

LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CINASA DE PROTEÍNAS TIPO A DEPENDIENTE DEL AMP_c EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Sergio Pérez-Landero y Jorge Nieto-Sotelo

Laboratorio de Fisiología Molecular, Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D. F., México, Correo E: jorge.nieto@ibiologia.unam.mx

RESUMEN

La fosforilación reversible de las proteínas regula una infinidad de procesos celulares. La cinasa de proteínas dependiente del AMP cíclico (PKA) está presente en todos los eucariontes (protozoarios, animales, algas y hongos) a excepción de las plantas terrestres y su estudio ha revelado mecanismos importantes para la señalización celular. Aquí se describen los componentes de la cascada de señalización de la PKA en *Saccharomyces cerevisiae*, la compartimentalización de las subunidades regulatorias, así como los mecanismos de regulación de la respuesta al estrés, la estimulación del crecimiento filamentoso y la retro-regulación de la actividad de la PKA. El análisis genético de los componentes de la vía PKA en *S. cerevisiae* ha arrojado información muy detallada acerca de su evolución, de sus relaciones estructura-función y de su operación mediante el desarrollo de modelos matemáticos y computacionales.

ABSTRACT

Many cellular processes are regulated by reversible protein phosphorylation. cAMP dependent protein kinase (PKA) is present in all eukaryotes (protozoa, fungi, algae, and animals) with the exception of land plants and its study has revealed important mechanisms for cell signaling. Here, the components of the PKA signaling cascade in *Saccharomyces cerevisiae*, the compartmentalization of the regulatory subunits as well as the mechanisms for regulation of the stress response, the stimulation of filamentous growth, and the feed-back regulation of PKA activity are described. The genetic analyses of the components of the PKA pathway in *S. cerevisiae* have revealed detailed information about its evolution, structure-function relationships, and operation by means of mathematical and computational modeling.

INTRODUCCIÓN

La remodelación de la estructura celular está determinada por interacciones complejas y delicadas entre sus componentes, así como por las condiciones del ambiente extracelular. En vertebrados, la PKA juega un papel muy importante en actividades tan dispares como la regulación del metabolismo, los procesos secretorios, la memoria y el aprendizaje (1). La PKA también regula el desarrollo, puesto que mutaciones en el gen *DCO* de *Drosophila*, que codifica a la subunidad catalítica de la PKA, ocasionan defectos en la oogenesis y en la formación de

patrones embrionarios. En vertebrados, la deficiencia de la PKA o su mala activación afectan el tubo neural, las somitas y las extremidades (1).

En *S. cerevisiae*, una de las rutas principales de señalización que regulan el metabolismo y el crecimiento en respuesta a la presencia de nutrientes y a las condiciones de estrés involucra a la PKA (2), la cual estimula tanto a las enzimas de la glucólisis y la fermentación como a aquellas involucradas en el desarrollo y en la proliferación celular. Al contrario, inhibe a las proteínas involucradas en la resistencia al estrés, en la gluconeogénesis y en la síntesis de la trealosa y del glucógeno (2, 3, 4, 5) (Fig. 1). Las

PALABRAS

CLAVE:

Respuesta al estrés, AMP_c, transducción de señales, desarrollo, diferenciación celular, modelamiento.

KEY WORDS:

Stress response, cAMP, signal transduction, development, cellular differentiation, modeling.

