

Мультисубодиничний комплекс eEF1H у гліальних пухлинах головного мозку людини: від мРНК до білка

М. В. Верем'єва, Т. А. Малишева¹, Ю. П. Зозуля¹, В. Д. Розуменко¹,
Л. Л. Сидорик, В. М. Кавсан, Б. С. Негруцький, А. В. Єльська

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

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

vermarina@list.ru

Мета. Проаналізувати вміст усіх субодиниць фактора елонгації трансляції eEF1H (eEF1A, eEF1B₁, eEF1B₂ і eEF1B₃) в гліальних пухлинах головного мозку людини порівняно з умовною нормою. **Методи.** Компоненти комплексу eEF1H досліджували у клінічних зразках гліальних пухлин людини Вестерн-блот-аналізом. **Результати.** Для визначення вмісту білків eEF1B₁, eEF1B₂ і eEF1B₃ отримано поліклональні антитіла до цих субодиниць. Спостерігали тенденцію до підвищення рівня білка eEF1B в гліобластомах. Відмінності в рівні білків eEF1A, eEF1B₁ та eEF1B₂ в гліальних пухлинах у порівнянні з умовною нормою виявилися несуттєвими. **Висновки.** Ця робота є продовженням попередніх досліджень, де вивчали рівень мРНК, які кодують субодиниці комплексу eEF1H у пухлинах головного мозку людини. Виявлене зростання концентрації білка eEF1B в гліобластомах, що відбувалося на фоні практичної відсутності розбіжностей в експресії інших субодиниць комплексу, може свідчити про виконання субодинцею eEF1B певної пухлинозалежної ролі, окремої від трансляційної функції комплексу eEF1H.

Ключові слова: фактор елонгації трансляції eEF1H, гліальні пухлини головного мозку людини.

Вступ. Мультисубодиничний комплекс eEF1H, що бере участь в елонгації білкового ланцюга, складається з чотирьох субодиниць. eEF1A відповідає за кодон-залежне зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом 80S рибосоми. Субодиниці eEF1B₁ і eEF1B₂ мають різну первинну структуру, але виконують в елонгації одну й ту саму функцію – каталізують обмін ГДФ на ГТФ у молекулі eEF1A. Субодиниця eEF1B₃, скоріш за все, відіграє в цьому комплексі структурну роль [1, 2].

Нещодавно в деяких пухлинах людини виявлено підвищення рівня мРНК, які кодують різні компоненти комплексу eEF1H [3–6]. У літературі практично відсутні дані стосовно того, яким чином пухлиноутворення впливає на вміст різних субодиниць eEF1H у клітинах. Вважають, що фактори елонгації мають істотне значення у функціонуванні пухлин, оскільки показано, що інгібування елонгації поліпептидів призводить до зниження резистентності пухлин до хіміотерапії [7].

Раніше ми дослідили можливість змін вмісту мРНК, які кодують субодиниці комплексу eEF1H, у

гліальних пухлинах головного мозку людини порівняно з нормальними тканинами [8].

Гліальні пухлини репрезентують неоднорідну групу найпоширеніших (40 %) внутрішньочерепних новоутворень, з яких гліобластоми є найагресивнішими пухлинами центральної нервової системи людини із схильністю до інфільтрації [9].

Оскільки коливання вмісту мРНК у тканинах не завжди корелюють зі змінами відповідного білка [10], ми вважали за необхідне проаналізувати, чи змінюється і якщо так, то яким чином, вміст білкових субодиниць eEF1H у гліальних пухлинах головного мозку людини.

Матеріали і методи. *Зразки тканин.* Зразки гліобластом (астроцитоми IV ступеня злоякісності згідно з класифікацією WHO) отримано з Інституту нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова АМН України. Для класифікації пухлин використано критерії WHO. Хірургічні зразки гістологічно нормальної тканини головного мозку, що межує з пухлиною, слугували джерелом білків норми. Загалом досліджено 23 зразки гліобластоми та шість зразків нормальної тканини головного мозку людини. Протокол дослідження схвалений комісіями з біоетики обох інститутів.

Отримання поліклональних антитіл проти eEF1B₁, eEF1B₂, eEF1B₃. Кролів імунізували очищеним рекомбінантним білком eEF1B₁ (0,15 мг у 50 %-му повному ад'юванті Фрейнда, ПАФ) внутрішньошкірно вздовж хребта у шість точок. Другу ін'єкцію проводили такою ж кількістю антигену в ПАФ через 8 тижнів. Останню підсилюючу імунізацію кролів здійснювали 0,1 мг антигену в 50 %-му неповному ад'юванті Фрейнда (НАФ) через 2 місяці.

