

# Дослідження експресії різних субодиниць еукаріотного фактора елонгації трансляції eEF1 у гліальних пухлинах головного мозку людини

М. В. Верем'єва, К. О. Шостак, Т. А. Малишева<sup>1</sup>, Ю. П. Зозуля<sup>1</sup>,  
В. Д. Розуменко<sup>1</sup>, В. М. Кавсан, Б. С. Негруцький

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

<sup>1</sup>Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України  
Вул. Мануїльського, 32, Київ, 04050, Україна

vermarina@list.ru

---

*Еукаріотний фактор елонгації трансляції 1 (eEF1) є одним із основних компонентів трансляційного апарату клітини, який бере участь в елонгації білкового ланцюга. eEF1 складається з чотирьох субодиниць: eEF1A, eEF1B<sub>1</sub>, eEF1B<sub>2</sub> і eEF1B<sub>3</sub>. Існують дві тканинспецифічні ізоформи субодиниць eEF1A – A1 і A2. Експресію генів eEF1A1, eEF1A2, eEF1B<sub>1</sub>, eEF1B<sub>2</sub> і eEF1B<sub>3</sub> проаналізовано Нозерн-блот гібридизацією панелі РНК пухлин і нормального головного мозку людини з відповідними олігонуклеотидними зондами. Загалом досліджено 23 зразки гліальних пухлин і 10 зразків нормального головного мозку людини. Нозерн-гібридизацією визначено відсутність відмінностей в експресії мРНК субодиниць eEF1A1, eEF1B<sub>1</sub>, eEF1B<sub>2</sub> та зниження кількості мРНК eEF1B<sub>3</sub> в гліобlastомах порівняно з умовною нормою приблизно в два рази. Також показано зниження рівня експресії мРНК eEF1A2 в зразках пухлин у порівнянні з умовною нормальною глією людини.*

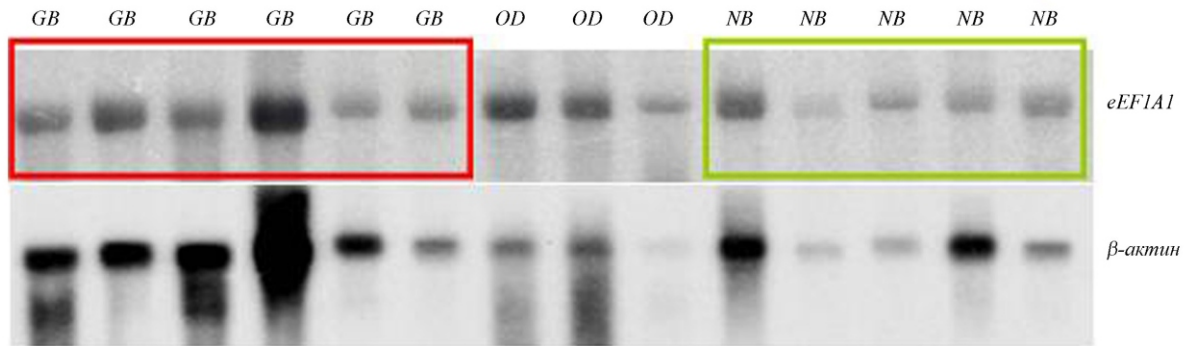
*Ключові слова: eEF1, еукаріотний фактор елонгації трансляції 1, надекспресія гена, гліальні пухлини головного мозку людини.*

---

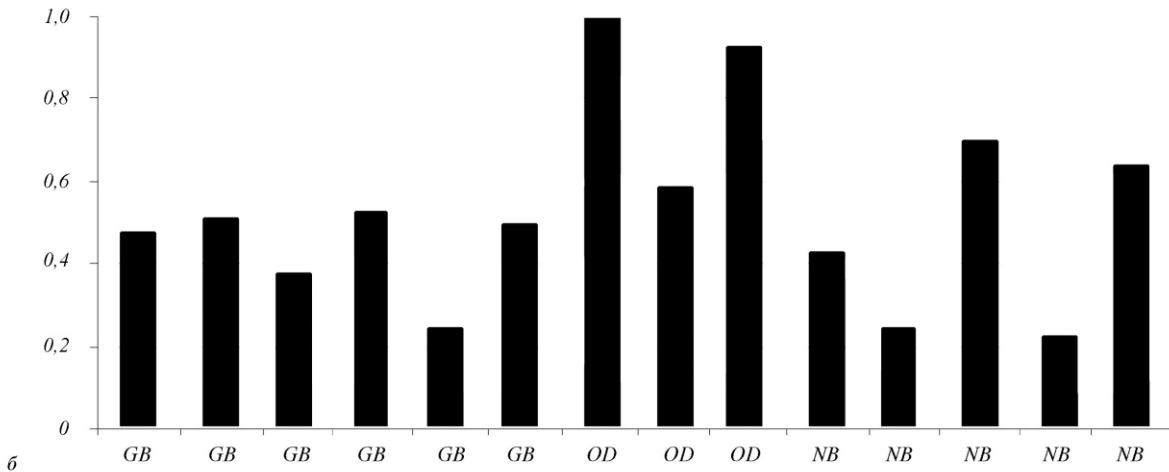
**Вступ.** Мультисубодиничний комплекс eEF1 забезпечує оптимальну швидкість елонгації поліпетидних ланцюгів на рибосомах у клітинах вищих еукаріотів. Комплекс складається з чотирьох субодиниць. eEF1A відповідає за кодон-залежне зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом 80S рибосоми. Вважають також, що вона є основним учасником механізму каналювання тРНК. У GTP-формі eEF1A переносить аміноацил-тРНК від аміноацил-тРНК синтетази до рибосоми, а в GDP-формі цей білок бере участь у транспорті деацильованої

