



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LA IDENTIDAD Y FUNCIÓN DE LAS
PROTEÍNAS DE ANDAMIAJE, PARTICULARMENTE DE
Ste5p, EN LAS VÍAS DE RESPUESTA A DIFERENTES
ESTÍMULOS EN LAS LEVADURAS

SEMINARIO DE TITULACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RODRIGO AGUILAR CORACHÁN

DOCTORA LAURA KAWASAKI WATANABE



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Laura Kawasaki, mi tutora, por toda su ayuda y paciencia en la realización de este trabajo, y por brindarme esta oportunidad de titulación. Agradezco también a mis sinodales: el M. en C. Alfonso Vilchis, la M. en C. Beatriz Rodarte, la Dra. Teresa Lara, y el M. en C. Pablo Hofmann; gracias por las revisiones y consejos al respecto, así como por todo su apoyo. También le quiero agradecer a dos personas que desafortunadamente no pudieron ser parte de mi jurado pero que no por eso me dejaron de ayudar: la Dra. Ana María Fernández y la M. en C. Nancy Velázquez, gracias por su revisión y tiempo invertido. Además, debo agradecer al Dr. Roberto Coria por permitirme realizar en su laboratorio la parte experimental de este proyecto; dicha etapa fue apoyada por la DGAPA, UNAM, proyecto PAPIIT No. IN209602 y CONACYT proyecto No. 44178.

Creo que no hay momento más propicio que este para agradecer a las personas que desde siempre me han apoyado y han visto por mí, mis padres. Gracias, muchas gracias por todo su amor, y por enseñarme y permitirme aprender tantas cosas.

También hay otras dos personas que han sido casi como mis padres, y a las cuales quiero agradecer por su cariño, apoyo, consejos y sabiduría: muchas gracias abuelos.

A Mari Pao, por su compañía. Sin ti estaría tan solo...

DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo, de forma muy especial, a mi abuelo, en quien estuve pensando a cada momento durante la realización del mismo, y cuyo recuerdo me daba fuerzas en los momentos más difíciles. Siempre estarás en mi corazón.

(Padres: a ustedes les dedico mi vida entera)

*Cuando se es joven y no se sabe nada,
las montañas son solo montañas,
los árboles son solo árboles
y el agua es solo agua.*

*Cuando se es adulto y letrado,
los árboles ya no son árboles,
las montañas ya no son montañas
y el agua deja de ser agua.*

*Pero cuando se envejece y se es sabio,
las montañas vuelven a ser montañas,
los árboles vuelven a ser árboles
y el agua vuelve a ser nada más que agua.*

(Antiguo proverbio oriental)

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
EXPOSICIÓN DEL TEMA	7
1 Vías de MAPK	7
1.1 Vías de MAPK en levaduras.....	9
1.2 Vías de MAPK de mamíferos.....	10
1.3 Proteínas de andamiaje para las vías de MAPK en levaduras.....	11
1.4 Proteínas de andamiaje para las vías de MAPK en mamíferos.....	12
2 Vía de respuesta a feromona sexual de levadura	15
3 La proteína de andamiaje Ste5p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.1 Generalidades.....	19
3.1.1 Ste5p como un andamio para la cascada de MAPK.....	20
3.1.2 Reclutamiento de Ste5p hacia G β γ (Ste4p/Ste18p) en la membrana plasmática.....	20
3.1.3 Oligomerización y cambios conformacionales.....	21
3.1.4 Modelo de oligomerización para el reclutamiento.....	22
3.1.5 Traslado nuclear de Ste5p y enlaces en la activación de la vía.....	23
3.1.6 Interacciones entre Ste5p y reguladores de la morfogénesis polarizada.....	23
3.1.7 Ste5p y la especificidad de la vía.....	24
3.2 Dominios de Ste5p.....	24
3.2.1 Dominio RING-H2.....	24

