

УДК 577.112.7:616

Мінченко Д.О.^{1,2},
 Яворовський О.П.¹,
 Паустовський Ю.О.¹,
 Мінченко О.Г.²

МЕТИЛТРЕТБУТИЛОВИЙ ЕФІР ПОСИЛЮЄ ЕКСПРЕСІЮ МРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 ТА CLOCK У ЛЕГЕНЯХ ТА ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

¹ Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

² Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України

Резюме. Біологічний годинник, молекулярними компонентами якого є циркадальні регуляторні фактори, відіграє надзвичайно важливу роль у регуляції більшості фізіологічних та метаболічних процесів в організмі і порушення протікання циркадальних процесів в організмі є одною із причин виникнення низки патологічних процесів. У цій роботі проведено дослідження дії метилтретбутилового ефіру, токсичної та екологічно небезпечної сполуки, на рівень експресії найбільш важливих генів системи циркадального годинника — CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK, а також протеїнкінази SNARK. Одержані нами дані показали, що рівень експресії усіх цих генів значно посилюється у легенях та печінці щурів за тривалої (протягом місяця) дії гранично допустимої концентрації метилтретбутилового ефіру в повітрі робочої зони. Результати даної роботи свідчать про виражену дію низьких концентрацій МТБЕ на важливі механізми регуляції метаболічних процесів у клітинах життєво важливих органів на рівні експресії циркадальних генів CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK, а також протеїнкінази SNARK, що може призводити до порушення сигнальних каскадів у клітинах та розвитку різноманітних патологічних станів і що може слугувати важливим чутливим показником шкідливої дії на організм метилтретбутилового ефіру та можливо і інших хімічних забруднювачів довкілля.

Ключові слова: метилтретбутиловий ефір, експресія генів, CSNK1E, PER1, BMAL1, CLOCK, SNARK, легені, печінка, щури.

Більшість основних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі мають здатність до автономних коливань з періодом близьким до 24 годин, які називають циркадальними ритмами і які генеруються в гіпоталамусі системою біологічного годинника, молекулярну основу якого складають регуляторні та транскрипційні фактори, що кодуються циркадальними генами груп Період (Period) та Криптохромів (Cryptochromes), газеїнкіназ, BMAL (brain and muscle ARNT-like protein) та CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) [1–9]. Циркадальні ритми з періодом близьким до 24 годин регулюють фундаментальні фізіологічні функції майже у всіх організмів і тісно пов'язані з метаболічним гомеостазом. Вони можуть мати як видові особливості, так і індивідуальні [10]. Циркадальні фактори є ключовими регуляторами різноманітних метаболічних процесів як в нормі, так і за різних патологічних станів. Рівень експресії генів, що кодують синтез циркадальних регуляторних факторів, щоденно зазнають автономних

коливань і визначають циркадальний характер протікання різноманітних фізіологічних та метаболічних процесів в організмі. Дисрегуляція циркадальних ритмів, зокрема сну, який є інтегральною частиною нашого життя і контролюється біологічним годинником, може сильно впливати здоров'я, змінювати метаболізм і приводити до ожиріння та метаболічних захворювань [11, 12].

Основу біологічного годинника ссавців складає група протеїнів, яка включає не менше восьми факторів: CLOCK, BMAL1, PER1 (period 1), PER2, PER3, CRY1 (cryptochrome 1), CRY2 та REV-ERВальфа. BMAL1 та CLOCK є транскрипційними факторами, що утворюють транскрипційно активний комплекс шляхом гетеродимеризації, здатний зв'язуватися з *cis*-діючим елементом у промоторі різних генів-мішеней, включаючи PER1, PER2, PER3, CRY1 та CRY2, і посилювати транскрипцію самого BMAL1, генеруючи позитивну петлю системи біологічного годинника. З іншого боку, комплекс CRY-PER формує негативну петлю взаємозв'язків годинни-

ка шляхом пригнічення транскрипційної активності гетеродимерного комплексу CLOCK/BMAL1. Іншу негативну петлю взаємозв'язків циркадального годинника формує REV-ERВальфа, який пригнічує транскрипційну активність комплексу CLOCK/BMAL у ядрі [9].

Рядом досліджень було встановлено, що порушення в регуляції експресії циркадальних генів мають місце за деяких захворювань і можуть бути причетні також до виникнення та прогресії злоякісних пухлин [13–23]. Останнім часом виявлена залежність експресії ряду циркадальних генів від гіпоксії [24], що також значною мірою може сприяти прогресії більшості злоякісних пухлин за порушень у функції цих генів. Експресія більшості циркадальних генів та функція факторів, що кодується ними, знаходиться під контролем протеїнази і, зокрема, казеїнази-1ε та Ідельта, які також беруть участь у регуляції ряду інших надзвичайно важливих процесів [25–29]. Так, було встановлено, що казеїнази-1ε та Ідельта зв'язується з PER1, PER2 PER3 і фосфорилує їх, що істотно змінює функціонування генів, які контролюють цикл поділу клітин (Cyclin D1, Cyclin A, MDM2, cMYC і GADD45α) та низки онкогенів, а також генів, що пригнічують ріст пухлин [16, 25, 26, 31, 35]. Ця протеїназа бере також участь у дестабілізації -катенін-деградуючого комплексу [32], у функціонуванні TGF-сигнального каскаду [29], в інактивації білка BID через його розщеплення каспазою 8 [33], фосфорилує P53, протеїн, що пригнічує ріст пухлин [34], негативно регулює фосфо-АКТ через PTEN [28]. Крім того, для циркадальних факторів у ссавців характерне явище зворотного зв'язку в механізмах регуляції, що надзвичайно важливо для точної і чіткої роботи циркадального годинника [36, 37].

