

# Сравнительный анализ функциональной активности нативной и модифицированной трипсином форм эукариотического фактора элонгации трансляции 1A

А. П. Погребная, С. В. Горчаков, Б. С. Негруцкий

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

---

*Эукариотический фактор элонгации трансляции 1A (eEF1A) является одним из основных компонентов трансляционного аппарата в клетке и выполняет целый ряд неканонических функций, не связанных с процессом трансляции. В данной работе фактор элонгации 1A подвергли ограниченному трипсинолизу для получения укороченного на 69 аминокислотных остатков полипептида ΔeEF1A, являющегося аналогом потенциального белкового продукта онкогена PTI-1. ΔeEF1A использован как модель для изучения свойств продукта онкогена PTI-1 в трансляции. Результаты сравнения eEF1A и ΔeEF1A в четырех различных функциональных тестах позволили предположить участие PTI-1 в трансляции.*

---

**Введение.** Фактор элонгации трансляции 1A (eEF1A) — высокоэкспрессирующийся белок, играющий главную роль в цикле элонгации трансляции эукариот. Важно, также что eEF1A, кроме белкового синтеза, выполняет немало других неканонических функций, участвуя в таких клеточных процессах, как старение [1], апоптоз [2], репликация ДНК [3], стимуляция злокачественной трансформации [4] и транскрипции TAR РНК [5]. Показано взаимодействие eEF1A с актином, микротрубочками и кальмодулином в цитоскелете [6], а также участие белка в активации фосфатидилинозитол-4-киназы [7].

Особый интерес представляет связь eEF1A с канцерогенезом. Установлено, что повышенная экспрессия eEF1A вызывает злокачественную трансформацию культуры клеточных линий сирийского хомяка и мыши [8]. Повышенный уровень экспрессии eEF1A выявлен в опухолях поджелудочной железы, толстого кишечника, груди, легких и желудка [9]. Можно предположить, что eEF1A,

будучи вовлеченным во многие клеточные процессы, участвует в регуляции баланса между состоянием клеточного покоя и пролиферацией. Нарушение такого баланса может привести к неконтролируемому клеточному росту и, как следствие, к канцерогенезу.

Связь между трансляцией и трансформацией была подтверждена открытием нового онкогена PTI-1 (prostate tumor induce gene-1, т. е. индуцирующий рак простаты). С помощью метода дифференциального дисплея при раке простаты обнаружена повышенная экспрессия гена мРНК, имеющего высокую гомологию с геном eEF1A. Этот ген получил название PTI-1. Было доказано, что PTI-1 является онкогеном, так как при введении в опухолевую клетку антисмысловой РНК для PTI-1 опухолевая клетка приобретала признаки клетки с нормальной клеточной морфологией [10]. Полноразмерная последовательность кДНК PTI-1 содержит 2123 пар нуклеотидов (п. н.) и включает 630 п. н. 5'-нетранслируемого участка со значительной гомологией с 23S рибосомной РНК *Mycoplasma hyorhinotoniae*, а также последовательности, почти идентичной человеческому eEF1A [11]. PTI-1 ко-

дирует белок, в котором по сравнению с eEF1A человека отсутствуют 67 аминокислотных остатков (а. о.) в N-концевой части пептида и содержится шесть аминокислотных замен [11].

До настоящего времени белковый продукт гена РТ1-1 не был идентифицирован *in vivo*. Однако ген был клонирован, экспрессирован и предполагаемый продукт его трансляции обнаружен в бесклеточной белоксинтезирующей системе, хотя достоверной идентификации продукта не проводили [11]. Учитывая очень высокую степень гомологии предполагаемого белка РТ1-1 и eEF1A и то обстоятельство, что с помощью трипсина можно отщепить от молекулы eEF1A 69 а. о. с N-конца [12], было решено получить аналог белкового продукта РТ1-1, используя для этого ограниченный трипсинолиз высокоочищенного eEF1A.

