназної реакції амінокислотні залишки в ізоензимі сім'яників, два з яких (Ser225 та Gln224) змінені в ізоформі PFKFB-1 печінки на Arg і Thr, чим і визначається різниця у 6-фосфофрукто-2-кіназних активностях цих двох ізоформ PFKFB, тоді як третій, Glu208, присутній в обох ізоензимах

Fig. 4. 3D structure of the 6-phosphofructo-2-kinase monomer interactions in the PFKFB-4 homodimer is shown. All six β -sheets of each 6-phosphofructo-2-kinase monomer participate in the interaction to form a continuous twelve-stranded inter-monomer β -sheet, which is needed for 6-phosphofructo-2-kinase activity. The positions of some important for 6-phosphofructo-2-kinase activity amino acid residues are shown. Two residues differ between the testis and liver isoenzymes: Ser225 and Gln224 in the PFKFB-4 replaced by Arg and Thr in the liver isoenzyme, what is important for 6-phosphofructo-2-kinase activity of PFKFB-4, along Glu208 is conserved and present in both isoenzymes



Рис. 5. Порівняння тривимірних структур мономерів PFKFB-1 та PFKFB-4 шляхом накладання однієї структури на іншу. PFKFB-1 печінки зображена темною, а PFKFB-4 – світлою смугою. Чітко видно подібність 6-фосфофрукто-2-кіназних частин PFKFB-1 і PFKFB-4 та відмінності конформації фруктозо-2,6-бісфосфатазних частин цих молекул PFKFB. Крім того, показано скручування фруктозо-2,6-бісфосфатазного щодо 6-фосфофрукто-2-кіназного домену в PFKFB-1, що забезпечує взаємодію цих двох доменів між собою, а також димерну взаємодію фруктозо-2,6-бісфосфатазних доменів

Fig. 5. Comparison of 3D structure of PFKFB-1 and PFKFB-4 monomers via superposition one structure over other. The liver PFKFB-1 is dark sheet and PFKFB-4 is in light grey. The similarity of 6-phosphofructo-2-kinase domains of PFKFB-1 and PFKFB-4 as well as the differences of fructose-2,6-bisphosphatase domains are clearly shown. Moreover, the bisphosphatase twist in relation to 6-phosphofructo-2-kinase domain is shown in PFKFB-1, which provides the interaction between both domains as well as dimer interaction of the bisphosphatase domains

змін в амінокислотних послідовностях фруктозо-2,6-бісфосфатазних доменів PFKFB-1 та PFKFB-4 можна пояснити і значно більшу афінність ізоензиму печінки до фруктозо-2,6-бісфосфату порівняно з PFKFB-4.

Альтернативні сплайс-варіанти мРНК різних ізоформ 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази. Найбільш детально вивчено альтернативні сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2, PFKFB-3 та PFKFB-4. Встановлено, що шляхом альтернативного сплайсингу 15-го екзону може утворюватися менша за розміром ізоформа PFKFB-3 у результаті зміни рамки читування і вкорочення С-кінцевої ділянки, яка не фосфорилується протеїнкіназами А та С, і відрізняється від конститутивної, всюдисущої ізоформи присутністю багатьох копій послідовності AUUA та наявністю

онкогеноподібного регуляторного елементу [55]. Фосфорилування „всюдисущої” ізоформи протеїнкіназою А та С приводить до активації 6-фосфофрукто-2-кінази без впливу на фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність [55]. Конститутивна ізоформа PFKFB-3 експресується майже в усіх органах, а менша є індукційною ізоформою і посилено експресується у пухлинах при злоякісному рості [13, 15].

