

Regulación de la función y estabilidad de eIF5A por la MAPK Hog1

Tomás Viuda-Moreno¹, Paula Alepuz^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universitat de València, C/ Dr. Moliner 50, Burjassot, España.

² Instituto Biotecmed, Universitat de València, C/ Dr. Moliner 50, Burjassot, España

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

BIOTECMED
Estructura de Recerca Interdisciplinària
en Biotecnologia i Biomedicina

Introducción

eIF5A (*eukaryotic translation Initiation Factor 5A*) es una proteína esencial conservada desde eucariotas simples, como *Saccharomyces cerevisiae*, hasta humanos. Su función principal es la de unirse al ribosoma para ayudar en la traducción de motivos proteicos ricos en prolinas o combinaciones de prolinas con glicina y aminoácidos cargados. Sin embargo, también se han descrito múltiples procesos celulares en los que eIF5A estaría implicado, como la apoptosis, proliferación, autofagia o diferenciación. Además, eIF5A es la única proteína hipusinada descrita. La hipusinación es una modificación post-traducciona en dos pasos en la que un residuo de lisina es transformado en hipusina. Esta modificación es esencial para que eIF5A pueda ser funcional.

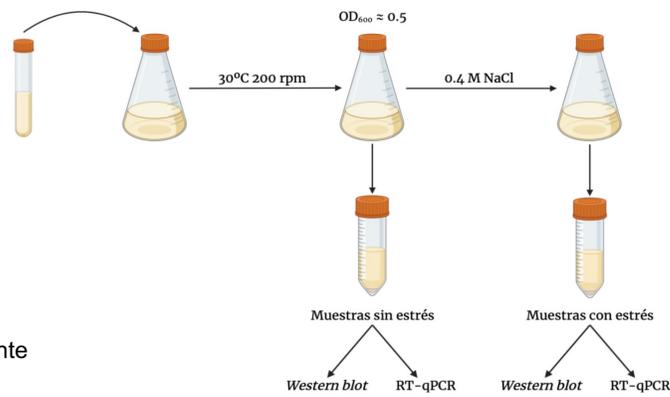
Por otra parte, Hog1 es una proteína quinasa activada por estrés de *S. cerevisiae*, homóloga a la familia de MAP quinases p38 y JNK humanas. Hog1 juega un papel clave en adaptar a las células a diferentes situaciones de estrés, como puede ser la situación de estrés salino, mediante una serie de respuestas genómicas y no genómicas⁽²⁾.

En artículos previos⁽³⁾ se describió que el silenciamiento génico de p38 α en células β -pancreáticas de ratón producía una disminución de la hipusinación de eIF5A en situaciones de estrés. Además, la bajada en los niveles de eIF5A hipusinada producía una disminución de la expresión iNOS, que codifica para una sintasa de óxido nítrico importante en la señalización durante la inflamación. Por tanto, estos resultados sugieren que eIF5A es regulado por la MAPK p38 para controlar la respuesta inflamatoria⁽³⁾.

Objetivos del trabajo

- Estudiar si la regulación de eIF5A por p38 está conservada en levaduras, lo cual facilitaría el estudio de la ruta en un organismo modelo más sencillo.
- Intentar dilucidar el mecanismo por el cual Hog1, homólogo a p38, regularía a eIF5A.

Materiales y métodos



Cepas de *S. cerevisiae* a utilizar:

- Cepa silvestre (WT) BY4741
- Cepa $\Delta hog1$
- Cepa Hog1 solamente nuclear (Hog1-NLS)
- Cepa Hog1 catalíticamente inactivo (Hog1- ΔK)

