

УДК 618.36:575.191-036

К.Л. Корнєєва¹, Р.Р. Родрігес¹, С.В. Ральченко², О.В. Вакуленко²,
Л.В. Манжула³, В.Т. Мельник⁴, О.Ю. Верещак⁴, М.Ю. Оболенська¹

Експресія генів, які кодують ензими ключових реакцій фолатзалежного метаболізму, у плаценті людини в першому і третьому триместрах неускладненої вагітності

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна

² Національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

³ Пологовий будинок № 3, м. Київ, Україна

⁴ Ірпінський пологовий будинок, м. Ірпінь, Україна

PERINATOLOGIYA I PEDIATRIYA.2014.4(60):24–30;doi10.15574/PP.2014.60.24

Вступ. Фолатзалежний метаболізм одноуглецевих фрагментів — це метаболічна мережа взаємозалежних реакцій, відповідальних за базові біологічні процеси в клітині: розвиток і поділ, регуляцію експресії генів шляхом метилування. Нещодавніми дослідженнями встановлено залежність перебігу вагітності і здоров'я матері й плода від функціонування цієї системи.

Мета — визначити експресію генів цієї системи, відповідальних за синтез попередників нуклеїнових кислот і, відповідно, за проліферацію; експресію генів, відповідальних за синтез внутрішньоклітинних переносників енергії, а також за синтез метіоніну і залежні від нього процеси метилування; надати кількісну характеристику експресії зазначених генів на рівні РНК у плацентах першого і третього триместрів вагітності.

Методи. У роботі використано метод полімеразної ланцюгової реакції.

Результати. Порівняно з ранніми етапами вагітності в зрілій плаценті виявлено триразове зниження вмісту РНК, які кодують останні стадії синтезу пуринів і синтезу метіоніну. Реакції попередніх фолатзалежних етапів синтезу пуринів і метилування цитидинмонофосфату в процесі синтезу тимідилату майже не змінюються наприкінці вагітності порівняно з першим триместром.

Висновки. Ці результати можуть слугувати вихідними кількісними даними для оцінки змін, які відбуваються в системі фолатзалежного метаболізму одноуглецевих фрагментів за умов патології та протягом усього перебігу вагітності.

Ключові слова: фолатзалежний метаболізм одноуглецевих фрагментів, експресія генів, неускладнена вагітність.

Вступ

Фолатзалежний метаболізм одноуглецевих фрагментів (ФЗМОФ) — це метаболічна мережа взаємозалежних реакцій, в яких похідні фолієвої кислоти виконують роль кофакторів і донорів метильних груп [17, 27, 38, 39, 42]. Одноуглецеві фрагменти фолатів необхідні для синтезу пуринів і тимідилату *de novo*, а також для реметилування гомоцистеїну до метіоніну. Після реакції приєднання аденозилу метіонін перетворюється на S-аденозилметіонін (SAM), донор метильної групи для переважної більшості реакцій метилування, включаючи метилування РНК, цитозину в CpG-острівцях ДНК, білків, у тому числі гістонів, нейротрансмітерів, фосfolіпідів та інших малих молекул [36]. Деметильоване похідне SAM — гомоцистеїн, тіоловмісна амінокислота, від якої метіоніновий цикл розгалужується. Близько половини гомоцистеїну відновлюється до метіоніну реметилуванням. Інша половина безповоротно конвертується шляхом транссульфування до цистеїну [15, 29, 40] (рис. 1). Рівні цистеїну в клітині належно збалансовані, оскільки його має бути достатньо для синтезу білка, утворення глутатіону, біосинтезу коензиму А і таурину [25, 37]. Водночас, концентрація цистеїну має зберігатися в межах, нижчих за поріг цитотоксичності, через схильність цистеїну до самоокислення і здатність викликати оксидесрес [18]. Таким чином, фолатзалежні реакції необхідні для підтримання життєво важливих функцій, а саме проліферації і експресії генів, мітохондріальної трансляції та утворення молекул-переносників енергії, переважної більшості реакцій метилування тощо [17, 27, 42].

Порушення у ФЗМОФ асоціюються з кількома поширеними захворюваннями і вадами розвитку, включаючи різноманітні ускладнення вагітності, такі як внутрішньоутробна затримка росту, передчасна або ембріональна загибель плода, вроджені дефекти, пов'язані з формуванням нервового гребеня, прееклампсія, дефекти нервової трубки тощо [7, 16, 38]. Плацента людини та її фолатзалежний одноуглецевий метаболізм відіграють істотну роль у патогенезі ускладнень вагітності і вроджених дефектів плода [7, 16, 22, 35]. Наші попередні дослідження плаценти людини від вагітних із прееклампсією виявили підвищений рівень гомоцистеїну, його знижене реметилування, дефіцит фолатів і зниження рівня глутатіону [35]. Ми показали активацію шляху транссульфування і апоптозу разом зі зниженням проліферації в експлантах плаценти, культивованих у присутності гомоцистеїну [1, 31]. За допомогою математичної моделі метаболічних потоків у системі фолатзалежних реакцій ми передбачили, що найбільш уразливими ланками в системі є реакції самого фолатного циклу і синтезу нуклеотидів, інозину і тимідин монофосфату, тоді як найбільш стабільними є реакції синтезу глутатіону і таурину [3].

Молекулярні механізми розладів у вищезгаданих процесах у преекламптичних плацентах і під впливом гомоцистеїну, а також вірогідність наших біоінформативних передбачень потребують експериментального з'ясування, передусім ми вирішили визначити, як змінюється в плаценті людини експресія ключових ферментів, які каталізують метаболічні реакції синтезу попередників нуклеїнових кислот і метіоніну протягом фізіологічного перебігу

