

УДК 577.112:616

**ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ЕКСПРЕСІЮ
мРНК 6-ФОСФОФРУКТО-2-КІНАЗИ/ФРУКТОЗО-2,6-БІСФОСФАТАЗИ-2
ТА ЇЇ АЛЬТЕРНАТИВНИХ СПЛАЙС-ВАРІАНТІВ
У РІЗНИХ ОРГАНАХ ЩУРІВ**

І. В. БОЖКО¹, Д. О. МІНЧЕНКО¹, Т. О. ЗІНЧЕНКО¹,
О. П. ЯВОРОВСЬКИЙ², О. Г. МІНЧЕНКО¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
²ДУ «Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця», Київ, Україна;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Біфункціональний ензим 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза-2 (PFKFB-2) представлена багатьма альтернативними сплайс-варіантами і відіграє важливу роль у регуляції гліколізу у клітинах головного мозку, легень, сім'яників та серця. Проведено вивчення експресії мРНК PFKFB-2 та низки її альтернативних сплайс-варіантів у цих життєво важливих органах щурів за одноразового інтратрахеального введення наночастинок срібла. Встановлено, що експресія мРНК PFKFB-2 в різних органах щурів під впливом наночастинок срібла істотно змінюється. Їхня дія на експресію мРНК PFKFB-2 виявляється вже через один день після введення наночастинок тваринам, а через три та 14 днів посилюється (у сім'яниках) або залишається майже на тому ж рівні (у всіх інших досліджуваних тканинах). Через рік після введення щурам наночастинок срібла експресія мРНК PFKFB-2 в більшості органів повертається до її рівня в контрольних тварин. Встановлено також, що експресія альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, що не мають функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кінази, головним чином істотно посилюється в різних органах щурів під впливом наночастинок срібла через 1, 3 та 14 днів після одноразового введення їх, що свідчить про суттєві порушення експресії мРНК PFKFB-2 на рівні альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 в різних життєво важливих органах. Результати роботи вказують на можливу дію наночастинок срібла на важливі механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії генів ключових ензимів.

Ключові слова: PFKFB-2, альтернативний сплайсинг, наночастинок срібла, легені, головний мозок, серце, сім'яники, щури.

Родина біфункціональних ензимів 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази (PFKFB) [6-фосфофрукто-2-кіназа (EC 2.7.1.105) і фруктозо-2,6-бісфосфатаза (EC 3.1.3.46)] – це родина надзвичайно важливих, регуляторних ізоензимів, що контролюють інтенсивність метаболізму глюкози, зокрема гліколізу, шляхом синтезу та розщеплення фруктозо-2,6-бісфосфату, алостеричного активатора фосфофруктокінази-1 та інгібітора фруктозо-1,6-бісфосфатази [1–8]. Можна припустити, що поєднання активності двох ензимів у структурі однієї молекули біфункціонального ензиму сприяє оперативнішій регуляції рівня фруктозо-2,6-бісфосфату у клітинах та обумовлено надзвичайною його важливістю в регуляції гліколізу і низки інших процесів метаболізму глюкози. Відомо, що зниження рівня фруктозо-2,6-бісфосфату в клітинах призводить до пригнічення гліколізу та активації глюконеогенезу [2, 9–11].

Численними дослідженнями встановлено, що за гіпоксії та у злоякісних пухлинах спостерігається виражена активація гліколізу, при цьому посилюється активність та експресія майже всіх ензимів гліколізу, але головним чином це стосується ключових ензимів цього шляху метаболізму глюкози і, в першу чергу, пов'язано з активацією 6-фосфофрукто-1-кінази (фосфофруктокінази-1) [3–5]. Показано, що регуляція активності фосфофруктокінази-1 є багатогранною і має тканиноспецифічний характер, але найважливішим регулятором її активності є фруктозо-2,6-бісфосфат, рівень якого і 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 та активації гліколітичного розщеплення глюкози, а пригнічення активності PFKFB, зокрема низькомолекулярним інгібітором 3-(3-піридиніл)-1-(4-піридиніл)-2-пропен-1-оном (ЗРО)

істотно пригнічує гліколіз, а також виявляє цитостатичну дію на трансформовані клітини [4, 7, 12–15]. Більше того, було чітко продемонстровано, що цей низькомолекулярний інгібітор здатний пригнічувати активність і рекомбінантної PFKFB у клітинах, а також знижувати в них транспортування глюкози і зменшувати внутрішньоклітинну концентрацію фруктозо-2,6-бісфосфату, лактату, АТР, NAD⁺ та NADH [7]. Виявлено істотний ефект ЗРО також і на проліферацію декількох ліній клітин аденокарциноми та гематопоетичних клітин людини [7].

Встановлено, що синтез ізоензимів PFKFB кодують чотири незалежних гени, які локалізуються на різних хромосомах. Детальне вивчення експресії генів PFKFB показало, що в різних тканинах та лініях пухлинних клітин виявляється експресія всіх чотирьох або декількох ізоензимів PFKFB, але рівень їхньої експресії має тканиноспецифічний характер і коливається в значних межах у різних лініях трансформованих клітин [12, 13, 16–22]. Більше того, недавно було встановлено, що PFKFB-3 виявляється і в ядрах клітин та має відношення до проліферації клітин [23]. Один із генів кодує синтез ізоензиму 2-го типу, PFKFB-2, який був виявлений спочатку в серці, але потім і в деяких інших органах [4, 5, 24].

PFKFB-2 – це ключовий фермент регуляції гліколізу в міокарді, але не менш важливу роль він відіграє у головному мозку, легенях, сім'яниках та нирках. Показано, що концентрація фруктозо-2,6-бісфосфату підвищується в серці мишей під час посиленої фізичної роботи та після стимуляції адреналіном або інсуліном через активацію кіназної активності PFKFB-2 і що це відбувається внаслідок фосфорилування специфічною протеїнкіназою амінокислотних залишків у карбоксильному домені ензиму у трьох консервативних положеннях – серину-466, треоніну-475 та серину-483 [25, 26]. Було також встановлено, що посилена експресія ізоформи 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2, дефіцитної за 6-фосфофрукто-2-кіназою в серці, призводить до гіпертрофії міокарда, порушує функцію міоцитів та суттєво зменшує чутливість клітин до дії інсуліну [27].