3.2.2	Dominio PM/NLS.....	25
3.2.3	Dominio PH.....	26
3.2.4	Dominio de Unión a Ste7p.....	28
3.3	Traslado nuclear de Ste5p.....	30
3.3.1	Cdc24p regula el traslado nuclear y el reclutamiento del andamio Ste5p.....	32
3.3.2	Los filamentos de actina se requieren para el reclutamiento polarizado de Ste5p.....	32
3.4	Fosforilación de Ste5p.....	32
4	Proteínas de andamiaje en la vía de respuesta a estrés osmótico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
5	Proteínas de andamiaje en el crecimiento polarizado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
5.1	Spa2p.....	40
5.2	Far1p.....	42
5.3	Bem1p.....	43
6	Vías de señalización en otros hongos y organismos pluricelulares	45
6.1	Cascadas de transducción de señales conservadas.....	45
6.2	Señalización de la proteína G en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	45
6.3	<i>Kluyveromyces lactis</i>	46
6.3.1	Vía de respuesta a feromona.....	46
6.3.2	Respuesta a estrés osmótico.....	47
6.4	Homólogos de Spa2p y Bud6p en <i>Aspergillus nidulans</i>	48
6.5	KSR, una proteína de andamiaje que facilita la activación de MAPK en organismos multicelulares.....	49

7 El andamio Ste5p de <i>Kluyveromyces lactis</i> —resultados experimentales	53
DISCUSIÓN	59
1 Proteínas de andamiaje	59
2 <i>Kluyveromyces lactis</i>	67
3 Palabras finales	69
LITERATURA CITADA	71

RESUMEN

Todas las células eucarióticas utilizan cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) como parte central de la transducción de señales en respuesta a una gran variedad de estímulos externos y para regular numerosas respuestas celulares, cada una respondiendo con alta especificidad, a través de proteínas efectoras dependientes del estímulo, aún cuando las rutas pueden compartir algunas cinasas.

La fidelidad en las respuestas puede deberse entre otras razones, a las interacciones entre las cinasas, las interacciones entre las cinasas y sus sustratos, la presencia de cinasas específicas para una ruta, la localización de las cinasas, y la formación de complejos multienzimáticos a través de proteínas de andamiaje. Estas últimas facilitan las interacciones entre las cinasas asociadas y pueden unir las a receptores, proteínas G u otros componentes involucrados en la señalización, así como también participar en el acercamiento del complejo a la membrana. La primera MAPK de andamiaje descrita fue Ste5p de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína se asocia con la proteína G heterotrimérica y con Ste11p (MAPKKK), Ste7p (MAPKK) y Fus3p (MAPK) para constituir la ruta de señalización en respuesta a la feromona durante el apareamiento. A pesar de que algunas de las MAPK mencionadas participan en otras vías de señalización (crecimiento filamentoso, integridad de la pared celular, estrés osmótico), Ste5p permite que la respuesta durante el apareamiento sea muy específica.

En la levadura *Kluyveromyces lactis* se han estudiado las proteínas ortólogas a las mencionadas anteriormente. En particular, Ste5p de *K. lactis* (KlSte5p) es muy interesante porque su presencia en la respuesta a feromona permite que sea específica para el apareamiento, aún cuando algunas de las cinasas con las que interactúa participan en otras vías de señalización. Se piensa que dicha especificidad es debida a que KlSte5p recluta las cinasas del módulo impidiendo que se activen en respuesta a otros estímulos.

El presente trabajo representa una revisión de la información existente a la fecha, acerca de las proteínas de andamiaje y las rutas de señalización en las que participan. Dicha información proviene principalmente de los experimentos realizados en levaduras y hongos filamentosos, aunque también se incluyen los recientes hallazgos en mamíferos. Adicionalmente se incluyen los datos obtenidos de una parte experimental en la que se analiza la función de KlSte5p y su importancia en la vía de respuesta a feromona de *K. lactis*.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la vía de respuesta a feromona de *Saccharomyces cerevisiae* comenzó con el aislamiento de mutantes estériles en los laboratorios de Mackay y Hartwell en los setentas. Las mutantes estériles, o *STE*, eran incapaces de aparearse, y aquellas específicamente defectuosas en la respuesta a feromona no atravesaban por el arresto del ciclo celular o no cambiaban su forma cuando se exponían a feromona sexual purificada.