Крім описаних вище двох ізоформ PFKFB-3 (конститутивна й індукційна), було виявлено ряд інших варіантів PFKFB-3, що є результатом альтернативного сплайсингу пре-мРНК. Kessler і Eschrich [56] у мозку людини виявили шість альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3, котрі було позначено як ізоформи UB12K1-6. У мозку щурів було виявлено вісім альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 і продемонстровано тканинспецифічний характер їхньої експресії [57, 58]. Сім альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 виявлено у різних органах мишей [59]. Ці сплайс-варіанти мають ідентичну N-кінцеву регуляторну частину для 6-фосфофрукто-2-кінази та фруктозо-2,6-бісфосфатази, але суттєво відрізняються за карбоксильними кінцями. Варіабельна ділянка цих сплайс ізоформ складається з кількох екзонів, у тому числі і додаткових. Схематичне зображення структурної екзонної організації альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3 миші представлено на рис. 6. Більша частина цих сплайс-варіантів мРНК не має 13-го екзону. Ці варіанти різняться між собою також за наявністю 15-го та 15а екзонів, які змінюють рамку зчитування, амінокислотну послідовність і довжину С-кінця альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3 (рис. 7). Один із варіантів не має 14-го екзону і є найкоротшим [59].

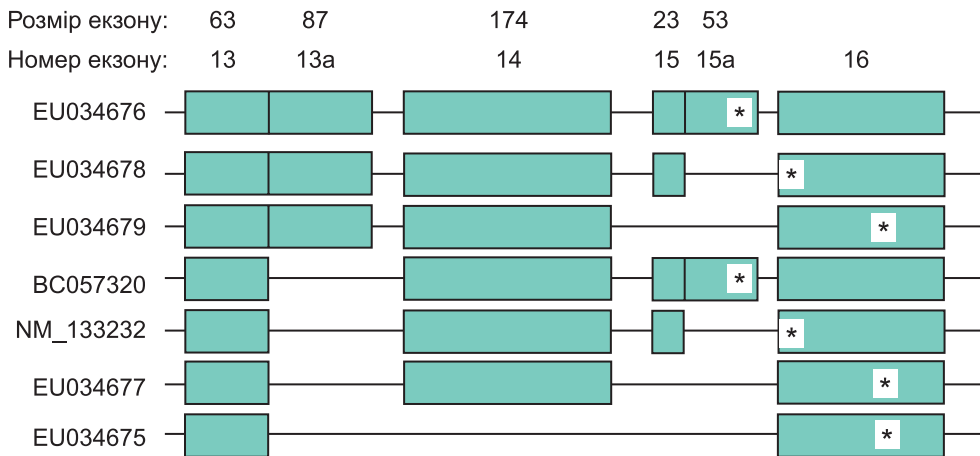


Рис. 6. Схематичне зображення структурної екзонної організації альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3 миші. Більша половина цих сплайс-варіантів мРНК не має 13-го екзону і різняться між собою за наявністю 15-го та 15а екзонів, які змінюють рамку зчитування, амінокислотну послідовність та довжину С-кінця альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3. Один із варіантів не має 14-го екзону і є найкоротшим. Зліва вказані номери GenBank альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 миші

Fig. 6. Schematic representation of exon structure of mouse PFKFB-3 mRNA alternative splice variants. Most of these splice variants do not have exon 13th. Some of splice variants have 15th and/or 15tha exons which alters the reading frame, amino acid sequence and length of C-terminus. One splice variant is shortest because it does not have exon 14th. Positions of three possible stop codons for the different alternative splice variants of PFKFB-3 mRNA are shown by the asterisk. The GenBank accession number of alternative splice variants of mouse PFKFB-3 is noted on the left

```

          450      460      470      480      490      500
EU034676 - THRERSEAVKIQHFASVVRPSSYTELDFQSVESAKQDAKKGPNLMRRNSVTPLASPEPT
EU034678 - *****
EU034679 - *****
BC057320 - *****-----*****
NM_133232 - *****-----*****
EU034677 - *****-----*****
EU034675 - *****-----*****

          510      520      530      540      550
EU034676 - KKPRINSFEERVASTSAALPSCLPPEVPTQLPGQPLLGKACLRSVCHIFSKFSPY
EU034678 - *****NMRSPRSGAESSSQKH
EU034679 - *****PLLGKACLT
BC057320 - *****PLLGKACLRSVCHIFSKFSPY
NM_133232 - *****NMRSPRSGAESSSQKH
EU034677 - *****PLLGKACLT
EU034675 - -----NMRSPRSGAESSSQKH

