

## Експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-3 у щурів із стрептозотоциновим діабетом

В. Г. Михальченко, К. Тсучигара<sup>1</sup>, Д. О. Мінченко, Г. Есумі<sup>1</sup>,  
О. М. Приступюк<sup>2</sup>, О. Г. Мінченко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна

<sup>1</sup>Науково-дослідний центр інноваційної онкології, Східний госпіталь Національного онкологічного центру Японії 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-8577, Japan

<sup>2</sup>Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця  
Бульв. Шевченка, 13, Київ, 01601, Україна

ominchenko@yahoo.com

---

*Встановлено, що експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-кінази/фруктозо-2,6-бісфосфатази-3 (PFKFB-3) в різних органах щурів з експериментальним цукровим діабетом змінюється неоднаково. Сплайс-варіанти мРНК PFKFB-3 експресуються в окремих органах специфічно і їхня експресія також зазнає змін при діабеті. Виявлено новий сплайс-варіант мРНК PFKFB-3, каталітичні домени в якому ідентичні основній ізоформі та уже відомим альтернативним сплайс-варіантам PFKFB-3, від яких він відрізняється лише довжиною С-кінцевої ділянки. Результати проведених досліджень вказують на те, що порушення гліколізу при стрептозотоциновому діабеті можуть бути пов'язані зі змінами в експресії PFKFB-3 – ключового ферменту регуляції гліколізу.*

*Ключові слова: PFKFB-3 мРНК, альтернативний сплайсинг, щури.*

---

**Вступ.** Біфункціональний фермент 6-фосфофрукто-2-кіназа/фруктозо-2,6-бісфосфатаза (PFKFB) виконує ключову роль у регуляції гліколізу як за норми, так і за різних патологічних станів, зокрема, при цукровому діабеті та в злоякісних пухлинах [1–6]. PFKFB (6-фосфофрукто-2-кіназа (EC 2.7.1.105); фруктозо-2,6-бісфосфатаза (EC 3.1.3.46)) контролює рівень фруктозо-2,6-бісфосфату в клітинах [7, 8] та є алостеричним регулятором 6-фосфофрукто-1-кінази, [9, 10]. Найпотужнішим активатором гліколізу вважають гіпоксію, яка посилює експресію гліколітичних ферментів – переносників глюкози, а також PFKFB,

що опосередковано індукує залежний від гіпоксії транскрипційний фактор HIF [11, 12]. Суттєво посилюється гліколіз і в злоякісних пухлинах, що частково обумовлено наявністю ефектів гіпоксії та значною мірою визначається транскрипційним фактором HIF [13]. Інтенсивність протікання процесів гліколізу змінюється і при цукровому діабеті внаслідок порушення метаболізму глюкози [16–18].

Відомо, що особливості гліколізу в тих чи інших органах і тканинах можуть бути зумовлені специфічністю експресії чотирьох генів PFKFB [1, 2], яка змінюється при гіпоксії і в злоякісних пухлинах, але неоднаково в різних органах і лініях клітин [11, 14, 15].

Нещодавно показано, що різні тканини експресують більше однієї ізоформи PFKFB і кожна мРНК, яка кодується генами *pfkfb1-4*, має два або більше альтернативних сплайс-варіантів [16]. Ген *pfkfb3* кодує синтез PFKFB, що постійно експресується в різних органах і клітинах пухлин, характеризується високим співвідношенням кінази до бісфосфатази, у зв'язку з чим сприяє акумуляції фруктозо-2,6-бісфосфату та посилює гліколіз [11, 15]. Особливістю основної ізоформи мРНК PFKFB-3 людини є відсутність у неї 15-го екзона [1, 16, 17], однак виявлено також її сплайс-варіант, який містить 15-й екзон (23 нуклеотидних залишки) [18]. Встановлено, що зазначений варіант PFKFB-3 має коротший та змінений С-кінець і посилено експресується в клітинах пухлин [19].

Припускають, що підвищення експресії PFKFB-3 в пухлинах значною мірою обумовлює активацію гліколізу та сприяє проліферації клітин [3, 19]. Окрім того, в тканині мозку знайдено ще декілька альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3, які різняться між собою та з основною ізоформою довжиною і амінокислотною послідовністю С-кінця [20, 21].