Протеїназа SNARK (SNF1 протеїназа, що активується AMP) є представником AMPK кіназ, що відносяться до серин/треонінових протеїназ [38, 39]. Відомо, що активність протеїнази SNARK змінюється за різноманітних стресових станів клітин, але не у всіх типах клітин, суттєво залежить від рівня глюкози і глютаміну в клітинах, бере участь в індукованій CD95 рухливості та інвазивності. Недавно було виявлено, що нокаутні по гену протеїнази SNARK миші характеризуються ожирінням, відповідними порушеннями метаболізму і мають схильність до виникнення злоякісних пухлин подібно до тварин, нокаутних по циркадальним генам [15, 40, 41, 42].

Метилтретбутиловий ефір – 2-метокси-2-метил-пропан (МТБЕ) є екологічно небезпечною

хімічною сполукою, що використовується для виробництва не етильованих бензинів. Дослідженнями останніх років встановлено, що МТБЕ є одним із найнебезпечніших глобальних хімічних забруднювачів довкілля в зв'язку з його високою стабільністю, здатністю накопичуватися в ґрунті і підземних джерелах водопостачання та вираженим негативним впливом на здоров'я людей [43–45]. Забруднення цією сполукою довкілля може стати причиною отруєння людей, може ініціювати розвиток ряду патологічних станів: хронічні нефропатії, гіпертрофія печінки, алергічні та респіраторні захворювання, нейротоксичні прояви, в тому числі і виникнення злоякісних новоутворень в нирках, печінці, сім'яниках та лімфовузлах, ініціювати розвиток лейкемій [44 – 48]. Більше того, враховуючи інтенсивність використання бензинів з МТБЕ та високу стабільність цієї хімічної сполуки, можна вважати її досить небезпечним глобальним забруднювачем довкілля [46].

В експериментах на щурах та мишах встановлено, що повторні інгаляції МТБЕ призводять до порушення функції нирок, появи різних злоякісних пухлин та збільшення смертності [43, 45]. В досліді на двох видах риб було показано, що короткотривала експозиція риб у воді з МТБЕ або третбутанолом призводить до деформації очей і ротової порожнини та до підвищеної смертності личинок [49]. Основними метаболітами МТБЕ у крові є метанол та третбутиловий алкоголь, тоді як у печінці він перетворюється за участю цитохрому Р-450 до формальдегіду та третбутанолу, але основним місцем накопичення МТБЕ є жирова тканина і дещо в меншій мірі кров та мозок [44, 50, 51]. Разом з тим, детальні механізми токсичної дії МТБЕ, що ініціюють розвиток різних захворювань, зокрема злоякісних пухлин, залишаються не з'ясованими.

Раніше нами було встановлено, що внутрішньо-шлункове введення різних доз МТБЕ щурам протягом 1 – 2 місяців приводить до значних порушень в експресії циркадальних генів, протеїнази та PFKFB, а також альтернативного сплайсингу PFKFB4 та VEGF, що переконливо свідчило про високу чутливість протеїнази SNARK та циркадальних генів, як і альтернативний сплайсинг PFKFB4 до дії цієї токсичної хімічної сполуки [52–55]. Актуальним постало питання про можливість впливу на організм гранично допустимої концентрації (ГДК) МТБЕ у повітрі робочої зони.

У зв'язку з цим, метою даного дослідження було вивчення можливих молекулярних механізмів впливу екологічно небезпечної хімічної сполуки

МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на організм. Для цього досліджували тривалу (протягом місяця) дію цієї хімічної сполуки на експресію протеїнкінази SNARK та циркадіальних генів у легенях і печінці шурів.

Матеріали і методи досліджень. Досліди проводили на щурах лінії Wistar, вагою 230–260 грамів. Тварин піддавали дії МТБЕ в концентрації 100 мг/м³ (на рівні нині чинної в Україні ГДК цієї речовини в повітрі робочої зони) у затравочній камері по 4 години на день, п'ять днів на тиждень протягом чотирьох тижнів.

Виділення РНК. Тотальні РНК виділяли із печінки та легень шурів за допомогою реагенту Трізол (Trizol; Invitrogen, USA) згідно протоколу виробника як описано раніше [56]. Осаджували РНК із водної фази рівним об'ємом 2-пропанолу. Осади РНК промивали двічі 75 % етанолом, розчиняли у воді, що не містить домішок рибонуклеаз, і використовували для синтезу комплементарних ДНК (кДНК).

