

UDC 577.2 + 616-006

Транскрипційний і посттранскрипційний контроль експресії eEF1A2 у процесі диференціації міобластів

А. А. Вісловух¹, І. С. Гройсман², А. В. Єльська¹, Б. С. Негруцький¹,А. Н. Полеська²

¹Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної біології
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

²Національний центр наукових досліджень (CNRS) та Комісаріат атомної енергетики (CEA)
Сакле, Жиф-сюр-Івет, Франція, F-91191

a.a.vislovukh@imbg.org.ua

*У процесі постнатального розвитку в нейрональній і м'язовій тканинах відбувається зміна ізоформи A1 фактора елонгації трансляції на ізоформу A2. Перемикання експресії ізоформ є життєво важливою подією, оскільки мутантні миші, що містять делецію *EEF1A2*, гинуть на 28-й день після народження. Механізми інгібування A1 і стимуляції A2 протягом перших днів постнатального розвитку невідомі. Наявність сайтів зв'язування мікроРНК у 3'-нетрансльованих послідовностях мРНК ізоформ фактора елонгації трансляції передбачає існування посттранскрипційного контролю даного процесу. **Мета.** Перевірити можливість посттранскрипційної регуляції експресії ізоформ A1 і A2 під час диференціації іморталізованих міобластів людини *LHCN*. **Методи.** Рівень експресії генів визначали методом кількісної ПЛР, наявність посттранскрипційного контролю детектували методом репортерних генів. **Результати.** Використовуючи як модель клітинну лінію іморталізованих міобластів людини *LHCN*, показано індукцію ізоформи A2 фактора елонгації трансляції *eEF1* при диференціації міобластів, наявність транскрипційного і посттранскрипційного контролю в даному процесі, а також потенційну участь мікроРНК у процесі зміни експресії ізоформ. **Висновки.** Індукція ізоформи A2 протягом диференціації міобластів може відбуватися як на транскрипційному, так і на посттранскрипційному рівні.*

Ключові слова: *eEF1A1, eEF1A2, іморталізовані міобласти людини LHCN, диференціація, мікроРНК.*

Вступ. Евкаріотний фактор елонгації трансляції (eEF1A) є одним із ключових елементів білкового синтезу [1]. Основною функцією eEF1A є доставка аміноацильованої тРНК в А-сайт рибосоми [2]. Під час ембріогенезу ізоформа A1 (eEF1A1) є основною і експресується в усіх тканинах. Але в процесі постнатального періоду розвитку в деяких тканинах відбувається зниження і зупинка експресії ізоформи A1 з паралельною індукцією експресії ізоформи A2 (eEF1A2) [3, 4]. Такі зміни характерні лише для термінально диференційованих клітин, зокрема, для нейронів, кардіоміоцитів і міоцитів [5, 6]. Питання про механізм і фізіологічне значення перемикання

експресії ізоформ на сьогоднішній день залишається без відповіді. Відсутність ізоформи A2, спричинена частковою делецією гена *EEF1A2*, знайдена у мутантних мишей *wst/wst*, є летальною. У таких мишей поступово порушується експресія A1, але на заміну їй експресія A2 не з'являється. Фенотип даних мишей характеризується зменшенням маси тіла, тремором, патологіями м'язової і нервової систем. На 28-й день після народження гомозиготи за цим алелем помирають [7].

Зазначені ізоформи на 98 % є гомологічними. Але незважаючи на значну гомологію і схожу ефективність трансляції, ці білки значно відрізняються за неканонічними функціями [8, 9]. Показано, що eEF1A1 має проапоптичні, тоді як eEF1A2 – анти-

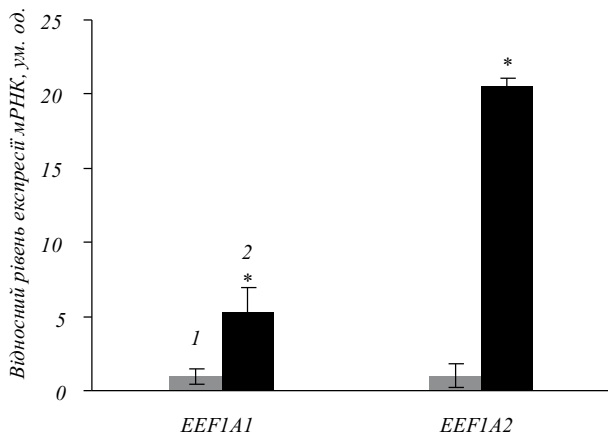


Рис. 1. Зміна експресії ізоформ фактора елонгації трансляції eEF1 під час диференціації міобластів. Кількісний ПЛР-аналіз мРНК EEF1A1/A2 в проліферуючих міобластах (1) та диференційованих міоцитах (2); * $p < 0,05$; t -тест Ст'юдента

апоптичні властивості [10]. Існують дані, які підтверджують протоонкогенну природу eEF1A2 [11]. Наявність ізоформи A2 показано в тканинах раку молочної залози, легенів та яєчників [12].