Resultados

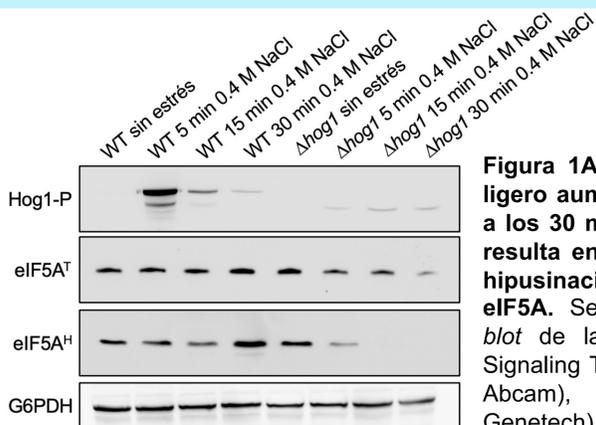


Figura 1A. El estrés osmótico produce un ligero aumento en la hipusinación de eIF5A a los 30 min, mientras que la falta de Hog1 resulta en una caída muy importante en la hipusinación y también en la cantidad de eIF5A. Se muestran los resultados de *western blot* de las proteínas p38-p (anti-p38, Cell Signaling Technology), eIF5A total (anti-eIF5A^T, Abcam), eIF5A hipusinado (anti-eIF5A^H, Genetech) y de la G6PDH como control de carga (anti-G6PDH, Sigma).

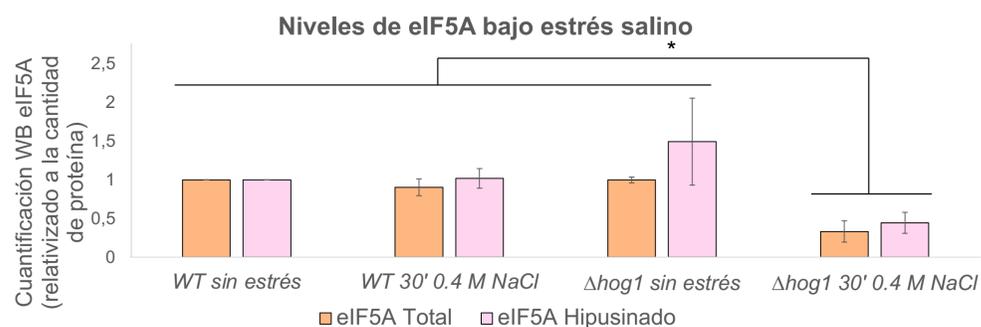


Figura 1B. Cuantificación de los niveles de eIF5A en respuesta a estrés osmótico. Se muestran los resultados de la cuantificación de eIF5A total e hipusinado. Se muestra la media y la desviación estándar de 4 réplicas. Los resultados se normalizaron por la cantidad de G6PDH y se ha relativizaron al nivel de proteína en la cepa silvestre (wt) sin estrés. Se muestra la significancia estadística (T-student, * p-value < 0.05).

Resultados

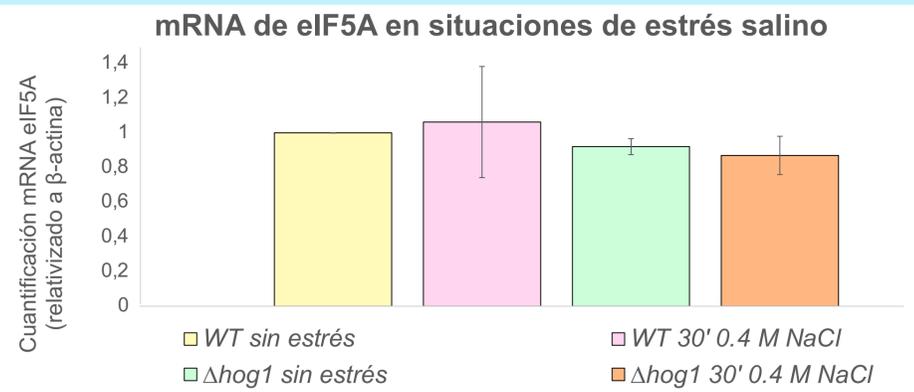


Figura 2. En respuesta a estrés osmótico no se observan cambios significativos en los niveles mRNA de eIF5A que justifiquen los cambios en los niveles de proteína. Se observan los resultados de los niveles relativos de mRNA del gen eIF5A, obtenidos por RT-qPCR, relativizados al gen β -actina y normalizado a los niveles de la cepa silvestre (WT) sin estrés. No se observaron diferencias significativas (T-student).