Аналіз експресії мРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK. Експресію мРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK досліджували методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК, отриманих методом зворотної транскрипції мРНК, а також методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Синтез кДНК проводили за допомогою QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Німеччина) згідно протоколу виробника, використовуючи тотальну РНК із легень та печінки шурів як матрицю. Для ампліфікації кДНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK використовували HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Німеччина) та специфічні для цих генів шурів пари праймерів, отриманих із компанії Sigma, США. Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію проводили на апараті "Stratagene Mx 3000P cycler". Для ампліфікації кДНК протеїнкінази SNARK та циркадіальних генів, а також бета-актину, як контрольного гена, використовували ABsolute qPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Великобританія).

Ампліфікацію кДНК протеїнкінази SNARK (SNF1 протеїнкінази, що активується AMP) проводили з використанням таких праймерів: прямого – 5'-AAGTCTCGGCAGCGTGAATC-3' та зворотного 5'-CAGGATGCTGTCCCTCACTCA-3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 1544–1564 та 1737–1718, відповідно, в мРНК SNARK щура (GenBank номер NM_001007617).

Для ампліфікації кДНК казеїнкінази-1εпси-лон (CSNK1E) були використані прямий (5'-GACATCTACCTGGGTGCCAAC-3') та зворотний (5'-TGATCATCTGGTCCGCCAGC-3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 64–84 та 340–321 у послідовності мРНК CSNK1E щура (GenBank номер NM_031617).

Ампліфікацію кДНК циркадіального фактора PER1 проводили з використанням таких праймерів: прямого – 5'-ТСТТТСТСГААСТГ-ГАТГ-3' та зворотного 5'-GGAAGCCTCTCATTAGACTGC-3', нуклеотидні послідовності яких відповідають залишкам нуклеотидів 3699–3718 та 3983–3963, відповідно, в мРНК Per1 щура (GenBank номер NM_001034125).

Для ампліфікації кДНК BMAL1 були використані прямий (5'-TGACCCATGGAAGGTTAG-3') та зворотний (5'-AATCCATCTGCTGCCCTGAG-3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 753–772 та 1042–1061 в послідовності мРНК BMAL1 щура (GenBank номер NM_024362).

Для ампліфікації кДНК CLOCK були використані прямий (5'-TGCACAGTCAGATGCTAGTG-3') та зворотний (5'-TGATCCACAAGATCAGATGG-3') праймери. Нуклеотидні залишки цих праймерів відповідають залишкам нуклеотидів 264–283 та 455–436 в послідовності мРНК CLOCK щура (GenBank номер NM_021856).

Для контролю кількості РНК, взятої для аналізу, досліджували експресію мРНК АСТВ (бета-актину). Ампліфікацію кДНК бета-актину проводили з використанням наступних праймерів: прямий – 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' та зворотний - 5'-AGCACTGTGTTGCGGTACAG-3'. Прямий праймер починається із 704-го нуклеотидного залишку (5'-позиція), а зворотний – з 937-го нуклеотидного залишку (3'-позиція; GenBank номер X00351). Ці ж пари праймерів були використані також і для ампліфікації в полімеразній ланцюговій реакції у реальному часі. Експресія кожної смуги кДНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK порівнювалася з експресією мРНК бета-актину. Зміни рівня експресії мРНК циркадіальних факторів SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK у легенях та печінці за дії МТБЕ порівнювали з відповідними значеннями у контрольних тварин, які було прийнято за 100%. Аналіз результатів виконували з допомогою спеціальної комп'ютерної програми "Differential expression calculator", а статистичний аналіз проводили в програмі Microsoft Excel.

Продукти ампліфікації аналізували електрофорезом в 2% агарозному гелі, забарвлюючи кДНК за допомогою 5x Sight DNA Stain (EUROMEDEA). Гелі аналізували в системі Quantity One BioRad System (США).

Результати дослідження та їх обговорення. У зв'язку з тим, що порушення системи регуляції циркадальних процесів в організмі є одною із причин виникнення ряду патологічних процесів, в тому числі і злоякісних новоутворень, ми досліджували експресію мРНК ключових циркадальних генів та протеїнкінази SNARK у легенях та печінці щурів в нормі та за тривалої дії на тварин низької концентрації МТБЕ методами полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отрима-

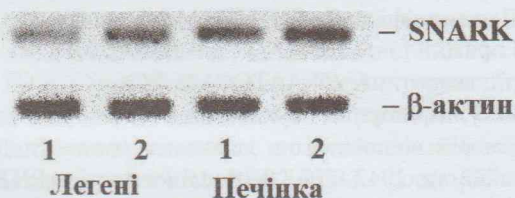


Рис. 1. Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК SNF1 протеїнкінази, що активується AMP, (SNARK) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції комплементарних ДНК (кДНК), отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 – контрольні тварини, а 2 – дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження

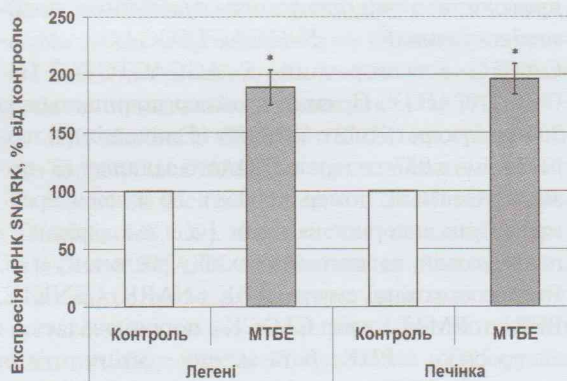


Рис. 2. Кількісне визначення рівня експресії мРНК SNF1 протеїнкінази, що активується AMP, (SNARK) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК SNARK нормалізували по бета-актину і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100 %

них шляхом зворотної транскрипції мРНК. Результати дослідження експресії мРНК протеїнкінази SNARK представлені на рис. 1 та 2. Встановлено, що рівень експресії мРНК протеїнкінази SNARK майже вдвічі збільшується як у легенях, так і у печінці щурів під впливом МТБЕ на рівні ГДК в повітрі робочої зони. Ці дані узгоджуються з отриманими нами раніше даними про підвищення рівня експресії цієї протеїнкінази під впливом тривалої дії лише малих доз метил-трет-бутилового ефіру за умов його внутрішньо-шлункового введення щурам [52].

Як видно із даних, наведених на рис. 3 та 4, рівень експресії іншої протеїнкінази, казеїнкінази-1 епсилон, також суттєво збільшувався за дії на ор-

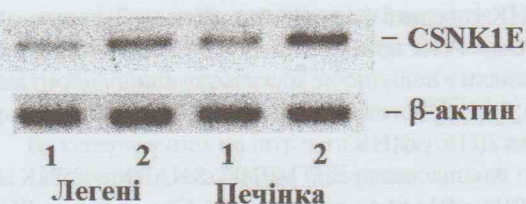


Рис. 3. Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК казеїнкінази-1 епсилон (CSNK1E) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 – контрольні тварини, а 2 – дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження

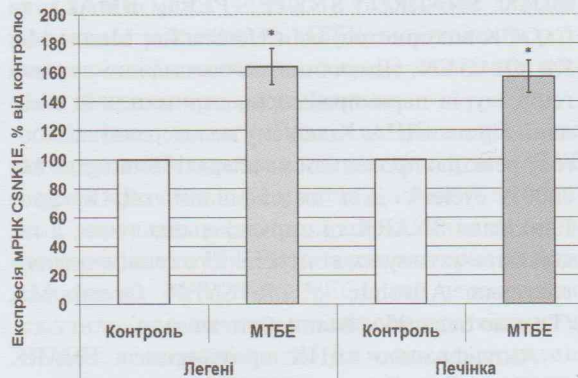


Рис. 4. Кількісне визначення рівня експресії мРНК казеїнкінази-1 епсилон (CSNK1E) у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК CSNK1E нормалізували по бета-актину і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100 %

ганізм щурів МТБЕ на рівні ГДК в повітрі робочої зони: у легенях на 64 %, а у печінці на 57 %. Рівень експресії циркадіального транскрипційного фактора BMAL1 за дії на організм щурів МТБЕ збільшувався у легенях на 73 %, а у печінці на 91 % (рис. 5 та 6). Дослідження експресії іншого циркадіального транскрипційного фактора CLOCK показало, що як у контрольних щурів, так і у тварин, що піддавалися дії МТБЕ, виявляється дві ізоформи цього транскрипційного фактора і що рівень експресії обох ізоформ збільшується під впливом цієї токсичної хімічної сполуки (рис. 7 та 8). В той же час, під впливом тривалої дії МТБЕ на рівні ГДК для повітря робочої зони рівень експресії

мРНК CLOCK посилюється у легенях в значно більшій мірі порівняно з печінкою: у легенях на 225 %, а у печінці лише на 62 % (рис. 8). Підвищення рівня експресії мРНК CLOCK було виявлено нами і раніше за умов тривалої дії малих доз МТБЕ при його внутрішньо-шлунковому введенні щурам, але ефект був значно меншим [52]. В той же час, за умов внутрішньо-шлункового введення щурам малих доз МТБЕ збільшення рівня експресії мРНК казеїнкінази-1εpsilon були виявлені лише у печінці, а мРНК циркадіального транскрипційного фактора BMAL1 – лише у легенях [52].

