

Получение и характеристика моноклональных антител против эукариотического трансляционного фактора элонгации 1A

А. П. Погребная, Н. В. Маркеева¹, В. В. Лизогубов²,
А. М. Фридберг³, С. И. Забашный³, В. С. Усенко², В. В. Филоненко,
П. В. Погребной¹, Б. С. Негруцкий

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины
Ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

² Морфологическая лаборатория БИОНТЕК
а/я 102, Днепропетровск, 49000, Украина

³ Днепропетровская областная клиническая больница им. И. И. Мечникова
Пл. Октябрьская, 14, Днепропетровск, 49008, Украина

Эукариотический фактор элонгации трансляции 1A (eEF1A) является одним из основных компонентов трансляционного аппарата клетки, а также выполняет целый ряд неканонических функций, не связанных с процессом трансляции. В данной работе фактор элонгации 1A из печени курицы очищен практически до гомогенности с помощью последовательных хроматографий на различных носителях. Очищенный белок использован для получения моноклональных антител против eEF1A, являющихся видонеспецифичными и распознающих этот белок в иммуноферментном анализе и иммуноблоттинге, а также при иммуногистологических исследованиях человеческого материала. Моноклональные антитела взаимодействовали как с первой, так и со второй изоформой eEF1A. Полученные антитела будут использованы для изучения канонических и неканонических функций eEF1A, в частности, для выяснения предполагаемой роли этого белка в онкогенезе.

Введение. Эукариотический фактор элонгации трансляции 1A (eEF1A) — один из важнейших компонентов трансляционного аппарата, участвует в элонгации белковой цепи, обеспечивая эффективное связывание аминоксил-тРНК с А-сайтом рибосомы за счет расщепления гуанозин-3'-трифосфата (GTP). eEF1A является одним из наиболее часто встречающихся белков в клетке (до 3—5 % от всех клеточных белков). Благодаря его способности связывать и гидролизовать GTP этот белок относят к многочисленному семейству G-белков.

Первичная структура фактора элонгации отличает

ся высокой консервативностью и гомологией от эу- и архебактерий до высших эукариот [1]. На сегодняшний день известны две изоформы eEF1A (eEF1A1 и eEF1A2), имеющие тканеспецифичную локализацию. Экспрессия eEF1A1 происходит в подавляющем большинстве тканей организма, за исключением тех, где экспрессируется eEF1A2 [2, 3]. Вторая изоформа (eEF1A2) синтезируется преимущественно в скелетных мышцах, а также в тканях головного мозга и сердца [4].

Кроме участия в белковом синтезе, eEF1A выполняет немало других, неканонических функций. Он задействован в таких клеточных процессах, как старение [5], апоптоз [6], репликация ДНК [7], стимуляция злокачественной трансформации [8] и транскрипции TAR РНК [9]. Показа-

© А. П. ПОГРЕБНАЯ, Н. В. МАРКЕЕВА, В. В. ЛИЗОГУБОВ,
А. М. ФРИДБЕРГ, С. И. ЗАБАШНЫЙ, В. С. УСЕНКО,
В. В. ФИЛОНЕНКО, П. В. ПОГРЕБНОЙ, Б. С. НЕГРУЦКИЙ,
2003

но взаимодействие eEF1A с актином, микротрубочками и кальмодулином в цитоскелете [10], а также активацию им фосфатидилинозитол-4-киназы [11]. Повышенный уровень экспрессии eEF1A обнаружен в тканях злокачественных опухолей поджелудочной железы, толстого кишечника, груди, легких и пищевода в сравнении с нормальными тканями данных органов [12]. Предполагается, что eEF1A2 является онкогеном при раке яичника [13]. С помощью метода дифференциального дисплея при раке простаты обнаружена повышенная экспрессия мРНК гена, имеющего высокую гомологию аминокислотной последовательности с eEF1A. Этот ген назвали *PTI-1* (prostate tumor induce gene-1, т. е. индуцирующий рак простаты). Было доказано, что *PTI-1* является онкогеном, поскольку при введении в опухолевую клетку антисмысловой РНК для *PTI-1* опухолевая клетка приобретала признаки клетки с нормальной клеточной морфологией [14].