Для мРНК різних PFKFB відомо по декілька альтернативних сплайс-варіантів із різною довжиною N- чи С-кінця, а також із різними вставками або делеціями у каталітичних ділянках як 6-фосфофрукто-2-кінази, так і фруктозо-2,6-бісфосфатази, що призводить до елімінації частини каталітичних доменів, внаслідок чого цей біфункціональний ензим

може виявляти лише одну функцію – 6-фосфофрукто-2-кінази або фруктозо-2,6-бісфосфатази [28–32]. Встановлено, що альтернативний сплайсинг різних PFKFB порушується у SNARK-нокаутних мишей, при цукровому діабеті, за дії токсичних речовин [33–37].

Раніше нами було показано, що експресія PFKFB-3 та PFKFB-4 в життєво важливих органах може бути чутливим маркером впливу на організм екологічно токсичних речовин, зокрема метил-третбутилового ефіру [38–40]. Дані літератури свідчать, що токсичними є також і наночастинки срібла, які, поряд з іншими наноматеріалами, знаходять застосування і в медицині. Відомо, що токсичність наночастинок срібла є більшою порівняно з макроскопічними дисперсіями срібла, що можливо пов'язано з їхніми фізико-хімічними характеристиками, здатністю наночастинок безперешкодно проникати крізь біологічні бар'єри організму [41–46].

Дослідження токсичності наночастинок срібла показали, що під їхнім впливом зростає частота загибелі ембріонів. Деякі автори вважають, що наночастинки срібла є довгостроковим джерелом іонів срібла, з чим пов'язують небезпеку шкідливого впливу їх на довкілля. Специфічним і потенційно менш небезпечним чинником є матричний аерозоль наночастинок срібла із хлоридом натрію, який включає до 30% срібла. Його виробництво є актуальним у зв'язку з можливим використанням для очистки води [47]. При різних технологічних операціях з виготовлення цих наночастинок срібла концентрація їх у повітрі коливається, але 98% матричного пилу належить до респірабельної фракції, тобто існує реальна можливість надходження певної кількості наночастинок срібла в організм інгаляційним шляхом. У зв'язку з цим всебічне еколого-токсикологічне дослідження цього нового антропогенного чинника є досить актуальним, в тому числі і для оцінки біонебезпеки операторів під час одержання наночастинок срібла методом електронно-променевої технології.

Нещодавно в експериментах на щурах було досліджено інгаляційну токсичність наночастинок срібла розміром від 20 до 65 нм у різних концентраціях в умовах витримування тварин у камері протягом 6 год (п'ять разів на тиждень протягом 28 днів). Було виявлено зміни активності глутамілтрансферази, а також кількості нейтрофілів та еозинофілів [41]. Більше того було показано, що наночастинки срібла, проникаючи в організм різними шляхами, в тому числі і через легені, накопичуються в життєво важливих органах, зокрема в головному мозку.

ку, хоча механізми подолання наночастинками срібла повітряно-кров'яного бар'єра в легенях до цього часу ще не з'ясовано [48, 49]. Було також встановлено, що наночастинки срібла індукують експресію гена протеїну теплового шоку, апоптоз та оксидативний стрес, можуть діяти як нейротоксини розвитку (порушувати розвиток ембріонів), суттєво посилюючи при цьому експресію металотіонеїну [50–53].

Таким чином, більшість наявних у літературі даних переконливо свідчать про токсичність наночастинок срібла, обумовлену вищою біологічною активністю їх порівняно з металевим сріблом, і вказують на необхідність всебічного дослідження його антропогенного впливу на рівні експресії генів, що є чутливими до дії екоотоксикантів.

Метою нашого дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу нового антропогенного чинника – наночастинок срібла – на щурів на рівні експресії мРНК PFKFB-2 та її альтернативних сплайс-варіантів у головному мозку, легенях, сім'яниках та серцевому м'язі після його одноразового інтратрахеального введення.

Матеріали і методи

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Wistar з урахуванням біотичних норм роботи з експериментальними тваринами. У дослідженні використовували наночастинки срібла в матриці хлориду натрію, одержані методом електронно-променевого випаровування у вакуумі в лабораторії № 84 Міжнародного центру електронно-променевої технології Інституту електрозварювання ім. Є. О. Патона. Методом електронної мікроскопії встановлено, що частинки срібла мають розміри 28–30 нм в діаметрі і переважно сферичну форму. Наночастинки срібла вводили тваринам інтратрахеально в кількості 50 мкг/кг маси тіла одноразово, декапітували під ефірним наркозом і досліджували експресію PFKFB-2 в різних органах щурів через 1, 3, 14 та 365 днів. Для виділення РНК і подальших досліджень експресії PFKFB-2 у тварин брали головний мозок, легені, сім'яники та серце і заморожували їх у рідкому азоті. Вибір цих органів був обумовлений тим, що саме у клітинах головного мозку, легень, сім'яників та серця PFKFB-2 відіграє важливу роль у регуляції гліколізу. Тотальну РНК виділяли із 100–200 мг тканини, застосовуючи метод екстракції з використанням гуанідину, фенолу та хлороформу, як було описано раніше [54, 55]. Спочатку проводили екстракцію тканин щурів 1 мл 4 М розчину

ізотіоціанату гуанідину (Ultra Pure), який містив 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 25 мМ EDTA та 100 мМ 2-меркаптоетанолу. До лізату тканин поступово додавали 0,1 мл 2 М ацетату натрію (рН 4,0), 1 мл водонасиченого фенолу та 0,2 мл суміші хлороформу з ізоаміловим спиртом (49:1), перемішуючи після додавання кожного із реагентів. РНК осаджували рівним об'ємом ізопропанолу. Осади РНК промивали 75%-им етанолом і розчиняли у стерильній воді, вільній від рибонуклеаз (QIAGEN, Німеччина).