При дослідженні механізмів регуляції гліколізу при цукровому діабеті головну увагу було зосереджено на вивченні гена *pfkfb1* [5, 6]. Так, виявлено зниження експресії PFKFB-1 у печінці щурів при експериментальному цукровому діабеті і показано, що падіння рівня фруктозо-2,6-бісфосфату веде до гіперглікемії та появи резистентності до інсуліну, а його зростання або посилення експресія PFKFB-1 зменшує рівень глюкози в крові за рахунок пригнічення синтезу глюкози в печінці щурів і підвищує ефективність дії інсуліну [5, 6, 22]. Є дані, що інсулін сприяє зростанню рівня мРНК і білка PFKFB-3 в культурі клітин аденокарциноми прямої кишки [23].

Незважаючи на важливість PFKFB-3 в регуляції гліколізу та глюконеогенезу, експресію мРНК PFKFB-3 та її сплайс-варіантів у різних органах при цукровому діабеті досі не вивчено. У даній роботі ми дослідили експресію PFKFB-3 в мозку, сім'яниках, серці, сітківці та скелетному м'язі, а також проаналізували ізоформи мРНК PFKFB-3 у контрольних та діабетичних щурів, щоб з'ясувати

внесок PFKFB-3 та її сплайс-варіантів у порушення гліколізу при цукровому діабеті.

**Матеріали і методи.** Досліди проводили на щурах-самцях лінії Wistar масою 220–250 г. Цукровий діабет викликали одноразовою ін'єкцією (внутрішньочеревно) стрептозотоцину (55 мг/кг маси тіла), як описано раніше [24, 25].

Експерименти розпочинали через два місяці після введення стрептозотоцину. До групи діабетичних тварин відібрано п'ять щурів з рівнем глюкози в крові більше 14 ммоль/л. Кров для визначення глюкози брали з хвостової вени. До контрольної групи також взято п'ять щурів. Для виділення РНК тканини контрольних і діабетичних тварин заморожували в рідкому азоті. Сумарну РНК виділяли з 20–200 мг тканини, застосовуючи метод екстракції РНК з використанням гуанідину, фенолу та хлороформу, як описано раніше [11]. Осади РНК промивали 75 %-м розчином етанолу і розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз.

Експресію мРНК PFKFB-3 досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) комплементарних ДНК (кДНК). Із тканин різних органів щурів виділяли РНК, яка надалі слугувала матрицею для синтезу кДНК за допомогою SuperScript II зворотної транскриптази («Invitrogen», США) та оліго(dT). Зворотну транскрипцію проводили згідно з рекомендаціями виробника в об'ємі 20 мкл, використовуючи для реакції 0,4 мкг сумарної РНК. Ампліфікацію кДНК PFKFB-3 (1 мкл продукту зворотної транскрипції, що відповідає 20 нг сумарної РНК, взятої для зворотної транскрипції) проводили за допомогою HotStarTaq Master Mix Kit («Qiagen», США) та «MasterCycler Personal» («Eppendorf», Німеччина).

ПЛР-ампліфікацію PFKFB-3 та сплайс-ізоформ здійснювали з використанням трьох специфічних для гена *pfkfb-3* прямих олігонуклеотидних праймерів: 5'-GTCACTGCGCTGGAGCATC-3' (M1), 5'-AGATGCCGTTGGAAGTACC-3' (M2) або 5'-CTGGAGCCTGTGATCATGG-3' (M3) та двох зворотних:

5'-ACTTCAGCATCAGTGCTTC-3' (M6) або 5'-GGTGACACTATTGCGTCTC-3' (M7).