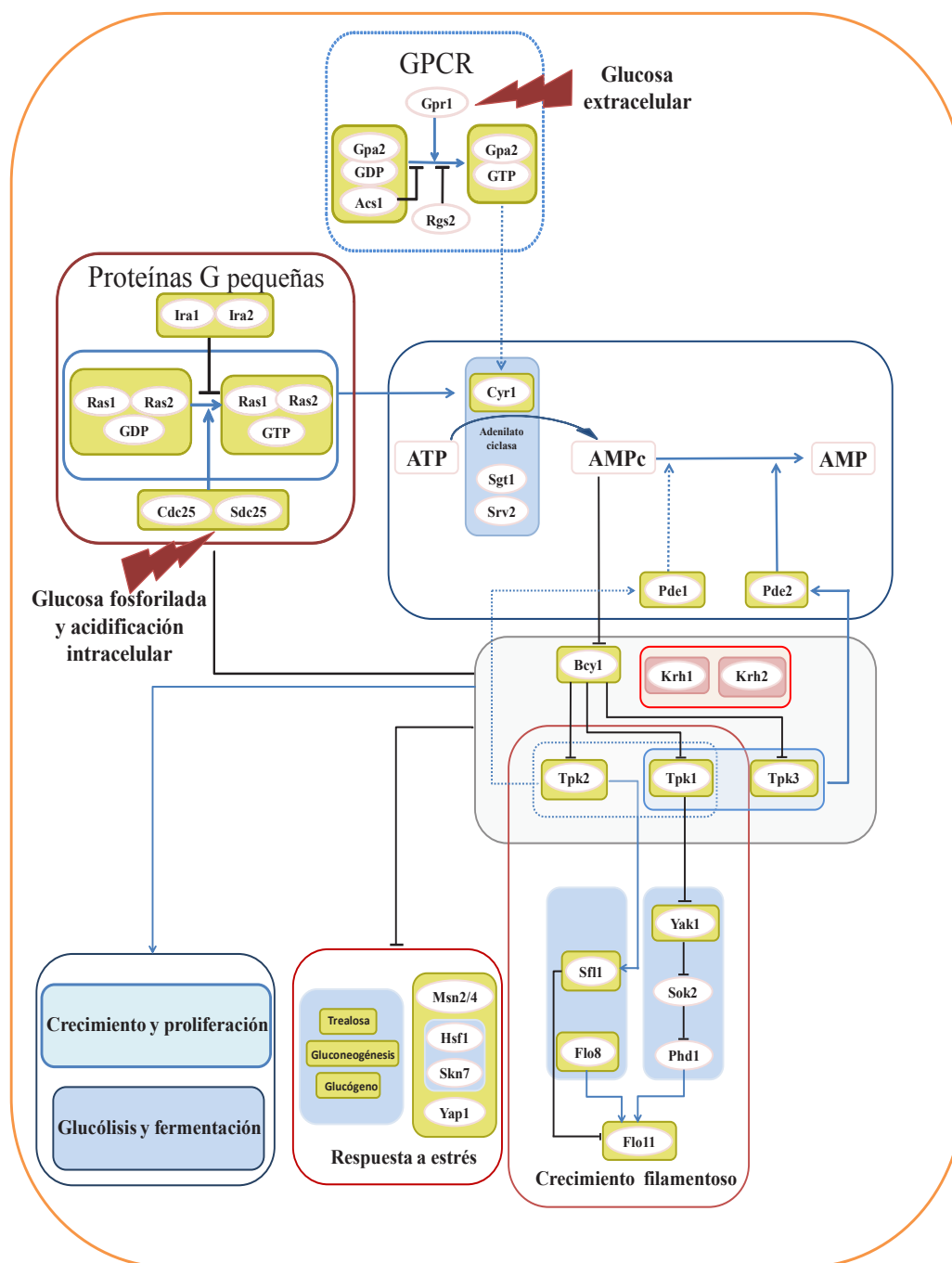


Figura 1. Esquema de la ruta de transducción de señales de la PKA en *S. cerevisiae*. Los cuadros representan a componentes de la vía que actúan de manera más íntima permitiendo apreciar claramente las interacciones entre los distintos módulos que la componen. La ubicación espacial intracelular y la dinámica temporal de las interacciones implican niveles de regulación no representados en éste esquema. Las líneas discontinuas indican las relaciones que se han demostrado entre los módulos cuando se añade glucosa a un cultivo que se encuentra creciendo en fuentes de carbono no-fermentables. Las líneas continuas indican las relaciones que se han demostrado entre los módulos durante el crecimiento exponencial en medio rico en nutrientes. La adenilato ciclasa es activada rápidamente por el sistema GPCR un minuto después de que la célula en ayuno percibe por primera vez a la glucosa en el medio extracelular, mientras que el sistema de proteínas G pequeñas (Ras) activa y mantiene de manera sostenida la actividad de la adenilato ciclasa en respuesta al aumento en los niveles de glucosa fosforilada y a la disminución del pH intracelulares.

células de *S. cerevisiae* proliferan cuando disponen de nutrientes y, por el contrario, crecen lentamente cuando éstos escasean o cuando las condiciones físico-químicas del medio les son adversas (2, 5). Para modular su crecimiento la levadura monitorea el ambiente circundante mediante estrategias diversas, integrando los estímulos o señales generadas y reestructurando, incluso, el estado transcripcional del genoma (2, 3). La ruta de señalización de la PKA está altamente conservada en los hongos y, debido a su relevancia en la adaptación a las condiciones nutricionales y ambientales, se le considera como un blanco clave para el desarrollo de fármacos antifúngicos que permitan controlar enfermedades humanas y vegetales. Algunos de estos fármacos en desarrollo actúan a nivel de los Receptores Acoplados a las Proteínas G (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCR), de las subunidades catalíticas o de las fosfodiesterasa, ya que muchos de sus dominios funcionales están conservados.