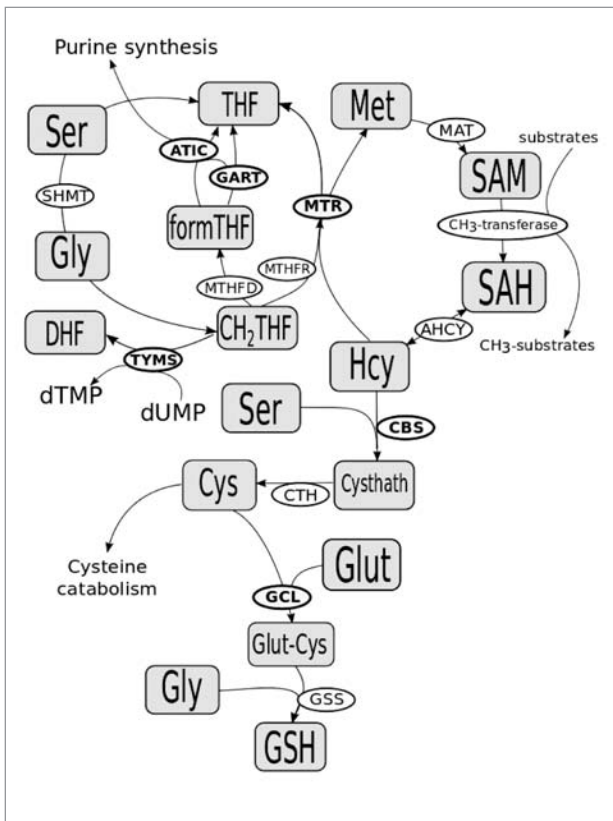


Рис. 1. Схема фолатзалежного метаболізму одноуглецевих фрагментів у плаценті людини

Примітки: Ензими (в овалах): ATIC – фосфорибозиламіноімазол-карбоксамідформілтрансфераза, 2.1.2.3; CBS – цистатіонін β-синтаза 4.2.1.22; CDO – цистеїн діоксигеназа, 1.13.11.20; CTH – цистатіонін γ-ліаза, 4.4.1.1; GCL – глутамат-цистеїн лігаза, 6.3.2.2; GSS – глутатіон синтаза, 6.3.2.3; HTDH – гіпотаурин дегідрогеназа, 1.8.1.3; MAT – метіонінаденозилтрансфераза, 2.5.1.6; Met-trans – метилтрансферази, MTR – метилтетрагідрофолат редуктаза, 2.1.1.13; MTHFD – метенілтетрагідрофолат циклогідролаза, 3.5.4.9 і метилтетрагідрофолат дегідрогеназа, 1.5.1.5 (ензим з 2 активностями); MTHFR – метилтетрагідрофолат редуктаза, 1.5.1.20; GART – фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза, 2.1.2.2; CSAD – сульфонілаланиндикарбоксилаза, 4.1.1.29; AHCY – аденозилгомоцистеїназа, 3.3.1.1; SHMT – гліцингідроксиметилтрансфераза, 2.1.2.1; TYMS – тимідилат синтаза, 2.1.1.45.

Метаболіти (квадрати): formTHF – N10-формілтетрагідрофолат, CH2THF – N5, N10-метилтетрагідрофолат, Cys – цистеїн, Cystath – цистатіонін, DHF – дигідрофолат, GAR – гліцинамідрибонуклеотид, Glut – глутамат, Glut-Cys – γ-глутаміл-цистеїн, Gly – гліцин, GSH – глутатіон, Hcy – гомоцистеїн, HурTaur – гіпотаурин, Met – метіонін, SAM – S-аденозилгомоцистеїн, SAM – S-аденозилметіонін, Ser – серин, SulfAla – сульфонілаланін, Taurine – таурин, THF – тетрагідрофолат.

вагітності. Хоча роль плаценти і порушення фолатзалежного метаболізму в патогенезі ряду ускладнень вагітності загальновізнана, досі відомості щодо експресії ферментів цього важливого метаболічного циклу залишаються мало відомими, на відміну від значно краще вивчених реакцій у печінці [2, 13, 31].

Мета роботи – вивчити абсолютну кількість мРНК, які кодують ферменти ФЗМОФ у плаценті людини в першому і третьому триместрі неускладненої вагітності.

Ці результати можуть бути використані для розуміння регуляції експресії генів у плаценті, що розвивається, а також у плаценті при вагітності з ускладненнями. Вони можуть бути корисними для реконструкції більш досконалої моделі ФЗМОФ і пов'язаних процесів і слугуватимуть базовими даними для подальших досліджень.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводилося відповідно до Гельсінкської декларації. Комітет з етики Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України затвердив протокол дослідження і використання тканин людини. Письмова інформована згода була отримана від усіх жінок, зразки плацент яких використовувалися в дослідженні. Зразки зрілих плацент були зібрані в районному пологовому будинку № 3 (м. Київ, Україна). Плацентарні тканини після абортівного переривання вагітності протягом 5–7 тижнів гестації були отримані в Ірпінському пологовому будинку (м. Ірпінь, Україна). Для дослідження відбиралися тільки зразки з неускладненою вагітністю. Кожен зразок супроводжувався особистою анкетною, яка включала дані щодо способу життя жінки, вживання алкоголю, куріння, діти і професійних ризиків. Інформація про загальні клінічні показники матерів та про стан здоров'я новонародженого бралася з медичних карток. Зразки тканини збиралися відразу після абортів та пологів, промивалися холодним стерильним 0,9% розчином NaCl, заморожувалися в рідкому азоті і зберігалися при –70°C до подальшої обробки. Зразки зрілої плаценти (бл. 20 г) відбиралися з центральної частини органу через усі шари.

Загальна РНК виділялася за допомогою реагенту Trizol (Неоген, Україна) відповідно до рекомендацій виробника. Вихід і якість РНК оцінювалися за допомогою спектрофотометрії на пристрої NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) з урахуванням коефіцієнтів 260/280 і 260/230 і за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Абсолютна кількість РНК визначалася за допомогою реакцій зворотної транскрипції та ланцюгової полімеризації (ЗТ-ПЛР) в реальному часі на приладі CFX96 Real-Time PCR System Detection Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd., США) з використанням відповідних кривих ампліфікації стандартів, тобто кДНК відповідних фрагментів РНК, які попередньо синтезувалися в достатній кількості для точного спектрофотометричного визначення їх концентрації. З тотальної РНК із кожного зразка синтезувалися кДНК методом зворотної транскрипції за допомогою набору реактивів First Strand cDNA Synthesis Kit (# K1612, Thermo Scientific, США) відповідно до протоколу виробника, а саме 5 мкг РНК у 50 мкл стандартної суміші, що містять випадкові гексамерні праймери і зворотну транскриптазу M-MuLV (Thermo Scientific, США) інкубувалися протягом 5 хв. при 25°C, 60 хв. при 37°C і 5 хв. при 70°C. Після цього розчин кДНК аліквотувався і зберігався при –20°C.