```

Рис. 7. Амінокислотна послідовність альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 миші. Видно різницю амінокислотних послідовностей і розміру С-кінця різних альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3. Залишки серину підкреслено. Зліва вказано номери GenBank альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 миші

Fig. 7. Amino acid sequences of mouse PFKFB-3 mRNA alternative splice variants. Differences in amino acid sequences and length of C-terminus of different alternative splice variants of mouse PFKFB-3 mRNA are shown. Serine residues are underlined. The GenBank accession number of alternative splice variants of mouse PFKFB-3 is noted on the left

Роль цих сплайс-ізоформ PFKFB-3 у різних тканинах і клітинах вивчена недостатньо, проте вже відомо, що експресія конститутивної ізоформи PFKFB-3 та деяких сплайс-варіантів змінюється у процесі диференціації адипоцитів. Це може свідчити про їхню участь у регуляції гліколізу в цих клітинах [11]. Встановлено також, що експресія альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3 змінюється і у SNARK-нокаутних мишей [59]. Виявлені зміни в експресії сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3 у різних органів щурів з експериментальним цукровим діабетом, а також у мишей при гіпоксії. Високий рівень експресії індукцибельної ізоформи PFKFB виявлено у злоякісних пухлинах, що, можливо, сприяє посиленій проліферації та є поясненням феномену Варбурга, який спостерігається у трансформованих клітинах, хоча дані останніх років вказують на те, що майже всі ізоензими PFKFB роблять свій вклад у ефект Варбурга [9, 12, 15, 20, 21, 47, 62]. Показано, що пригнічення експресії індукцибельної ізоформи PFKFB значно зменшує ріст пухлин у експериментальних тварин. Недавно було показано, що сплайс-варіанти PFKFB-3, які мають інтрон 13а, експресуються переважно у печінці та нирці, причому їхня експресія у первинній культурі гепатоцитів знижується під час культивування, що вказує на залежність експресії цих ізоформ PFKFB-3 від процесів проліферації та диференціації [63].

Виявлено два альтернативних сплайс-варіанти мРНК PFKFB-2 у серці щурів, які мали відмінності у регуляторній С-кінцевій ділянці [64]. Унікальні альтернативні сплайс-варіанти виявлені для PFKFB-4 у людини, миші та щура [46, 65–67]. На рис. 8 наведена схема структурної організації альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 миші. Один зі сплайс-варіантів має делецію у каталітичній частині фруктозо-2,6-бісфосфатази, що зумовлює зміну рамки зчитування, вкорочення С-кінця та зміну амінокислотної послідовності, у результаті чого у ній з'являється багато залишків серину. Аналогічний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 був виявлений і у щурів, але ще більше вкорочений [66]. Два альтернативних сплайс-варіанти мРНК PFKFB-4 мають