LAS VÍAS PRINCIPALES QUE CONDUCE A LA ACTIVACIÓN DE LA PKA EN *S. cerevisiae*

La activación de la PKA requiere de dos vías principales (Fig. 1). Una, la vía Gpa1-Gpr2, el equivalente funcional de las proteínas G heterotriméricas de la adenilato ciclasa de los mamíferos, detecta la presencia extracelular de la glucosa o la sacarosa y estimula de manera rápida a la PKA. La segunda, la vía Cdc25-Ras, permite mantener elevada la actividad de la PKA cuando los niveles de glucosa fosforilada aumentan y el pH disminuye dentro de la célula como resultado de la actividad glucolítica. Para monitorear el ambiente circundante, la levadura utiliza a los GPCR. Los azúcares extracelulares son inicialmente percibidos por la proteína receptora transmembranal Gpr1. El receptor, al sensar a la glucosa, estimula el intercambio del GDP por el GTP de la proteína Gpa2 (proteína tipo G α). Unido el GTP a Gpa2, la adenilato ciclasa (AC), Cyr1, es estimulada con el consecuente aumento en la actividad de la PKA en respuesta a la rápida elevación de los niveles del AMPc. Por el contrario, la subunidad Rgs2 (subunidad reguladora RGS -*Regulator of G-protein Signaling*-) promueve la retro/inhibición de la cascada, promoviendo la actividad GTPasa de la proteína Gpa2 (4). Un segundo punto de control negativo de la actividad de Gpa2 lo constituye la proteína Asc1 que, al unirse al complejo Gpa2-GDP, inhibe el intercambio de GDP por GTP (4). En la Vía Cdc25-Ras, los sacáridos intracelulares son fosforilados antes de ser metabolizados y se postula que, cuando la glucosa se encuentra fosforilada, la unión del GTP a las proteínas G monoméricas Ras (Ras1 y Ras2) aumenta de dos a tres veces (2). Esto

es relevante, ya que la isoforma Ras-GTP también estimula a la AC ayudando a mantener elevada su actividad. La estimulación de la AC por Ras-GTP requiere de elementos adicionales, como la proteína asociada a la AC, Srv2, o la proteína Sgt1, que puede actuar como chaperona (3). El intercambio del GDP por el GTP de Ras requiere de los factores de intercambio Cdc25 y Sdc25 (2, 5). Por el contrario, las proteínas Ira, Ira1 e Ira2, inhiben a Ras acelerando su actividad intrínseca de GTPasa (2). Ras y los intercambiadores de nucleótidos de guanina tipo Cdc25 están presentes en los mamíferos, pero no activan a la AC.

LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS Y REGULATORIAS DE LA PKA

La PKA en *S. cerevisiae* consta de tres subunidades catalíticas (C) codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (2, 3). Estas cinasas son reguladas negativamente por Bcy1 (R), mediante la formación de un complejo tetramérico inactivo compuesto por dos subunidades R unidas a dos subunidades C (6). En otras especies, el número de isoformas que componen la PKA es mayor. En humanos, por ejemplo, cuatro genes codifican a las subunidades regulatorias y tres a las catalíticas (7), por lo que *S. cerevisiae* representa un modelo de menor complejidad para el estudio de la dinámica y de las interacciones entre las subunidades de la PKA.

A concentraciones elevadas del AMPc se activan las Tpk's, ya que dos moléculas de este nucleótido cíclico (AMPc) se unen a cada una de las subunidades R, promoviendo cambios estructurales que desencadenan en la disociación del complejo R-C y, en consecuencia, la liberación/activación de las subunidades catalíticas -Tpk1, Tpk2 o Tpk3- (6). Las Tpk's reconocen residuos de serina o treonina en sus proteínas blanco ubicados dentro de las secuencias consenso R-R/K-X-S*/T* > R-X2-S*/T* = R-X-S*/T* (8).

Los análisis filogenéticos sugieren que las isoformas Tpk1 y Tpk3 son evolutivamente más cercanas, mientras que la Tpk2 es la más distante de las tres (9), siendo el dominio N-terminal el que más ha variado, tanto en longitud como en secuencia. En Tpk2 el dominio N-terminal es el de menor longitud, componiéndose de 66 aminoácidos, en comparación con 83 y 84 de Tpk1 y Tpk3, respectivamente (6). Esto ha llevado a sugerir que el dominio N-terminal podría determinar la especificidad de la cinasa hacia sus sustratos. Esta hipótesis se basa en el análisis de quimeras entre el dominio N-terminal de las Tpk's de *Candida albicans*, donde se demostró que este segmento en Tpk2 es relevante para regular el crecimiento invasivo (10). El análisis fino