Експресію мРНК PFKFB-2 досліджували методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції на апараті «Stratagene Mx 3000P cyclor». Для цього РНК із головного мозку, легень, сім'яників та серця щурів використовували як матрицю для синтезу комплементарної ДНК (кДНК). Зворотну транскрипцію РНК проводили за допомогою набору «Quantitect Reverse Transcription Kit» (QIAGEN) відповідно до протоколу виробника. Для реакції зворотної транскрипції брали 1 мкг РНК та суміш праймерів із набору. Далі проводили ампліфікацію одержаних препаратів кДНК. Реакційна суміш містила 8 мкл води, вільної від нуклеаз, 1 мкл кДНК, 1 мкл 10 мкМ суміші праймерів та 10 мкл двократної суміші для полімеразної ланцюгової реакції (SYBRGreen Mix).

Для дослідження експресії мРНК PFKFB-2 було використано таку пару праймерів: прямий 5'-GATCCTGATGTCATTGCTGC-3' (1) і зворотний 3'-GAACAGGAGATCCAGGACCT-5' (2), які відповідали нуклеотидним послідовностям 676–695 та 1069–1088 (GenBank номер NM_080477). Експресію альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією 8-го екзону (–125 нуклеотидних залишків) досліджували за допомогою прямого праймера 5'-GCTGCCAATATTCTGGGACC-3' (3) і зворотного (2), які відповідали нуклеотидним послідовностям 521–540 та 774–793 сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 щура (GenBank номер GQ422137).

Для ампліфікації альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3-м та 4-м екзонами (+55 нуклеотидних залишків; GenBank номер GQ422138) було використано такі праймери: прямий 5'-TGCCTCCTGAAGAАCTACCATG-3' (4) та зворотний 3'-GTCTGTTAGGCCAAGAAGTC-5' (5), які відповідали нуклеотидним послідовностям 1–22 та 239–258.

Для ампліфікації альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону (–125 нуклеотидних залишків) та двома вставками між 1-м і 2-м екзонами (+10 нуклеотидних залишків) та між 13-м і 14-м екзонами

(+66 нуклеотидних залишків; GenBank номер GQ438758) було використано праймери для ділянки зі вставкою між 1-м і 2-м екзонами: прямий 5'-ATGCTGTGAGTTCTGCATGG-3' (6) та зворотний 3'-GAAGCAGTCAAGTCCATATAA-5' (7). Прямий праймер починається із 109-го нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – з 331-го нуклеотидного залишку (5'-позиція).

Експресія мРНК β-актину слугувала додатковим контролем кількості аналізованої РНК. Для ампліфікації кДНК β-актину використовували наступні праймери: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' та зворотний – 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'. Ці олігонуклеотиди відповідають нуклеотидним послідовностям 704–723 та 937–918 кДНК β-актину (GenBank номер X00351).

Аналіз результатів виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програми «Differential expression calculator», а статистичний аналіз – у програмі Excel. Праймери отримано від компанії Sigma (США).

Ампліфікацію частини альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 проводили в апараті «MasterCycler Personal» (Eppendorf, Німеччина). Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 2%-му агарозному гелі, який аналізували в системі Quantity One BioRad System (США).

Результати та обговорення

Експресію мРНК PFKFB-2 досліджували в легенях, головному мозку, сім'яниках та серцевому м'язі щурів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції кДНК, одержаних шляхом зворотної транскрипції мРНК. Результати проведених досліджень наведено на рис. 1. Встановлено, що у головному мозку щурів істотно посилюється (на 47%) порівняно з контрольними тваринами рівень експресії мРНК PFKFB-2 вже через один день після одноразового інтратрахеального введення щурам наночастинок срібла. Подібні зміни рівня експресії мРНК PFKFB-2 (+46 та +34%) спостерігали у головному мозку щурів і на 3-й та 14-й день дії наночастинок срібла. У сім'яниках рівень експресії мРНК PFKFB-2 істотно збільшується (на 40%) через один день після введення наночастинок срібла і продовжує збільшуватися на 3-й та 14-й день (+55 та 73%), але у легенях та серцевому м'язі рівень експресії цієї мРНК збільшується значно меншою мірою. Із даних, наведених на рис. 1, також видно, що через рік після введення тваринам наночастинок срібла істотних змін в експресії мРНК PFKFB-2 не виявлено як у головному мозку, так і в сім'яниках та серцевому м'язі. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації в агарозному гелі показав наявність двох смужок, одна із яких відповідає

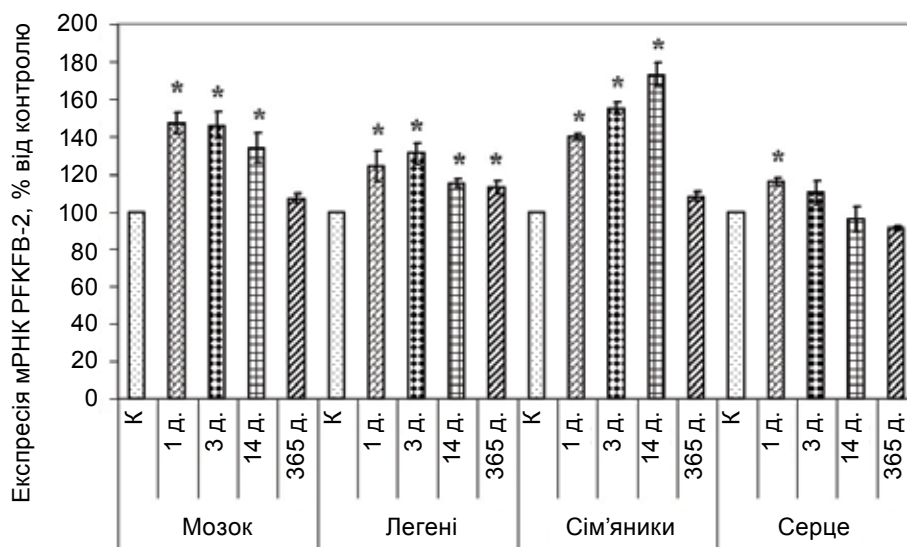


Рис. 1. Експресія мРНК β-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 (PFKFB-2) в головному мозку, легенях, сім'яниках та серці контрольних (К) щурів і тварин, яким вводили наночастинок срібла, через 1, 3, 14 та 365 днів (д.). Ампліфікацію кДНК PFKFB-2 проводили за допомогою прямого (1) та зворотного (2) праймерів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Величину експресії мРНК PFKFB-2 нормалізували за експресією β-актину; n = 3; * P < 0,05

основному варіанту мРНК PFKFB-2, а інша – альтернативному сплайс-варіанту з делецією 125 нуклеотидних залишків, що відповідають восьмому екзону (дані не наведено).