При дослідженні експресії циркадіального фактора PER1 було також виявлено значне збіль-

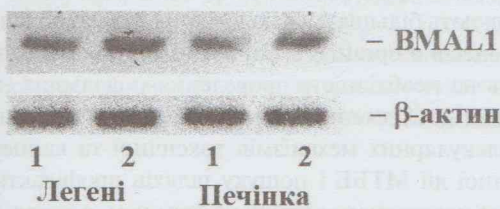


Рис. 5. Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК циркадіального гена BMAL1 у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 – контрольні тварини, а 2 – дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження

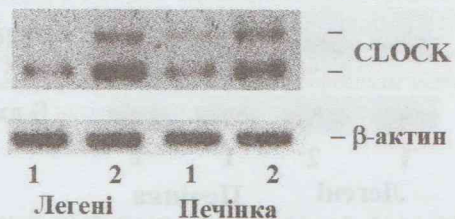


Рис. 7. Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК циркадіального гена CLOCK у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 – контрольні тварини, а 2 – дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження

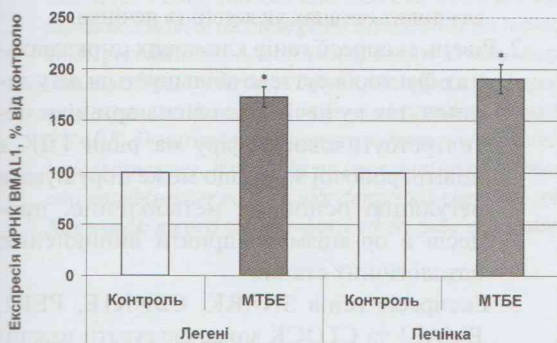


Рис. 6. Кількісне визначення рівня експресії мРНК циркадіального гена BMAL1 у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК BMAL1 нормалізували по бета-актину і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100 %

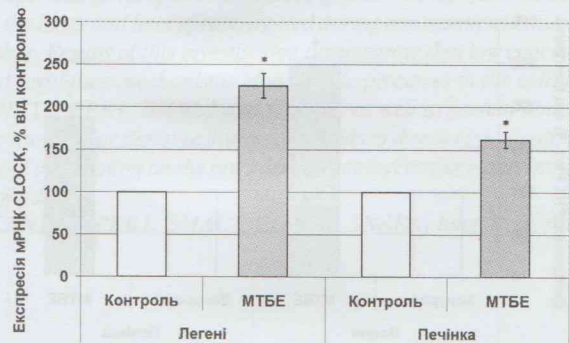


Рис. 8. Кількісне визначення рівня експресії мРНК циркадіального гена CLOCK у легенях та печінці щурів методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК CLOCK нормалізували по бета-актину і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100 %

шення рівня мРНК як у легенях, так і у печінці шурів за дії низьких концентрацій МТБЕ, але у легенях ефект цієї токсичної хімічної сполуки був значно більшим (рис. 9 та 10). Так, під впливом тривалої дії МТБЕ на рівні ГДК в повітрі робочої зони рівень експресії мРНК PER1 збільшився у легенях на 246 %, а у печінці лише на 85 % порівняно з контрольними тваринами.

Більш виражені зміни в рівнях експресії циркадальних факторів PER1 та CLOCK у легенях порівняно з печінкою можуть бути обумовлені тим, що саме через легені МТБЕ надходить до організму, а також особливостями епітеліальних клітин легень і альвеоцитів та різними шляхами метаболізму

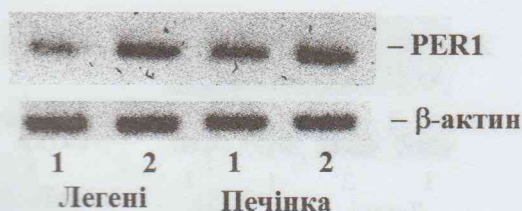


Рис. 9. Вплив тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони на рівень експресії мРНК циркадального гена PER1 у легенях та печінці шурів методом полімеразної ланцюгової реакції кДНК, отриманих шляхом зворотної транскрипції мРНК. 1 – контрольні тварини, а 2 – дія МТБЕ. Рівень експресії мРНК бета-актину досліджували для контролю кількості РНК, взятої для дослідження

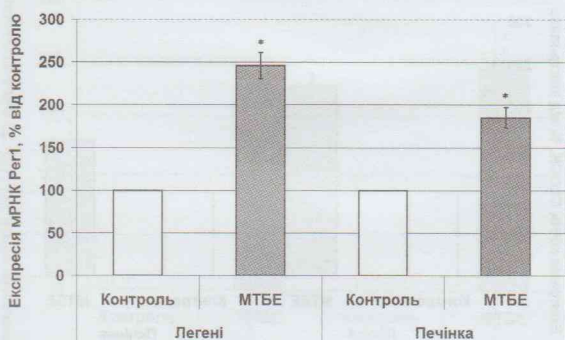


Рис. 10. Кількісне визначення рівня експресії мРНК циркадального гена PER1 у легенях та печінці шурів методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі за тривалої (протягом місяця) дії МТБЕ на рівні ГДК у повітрі робочої зони. Рівень експресії мРНК PER1 нормалізували по бета-актину і виражали у процентах від контролю, прийнятого за 100 %

МТБЕ у цих тканинах. Наведені вище дані переконливо свідчать про залежність змін в рівнях експресії протеїнкінази SNARK та основних циркадальних факторів як від величини доз МТБЕ, так і від способу його надходження до організму.