Неизвестно, сохраняет ли белок РТ1-1 способность участвовать в трансляции. В литературе есть свидетельства того, что подвергнутый ограниченному трипсинолизу eEF1A ( $\Delta$ eEF1A) полностью теряет свойство стимулировать трансляцию poly(U)-матрицы в бесклеточной белоксинтезирующей системе [13]. В данной статье мы сравнили активность eEF1A и  $\Delta$ eEF1A в четырех функциональных тестах и показали, что удаление части GDP-связывающего домена вызывает лишь некоторое снижение, но отнюдь не полную потерю трансляционной активности модифицированного фактора.

**Материалы и методы. Получение eEF1A из печени кролика.** Печень измельчали и промывали буфером А (трис-НСl, рН 7,6, 1 мМ PMSF, 2 мМ DTT, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 %-й глицерин). Затем ткань гомогенизировали в течение 30 с в гомогенизаторе РТ-1 с перерывом 20—30 с для избежания 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 КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 7,5, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 %-й глицерин, 6 мМ 2-меркаптоэтанол). После гель-фильтрации 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, объединяли и наносили на колонку с гидроксипатитом («Whatman»). Белок элюировали с помощью линей-

ного градиента (от 40 до 220 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>) концентрации 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 в жидком азоте (буфер В: 25 мМ трис-НСl, рН 7,5, 25 мМ КСl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 %-й глицерин, 6 мМ 2-меркаптоэтанол). На всех этапах очистки eEF1A белок определяли по активности в реакции GTP/[<sup>3</sup>H]GDP обмена [14]. Концентрацию белка измеряли методом Брэдфорд [15].

**Ограниченный трипсинолиз eEF1A.** Модифицированный трипсином фактор элонгации 1А из печени кролика получали, добавляя 4 мкг N-тозил-L-фенилаланилхлорометилкетон-обработанного трипсина («Calbiochem», США) к 250 мкг высокоочищенного eEF1A в присутствии 8 мМ GTP и 15 % глицерина при температуре 18 °С в течение 2 ч. Протеолиз останавливали добавлением ингибитора трипсина — 2 мМ фенилметилсульфонилфлюорида (PMSF). Степень расщепления определяли с помощью электрофореза. Электрофорез проводили в буферной системе Лэммли в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле (ПААГ) (12 %) [16].

Трипсинизированный eEF1A очищали от N-концевого фрагмента при помощи хроматографии на SP-сефарозе («Pharmacia»). Раствор трипсинизированного eEF1A хранили в жидком азоте в буфере В.

**Образование комплексов eEF1A и  $\Delta$ eEF1A с GDP и mPHK<sup>P<sub>tr</sub></sup>.** 10 пмоль [<sup>32</sup>P]tPHK<sup>P<sub>tr</sub></sup> инкубировали при 37 °С в присутствии различных концентраций eEF1A или  $\Delta$ eEF1A (от 10 нМ до 2 мкМ белка) в буфере Г, содержащем 25 мМ трис-НСl, рН 7,5, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ КСl, 25 %-й глицерин, 2 мМ DTT, 100 мкМ GDP. Затем для анализа комплексов проводили электрофорез в 5 %-м ПААГ при 20 В/см<sup>2</sup> (буфер Д: 50 мМ трис-борат, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА) и температуре 4 °С в течение 2 ч. Радиоавтографию геля проводили с помощью рентгеновской пленки («Kodak BioMax film», США) в течение 1—3 сут при 4 °С.