Наступним етапом роботи було вивчення дії наночастинок срібла на експресію альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону (–125 нуклеотидних залишків; GenBank номер GQ422137). Із даних, наведених на рис. 2, видно, що у головному мозку щурів рівень експресії цього сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 істотно посилюється (на 47 та 44%) через один та три дні після одноразового інтратрахеального введення наночастинок срібла, а на 14-й день зміни в рівні його експресії є значно меншими (+24%). В легенях, сім'яниках та серцевому м'язі також спостерігається збільшення рівня експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону вже через один день після введення тваринам наночастинок срібла, але на 3-й та 14-й день ефект їхньої дії зменшується, лише у сім'яниках істотно посилюється на 14-й день. Через рік після введення шурам наночастинок срібла рівень експресії цього сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 в більшості органів повертається до рівня контрольних тварин, а в головному мозку залишається збільшеним (на 18%).

Експресію альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону

було також досліджено методом напівкількісної полімеразної ланцюгової реакції. Із даних, наведених на рис. 3 та 4, видно, що у всіх досліджуваних органах виявляється одна смужка кДНК цього сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2. Зміни рівня його експресії під впливом наночастинок срібла в основному узгоджуються з результатами кількісної полімеразної ланцюгової реакції.

Істотне підвищення рівня експресії альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3-м та 4-м екзонами (+55 нуклеотидних залишків; GenBank номер GQ422138) виявлено в головному мозку щурів через 1, 3 та 14 днів після одноразового введення наночастинок срібла (на 52, 64 та 70% відповідно; рис. 5). Подібні зміни рівня експресії цього сплайс-варіанта спостерігалися в легенях: на 50, 44 та 65% відповідно через 1, 3 та 14 днів після введення шурам наночастинок срібла. Дещо менше підвищення рівня експресії сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 3-м та 4-м екзонами мало місце і в сім'яниках та серцевому м'язі. Через рік після одноразового введення шурам наночастинок срібла рівень експресії цього сплайс-варіанта повертався до рівня контрольних тварин у головному мозку, легенях та серцевому м'язі (рис. 5).

Із даних, наведених на рис. 6, видно, що рівень експресії альтернативного сплайс-

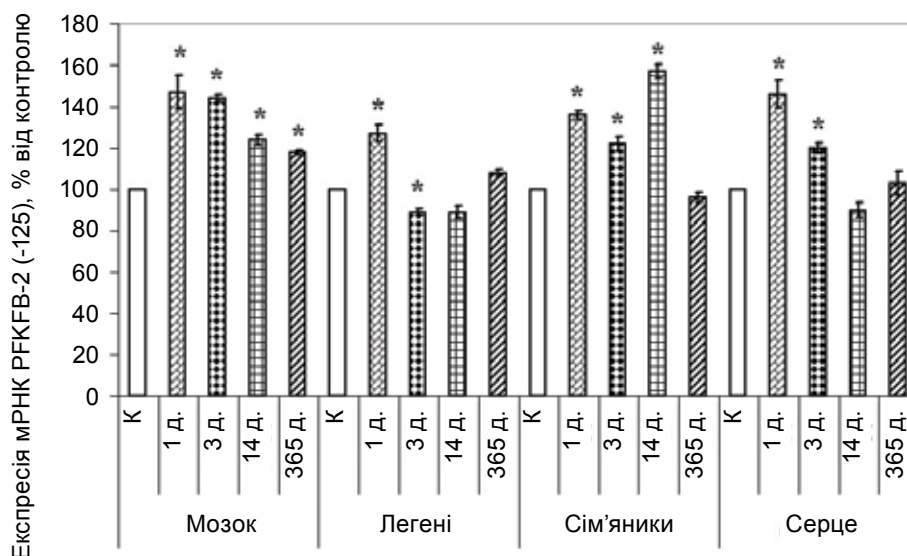


Рис. 2. Експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 з делецією восьмого екзону розміром 125 нуклеотидних залишків (PFKFB-2; –125) у головному мозку, легенях, сім'яниках та серці контрольних (К) щурів і тварин, яким вводили наночастинок срібла, через 1, 3, 14 та 365 днів (д.) за допомогою прямого (3) та зворотного (2) праймерів методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Величину експресії мРНК PFKFB-2 нормалізували за експресією β-актину; n = 3; * – P < 0,05

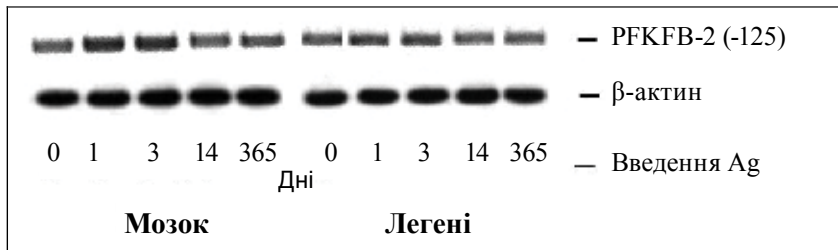


Рис. 3. Експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 з делецією восьмого екзону (PFKFB-2; -125) у головному мозку та легенях контрольних (К) щурів і тварин, яким вводили наночастинки срібла через 1, 3, 14 та 365 днів після одноразового їх введення методом напівкількісної полімеразної ланцюгової реакції. На рис. 3 та 4 ампліфікацію проводили за допомогою прямого (3) та зворотного (2) праймерів, продукти ампліфікації розділяли електрофорезом у 2%-му агарозному гелі та фотографували, а кількість аналізованої РНК оцінювали за експресією мРНК β -актину

варіанта мРНК PFKFB-2 із вставками між 1-м та 2-м екзонами, розміром 10 нуклеотидних залишків, і між 13-м та 14-м екзонами, розміром 66 нуклеотидних залишків, та делецією восьмого екзону (GenBank номер GQ438758) також істотно посилюється в усіх досліджуваних органах, досягаючи максимальних значень через 14 днів після одноразового інтратрахеального введення щурам наночастинок срібла, причому найвираженішими були зміни в легенях (+50% на 14-й день). Через рік після введення щурам наночастинок срібла рівень експресії цього сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 в усіх органах повертається до рівня контрольних тварин.