Таким образом, eEF1A в числе прочего может играть определенную роль в процессе канцерогенеза. Характеристика экспрессии eEF1A непосредственно в тканях опухолей, так же как и изучение внутриклеточной локализации этого белка при онкогенезе, представляют значительный научный интерес. Одним из подходов, позволяющих решить данные задачи, является применение моноклональных антител против eEF1A. Несмотря на то, что получение моноклональных антител к eEF1A является нетривиальной задачей вследствие практически полной гомологии первичной структуры eEF1A у животных, нами выделены и охарактеризованы моноклональные антитела против данного антигена из печени курицы.

Материалы и методы. Очистка eEF1A из гомогената печени курицы. Печень курицы измельчали и промывали буфером А (трис-НСl, рН 7,6, 1 мМ PMSF, 2 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂, 15 %-й глицерин). Затем печень гомогенизировали в течение 30 с в гомогенизаторе РТ-1 с перерывом в 20—30 с, чтобы избежать нагрева образца. Процедуру гомогенизации повторяли несколько раз до получения гомогенной массы. Гомогенат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 1 ч при температуре 4 °С на низкоскоростной центрифуге, затем супернатант фильтровали через четыре слоя стерильной марли.

Постмитохондриальный супернатант наносили на колонку с сефакрилом S-400 («Pharmacia», Швеция) и промывали буфером Б (30 мМ КН₂РO₄, рН 7,5, 1 мМ MgCl₂, 15 %-й глицерин, 6 мМ 2-меркаптоэтанол). После гель-фльтрации фракции с eEF1A объединяли и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой («Whatman», Великобритания),

затем осветленный экстракт наносили на колонку с SP-сефарозой («Pharmacia»). Белок элюировали градиентом концентрации КСl (от 50 до 350 мМ) в буфере Б. Фракции, содержащие eEF1A, собирали, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом («Whatman»). Белок элюировали с помощью линейного градиента концентрации КН₂РO₄ от 40 до 220 мМ в буфере Б. Фракции, содержащие eEF1A, объединяли и диализовали в течение ночи против буфера Б. Белок концентрировали с помощью SP-сефарозы. Раствор eEF1A хранили в буфере В (25 мМ трис-НСl, рН 7,5, 25 мМ КСl, 2 мМ MgCl₂, 25 %-й глицерин, 6 мМ 2-меркаптоэтанол) в жидком азоте. На всех этапах очистки eEF1A белок определяли по реакции GTP-[³H]-GDP обмена [15]. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда [16].

eEF1A из печени кролика (eEF1A1) очищали аналогично eEF1A из печени курицы; eEF1A из мышц кролика (eEF1A2) — по методике, описанной Кристенсенем и др. [17].

Ограниченный протеолиз eEF1A (на N-конце отщепляются 69 аминокислотных остатков) проводили по методике Госса и Меррика [18].

Приготовление и электрофоретическое разделение клеточных лизатов. Клетки центрифугировали при 1000 об/мин, после чего к осадку добавляли лизирующий буфер (50 мМ Hepes, 1 %-й тритон X-100, 100 мМ NaCl, 0,5 %-й NP-40, ингибиторы протеаз фирмы «Pharmacia»), инкубировали в течение 10 мин при температуре 4 °С, затем лизаты центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. После этого к супернатанту добавляли буфер для образцов, кипятили 5 мин на водяной бане и далее разделяли белки с помощью электрофореза. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (10—15 %) в буферной системе Лэммли [19].

Получение моноклональных антител против eEF1A из печени курицы. Для получения моноклональных антител самцам мышей линии BALB/c 7—12-недельного возраста в брюшную полость вводили 20 мкг высокоочищенного eEF1A из печени курицы в полном адьюванте Фрейнда (50 %) в объеме 300 мкл. Еще через четыре недели вводили то же количество антигена, но в 50 %-м неполном адьюванте Фрейнда. Последнюю иммунизацию осуществляли через 27 дней тем же антигеном в 300 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Через три дня после третьей иммунизации селезенку иммунизированной мыши осторожно измельчали в гомогенизаторе Поттера до отдельных клеток, которые затем дважды отмывали в культуральной среде без добавок с помощью центрифугирования.