**Трансляция поли(Phe) в поли(U)-программированной белоксинтезирующей системе из печени кролика.** Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NH<sub>4</sub>Сl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,6 мМ спермидин («Serva», ФРГ), 0,8 мМ спермин («Serva»), 1 мМ АТФ («Sigma», США), 0,4 мМ GTP, 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 10 %-й глицерин, 10 мМ креатинфосфат («Serva»), 2 мкг креатинфосфаткиназы («Serva»), 5 мкг поли(U), 6 пмоль 40S субчастиц и 16 пмоль 60S субчастиц из печени кролика, разные количества

eEF1A или ΔeEF1A, 5 пмоль eEF2 (эукариотический фактор элонгации трансляции 2), очищенного из печени кролика, и 25 пмоль дрожжевой [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК. Поли(Phe) синтезировали в течение 30 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 1 мл охлажденной 10 %-й трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Затем реакционную смесь прогревали (10 мин, 90 °С) для разрушения аминоксил-тРНК и снова охлаждали на ледяной бане. Осадки наносили на GF/C фильтры («Whatman») и промывали 30 мл 5 %-й ТХУ.

Содержание радиоактивности на высушенных фильтрах определяли в толуольном сцинтиллаторе «Ortiphase» на счетчике RackBeta 1219 фирмы «LKB» (Швеция). Эффективность счета [<sup>14</sup>C] на фильтрах составляла 95 %.

Кинетику трансляции поли(U) изучали в смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,6 мМ спермидин, 0,8 мМ спермин, 1 мМ АТР, 0,4 мМ ГТР, 2 мМ β-меркаптоэтанол, 10 %-й глицерин, 10 мМ креатинфосфат, 2 мкг креатинфосфаткиназы, 5 мкг поли(U), 6 пмоль 40S субчастиц и 16 пмоль 60S субчастиц, 8 пмоль eEF1A или ΔeEF1A, 5 пмоль eEF2 и 25 пмоль [<sup>14</sup>C]Phe-тРНК. Пробы инкубировали при температуре 37 °С. Аликвоты отбирали через определенные промежутки времени и осаждали 10 %-й ТХУ. Остановку реакции и подсчет содержания радиоактивности на фильтрах осуществляли, как описано ранее.

Препарат eEF2 любезно предоставлен Т. В. Будкевич (ИМБиГ НАН Украины). Аминоацилирование дрожжевой тРНК<sup>Phe</sup> («Sigma») радиоактивно меченым [<sup>14</sup>C]Phe проводили с помощью фенилаланил-тРНК синтазы [17].

**Определение скорости диссоциации комплексов.** Двойные комплексы eEF1A·GDP/GTP или ΔeEF1A·GDP/GTP формировали при инкубации 0,08 нмоль одного из указанных белков с 2 нмоль [<sup>3</sup>H]GDP в течение 15 мин при 37 °С в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), 25 %-й глицерин, 50 мМ KCl. Затем смесь, содержащую комплекс белка с [<sup>3</sup>H]GDP или [<sup>3</sup>H]GTP, охлаждали на льду в течение 5 мин.

Реакцию диссоциации начинали, добавляя 150-кратный избыток немеченого GDP или GTP. Пробы (60 мкл) отбирали через определенные промежутки времени и фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм) («Schleicher & Schuell», ФРГ), фильтры дважды промывали и высушивали. Радиоактивность определяли, как указано выше.

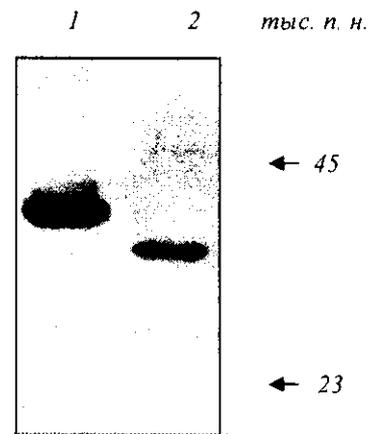


Рис. 1. Электрофореграмма eEF1A1 (1) и ΔeEF1A1 (2) из печени кролика. Полосы визуализировали с помощью окрашивания гелей кумасси синим. Справа указано положение маркеров молекулярной массы