de la relación estructura-función en la subunidad Tpk2 de *S. cerevisiae* mostró que existen dominios afuera del núcleo catalítico, tanto en el C- como en el N-terminales, que afectan la actividad de la enzima (11). Este tipo de estudios permitirá facilitar el diseño de inhibidores específicos para las subunidades catalíticas. En varios procesos celulares se ha visto que la actividad de las Tpk's es redundante, por ejemplo: en la estimulación del crecimiento, en la progresión del ciclo celular y en la inhibición de la gluconeogénesis (2, 3). Sin embargo, se conocen ciertos procesos celulares que de manera específica son regulados por las Tpk's. La subunidad Tpk2 estimula el crecimiento filamentosos (12), desreprime a los genes involucrados en la degradación de la trehalosa, favorece la asimilación del hierro y la homeostasis del agua (13) y antagoniza a las subunidades Tpk1 y Tpk3 durante la inhibición de la actividad los factores de transcripción Hsf1 y Skn7 (14, 15). La subunidad Tpk1 estimula la expresión de genes que participan en la respiración celular y en la biosíntesis de aminoácidos con cadenas ramificadas (12). La subunidad Tpk3 estimula el contenido enzimático mitocondrial durante el crecimiento fermentativo (15) e hiper-fosforila a Rgt1, que es un factor de transcripción involucrado en la represión del gen *HXK2* -hexocinasa 2-, cuando la concentración de la glucosa es alta.

LA COMPARTAMENTALIZACIÓN Y LA RETRO-REGULACIÓN DE LA PKA

La existencia de varias subunidades catalíticas e incluso regulatorias, como en vertebrados, que permiten la formación de distintas isoformas de los complejos R-C constituye un primer nivel de especificidad para encausar a la señalización. Un segundo nivel de regulación, es la localización de la PKA en compartimentos subcelulares específicos mediante la unión de las subunidades regulatorias con las proteínas de anclaje de la cinasa A (AKAPs, *A-kinase anchoring proteins*). Las AKAPs sirven como andamios moleculares que unen a la PKA con otras proteínas (p. ejem., enzimas blanco, receptores, componentes de vías de señalización) de manera que su localización espacial dentro de la célula es más próxima, facilitando su interacción. Se han descrito varias AKAPs que se unen ya sea a la subunidad regulatoria RI o a la RII, lo que constituye un segundo nivel de regulación de la PKA bien establecido en vertebrados, con posibles ortólogos en invertebrados, pero, sorprendentemente, no en hongos como la levadura *S. cerevisiae* (7).

Como se describió anteriormente, la inhibición que ejerce Bcy1 sobre las Tpk's, favorecida cuando los niveles del AMPc son bajos, está bien caracteri-

zada. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que las proteínas con repeticiones *kelch*, Krh1 y Krh2, facilitan la interacción entre Bcy1 y las cinasas (4). En cultivos de *S. cerevisiae* en fase logarítmica, crecidos con medio nutritivo rico y glucosa como fuente de carbono, los niveles de la proteína Bcy1 son aproximadamente el doble de la suma de las tres Tpk's (16). Estas proporciones asegurarían la formación del tetrámero R-C. Sin embargo, en estas condiciones es cuando la PKA presenta mayor actividad. Es posible que este efecto se deba, parcialmente, a diferencias en la compartimentalización intracelular de estos componentes. De hecho, se sabe que la localización subcelular de las subunidades catalíticas no es homogénea, ya que durante el crecimiento en glucosa, la mayoría de las moléculas de Bcy1 se encuentran en el núcleo al igual que Tpk2, mientras que la mayor parte de las moléculas de Tpk1 y Tpk3 se localizan en el citoplasma (16). Además, en estas condiciones, en mutantes con alta actividad de PKA debido a la delección de *BCY1*, la Pde2 se ubica en el núcleo (17). Lo anterior permite sugerir la hipótesis de que las diferencias en la concentración del AMPc son drásticas entre los diferentes compartimentos subcelulares.

Cuando las levaduras son sometidas a ayuno y reciben una fuerte dosis de glucosa (como durante la fase "lag" de la curva de crecimiento), se dispara la síntesis rápida y vigorosa del AMPc. Sin embargo, este pico de AMPc disminuye por efecto de la fosfodiesterasa de baja afinidad Pde1 que inmediatamente es activada por las cinasas Tpk1 y Tpk2 constituyendo de esta manera una horquilla de retroregulación negativa (18).