Мишей імунізували 0,02 мг eEF1B₁ або eEF1B₂ в 50 %-му ПАФ у черевну порожнину. Через чотири тижні їм вводили таку ж дозу антигену, але в 50 %-му НАФ. Останню імунізацію проводили через 25 днів. Сироватку кролів або мишей збирали через 8 днів від останньої імунізації. Титр специфічних антитіл у сироватці крові імунізованих тварин визначали за методом ELISA.

Фракцію імуноглобулінов преципітували із сироватки висоловлюванням 50 %-м сульфатом амонію з подальшим очищенням на DEAE-целюлозі («Ser-

va», ФРН) та протеїн G-сефарозі («Sigma», США) за протоколом виробника.

Специфічність антитіл перевіряли Вестерн-блот-аналізом проти рекомбінантного білка та на лізатах післяопераційних тканин людини, використовуючи протокол виробника ECL-системи («Pierce», США).

Вестерн-блот-аналіз. Заморожені зразки тканин гомогенізували за присутності рідкого азоту та буфера для лізису (10 mM K₂HPO₄, 100 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, pH 7,4). Отриману суспензію інкубували на льодовій бані протягом 30 хв та центрифугували при 13000 g упродовж 20 хв за температури 4 °C.

Концентрацію білків у розчинній фракції лізатів вимірювали методом Бредфорд [11]. Однакову кількість білка кожного лізату фракціонували електрофорезом у 12,5 %-му SDS-поліакриламідному гелі, потім переносили на нітроцелюлозні мембрани. Мембрани блокували 5 %-м сухим знежиреним молоком у фосфатному буфері з твіном-20 (PBS-T: 1,47 mM KH₂PO₄, 4,29 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 0,1 %-й твін-20, pH 7,3) протягом 1 год з подальшою інкубацією з первинними антитілами.

Мишачі моноклональні антитіла проти eEF1A («Upstate», США), поліклональні антитіла проти eEF1B₁ та eEF1B₂, а також поліклональні антитіла кроля проти eEF1B₃ використовували для визначення відповідних білків у тканинних лізатах. Після кожної обробки мембран ECL-реагентом («Pierce», США) мембрани промивали розчином PBS-T та інкубували з антитілами проти α -актину («Santa Cruz», США). Ендогенний α -актин слугував контролем нанесення препарату.

Денситометричний аналіз сигналів здійснювали за допомогою програми Scion Image. Дані нормалізували, використовуючи відношення інтенсивності сигналів певної субодиниці комплексу eEF1H і α -актину.

Результати і обговорення. Реактивність поліклональних антитіл проти субодиниць комплексу eEF1B (eEF1B₁, eEF1B₂ та eEF1B₃) з відповідними очищеними рекомбінантними і ендогенними білками та відсутність упізнання антитілами неспецифічних білків у лізатах тканин людини перевіряли в

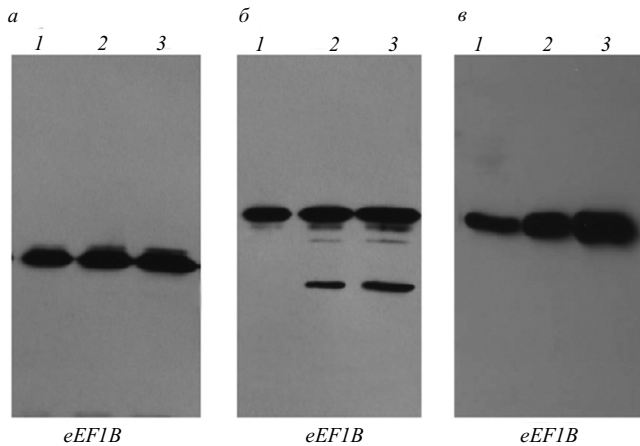


Рис. 1. Вестерн-блот-аналіз специфічності поліклональних антитіл проти eEF1B (а: 1 – eEF1B, 0,1 мкг; 2 – лізат тканини шлунку людини, 40 мкг білка; 3 – лізат тканини легенів людини, 40 мкг білка), eEF1B (б: 1 – eEF1Bв, 0,1 мкг; 2 – лізат тканини шлунку людини, 40 мкг білка; 3 – лізат тканини легенів людини, 40 мкг білка) і eEF1B (в: 1 – eEF1Bг, 0,5 мкг; 2 – лізат тканини шлунку людини, 40 мкг білка; 3 – лізат тканини легенів людини, 40 мкг білка)

окремих експериментах методом імуноблотингу (рис. 1).