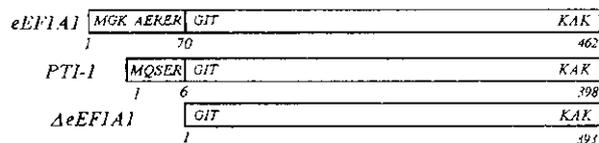


Рис. 2. Сравнение последовательностей эукариотического фактора элонгации трансляции 1A из печени кролика (eEF1A1), белкового продукта онкогена PTI-1 и модифицированного трипсином eEF1A

**Определение уровня связывания** [<sup>3</sup>H]GDP и [<sup>3</sup>H]GTP с eEF1A и ΔeEF1A. 4 пмоль eEF1A или Δ69eEF1A инкубировали в течение 15 мин при 37 °С с 2 нмоль [<sup>3</sup>H]GDP/[<sup>3</sup>H]GTP в буфере E, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 10 мг/мл БСА, 25 %-й глицерин, 50 мМ KCl. Реакцию останавливали добавлением 1 мл холодного раствора, содержащего 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 10 мМ β-меркаптоэтанол. Разведенные пробы немедленно наносили на нитроцеллюлозные фильтры («Sartorius», США) с диаметром пор 0,45 мкм и трижды промывали 1 мл того же буфера. Радиоактивность фильтров определяли в толуольном сцинтиллаторе, как описано выше.

**Результаты и обсуждение.** eEF1A очищали из печени кролика (степень очистки ~98 %) (рис. 1) при помощи метода последовательных хроматографий на различных носителях. С использованием метода ограниченного трипсинолиза eEF1A получена форма белка с молекулярной массой около 43 кДа, имеющая высокую гомологию с белковым продуктом онкогена PTI-1 (рис. 2). Кинетика огра-

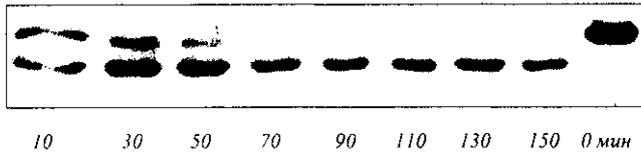


Рис. 3. Кинетика ограниченного трипсинолиза eEF1A печени кролика. Трипсинолиз проводили при соотношении масс eEF1A:трипсин 70:1. Через указанные интервалы времени аликвоты отбирали, добавляли к ним 2 мМ PMSF для ингибирования трипсина, затем туда же вносили электрофорезный буфер для образцов, после чего образцы кипятили в течение 5 мин и наносили на 12 %-й полиакриламидный гель. Электрофорез проводили, как описано в разделе «Материалы и методы»

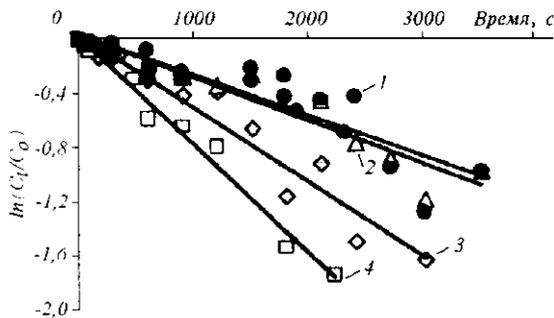


Рис. 4. Определение скорости диссоциации  $[^3\text{H}]\text{GDP}$  и  $[^3\text{H}]\text{GTP}$  из комплексов с eEF1A или  $\Delta\text{eEF1A}$ : 1 — eEF1A·GTP; 2 —  $\Delta\text{eEF1A}$ ·GTP; 3 — eEF1A·GDP; 4 —  $\Delta\text{eEF1A}$ ·GDP ( $C_0$  — исходная концентрация комплекса белок/гуанозинфосфат;  $C_t$  — концентрация комплекса в момент времени  $t$ )

ниченного трипсинолиза  $\Delta\text{eEF1A}$  представлена на рис. 3.

При ограниченном трипсинолизе eEF1A отщепляется приблизительно 1/3 GTP-связывающего домена белка. Для изучения свойств  $\Delta\text{eEF1A}$  и моделирования поведения белкового продукта гена РТ1-1 использовали четыре функциональных теста *in vitro*.