Таким чином, результати даної роботи вказують на виражену дію МТБЕ на рівні ГДК на експресію генів надзвичайно важливих протеїнкіназ та циркадальних факторів, відповідальних за регуляцію основних метаболічних процесів у клітинах організму у таких життєво важливих органах як легені та печінка. Отримані результати вказують на те, що дія МТБЕ на організм може бути опосередкована, принаймні частково, порушенням функції біологічного годинника шляхом змін в експресії циркадальних факторів, які контролюють більшість фізіологічних та метаболічних процесів в організмі. Отримані результати вказують на необхідність проведення подальших наукових досліджень з метою з'ясування детальних молекулярних механізмів токсичної та канцерогенної дії МТБЕ і пошуку шляхів профілактики його негативного впливу на організм, а також перегляду ГДК цієї речовини в повітрі робочої зони. На нашу думку, одним із механізмів дії низьких концентрацій МТБЕ на організм можуть бути порушення функціонування системи біологічного годинника та сигнальних каскадів у клітинах.

Висновки

1. Тривала дія метилтретбутилового ефіру на організм на рівні ГДК у повітрі робочої зони призводить до збільшення рівня експресії мРНК протеїнкінази SNARK у таких життєво важливих органах як легені та печінка.
2. Рівень експресії генів ключових циркадальних факторів суттєво збільшується як у легенях, так і у печінці, за дії на організм метилтретбутилового ефіру на рівні ГДК в повітрі робочої зони, що може порушувати регуляцію основних метаболічних процесів в організмі і сприяти виникненню патологічних станів.
3. Експресія генів SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 та CLOCK може слугувати важливим чутливим показником шкідливої дії хімічних забруднювачів довкілля у досить низьких концентраціях.
4. Гранично допустима концентрація метилтретбутилового ефіру в повітрі робочої зони (1 мг/м³) не забезпечує безпечних умов праці осіб, що контактують з цією речовиною, і потребує перегляду у бік зменшення.

МЕТИЛТРЕТБУТИЛОВЫЙ ЭФИР УСИЛИВАЕТ ЭКСПРЕССИЮ МРНК SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 И CLOCK В ЛЕГКИХ И ПЕЧЕНИ КРЫС

Минченко Д.А., Яворовский А.П., Паустовський Ю.А., Минченко А.Г.

Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца

Институт биохимии им. А.В. Палладина Национальной академии наук Украины

Резюме. Биологические часы, молекулярными компонентами которых являются циркадиальные регуляторные факторы, играет чрезвычайно важную роль в регуляции большинства физиологических и метаболических процессов в организме и нарушение протекания циркадиальных процессов в организме есть одной из причин возникновения ряда патологических процессов. В этой работе проведено исследование влияния метил-третбутилового эфира, токсичного и экологически опасного химического соединения, на уровень экспрессии наиболее важных генов системы циркадиальных часов — CSNK1E, PER1, BMAL1 и CLOCK, а также протеинкиназы SNARK. Полученные нами данные показали, что уровень экспрессии всех этих генов значительно усиливается в легких и печени крыс под влиянием продолжительного (в течение месяца) действия предельно допустимой концентрации метил-третбутилового эфира в воздухе рабочей зоны. Результаты данной работы свидетельствуют о выраженном влиянии низких концентраций метил-третбутилового эфира на важные механизмы регуляции метаболических процессов в клетках жизненно важных органов на уровне экспрессии циркадиальных генов CSNK1E, PER1, BMAL1 и CLOCK, а также протеинкиназы SNARK. Это может приводить к нарушению сигнальных каскадов в клетках и развитию различных патологических состояний и может служить важным чувствительным показателем вредного действия на организм метил-третбутилового эфира, а возможно и других химических веществ, загрязняющих окружающую среду.

METHYL TERTIARY-BUTYL ETHER ENHANCES THE EXPRESSION OF SNARK, CSNK1E, PER1, BMAL1 AND CLOCK IN RAT LUNG AND LIVER

Minchenko D.O., Yavorovsky O.P., Paustovsky Y.O., Minchenko O.H.

O.O. Bogomolets National Medical University

Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine

Abstract. Circadian regulatory factors are the molecular components of biological clock, which plays an important role in the regulation of most physiological and metabolic processes in organism. The disturbance of circadian processes behaviour in the organism leads to developing of different pathology. In this work we studied effect of methyl tertiary-butyl ether, toxic and ecologically dangerous chemical compounds, on the expression level of protein kinase SNARK as well as CSNK1E, PER1, BMAL1 and CLOCK, which are most important genes of circadian clock system. We have shown that expression level of all these genes significantly increased in the lungs and liver of rats, treated during one month with maximum permissible concentration of methyl tertiary-butyl ether. Results of this investigation demonstrate that low concentrations of methyl tertiary-butyl ether affects the important regulatory mechanisms of metabolic processes in the cells of vital organs at the expression level of circadian genes CSNK1E, PER1, BMAL1 and CLOCK as well as protein kinase SNARK. Disturbance of these genes expression can destroy the cellular signal pathways and leads to developing of pathological processes. It could be an important sensitive marker of toxic action on the organism the methyl tertiary-butyl ether and possibly other ecologically dangerous chemical compounds.