Зазначені олігонуклеотиди відповідають послідовностям 114–132, 404–423, 1513–1531 (прямі

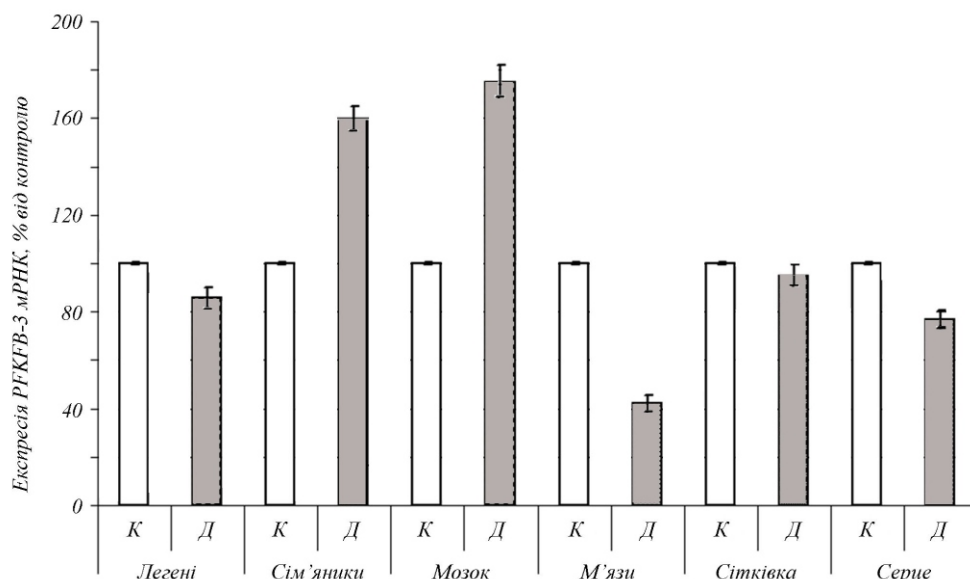


Рис. 1. Аналіз експресії мРНК PFKFB-3 в різних органах чотирьох контрольних (К) та чотирьох діабетичних (Д) щурів методом ПЛР у реальному часі. Для ампліфікації мРНК PFKFB-3 використано прямий (М4) та зворотний (М5) праймери. Інтенсивність експресії мРНК PFKFB-3 нормалізували за експресією мРНК -актину

праймери) та 2140–2122, 1881–1863 (зворотні праймери) секвенованої послідовності кДНК PFKFB-3 щура (GenBank номер NM\_157135). Експресію мРНК -актину використовували як контроль кількості аналізованої РНК.

Ампліфікацію кДНК -актину проводили за допомогою таких праймерів: прямого – 5'- CGTACCACTGGCATCGTGAT-3' і зворотного – 5'- GTGTTGGCGTACAGGTCTTT-3' [26].

Праймери отримано від компаній «Sigma» або «Metabion» (Німеччина). Продукти ПЛР розділяли електрофорезом в агарозному гелі і забарвлювали їх бромистим етидієм.

Два інших праймери використано для аналізу експресії мРНК PFKFB-3 методом ПЛР у реальному часі:

прямий (М4) –  
 5'-TGGACGACTTTCATGAAGAG-3'  
 та зворотний (М5) –  
 5'-GCATTGGCGAACTTCTTGC-3'.

Нуклеотидні послідовності наведених праймерів відповідають послідовностям 956–974 та 1247–1229 відомої послідовності кДНК PFKFB-3 щура (NM\_157135). Кількісну ПЛР проводили на апараті «Stratagene Mx 3000P cycler», використовуючи SYBRGreen Mix. Реакцію повторювали тричі. Аналіз результатів ПЛР у реальному часі виконували за допомогою спеціальної комп'ютерної програ-

ми «Differential expression calculator», а статистичний аналіз – в програмі Excel.

Отримані при ПЛР кДНК клонувано у векторі *pCRII-TOPO* згідно з протоколом, рекомендованим виробником *pCRII-TOPO Kit* («Invitrogen»). ДНК одержаних клонів розщеплювали рестриктазами і розділяли електрофорезом в агарозному гелі. Фрагменти кДНК відібраних клонів PFKFB-3 секвенували для ідентифікації сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3. ПЛР для секвенування ДНК виконували за допомогою спеціального набору (Dye terminator cycle sequencing kit; Applied Biosystems Inc.) згідно з рекомендаціями виробника, продукти автоматично аналізували в ДНК-секвенаторі (Applied Biosystems Inc., Model 3100, version 3.7).