Во-первых, исследовали уровень связывания гуанозинфосфатов с eEF1A или  $\Delta\text{eEF1A}$ . Сравнительное сродство белка к гуанозинфосфатам выражали как соотношение между количеством  $[^3\text{H}]\text{GDP}$  или  $[^3\text{H}]\text{GTP}$ , способным связаться с белком за 15 мин при 37 °C [19]. Как следует из данных, приведенных ниже, при отщеплении 1/3 GTP-связывающего домена наблюдается падение нуклеотидсвязывающей активности модифицированного белка приблизительно в 3 раза, однако сравнительное сродство к GTP или GDP остается для двух белков практически неизменным:

Комплекс	Соотношение показателей
$(\Delta\text{eEF1A} \cdot \text{GDP}) / (\Delta\text{eEF1A} \cdot \text{GTP})$	2,7
$(\text{eEF1A} \cdot \text{GDP}) / (\text{eEF1A} \cdot \text{GTP})$	2,9
$(\text{eEF1A} \cdot \text{GTP}) / (\Delta\text{eEF1A} \cdot \text{GTP})$	0,83
$(\text{eEF1A} \cdot \text{GDP}) / (\Delta\text{eEF1A} \cdot \text{GDP})$	0,85.

Второй функциональный тест — изучение скорости диссоциации связанных с eEF1A или  $\Delta\text{eEF1A}$   $[^3\text{H}]\text{GDP}$  и  $[^3\text{H}]\text{GTP}$  (рис. 4). Диссоциации меченых тритием нуклеотидов достигали добавлением большого избытка (более чем в 250 раз) немеченого GDP или GTP. Как видно из представленных данных, значения константы скорости диссоциации как GDP, так и GTP для обеих форм фактора элонгации 1А различались несущественно:

Комплекс	Константа скорости диссоциации комплекса, $\text{с}^{-1}$
eEF1A·GDP	$(0,55 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$
$\Delta\text{eEF1A}$ ·GDP	$(0,70 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$
eEF1A·GTP	$(0,18 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$
$\Delta\text{eEF1A}$ ·GTP	$(0,21 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$ .

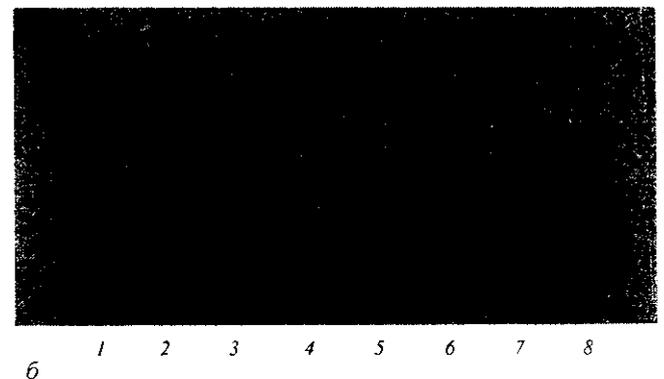
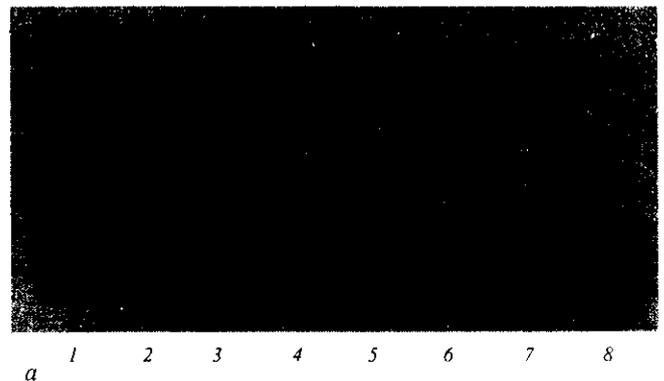