Миеломные клетки линии SP2/0 и клетки селезенки отмывали культуральной средой, не содержащей сыворотки. Клетки селезенки и миеломные клетки смешивали в соотношении 10:1 и осаждали центрифугированием ($5 \cdot 10^6$ миеломных клеток). К осадку осторожно добавляли 1 мл 50 %-го PEG-1500 («Sigma», США) в 1 мМ NaOH в течение 1 мин при аккуратном перемешивании. После дополнительной инкубации (1 мин) клеток в вышеупомянутом растворе к клеточной суспензии в течение 3 мин добавляли 10 мл среды RPMI 1640. Клеточную суспензию выдерживали 10 мин при комнатной температуре и затем центрифугировали 10 мин при 400 g. Клетки осторожно ресуспендировали в среде RPMI 1640 с добавлением 20 %-й эмбриональной сыворотки до конечной концентрации 10^4 миеломных клеток в 100 мкл среды и разливали по 100 мкл суспензии в 96-луночные планшеты. Каждая лунка содержала по 100 мкл фидера из макрофагов ($10 \cdot 10^3$ клеток на лунку). Клетки культивировали в атмосфере CO_2 при 37 °C в RPMI-среде, содержащей 100 мкМ гипоксантин, 0,4 мкМ аминоптерин и 16 мМ тимидин — ГАТ («Sigma»), которую добавляли через 36 ч по 50 мкл в каждую лунку планшета. Спустя 7 дней среду с ГАТ меняли на свежую.

Через две недели среду из лунок, где были клоны, проверяли с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) и иммуноблоттинга на присутствие антител к антигену, а также меняли среду в лунках на RPMI-среду, содержащую только гипоксантин и тимидин. Через три недели клетки, продуцирующие антитела к eEF1A, отбирали и культивировали в среде RPMI с 20 %-й эмбриональной сывороткой теленка. Для получения моноклонов гибридные клетки были два раза реклонированы. Для длительного хранения гибридные клетки наращивали в достаточном количестве и замораживали в жидком азоте, как описано [20]. Моноклональные антитела получали из культуральной среды или из асцитной жидкости мышей, которым прививали гибридные клетки.

Иммуноферментный анализ. В плашки для иммуноферментного анализа («Nunc», Дания) на ночь наносили 100 мкл антигена в PBS в концентрации 10 мкг/мл, pH 7,5 при 4 °C. Затем дно плашек блокировали с помощью раствора PBS с 0,1 %-м твином-20 (PBST) в течение 1 ч, три раза отмывали PBST. По 100 мкл культуральной среды анализируемых клонов наносили в лунки, содержащие антиген, и инкубировали около 1 ч при комнатной температуре. После этого плашки пятикратно отмывали буфером PBST. Затем в лунки добавляли антитела против IgG мыши, конъюгиро-

ванные с пероксидазой хрена («Sigma») в разведении 1:5000, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее плашки снова 3 раза отмывали буфером PBST. Положительные клоны определяли с помощью ABTS-окрашивания по протоколу компании «Amersham» (Англия).

Иммуноблоттинг. Электрофорез белков производили, как описано выше. Электроперенос белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозные фильтры («Whatman») осуществляли в течение ночи при напряжении 30 В и температуре 4 °C.

Нитроцеллюлозный фильтр выдерживали в растворе С (PBST с добавлением 3 % обезжиренного молока) в течение 1 ч при комнатной температуре. После четырех промывок раствором С фильтры инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в растворе С, содержащем моноклональные антитела против eEF1A (1 мкг/мл). После четырехразового промывания раствором С по 5 мин при комнатной температуре добавляли антитела против иммуноглобулинов G (IgG) мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma») (разведение 1:5000), и инкубировали в течение 1 ч. Фильтры отмывали 3—4 раза раствором PBST и обрабатывали раствором ECL по протоколу фирмы «Amersham» с последующей визуализацией сигнала на рентгеновской пленке («Kodak», США).

Иммуногистологические исследования. eEF1A выявляли иммуногистохимически на фиксированных жидкостью Буэна парафиновых срезах тканей предстательной железы человека, полученных во время трансуретральной простатэктомии. Моноклональную антисыворотку к eEF1A использовали в разведении 1:4000. Для окрашивания использован метод непрямой иммуногистохимии, первичные антитела визуализировали с помощью PicTure PLUS Kit («Zymed», США) с пероксидазой хрена как ферментной меткой. В качестве хромогена использовали 0,05 %-й раствор тетрагидрохлорида 3'3'-диаминобензидина, содержащий 0,01 % перекиси водорода [21]. После иммуногистохимического окрашивания срезы доокрашивали гематоксилином Майера, обезвоживали и помещали в канадский бальзам. Контролировали специфичность окрашивания, блокируя антитела избытком белка eEF1A из печени кроля.