Key words: methyl tertiary-butyl ether, gene expression, CSNK1E, PER1, BMAL1, CLOCK, SNARK, lung, liver, rats

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dunlap J.C. Molecular bases for circadian clocks // Cell, 1999, 96, N 2. P. 271-290.
2. Gonze D., Goldbeter A. Circadian rhythms and molecular noise // Chaos, 2006, 16, N 2, P. 026110.
3. Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 2001, 17, P. 215-253.
4. Crumbley C., Burris T.P. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB // PLoS ONE, 2011, 6, N 3, P. E17290.
5. Eide E.J., Woolf M.F., Kang H. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation // Mol. Cell. Biol., 2005, 25, N 7, P. 2795-2807.

6. Liu A.C., Tran H.G. Redundant function of REV-ERB α and β and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms // *PLoS Genet.*, 2008, 4, N 2, P. e1000023.
7. Oishi K., Shirai H., Ishida N. CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α) in mice // *Biochem. J.*, 2005, 386, PT 3, P. 575-581.
8. Rudic R.D., McNamara P., Curtis A.M. et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis // *PLoS Biol.*, 2004, 2, N 11, P. E377.
9. Emery P., Reppert S.M. A rhythmic Ror // *Neuron*, 2004, 43, N 4, P. 443-446.
10. Teboul M., Barrat-Petit M.-A., Li X.M. et al. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells // *J. Mol. Med.*, 2005, 83, N , P. 693-699.
11. Huang W., Ramsey K.M., Marcheva B., Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J. Clin. Invest.* 2011;121(6): 2133-2141.
12. Laposky A.D., Bass J., Kohsaka A., Turek F.W. Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett.* 2008; 582(1): 142-151.
13. Bray M.S., Young M.E. The role of cell-specific circadian clocks in metabolism and disease. *Obes. Rev.* 2009; 10 Suppl. 2: 6-13.
14. Kovac J., Husse J., Oster H. A time to fast, a time to feast: the crosstalk between metabolism and the circadian clock. *Mol Cells.* 2009; 28(2): 75-80.
15. Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A. et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice // *Science*, 2005, 308, N 5724, P. 1043-1045.
16. Gr?chez-Cassiau A., Rayet B., Guillaumond F. et al. The circadian clock component bmal1 is a critical regulator of p21waf1/cip1 expression and hepatocyte proliferation // *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, N 8, 4535-4542.
17. You S., Wood P.A., Xiong Y. et al. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression // *Breast Cancer Res. Treat.*, 2005, 91, N 1, P. 47-60.
18. Chen S.T., Choo K.B., Hou M.F. et al. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis*, 2005, 26, N 7, P. 1241-1246.
19. Winter S.L., Bosnoyan-Collins L., Pinnaduwege D., Andrulis I.L. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors // *Neoplasia*, 2007, 9, N 10, P. 797-800.
20. Lee C.C. The circadian clock and tumor suppression by Mammalian period genes. *Methods Enzymol.*, 2005, 393, P. 852-861.
21. Bechtold D.A., Gibbs J.E., Loudon A.S. Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, 31, N 5, P. 191-198.
22. Shih H.C., Choo K.B., Chang T.J. et al. Disturbance of circadian gene expression in endometrial cancer: detection by real-time quantitative RT-PCR // *Oncol. Rep.*, 2005, 14, N 6, P. 1533-1538.
23. Gery S., Gombart A.F., Yi W.S. et al. Transcription profiling of C/EBP targets identifies Per2 as a gene implicated in myeloid leukaemia // *Blood*, 2005, 106, N 8, P. 2827-2836.
24. Chilov D., Hofer T., Bauer C. et al. Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain // *FASEB J.*, 2001, 15, P. 2613-2622.
25. Vielhaber E., Eide E., Rivers A. et al. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon // *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20, N 13, P. 4888-4899.
26. Keesler G.A., Camacho F., Guo Y. et al. Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport*, 2000, 11, N 5, P. 951-955.
27. Shirogane T., Jin J., Ang X.L., Harper J.W. SCF β -TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein // *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, N 29, P. 26863-26872.
28. Okamura A., Iwata N., Tamekane A. et al. Casein kinase Iepsilon down-regulates phospho-Akt via PTEN, following genotoxic stress-induced apoptosis in hematopoietic cells // *Life Sci.*, 2006, 78, N 14, P.1624-1629.
29. Waddell D.S., Liberati N.T., Guo X. et al. Casein kinase Iepsilon plays a functional role in the transforming growth factor-beta signaling pathway // *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, N 28, P. 29236-29246.
30. Eide E.J., Vielhaber E.L., Hinz W.A., Virshup D.M. The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon // *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, N 19, P. 17248-17254.
31. Akashi M., Tsuchiya Y., Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells // *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, N 6, P. 1693-1703.
32. Gao Z.H., Seeling J.M., Hill V. et al. Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99, N 3, P. 1182-1187.
33. Desagher S., Osen-Sand A., Montessuit S. et al. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8 // *Mol. Cell.*, 2001, 8, N 3, P. 601-611.