Otro tipo de retroregulación ocurre durante la fase exponencial del crecimiento en glucosa. En este caso el AMPc es degradado principalmente por la fosfodiesterasa de alta afinidad Pde2 (19) debido a que Tpk1 y Tpk3 la activan y la estabilizan (17). Interesantemente, al cambiar la fuente de carbono a rafinosa, o cuando la actividad de la PKA disminuye, una gran cantidad de Pde2 se transloca del núcleo hacia el citoplasma (17). Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual la PKA actúa sobre Pde2. Otro punto de autorregulación negativa se da a nivel de la modulación de la estabilidad de Ras en la membrana (3). Las Tpk's hiperfosforilan a Cdc25, comprometiendo su estabilidad en la membrana y la unión con Ras (20). En ambos casos la actividad de la AC disminuye. Además, el anclaje a la membrana plasmática y estabilidad de Cdc25 dependen de Ssa1 (Hsp70) (2). Durante el estrés oxidativo o de calor los niveles de Cdc25 disminuyen (21). Se ha planteado que este efecto se debe a que, en condiciones estresantes, el aumento en la cantidad de proteínas desnaturalizadas disminuye

la disponibilidad de Ssa1 y de otras chaperonas que se requieren para proteger y renaturalizar a otras proteínas. Por lo anteriormente expuesto, se ha sugerido que las proteínas Ras podrían estar relacionadas en la transmisión de señales en condiciones de estrés.

La localización espacio-temporal de los componentes que inciden sobre la PKA es relevante para la regulación de los distintos procesos celulares en los cuales está involucrada. En *S. cerevisiae* Bcy1 se concentra en el núcleo cuando el medio de cultivo contiene glucosa, mientras que, en fuentes no fermentables de carbono (p. ejem., etanol, glicerol), su localización es homogénea entre el citoplasma y el núcleo. La distribución subcelular de Bcy1 es regulada por la fosforilación de dos regiones ricas en serinas de su extremo N-terminal (22). La forma no fosforilada se encuentra en el núcleo, mientras que, cuando es fosforilada por la cinasa Yak1, se mueve hacia el citoplasma. La retención de Bcy1 en el citoplasma depende de la proteína Zds1, que interactúa físicamente con el N-terminal de Bcy1 una vez que éste es fosforilado por Yak1. Existe evidencia de que otro factor retiene a Bcy1 en el citoplasma, ya que la fosforilación de una de las dos regiones ricas en serina es independiente de Zds1 (22). Cuando las levaduras son sometidas a choque térmico (37°C) en presencia de glucosa, una subconjunto de la población de Bcy1 sale del núcleo al citoplasma, translocación que es dependiente tanto de Zds1, como de Zds2 (22). Los datos anteriores indican que el mecanismo de compartimentalización subcelular de la subunidad reguladora de la PKA es funcionalmente homólogo entre levaduras y animales, pero no a nivel estructural, pues las primeras carecen de AKAPs y los segundos de Zds1 y Zds2.

LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS

El estado transcripcional de cada gen está gobernado tanto por la estructura que adquiere la cromatina como por los factores de transcripción (FT), que son capaces de reclutar a la RNA polimerasa tipo II. Este proceso requiere de la coordinación de muchas proteínas y de la unión de los FT a secuencias específicas ubicadas cerca del inicio de la transcripción a lo largo del tiempo y en células, tejidos u órganos específicos. Se sabe que la remodelación de la expresión genética está gobernada por FT jerárquicos dependiendo del estímulo. Por ejemplo, en respuesta a un choque térmico o al aumento paulatino en la temperatura, el principal FT que interviene es Hsf1, ya que su función se requiere para la inducción de 165 genes (23). Los FT Msn2, Msn4, Yap1 y Skn7 también colaboran en la inducción de la expresión

de los genes de respuesta al estrés (GRE). La actividad de la PKA está relacionada a la actividad de algunos de estos FT.

Los genes *MSN2* y *MSN4* codifican para los FT Msn2 y Msn4, respectivamente, los cuales conservan un dominio de unión al DNA del tipo "dedo de zinc". Ambos participan en la respuesta general al estrés en *S. cerevisiae* (24) y reconocen a los elementos consenso *STRE* (5'-CCCCT-3') promoviendo el aumento de la expresión de 200 a 300 genes en réplica a distintas condiciones adversas (25). Uno de los principales mecanismos de inhibición de Msn2 y Msn4 consiste en contenerlos en el citoplasma, lo cual se logra con la fosforilación del dominio de localización nuclear. Las cinasas TOR y PKA regulan el estado de fosforilación de Msn2 y Msn4 de manera directa. En condiciones de estrés, los FT Msn2 y Msn4 son hiper-fosforilados y rápidamente re-localizados al núcleo, oscilando dinámicamente entre el núcleo y el citoplasma (26).

Si bien la regulación de la actividad de Hsf1 vía la PKA ha estado sujeta a debate, recientemente se demostró que las variaciones genéticas entre cepas de *S. cerevisiae* determinan el estado de la actividad de Hsf1 cuando la cascada de señalización Ras-PKA es alterada. Se postula que la inhibición de Hsf1 por la PKA es de manera indirecta, en donde la chaperona Hsp70 es intermediaria en esta relación (15). Estos datos concuerdan con observaciones acerca del complejo Hsf1-Hsp70, que mantiene baja actividad transcripcional durante el crecimiento exponencial en medio con glucosa. En condiciones de estrés se promueve su disociación, liberando a Hsf1 en un estado transcripcional de mayor actividad (27).

LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO FILAMENTOSO

Yak1 constituye un nodo importante en la estimulación del crecimiento filamentoso y de la respuesta a estrés en condiciones nutricionales adversas, actuando paralelamente y hacia abajo de la PKA. La PKA regula el crecimiento filamentoso (12), modulando la especificidad dual de la cinasa de treoninas Yak1. La eliminación de cada uno de los genes que codifican para las Tpk's causa fenotipos diferentes. A falta de *TPK2* este tipo de crecimiento resulta inhibido, mientras que la eliminación de *TPK1* no lo afecta y la eliminación de *TPK3* causa hiper-crecimiento filamentoso, sugiriendo que Tpk3 tiene la capacidad de inhibir y Tpk2 de estimular este fenotipo (12). Específicamente, Tpk1 fosforila a Yak1 inactivándola. Se sugiere que esta modificación mantendría a Yak1 en el citoplasma. En contraste, en el estado activo (no-fosforilado) Yak1 preferentemente se

localiza en el núcleo, donde promueve la expresión de *FLO11* a través de los FT Sok2 y Phd1 (28). En cambio, Tpk2 estimula el crecimiento filamentosos controlando la unión al promotor de *Flo11* del FT *Flo8* y la disociación, por fosforilación, del represor transcripcional Sfl1.

LA INTEGRACIÓN DE LAS INTERACCIONES

Los modelos computacionales constituyen herramientas importantes para investigar el comportamiento de los sistemas complejos. Se han propuesto modelos matemáticos discretos y determinísticos para describir la dinámica de las interconexiones entre los componentes de la ruta de señalización Ras/PKA/AMPC (29, 30). Aunque en el modelo matemático determinístico se modeló la actividad de la PKA, incluyendo el asa de retro-inhibición, se consideró que la actividad de las Tpk's es redundante (30). El modelo matemático del tipo discreto se enfocó principalmente a estimar la cantidad relativa de los componentes citoplasmáticos de la ruta de señalización de la PKA pero, similarmente al trabajo anterior, se consideró como redundante la actividad de las Tpk's (29). Recientemente se ha desarrollado un modelo computacional discreto en donde la actividad de cada una de las subunidades catalíticas es analizada de manera independiente. Este modelo se basó en datos experimentales del análisis genético de la regulación de la expresión génica dependiente de *Heat Shock Elements* (HSE) vía los FT Hsf1 y Skn7 por la PKA, el cual demostró la existencia de interacciones antagónicas entre la subunidad Tpk2 y las subunidades Tpk1 y Tpk3 en la inhibición de Hsf1 y Skn7, así como el papel de las proteínas Hsp70 (*Ssa1* y *Ssa2*) como mediadoras de la inhibición de Hsf1 por las Tpk's. Con este modelo se representa la dinámica de las interacciones de la red; entre las tres subunidades catalíticas con su subunidad reguladora Bcy1 a través de la retroinhibición de la síntesis de AMPc vía Pde2. La modelación matemática de la vía PKA está todavía en una etapa temprana de desarrollo. Las nuevas generaciones de modelos matemáticos y computacionales deberán de incorporar tanto a la ubicación espacial, así como a la dinámica temporal de los elementos que componen esta vía de señalización. Los modelos que incluyan estos parámetros permitirán postular hipótesis que no siempre se obtienen bajo mera intuición, así como analizar el comportamiento del sistema con dos o más variables incluidas de manera simultánea o en compartimentos diferentes, tal y como ocurre en la célula. Otro reto más ambicioso implicará el acoplamiento de las dinámicas antes mencionadas con los experimentos masivos llevados a cabo en *S. cerevisiae* que han permitido conocer

la localización subcelular y la abundancia de todo el proteoma, los cambios en la expresión del genoma y sus interacciones epistáticas. Esto aumentará aún más la complejidad del modelamiento de la vía PKA en el futuro, tanto en *S. cerevisiae* como en humanos.

