



Inhibition of local protein synthesis as a result of eIF2 inactivation in neurons.

Alexandrov G.O., Porfirieva E.I., Shuvalova E. Yu.

Supervisors: Alkalaeva E.Z., Kolosov P.M.



Династия
Фонд Дмитрия Зимина



Abstract:

Protein biosynthesis is one of the three fundamental processes in all living cells, however, the local translation in dendrites is suppressed. Mechanisms of this suppression is still unknown. One of the mechanisms of global translation inhibition is phosphorylation of initiation factor eIF2.

That's why we check up the hypothesis about local protein synthesis inhibition as a result of eIF2 inactivation.

Issue:

To investigate the local protein synthesis in rat neurons.

Tasks:

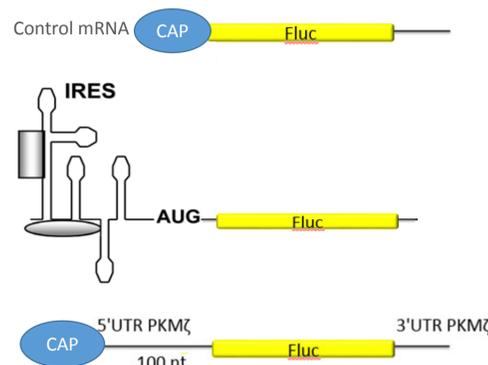
1. To simulate protein synthesis in neurons in the acellular translation system
2. To show the role phosphorylation of eIF2 factor in the regulation of translation in neurons.

Ход работы:

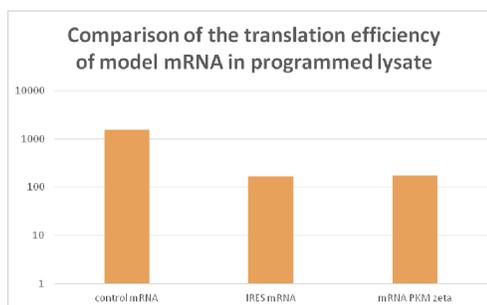
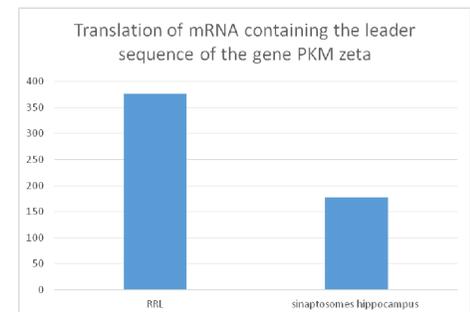
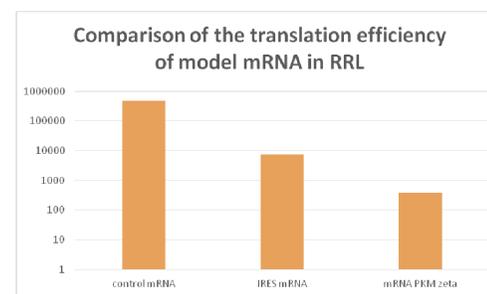
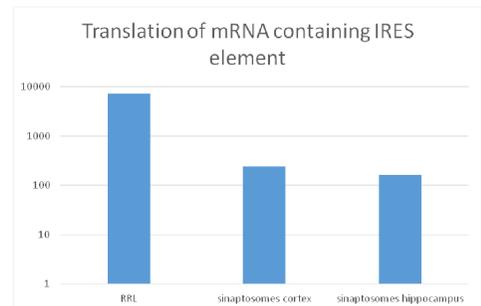
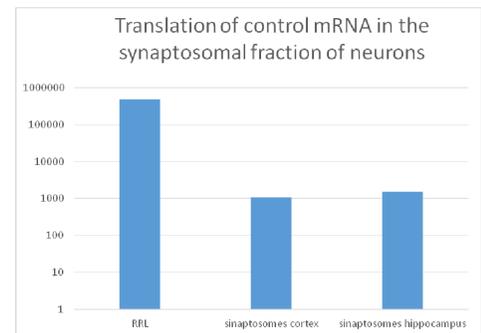
1. Preparation of mRNA part comprising part of the 5' leader sequence PKM zeta
2. Programming RRL rat brain homogenates and synaptosomal fraction of neurons
3. Translation of model mRNA in the programmed lysate
4. Staining primary neuronal cultures of rat antibodies to the proteins GFAP and eIF2

Results:

Translation in lysate

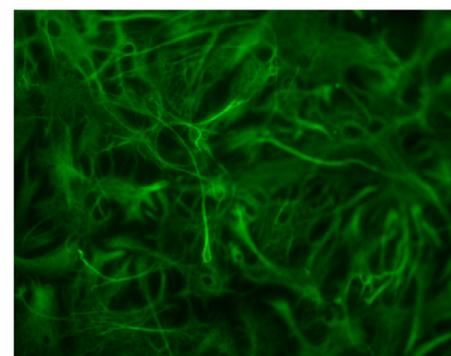
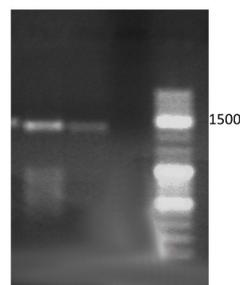