Реакційна суміш для ЗТ-ПЛР загальним об'ємом 25 мкл містила 2 мкл розчину кДНК, 10 мкл 2,5 х буферу з SYBR® Green I (Syntol, Росія, кат.номер M-427) і 10 пікомоль кожного праймера. Режим термоциклера складався з початкової денатурації 3 хв. при 95°C, 40 циклів по 10 с при 95°C, 20 с при 60°C для всіх генів, окрім MTR – 55,5°C і GART 58°C, і 30 с при 72°C. Остаточна полімеризація – при 72°C протягом 1,5 хв. Специфічність ампліфікації контролювалася за допомогою кривої плавлення в діапазоні 55–95°C з кроком 0,5°C і гелелектрофорезу ампліфікованого продукту.

Аналіз даних проводився за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX-manager (Bio-Rad, США) і LibreOffice Calc (Document Foundation, Німеччина). Кількість копій кожного транскрипту на 1 нг загальної РНК розраховувалася за допомогою стандартних кривих і наводилася як середнє арифметичне значення з помилкою середнього арифметичного. Стандартні криві для кількісного визначення кожного транскрипту отримувалися з використанням 10-кратних розведень ампліконів

Таблиця 1

Праймери, використані для полімеразної ланцюгової реакції, та характеристики ампліконів

Скорочення гена/ RefSeq мРНК	Опис гена	Праймери	Позиція амплікона на мРНК, п.н.	Рестрикційний аналіз амплікона	
				Рестриктаза	Фрагменти, п.н.
GARS-AIRS-GART/ NM_175085.2	Гліцинамідрибонуклеотид синтетаза-аміноімідазолрибонуклеотид синтетаза – фосфорибозилгліцинамід формілтрансфераза	f 5'-CAAGGCCAGTCTGAAATCCT-3' r 5'-AGCGGCTCATGCCTATAATC-3'	1843-1925	SmlI	24, 58
GARS/ NM_001136005.1	Гліцинамідрибонуклеотид синтетаза (монофункціональна)	f 5'-GCAAAGAGCAAAGAAGAG-3' r 5'-TGAAACACAGACACGACA-3'	616-745	Rsa I	32, 98
ATIC/ NM_004044	Фосфорибозиламіноімідазол-карбоксамідформілтрансфераза	f 5'-GGCATTCACTCATACGGCACAA-3' r 5'-ATCCAGGGGCTCCATTTA-3'	718-896	Pvu II	124, 55
TYMS/ NM_001071	Тимідилатсинтаза	f 5'-CAACCCTGACGACAGAAGAA-3' r 5'-GCTCACTGTTACCACATAGA-3'	649-761	Bgl II	46, 104
MTR/ NM_000254.2	5'-Метилтетрагідрофолат-гомоцистеїнметилтрансфераза	f 5'-GCAACAAGCCTCAAACCTCAACCA-3' r 5'-TTCCTCCCTTCTCTTGGTCTT-3'	5456-5635	Hinf I	133, 12, 35
CBS/ NM_000071.2	Цистатіонін β-синтаза	f 5'-CCCAATTCTCATCCTAGAC-3' r 5'-GACACTTCTCCTTCAGCTTC-3'	888-1063	PstI	83, 92

Таблиця 2

Абсолютна і відносна кількість РНК у першому і третьому триместрах вагітності

РНК	Копії/нгтотальної РНК		Порівняння I триместр/III триместр	
	I триместр	III триместр	значення p	співвідношення, I/III триместр
GARS-AIRS-GART	21,0±5,73	17,2±3,68	0,340	1,2±0,42
GARS	91,3±12,49	32,4±4,78	0,006	2,8±0,56
ATIC	320,0±37,74	117,0±30,60	0,004	2,7±0,78
TYMS	23,7±6,34	33,2±11,03	0,242	0,7±0,31
MTR	85,3±15,23	28,9±5,23	0,017	2,9±0,75
CBS	14,9±2,31	5,0±1,21	0,003	3,0±0,86

(ПЛР-продуктів) відповідних кДНК у діапазоні від 1 фмоля до 0,001 амоля в 25 мкл ПЛР-суміші. Амплікони кДНК для стандартизації напрацьовувалися в 150 мкл ПЛР суміші, очищувалися за допомогою набору реактивів GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific, США), а їх концентрація визначалася на спектрофотометрі. Специфічність ампліконів контролювалася за допомогою рестрикційного аналізу (табл. 1). Ефективність ампліфікації – 90% для всіх пар праймерів.

Праймери для кожної кДНК підбиралися з використанням онлайн-програми PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Inc., США), їх специфічність перевірялася онлайн-інструментом BLAST (NCBI, США). Праймери синтезувалися в ІМБГ НАН Україна (м. Київ, Україна) і Syntol (м. Москва, Росія). Для того, щоб уникнути ампліфікації фрагменту геномної ДНК, праймери підбиралися таким чином, щоб прямий або зворотний праймери перекривали ділянку ДНК на стику двох екзонів. Негативний контроль, що містить дистильовану воду замість кДНК, завжди ставили одночасно з пробами в тій самій плашці.

Результати дослідження та їх обговорення

GART, ATIC і TYMS мРНК

Фолатні кофактори надають вуглецеві фрагменти для реакції синтезу *de novo* пуринів і тимідилату, а саме пуринового кільця інозин монофосфату (ІМФ), який передусе утворенню аденинових і гуанінових нуклеотидів, і для синтезу дезокситимідин монофосфату (dTMP) через метилювання дезоксиуридину монофосфату (dUMP).

De novo біосинтез пуринів відбувається протягом 10 послідовних реакцій, які каталізують шість ферментів, що функціонують у складі цитоплазматичного мультиензимного комплексу, пуриносоми, під час періоду клітинного циклу G1 [27] (рис. 2). GART і ATIC мРНК кодуєть, відповідно, ензиматичні активності GART (EC 2.1.2.211) і ATIC (EC 2.1.2.3, 3.5.4.10) двох багатофункціональних протеїнів, що каталізують третю і дев'яту реакцію синтезу ІМФ. Вони надають, відповідно, другий та восьмий атоми вуглецю пуринового кільця від формільної групи 10-формілтетрагідрофолату [17, 27].