CONCLUSIONES

Una gran cantidad de laboratorios han analizado extractos de plantas (algas y plantas terrestres [briófitas y pteridofitas]) para detectar al AMPc o a las cinasas dependientes del AMPc desde los años 70 del siglo pasado. Las evidencias más contundentes indican que, salvo en algas verdes y rojas, estos componentes no son detectables en las plantas terrestres. La ausencia de éstos componentes regulatorios (cAMP, subunidad reguladora de la PKA) y catalíticos (subunidad catalítica de la PKA, adenilato ciclasa) en las plantas terrestres, concuerda con los estudios genómicos recientes de plantas vasculares y no vasculares (31, 32). Cabe aclarar que la falta de secuencias similares a la PKA en las plantas terrestres no implica la ausencia de otras familias de cinasas de proteínas de serina y treonina que no dependen del cAMP para su funcionamiento (33) o incluso la ausencia de genes que codifican componentes de la vía PKA cuya secuencia ha divergido de sus ancestros algales a tal grado que ya no es posible reconocerlas con los algoritmos tradicionales tipo BLAST. La ausencia de componentes fácilmente reconocibles de la PKA, en las plantas terrestres, pudiera ser una consecuencia de su larga historia evolutiva. Se ha sugerido que el ancestro común de las plantas, que divergió hace mil millones de años de las algas verdes, perdió funciones importantes relativas a la motilidad celular, como los cilios y los flagelos y su cuerpo basal asociado, el centriolo (34). En *Chlamydomonas reinhardtii* el cAMP se requiere para el proceso de apareamiento y para la función y regulación flagelar, por lo que se podría hipotetizar que la pérdida de las funciones anteriores incluyó también la de los genes implicados en la vía PKA. Sin embargo, estudios más recientes han avivado la controversia acerca de si las plantas tienen la capacidad de sintetizar cAMP y cGMP vía adenilil o guanilil ciclasas no convencionales, respectivamente (35). Una hipótesis alternativa es que las plantas terrestres desarrollaron distintas estrategias de monitoreo y adecuación al ambiente, por su naturaleza sésil y quizás evolucionaron posteriormente, por convergencia evolutiva, la capacidad de sintetizar cAMP o cGMP.

En los animales, la PKA desempeña un papel muy importante en la transmisión de señales tanto intracelulares como intercelulares en procesos fisio-

lógicos, de desarrollo, metabólicos y de proliferación celular a través de la activación de enzimas y genes. La fácil manipulación experimental de *S. cerevisiae* y la baja complejidad genética de los componentes que regulan a la PKA han facilitado el rápido avance en el estudio de su regulación e interacciones físicas y genéticas. Aunado a lo anterior, la variabilidad genética entre cepas de la especie *S. cerevisiae* ha permitido iniciar estudios acerca de cómo es que fenómenos como la epistasis influyen en la actividad de ésta cascada de señalización. El modelaje ma-

temático y computacional de la vía permitirá algún día entender y predecir la importancia de la diversidad genética en la adecuación a los ambientes en constante cambio.

AGRADECIMIENTOS

S.P.L. contó con el apoyo de la beca doctoral del CONACYT (165709) y recibió apoyo del donativo CONACYT (78982) del cual JNS es responsable.



TABLA I

Comparación de los componentes de los módulos que conforman a la ruta de señalización de la PKA en *Homo sapiens* y en *S. cerevisiae*. Abreviaturas: TSH (hormona estimulante de la tiroides), GEF (factores de intercambio de nucleótidos de guanina), GAPs (proteínas activadoras de la GTPasa), AKAPs (proteínas-ancla de la PKA). Nótese que en humanos existe una gran diversidad de moléculas Ras, GEFs, GAPs y proteínas con repeticiones Kelch. Sin embargo, para el caso de Ras, GEFs y GAPs, se sabe que no existe interacción alguna con la PKA. Para el caso de las proteínas con repeticiones Kelch, no se ha determinado aún si median la interacción entre las subunidades R y C de la PKA.

Módulo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Proteínas G heterotriméricas	TSH, α y β -adrenérgico, muscarínico de acetilcolina, dopamina, etc. (receptores). Cuatro subclases de proteínas G α , cada una con varios miembros: G α_s , G α_i , G α_q y G $\alpha_{12/13}$. Cinco proteínas G β ; doce proteínas G γ .	Gpr1 (receptor de glucosa); Gpa2 (G α_s); Rgs2 (regulador).
Proteínas G monoméricas	Todos los componentes presentes, pero no están relacionados a la estimulación de la AC	Ras1, Ras2 (proteínas G); Cdc25, Sdc25 (GEFs); Ira1, Ira2 (GAPs).
AMP cíclico	AC1, AC2, AC3, AC4, AC5, AC6, AC7, AC8, AC9 y sAC (adenilato ciclasas); Pde 1, Pde2, Pde3, Pde4, Pde5, Pde6, Pde7, Pde8, Pde9, Pde10, Pde11 (fosfodiesterasas)	Cyr1 (adenilato ciclasa), Srv2 (activador de la AC); Sgt1 (cochaperona de la AC); Pde1 y Pde2 (fosfodiesterasas)
PKA	C α , C β , C γ , PrkX (subunidades catalíticas); RI α , RI β , RII α , RII β (subunidades regulatorias); > 50 AKAPs (localización subcelular de R)	Tpk1, Tpk2, Tpk3 (subunidades catalíticas); Bcy1 (subunidad regulatoria); Krh1, Krh2 (proteínas con repeticiones Kelch); Zds1 y Zds2 (localización subcelular de R)