тРНК від рибосоми до аміноацил-тРНК синтетази для реаміноацилювання [1]. eEF1B<sub>1</sub> і eEF1B<sub>2</sub> субодиниці мають різну первинну структуру, але виконують в елонгації одну й ту саму функцію – каталізують обмін GDP на GTP у молекулі eEF1A [2]. Субодиниця eEF1B<sub>3</sub> не має самостійної функції в обміні GDP/GTP. Припускають, що її роль полягає у з'єднуванні всіх субодиниць мінікомплексу eEF1B [3, 4].

Останнім часом з'являється все більше інформації щодо потенційно важливого значення компонентів комплексу eEF1 для канцерогенезу. Зокрема, причетність eEF1A до трансформації клітин вперше описано досить давно [5], однак лише нещодав-



а



б

Рис. 1. Нозерн-блот гібридизація [<sup>32</sup>P]-мічених проб кДНК eEF1A1 або -актину з панеллю РНК головного мозку людини (а: NB – нормальний головний мозок людини; GB – гліобластома; OD – олігодендрогліома); б – денситометричний аналіз

но відкрито, що істотна роль у канцерогенезі належить саме тканинспецифічній ізоформі eEF1A2. Вважають, що ця ізоформа присутня тільки в м'язах і нейронах. Тим не менш, показано, що поява eEF1A2 в інших тканинах, таких як молочна залоза або яєчник, пов'язана з пухлинами цих тканин [6, 7]. Оскільки, згідно з деякими літературними даними, за норми форму eEF1A2 знаходять тільки в нейрональній, а не в гліальній тканині мозку, важливо дослідити, чи не пов'язаний рак гліальних тканин із появою eEF1A2.

Надекспресію мРНК eEF1B або eEF1B субодиниць виявлено при раку шлунка, кишечника, підшлункової залози та ін. [8–12]. Однак рівень експресії мРНК субодиниць комплексу eEF1B у нормальних або пухлинних тканинах мозку людини залишається нез'ясованим.

Мета цієї роботи полягала в дослідженні рівня експресії мРНК, що кодують усі субодиниці ком-

плексу eEF1 та тканинспецифічну ізоформу eEF1A2, в гліальних пухлинах та нормальному головному мозку людини.

**Матеріали і методи.** Зразки астроцитарних гліом II – IV ступенів злоякісності згідно з класифікацією ВООЗ отримано з Інституту нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова (Україна). Критерії ВООЗ використано для класифікації пухлин. Хірургічні зразки гістологічно нормальних тканин мозку, які межують з пухлинами, слугували джерелом мРНК нормального мозку.

Зразки ембріональних тканин одержано з Центру ембріональних тканин «ЕМ СЕЛЛІ» (Україна). Роботу із зразками проводили з дотриманням норм, узгоджених з Комісією з біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (ІМБіГ НАН України).

Плазмиди зі вставками кДНК eEF1A1, eEF1A2, eEF1B, eEF1B і eEF1B отримано від В. Ф. Шала-

ка (ІМБіГ), Ш. Кнудсен (Університет м. Орхус, Данія) та Г. Шеу (Медичний університет, Чун Шан, Тайвань).

Сумарну РНК виділяли із заморожених у рідкому азоті тканин методом фенольної екстракції гуанідину ізотіоціанатним розчином, як описано раніше [13]. РНК (10 мкг на доріжку) фракціонували в горизонтальному 1,5 %-му агарозному гелі за присутності 2,2 М формальдегіду в боратному буфері (0,2 мМ ЕДТА, рН 8,0, 30 мМ борна кислота, 3,3 мМ тетраборат натрію, рН 7,5), а потім перенесли на нейлонові мембрани Hybond-N (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., США).

[<sup>32</sup>P]-мічені проби продуковано за допомогою фрагмента Кленова методом RandomPrimer-мічення фрагментів кДНК eEF1A1, eEF1A2, eEF1B, eEF1B та eEF1B, отриманих після гідролізу плазмід відповідними ендонуклеазами, як в [14].

Мембрану з іммобілізованою РНК інкубували з [<sup>32</sup>P]-міченими пробамі кДНК в розчині, що містив 50 %-й формамід, 5 SSC (розчин 0,15 М хлориду натрію та 0,015 М цитрату натрію), 5 розчину Денхарда, 0,5 %-й SDS та 100 мкг/мл ДНК сперми лосося, за температури 42 С протягом ночі. Фільтри відмивали двічі по 30 хв за кімнатної температури в розчині 2 SSC, 0,1 %-й SDS; один раз протягом 30 хв у розчині 2 SSC, 0,1 %-й SDS (65 С) і остаточно в розчині 0,2 SSC, 0,1 %-й SDS упродовж 30 хв (65 С).