Ензиматична активність GART є однією з трьох видів активності, кодованих *GARS-AIRS-GART* мРНК, що транслюється у трифункціональний фермент біосинтезу пуринів аденозин-3, який має, крім ензиматичної активності GART, додаткові активності гліцинамідрибонуклеотид синтетази (GARS) і аміноімідазолрибонуклеотид синтетази (AIRS) активність [4, 9, 12].

Кількість транскриптів *GARS-AIRS-GART* істотно не змінюється від першого триместру до кінця вагітності (табл. 2). Слід зазначити, що ген людини *GARS-AIRS-GART* може кодувати не тільки трифункціональний білок вагою 110 кДа, а також монофункціональний GARS білок вагою 50 кДа. Цей вкорочений з C-кінця ензим GARS утворюється шляхом альтернативного сплайсингу по сайту поліаденілювання, який міститься на інтроні між останнім екзоном *GARS* і першим екзоном *AIRS* [41]. Ми розробили праймери спеціально для послідовності *GARS* і показали, що кількість транскриптів *GARS* більш ніж

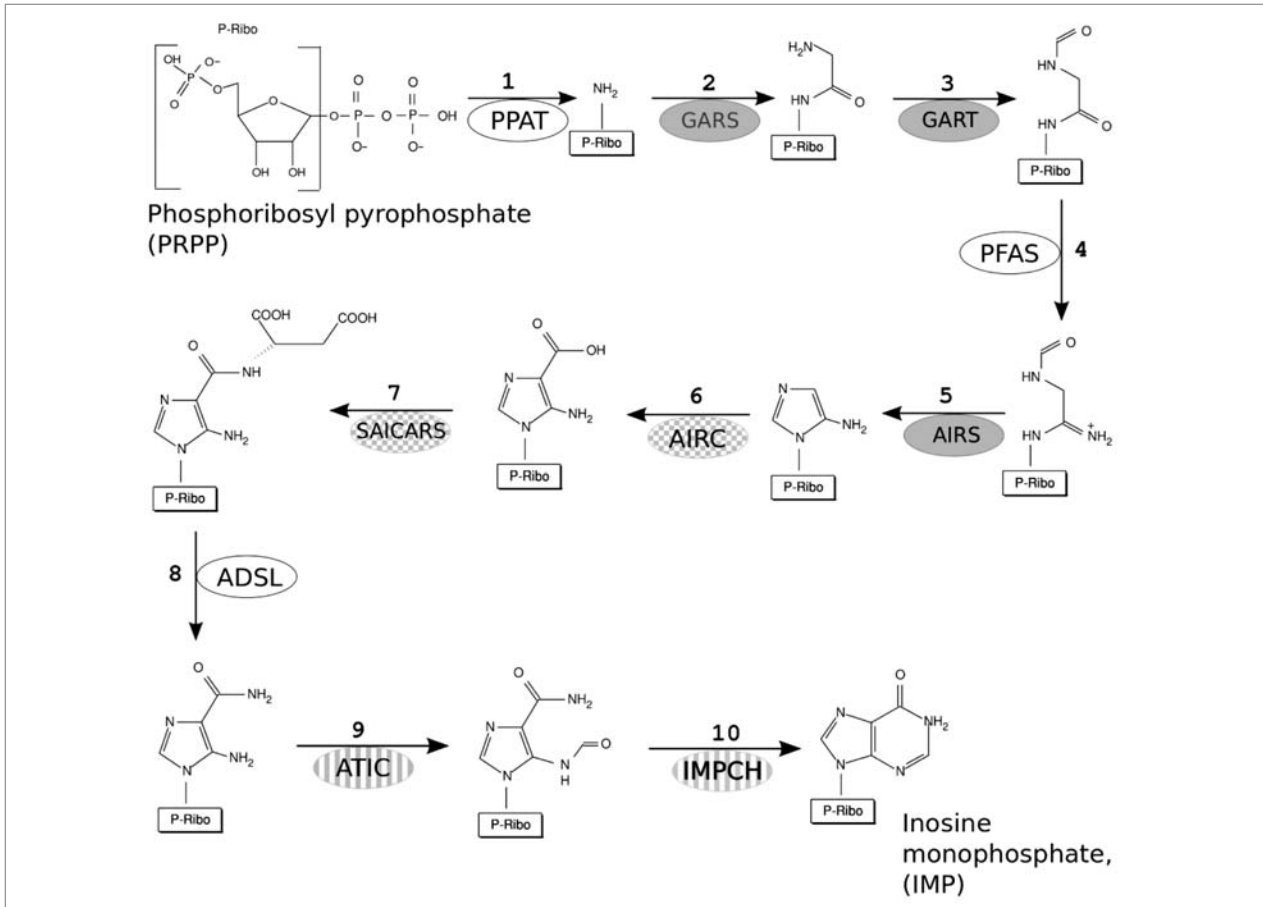


Рис. 2. Послідовність реакцій біосинтезу пуринових нуклеотидів *de novo* (адаптовано з [27])

Примітки: ферменти, які кодуються одним геном, позначені овалами з однаковим заповненням. Скорочення назв ферментів: 1. PPAT, фосфорибозилпірофосфатамідоотрансфераза; 2. GARS, гліцинамідрибонуклеотид синтетаза (GARS-AIRS-GART ген); 3. GART, фосфорибозилгліцинамідформілтрансфераза (GARS-AIRS-GART ген); 4. PFAS, фосфорибозилгліцинамідін синтаза; 5. AIRS, аміноімідазолрибонуклеотид синтетаза (GARS-AIRS-GART ген); 6. AIRC, 5-(карбоксаміно)імідазолрибонуклеотид синтаза (PAICS ген); 7. SAICARS, сукциніл аміноімідазол карбоксамідрибонуклеотид синтетаза (PAICS ген); 8. ADSL, аденозилсукцинатаза; 9. ATIC, фосфорибозиламіноімідазол карбокси амідформілтрансфераза (ATIC ген); 10. IMPCH, інозинмонофосфатциклогідролаза (ATIC ген).

у чотири рази перевищує кількість транскриптів *GARS-AIRS-GART* (табл. 2). Це означає, що в зразках із першого триместру 80% транскриптів *GARS* представлено монофункціональними РНК і лише близько 20% належать до РНК повної довжини. Кількість коротких транскриптів *GARS* різко зменшується наприкінці вагітності і дорівнює кількості транскриптів повної довжини (табл. 2).