Незважаючи на високий рівень гомології білків, мРНК, які кодують ізоформи A1 і A2, значно відрізняються за 3'- і 5'-нетрансльованими послідовностями (НТП). Це свідчить про можливість різного контролю експресії ізоформ на посттранскрипційному рівні. МікроРНК є одними з головних гравців у системі посттранскрипційного контролю [13]. Наявність сайтів для різних мікроРНК у НТП-ділянках ізоформ наводить на думку стосовно участі посттранскрипційного контролю при перемиканні експресії ізоформ з A1 на A2. В даній роботі експериментально підтверджено гіпотезу наявності посттранскрипційного контролю у разі перемикання ізоформ фактора елонгації eEF1A при диференціації міобластів, а також участь мікроРНК у даному процесі.

Матеріали і методи. *Культура клітин.* Культуривування і диференціацію іморталізованих міобластів людини LHCN проводили згідно з оригінальною методикою [14].

Синтез кДНК, кількісна ПЛР. Тотальну РНК виділяли з $(1-2) \cdot 10^6$ клітин, використовуючи TRI-регент («Sigma Chem. Co.», США). кДНК синтезували за допомогою зворотної транскриптази RevertAid («Fermentas», Литва) та олігоДТ-праймера згідно з рекомендаціями виробника. Кількісну ПЛР

проводили, як описано раніше [15]. Відносну кількість мРНК EEF1A1/A2 нормалізували до мРНК бета-актину. Кількісний ПЛР-аналіз мікроРНК здійснювали із застосуванням комерційного набору TaqMan® MicroRNA Assays («Applied Biosystems», США) за рекомендаціями виробника.

Метод репортерного гену. Проліферуючі або диференційовані клітини LHCN трансфікували 20 нг плазмиди, яка містить відкриту рамку зчитування люцифрази та 3'-НТП EEF1A1/A2, з використанням ліпоектаміну згідно з інструкцією виробника. Через 24 год рівень люцифрази вимірювали за допомогою Dual-Luciferase® Reporter Assay System за протоколом виробника.

Результати і обговорення. Іморталізовані міобласти людини отримували, трансформуючи їх теломеразою і циклін-залежною кіназою 4 [14]. Отримана клітинна лінія здатна як до проліферації у вигляді недиференційованих міобластів, так і до диференціації із формуванням міоцитів. Основним критерієм можливості використання клітин LHCN для вивчення регуляції експресії A1 і A2 є взаємозаміна експресії ізоформ після процесу диференціації. Тому ми порівняли експресію ізоформ в недиференційованих міобластах і на 6-й день диференціації. Після завершення диференціації спостерігали 20-разове збільшення експресії мРНК ізоформи A2, що відображає аналогічний процес в організмі [7] (рис. 1). Водночас показано менш значуще, ніж у EEF1A2, але статистично достовірне п'ятиразове зростання мРНК ізоформи EEF1A1.

МікроРНК відіграють важливу роль у процесі диференціації міобластів і розвитку патологій м'язової і серцевої тканин [16]. Щоб перевірити можливість участі мікроРНК у регуляції експресії ізоформ при диференціації міобластів ми проаналізували *in silico* сайти зв'язування мікроРНК в 3'-НТП мРНК EEF1A1/A2. Встановлено, що в мРНК ізоформи EEF1A1 можуть існувати сайти зв'язування mir-133, mir-543, mir-33, а в мРНК EEF1A2 – сайти зв'язування mir-744, mir-661, mir-675. Слід зауважити, що 3'-НТП мРНК EEF1A1 на відміну від EEF1A2 містить сайт зв'язування для mir-133, ключової мікроРНК при диференціації міобластів [16].