**Результати і обговорення.** Експресію мРНК PFKFB-3 досліджували в легенях, сім'яниках, мозку, сітківці, серці та скелетному м'язі контрольних і діабетичних щурів методом кількісної ПЛР з прямим (М4) та зворотним (М5) праймерами. Аналіз експресії мРНК PFKFB-3 методом ПЛР у реальному часі чітко демонструє значне збільшення експресії цієї мРНК в мозку та сім'яниках щурів із стрептозотоциновим діабетом порівняно з контрольними тваринами (рис. 1). Разом з тим, не виявлено суттєвих змін в експресії мРНК PFKFB-3 в сітківці діабетичних тварин. Більше того, у щурів із стрептозотоциновим діабетом методом ПЛР у реальному часі встановлено істотне зниження

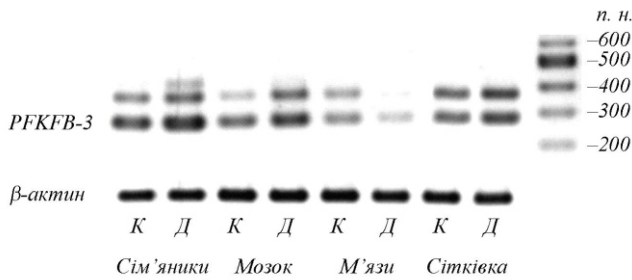


Рис. 2. Аналіз експресії мРНК PFKFB-3 в різних органах контрольних (К) та діабетичних (Д) щурів методом ПЛР (праймери М3 та М7) за даними електрофорезу в агарозному гелі. Наведено дані одного типового з п'яти незалежних експериментів

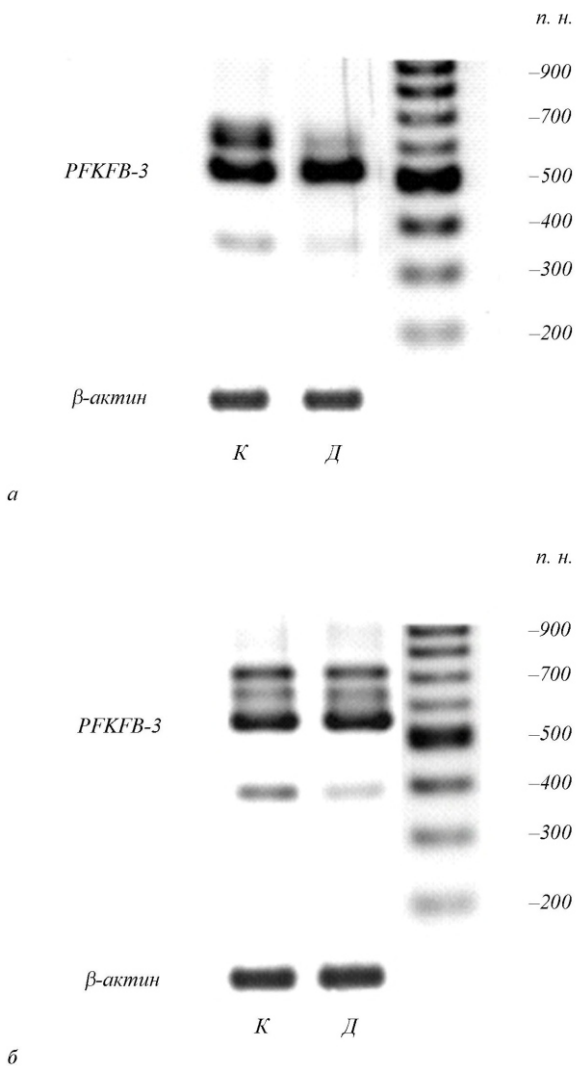


Рис. 3. Аналіз експресії мРНК PFKFB-3 в серці (а) та легенях (б) контрольних (К) і діабетичних (Д) щурів методом ПЛР (праймери М3 та М6) за даними електрофорезу в агарозному гелі. Наведено дані одного типового з п'яти незалежних експериментів