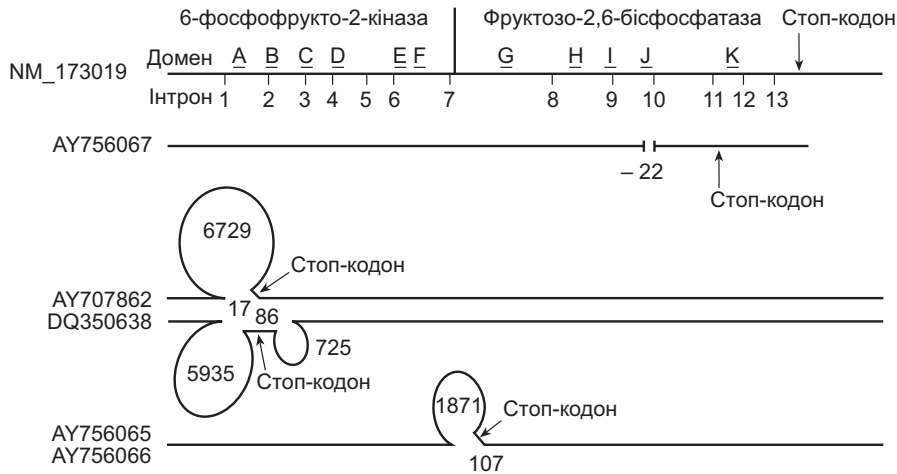


Рис. 8. Схематичне зображення структурної організації альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-4 миші. Зліва вказано номери GenBank альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-4 миші

Fig. 8. Schematic representation of the structure of mouse PFKFB-4 mRNA alternative splice variants. The GenBank accession number of alternative splice variants of mouse PFKFB-4 is noted on the left

після першого екзону вставки різної довжини і з різних місць першого інтрону, які вносять стоп-кодону, у результаті чого синтезуються ідентичні ізоензими без регуляторного N-кінця. Аналогічний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 був виявлений у клітинах меланоми лінії DB-1, але розмір вставки значно більший, причому показано високий рівень його експресії у цих клітинах [46]. Ще один сплайс-варіант мРНК PFKFB-4 миші має вставку між 7-м та 8-м екзонами, тобто між 6-фосфофрукто-2-кіназою та фруктозо-2,6-бісфосфатазою, і кодує синтез двох монофункціональних білків: 6-фосфофрукто-2-кінази з вкороченим та збагаченим залишками серину C-кінцем та фруктозо-2,6-бісфосфатази. У щурів виявлено ще один альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-4, який у своїй структурі зберігав 11-й інтрон (94 н.з.), що різко вкорочувало C-кінцеву частину ензиму через наявність стоп-кодону в інтроні, але він з'являвся у печінці тварин лише за дії на них екотоксиканта метил-третбутилового ефіру [66]. Було також показано, що у таких щурів змінюється експресія і альтернативного сплайс-варіанта з делецією у ділянці фруктозо-2,6-бісфосфатази.

Молекулярні механізми індукції експресії PFKFB при гіпоксії. Відомо, що за умов гіпоксії значно знижується інтенсивність утворення енергії за рахунок окиснювального фосфорилування внаслідок нестачі кисню, що компенсується посиленням процесів транспорту глюкози та її метаболізму гліколітичним шляхом. Гліколіз є одним із основних метаболічних процесів, що активується при гіпоксії та у злоякісних пухлинах, де спостерігаються локальна гіпоксія через недостатнє надходження кисню до клітин або знижену здатність його засвоєння. Відомо, що гіпоксія є важливим чинником у формуванні та рості більшості, а ключовим фактором регуляції транскрипції, що опосередковує адаптацію клітин до гіпоксії, як також і перебіг низки патологічних процесів, є транскрипційний фактор (HIF), що індукується при гіпоксії і суттєво активується також у злоякісних пухлинах [68–75]. Він індукує процеси транскрипції певних генів, зв'язуючись зі специфічними послідовностями їх регуляторних ділянок [76–77].