Для морфологических исследований использовали микроскоп Axioplan («Carl Zeiss», Австрия).

Результаты и обсуждение. Известно, что величина иммунного ответа зависит от филогенетической дистанции между антигеном и реципиентом. Соответственно антитела неэффективно продуцируются против высококонсервативных белков. Возможно, это является причиной серьезных затрудне-

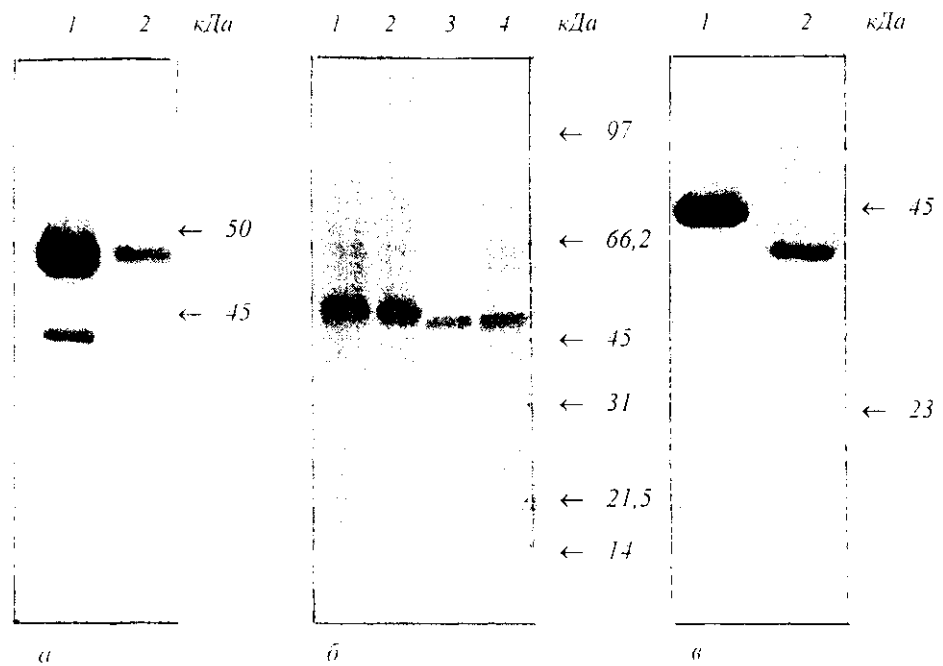


Рис. 1. Иммуноблоттинг белков, полученных из печени курицы, с помощью антител клонального гибридомного гибрида «3D8» (СРВ-клетки) против eEF1A1 (1 мкг) (первый ряд). Второй ряд — контроль. Молекулярные массы (кДа): 97, 66,2, 45, 31, 21,5, 14.

ний при получении антител против eEF1A, поскольку этот белок у животных отличается высокой степенью консервативности.

Для получения моноклональных антител против eEF1A мышей иммунизировали высокоочищенным фактором элонгации трансляции из печени курицы (рис. 1, а). Для его очистки использована методика, разработанная ранее в нашей лаборатории для получения eEF1A1 из печени кролика [22]. Известно, что посттрансляционные модификации eEF1A более вариабельны по сравнению с высокой степенью консервативности аминокислотной последовательности этого белка у высших эукариот [23—26]. Следовательно, иммунизация может быть успешной при использовании для этих целей антигена из организма, находящегося на более отдаленной филогенетической ступени развития по отношению к объекту иммунизации.

Высокоочищенный eEF1A из печени курицы использовали как для иммунизации мышей линии BALB/c, так и в последующем скрининге продукции гибридомными клетками моноклональных антител. Клетки селезенки мышей, в сыворотке которых обнаружен наиболее высокий титр (1:10⁴) против eEF1A, были использованы для слияния с миеломными клетками линии Sp2/0. Получена

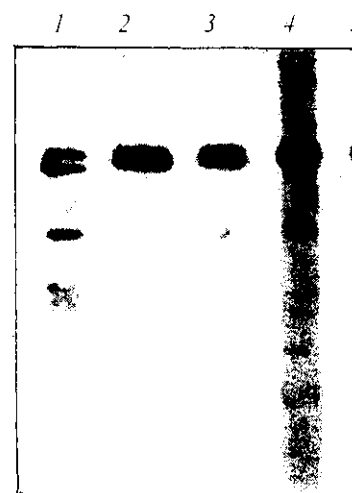


Рис. 2. Иммуноблоттинг eEF1A1 из печени курицы с помощью антител из культуральных сред гибридомных клеток гибридомного гибрида «3D8» (СРВ-клетки) против eEF1A1 (1 мкг) (первый ряд). Второй ряд — контроль. Молекулярные массы (кДа): 97, 66,2, 45, 31, 21,5, 14.