Вестерн-блот-аналіз вмісту білка eEF1A у зразках гліобластом порівняно з нормою не виявив суттєвої різниці (рис. 2). В попередньому дослідженні нами не знайдено відмінностей в експресії гена *EEF1A1* на рівні мРНК у пухлинних і нормальних тканинах [8].

Аналогічні результати отримано для eEF1B.

Раніше нами показано зниження в гліобlastомах рівня мРНК субодиниці eEF1B. Незважаючи на те, що загальний вміст цієї мРНК як у пухлинних, так і в нормальних тканинах був дуже низьким [8], кількість відповідного білка в досліджуваних зразках виявилася достатньою для детекції Вестерн-блот-аналізом. Вміст білка eEF1B був подібним у пухлинних і нормальних тканинах (рис. 2).

Виявлено тенденцію до збільшення рівня білка eEF1B в гліобlastомах людини (рис. 2). Цікаві результати отримано раніше стосовно вмісту мРНК, що кодує цей білок, у пухлинах головного мозку [8]. Аналіз відповідно до стадії захворювання демонстрував зростання вмісту мРНК eEF1B в астроцитомах II–III ступенів злоякісності. Натомість, у

гліобlastомах IV ступеня злоякісності спостерігали тенденцію до зменшення вмісту цієї мРНК, еквівалентного нормі [8]. Тобто в даному разі зафіксовано відсутність кореляції між змінами вмісту мРНК і відповідного білка в гліобlastомах, що вказує на можливість посттранскрипційної регуляції рівня eEF1B у таких пухлинах.

У роботах інших авторів зростання вмісту мРНК, що кодує eEF1B, знайдено в пухлинах молочної залози, шлунка, кишечника і підшлункової залози [12–15]. У нашому дослідженні отримано перше свідчення на користь пухлинозалежного підвищення кількості білка eEF1B в гліобlastомі. Відсутність при цій патології координованих змін інших субодиниць комплексу може свідчити про появу в клітинах пухлин індивідуального, не залученого до мультисубодиничного комплексу білка eEF1B. Поєднуючи отримані нами результати з даними літератури, можна висунути гіпотезу щодо здійснення субодиницею eEF1B деяких інших, крім трансляційної, функцій. Наприклад, у відповіді клітини на окисдаивний стрес ця субодиниця може виконувати певну функцію [16] окремо від комплексу.

Ця робота є першою спробою дослідити пов'язані з пухлиноутворенням зміни вмісту всіх компонентів мультибілкового комплексу факторів елонгації трансляції eEF1N на білковому рівні. На жаль, обмежена доступність біологічного матеріалу не дозволила дослідити достатню для класичного статистичного аналізу кількість зразків нормальної тканини головного мозку людини. Зміни вмісту субодиниць і, зокрема, уже виявлена тенденція до зростання кількості білка eEF1B в гліобlastомах будуть детальніше вивчені у подальших експериментах з пухлинами різної локалізації.

Висновки. Проведено порівняльне дослідження вмісту різних субодиниць мультибілкового комплексу факторів елонгації трансляції eEF1N у гліобlastомах і нормальних тканинах головного мозку людини із використанням Вестерн-блот-аналізу.

Отримано антитіла проти eEF1B, eEF1B і eEF1B субодиниць комплексу. Нами не встановлено пухлинозалежних змін вмісту білків eEF1A, eEF1B і eEF1B, однак спостерігали тенденцію до збільшення кількості білка eEF1B.