Таким чином, результати проведених нами досліджень переконливо свідчать про те, що одноразове інтратрахеальне введення щурам наночастинок срібла призводить до порушення експресії мРНК PFKFB-2 не лише в легенях, а і в головному мозку, сім'яниках та серцевому м'язі. І хоча дослідження експресії мРНК основної ізоформи PFKFB-2 вказує на посилення рівня її експресії і можливу активацію гліколізу під впливом наночастинок

срібла, результати вивчення експресії різних альтернативних сплайс-варіантів свідчать про істотне порушення експресії мРНК PFKFB-2 на рівні альтернативного сплайсингу, оскільки наночастинки срібла посилюють експресію сплайс-варіантів, що можуть кодувати ізоензими без функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кіназної частини (GenBank номери GQ422137, GQ422138 та GQ438758). Так, альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 (GenBank номер GQ422137) має делецію восьмого екзону, який кодує синтез каталітичних доменів E та F 6-фосфофрукто-2-кінази. Більше того, делеція восьмого екзону призводить до зміни рамки читування і до передчасної появи стоп-кодону під час трансляції цього сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2, внаслідок чого він ймовірно кодує синтез двох протеїнів: вкороченої 6-фосфофрукто-2-кінази без двох каталітичних доменів E та F на С-кінці та фруктозо-2,6-бісфосфатази, як окремого ензиму, що не є у складі біфункціонального ензиму.

Один із цих альтернативних сплайс-варіантів (GenBank номер GQ422138) має вставку між

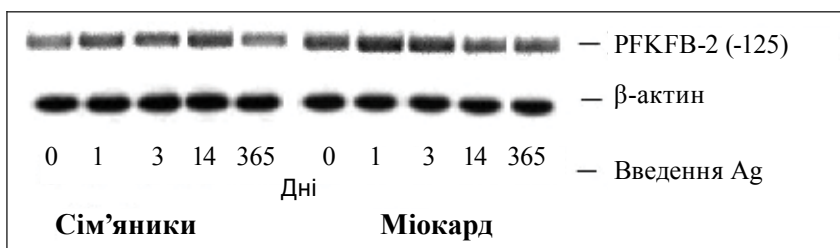


Рис. 4. Експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 з делецією восьмого екзону (PFKFB-2; -125) у сім'яниках та серці контрольних (К) щурів і тварин, яким вводили наночастинки срібла через 1, 3, 14 та 365 днів після одноразового введення їх методом напівкількісної полімеразної ланцюгової реакції

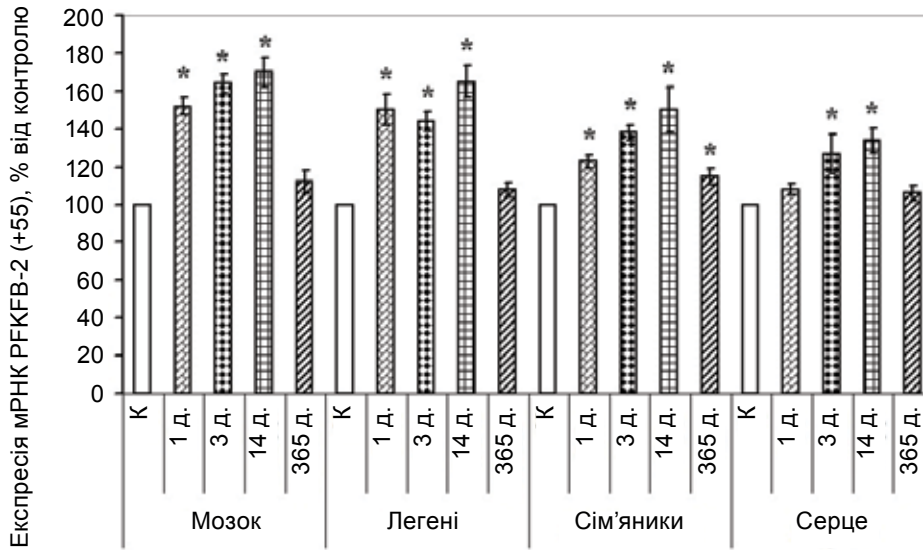


Рис. 5. Експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 із вставкою між 3-м та 4-м екзонами, розміром 55 нуклеотидних залишків (PFKFB-2; +55) у головному мозку, легенях, сім'яниках та серці контрольних (К) щурів і тварин, яким вводили наночастинки срібла через 1, 3, 14 та 365 днів (д.). Ампліфікацію κДНК PFKFB-2 проводили за допомогою прямого (4) та зворотного (5) праймерів методом кількісної полімеразної реакції. Величину експресії мРНК PFKFB-2 нормалізували за експресією β-актину; n = 3; * – P < 0,05