Експозицію мембран на рентгенівську плівку здійснювали з використанням посилюючого екрану за температури -70 С. Мембрани відмивали і гібридували повторно з [<sup>32</sup>P]-міченою кДНК -актину людини для контролю нанесення РНК на агарозний гель.

Для проведення зворотної транскрипції з наступною полімеразно-ланцюговою реакцією (ЗТ-ПЛР) використовували 1–5 мкг сумарної РНК та RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase («Fermentas», Литва) згідно з протоколом виробника.

Використано такі праймери:

eEF1A1 –

GCATCCTACCACCAACTCGT (прямий),  
CAGCATCACCAGACTTCAA (зворотний);

eEF1A2 –

GAGAAGCGCTACGACGAGAT (прямий),

CTTCACCGACACGTTCTTCA (зворотний);  
eEF1B –

GGCGTCAGAAAATGGCTAC (прямий),

TCCTCCTCATTTGTCACCTGCCAAAC (зворотний).

ЗТ-ПЛР проводили у режимі: 94 С, 3 хв та 25 циклів (94 С, 30 с; 58 С, 60 с; 72 С, 60 с) і після останнього циклу – 72 С, 7 хв. Продукти ПЛР проаналізовано в 1 %-му агарозному гелі.

Денситометричний аналіз проведено за допомогою програми ScionImage.

**Результати і обговорення.** Експресію генів eEF1A1, eEF1A2, eEF1B, eEF1B і eEF1B аналізували Нозерн-блот гібридизацією панелі РНК пухлин і нормального головного мозку людини. Загалом досліджено 23 зразки гліобластоми і 10 зразків нормального головного мозку людини.

Не виявлено істотних відмінностей у рівні експресії мРНК, що кодує звичну для гліальної тканини ізоформу eEF1A1 за норми, і пухлинах глії (рис. 1).

Оскільки відомо, що поява іншої ізоформи, eEF1A2, в неспецифічних для неї тканинах пов'язана з канцерогенезом [6, 7], вирішено було перевірити наявність цієї ізоформи в гліальних пухлинах. У нормальному мозку eEF1A2, згідно з літературними даними, має локалізуватися лише в нейронах.

Як відомо, дві ізоформи eEF1A на 97 % є гомологічними, тому необхідно було контролювати специфічність отриманої кДНК eEF1A2. Для цього її гібридували із сумарною РНК, ізольованою з м'язів, головного мозку та печінки кроля. Високий рівень експресії виявлено у м'язах, менш інтенсивний сигнал спостерігали в тканині головного мозку, а в печінці сигнал був зовсім відсутній (рис. 2, а). Оскільки тканиноспецифічний характер експресії мРНК eEF1A2 відповідав відомій з літератури локалізації білка eEF1A2, кДНК eEF1A2 можна було використовувати для аналізу експресії eEF1A2 в пухлинах мозку.

Досить несподівано Нозерн-блот аналізом з використанням кДНК eEF1A2 визначено наявність мРНК eEF1A2 в зразках як пухлин, так і умовної норми глії людини (рис. 2, б). Більше того, спостерігалось досить значне і статистично вірогідне зниження рівня експресії eEF1A2 в пухлинах порівняно з нормою. На сьогодні ми не можемо