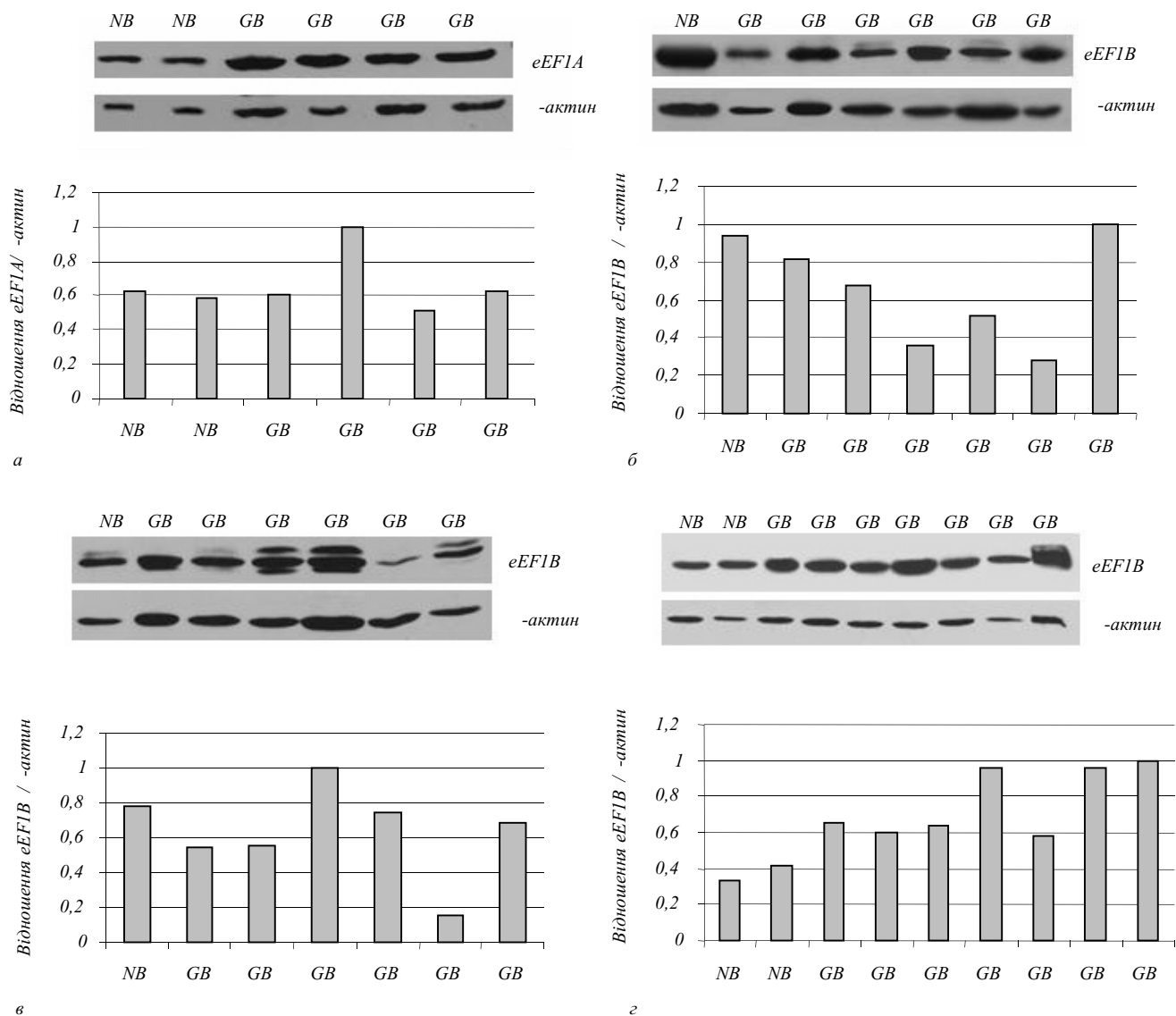


Рис. 2. Порівняльний аналіз вмісту білкових компонентів комплексу eEF1H (а – eEF1A; б – eEF1B ; в – eEF1B ; г – eEF1B) в гліобластомах людини. Денситометричний аналіз сигналів проводили з використанням програми Scion Image. Концентрацію досліджуваного білка оцінювали як відношення інтенсивності сигналів субодиниці комплексу до -актину; NB – зразок нормального головного мозку людини; GB – зразок гліобластоми людини

Зростання в гліобластомах рівня тільки однієї субодиниці комплексу eEF1H може свідчити про виконання білком eEF1B в індивідуальному стані певної пухлинозалежної ролі, окремої від трансляційної функції всього комплексу.

Дослідження виконано частково за рахунок коштів проекту ДФФД України Ф28/276-2009 і Програм співробітництва між НАН України і CNRS. Автори вдячні професору В. В. Філоненку за допомогу із отримання антитіл.

M. V. Veremieva, T. A. Malysheva, Y. P. Zozulya, V. D. Rozumenko, L. L. Sidorik, V. M. Kavsan, B. S. Negrutskii, A. V. El'skaya

Multisubunit complex eEF1H in human glial tumors: from mRNA to protein

Summary

Aim. To investigate protein level of all subunits of the eukaryotic elongation translation factor eEF1H (eEF1A, eEF1B, eEF1B and eEF1B) in glial tumors of human brain in comparison with normal brain. **Methods.** The eEF1H components content has been investigated in human glioblastoma clinical samples by Western blot analysis. **Results.** To determine the eEF1B, eEF1B and

eEF1B content, the polyclonal antibodies against all *eEF1H* subunits were obtained. The tendency of the *eEF1B* protein level to increase in glioblastomas was observed. There were no significant differences in the *eEF1A*, *eEF1B* and *eEF1C* protein contents. **Conclusions.** In the previous report we analysed the expression of all *eEF1H* subunits in human glial brain tumor on the mRNA level. This study showed that *eEF1B* was overexpressed while no significant changes in other *eEF1H* subunits were observed. It suggests a possible function of *eEF1B* which is cancer-related and is not connected with the functioning of *eEF1H* complex in translation.