експресії PFKFB-3 мРНК у скелетному м'язі і значно менше – в серці та легенях, якщо порівняти з контрольними тваринами (рис. 1). Таким чином, у клітинах організму експериментальних діабетичних тварин спостерігаються різнонаправлені зміни в експресії мРНК PFKFB-3 в різних органах щурів. Після проведення ПЛР у реальному часі продукти реакції розділяли електрофорезом в агарозному гелі. Варто відмітити, що в продуктах ПЛР виявляється лише одна смуга в різних тканинах як контрольних, так і діабетичних тварин при використанні прямого праймера М4 та зворотного – М5. Останнє свідчить про те, що досліджувана кількісною ПЛР ділянка мРНК є спільною для всіх відомих ізоформ мРНК PFKFB-3.

У зв'язку з тим, що мРНК PFKFB-3 головного мозку щура має декілька альтернативних сплайс-варіантів [27], ми вивчали їхню присутність у різних тканинах нормальних щурів та зміни в експресії при цукровому діабеті. Для цього проводили ПЛР за допомогою праймерів, специфічних для 3'-кодуючої ділянки зазначеної мРНК. Як видно з даних, наведених на рис. 2, при електрофорезі продуктів ПЛР в агарозному гелі ідентифіковано по дві окремі смуги кДНК в головному мозку, сім'яниках, сітківці та скелетному м'язі як контрольних, так і діабетичних щурів при використанні для ампліфікації праймерів М3 та М7. Отримані результати вказують на те, що в головному мозку та сім'яниках щурів із стрептозотоциновим діабетом збільшується експресія ізоформ обох смуг кДНК, у той час як у скелетному м'язі знижується експресія переважно більших за розміром ізоформ мРНК PFKFB-3. Разом з тим, при використанні прямого праймера М3 та дистальнішого зворотного праймера М6 визначено по 3–4 окремі смуги кДНК в серці та легенях відповідно (рис. 3, а, б). Ця пара праймерів охоплює більшу ділянку мРНК і тому при ампліфікації синтезуються довші продукти порівняно з парою праймерів М3–М7 (рис. 2). У серцевому м'язі, як і в скелетному, також знижується при діабеті експресія більших за розміром ізоформ мРНК PFKFB-3, але в серці виявлено ще одну, значно меншу ізоформу мРНК PFKFB-3. Її експресія також знижується в серцевому м'язі щурів із стрептозотоциновим діабетом. Таку ж

смугу кДНК PFKFB-3 відмічено і в легенях, причому і тут експресія зазначеної ізоформи мРНК зменшується при діабеті, тоді як інтенсивність інших смуг суттєво не змінюється (рис. 3, б).

Для встановлення нуклеотидної послідовності ізоформ мРНК PFKFB-3 з різних органів щурів нами проведено клонування кДНК у векторі *pCRII-TOPO*. Клони аналізували електрофорезом в агарозному гелі, а потім секвенували клоновані фрагменти кДНК PFKFB-3 за допомогою прямого та зворотного праймерів M13. Із тканин щурів виділили сім ізоформ. Шість із них описано раніше [20]: одна не має вставок, а дві мають по одній вставці: 87 нуклеотидних залишків (додатковий екзон між 13-м та 14-м екзонами) або 23 нуклеотидних залишки (15-й екзон) [16, 20]. Ще дві ізоформи мають по дві вставки (87 + 23 або 23 + 53 нуклеотидних залишки), шоста має три вставки (87 + 23 + 53 нуклеотидних залишки). Вставка розміром 53 нуклеотидних залишки є додатковим екзоном, розташованим між екзонами 15 та 16. Природу його ще не з'ясовано. Вставка розміром 87 нуклеотидних залишків не змінює рамки зчитування, але додає 29 амінокислотних залишків, причому шість із них припадає на частку серину. Це може мати певне значення для регуляції активності ферменту через фосфорилування залишків серину. Декілька альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3 мають 15-й екзон розміром 23 нуклеотидних залишків [18]. Дані варіанти мРНК PFKFB-3 містять відмінний С-кінець через зміну рамки зчитування. Відомо, що одна з них посилено експресується в клітинах пухлин [19]. Припускають, що підвищення експресії PFKFB-3 в пухлинах значною мірою обумовлює посилення гліколізу та сприяє проліферації клітин [3, 19]. Ізоформи мРНК PFKFB-3, що містять додатковий екзон між 15-м та 16-м екзонами, також мають відмінний С-кінець внаслідок зміни рамки зчитування і відрізняються від інших як за кількістю, так і за положенням залишків серину, потенційних сайтів фосфорилування і регуляції активності ферменту. Сьома ізоформа виявилася новою (GenBank номер EU034674). Це найменша за розміром ізоформа мРНК PFKFB-3, що має велику делецію (174 нуклеотидних залишки; екзон 14) у порівнянні з усіма іншими варіантами