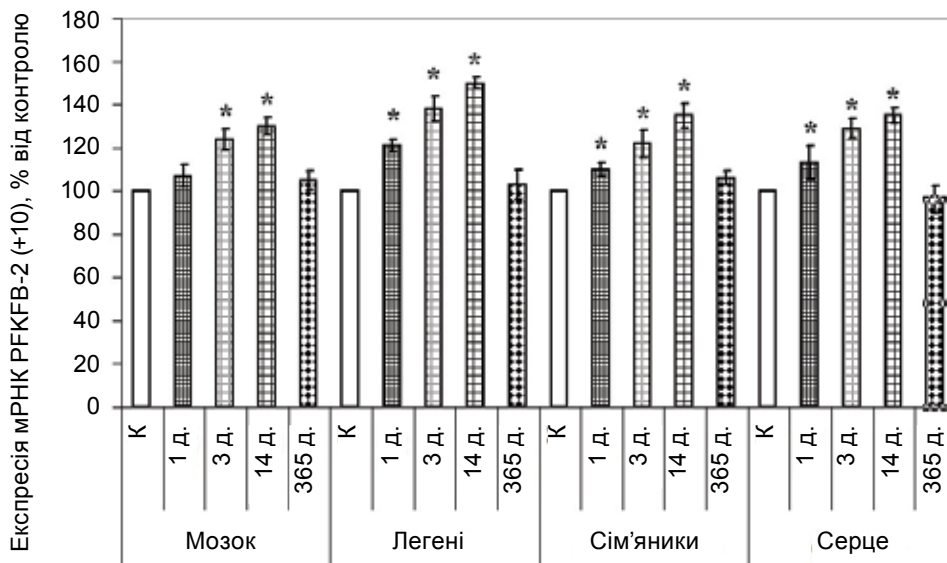


Рис. 6. Експресія альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 із вставкою між 1-им і 2-им екзонами, розміром 10 нуклеотидних залишків (PFKFB-2; +10) у головному мозку, легенях, сім'яниках та серці контрольних (К) щурів і тварин, яким вводили наночастинки срібла через 1, 3, 14 та 365 днів (д.) методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів: прямого (8) і зворотного (9)

3-м і 4-м екзонами розміром 55 нуклеотидних залишків і вносить позачерговий стоп-кодон у кодуючу послідовність [32, 34]. Передбачуваний протеїновий продукт цієї ізоформи не має двох каталітичних доменів, а також N-кінце-

вої послідовності 6-фосфофрукто-2-кінази, відповідальної за формування гомодимеру, у зв'язку з чим може проявляти лише фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність.

Ще один альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 (GenBank номер GQ438758) також має делецію восьмого екзону, розміром 125 нуклеотидних залишків, але має ще дві вставки: між 1-м і 2-м екзонами розміром 10 нуклеотидних залишків та між 13-м і 14-м екзонами розміром 66 нуклеотидних залишків. Перша вставка змінює рамку зчитування і призводить до передчасної появи стоп-кодону. Друга вставка теоретично не може змінити рамку зчитування, бо має 66 нуклеотидних залишків, але вона містить стоп-кодон у своїй послідовності. Тому цей варіант мРНК PFKFB-2 не може кодувати функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кінази, оскільки в передбачуваному протеїновому продукті немає всіх, необхідних для прояву ензиматичної активності, каталітичних доменів, а також немає N-кінця, необхідного для утворення гомодимеру PFKFB-2. Разом з тим, незважаючи на наявність другої вставки, цей альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-2 може кодувати синтез фруктозо-2,6-бісфосфатази, як окремого ензиму з усіма каталітичними доменами, необхідними для прояву ензиматичної активності, але із вкороченим C-кінцем порівняно з описаними вище варіантами. Таким чином, другий передбачуваний протеїновий продукт цього альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-2 гіпотетично може виявляти фруктозо-2,6-бісфосфатазну активність.

Можна припустити, що посилення експресії мРНК PFKFB-2 є реакцією клітин на порушення альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 і зменшення ізоформ з 6-фосфофрукто-2-кіназною активністю. Подібні порушення альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2 було виявлено у тварин з експериментальним цукровим діабетом, в яких знижується рівень фруктозо-2,6-бісфосфату і інтенсивність гліколізу та посилюється глюконеогенез [4, 8, 11, 22, 34, 56].

Результати нашої роботи переконливо свідчать про виражені зміни в експресії гена надзвичайно важливого регуляторного біфункціонального ензиму PFKFB-2 у щурів під впливом наночастинок срібла в таких життєво важливих органах як легені, головний мозок, серце та сім'яники. Збільшення експресії альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2 без 6-фосфофрукто-2-кіназної активності в

різних органах щурів після введення їм наночастинок срібла може свідчити про послаблення гліколізу, опосередкованого PFKFB-2, внаслідок порушення альтернативного сплайсингу пре-мРНК PFKFB-2. Як фруктозо-2,6-бісфосфатаза, так і N-кінцеві частини ізоензимів PFKFB-2, які являють собою вкорочену 6-фосфофрукто-2-кіназу, що синтезуються альтернативними сплайс-варіантами мРНК PFKFB-2 і можуть брати участь у формуванні та функціонуванні гомодимерної форми ензиму, заслуговують на подальше вивчення щодо створення засобів зниження інтенсивності гліколізу, що важливо для пригнічення злоякісного росту клітин. Одержані результати будуть сприяти розробці принципово нових молекулярних підходів до виявлення та профілактики негативних впливів наночастинок срібла та можливо низки інших наноматеріалів і токсичних речовин.

Аналіз одержаних результатів свідчить:

1. Експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-2 істотно змінюється в клітинах головного мозку, легень, сім'яників та серця після одноразового інтратрахеального введення наночастинок срібла.

2. Ефект наночастинок срібла на експресію мРНК PFKFB-2 виявляється вже через один день після введення їх тваринам, а через три та 14 днів посилюється (у сім'яниках) або залишається майже на тому самому рівні (в усіх інших досліджуваних тканинах). Через рік після введення шурам наночастинок срібла експресія мРНК PFKFB-2 в більшості органів повертається до її рівня у контрольних тварин.

3. Експресія альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-2, що не мають функціонально активної 6-фосфофрукто-2-кінази, головним чином посилюється в різних органах щурів під впливом наночастинок срібла через 1, 3 та 14 днів після одноразового їх введення.

4. Одноразове інтратрахеальне введення шурам наночастинок срібла суттєво порушує експресію мРНК PFKFB-2 на рівні альтернативного сплайсингу пре-мРНК в різних життєво важливих органах, що вказує на можливу дію наночастинок срібла на важливі механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах на рівні експресії генів ключових ензимів.