34. Knippschild U., Milne D.M., Campbell L.E. et al. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase1 delta in response to topoisomerase-directed drugs // *Oncogene*, 1997,15, N 14, P. 1727-1736.
35. Miyazaki K., Nagase T., Mesaki M. et al. Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts // *Biochem. J.*, 2004, 380, PT 1, P. 95-103.
36. Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H. et al. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function // *Nat. Genet.*, 2006, 38, N 3, P. 312-319.
37. Motzkus D., Loumi S., Cadenas C. et al. Activation of human period-1 by PKA or CLOCK/BMAL1 is conferred by separate signal transduction pathways // *Chronobiol. Int.*, 2007, 24, N 5, P. 783-792.
38. Legembre P., Schickel R., Barnhart B.C., Peter M.E. Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness // *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, N 45, P. 46742-46747.
39. Lefebvre D.L., Rosen C.F. Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses // *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1724, N 1-2, P. 71-85.
40. Lee C.C. The circadian clock and tumor suppression by Mammalian period genes. *Methods Enzymol.*, 2005, 393, P. 852-861.
41. Fu L., Pelicano H., Liu J., Huang P., Lee C. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo // *Cell*, 2002, 111, N 1, P. 41-50.
42. Tsuchihara K., Ogura T., Fujioka R., Fujii S., Kuga W., Saito M., Ochiya T., Ochiai A., Esumi H. Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci // *Cancer Sci.*, 2008, 99, N 4, P. 677 - 682.
43. McGregor D. Ethyl tertiary-butyl ether: a toxicological review // *Crit. Rev. Toxicol.*, 2007, 37, N 4, 287 - 312.
44. Hutcheon D.E., Arnold J.D., Hove W., Boyle J., 3rd. Disposition, metabolism, and toxicity of methyl tertiary butyl ether, an oxygenate for reformulated gasoline // *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, 47, N 5, P. 453 - 464.
45. Mehlman M.A. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil-refining and petrochemical industry--Part XXII: Health hazards from exposure to gasoline containing methyl tertiary butyl ether: study of New Jersey residents // *Toxicol. Ind. Health*, 1996, 12, N 5, P. 613 - 627.
46. Яворовський О.П., Зенкіна В.І. Метил-третбутиловий ефір як глобальний забруднювач довкілля. Токсикологічні та екологічні аспекти ризику впливу в Україні // *Довкілля та здоров'я*, 2006, № 4 (35), С.75-80.
47. McGregor D. Methyl tertiary-butyl ether: studies for potential human health hazards // *Crit. Rev. Toxicol.*, 2006, 36, N 4, P. 319 - 358.
48. Ahmed F.E. Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline // *Toxicol. Lett.*, 2001, 123, N 2-3, P. 89-113.
49. Moreels D., Lodewijks P., Zegers H. et al. Effect of short-term exposure to methyl-tert-butyl ether and tert-butyl alcohol on the hatch rate and development of the African catfish, *Clarias gariepinus* // *Environ. Toxicol. Chem.*, 2006, 25, N 2, P. 514 - 519.
50. Clary J.J. Methyl tert butyl ether systemic toxicity // *Risk Anal.*, 1997, 17, N 6, P. 661 - 672.
51. Imbriani M., Ghittori S., Pezzagno G. Partition coefficients of methyl tert-butyl ether (MTBE) // *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, 1997, 19, N 3, P. 63 - 65.
52. Мінченко О.Г., Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Завгородній І.В., Паустовський Ю.О., Тсучігара К., Есумі Г. Експресія казеїнкінази-1 та SNARK в печінці, легенях та міокарді як показник впливу метил-третбутилового ефіру на організм лабораторних тварин. Науковий вісник Національного медичного університету імені О.О.Богомольця, 2008, № 21(2), 21-27.
53. Мінченко Д.О., Яворовський О.П., Завгородній І.В., Паустовський Ю.О., Тсучігара К., Есумі Г., Мінченко О.Г. Експериментальні дані щодо порушення експресії циркадіальних генів у печінці та легенях як показник токсичної дії метил-третбутилового ефіру на організм. Укр. ж. з проблем медицини праці, 2008, № 3 (15), С. 20-26.
54. Мінченко О.Г., Яворовський О.П., Паустовський Ю.О., Мінченко Д.О., Завгородній І.В. Циркадіальні гени як чутливі маркери біонебезпеки. Здоров'я та довкілля, 2009, №1 (48), 10-17.
55. Minchenko D.O., Mykhalchenko V.G., Tsuchihara K., Kanehara S., Yavorovsky O.P., Zavgorodny I.V., Paustovsky Y.O., Komisarenko S.V., Esumi H., Minchenko O.H. Unique alternative splice variants of rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 mRNA. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 2008, 80, № 4, P. 66-73.
56. Minchenko O.H., Opentanova I.L., Minchenko D.O. et al. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation // *FEBS Lett.* - 2004. N 1. - P. 14-20.