Показано залежність експресії всіх ізоензимів PFKFB від гіпоксії як в окремих органах (*in vivo*, 7% кисню), так і в різних лініях клітин (*in vitro*, 1% кисню), причому ця залежність має чітко виражений тканиноспецифічний чи клітинспецифічний характер [12, 13, 21, 48]. Вивчення експресії мРНК PFKFB-1 та PFKFB-2 у різних органах мишей за умов гіпоксії показало, що індукція їхньої експресії спостерігається лише у деяких органах: PFKFB-1 – у печінці та скелетних м'язах, а PFKFB-2 – у легені і також у печінці, а у скелетних м'язах, навпаки, знижувалась [13]. Експресія мРНК PFKFB-3 при гіпоксії також посилюється в усіх основних органах: головному мозку, легені, сім'яниках, нирці, печінці та міокарді [13]. Водночас, у скелетних м'язах експресія мРНК PFKFB-3 при гіпоксії знижувалася, що можна пояснити особливостями регуляції експресії або структурою регуляторної промоторної ділянки даного гена у м'язах [6, 13]. Активація експресії PFKFB-3 під впливом гіпоксії абсолютно залежна від активності транскрипційного комплексу HIF-1, оскільки у дефіцитних за HIF-1 α клітинах (ембріональні фібробласти миші) не спостерігається змін в експресії PFKFB-3, як і ряду відомих HIF-залежних генів *glut1* та *vegf*, і опосередковується взаємодією HIF із залежним від гіпоксії регуляторним елементом (HRE) у структурі гена [12, 40, 41].

Встановлено, що за умов гіпоксії посилюється також експресія мРНК PFKFB-4 у різних лініях трансформованих клітин і гіпоксія індукує експресію через специфічну послідовність нуклеотидів (CGCGTGCC) у 5'-регуляторній зоні гена *pfkfb4*, з якою зв'язується HIF [19]. Більше того, було показано, що експресія гена PFKFB-4 значно посилюється у різних злоякісних пухлинах [20, 21, 47, 78]. Відомо, що більшість ефектів гіпоксії можна спостерігати і за нормального рівня кисню, інкубуючи клітини з речовинами, що блокують активність пролілгідроксилаз HIF, які проявляють активність тільки у присутності кисню й іонів заліза [12, 13, 19, 21].

Отже, експресія всіх чотирьох генів PFKFB є залежною від гіпоксії, але проявляється по-різному у різних органах і клітинах і опосередковується HRE у регуляторній зоні генів *pfkfb3* та *pfkfb4*, з яким зв'язується HIF, ключовий регулятор транскрипції залежних від гіпоксії генів, експресія й активність якого посилюється при гіпоксії та у злоякісних пухлинах.

ВИСНОВКИ

PFKFB є одним із ключових ензимів, що контролюють гліколіз як за нормальних умов, так і при різних патологічних станах, у тому числі при гіпоксії та злоякісному рості, шляхом синтезу і розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату, алостеричного активатора 6-фосфофрукто-1-кінази й інгібітора фруктозо-1,6-бісфосфатази. PFKFB представлена багатьма ізоформами, синтез яких кодується чотирма незалежними генами, але основна частина ізоформ утворюється за рахунок альтернативного сплайсингу. Ізоформи PFKFB виконують одні і ті ж функції (синтезу та розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату), але різняться за кінетичними характеристиками, механізмами регуляції активності й по-різному експресується у різних тканинах. Альтернативні сплайс-варіанти PFKFB-2 та PFKFB-3 різняться між собою за довжиною і амінокислотною послідовністю С-кінцевої регуляторної ділянки, а PFKFB-4 має ряд унікальних сплайс-варіантів, що можуть мати лише 6-фосфофрукто-2-кіназу або фруктозо-2,6-бісфосфатазу активність. Експресія різних генів PFKFB суттєво активується при гіпоксії та у злоякісних пухлинах і має тканиноспецифічний чи клітинспецифічний характер регуляції, що сприяє забезпеченню клітин організму енергією за умов зниження рівня або використання кисню, а також адаптації клітин до гіпоксії. Індукція експресії або

активності PFKFB зумовлює значне посилення гліколізу, а блокада – його пригнічення. Детальне вивчення механізмів регуляції експресії різних генів PFKFB у різних типах клітин і, зокрема, у трансформованих клітинах є актуальною проблемою, оскільки дає змогу виявити вклад цих ензимів, а також їхніх альтернативних сплайс-варіантів, у регуляцію гліколізу в нормі та за різних патологічних станів, у тому числі у злякисних пухлинах, і розробляти способи його корекції.