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ
СЕРЕБРА НА ЭКСПРЕССИЮ мРНК
6-ФОСФОФРУКТО-2-КИНАЗЫ/
ФРУКТОЗО-2,6-БИСФОСФАТАЗЫ-2
И ЕЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ СПЛАЙС-
ВАРИАНТОВ В РАЗНЫХ ОРГАНАХ
КРЫС**

*И. В. Божко¹, Д. А. Минченко¹,
Т. А. Зинченко¹, А. П. Яворовский²,
А. Г. Минченко¹*

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

²ГУ «Национальный медицинский
университет им. А. А. Богомольца», Киев;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

Бифункциональный фермент 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бисфосфатаза-2 (PFKFB-2) представлен многими альтернативными сплайс-вариантами и играет важную роль в регуляции гликолиза в клетках головного мозга, легких, семенников и сердца. Изучена экспрессия мРНК PFKFB-2 и ряда ее альтернативных сплайс-вариантов в этих жизненно важных органах крыс при однократном интратрахеальном введении наночастиц серебра. Установлено, что экспрессия мРНК PFKFB-2 существенно изменяется в разных органах крыс под влиянием наночастиц серебра. Эффект наночастиц серебра на экспрессию мРНК PFKFB-2 проявляется уже через один день после их введения животным, а через 3 и 14 дней усиливается (в семенниках) или остается почти на том же уровне (во всех других исследованных тканях). Через год после введения крысам наночастиц серебра экспрессия мРНК PFKFB-2 в большинстве органов возвращается к ее уровню у контрольных животных. Установлено также, что экспрессия альтернативных сплайс-вариантов мРНК PFKFB-2, которые не имеют функционально активной 6-фосфофрукто-2-киназы, главным образом существенно усиливается в различных органах крыс под влиянием наночастиц серебра через 1, 3 и 14 дней после однократного их введения. Это свидетельствует о существенном нарушении экспрессии мРНК PFKFB-2 на уровне альтернативного сплайсинга пре-мРНК PFKFB-2 в различных жизненно важных органах. Результаты данной работы указывают на возможное действие наночастиц серебра на важные механизмы регуляции метаболических процессов в клетках на уровне экспрессии генов ключевых ферментов.

Ключевые слова: PFKFB-2 мРНК, альтернативный сплайсинг, наночастицы серебра, головной мозг, легкие, сердце, семенники, крысы.

**EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES
ON THE EXPRESSION OF
6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/
FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHATASE-2
mRNA AND ITS ALTERNATIVE SPLICE
VARIANTS IN DIFFERENT RAT
ORGANS**

*I. V. Bozhko¹, D. O. Minchenko¹,
T. O. Zinchenko¹, O. P. Yavorovsky²,
O. H. Minchenko¹*

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

²State Institution Bogomoletz National
Medical University, Kyiv;
e-mail: ominchenko@yahoo.com

S u m m a r y

Bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-2 (PFKFB-2) is represented by several alternative splice variants and plays a significant role in the glycolysis regulation in the brain, lung, testis and heart cells. The expression of PFKFB-2 mRNA and its alternative splice variants in these rat vital organs after single intratracheal injection of silver nanoparticles was studied. It was shown that the expression of PFKFB-2 mRNA is significantly changed in different rat tissues under silver nanoparticles action. The effect of silver nanoparticles on the expression of PFKFB-2 mRNA was observed one day after its injection to animals. In 3 and 14 days the effect of silver nanoparticles was increased (in testes) or kept on the approximately same level (in other investigated tissues). The expression of PFKFB-2 mRNA in most tissues is returned to its control levels one year after the injection of silver nanoparticles to the rats. It was also shown that the expression of alternative splice variants of PFKFB-2 mRNA without functional activity of 6-phosphofructo-2-kinase is significantly increased in different tissues 1, 3 and 14 days after single injection of silver nanoparticles. The results of this investigation demonstrate clearly that silver nanoparticles significantly affect the expression of PFKFB-2 mRNA on the alternative splicing level in different vital organs and show their effect on the important mechanisms of metabolism regulation in the cells on the level of key enzyme gene expression.

Key words: PFKFB-2, mRNA, alternative splicing, silver nanoparticles, brain, lungs, testes, heart, rats.