Кореляція зміни експресії мікроРНК з порушенням експресії цільових білків є одним із фактів, що

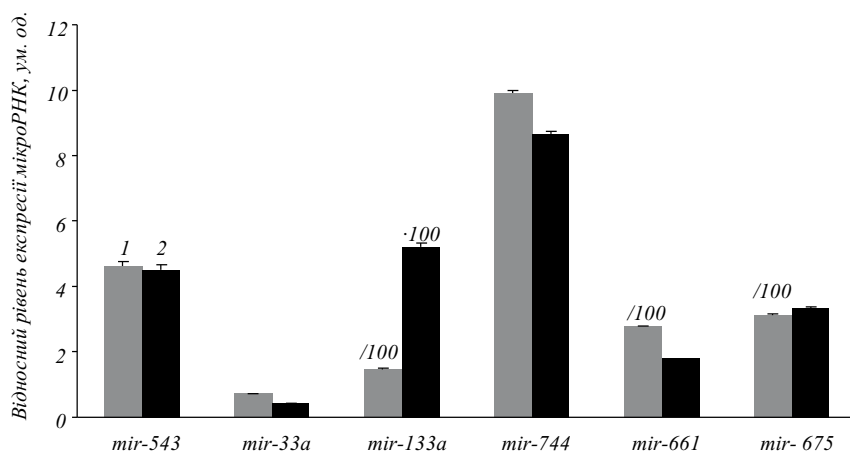


Рис. 2. Експресія мікроРНК, для яких передбачено сайти зв'язування в 3'-НТП мРНК EEF1A1/A2, під час диференціації міобластів. Кількісний ПЛР-аналіз мікроРНК у проліферуючих міобластах (1) та диференційованих міоцитах (2)

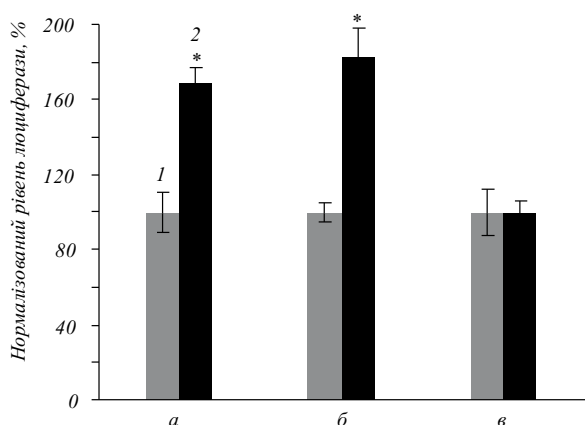


Рис. 3. Посттранскрипційний контроль експресії ізоформ фактора елонгації трансляції eEF1 у процесі диференціації міобластів. Проліферуючі міобласти (1) або диференційовані міоцити (2) LHCN трансфікували репортерними плазмідами, які містять відкриту рамку зчитування люциферази і 3'-НТП EEF1A1/A2: а – pSICHECK + eEF1A1 3'-НТП; б – pSICHECK + eEF1A2 3'-НТП; в – pSICHECK-2; t-тест Ст'юдента Після 24 год інкубації вимірювали рівень люциферази; *p < 0,05; t-тест Ст'юдента

свідчить на користь наявності посттранскрипційного контролю даних білків. Кількісний ПЛР-аналіз рівня експресії всіх мікроРНК, передбачених біоінформатичним методом, виявив 500-разове зростання вмісту mir-133 (рис. 2). Таке значне підвищення може стати причиною в тому числі і посттранскрипційної блокади мРНК EEF1A1. Для ізоформи A2 виявлено дві мікроРНК (mir-744 і mir-661), експресія яких знижується в процесі диференціації на 13 і 36 % відповідно. Зменшення вмісту цих мікроРНК корелює із збільшенням кількості мРНК EEF1A2 при диференціації (рис.1).

Для підтвердження існування посттранскрипційного контролю перемикання ізоформ під час ди-

ференціації міобластів ми застосували метод репортерних генів. Проліферуючі міобласти та диференційовані міоцити після шести днів диференціації трансфікували репортерною плазмідною, що містить 3'-НТП мРНК A1 або A2 відповідно. Результати експерименту виявили майже дворазове зростання рівня люциферази у разі 3'-НТП мРНК A2 (рис. 3), що корелює з отриманими раніше даними стосовно збільшення кількості мРНК A2 та зменшення рівня експресії мікроРНК, які потенційно регулюють A2 (рис. 1, 2). Водночас зафіксовано деяку позитивну посттранскрипційну регуляцію експресії репортерного гена для A1 (рис. 3).

20-Разова зміна експресії A2 на рівні мРНК і дворазова – у разі застосування репортерного вектора з використанням 3'-НТП A2 можуть свідчити про певний внесок посттранскрипційної регуляції у позитивний контроль експресії мРНК ізоформи A2 в процесі диференціації міобластів.

Отже, стимуляція експресії мРНК EEF1A2 при диференціації відбувається як на транскрипційному, так і на посттранскрипційному рівні. Разом з тим, пригнічення ізоформи A1, експресія якої здійснюється в усіх тканинах на дуже високому рівні [14], вочевидь потребує більш потужних, аніж мікроРНК, засобів регуляції. Дійсно, навіть високоекспресована mir-133 у наших дослідах не інгібує експресії EEF1A1, що узгоджується з літературними даними [17].