Рис. 5. Образование комплексов  $[^{32}\text{P}]\text{tRNA}^{\text{Phe}}$  с eEF1A·GDP (a) и eEF1A $\Delta$ 6·GDP (b). Концентрации белка на дорожках: 1 — 1 мкМ; 2 — 500 нМ; 3 — 250 нМ; 4 — 125 нМ; 5 — 100 нМ; 6 — 80 нМ; 7 — 50 нМ; 8 — 0 нМ

Значение константы скорости диссоциации [ $^3\text{H}$ ]GTP было практически одинаковым для eEF1A и  $\Delta\text{eEF1A}$ , в то время как скорость диссоциации [ $^3\text{H}$ ]GDP была несколько меньше для eEF1A, чем для  $\Delta\text{eEF1A}$ .

С помощью метода задержки полосы в геле было проверено образование третичных комплексов деацилированной тРНК с eEF1A/ $\Delta\text{eEF1A}$  и GDP (рис. 5). Данные радиоавтографического анализа свидетельствуют о том, что комплекс модифицированного eEF1A с деацилированной тРНК и GDP оказался заметно менее стабильным, чем аналогичный комплекс с нативным фактором элонгации.

Для проверки активности  $\Delta\text{eEF1A}$  в трансляции исследовали уровень трансляции поли(U) в бесклеточной белоксинтезирующей системе, собранной из индивидуальных компонентов, в присутствии eEF1A или  $\Delta\text{eEF1A}$  (рис. 6). Обнаружено, что последний сохраняет существенную активность в трансляции, однако даже добавление его избыточных количеств все же не позволяет восстановить активность системы трансляции до уровня, наблюдавшегося в присутствии eEF1A.

Изучение влияния eEF1A и  $\Delta\text{eEF1A}$  на кинетику трансляции (рис. 7) показало, что замена eEF1A модифицированным фактором сказывается не только на уровне, но и на скорости трансляции поли(U). Важным, однако, является тот факт, что  $\Delta\text{eEF1A}$ , несмотря на отщепление части GTP-связывающего домена, сохраняет довольно существенную активность в трансляции.

Эукариотический eEF1A принадлежит к GTP-связывающему семейству трансляционных факторов. Этот белок участвует в эффективном присоединении аминоксил-тРНК к А-сайту рибосомы на этапе элонгации [19]. Как уже отмечалось, кроме участия в процессе трансляции, eEF1A может выполнять неканонические функции, в частности, участвовать в процессе злокачественной трансформации эукариотической клетки.

Мутации в eEF1A могут прямо влиять на сдвиг рамки считывания и частоту включения ошибочных аминокислот у *Saccharomyces cerevisiae* [20]. Замена одной аминокислоты в последовательности eEF1A изменяет уровень селекции и коррекции аминоксил-тРНК при кодон-антикодоновом взаимодействии в процессе трансляции [20]. В связи с этим появление в опухолевых клетках гомолога eEF1A, кодируемого геном PTI-1, может быть причиной снижения точности трансляции и неспособности подавлять специфические мутации при злокачественном опухолеобразовании. Учитывая, что eEF1A и белковый продукт онкогена PTI-1 высокоомологичны, они могут иметь схожие функции

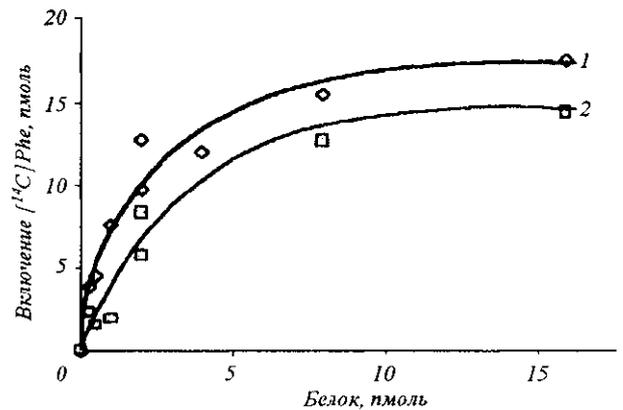


Рис. 6. Зависимость уровня трансляции поли(U) в бесклеточной белоксинтезирующей системе, собранной из индивидуальных компонентов, от концентрации: 1 — eEF1A или 2 —  $\Delta\text{eEF1A}$

