Облікова картка НДДКР

Державний обліковий номер: 0213U006512

Державний реєстраційний номер: 0112U000995

Відкрита

Дата реєстрації: 14-10-2013

1. Етапи виконання

Номер етапу: 1

Назва етапу: ІЗОФОРМА ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ 1, eEF1A2, ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ОНКОМАРКЕР

Початок етапу: 02-2012

Закінчення етапу: 08-2013

Вид звітного документа: Остаточний звіт

2. Виконавець

Назва організації: Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Код ЄДРПОУ/ІПН: 05417101

Підпорядкованість: Національна академія наук України

Адреса: 03680 Київ, вул. Заболотного, 150

Телефон: (044)2000337

Телефон: 5260759

E-mail: shalak@imbg.org.ua

3. Власник результатів НДДКР (продукції)

Назва організації: Національна академія наук України

Код ЄДРПОУ/ІПН: 00019270

Адреса: вул. Володимирська, 54, м. Київ, Київська обл., 01030, Україна

Підпорядкованість: Кабінет Міністрів України

Телефон: 380442350981

E-mail: prez@nas.gov.ua

WWW: http://nas.gov.ua

4. Джерела та напрями фінансування

Підстава для проведення робіт: 34 - договір (замовлення) з центральним органом виконавчої влади, академією наук (головними розпорядниками бюджетних коштів на проведення НДДКР)

КПКВК: 6541030

Напрям фінансування: 2.2 - прикладні дослідження і розробки

Джерела фінансування

Джерело фінансування: 7713 - кошти держбюджету

Фактичний обсяг фінансування за звітний етап: 279.65 тис. грн.

5. Науково-технічна робота

Назва роботи (укр)

Ізоформа фактора елонгації трансляції 1, eEF1A2, як потенційний онкомаркер

Назва роботи (англ)

The A2 isoform of translation elongation factor 1 as a potential oncomarker

Реферат (укр)

Фактор елонгації трансляції 1А (eEF1A) є ключовим компонентом апарату білкового синтезу в евкаріотній клітині. Існують дві ізоформи фактора елонгації трансляції 1А, скорочено eEF1A1 та eEF1A2, які є ідентичними на 92%. eEF1A1 експресується в переважній більшості тканин та клітин організму, за виключенням скелетних м'язів, серцевого м'язу і нейронів, в яких відбувається експресія eEF1A2. У випадку виникнення збою в експресії ізоформ, а саме, коли в нормальних клітинах "непрацюючий" ген, що кодує eEF1A2, починає свою експресію, може відбуватися злоякісна трансформація таких клітин. На сьогодні існують комерційно доступні моноклональні антитіла, які впізнають обидві ізоформи фактора елонгації трансляції, що робить проблематичним їх використання з метою диференціального визначення eEF1A2. В світі існує лише одна лабораторія, яка має антитіла проти eEF1A2 власного виробництва і використовує їх в імунологічних дослідженнях. Однак, слід зазначити, що ці антитіла не є комерціалізованими, а значить, поки що недоступні для використання іншими дослідниками. Метою проекту було створення специфічних антитіл проти ізоформи фактора елонгації трансляції eEF1A2, визначення вмісту цієї ізоформи в пухлинах різної локалізації та пошук сигнальних шляхів, через які eEF1A2 може впливати на злоякісну трансформацію клітини. Для втіленні мети проекту ми також обрали підхід, оснований на включенні відносно коротких (10-16 амінокислотних залишків) фрагментів амінокислотних послідовності eEF1A2 до складу імуногенних конструкцій. Було проведено комп'ютерний порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей обох ізоформ на основі просторових моделей цих білків було обрано пептиди, що максимально відрізняються між собою і знаходяться на білковій поверхні, що буде робити їх доступними для впізнавання антитілами. Обрані пептиди eEF1A2 кон'югували з білком-носієм бичачим сироватковим альбуміном і проводили імунізацію тварин для генерації антитіл, які потім очищували і перевіряли їх специфічність Антитіла проти eEF1A2 володіли високою специфічністю, що дозволило нам використати їх для скринінгу гістологічних зразків пухлин різної локалізації методом імуногістохіімії і екстрактів пухлин методом імуноблотингу. В результаті ми виявили наявність білка eEF1A2 в 90% зразків раку легенів і приблизно 70% зразків раку шлунку людини, а також у всіх зразках раку молочної залози людини. Для визначення білків-партнерів eEF1A2 було обрано лінію клітин карциноми молочної залози людини. По-перше, ці клітини є злоякісними і, по-друге, в післяопераційних зразках пухлин молочної залози було встановлено наявність ізоформи eEF1A2 методом імуногістохімії. Ці клітини було трансфіковано створеними генетичними конструкціями, які експресують послідовності eEF1A1 та eEF1A2 злиті з HaloTag. Отримані білкові комплекси розділяли в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах і визначали білкові смуги для подальшої ідентифікації на мас-спектрометрі. Для виконання другого завдання, а саме дослідження взаємодії обох ізоформ фактора елонгації трансляції 1А з білками-партнерами in vitro, ми обрали три білка, які беруть участь у сигнальних шляхах клітини, в організації цитоскелету клітини і феномені РНК залежної інтерференції. Це зокрема кальмодулін, білок Argonaut, а також новий білок Sgt1, взаємодія якого з фактором елонгації трансляції нами було нещодавно виявлено. Нами вперше було встановлено, що eEF1A2 може утворювати комплекс з білком Argonaut за допомого антитіл специфічних до eEF1A2. Окрім цього, ми визначили, що ця ізоформа утворює комплекс саме з другою ізоформою білка Argonaut під час проходження мітотичної фази клітинного циклу.