Translation of different mRNAs was suppressed by programmed lysate

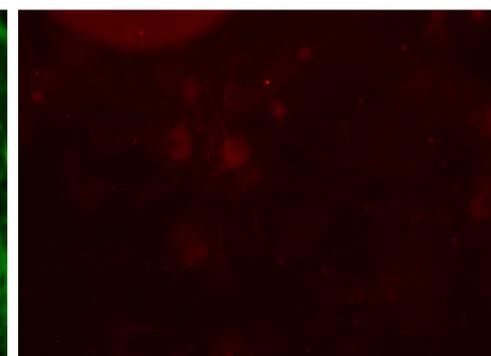


Translation of different mRNAs was suppressed irregularly in programmed lysate

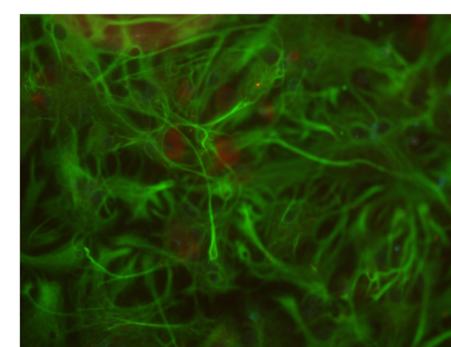
Stained fixed primary neuron culture with antibodies to GFAP and eIF2-P.



Glial staining with antibody to GFAP (Glial fibrillary acidic protein)



Neuron staining with antibody to eIF2-P



Superposition of two types cell staining

eIF2-P is expressed only in neurons, thereby suppressing of total translation occurs due to eIF2 inactivation.

Conclusions:

1. Both cap-dependent and cap-independent translation is suppressed by programmed lysate RRL.
2. One of the mechanisms of translation inhibition in rat neurons is eIF2 phosphorylation.



Подавление локального синтеза белка в нейронах в результате инактивации eIF2

Александров Г. О., Порфириева Е.Ю Шувалова Е.Ю

Руководители проекта: Колосов П.М Алкалаева Е.З.



Династия
Фонд Дмитрия Зимины



Введение:

Биосинтез белка является одним из трех фундаментальных процессов во всех живых клетках, однако, локальная трансляция в дендритах подавлена. Механизмы данного подавления до сих пор неизвестны. Одним из механизмов глобального ингибирования трансляции является фосфорилирование фактора инициации eIF2. Поэтому в данном проекте мы проверяли гипотезу об ингибировании локального синтеза белка в результате инактивации eIF2.

Цель:

Исследование подавления локального синтеза белка в нейронах.

Задачи:

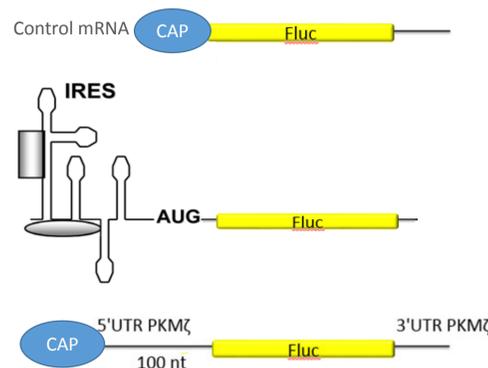
1. Смоделировать синтез белка в нейронах в системе бесклеточной трансляции
2. Показать роль фосфорилирование фактора eIF2 в регуляции трансляции в нейронах.

Ход работы:

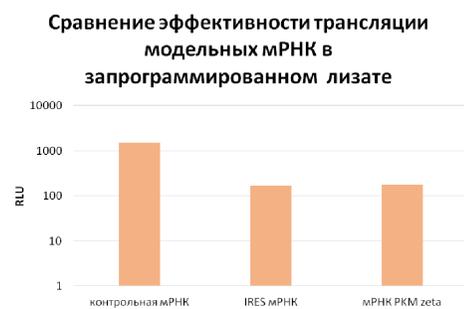
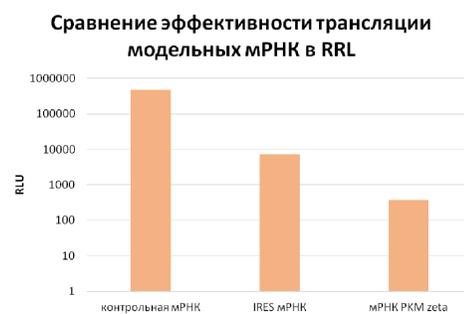
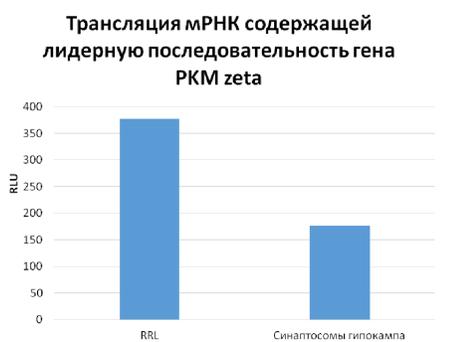
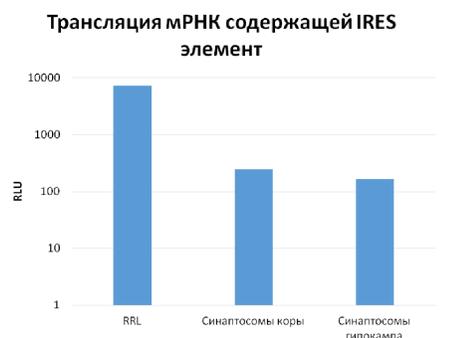
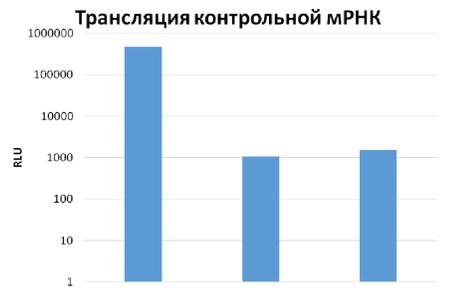
1. Получение мРНК, содержащей часть 5' лидерной последовательности PKM zeta
2. Программирование RRL гомогенатом мозга крысы и синапсомальной фракции нейронов
3. Трансляция модельных мРНК в запрограммированном лизате
4. Окраска первичной культуры нейронов крысы антителами к белкам GFAP и eIF2

Результаты:

Трансляция в лизате



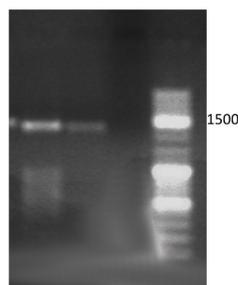
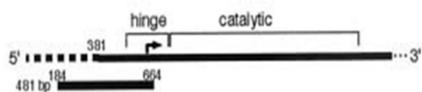
При программировании лизатов синапсомами трансляция разных мРНК подавлялась.



В запрограммированном лизате трансляция подавлялась неравномерно на разных мРНК

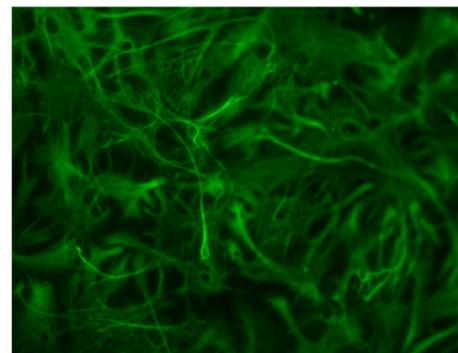
Окраска фиксированной первичной культуры нейронов антителами к GFAP и eIF2-P.

PKM zeta mRNA

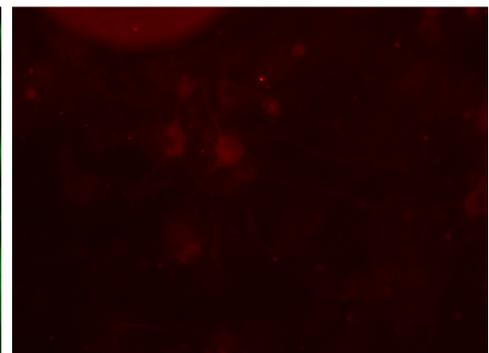


Выводы:

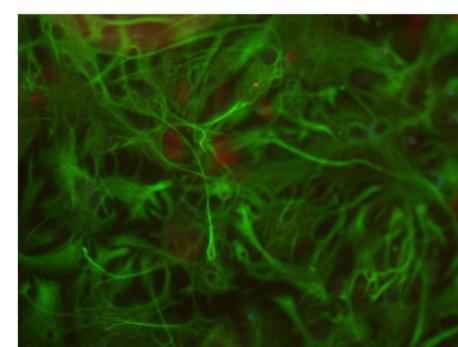
1. При программировании лизата RRL подавлялась трансляция как cap-зависимая трансляция, так и независимая.
2. Один из механизмов подавления трансляции в нейронах крысы – фосфорилирование фактора инициации eIF2.



Окраска глии антителами к GFAP (Glial fibrillary acidic protein)



Окраска нейронов антителами к eIF2 (фосфорилированная форма)



Суперпозиция двух видов окраски клеток

Белок eIF2-P экспрессируется только в нейронах, таким образом подавление общей трансляции происходит в том числе и за счет инактивации eIF2.