La levadura tiene dos tipos sexuales, **a** y α (genotipos *MATa* y *MAT α* , respectivamente). Las células *MATa* y *MAT α* son haploides, y el resultado de un apareamiento exitoso será que dos células haploides de sexo opuesto se fusionen para formar un diploide *MATa/MAT α* . Las células *MAT α* secretan la feromona Factor- α , un péptido de 13 residuos (con secuencia WHWLQLKPGQPMY), y responden al Factor-**a** (Bardwell *et al.*, 2005). Las células *MATa* secretan el Factor-**a**, un péptido de 12 residuos (con secuencia YIKGVFWDPAC) que está unido covalentemente a un grupo lipídico (farnesilo), y responden al Factor- α (Bardwell *et al.*, 2005). Cuando una célula de levadura es estimulada por la feromona secretada por una célula cercana del sexo opuesto, atraviesa por una serie de cambios fisiológicos que la prepararán para el apareamiento. Éstos incluyen cambios significativos en la expresión de alrededor de 200 genes (cerca de 3% del genoma), arresto en la fase G1 del ciclo celular, crecimiento orientado hacia el compañero sexual, y, finalmente, la fusión de las membranas plasmáticas de los compañeros sexuales, seguida, poco tiempo después, por la fusión de sus núcleos. El proceso completo tarda alrededor de 4h (Bardwell *et al.*, 2005).

Muchos cambios similares también ocurren cuando las células de un tipo sexual son expuestas a feromona purificada del tipo sexual opuesto. Debido a que el Factor-**a** es difícil de purificar, problemático de sintetizar, y se pega a la mayoría de las superficies, las células *MATa* típicamente son tratadas con el péptido Factor- α sintetizado (Bardwell *et al.*, 2005). Las células así tratadas interrumpirán su ciclo celular, inducirán la represión de la mayoría de los mismos genes, e incluso se alargarán en una dirección determinada por el sitio de su gemación previa.

Las células que no se aparean exitosamente, eventualmente vuelven a entrar al ciclo celular y continúan el crecimiento vegetativo como haploides.

La vía de transducción de señales que registra la presencia de la feromona extracelular y coordina las diversas respuestas celulares se conoce como la vía de respuesta a feromona de levadura, o vía de apareamiento. Varios de los componentes de la vía de apareamiento también son componentes de distintas vías de señalización que regulan aspectos del crecimiento invasivo filamentoso y la respuesta a ciertos tipos de estrés.

El apareamiento es iniciado por la unión de la feromona a un receptor de siete dominios transmembranales (GPCR, por sus siglas en Inglés: *G-Protein-Coupled Receptor*) acoplado a una

proteína G heterotrimérica en la superficie celular. Como es verdad para casi todos los otros módulos de GPCR/proteína G de eucariontes, la unión a receptor estimula a la subunidad $G\alpha$ de la proteína G para intercambiar GDP por GTP; $G\alpha$ unida a GTP entonces libera el heterodímero $G\beta\gamma$ (Elion, 2000).

Después de ser liberado de $G\alpha$, el complejo $G\beta\gamma$ unido a la membrana, transmite la señal al unirse a tres distintos efectores: (1) un complejo Ste5p/Ste11p; (2) la proteína cinasa Ste20p; y (3) un complejo Far1p/Cdc24p. En realidad Ste4p^{GB} se une a cada uno de los efectores, mediante superficies de interacción que estaban ocultas cuando estaba asociado con $G\alpha$ -GDP. Ste18p^{GY} ancla el complejo $\beta\gamma$ a la membrana a través de grupos lipídicos (farnesilo y palmitoílo) unidos covalentemente (Elion, 2000; Bardwell *et al.*, 2005). Un resultado fundamental de la unión de $G\beta\gamma$ a estos efectores múltiples es que Ste20p y Ste11p son colocados uno cerca del otro; entonces la señal inicial es transmitida corriente abajo cuando Ste20p se fosforila, y por lo tanto activa a Ste11p, el primer efector de la cascada de MAPK (ver Fig. 3 más adelante).