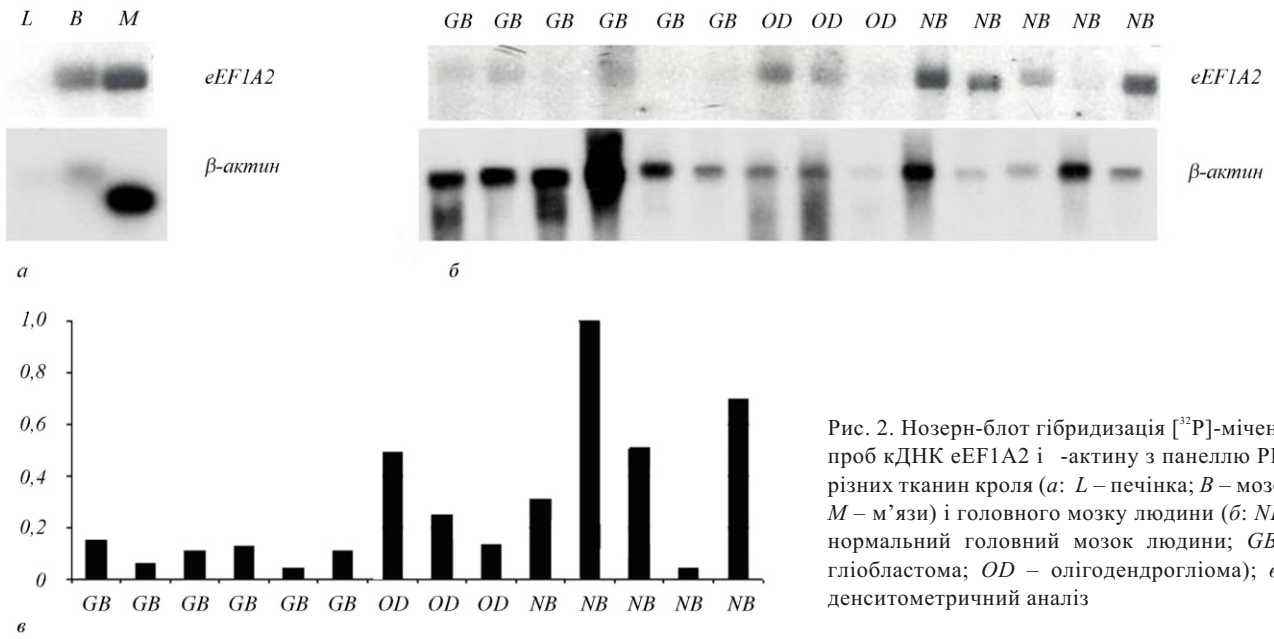


Рис. 2. Нозерн-блот гібридизація [ $^{32}$ P]-мічених проб кДНК eEF1A2 і  $\beta$ -актину з панеллю РНК різних тканин кроля (а: L – печінка; B – мозок; M – м'язи) і головного мозку людини (б: NB – нормальний головний мозок людини; GB – гліобластома; OD – олігодендрогліома); в – денситометричний аналіз

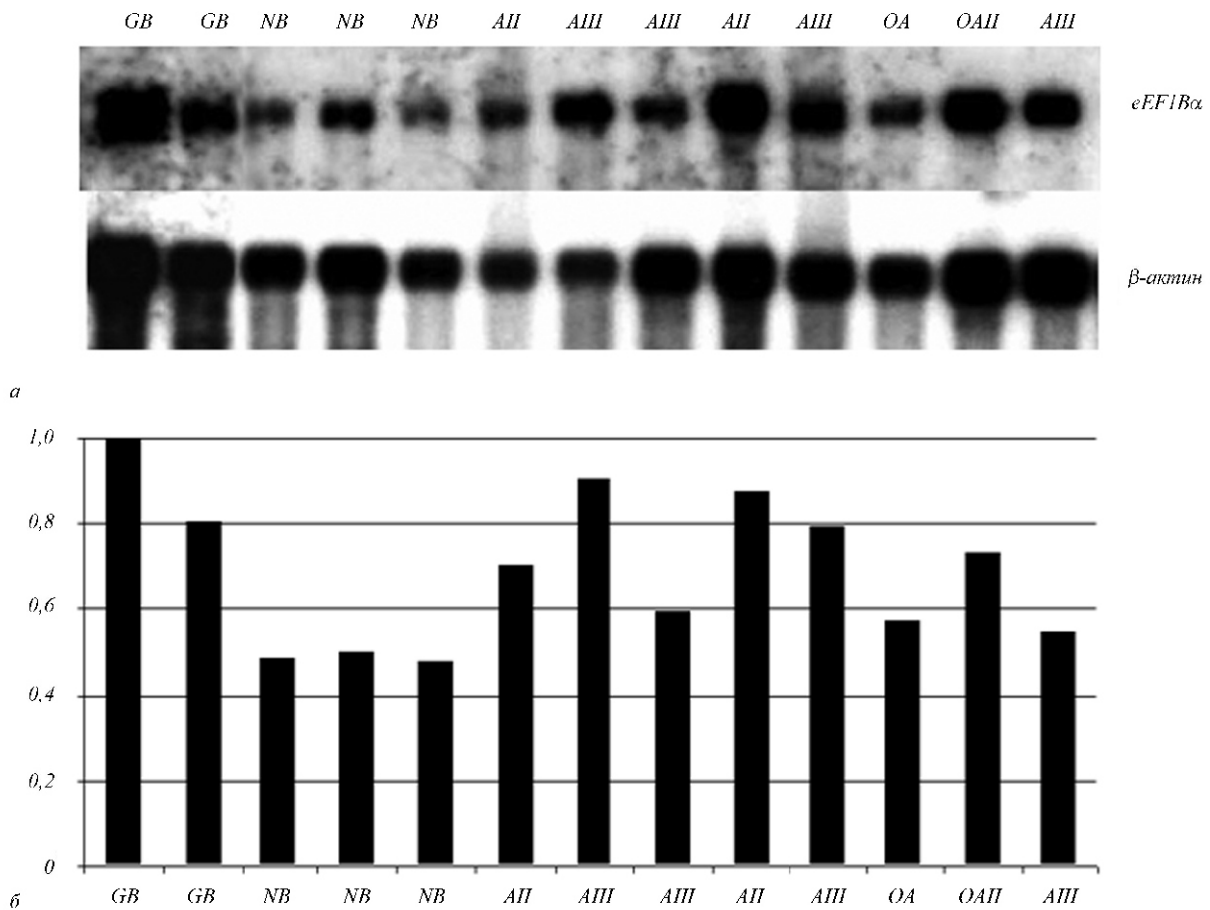


Рис. 3. Нозерн-блот гібридизація [ $^{32}$ P]-мічених проб кДНК eEF1B  $\alpha$  або  $\beta$ -актину з панеллю РНК головного мозку людини (а: NB – нормальний головний мозок людини; GB – гліобластома; АII – астроцитома II ступеня; АIII – астроцитома III ступеня; ОА – олігодендроастроцитома; ОАII – олігодендроастроцитома II ступеня); б – денситометричний аналіз