Keywords: translation elongation factor *eEF1H*, human glial brain tumors.

М. В. Веремьева, Т. А. Малышева, Ю. П. Зозуля,
В. Д. Розуменко, Л. Л. Сидорик, В. М. Кавсан,
Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Мультисубъединичный комплекс eEF1H в глиальных опухолях головного мозга человека: от мРНК до белка

Резюме

Цель. Проанализировать содержание всех субъединиц фактора элонгации трансляции *eEF1H* (*eEF1A*, *eEF1B*, *eEF1C* и *eEF1D*) в глиальных опухолях головного мозга человека по сравнению с условной нормой. **Методы.** Компоненты комплекса *eEF1H* исследовали в клинических образцах глиальных опухолей человека Вестерн-блот-анализом. **Результаты.** Для определения содержания белков *eEF1B*, *eEF1C* и *eEF1D* получены поликлональные антитела против этих субъединиц. Наблюдалась тенденция к повышению уровня белка *eEF1B* в глиобластомах. Отличия в уровнях белков *eEF1A*, *eEF1B* и *eEF1C* оказались незначительными. **Выводы.** Эта работа продолжает предыдущие исследования по изучению уровня мРНК, кодирующих субъединицы комплекса *eEF1H* в опухолях головного мозга человека. Выявленное увеличение концентрации белка *eEF1B* в глиобластомах, происходящее на фоне практически отсутствующих изменений в уровнях экспрессии других субъединиц комплекса, может указывать на выполнение субъединицей *eEF1B* определенной опухоль-зависимой роли, отличной от трансляционного комплекса *eEF1H*.

Ключевые слова: фактор элонгации трансляции *eEF1H*, 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 // Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.—1998.—**60**.—P. 47–78.
2. IUMBMB. Prokaryotic and eukaryotic translation factors. Ad Hoc Nomenclature Subcommittee Report // Biochimie.—1996.—**78**, N 11—12.—P. 1119–1122.
3. Joseph P., O'Kernick C., Othumpangat S., Lei Y., Yuan B., Ong T. Expression profile of eukaryotic translation factors in

human cancer tissues and cell lines // Mol. Carcinogen.—2004.—**40**, N 3.—P. 171–179.

4. 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**, N 2.—P. 282–286.
5. 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**, N 1.—P. 18–20.
6. De Bortoli M., Castellino 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. 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.
7. Robert F., Carrier M., Rawe S., Chen S., Lowe S., Pelletier J. Altering chemosensitivity by modulating translation elongation // PLoS One.—2009.—**4**, N 5.—e5428.
8. Veremieva M., Shostak K., Malysheva T., Zozulya Y., Rozumenko V., Kavsan V., Negrutskii B. Expression of different subunits of eukaryotic translation elongation factor eEF1 in human glial brain tumors // Biopolym. cell.—2008.—**24**, N 4.—P. 310–317.
9. Kleihues P., Cavenee W. K. World Health Organization classification of tumors of the nervous system.—Lyon: IARC/WHO, 2000.
10. Maier T., Guell M., Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples // FEBS Lett.—2009.—**583**, N 24.—P. 3966–3973.
11. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—**72**.—P. 248–254.
12. Al-Maghrebi M., Anim J. T., Olalu A. A. Up-regulation of eukaryotic elongation factor-1 subunits in breast carcinoma // Anticancer Res.—2005.—**25**.—P. 2573–2578.
13. Chi K., Jones D., Frazier M. Expression of an elongation factor 1 gamma-related sequence in adenocarcinomas of the colon // Gastroenterology.—1992.—**103**, N 1.—P. 98–102.
14. Mimori K., Mori M., Tanaka S., Akiyoshi T., Sugimachi K. The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma // Cancer.—1995.—**75**, N 6 (Suppl.).—P. 1446–1449.
15. Lew Y., Jones D., Mars W., Evans D., Byrd D., Frazier M. Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer // Pancreas.—1992.—**7**, N 2.—P. 144–152.
16. Olarewaju O., Ortiz P. A., Chowdhury W. Q., Chatterjee I., Kinzy T. G. The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway // RNA Biol.—2004.—**1**, N 2.—P. 89–94.

UDC 577.217:577.112.7

Received 05.05.10