El primer efector de $G\beta\gamma$ es Ste20p y el segundo es Ste5p. Una región N-terminal de Ste5p, que contiene un dominio RING-H2, se une a $G\beta\gamma$ cerca del sitio de unión de Ste20p (Elion, 2000; Bardwell *et al.*, 2005; Garrenton *et al.*, 2006). Ste5p es una proteína multifuncional grande que carece de actividad catalítica, pero que sirve como una plataforma de unión, un remolcador, y un andamio para otras proteínas. Después de la estimulación por feromona, la primera función de Ste5p es la de servir como un adaptador, al unirse a ambas proteínas $G\beta$ y Ste11p, y remolcar Ste11p unida a las inmediaciones de la membrana plasmática. En este punto, Ste20p se fosforila, y por tanto, activa a Ste11p.

El tercer efector de $G\beta\gamma$ es un complejo de proteínas que incluye a Far1p y Cdc24p. Far1p funciona de manera similar a Ste5p, es decir, como un adaptador para la activación de otra proteína que en este caso, es Cdc42p. Al unirse con $G\beta$ y con Cdc24p^{GEF}, Far1p trae a Cdc24p^{GEF} a la membrana plasmática, donde el sustrato de Cdc24p, Cdc42p, está (literalmente) colgando (Bardwell *et al.*, 2005). Entonces Cdc24p actúa sobre Cdc42p para promover el intercambio de GDP por GTP.

Las células de levadura son sésiles pero se alargan mediante el crecimiento asimétrico en dirección al compañero sexual cercano, formando una estructura llamada proyección de apareamiento, y adoptando una forma de pera distendida que se denomina "shmoo".

Las proteínas involucradas en la señalización, la polarización, la adhesión celular y la fusión se localizan en la proyección de apareamiento.

Las cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) se encuentran en todos los eucariontes, y prácticamente se expresan en todos los tejidos. Las cascadas de MAPK contribuyen a la regulación de diversas respuestas, que incluyen, tanto en levaduras como en humanos, acción hormonal, diferenciación celular, progresión del ciclo celular, y respuestas a estrés. La cascada de MAPK es un conjunto de tres proteínas cinasas que actúan en secuencia. En la vía de apareamiento de la levadura, la MEKK es Ste11p, la MEK es Ste7p, y hay dos MAPKs, Kss1p y Fus3p.

Distintas regiones de Ste5p se unen con Ste7p^{MEK} y con las MAPKs. Se piensa que Ste5p funciona como un andamio que asocia y organiza las proteínas cinasas que componen la cascada de MAPK, y aumenta, por tanto, la transmisión de la señal de MEKK hacia MEK y de ahí hacia MAPK.

Las proteínas de andamiaje, por tanto, tienen un papel muy relevante en la especificidad de las respuestas y en la organización de los módulos de cinasas. El presente trabajo pretende llevar a cabo una revisión exhaustiva de la información disponible sobre las distintas proteínas de andamiaje en las levaduras, analizando sus diferencias y similitudes, así como su importancia en las diversas rutas de respuesta a estímulos. Particularmente, nos interesaremos en la proteína Ste5p de *Kluyveromyces lactis*, sobre la cual se expondrá una parte experimental realizada que incluye la clonación e interrupción del gen y el análisis del fenotipo de la mutante en el apareamiento.

EXPOSICIÓN DEL TEMA

1 Vías de MAPK

Las vías de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, por sus siglas en Inglés: *Mitogen-Activated Protein Kinase*) regulan diversos procesos que abarcan desde la proliferación y la diferenciación, hasta la apoptosis. Activadas por un enorme conjunto de estímulos, fosforilan numerosas proteínas, incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, cinasas y otras enzimas, e influyen sobremanera en la expresión génica, el metabolismo, la división celular, la morfología celular, y la supervivencia celular (Garrington y Johnson, 1999; Qi y Elion, 2005-II).

Cada vía de MAPK contiene una cascada de tres cinasas enfiladas que comprenden: una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK, MAP3K, MEKK o MKKK), una MAP cinasa cinasa (MAPKK, MAP2K, MEK o MKK) y una MAP cinasa (MAPK). Frecuentemente, una MAPKKK cinasa (MAPKKKK, MAP4K o MKKKK) activa la MAPKKK. La MAPKKKK o la MAPKKK pueden estar unidas a la membrana plasmática —por ejemplo, a través de la asociación con una pequeña GTPasa o lípido (e.g. Ste20p, PKC, PAK MAPKKKKs y Raf MAPKKKs) (Qi y Elion, 2005-II).