Висновки. Отримані результати свідчать про те, що індукція експресії EEF1A2 при диференціації контролюється на транскрипційному і посттранскрипційному рівнях. Крім того, підвищення

експресії мРНК ізоформи A2 та репортерного гена, що містить 3'-НТП мРНК EEF1A2, корелює зі зниженням експресії mir-744 і mir-661 – мікроРНК, для яких передбачені сайти зв'язування в 3'-НТП мРНК EEF1A2. Це наводить на думку, що дані мікроРНК беруть участь у посттранскрипційній регуляції експресії даної ізоформи. Несподіваним виявилось підвищення експресії ізоформи A1 після диференціації міобластів, що не є характерним для даного процесу *in vivo*. Можливим поясненням цього є штучність умов для диференціації, а саме – застосування інсуліну як одного з основних складових середовища для диференціації. Показано, що цей гормон стимулює експресію мРНК, які містять олігопіримидиновий тракт в 5'-НТП [18]. Саме до таких мРНК належить мРНК EEF1A1 [19].

Отримані дані є суттєвим внеском у розуміння фундаментального механізму диференціації міобластів і можуть допомогти у розкритті механізмів розвитку таких патологій, як рак, оскільки поява ізоформи A2 у нехарактерних для неї тканинах призводить до злоякісного переродження клітини [10].

Питання стосовно негативної регуляції eEF1A1 у м'язовій і нервовій тканинах залишається відкритим і потребує подальшого вивчення.

A. A. Vislovukh¹, I. S. Groisman², A. V. El'skaya¹,
B. S. Negrutskii¹, A. N. Poleskaya²

Transcriptional and post-transcriptional control of eEF1A2 expression during myoblast differentiation

¹The State Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine 150, Akademika Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680

²CNRS FRE 3377 and Univ. Paris-Sud, CEA Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

Summary

During postnatal development, the switch of the expression from isoform A1 to the isoform A2 of eukaryotic translation elongation factor (eEF1A) is observed in neuronal and muscle tissues. The switch of the expression is a vital fundamental process, as mutant mice, with the partial EEF1A2 deletion dies on the 28th day after birth. Mechanism of the inhibition of A1 and stimulation of A2 expression during the first days of postnatal development is unknown. The existence of potential miRNA binding sites in the 3'UTR of mRNAs encoding the isoforms assumes a post-transcriptional control of abovementioned phenomenon. Aim. To check the possibility of post-transcriptional regulation of the isoforms A1 and A2 expression during differentiation of the human immortalized myoblasts cell line LHCN. Methods. The level of gene expression was quantified by qPCR, the existence of post-transcriptional regula-

tion was demonstrated with Dual-Luciferase[®] Reporter Assay. Results. Using immortalized human myoblasts cell line LHCN, the induction of isoform A2 of eEF1A during differentiation of myoblasts was shown. The existence of transcriptional and post-transcriptional control of the abovementioned process was confirmed. Downregulation of mir-661 and mir-744 that have binding sites in the 3' UTR of EEF1A2 mRNA, during differentiation suggests a potential role of microRNAs in the eEF1A2 induction during myoblast differentiation. Conclusions. Induction of A2 isoform of eEF1A during differentiation of myoblasts occurs on transcriptional and post-transcriptional level.

Keywords: eEF1A1, eEF1A2, immortalized human myoblasts LHCN, differentiation, microRNA.

A. A. Висловух, I. С. Гройсман, А. В. Ельская, Б. С. Негруцкий,
А. Н. Полесская

Транскрипционный и посттранскрипционный контроль экспрессии eEF1A2 в процессе дифференциации миобластов

Резюме

В процессе постнатального развития в нейрональной и мышечной тканях происходит изменение экспрессии изоформы A1 фактора элонгации трансляции на экспрессию изоформы A2. Переключение экспрессии изоформ является жизненно важным фундаментальным процессом, поскольку мутантные мыши, содержащие делецию части гена EEF1A2, погибают на 28-й день после рождения. Механизмы ингибирования экспрессии A1 и стимуляции A2 в течение первых дней постнатального развития неизвестны. Наличие потенциальных сайтов связывания микроРНК в 3'-нетранслируемых последовательностях мРНК изоформ фактора элонгации трансляции предусматривает возможность посттранскрипционного контроля данного процесса. Цель. Проверить возможность посттранскрипционной регуляции экспрессии изоформ A1 и A2 во время дифференциации immortalized миобластов человека LHCN. Методы. Уровень экспрессии генов определяли методом количественного ПЛР, наличие посттранскрипционного контроля детектировали методом репортерных генов. Результаты. Используя клеточную линию immortalized миобластов человека LHCN как модель, показана индукция изоформы A2 фактора элонгации трансляции eEF1A при дифференциации миобластов, наличие транскрипционного и посттранскрипционного контроля в данном процессе, а также потенциальное участие микроРНК в процессе изменения экспрессии изоформ. Выводы. Индукция изоформы A2 при дифференциации миобластов может происходить как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне.