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. **Advances in 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 in Biochemical Sciences**, 2001; 26(1): 30–35.
4. 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. **Biochemical Journal**, 2004; 381(Pt. 3): 561–579.
5. Rousseau G. G., Hue L. Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that control glycolysis. **Progress in Nucleic Acid Research & Molecular Biology**, 1993; 45: 99–127.
6. Pilkis S. J., Claus T. H., Kurland I. J., Lange A. J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signalling enzyme. **Annual Review of Biochemistry**, 1995; 64: 799–835.
7. Bensaad K., Tsuruta A., Selak M. A. et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. **Cell**, 2006; 126: 107–120.
8. Hue L., Rider M.H. Role of fructose-2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. **Biochemical Journal**, 1987; 245: 313–324.
9. Clem B., Telang S., Clem A. et al. Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. **Molecular Cancer Therapy**, 2008; 7(1): 110–120.
10. 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.
11. 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; 54(12): 3349–3357.
12. 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. **Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277(8): 6183–6187.
13. 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.
14. 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. **Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277(40): 30778–30783.
15. 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.
16. 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. **Journal of Biological Chemistry**, 1991; 266(24): 15764–15770.
17. Manzano A., Pérez 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; 229(1–2): 83–89.

18. Sakakibara R., Okudaira T., Fujiwara K. et al. Tissue distribution of placenta-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1999; 257: 177–181.
19. 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-1 α activation. **FEBS Letters**, 2004; 576(1): 14–20.
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. **Український біохімічний журнал**, 2005; 77(6): 46–50.
21. 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.
22. 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. **Journal of Biological Chemistry**, 1993; 268(17): 15951–15957.
23. Dupriez V.J., Darville M.I., Antoine I.V. et al. Characterization of a hepatoma mRNA transcribed from a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-encoding gene and controlled by ets oncogene-related products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 1993; 90: 8224–8228.
24. Meton I., Egea M., Anemaet I.G. et al. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. **Endocrinology**, 2006; 147(7): 3446–3456.
25. Foretz M., Guichard C., Ferré P., Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 1999; 96(22): 12737–12742.
26. Mykhalchenko V. G., Minchenko D. O., Bobarykina A. Y., Minchenko O. H. Structure and expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-1 in the rat retina. **Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Біологія**, 2006; 46-47: 21–23.
27. Kurland I. J., El-Maghrabi M. R., Correia J. J., Pilkis S. J. Rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: properties of phospho- and dephospho-forms and of two mutants in which Ser32 has been changed by site-directed mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 1992; 267(7): 4416–4423.
28. 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 of Biochemistry**, 1998, 254(1): 103–110.
29. Tsuchiya Y., Uyeda K. Bovine heart fructose 6-P₂-kinase:fructose-2,6-bisphosphatase mRNA and gene structure. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1994; 310: 467–474.
30. Chikri M., Rousseau G.G. Rat gene coding for heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: characterization of an unusual promoter region and identification of four mRNAs. **Biochemistry**, 1995; 34: 8876–8884.
31. 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.
32. Hue L., Beauloye C., Bertrand L., Horman S. et al. New targets of AMP-activated kinase. **Biochemical Society Transactions**, 2003; 31(Pt. 1): 213–215.
33. Rider M. H., Van Damme J., Vertommen D. et al. Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. **FEBS Letters**, 1992; 310: 139–142.
34. 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. **Journal of Biological Chemistry**, 2004; 279(46): 48085–48090.
35. 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). **Cytogenetics and Cell Genetics**, 1998; 83(3-4): 214–217.