мРНК PFKFB-3. Вона є результатом альтернативного сплайсингу мРНК PFKFB-3. Важливо відмітити, що експресія цього альтернативного сплайс-варіанта мРНК PFKFB-3 знижується в легенях та серцевому м'язі діабетичних щурів.

Таким чином, дані, наведені на рис. 2 та 3, а, б, вказують на тканинспецифічний характер експресії альтернативних сплайс-варіантів PFKFB-3 та опосередкованість їхньої експресії інсуліном чи залежними від інсуліну процесами, що спостерігаються при цукровому діабеті. В серцевому та скелетному м'язах виявляється зниження, а в головному мозку та сім'яниках – посилення експресії мРНК PFKFB-3, причому зростає експресія як більших, так і менших альтернативних сплайс-варіантів. У той же час, зменшення експресії мРНК PFKFB-3 в серцевому та скелетному м'язах відбувається переважно за рахунок більших альтернативних сплайс-варіантів. До складу останніх входять ізоформи із вставкою 87 нуклеотидних залишків або з двома чи трьома вставками. Існують дані про те, що експресія сплайс-ізоформи із вставкою 87 нуклеотидних залишків суттєво залежить від проліферації та диференціації клітин печінки [28]. Такі результати вказують на важливість PFKFB-3 та його альтернативних сплайс-варіантів для метаболізму клітин у процесі їхнього росту і диференціації. Результати нашої роботи свідчать про можливість інсулін-залежного характеру регуляції альтернативного сплайсингу мРНК PFKFB-3. Варто зазначити, що альтернативні сплайс-варіанти PFKFB-3 в С-термінальній ділянці мають неоднакову кількість залишків серину та різне їхнє положення в амінокислотній послідовності PFKFB-3 і що саме це є дуже важливим для регуляції ферментативної активності за рахунок фосфорилування залишків серину [2]. Отже, виявлення і дослідження нових ізоферментів є досить суттєвим для розуміння механізмів тканинспецифічної регуляції гліколізу.

Детальні молекулярні механізми участі інсуліну в регуляції альтернативного сплайсингу мРНК PFKFB-3, а також роль різних ізоферментів у регуляції гліколізу заслуговують на подальше детальне вивчення. Прийнято вважати, що PFKFB-3 є пухлинспецифічним ферментом і його ізоформи

можуть бути використані як мішені при розробці антипухлинних препаратів. Варто відмітити, що в значній мірі це стосується і діабету, оскільки ізоформи PFKFB можуть бути терапевтичними мішенями при створенні антидіабетичних препаратів для зниження продукції глюкози в організмі [29].

**Висновки.** Встановлено, що при стрептозототициновому діабеті порушується експресія мРНК PFKFB-3, але в різних органах щурів неоднаково. У щурів із стрептозототициновим діабетом змінюється спектр альтернативних сплайс-варіантів мРНК PFKFB-3, причому також неоднаково в різних органах. Ідентифіковано унікальний альтернативний сплайс-варіант мРНК PFKFB-3, що не має 14-го екзона. Результати проведених досліджень вказують на те, що порушення гліколізу при стрептозототициновому діабеті можуть бути пов'язані зі змінами в експресії PFKFB-3 – ключового ферменту регуляції гліколізу, а також альтернативного сплайсингу мРНК PFKFB-3.