Реферат (англ)

Translation elongation factor 1A (eEF1A) is a key component of the apparatus of protein synthesis in eukaryotic cells. There are two isoforms of translation elongation factor 1A, eEF1A1 and eEF1A2 in short, which are 92%identical. eEF1A1 is expressed in most tissues and cells, with the exception of skeletal muscle, cardiac muscle and neurons, where eEF1A2 is expressed. In the case of a failure in expression of the second isoform, namely, when in the normal cells the "silent" gene encoding eEF1A2 begins its expression; it may result in malignant transformation of cells. At present, monoclonal antibodies preparations, which recognize

both isoforms, are commercially available. Evidently, that the problem of selective determination of eEF1A2 cannot be solved by these antibodies. In the world there is only one laboratory that has own antibody against eEF1A2 and use it for the immunological studies. However, it should be noted that these antibodies are not commercialized and, therefore, are not yet available for use by other researchers. The aim of project was to generate specific antibodies against A2 isoform of translation elongation factor eEF1, detect this isoform in tumors of different localization and search for signaling pathways by means of which eEF1A2 may influence the malignant transformation of cell. To attain the aim of the project we choose using of short peptides (about 10-16 aminoacid residues) derived from eEF1A2 sequence as a main component of immunogenic constructions. We compared amino acid sequences of eEF1A1 and eEF1A2 and on the base of three-dimensional models of these factors we selected the peptides which were different and at the same time situated on the protein surface to be accessible to antibodies. Selected peptides of eEF1A2 were conjugated to a carrier protein bovine serum albumin and were used for animal immunization to generate antibodies. These antibodies were purified and their specificity was tested by ELISA, immunoblotting and imunohistochemistry. It was shown that purified antibodies recognized eEF1A2 in the individual state and in the crude cell and tissue extracts and didn't demonstrate any cross-interaction with eEF1A1. High specificity of antibodies against eEF1A2 allowed us to use them for screening of histological samples of tumors of different localization by the method of imunohistochemistry and tumor extracts by immunoblotting. As a result, we found the presence of eEF1A2 protein in 90% of lung cancer samples, approximately 70% of human gastric cancer specimens and in all the samples of human breast cancer. We also used the antibodies against eEF1A2 to identify this protein in the extracts of cells that grow in culture. A clear positive signal on western-blot was obtained in human breast carcinoma cell extracts and mouse fibroblasts. The results indicate that in cancer cell lines, except HeLa cells, eEF1A2 isoform is also present. We failed to detect eEF1A2 in HEK293 cell line extracts, but it should be noted that this cell line is not cancerous but only immortalized. Thus, the results of our study confirm the assumption that eEF1A2 can serve as one of the tumor markers, whose presence in the postoperative samples can confirm the malignant nature of the tumor. To determine the protein-partners of eEF1A2 human breast carcinoma cell line was selected. First, these cells are malignant and, secondly, in the postoperative samples of breast tumors the presence of eEF1A2 was determined by immunohistochemistry. These cells were transfected by created genetic constructs expressing eEF1A1 and eEF1A2 fused to HaloTag. The resulting protein complexes were separated on polyacrylamide gel in denaturing conditions and the protein bands were selected for further identification by mass spectrometry. To study the interaction of both isoforms of translation elongation factor 1A with protein partners in vitro, we chose three proteins involved in cell signaling pathway, in the organization of the cell cytoskeleton and phenomenon of RNA dependent interference. This is, in particular, calmodulin, protein Argonaut, and a new protein Sgt1, whose interaction with translation elongation factor we have recently discovered. We first found that eEF1A2 isoform can form a complex with the protein Argonaut using an antibody specific to eEF1A2. In addition, we determined that eEF1A2 forms a complex with a second protein isoform of Argonaut during mitotic phase of the cell cycle.

Індекс УДК: 57, 57.083.3

Коди тематичних рубрик НТІ: 34.01

6. Науково-технічна продукція (НТП)

НТП 1

Назва продукції (укр): Пептидо-специфічні антитіла проти другої ізоформи фактора елонгації трансляції, eEF1A2, та їх характеристика.

Назва продукції (англ): Peptide-specific antibody against the second isoform of translation elongation factor, eEF1A2, and its characteristics.

Очікувані результати: поліпшення ефективності діагностики та лікування хворих

Галузь застосування: медицина, наукові заклади

Опис продукції (укр): Афінно очищені анти-пептидні антитіла специфічно взаємодіють лише з eEF1A2 ізоформою і не взаємодіють з eEF1A1 як у вестерн-блот аналізі грубих екстрактів клітин,так і в імуногістохімії зразків парафінових зрізів.

Соціально-економічна спрямованість НТП:

Стадія завершеності НТП: Дослідний зразок

Впровадження НТП: Не впроваджено

Строки впровадження: -

Виробник продукції: ІМБіГ

Споживачі продукції: імунологи, біохіміки, молекулярні біологи

Перспективні ринки: Україна, світ

Права інтелектуальної власності: За договорами

Форми та умови передачі продукції: Спільні НДДКР

7. Бібліографічний опис

8. Звітна документація

Кількість сторінок в звіті: 78

Мова звіту: Українська

Кількість файлів у звіті: 1

9. Заключні відомості

Перелік осіб-виконавців

Єльська Г. В.

Вісловух А.А

Власенко Д.О

Негруцький Б.С.

Новосильна О.В

Порубльова Л.В

Керівник організації:

Єльська Ганна Валентинівна (д. б. н., акад.)

Керівники роботи:

Шалак В.Ф.

Керівник відділу реєстрації наукової діяльності УкрІНТЕІ

Юрченко Т.А.