ружены шесть позитивных клонов. На рис. 2 представлены результаты иммуноблоттинга eEF1A из печени курицы с антителами

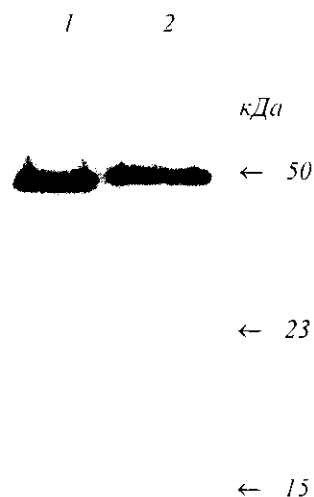


Рис. 3. Иммуноблоттинг eEF1A1 (1) (0,5 мкг) из печени и eEF1A2 (2) (0,5 мкг) из поперечнополосатых мышц кролика с помощью анти-eEF1A моноклональных антител клона 3Е3

смешанного типов. Стабильным оказался лишь один клон 3Е3, после реклонирования которого титр антител в культуральной среде не падал в ходе длительного культивирования клеток. Для получения моноклональных антител против eEF1A в больших количествах гибридомные клетки данного клона были привиты пристаном мышам линии BALB/c, после чего у животных в течение 2 недель развивалась асцитная опухоль. Моноклональные антитела получали из асцитной жидкости высаливанием насыщенным раствором сульфата аммония.

Антитела клона 3Е3 взаимодействовали как с первой формой eEF1A1, выделенной из печени кролика, так и со второй формой eEF1A2, полученной из поперечнополосатых мышц задней лапы кролика (рис. 1, б; рис. 3). Анти-eEF1A моноклональные антитела взаимодействовали также с продуктом ограниченного трипсинолиза eEF1A1 (рис. 1, в; рис. 4). Этот факт свидетельствует о том, что первые 69 аминокислотных остатков с N-конца молекулы eEF1A не участвуют в формировании антигенной детерминанты для данных антител.

Одной из важных задач было изучить реактивность данных антител с eEF1A в лизатах клеточных культур. Методом иммуноблоттинга показано, что анти-eEF1A моноклональные антитела узнавали полипептид с электрофоретической подвижностью, соответствующей таковой для eEF1A, в лизатах клеток хомяка (CHO), крысы (RAT2, MH1C1),

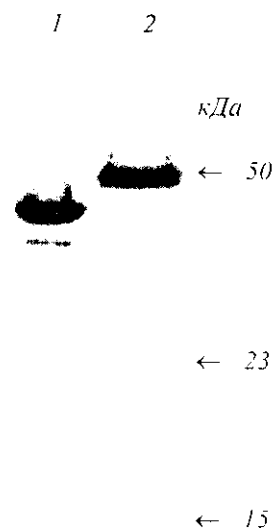


Рис. 4. Иммуноблоттинг частично трипсинизированного (1) (0,5 мкг) и нативного (2) (0,5 мкг) eEF1A1 из печени кролика с помощью анти-eEF1A моноклональных антител клона 3Е3

мыши (С3Н/10Т1/2), обезьяны (COS 3) и человека (HeLa, A-431, MCF-7) (рис. 5).

Поскольку аффинность полученных моноклональных антител была достаточной для визуализации антигена в клеточных лизатах, представлялось вполне возможным исследовать экспрессию и внутриклеточную локализацию eEF1A непосредственно в тканях человека.

На рис. 6, а, показан срез нормальной ткани предстательной железы человека. В ядрах клеток железистого эпителия выявлено интенсивное позитивное окрашивание, в то же время окрашивание цитоплазмы было весьма слабым. В качестве контроля использована истощенная кроличьим eEF1A1 сыворотка из асцитов мышей, привитых гибридными клетками клона 3Е3 (рис. 6, б). Следовательно, с помощью полученных моноклональных антител возможно изучение как тканевой, так и внутриклеточной локализации фактора элонгации. Данные антитела могут быть использованы в дальнейшем для изучения локализации eEF1A при различных патологических изменениях, в том числе и при канцерогенезе.