1. Okar D. A., Lange A. J. // *Biofactors* – 1999. – **10**, N 1. – P. 1–14.
2. Bando H., Atsumi T., Nishio T. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. – **11**, N 16. – P. 5784–5792.
3. Okar D. A., Manzano A., Navarro-Sabate A. et al. // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – **26**, N 1. – P. 30–35.
4. Rider M. H., Bertrand L., Vertommen D. et al. // *Biochem. J.* – 2004. – **381**, Pt. 3. – P. 561–579.
5. Мінченко Д. О., Бобарикіна А. Ю., Кундієва А. В. та співавт. // *Біологічні студії/ Studia Biologica.* – 2009. – **3**, № 3. – С. 123–140.
6. Bensaad K., Tsuruta A., Selak M. A. et al. // *Cell.* – 2006. – **126**. – P. 107–120.
7. Clem B., Telang S., Clem A. et al. // *Mol. Cancer Therapy.* – 2008. – **7**, N 1. – P. 110–120.
8. Denko N. C. // *Nature Review Cancer.* – 2008. – **8**. – P. 705–713.
9. Calvo M. N., Bartrons R., Castaco E. et al. // *FEBS Lett.* – 2006. – **580**, N 13. – P. 3308–3314.
10. Atsumi T., Nishio T., Niwa H. et al. // *Diabetes.* – 2005. – **54**, N 12. – P. 3349–3357.
11. Wu C., Khan S. A., Peng L.-J., Lange A. J. // *Adv. Enzyme Regul.* – 2006. – **46**. – P. 72–88.
12. Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. L. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 8. – P. 6183–6187.
13. Minchenko O., Opentanova I., Caro J. // *FEBS Lett.* – 2003. – **554**(3). – P. 264–270.
14. Marsin A.-S., Douzin C., Bertrand L., Hue L. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 40. – P. 30778–30783.
15. Atsumi T., Chesney J., Metz C. et al. // *Cancer Res.* – 2002. – **62**, N 20. – P. 5881–5887.
16. Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O. et al. // *FEBS Letters.* – 2004. – **576**, N 1. – P. 14–20.
17. Minchenko O. H., Ogura T., Opentanova I. L. et al. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2005. – **280**, N 1–2. – P. 227–234.
18. Bobarykina A. Y., Minchenko D. O., Opentanova I. L. et al. // *Acta Biochim. Polonica.* – 2006. – **53**, N 4. – P. 789–799.
19. Minchenko O. H., Ogura T., Opentanova I. L. et al. // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 6. – С. 46–50.
20. Minchenko O. H., Ochiai A., Opentanova I. L. et al. // *Biochimie.* – 2005. – **87**, N 11. – P. 1005–1010.
21. Bartrons R., Caro J. // *J. Bioenergy Biomembr.* – 2007. – **39**, N 3. – P. 223–229.
22. Chesney J. // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2006. – **9**, N 5. – P. 535–539.
23. Yalcin A., Clem B. F., Simmons A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, N 36. – P. 24223–24232.
24. Heine-Suner D., Diaz-Guillen M. A., Lange A. J., Rodriguez de Cordoba S. // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – **254**, 1. – P. 103–110.
25. Marsin A., Bertrand L., Rider M. H., Deprez J. // *Currant Biol.* – 2000. – **10**. – P. 1247–1255.
26. Hue L., Beauloye C., Bertrand L. et al. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – **31**, N 1. – P. 213–215.
27. Donti R., Ye G., Wu C., Lange A. J. // *J. Biol. Chem.* 2004. – **279**, N 46. – P. 48085–48090.
28. Мінченко Д. О., Ковтун О. О., Мінченко О. Г., Биць Ю. В. // *Наук. вісн. Нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця.* – 2006. – № 4. – С. 72–78.
29. Watanabe F., Furuya E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **282**, N 3. – P. 803–810.
30. Watanabe F., Furuya E. // *FEBS Lett.* – 1999. – **458**, N 1. – P. 304–308.
31. Kessler R., Eschrich K. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* – 2001. – **87**, N 2. – P. 190–195.
32. Мінченко Д. О., Божко І. В., Липова Н. М. та співавт. // *Біологічні студії/Studia Biologica.* – 2010. – **4**, № 2. – С. 5–14.
33. Minchenko D. O., Tsuchihara K., Komisarenko S. V. et al. // *Scientific Bulletin National O. O. Bohomoletz Medical University.* – 2008. – N 1. – P. 22–31.
34. Липова Н. М., Мінченко Д. О., Ратушна О. О. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2010. – **82**, № 1. – С. 90–99.
35. Mykhalchenko V. G., Tsuchihara K., Minchenko D. O. et al. // *Biopolymers & Cell.* – 2008. – **24**, N 3. – P. 260–266.
36. Kessler R., Bleihert F., Warnke J. R., Eschrich K. // *J. Neuro-Oncology* – 2008. – **86**, N 3. – P. 257–264.
37. Minchenko D. O., Kundieva A. V., Tsuchihara K. et al. // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – **81**, № 4. – С. 59–68.
38. Minchenko D. O., Tsuchihara K., Yavorovsky O. P. et al. // *Studia Biologica.* – 2009. – **3**, N 2. – С. 5–14.
39. Мінченко Д. О., Кундієва А. В., Яворовський О. П. та співавт. // *Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О. О. Богомольця.* – 2009. – № 4 (26). – С. 42–49.
40. Мінченко О. Г., Яворовський О. П., Паустовський Ю. О., Мінченко Д. О. // *Здоров'я та довкілля.* – 2009. – № 1 (48). – С. 10–17.

41. *Ji J. H., Jung J. H., Kim S. S. et al.* // *Inhalat. Toxicol.* – 2007. – **19**, N 10. – P. 857 – 871.
42. *Griffitt R. J., Hyndman K., Denslow N. D., Barber D. S.* // *Toxicol. Sciences.* – 2009. – **107**, N 2. – P. 404–415.
43. *Chen D., Xi T., Bai J.* // *Biomed. Mater.* – 2007. – **2**, N 3. – P. S126–S128.
44. *Lubick N.* // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – **42**, N 23. – P. 8617.
45. *Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J.* // *Nanomedicine.* – 2007. – **3**, N 1. – P. 20–31.
46. *Balbus J. M., Maynard A. D., Colvin V. L. et al.* // *Environ. Health Perspect.* – 2007. – **115**, N 11. – P. 1654–1659.
47. *Nangmenyi G., Yue Z., Mehrabi S. et al.* // *Nanotechnology.* – 2009. – **20**, N 49. – P. 495705.
48. *Tang J., Xiong L., Wang S. et al.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2009. – **9**, N 8. – P. 4924–4932.
49. *Shimada A., Kawamura N., Okajima M. et al.* // *Toxicol. Pathol.* – 2006. – **34**, N 7. – P. 949–957.
50. *Ahamed M., Posgai R., Gorey T. J. et al.* // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2010. – **242**, N 3. – P. 263–269.
51. *Ringwood A. H., McCarthy M., Bates T. C., Carroll D. L.* // *Mar. Environ. Res.* – 2010. – **69**, Suppl. – P. S49–51.
52. *Powers C. M., Wrench N., Ryde I. T. et al.* // *Environ. Health Perspect.* – 2010. – **118**, N 1. – P. 73–79.
53. *Choi J. E., Kim S., Ahn J. H. et al.* // *Aquat Toxicol.* – 2010. – **100**, N 2. – P. 151–159.
54. *Armstead V. E., Minchenko A. G., Campbell B., Lefer A. M.* // *FASEB J.* – 1997. – **11**. – P. 1271–1279.
55. *Мінченко Д. О., Божко І. В., Зінченко Т. О. та співавт.* // *Біотехнологія.* – 2010. – N 3. – С. 42–49.
56. *Wu C., Okar D. A., Kang J., Lange A. J.* // *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* – 2005. – **5**, N 1. – P. 51–59.

Отримано 25.08.2010