REFERENCIAS

1. Milenkovic L, Scott MP (2010) Not lost in space: trafficking in the Hedgehog signaling pathway. *Sci Signal* 3 p. pe14 [DOI: 10.1126/scisignal.3117pe14].
2. Thevelein JM, de Winde JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-918.
3. Santangelo GM (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 253-282.
4. Rubio-Teixeira M, Van Zeebroeck G, Voordeckers K, Thevelein JM (2010) *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Res* 10: 134-149.
5. Folch-Mallol JL, Martínez LM, Casas SJ, Yang R, Martínez-Anaya C, López L, Hernández A, Nieto-Sotelo J (2004) New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150: 2865-2879.
6. Cannon J F, Tatchell K (1987) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 7: 2653-2663.
7. Skroblin P, Grossmann S, Schäfer G, Rosenthal W, Klusmann E (2010) Mechanisms of protein kinase A anchoring. *Int Rev Cell Mol Biol* 283: 235-330.
8. Kennelly PJ, Krebs EG (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266: 15555-15558.
9. Hunter T, Plowman G D (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* 22: 18-22.
10. Bockmühl DP, Krishnamurthy S, Gerads M, Sonneborn A, Ernst JF (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 42:1243-57.
11. Kennedy EJ, Ghosh G, Pillus L (2008) Identification of functionally distinct regions that mediate biological activity of the protein kinase A homolog Tpk2. *J Biol Chem* 283: 1084-1093.
12. Pan X, Heitman J (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* 22: 3981-3993.
13. Robertson LS, Causton HC, Young RA, Fink GR (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5984-5988.
14. Pérez-Landero S (2007) El papel de Hsf1 y Skn7 en la regulación de la respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae* a través de la vía Ras-AMPc-PKA. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, 87 páginas.
15. Chevtzoff C, Vallortigara J, Avéret N, Rigoulet M, Devin A (2005) The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim Biophys Acta* 1706: 117-125.
16. Tudisca V, Recouvreur V, Moreno S, Boy-Marcotte E, Jacquet M, Portela P (2010) Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *Eur J Cell Biol* 89: 339-348.
17. Hu Y, Liu E, Bai X, Zhang A (2010) The localization and concentration of the PDE2-encoded high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 10: 177-187.
18. Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM (1999) The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell* 10: 91-104.
19. Park JI, Grant CM, Dawes IW (2005) The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 311-319.
20. Jian D, Aili Z, Xiaojia B, Huansheng Z, Yun H (2010) Feedback regulation of Ras2 guanine nucleotide exchange factor (Ras2-GEF) activity of Cdc25p by Cdc25p phosphorylation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 584:4745-4750.
21. Wang L, Renault G, Garreau H, Jacquet M (2004) Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150: 3383-3391.

22. Griffioen G, Swinnen S, Thevelein JM (2003) Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. *J Biol Chem* 278: 23460-23471.
23. Hahn JS, Thiele DJ (2004) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 279: 5169-5176.
24. Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15: 2227-2235.
25. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257.
26. Garmendia-Torres C, Goldbeter A, Jacquet M (2007) Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation. *Curr Biol* 17: 1044-1049.
27. Halladay JT, Craig EA (1995) A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant. *Mol Cell Biol* 15: 4890-4897.
28. Malcher M, Schladebeck S, Mösch H-U (2011) The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 187: 717-730.
29. Cazzaniga P, Pescini D, Besozzi D, Mauri G, Colombo S, Martegani E (2008) Modeling and stochastic simulation of the Ras/cAMP/PKA pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* evidences a key regulatory function for intracellular guanine nucleotides pools. *J Biotechnol* 133: 377-385
30. Williamson T, Schwartz JM, Kell DB, Stateva L (2009) Deterministic mathematical models of the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst Biol* 3:70-84
31. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318: 245-250.
32. Canaves JM, Taylor SS (2002) Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family. *J Mol Evol* 54:17-29.
33. Hardie DG. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 97-131.
34. Li JB, Gerdes JM, Haycraft CJ, Fan Y, Teslovich TM, May-Simera H, Li H, Blacque OE, Li L, Leitch CC et al. (2004) Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* 117: 541-552.
35. Gehring C (2010) Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling - past and present. *Cell Communication and Signaling* 8: 15 <http://www.biosignaling.com/content/8/1/15>