36. Nicholl J., Hamilton J. A., Sutherland G. R. et al. The third human isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) map position 10p14-p15. **Chromosome Research**, 1997; 5(2): 150.
37. Kim S. G., Manes N. P., El-Maghrabi M. R., Lee Y. H. Crystal structure of the hypoxia-inducible form of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3): a possible new target for cancer therapy. **Journal of Biological Chemistry**, 2006; 281(5): 2939–2944.
38. Fukasawa M., Takayama E., Shinomiya N. et al. Identification of the promoter region of human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2000; 267(3): 703–708.
39. Navarro-Sabaté A., Manzano A., Riera L., Rosa I. J. The human ubiquitous the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. **Gene**, 2001; 264: 131–138.
40. Fukasawa M., Tsuchiya T., Takayama E. et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element of the human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. **Journal of Biochemistry**, 2004; 136(3): 273–277.
41. Obach M., Navarro-Sabaté A., Caro J. et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (*pfkfb3*) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**, 2004; 279(51): 53562–53570.
42. Kessler R., Bleichert F., Warnke J. P., Eschrich K. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. **Journal of Neuro-Oncology**, 2008; 86(3): 257–264.
43. Okamura N., Sakakibara R. A common phosphorylation site for cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C in human placental 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1998; 62: 2039–2042.
44. 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. **Clinical Cancer Research**, 2005; 11(16): 5784–5792.
45. Gomez M., Manzano A., Navarro-Sabaté A. et al. Specific expression of *pfkfb4* gene in spermatogonia germ cells and analysis of its 5'-flanking region. **FEBS Letters**, 2005; 579: 357–362.
46. 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. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2005; 280(1–2): 227–234.
47. 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; 87(11): 1005–1010.
48. 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 Biochimica Polonica**, 2005; 52(4): 881–888.
49. Lee Y. H., Li Y., Uyeda K., Hasemann C. A. Tissue-specific structure/function differentiation of the liver isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, 2003; 278(1): 523–530.
50. Traut T. W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. **European Journal of Biochemistry**, 1994; 222: 9–19.
51. Rider M. H., Crepin K. M., De Cloedt M. et al. Site-directed mutagenesis of Lys-174, Asp-179 and Asp-191 in the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. **Biochemical Journal**, 1994; 300: 111–115.
52. Bertrand L., Deprez J., Vertommen D. et al. Site-directed mutagenesis of rat muscle 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: role of Asp-130 in the 2-kinase domain. **Biochemical Journal**, 1997; 321(Pt. 3): 623–627.
53. Bertrand L., Vertommen D., Feitmans E. et al. Modelling the 2-kinase domain of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase on adenylate kinase. **Biochemical Journal**, 1997; 321(Pt. 3): 615–621.
54. Hasemann C. A., Istvan E. S., Ueda K., Deisenhofer J. The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase reveals distinct domain homologies. **Structure**, 1996; 4: 1017–1029.

55. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A**, 1999; 96(6): 3047–3052.
56. Kessler R., Eschrich K. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. **Molecular Brain Research**, 2001; 87(2): 190–195.
57. Watanabe F., Sakai A., Furuya E. Novel isoform of rat brain fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase are generated by tissue-specific alternative splicing. **Journal of Neurochemistry**, 1997; 69(1): 1–9.
58. Watanabe F., Furuya E. Tissue-specific alternative splicing of rat brain fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. **FEBS Letters**, 1999; 458(1): 304–308.
59. 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; 1: 22–31.
60. 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 & Cell**, 2008; 24(3): 260–266.
61. 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. **Український біохімічний журнал**, 2008; 80(1): 19–25.
62. Bartrons R., Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 2007; 39(3): 223–229.
63. Duran J., Gómez M., Navarro-Sabate A. et al. Characterization of a new liver- and kidney-specific *pfkfb3* isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2008; 367(4): 748–754.
64. Watanabe F., Furuya E. Alternative splicing of novel exons rat heart type fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2001; 282: 803–810.
65. 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.
66. Minchenko D. O., Kovtun O. O., Bobarykina A. Y. et al. A family of alternative splices variants of mouse testis PFKFB mRNA. **20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress**, Kyoto, Japan, Abstracts, 2006; 1P-A-352: 137.
67. Minchenko D. O., Mykhalchenko V. G., Tsuchihara K. et al. Unique alternative splice variants of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 mRNA. **Український біохімічний журнал**, 2008; 80(4): 66–73.
68. Denko N. C. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. **Nature Reviews Cancer**, 2008; 8: 705–713.
69. Johnson A. B., Denko N., Barton M. C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. **Mutation Research**, 2008; 640: 174–179.
70. Kaur B., Khwaja F. W., Severson E. A. et al. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. **Neuro-Oncology**, 2005; 7(2): 134–153.
71. Lu H., Forbes R. A., Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in cancerogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277(26): 23111–23115.
72. Rankin E. B., Giaccia A. J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death and Differentiation**, 2008; 15(4): 678–685.
73. Lum J. J., Bui T., Gruber M. et al. The transcriptional factor HIF-1a plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. **Genes & Development**, 2007; 21(9): 1037–1049.
74. Kenneth N. S., Rocha S. Regulation of gene expression by hypoxia. **Biochemical Journal**, 2008; 414: 19–29.
75. Brahimi-Horn M. C., Chiche J., Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. **Journal of Molecular Medicine**, 2007; 85(12): 1301–1307.

76. Wenger R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. **FASEB Journal**, 2002; 16: 1151–1162.
77. Gleade J. M., Ratcliffe P. J. Hypoxia and the regulation of gene expression. **Molecular Medicine Today**, 1998; 4: 122–129.
78. Minchenko D. O., Bobarykina A. Y., Senchenko T. Y. et al. Expression of the VEGF, Glut1 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 and -4 in human cancers of the lung, colon and stomach. **Studia Biologica**, 2009; 3(1): 25–34.

6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE GENES: STRUCTURAL ORGANIZATION, EXPRESSION AND REGULATION OF THE EXPRESSION

**D. O. Minchenko, A. Y. Bobarykina, A. B. Kundieva,
N. M. Lypova, I. V. Bozhko, O. O. Ratushna, O. H. Minchenko**

Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovych St., Kyiv 01601, Ukraine

A bifunctional PFKFB enzyme is a key regulator of glycolysis. Four different genes encode the synthesis of multiple PFKFB isoforms. We analyzed data concerning structural organization of PFKFB genes and alternative splice variants of PFKFB mRNA, as well as expression and molecular mechanisms of regulation of different PFKFB isoforms in malignant tumors and at hypoxia, and mechanisms of hormonal regulation. Hypoxia inducible factor (HIF)-dependent mechanisms of regulation of the expression of different PFKFB variants are presented and discussed.

Key words: PFKFB, expression regulation, mRNA, alternative splicing, HIF.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ, ЭКСПРЕССИЯ И РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ 6-ФОСФОФРУКТО-2-КИНАЗЫ/ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ

**Д. А. Минченко, А. Ю. Бобарыкина, А. В. Кундиева
Н. Н. Лыпова, И. В. Божко, О. О. Ратушна, А. Г. Минченко**

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина*

Ключевым энзимом регуляции гликолиза является бифункциональный энзим PFKFB, представленный многими изоформами, синтез которых кодируется четырьмя разными генами. Детально проанализированы данные о структурной организации этих генов и альтернативных сплайс-вариантах мРНК PFKFB, а также об экспрессии и молекулярных механизмах регуляции экспрессии различных изоформ PFKFB в злокачественных опухолях и при гипоксии, и механизмах гормональной регуляции. Представлены и обобщены результаты исследований относительно роли зависящих от индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора (HIF) механизмов регуляции в экспрессии различных изоформ PFKFB.

Ключевые слова: PFKFB, регуляция экспрессии, альтернативный сплайсинг, мРНК, HIF.

Одержано: 14.08.2009