*V. G. Mykhalchenko, K. Tsuchihara, D. O. Minchenko, H. Esumi, O. M. Prystupiyuk, O. H. Minchenko*

6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA expression in streptozotocin-diabetic rats

#### Summary

*We have determined that changes in the expression of 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase mRNA in streptozotocin-diabetic rats vary in different organs. The expression of different splice variants of PFKFB-3 mRNA is organ specific and changes in diabetes. We have identified new splice variant of PFKFB-3 mRNA which has catalytic domains identical to those of the main isoform and other alternative splice variants of PFKFB-3 but differs by the length of C-terminus. Results of this investigation support possible role of PFKFB-3 isozymes in adaptation of the cells to disordered carbohydrate metabolism resulting from the insulin deficiency.*

*Keywords: PFKFB-3 mRNA; alternative splicing, lung, brain, heart, diabetes, rats.*

*V. Г. Михальченко, К. Тсучигара, Д. А. Минченко, Г. Есуми, А. М. Приступюк, А. Г. Минченко*

Експресія мРНК 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-3 у крыс со стрептозототициновим діабетом

#### Резюме

*Показано, что экспресия мРНК 6-фосфофрукто-2-киназы/фруктозо-2,6-бисфосфатазы-3 (PFKFB-3) в различных органах крыс с экспериментальным сахарным диабетом изменяется по-разному. Сплайс-варианты мРНК PFKFB-3 экспрессируются в отдельных органах специфически и их экспресия также изменяется при диабете. Выявлен новый сплайс-вари-*

*ант мРНК PFKFB-3, каталитические домены в котором идентичны основной изоформе и уже известным альтернативным сплайс-вариантам PFKFB-3, отличающийся от них лишь длиной С-концевой области. Результаты проведенных исследований указывают на то, что нарушение гликолиза при стрептозототициновом диабете может быть связано и с изменениями в экспрессии PFKFB-3 – ключевого фермента регуляции гликолиза.*

*Ключевые слова: PFKFB-3 мРНК, альтернативный сплайсинг, стрептозототициновый сахарный диабет, крысы.*

#### PERELIK LITERATURY

1. Rider M. H., Bertrand L., Vertommen D., Michels P. A., Rousseau G. G., Hue L. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis // *Biochem. J.*–2004.–**381**, N 3.– P. 561–579.
2. Bando H., Atsumi T., Nishio T., Niwa H., Mishima S., Shimizu C., Yoshioka N., Bucala R., Koike T. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/ PFKFB 3 family of glycolytic regulators in human cancer // *Clin. Cancer Res.*–2005.–**11**, N 16.– P. 5784–5792.
3. Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*–2006.–**9**, N 5.– P. 535–539.
4. Atsumi T., Nishio T., Niwa H., Takeuchi J., Bando H., Shimizu C., Yoshioka N., Bucala R., Koike T. 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**, N 12.–P. 3349–3357.
5. Wu C., Khan S. A., Peng L. J., Li H., Carmella S. G., Lange A. J. Perturbation of glucose flux in the liver by decreasing F26P2 levels causes hepatic insulin resistance and hyperglycemia // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*–2006.–**291**, N 3.–P. E536–E543.
6. Wu C., Okar D. A., Newgard C. B., Lange A. J. Increasing fructose 2,6-bisphosphate overcomes hepatic insulin resistance of type 2 diabetes // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*–2002.–**282**, N 1.–P. E38–E45.
7. Rousseau G. G., Hue L. Mammalian 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a bifunctional enzyme that control glycolysis // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*–1993.–**45**.–P. 99–127.
8. Okar D. A., Manzano A., Navarro-Sabate A., Riera L., Bartrons R., Lange A. PFK-2/FBPase 2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate // *Trends Biochem. Sci.*–2001.–**26**, N 1.– P. 30–35.
9. Okar D. A., Lange A. J. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes // *Biofactors.*–1999.–**10**, N 1.– P. 1–14.
10. Kawaguchi T., Veech R. L., Uyeda K. Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia. Roles of fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate // *J. Biol. Chem.*–2001.–**276**, N 30.– P. 28554–28561.
11. Minchenko A. G., Leshchinsky I., Opentanova I. L., Sang N., Srinivas V., Armstead V. E., Caro J. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene // *J. Biol. Chem.*–2002.–**277**, N 8.–P. 6183–6187.