Resultados

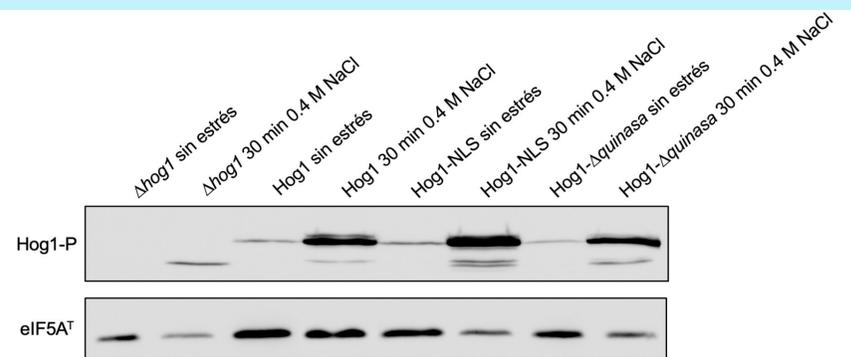


Figura 3A. La actividad quinasa de Hog1 y su presencia en el citoplasma son necesarias para mantener los niveles de la proteína eIF5A en respuesta a estrés osmótico. Se muestran los resultados obtenidos del análisis de la proteína eIF5A total por *western blot* en células mutantes en Hog1 en las que se ha introducido versiones de Hog1 solo localizada en el núcleo o catalíticamente inactiva.

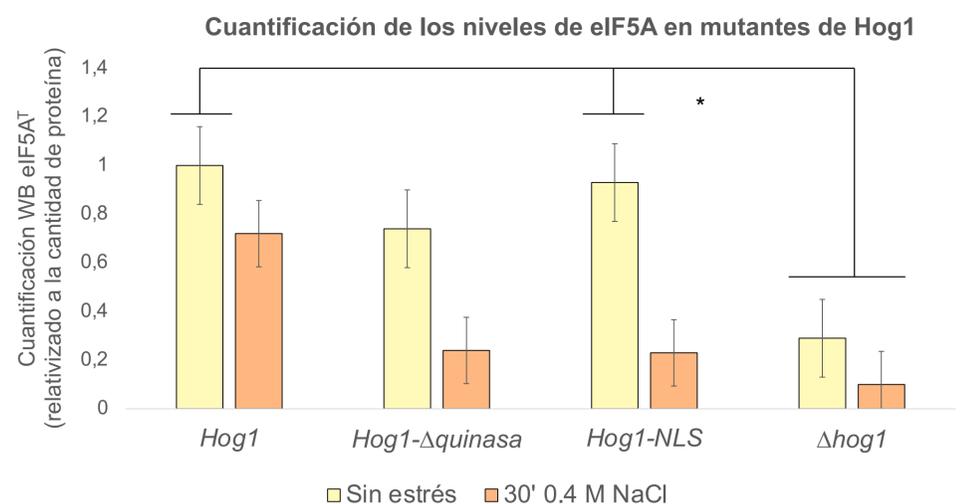


Figura 3B. Cuantificación de los niveles de eIF5A en mutantes de Hog1. Se muestran los resultados de la cuantificación de eIF5A total como la media y desviación estándar de 3 réplicas. La cantidad de eIF5A se normalizó frente a la cantidad de proteína total y se relativizó al nivel de proteína en la cepa silvestre (WT) sin estrés. Se muestra la significancia estadística (T-student, * p-value < 0.05).

Conclusiones

- La deficiencia de Hog1 produce una caída de los niveles de hipusinación de eIF5A en respuesta a estrés osmótico en la levadura *S. cerevisiae*. La caída en hipusinación se produce en paralelo a una disminución de la cantidad de eIF5A total, siendo necesaria la presencia de Hog1 activo en el citoplasma para mantener los niveles de eIF5A.
- La disminución de los niveles de eIF5A total en respuesta a estrés no ocurre a nivel de transcripción, dado que los niveles del mRNA de eIF5A se mantienen estables, sugiriendo que se da una regulación a nivel de estabilidad de la proteína eIF5A.
- Por tanto, la MAPK Hog1 regula la expresión de eIF5A en respuesta a estrés en *S. cerevisiae*, tal como sucede en células de mamíferos con la MAPK homóloga p38.

Referencias

- Barba-Aliaga, M., & Alepuz, P. (2022). Role of eIF5A in Mitochondrial Function. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 1284.
- Brewster, J.L., Gustin, M.C. (2014). Hog1: 20 years of Discovery and impact. *Science Signalling*, **7**, 343.
- Nishiki, Y., Adewola, A., Hatanaka, M., Templin, A. T., Maier, B., & Mirmira, R. G. (2013). Translational control of inducible nitric oxide synthase by p38 MAPK in islet β -cells. *Molecular Endocrinology*, **27**, 336-349.