Окремі *GARS* і *GARS-AIRS-GART* мРНК і білки виявлені в печінці людини і птахів, у Т-клітинах миші і у дрозофілі [12, 28, 30]. Обидві ізоформи наявні в мозочку людини протягом перинатального періоду, але вони зникають незабаром після народження [41]. Їх присутність у плаценті людини і зміни в експресії спостерігаються вперше. Роль монофункціонального *GARS* ще не встановлена. Припускаємо, що йому належить важлива роль у регуляції біосинтезу нуклеотидів в ембріональний період розвитку через його суттєве зниження наприкінці вагітності, синхронне із завершальним ферментом синтезу пуринового кільця.

мРНК *ATIC* представлено однією ізоформою 2,0 кб мРНК у різних тканинах, включаючи плаценту [10], яка кодує формілтрансферазну активність біфункціонального ензиму шляху синтезу пуринів PURH (амінокислотні залишки 199–592 у послідовності білка). ІМФ-циклогідролазна активність іншого домену цього білка (залишки 1–198) завершує синтез кінцевого продукту шляху,

ІМФ, і каталізує внутрішньомолекулярну циклізацію [8] (рис. 2).

Кількість *ATIC* РНК істотно більша, ніж *GARS-AIRS-GART* РНК як у першому, так і в третьому періодах вагітності (табл. 2). Зважаючи на те, що всі реакції синтезу пуринового кільця мають бути координованими, велика різниця у вмісті *GARS-AIRS-GART* і *ATIC* РНК може бути частково пояснена специфічними характеристиками обох ферментів. Трифункціональний фермент пуринового біосинтезу аденозин-3 діє як мономер [12], тоді як трансформілазна активність *AICART* потребує димеризації [21]. Число обертів ензиму біосинтезу пуринового кільця PURH ($2,9 \pm 0,4 \text{ c}^{-1}$) [8], принаймні в два рази менше, ніж в ензиму аденозин-3 ($6,3\text{--}8,6 \text{ c}^{-1}$) [9]. Ці специфічні характеристики обох ферментів можуть частково пояснити різницю в кількості їх транскриптів.

Під час вагітності кількість РНК *ATIC* зменшується майже в три рази (табл. 2). Оскільки ензим PURH завершує синтез пуринового кільця, вміст його РНК у тотальній РНК може відігравати вирішальну роль в ефективності біосинтезу пуринів *de novo*. Ми припускаємо, що істотне зниження кількості РНК як *ATIC*, так і *GARS* наприкінці вагітності робить істотний внесок у загальний спад *de novo* синтезу нуклеотидів метаболізму [6, 41], на відміну від шляху використання нуклеотидів для синтезу нових нуклеотидів (*salvage pathway*), який є основним

постачальником пуринів у диференційованих клітинах ссавців [1, 33].

Наразі є зовсім небагато даних про регуляторні механізми експресії генів *GARS*, *GARS-AIRS-GART* і *ATIC* взагалі і в плаценті людини зокрема. Ці питання та інтригуюча роль *GARS* протягом перебігу вагітності ще не вирішені.

РНК *TYMS* кодує тимідилатсинтазу (*TYMS*, EC: 2.1.1.45), яка використовує 5,10-метилентГФ як донор одновуглецевих фрагментів і джерело відновлювальних еквівалентів для перетворення дезоксиуридину монофосфату в дезокситимідилату монофосфат. Як і ферменти пуринового синтезу *de novo*, *TYMS* функціонує в складі мультиензимного комплексу. *TYMS* та пов'язані з ним ферменти (*SHMT*, *DHFR*) присутні в цитоплазмі у фазі G1, але переміщуються в ядро, коли клітина переходить в S-фазу, і локалізуються на видільці реплікації [27]. Активність *TYMS* критична для розвитку ембріона, оскільки ембріональні клітини внутрішньої маси за відсутності цього ферменту не можуть імплантуватися в ендометрій, і відбувається зрив вагітності [20]. Відомостей щодо експресії *TYMS* в плаценті людини протягом вагітності ми не знайшли в науковій літературі.

Рівень *TYMS* РНК у зразках плаценти істотно не змінюється наприкінці вагітності порівняно з першим триместром. Стабільність рівня експресії РНК, що відповідає за синтез тимідилату, на тлі очевидного спаду РНК *ATIC*, ставить питання про координацію в ході вагітності шляхів синтезу, пуринових і піримідинових нуклеотидів.

MTR і *CBS* мРНК

MTR і *CBS* мРНК кодують, відповідно, мультидоменну кобаламінзалежну метіонінсинтазу (*MTR*, EC: 2.1.1.13) і цистатіонін β-синтазу (*CBS*, EC: 4.2.1.22). Обидві використовують один і той же субстрат, гомоцистеїн. *MTR* каталізує необоротну передачу метильної групи від 5'-метилтетрагідрофолату до гомоцистеїну з утворенням тетрагідрофолату (ТГФ) і метіоніну. Це єдиний фермент, який метаболізує 5'-метилтетрагідрофолат ссавців із регенерацією активного кофактора ТГФ для інших фолатзалежних реакцій, у тому числі для синтезу ІМФ і ТМФ [17].

CBS «відкриває» шлях транссульфування (рис. 1). Вона каталізує β-заміщення гідроксильної групи серину гомоцистеїном і утворює тіоефір цистатіонін із виділенням води [40]. Подальше розщеплення цистатіоніну цистатіонін γ-ліазою (СТН; EC 4.4.1.1) перетворює вуглецевий ланцюг і азот метіоніну/гомоцистеїну, відповідно, в α-кетобутират, що після кількох перетворень у мітохондріях входить до циклу лимонної кислоти, і аміак, який виводиться з організму з сечею. Атом сірки від гомоцистеїну передається цистеїну [29, 37, 40] (рис. 1). Регулювання метаболічного потоку через конкуруючі шляхи трансметилування і транссульфування докладно описане на посттрансляційному рівні за участі S-аденозилметіоніну, продукту метіонінового циклу [14, 15]. Наразі нам невідомо про результати досліджень із регуляції експресії цих ферментів у плаценті людини на етапі транскрипції і посттранскрипційних змін.