Existen numerosas MAPKKKs, que incluyen las isoformas de Raf, las semejantes a Ste11p MEKK1-MEKK4, cinasas de linaje mezclado (MLKs, por sus siglas en Inglés: *Mixed Lineage Kinases*), proteínas Tao y Mos (Qi y Elion, 2005-II). Las MAPKKs y las MAPKs están más altamente relacionadas. Las MAPKKKs pueden tener grandes dominios regulatorios que interactúan con reguladores previos (e.g. Rho, Ras). Típicamente, las MAPKKs poseen dominios regulatorios menores y son activadas por una fosforilación doble de los residuos serina y treonina dentro de la espiral del dominio catalítico. Exhiben una gran especificidad por su MAPK relacionada pero son reguladas por diversas MAPKKKs.

Las MAPKs son activadas por una doble fosforilación de los residuos treonina y tirosina conservados dentro de la espiral de activación (denotado por T-X-Y) y fosforilan residuos de serina y treonina dentro del consenso de los motivos PXT/SP (Garrington y Johnson, 1999; Qi y Elion, 2005-II; Breitkreutz y Tyers, 2006). La especificidad de la vía es regulada en distintos niveles, que incluyen las interacciones cinasa-cinasa y cinasa-sustrato, la localización conjunta de cinasas por proteínas de andamiaje, y la inhibición de la intercomunicación por las mismas MAPKs. Las MAPKs se unen establemente con sus sustratos, con las MAPKKs y las proteínas de andamiaje a través de múltiples dominios de acoplamiento distintos de sus sitios activos, que pueden reconocer sitios homólogos en diferentes objetivos. Las MAPKs también pueden inhibir la señalización a través de la unión a sustratos cuando están catalíticamente inactivas.

Los complejos de señalización de los componentes del módulo de MAPK pueden variar en el tiempo y en el espacio. Frecuentemente, las MAPKs activas se translocan del citoplasma al núcleo para fosforilar objetivos nucleicos, y las MAPKKs pueden trasladarse dentro y fuera del núcleo llevando la MAPK como pasajera para anclarse en el citoplasma. Las MAPKs se posicionan en numerosas estructuras subcelulares, que incluyen microtúbulos, endosomas, el retículo endoplásmico y el citoesqueleto de actina.