Итак, нами получены специфичные моноклональные антитела против консервативного и полифункционального белка — эукариотического фактора элонгации трансляции 1А. Эти антитела являются видонеспецифичными и взаимодействуют с двумя изоформами eEF1A, причем как с высоко-

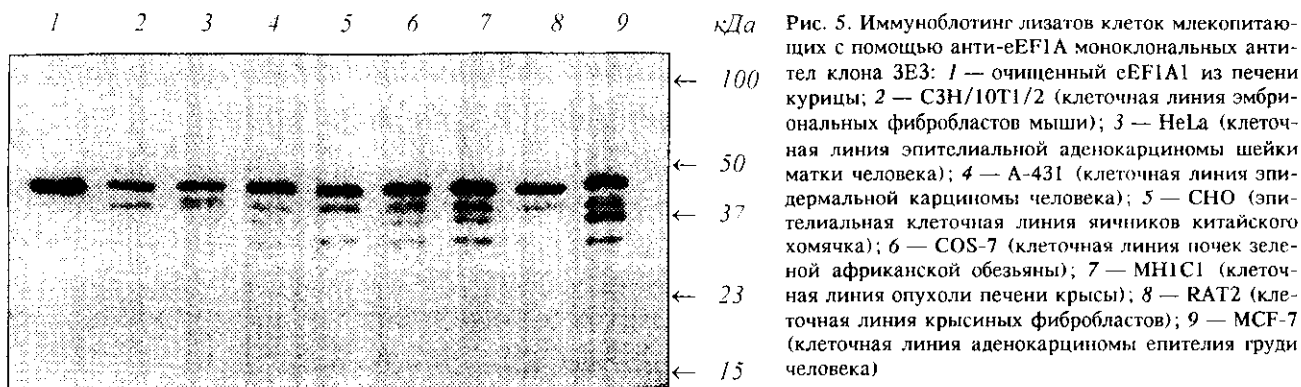


Рис. 5. Иммуноблоттинг лизатов клеток млекопитающих с помощью анти-eEF1A моноклональных антител клона 3Е3: 1 — очищенный eEF1A1 из печени курицы; 2 — С3Н/10Т1/2 (клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши); 3 — HeLa (клеточная линия эпителиальной аденокарциномы шейки матки человека); 4 — А-431 (клеточная линия эпидермальной карциномы человека); 5 — СНО (эпителиальная клеточная линия яичников китайского хомячка); 6 — COS-7 (клеточная линия почек зеленой африканской обезьяны); 7 — МН1С1 (клеточная линия опухоли печени крысы); 8 — RAT2 (клеточная линия крысиных фибробластов); 9 — MCF-7 (клеточная линия аденокарциномы эпителия груди человека)