MTR і *CBS* РНК суттєво різняться між собою за вмістом у тотальній РНК. Концентрація РНК *MTR* перевищує концентрацію РНК *CBS* більш ніж у п'ять разів як у першому, так і в третьому триместрах вагітності. Водночас, рівень обох РНК знижується в три рази в зрілій плаценті порівняно зі зразками з першого триместру. Співвідношення між ними зберігається на сталому рівні в зазначені строки дослідження (табл. 2). Наші попередні експерименти зі зразками зрілої плаценти виявили в них

експресію *CBS* і її каталітичну активність, а також експресію цистатіонін γ-ліази на рівні мРНК [31]. *MTR* експресується в усіх органах людини, з плацентою включно.

Потенційні наслідки, які випливають із цього загального зниження рівнів РНК *MTR* і *CBS* пов'язані передусім зі зменшенням кількості S-аденозилметіоніну (*SAM*), який зв'язує метіонін із переважною більшістю реакцій трансметилування, синтезом поліамінів, реутилізацією самого метіоніну і транссульфуванням [34]. Зниження рівня *CBS* РНК у зрілій плаценті частково відображає наслідки зниження рівня РНК *MTR*. Відповідно до інших джерел, у третьому триместрі вагітності зменшується також синтез поліамінів (спермидину і сперміну), необхідних для підтримки проліферації [32]. Дані про метилування ДНК протягом вагітності недостатні, хоча відомо, що метилування ДНК у плаценті людини більш мінливе порівняно з іншими тканинами. Воно відображає зміни в середовищах усередині матки і поза нею і запропоновано в якості певного маркера стану цих середовищ. Метилування ДНК у плаценті відіграє критичну функціональну роль у розвитку плода, а також впливає на життя в постнатальному періоді і заслуговує на більш ретельне дослідження [11, 23, 24, 26]. Здатність протистояти оксидативному стресу також може змінюватися на пізніх строках вагітності через зменшення рівня експресії *MTR*. Відомо, що *MTR* чутлива до інактивації активними формами кисню і впливає на регулювання клітинного метаболізму в цілому залежно від стану окислювально-відновного балансу [5]. Оскільки спектр функцій, що виконують *MTR* і *CBS*, досить широкий, то перелік можливих наслідків зниження їх експресії можна продовжувати, але всі передбачення потребують експериментальної перевірки. Постійне співвідношення між обома РНК протягом фізіологічної вагітності має велике значення, оскільки це може гарантувати координацію дій обох ензимів.

Висновки

Підсумовуючи вищесказане, у цьому дослідженні ми одночасно вимірювали абсолютну кількість мРНК біосинтетичних ферментів ФЗМОФ (*GART*, *ATIC* і *MTR*) і початкового етапу шляху транссульфування в плаценті людини першого і третього триместрів неускладненої вагітності. Отримані результати показують взаємозв'язок між різними гілками фолатзалежного метаболізму на рівні претрансляційної експресії генів і опосередковано вказують на рівні білка. Ми не вважаємо, що існує повна кореляція між мРНК і рівнем білка, хоча вони корелюють краще, ніж вважалося раніше [19]. Тим більш складним і менш прямим є зв'язок між експресією генів і каталітичною активністю ферментів, оскільки остання залежить не тільки від рівня білка, але й від багатьох різних факторів, таких як клітинна компартменталізація, взаємодія ферменту із субстратами, наявності аллостеричних ефекторів та інших агентів; також каталітична активність залежить від наявності характерних поживних речовин і вітамінів, що є кофакторами ферментів, і ефективності їх транспорту. Значною мірою активність ферментів залежить від тканинної специфічності. Однак дослідження експресії генів на рівні РНК дає базисні дані щодо процесу і спрямовує більш детальні подальші дослідження. Наше дослідження поставило питання про роль монофункціональної РНК *GARS* та її білка, корегуляції різних етапів біосинтезу пуринового кільця і балансу між синтезом пуринів і тимідилату. Усі ці питання плануються вирішити в майбутніх дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА

- Вплив гомоцистеїну на структуру та функції трофобласта плаценти людини / О.П. Марценюк, К.Л. Романець, М.Ю. Оболенська, Б. Хупертц // Український біохімічний журнал. — 2009. — Т. 81, № 5. — С. 40—49.
- Оболенська М.Ю. Фолатзалежні процеси у плаценті людини: експресія генів, амінотіоли, проліферація і апоптоз / М.Ю. Оболенська, Р.Р. Родрігес, О.П. Марценюк // Український біохімічний журнал. — 2011. — Т. 83, № 1. — С. 5—17.
- Родрігес Р.Р. Стехіометрична модель фолатзалежного метаболізму одновуглецевих груп у плаценті людини / Р.Р. Родрігес, І.С. Лущик, М.Ю. Оболенська // Український біохімічний журнал. — 2012. — Т. 84, № 4. — С. 20—31.
- A multifunctional protein possessing glycinamide ribonucleotide synthetase, glycinamide ribonucleotide transformylase, and aminoimidazole ribonucleotide synthetase activities in de novo purine biosynthesis / S.C. Daubner, J.L. Schrimsher, F.J. Schendel [et al.] // *Biochemistry*. — 1985. — Vol. 24, № 25. — P. 7059—7062.
- Age-dependent decrease and alternative splicing of methionine synthase mRNA in human cerebral cortex and an accelerated decrease in autism / C.R. Muratore, N.W. Hodgson, M.S. Trivedi [et al.] // *PLoS one*. — 2013. — Vol. 8, № 2. — P. 1—15.
- Alexiou M. Purine utilisation, de novo synthesis and degradation in mouse preimplantation embryos / M. Alexiou, H.J. Leese // *Development*. — 1992. — Vol. 114. — P. 185—192.
- Blom H.J. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects / H.J. Blom, Y. Smulders // *J. Inher. Metab. Dis.* — 2011. — Vol. 34. — P. 75—81.
- Bulock K.G. The kinetic mechanism of the human bifunctional enzyme ATIC (5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase). A surprising lack of substrate channeling / K.G. Bulock, G.P. Beardsley, K.S. Anderson // *J. of Biol. Chemistry*. — 2002. — Vol. 277, № 25. — P. 22168—22174.
- Caperelli C.A. The human glycinamide ribonucleotide transformylase domain: purification, characterization, and kinetic mechanism / C.A. Caperelli, E.L. Giroux // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 1997. — Vol. 341, № 1. — P. 98—103.
- Characterization of molecularly cloned human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase / T. Sugita, H. Aya, M. Ueno [et al.] // *J. Biochem.* — 1997. — Vol. 122, № 2. — P. 309—313.
- Constancia M. Resourceful imprinting / M. Constancia, G. Kelsey, W. Reik // *Nature*. — 2004. — Vol. 432, № 7013. — P. 53—57.
- De novo purine nucleotide biosynthesis: cloning of human and avian cDNAs encoding the trifunctional glycinamide ribonucleotide synthetase-aminoimidazole ribonucleotide synthetase-glycinamide ribonucleotide transformylase by functional complementation in *E. Coli* / J. Aimi, H. Qiu, J. Illiams [et al.] // *Nucl. Acids. Res.* — 1990. — Vol. 18 (22) — P. 6665—6672.
- Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism / N. Solanky, Requena A. Jimenez, S.W. D'Souza [et al.] // *Placenta*. — 2010. — Vol. 31. — P. 134—143.
- Finkelstein J.D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals / J.D. Finkelstein // *Semin. Thromb Hemost.* — 2000. — Vol. 26, № 3. — P. 219—225.
- Finkelstein J.D. Methionine metabolism in mammals / J.D. Finkelstein // *J. Nutr. Biochem.* — 1990. — Vol. 1, № 5. — P. 228—237.
- Folate and fetal programming: a play in epigenomics? / J.L. Gueant, F. Namour, R.M. Gueant-Rodriguez [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* — 2013. — Vol. 24, № 6. — P. 279—289.
- Fox J.T. Folate-mediated one-carbon metabolism / J.T. Fox, P.J. Stover // *Vitam. Horm.* — 2008. — Vol. 79. — P. 1—44.
- Gabaldon M. Oxidation of cysteine and homocysteine by bovine albumin / M. Gabaldon // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2004. — Vol. 431, № 2. — P. 178—188.
- Global quantification of mammalian gene expression control / B. Schwanhauser, D. Busse, N. Li [et al.] // *Nature*. — 2011. — Vol. 473, № 7347. — P. 337—342.
- High resolution mapping and positional cloning of ENU-induced mutations in the R_w region of mouse chromosome 5 / Y.H. Ching, R.J. Munroe, J.L. Moran [et al.] // *BMC Genet.* — 2010. — Vol. 411. — P. 106.
- Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity / J.M. Vergis, K.G. Bulock, K.G. Fleming, G.P. Beardsley // *J. of Biol. Chemistry*. — 2001. — Vol. 276, № 11. — P. 7727—7733.
- Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis / B. Huppertz // *Hypertension*. — 2008. — Vol. 51. — P. 970—975.
- Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas / C.E. Banister, D.C. Koestler, M.A. Maccani [et al.] // *Epigenetics*. — 2011. — № 6. — P. 920—927.
- Koukoura O. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review) / O. Koukoura, S. Sifakis, D.A. Spandidos // *Mol. Med. Rep.* — 2012. — Vol. 5, № 4. — P. 883—889.
- Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism / M.H. Stipanuk, J.E. Dominy, J.I. Lee, R.M. Coloso // *J. Nutr.* — 2006. — Vol. 136 (Suppl. 6). — P. 1652S—1659S.
- Model-based clustering of DNA methylation array data: a recursive-partitioning algorithm for high-dimensional data arising as a mixture of beta distributions / E.A. Houseman, B.C. Christensen, R.F. Yeh [et al.] // *BMC Bioinformatics*. — 2008. — № 9. — P. 365—380.
- Modeling cellular compartmentation in one-carbon metabolism / M. Scotti, L. Stella, E.J. Shearer, P.J. Stover // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* — 2013. — Vol. 5, № 3. — P. 343—365.
- Mouse cDNAs encoding a trifunctional protein of de novo purine synthesis and a related single-domain glycinamide ribonucleotide synthetase / J.L. Kan, M. Jannatipour, S.M. Taylor, R.G. Moran // *Gene*. — 1993. — Vol. 137, № 2. — P. 195—202.
- Mudd S.H. Disorders of transsulfuration / S.H. Mudd, H.L. Levy // *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. — 1989. — Vol. 4. — P. 693—734.
- Multiple purine pathway enzyme activities are encoded at a single genetic locus in *Drosophila* / S. Henikoff, M.A. Keene, J.S. Sloan [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1986. — Vol. 83. — P. 720—724.
- Placental markers of folate-related metabolism in preeclampsia / C. Mislanova, O. Martsenyuk, B. Huppertz, M. Obolenskaya // *Reproduction*. — 2011. — Vol. 142, № 3. — P. 467—476.
- Profiling gene expression in human placenta of different gestational ages: an OPRU Network and UW SCOR Study / A.M. Mikheev, T. Nabekura, A. Kaddoumi [et al.] // *Reprod. Sci.* — 2008. — Vol. 15, № 9. — P. 866—877.
- Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies / H. Arnholdt, F. Meisel, K. Fandrey, U. Lohrs // *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. — 1991. — Vol. 60 (6). — P. 365—372.
- Quantitation of cellular metabolic fluxes of methionine / T. Shlomi, J. Fan, B. Tang [et al.] // *Anal. Chem.* — 2014. — Vol. 86, № 3. — P. 1583—1591.
- Roberts J.M. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme / J.M. Roberts, C.A. Hubel // *Placenta*. — 2009. — Vol. 30 (Suppl. A). — P. 32—37.
- S-Adenosylmethionine and methylation / P.K. Chiang, R.K. Gordon, L.J. Ta [et al.] // *FASEBJ.* — 1996. — Vol. 10, № 4. — P. 471—480.
- Stipanuk M.H. Dealing with methionine/ homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur / M.H. Stipanuk, I. Ueki // *J. of Inherited Metabolic Disease*. — 2011. — Vol. 34. — P. 17—32.
- Stover P.J. One-carbon metabolism-genome interactions in folate-associated pathologies / P.J. Stover // *J. Nutr.* — 2009. — Vol. 139, № 12. — P. 2402—2405.
- Stover P.J. Trafficking of intracellular folates / P.J. Stover, M.S. Field // *Adv. Nutr.* — 2011. — Vol. 2, № 4. — P. 325—331.
- Tarver H. The conversion of methionine to cysteine: experiments with radioactive sulfur / H. Tarver, C.L.A. Schmidt // *J. of Biol. Chemistry*. — 1939. — Vol. 130. — P. 67—80.
- The human GARS-AIRS-GART gene encodes two proteins which are differentially expressed during human brain development and temporally overexpressed in cerebellum of individuals with Down syndrome / G. Brodsky, T. Barnes, J. Bleskan [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* — 1997. — Vol. 6, № 12. — P. 2043—2050.
- Tibbetts A.S. Compartmentalization of mammalian folate-mediated one-carbon metabolism / A.S. Tibbetts, D.R. Appling // *Annu. Rev. Nutr.* — 2010. — Vol. 30. — P. 57—81.