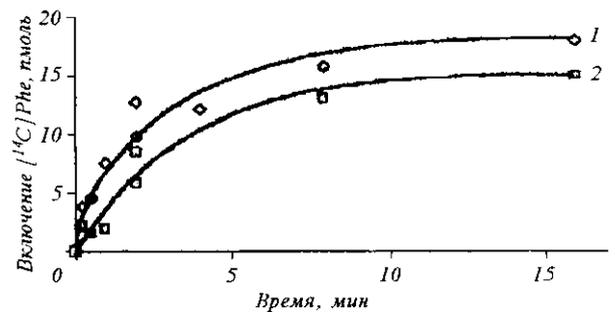


Рис. 7. Кинетика трансляции поли(U) в бесклеточной белоксинтезирующей системе, собранной из индивидуальных компонентов, в присутствии: 1 — eEF1A или 2 —  $\Delta\text{eEF1A}$

или же прямо конкурировать при трансляции различных мРНК в опухолевой клетке.

Поскольку белковый продукт онкогена PTI-1 еще не идентифицирован *in vivo*, нами было решено использовать модифицированный трипсином eEF1A как модель для изучения возможности функционирования PTI-1 в трансляции.

Показано, что удаление 1/3 GTP-связывающего домена не вызывает полной потери активности фактора в различных функциональных тестах в системе *in vitro*. При проверке связывания GTP и GDP фактором элонгации 1A, а также  $\Delta\text{eEF1A}$  выявлено, что оба белка могут образовывать комплексы как с GDP, так и с GTP. Удаление 69 а. о. с N-конца уменьшало сродство eEF1A к GDP/GTP почти в 3 раза, но не приводило к полной потере свойств модифицированного белка в сравнении с нормальным фактором элонгации 1A.

Важно, что при проведении эксперимента по проверке активности  $\Delta eEF1A$  в системе трансляции поли(U) модифицированный белок был активен и уровень трансляции значительно не отличался от такового в системе с нативным  $eEF1A$ . Следует отметить, что в литературе есть данные о том, что модифицированный трипсином фактор элонгации 1A полностью утрачивал способность участвовать в синтезе поли(Phe) в поли(U)-программированной белоксинтезирующей системе [13]. Однако в нашем случае  $\Delta eEF1A$  сохранял свои трансляционные свойства и взаимодействовал с компонентами трансляционной машины. Одной из возможных причин сохранения трансляционной активности модифицированного  $eEF1A$  в данной работе может быть различие в технике удаления N-концевого фрагмента из реакционной смеси.

Как отмечено в [13], N-концевой фрагмент может образовывать комплекс с  $\Delta eEF1A$  и при гель-фильтрации не отделяться от модифицированного белка, образуя с ним комплекс и препятствуя участию  $\Delta eEF1A$  в трансляционном процессе. Для избавления от N-концевого фрагмента  $eEF1A$  после трипсинолиза мы проводили не гель-фильтрацию, а ионообменную хроматографию на SP-сефарозе, во время которой фрагменты белка в зависимости от заряда элюировались при различной концентрации соли. В этом случае очистка модифицированного белка от N-концевого фрагмента была более эффективна, чем при гель-фильтрации [13], что могло исключить неспецифическое взаимодействие белка с N-концевым пептидом, препятствующим трансляции.

Результаты данной работы свидетельствуют о способности полученного из  $eEF1A$  аналога белкового продукта PTI-1 достаточно активно участвовать в трансляции *in vitro*, что дает основание предположить участие самого продукта онкогена в процессе трансляции в опухолевой клетке. Выяснение того, насколько корректно подобное участие в случае присутствия обоих белков в клетке и не приводит ли оно к накоплению ошибок трансляции, — задача последующих исследований.