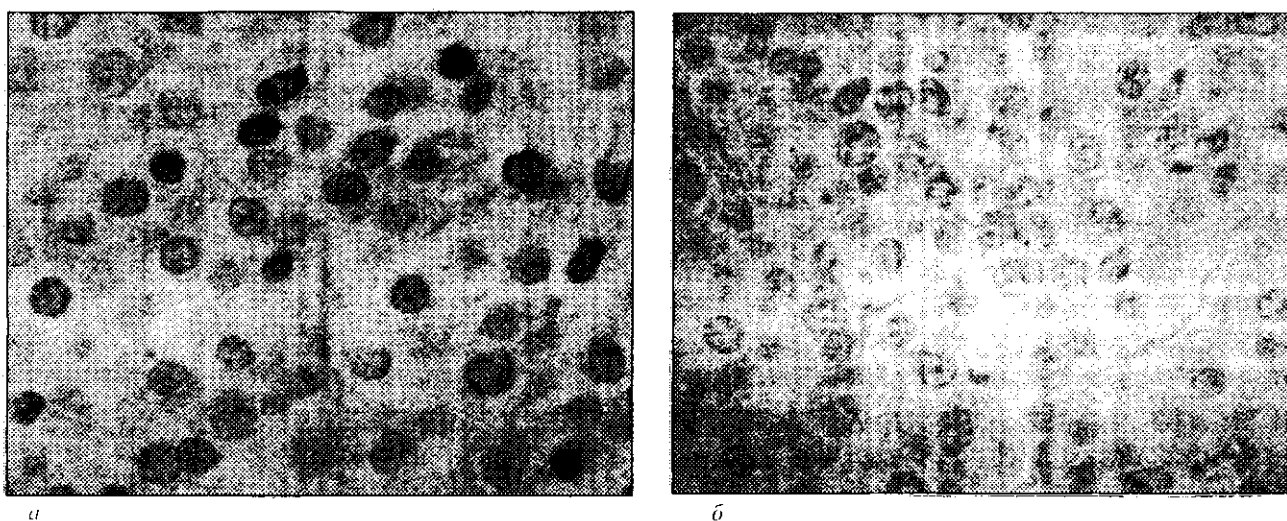


Рис. 6. Микрофотографии ткани предстательной железы человека: а — иммуногистохимическое выявление eEF1A с помощью анти-eEF1A моноклональных антител (разведение 1:4000, темным цветом выделены ядра раковых клеток; интенсивность окрашивания ядер различна; цитоплазма опухолевых клеток окрашена слабо; $\times 1000$); б — эксперимент по блокированию антител с помощью избытка белка eEF1A из печени кроля (соотношение молекул антитела к eEF1A составляет 1:4, конечное разведение анти-eEF1A моноклональных антител 1:4000; позитивное окрашивание (темный цвет) на срезе отсутствует; $\times 1000$)

очищенным антигеном, так и с белком, находящимся в лизатах трансформированных клеточных линий или же в срезах тканей человека. Полученные моноклональные антитела будут использованы в дальнейшем для исследований потенциальной роли eEF1A при злокачественной трансформации клеток человека.

A. P. Pogrebnaya, N. V. Markeyeva, V. V. Lisogubov, A. M. Fridberg, S. I. Zabashnyi, V. S. Usenko, V. V. Filonenko, P. V. Pogrebnoy, B. S. Negrutskii

Isolation and characterization of monoclonal antibodies against eukaryotic translation elongation factor 1A

Summary

Eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) is one of the main components of the translation apparatus. The protein also

fulfills a number of non-canonical functions not related directly to protein synthesis. In this work the homogenous elongation factor 1A was obtained from hen liver by several chromatographic procedures with different carriers. The purified protein was used to develop monoclonal antibodies. The anti-eEF1A antibodies obtained are species-unspecific, they recognize both eEF1A and eEF1A2 isoforms in ELISA and immunoblotting. The antibodies have been successfully used for immunohistological studies on human tissues.

A. П. Погребна, Н. В. Маркеева, В. В. Лизогубов, А. М. Фридберг, С. И. Забашный, В. С. Усенко, В. В. Філоненко, П. В. Погребний, Б. С. Негруцький

Отримання і характеристика моноклональних антител проти еукаріотичного трансляційного фактора елонгації 1А

Резюме

Еукаріотичний фактор елонгації трансляції 1А (eEF1A) — один з основних компонентів трансляційного апарату клітини, виконує цілу низку неканонічних функцій, не пов'язаних