Экспрессия генов, кодирующих энзимы ключевых реакций фолатзависимого метаболизма, в плаценте человека в первом и третьем триместрах неосложненной беременности

К.Л. Корнеева¹, Р.Р. Родригес¹, С.В. Ральченко², А.В. Вакуленко², Л.В. Манжула³, В.Т. Мельник⁴, О.Ю. Верещак⁴, М.Ю. Оболенская¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, г. Киев, Украина

² Национальный университет имени Тараса Шевченка, г. Киев, Украина

³ Родильный дом № 3, г. Киев, Украина

⁴ Ирпенский родильный дом, г. Ирпень, Украина

Введение. Фолатзависимый метаболизм одноуглеродных фрагментов — это метаболическая сеть взаимосвязанных реакций, ответственных за базовые биологические процессы в клетке: развитие и деление, регуляцию экспрессии генов посредством метилирования. Недавними исследованиями была установлена зависимость течения беременности и здоровья матери и плода от функционирования этой системы.

Цель — определить экспрессию генов этой системы, ответственных за синтез предшественников нуклеиновых кислот и, соответственно, за пролиферацию; экспрессию генов, ответственных за синтез внутриклеточных переносчиков энергии, а также за синтез метионина и зависящие от него процессы метилирования; представить количественную характеристику экспрессии указанных генов на уровне РНК в плацентах первого и третьего триместров беременности.

Метод. В работе использован метод полимеразной цепной реакции.

Результаты. По сравнению с ранними этапами беременности, в зрелой плаценте выявлено трехразовое снижение содержания РНК, кодирующих последние стадии синтеза пуринов и синтеза метионина. Реакции предыдущих фолатзависимых этапов синтеза пуринов и метилирования цитидинмонофосфата в процессе синтеза тимидилата почти не меняются в конце беременности по сравнению с первым триместром.

Выводы. Эти результаты могут служить исходными количественными данными для оценки изменений, происходящих в системе фолатзависимого метаболизма одноуглеродных фрагментов в условиях патологии и в течение всей беременности.

Ключевые слова: фолатзависимый метаболизм одноуглеродных фрагментов, экспрессия генов, неосложненная беременность.

PERINATOLOGIYA I PEDIATRIYA.2014.4(60):24–30;doi10.15574/PP.2014.60.24

The genes expression which is encoding enzyme key reactions of folate-dependent metabolism in human placenta in the first and third trimesters of uncomplicated pregnancy

K.L. Korneyeva¹, R.R. Rodrigues¹, S.V. Ralchenko², A.V. Vakulenko², L.V. Manzhula³, V.T. Melnik⁴, O.Yu. Vereshchak⁴, M.Yu. Obolenskaya¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

² Taras Shevchenko Natsionalny University, Kiev, Ukraine

³ Maternity Hospital № 3, Kyiv, Ukraine

⁴ Irpin Maternity Hospital, Irpin, Ukraine

Introduction. Folate-dependent metabolism of one-carbon fragments- is a metabolic system of interconnected reactions responsible for basic biological processes in the cell: development and division, regulation of gene expression by means of methylation. According to the recent studies was found the course of pregnancy and the health of the mother and fetus due to the operation of this system.

Purpose — to determine the gene expression of this system responsible for the synthesis of nucleic acid precursors, and accordingly for the proliferation, the expression of genes responsible for the synthesis of the intracellular energy carriers, as well as for the synthesis of methionine and the dependent methylation processes; provide a quantitative characterization of the expression of presented genes at the level of RNA in the placentas of the first and the third trimesters of pregnancy.

Method. Polymerase chain reaction method was used in the work.

Results. In comparison with the early stages of pregnancy, in the mature placenta was found three-time reduction of RNA containing, encoding the last stage of the purines and methionine synthesis. The reactions of the previous folate-dependent stages of the purine synthesis and cytidine monophosphate methylation during

the process of thymidylate synthesis hardly changed at the end of pregnancy in comparison with the first trimester.

Conclusions. These results can be as a baseline quantitative data for evaluation of changes in the system of folate-dependent metabolism of one-carbon fragments in pathological conditions and during the all period of pregnancy.

Key words: folate-dependent metabolism of one-carbon fragments, gene expression, uncomplicated pregnancy.

Сведения об авторах:

Корнеева Катерина Леонидовна — аспирант Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Адрес: г. Киев, просп. Акад. Глушкова, 2; тел. +38 (044) 522-39-92.

Родригес Руслан Рейнальдович — м.н.с Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. +38 (044) 526-11-69.

Ральченко Сергей Владимирович — студент Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Адрес: г. Киев, просп. Акад. Глушкова, 2; тел. +38 (044) 522-39-92.

Вакуленко Александра Васильевна — студентка Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Адрес: г. Киев, просп. Акад. Глушкова, 2; тел. тел. +38 (044) 522-39-95.

Манжула Людмила Васильевна — к.мед.н, зав. родового отделения Родильного дома №3. Адрес: г. Киев, ул. Кучера, 7; тел. +38 (044) 405-01-44.

Мельник Василий Тарасович — врач высшей категории Ирпенского роддома. Адрес: г. Ирпень, Киевская обл., ул. Ленина, 22; тел. +38 (045) 974-61-38.

Верещак Оксана Юрьевна — врач II категории Ирпенского роддома. Адрес: г. Ирпень, Киевская обл., ул. Ленина, 22; тел. +38 (045) 974-61-38.

Оболенская Мария Юрьевна — д.биол.н., проф., зав. лаб. системной биологии Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Адрес: г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; тел. +38 (044) 526-11-69.

Статья поступила в редакцию 14.11.2014 г.