A. P. Pogribna, S. V. Gorchakov, B. S. Negrutskii

Comparative analysis of the functional activity of the native and modified by trypsin forms of eukaryotic translation elongation factor 1a

#### Summary

Eukaryotic translation elongation factor 1A (*eEF1A*) is one of the main components of the translation machinery in cells. It performs also a number of non-canonical functions which are not related to the protein synthesis. In this work *eEF1A* was subjected to limited trypsinolysis to obtain the truncated by 67 amino acids polypeptide

*eEF1A* similar to a potential product of the oncogene PTI-1. *eEF1A* was used as a model to study possible translation functions of the PTI-1 oncogene product. Comparison of *eEF1A* and *eEF1A* in four different functional tests suggests a possibility of the participation of the PTI-1 protein in translation.

A. P. Pogribna, S. V. Gorchakov, B. S. Negrutskii

Порівняльний аналіз функціональної активності нативної і модифікованої трипсином форм еукаріотичного фактора елонгації трансляції 1A

#### Резюме

Еукаріотичний фактор елонгації трансляції 1A (*eEF1A*) є одним з головних компонентів трансляційного апарату в клітині, який також виконує цілу низку неканонічних функцій, що не пов'язані з трансляційним процесом. У даній роботі за допомогою методу обмеженого трипсинолізу фактора елонгації 1A отримано вкорочену на 69 амінокислотних залишків форму  $\Delta eEF1A$ , яка є аналогом потенційного білкового продукту онкогена PTI-1.  $\Delta eEF1A$  використано як модель для вивчення властивостей продукту онкогена PTI-1 в трансляційному процесі. Результати порівняння *eEF1A* і  $\Delta eEF1A$  в чотирьох різних функціональних тестах дозволяють зробити припущення щодо можливої участі PTI-1 в трансляції.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cavallius J., Rattan S. J., 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.
2. 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.
3. 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—3246.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Shen R., Su Z.-Z., Olsson C. A., Fisher P. B. Identification of the human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92.—P. 6778—6782.
  12. Negrutskii B. S., El'skaya A. V. Eukaryotic translation elongation factor 1 $\alpha$  // Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—New York: Acad. press, 1998.—P. 47—78.
  13. Kinzy T. G., Merrick W. C. Characterization of a limited trypsin digestion form of eukaryotic elongation factor 1 $\alpha$  // J. Biol. Chem.—1991.—266, N 7.—P. 4099—4110.
  14. Toshi R. L., Faulhammer H. G., Haenni A. L., Sprinzl M. Fluorescence labeling of an aminoacyl-tRNA at the 3'-end and its interaction with elongation factor TupGTP // FEBS Lett.—1986.—208.—P. 189—193.
  15. 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.
  16. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
  17. Pailliez J. P., Waller J. P. Phenylalanyl-tRNA synthetases from sheep liver and yeast. Correlation between net charge and binding to ribosomes // J. Biol. Chem.—1984.—259.—P. 15491—15496.
  18. Kahns S., Lund A., Kristensen P., Knudsen C. R., Clark B. F. C., Cavallius J., Merrick W. C. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein // Nucl. Acid Research.—1998.—26, N 8.—P. 1884—1890.
  19. Petrushenko Z. M., Negrutskii B. S., Ladokhin A. S., Budkevich T. V., Shalak V. F., El'skaya A. V. Evidence for the formation of an unusual ternary complex of a rabbit liver EF-1 $\alpha$  with GDP and deacylated tRNA // FEBS Lett.—1997.—407.—P. 13—17.
  20. Sandbaken M. G., Gulbertson M. R. Mutations in elongation factor EF-1 $\alpha$  affect the frequency of frameshifting and amino acid misincorporation in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics.—1988.—120.—P. 923—934.

УДК 577.217

Надійшла до редакції 05.08.03