Ключевые слова: eEF1A1, eEF1A2, immortalized миобласты человека LHCN, дифференциация, микроРНК.

REFERENCES

1. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.–1998.–**60**.–P. 47–78.
2. Merrick W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis // Microbiol. Rev.–1992.–**56**, N 2.–P. 291–315.
3. Lee S., Francoeur A. M., Liu S., Wang E. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family // J. Biol. Chem.–1992.–**267**, N 33.–P. 24064–24068.

4. *Novosylina A. V., Timchenko A. A., Tiktopulo E. I., Serdyuk I. N., Negrutskii B. S., El'skaya A. V.* Characterization of physical properties of two isoforms of translation elongation factor 1A // *Biopolym. Cell.*—2007.—**23**, N 5.—P. 386–390
5. *Lee S., Wolfrain L. A., Wang E.* Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development // *J. Biol. Chem.*—1993.—**268**, N 32.—P. 24453–24459.
6. *Lee S., Stollar E., Wang E.* Localization of S1 and elongation factor-1 alpha mRNA in rat brain and liver by non-radioactive *in situ* hybridization // *J. Histochem. Cytochem.*—1993.—**41**, N 7.—P. 1093–1098.
7. *Newbery H. J., Loh D. H., O'Donoghue J. E., Tomlinson V. A., Chau Y. Y., Boyd J. A., Bergmann J. H., Brownstein D., Abbott C. M.* Translation elongation factor eEF1A2 is essential for post-weaning survival in mice // *J. Biol. Chem.*—2007.—**282**, N 39.—P. 28951–28959.
8. *Mateyak M. K., Kinzy T. G.* eEF1A: thinking outside the ribosome // *J. Biol. Chem.*—2010.—**285**, N 28.—P. 21209–21213.
9. *Futernyk P. V., Negrutskii B. S., El'ska G. V.* Noncanonical complexes of mammalian eEF1A with various deacylated tRNAs // *Biopolym. Cell.*—2008.—**24**, N 6.—P. 453–462.
10. *Ruest L. B., Marcotte R., Wang E.* Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis // *J. Biol. Chem.*—2002.—**277**, N 7.—P. 5418–5425.
11. *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**, N 3.—P. 301–305.
12. *Lee M. H., Surh Y. J.* eEF1A2 as a putative oncogene // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*—2009.—**1171**.—P. 87–93.
13. *Ambros V.* The functions of animal microRNAs // *Nature.*—2004.—**431**, N 7006.—P. 350–355.
14. *Zhu C. H., Mouly V., Cooper R. N., Mamchaoui K., Bigot A., Shay J. W., Di Santo J. P., Butler-Browne G. S., Wright W. E.* Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies // *Aging Cell.*—2007.—**6**, N 4.—P. 515–523.
15. *Grassi G., Scaggiante B., Farra R., Dapas B., Agostini F., Baiz D., Rosso N., Tiribelli C.* The expression levels of the translational factors eEF1A 1/2 correlate with cell growth but not apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines with different differentiation grade // *Biochimie.*—2007.—**89**, N 12.—P. 1544–1552.
16. *Chen J. F., Callis T. E., Wang D. Z.* microRNAs and muscle disorders // *J. Cell Sci.*—2009.—**122**, Pt 1.—P. 13–20.
17. *Newbery H. J., Stancheva I., Zimmerman L. B., Abbott C. M.* Evolutionary importance of translation elongation factor eEF1A variant switching: eEF1A1 down-regulation in muscle is conserved in *Xenopus* but is controlled at a post-transcriptional level // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—2011.—**411**, N 1.—P. 19–24.
18. *Suryawan A., Davis T. A.* Regulation of protein synthesis by amino acids in muscle of neonates // *Front. Biosci.*—2011.—**16**.—P. 1445–1460.
19. *Zhu J., Hayakawa A., Kakegawa T., Kaspar R. L.* Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation *in vitro* // *Biochim. Biophys. Acta.*—2001.—**1521**, N 1–3.—P. 19–29.

Received 20.10.12