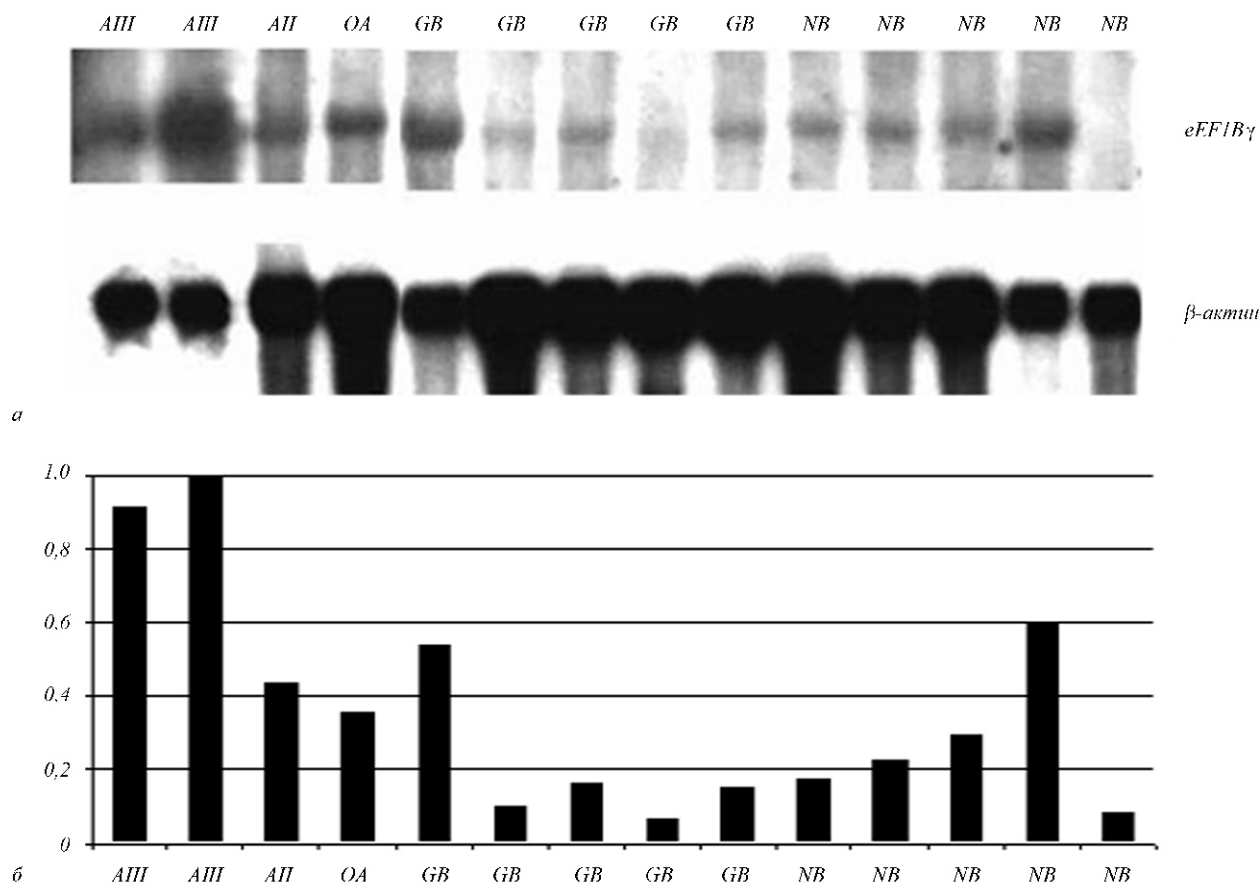


Рис. 4. Нозерн-блот гібридизація [<sup>32</sup>P]-мічених проб кДНК eEF1B або -актину з панеллю РНК головного мозку людини (а: NB – нормальний головний мозок людини; GB – гліобластома; AII – астроцитома II ступеня; AIII – астроцитома III ступеня; OA – олігодендроастроцитома); б – денситометричний аналіз

виключити, що наявність eEF1A2 в досліджуваних зразках є наслідком домішки нейрональних клітин і відповідно зниження вмісту eEF1A2 в пухлинах віддзеркалює зменшення частки нейрональних клітин у пухлинних зразках відносно умовної норми. Таку можливість буде перевірено в майбутніх імуногістологічних дослідженнях.

Таким чином, ізоформи eEF1A, які надекспресуються в декількох клітинних лініях і тканинах пухлин людини [15], у тканинах пухлин гліом головного мозку людини не проявляють підвищеного рівня експресії мРНК. Навпаки, там спостерігається суттєве зменшення кількості мРНК eEF1A2.