12. *Minchenko O. H., Opentanova I. L., Minchenko D. O., Ogura T., Esumi H.* Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // *FEBS Lett.*—2004.—**576**, N 1.—P. 14–20.
13. *Hopfl G., Ogunshola O., Gassmann M.* HIFs and tumors – causes and consequences // *Amer. J. Physiol.*—2004.—**286**, N 4.—P. R608–R623.
14. *Lu H., Forbes R. A., Verma A.* Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in cancerogenesis // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 26.—P. 23111–23115.
15. *Minchenko O., Opentanova I., Caro J.* Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression *in vivo* // *FEBS Lett.*—2003.—**554**, N 3.—P. 264–270.
16. *Navarro-Sabate A., Manzano A., Riera L., Rosa J. L., Ventura F., Bartrons R.* The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure // *Gene.*—2001.—**264**, N 1.—P. 131–138.
17. *Hirata T., Kato M., Okamura N., Fukasawa M., Sakakibara R.* Expression of human placental-type 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in various cells and cell lines // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1998.—**242**, N 2.—P. 680–684.
18. *Chesney J., Mitchell R., Benigni F., Bacher M., Spiegel L., Al-Abed Y., Han J. H., Metz C., Bucala R.* An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: Role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—**96**, N 6.—P. 3047–3052.
19. *Atsumi T., Chesney J., Metz C., Leng L., Donnelly S., Makita Z., Mitchell R., Bucala R.* High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers // *Cancer Res.*—2002.—**62**, N 20.—P. 5881–5887.
20. *Watanabe F., Sakai A., Furuya E.* Novel isoforms of rat brain fructose 2-phospho 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase are generated by tissue-specific alternative splicing // *J. Neurochem.*—1997.—**69**, N 1.—P. 1–9.
21. *Kessler R., Eschrich K.* Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain // *Mol. Brain Res.*—2001.—**87**, N 2.—P. 190–195.
22. *Wu C., Okar D. A., Newgard C. B., Lange A. J.* Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppressing hepatic glucose production // *J. Clin. Invest.*—2001.—**107**, N 1.—P. 91–98.
23. *Duran J., Navarro-Sabate A., Pujol A., Perales J. C., Manzano A., Obach M., Gomez M., Bartrons R.* Overexpression of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase in the liver of transgenic mice results in weight gain // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2008.—**365**, N 2.—P. 291–297.
24. *Minchenko A. G., Stevens M. J., White L., Abatan O. I., Komjati K., Pacher P., Szabo C., Obrosova I. G.* Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose)polymerase activation // *FASEB J.*—2003.—**17**.—P. 1514–1516.
25. *Obrosova I. G., Minchenko A. G., Frank R. N., Seigel G. M., Zsengeller Z., Pacher P., Stevens M. J., Szabo C.* Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors counteract diabetes- and hypoxia-induced retinal vascular endothelial growth factor overexpression // *Int. J. Mol. Med.*—2004.—**14**, N 1.—P. 55–64.
26. *Drogat B., Auguste P., Nguyen D. T., Bouche-careilh M., Pineau R., Nalbantoglu J., Kaufman R. J., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M.* IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth *in vivo* // *Cancer Res.*—2007.—**67**, N 14.—P. 6700–6707.
27. *Riera L., Manzano A., Navarro-Sabate A., Perales J. C., Bartrons R.* Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells // *Biochim. et Biophys. Acta.*—2002.—**1589**, N 2.—P. 89–92.
28. *Duran J., Gomez M., Navarro-Sabate A., Riera-Sans L., Obach M., Manzano A., Perales J. C., Bartrons R.* Characterization of a new liver- and kidney-specific pfkfb3 isozyme that is downregulated by cell proliferation and dedifferentiation // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2008.—**367**, N 4.—P. 748–754.
29. *Wu C., Okar D. A., Kang J., Lange A. J.* Reduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes // *Curr. Drug Targets Immune Endocrinol. Metabol. Disord.*—2005.—**5**, N 1.—P. 51–59.

УДК 577.112:616

Надійшла до редакції 26.02.08