з процесом трансляції. У представленій роботі фактор елонгації 1A з печінки курки очищено практично до гомогенності за допомогою послідовних хроматографій на різних носіях. Очищений білок використано для отримання моноклональних антитіл проти eEF1A, які є видонеспецифічними і розпізнають цей білок в імуноферментному аналізі та імуноблотингу, а також при імуногістологічних дослідженнях тканин людини. Моноклональні антитіла взаємодіяли як з першою, так і з другою ізоформою eEF1A. Отримані антитіла буде використано для вивчення канонічних і неканонічних функцій eEF1A, зокрема, для з'ясування можливої ролі цього білка в онкогенезі.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Negrutskiy B. S., El'skaya A. V. Progress in nucleic acid research and molecular biology // Eukaryotic translation elongation factor 1A: structural expression functions and possible role in aminoacyl-tRNA channeling.—New York: Acad. press, 1998.—P. 47—78.
- 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.
- Lee S., Leblanc A., Duttaroy A., Wang E. Terminal differentiation-dependent alteration in the expression of translation elongation factor-1 alpha and its sister gene, S1, in neurons // Exp. Cell Res.—1995.—219, N 2.—P. 589—597.
- Knudsen S. M., Frydenberg J., Clark B. F., Leffers H. Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha // Eur. J. Biochem.—1993.—215, N 3.—P. 549—554.
- Cavallius J., Rattan S. I., Clark B. F. Changes in activity and amount of active elongation factor 1 alpha in aging and immortal human fibroblast cultures // Exp. Gerontol.—1986.—21, N 3.—P. 149—157.
- Talapatra S., Wagner J. D., Thompson C. B. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis // Cell Death Differ.—2002.—8.—P. 856—861.
- Ohta K., Toriyama M., Miyazaki M., Mirofushi H., Hosoda S., Endo S., Sakai. The mitotic apparatus-associated 51-kDa protein from sea urchin eggs is a GTP-binding protein and is immunologically related to yeast polypeptide elongation factor 1 alpha // J. Biol. Chem.—1990.—265.—P. 3240—3247.
- Tatsuka M., Katayama H., Ota T., Tanaka T., Odashima S., Suzuki F., Terada Y. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells // Cancer Res.—1998.—58, N 21.—P. 4811—4816.
- Wu-Baer F., Lane W. S., Gaynor R. B. Identification of a group of cellular cofactors that stimulate the binding of RNA polymerase II and TRP-185 to human immunodeficiency virus 1 TAR RNA // J. Biol. Chem.—1996.—271, N 8.—P. 4201—4208.
- Durso N. A., Cyr R. J. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha // Plant Cell.—1994.—6, N 6.—P. 893—905.
- Yang W., Boss W. F. J. Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49 // J. Biol. Chem.—1994.—269.—P. 3852—3857.
- Grant A. G., Flomen R. M., Tizard M. L., Grant D. A. Differential screening of a human pancreatic adenocarcinoma identified increased transcription of elongation factor-1 alpha in tumor cells // Int. J. Cancer.—1992.—50.—P. 740—745.
- Anand N., Murthy S., Amann G., Wernick M., Porter L. A., Cukier J. H., Collins C., Gray J. W., Diebold J., Demetrick D. J., Lee J. M. Protein elongation factor eEF1A2 is putative oncogene in ovarian cancer // Nature Genet.—2002.—31, N 3.—P. 301—305.
- Su Z., Goldstein N. I., Fisher P. B. Antisense inhibition of the PTI-1 oncogene reverses cancer phenotypes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95.—P. 1764—1769.
- Kaziro Y. The role of guanosine 5B-triphosphate in polypeptide chane elongation // Biochim. et biophys. acta.—1978.—505.—P. 95—126.
- Bradford M. 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.
- Kristensen P., Lund A., Clark B. F., Cavallius J., Merrick W. C. Purification and characterisation of a tissue specific elongation factor-1 alpha (EF-1 alpha 2) from rabbit muscle // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1998.—245, N 3.—P. 810—814.
- Goss K. T., Merrick W. C. Characterization of a limited trypsin digested form of eukaryotic elongation factor 1A // J. Biol. Chem.—1991.—266.—P. 4199—4205.
- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
- Filonenko V. V., Wolfson A. D., Wartanyan O. A., Beresten S. F. Monoclonal antibodies to the components of the high-molecular-mass aminoacyl-tRNA synthetase complex // Biomed. Sci.—1991.—2.—P. 289—292.
- Lorette C. J. Immunocytochemical methods and protocols / Ed. C. J. Lorette.—Tokyo: Humana press, 1999.—P. 233.
- Shalak V. F., Budkevich T. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. A fast and effective method for purification of elongation factor 16 from rabbit liver // Укр. біохім. журн.—1997.—69.—P. 104—109.
- Davydova E. K., Sitikov A. S., Ovchinnikov L. P. Phosphorylation of elongation factor 1 in polyribosome fraction of rabbit reticulocytes // FEBS Lett.—1984.—176, N 2.—P. 401—405.
- Dever T. E., Costello C. E., Owens C. L., Rosenberry T. L., Merrick W. C. Location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine and glycercylphosphorylethanolamine // J. Biol. Chem.—1989.—264, N 34.—P. 20518—20525.
- Tisdale E. J., Tartakoff A. M. Extensive labeling with [3H]-ethanolamine of a hydrophilic protein of animal cells // J. Biol. Chem.—1988.—263, N 17.—P. 8244—8252.
- Venema R. C., Peters H. I., Traugh J. A. Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity // J. Biol. Chem.—1991.—266, N 19.—P. 12574—12580.

УДК 577.152.6

Надійшла до редакції 16.05.02