З літератури відомо, що рівень мРНК, які кодують субодиниці eEF1B і eEF1B, є збільшеним у злоякісних новоутвореннях різної локалізації [8–12]. Інформація щодо рівня мРНК у пухлинах головного мозку відсутня. Досить цікаво, що, не-

зважаючи на однакове співвідношення (1:1:1) різних субодиниць комплексу eEF1B [4], рівні їхньої експресії при канцерогенезі можуть бути не завжди скоординованими [8–12]. Іншими словами, надекспресія eEF1B не обов'язково супроводжується надекспресією eEF1B і навпаки. Це може свідчити про існування поки невідомої, пов'язаної з пухлиноутворенням, функції субодиниць eEF1B. Тому важливим є проаналізувати рівень експресії субодиниць комплексу eEF1B у нормальній та пухлинній тканинах головного мозку.

Нозерн-блот аналіз не виявив різниці у рівнях експресії eEF1B (рис. 3) і eEF1B (рис. 4) в пухлинах порівняно з нормальними тканинами головного мозку. Якщо однаково високий рівень експресії eEF1B в нормальних і пухлинних тканинах був очікуваним (її підвищеної експресії ніколи не спостерігається при канцерогенезі), то відсутність над-

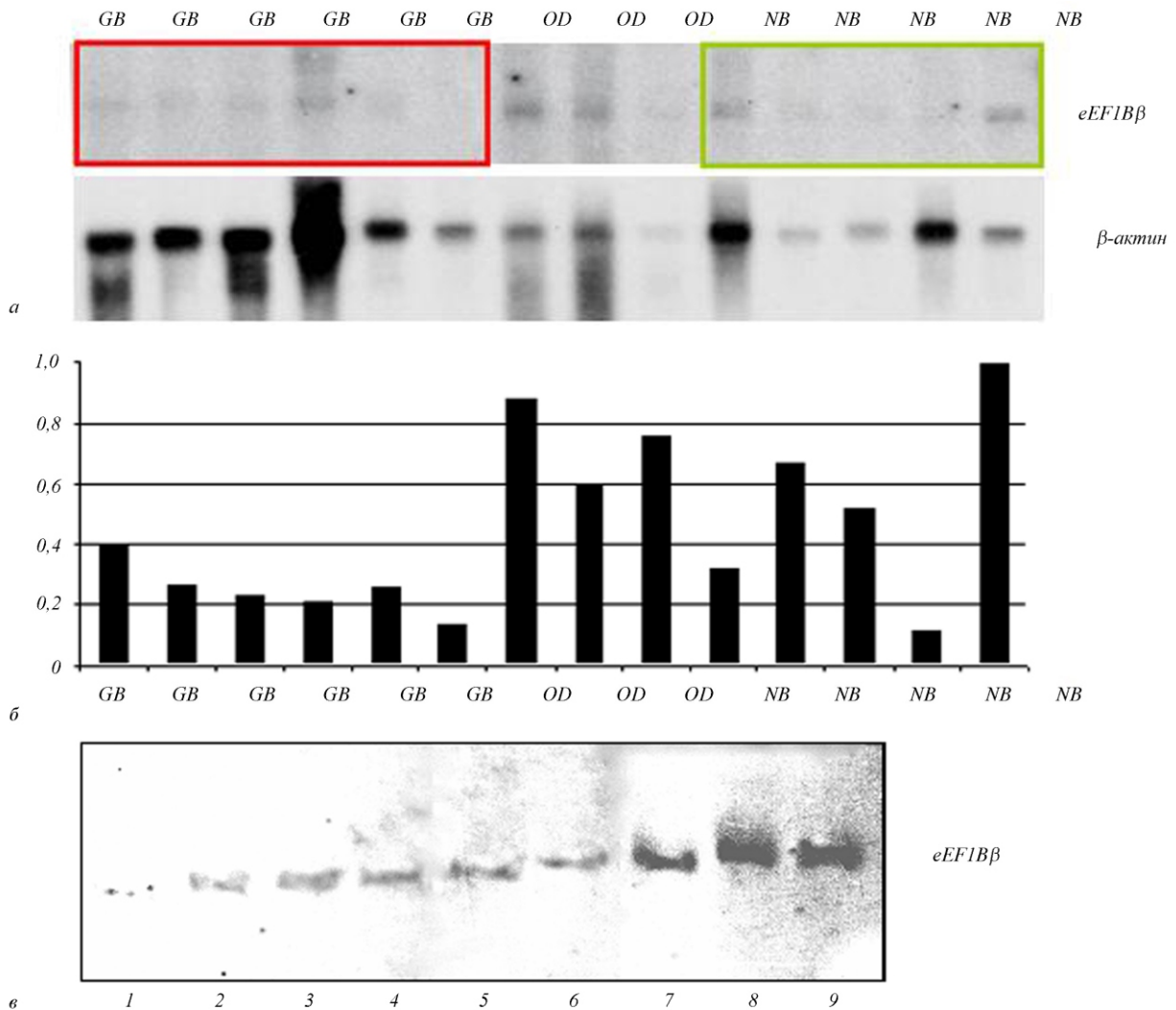


Рис. 5. Нозерн-блот гібридизація [<sup>32</sup>P]-міченої проби кДНК eEF1B і -актину з панеллю РНК головного мозку (а: NB – нормальний головний мозок людини; GB – гліобластома; OD – олигодендрогліома) та ембріональних тканин (в: 1 – нирки, вік ембріона 6 тижнів; 2 – нирки, 7 тижнів; 3 – головний мозок, 6 тижнів; 4 – головний мозок, 7 тижнів; 5 – печінка, 6 тижнів; 6 – печінка, 7 тижнів; 7 – печінка, 8 тижнів; 8 – печінка, 9 тижнів; 9 – печінка, 10 тижнів) людини; б – денситометричний аналіз

експресії eEF1B може свідчити про незаангажованість цієї субодиниці до розвитку новоутворень мозку на відміну від пухлин шлунку або кишечника [8–10].

Несподіваним виявився досить низький рівень експресії гена eEF1B як у нормальному головному мозку, так і в гліобlastомах (рис. 5, а). Позитивним контролем якості кДНК eEF1B була детекція відповідної мРНК в ембріональних тканинах людини (рис. 5, б). Отже, щоб визначити, чи присутня достовірно мРНК цієї субодиниці фактора елонгації в мозку, використано чутливіший метод ЗТ-ПЛР.

Дійсно, експресію eEF1B підтверджено як у нормальному головному мозку, так і в гліобlastомах людини (рис. 6). Важливо, що, незважаючи на досить низький рівень експресії, за допомогою Нозерн-блот аналізу можна спостерігати зниження кількості мРНК eEF1B в гліобlastомах порівняно з умовною нормою приблизно в два рази. Детальніше вивчення змін експресії eEF1B планується провести за допомогою методу ЗТ-ПЛР у реальному часі.

Мала кількість мРНК eEF1B в головному мозку на фоні високого рівня експресії субодиниць

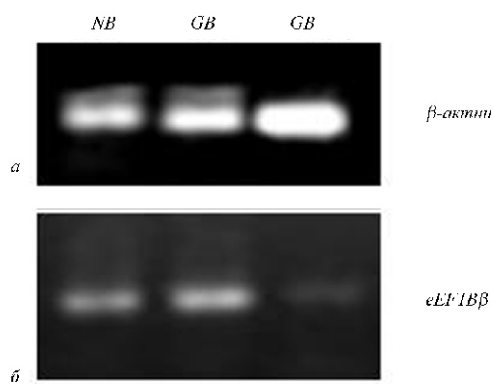


Рис. 6. Гель-електрофорез продуктів полімеразної ланцюгової реакції з праймерами eEF1B (а: NB – нормальний головний мозок людини; GB – гліобластома) та β-актину (б) кДНК гліальних пухлин та нормального головного мозку людини

eEF1B і eEF1B є неочікуваною, якщо брати до уваги раніше встановлену стехіометрію 1:1:1 для субодиниць комплексу eEF1B з інших джерел. Можна припустити, що функцію eEF1B в мозку бере на себе eEF1B або цю функцію виконує ще якийсь білок. Зокрема, недавно показано, що ацетилхоліновий мускариновий рецептор типу M4 може каталізувати GDP/GTP обмін у молекулі eEF1A [16]. Якщо цей рецептор присутній у головному мозку людини в достатній кількості, не виключено, що він може функціонально замінити eEF1B.

У подальшій роботі планується провести оцінку кількості в пухлинних і нормальних тканинах головного мозку людини різних субодиниць eEF1 на рівні білків. Це дасть змогу точніше визначити склад і стехіометрію субодиниць комплексу eEF1B в головному мозку людини і можливу роль субодиниць у канцерогенезі.

Роботу частково профінансовано INTAS, ДФФД МОН України та спільними програмами НАН України з Францією і Російською Федерацією, а також Грантом Президента України для обдарованої молоді.

*M. V. Veremieva, K. O. Shostak, T. A. Malysheva, Y. P. Zozulya, V. D. Rozumenko, V. M. Kavsan, B. S. Negrutskii*

Investigation of expression of different subunits of eukaryotic translation elongation factor eEF1 in human glial brain tumors

Summary

*Eukaryotic elongation factor 1 (eEF1) mediates the binding of aminoacyl-tRNA to the ribosome in GTP-dependent manner. eEF1*

*consists of four subunits: eEF1A, eEF1B, eEF1B and eEF1B. eEF1A has two different isoforms: eEF1A1 is present throughout development and is ubiquitously expressed with the exception of adult muscle, while eEF1A2 is developmentally regulated and expressed only in muscle cells and neurons. Expression of eEF1A1, eEF1A2, eEF1B, eEF1B and eEF1B genes was analyzed by Northern blot hybridization of a panel of brain tumor and normal brain tissue RNAs. Totally 23 glioblastoma and 10 normal brain samples were investigated. In gliomas, no meaningful difference in the mRNA content for the eEF1A1, eEF1B and eEF1B subunits as compared to normal brain tissues was found. However, we have observed approximately 2-fold decrease in the eEF1B mRNA expression in human gliomas as compared to normal human brain by Northern blot analysis. Besides, we have shown reduced level of the eEF1A2 mRNA expression in glioblastoma as compared to normal human glia.*

*Keywords: eEF1, eukaryotic translation elongation factor 1, overexpression of genes, human glial brain tumors.*

*M. V. Veremieva, K. O. Shostak, T. A. Malysheva, Y. P. Zozulya, V. D. Rozumenko, V. M. Kavsan, B. S. Negrutskii*

Исследование экспрессии разных субъединиц эукариотного фактора элонгации трансляции eEF1 в глиальных опухолях головного мозга человека

Резюме

*Эукариотный фактор элонгации трансляции 1 (eEF1) является одним из основных компонентов трансляционного аппарата клетки, участвующий в элонгации белковой цепи. eEF1 состоит из четырех субъединиц: eEF1A, eEF1B, eEF1B и eEF1B. Существуют две тканеспецифические изоформы субъединицы eEF1A (A1 и A2). Экспрессия генов eEF1A1, eEF1A2, eEF1B, eEF1B и eEF1B проанализирована Нозерн-блот гибридацией панели РНК опухолей и нормального головного мозга человека. Всего исследованы 23 образца глиальных опухолей и 10 образцов нормального головного мозга человека. Нозерн-гибридизацией выявлено отсутствие отличий в экспрессии мРНК субъединиц eEF1A1, eEF1B, eEF1B и снижение количества мРНК eEF1B в глиобластомах по сравнению с условной нормой приблизительно в два раза. Также показано снижение уровня экспрессии мРНК eEF1A2 в опухолевых образцах по сравнению с условно нормальной глией человека.*

*Ключевые слова: eEF1, эукариотный фактор элонгации трансляции 1, сверхэкспрессия гена, глиальные опухоли головного мозга человека.*

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1a: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*—1998.—**60**.—P. 48–77.
2. Amons R., Guerrucci M. A., Karssies R. H., Morales J., Cormier P., Moller W., Belle R. The leucine-zipper in elongation factor EF-1, a guanine-nucleotide exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus* // *Biochim. et Biophys. Acta.*—1994.—**1218**.—P. 346–350.
3. Janssen G. M. C., Moller W. Kinetic studies on the role of elongation factors 1 and 1 in protein synthesis // *J. Biol. Chem.*—1988.—**263**.—P. 1773–1778.

4. Janssen G. M., van Damme H. T. K., Kriek J., Amons R., Moller W. The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia* // *J. Biol. Chem.*—1994.—**269**.—P. 31410–31417.
5. Tatsuka M., Mitsui H., Wada M., Nagata A., Nojima H., Okayama H. Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation // *Nature*.—1992.—**359**.—P. 333–336.
6. Anand N., Murthy S., Amann G., Wernick M., Porter L. A., Cukier I. H., Collins C., Gray J. W., Diebold J., Demetrick D. J., Lee J. M. Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer // *Nat. Genet.*—2002.—**31**.—P. 301–305.
7. Tomlinson V. A. L., Newbery H. J., Wray N. R., Jackson J., Larionov A., Miller W. R., Dixon J. M., Abbot C. M. Translation elongation factor eEF1A2 is potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumors // *BMC Cancer*.—2005.—**5**.—P. 113–120.
8. Chi K., Jones D. V., Frazier M. L. Expression of an elongation factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon // *Gastroenterology*.—1992.—**103**.—P. 98–102.
9. Lew Y., Jones D. V., Mars W. M., Evans D., Byrd D., Frazier M. L. Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer // *Pancreas*.—1992.—**7**.—P. 144–152.
10. Ender B., Lynch P., Kim Y. H., Inamdar N. Y., Cleary K. R., Frazier M. L. Overexpression of an elongation factor-1 gamma-hybridizing RNA in colorectal adenomas // *Mol. Carcinogen*.—1993.—**7**.—P. 18–20.
11. Ogawa K., Utsunomiya T., Mimori K., Tanaka Y., Inoue H., Murayama S., Mori M. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma // *Br. J. Cancer*.—2004.—**91**.—P. 282–286.
12. De Bortoli M., Castelino R. C., Lu X.-Y., Deyo J., Sturla L. M., Adesina A. M., Perlaky L., Pomeroy S. L., Lau C. C., Man T.-K., Rao P. H., Kim J. Y. H. Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30, and RPS20 on the long arm of chromosome 8 // *BMC Cancer*.—2006.—**6**.—P. 223.
13. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem.*—1987.—**162**.—P. 156–159.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—424 p.
15. Joseph P., O'Kernick C. M., Othumpangat S., Lei Y.-X., Yuan B.-Z., Ong T.-M. Expression profile of eukaryotic translation factors in human cancer tissues and cell lines // *Mol. Carcinogen*.—2004.—**40**.—P. 171–179.
16. McClatchy D. B., Knudsen C. R., Clark B. F., Kahu R. A., Hall R. A., Levey A. I. Novel interaction the M4 muscarinic acetylcholine receptor and elongation factor 1A2 // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 32.—P. 29268–29274.

УДК 577.217:577.112.7  
Надійшла до редакції 20.08.07