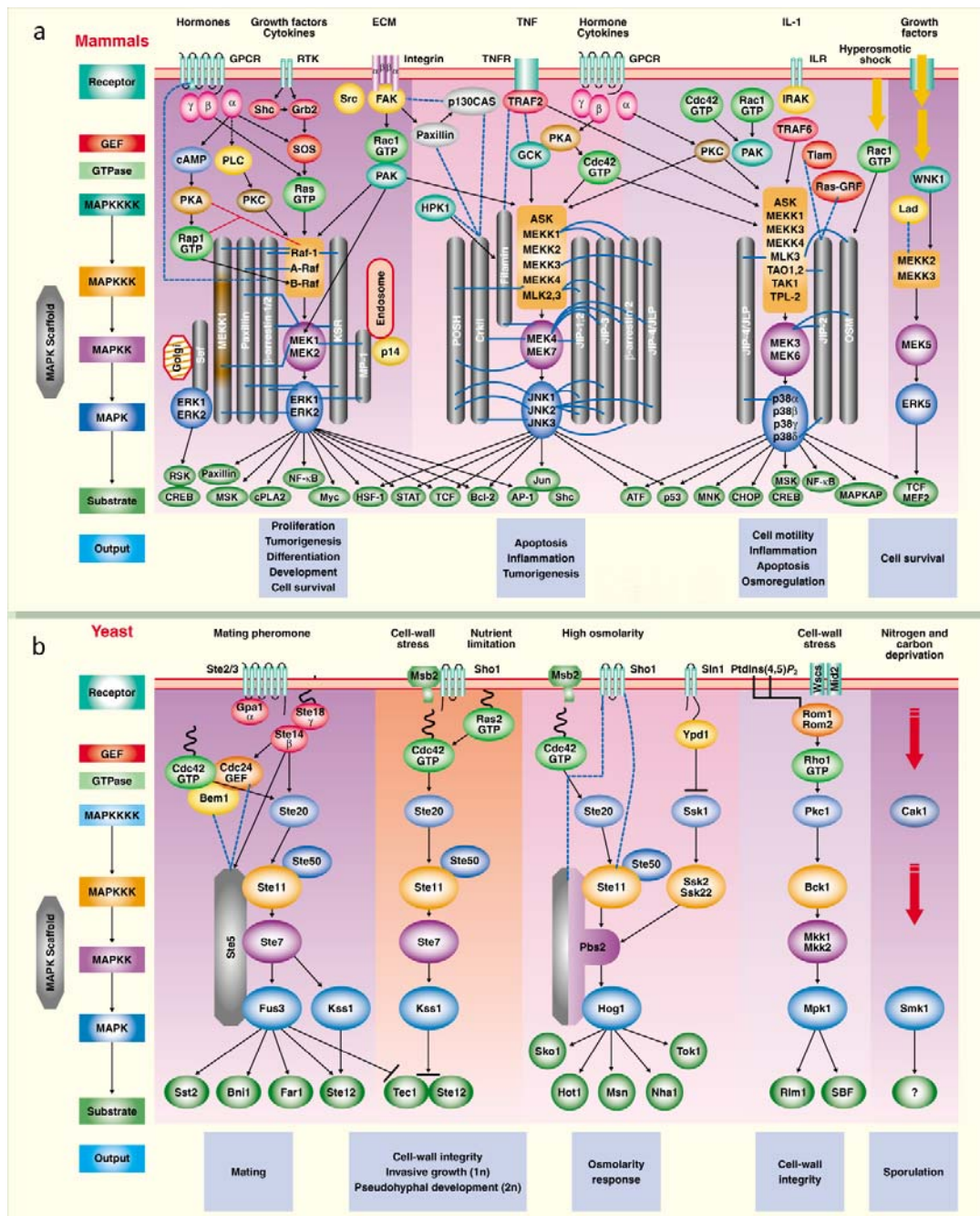


Fig. 1 Vías de señalización mediadas por MAPK en (a) mamíferos y (b) levaduras. (Tomado de Qi y Elion, 2005-II)

1.1 Vías de MAPK en levaduras

Todas las vías de MAPK de *S. cerevisiae* (Fig. 1b) han sido identificadas genéticamente. A pesar de que los componentes son compartidos entre distintas vías, no ocurre intercomunicación errónea. El primer módulo de MAPK en ser definido fue el correspondiente a la vía de apareamiento.

A la fecha, se han definido cinco vías de MAPK que utilizan seis distintas MAPKs: Fus3p, Kss1p, Hog1p, Mpk1p (también conocida como Slt2p), Mpl1p y Smk1p. Fus3p y Kss1p regulan el apareamiento en respuesta a feromonas peptídicas y tienen sustratos únicos y compartidos pero sólo Fus3p es esencial para el apareamiento. Kss1p funciona en vías adicionales que regulan el crecimiento invasivo y desarrollo de pseudohifas así como la integridad de la pared celular (Garrington y Johnson, 1999; Qi y Elion, 2005-II). Hog1p regula la osmolaridad intracelular en respuesta a la osmolaridad extracelular y estrés por ácido crítico, Mpk1p regula la integridad celular y la gemación en respuesta a cambios mecánicos en la pared celular y membrana plasmática (mediante una señal indefinida proveniente de Mpl1p) y Smk1p regula la esporulación, expresada sólo después de que la meiosis se ha iniciado en respuesta a la escasez de carbono y nitrógeno (Garrington y Johnson, 1999). Fus3p es activada por la MAPKK Ste7p en el andamio Ste5p, a través de interacciones localizadas que involucran una proteína G heterotrimérica y una GTPasa Cdc42p, las cuales guían la MAPKKK Ste11p hacia la MAPKKK Ste20p. Kss1p puede ser activada por Ste7p que no esté unida a Ste5p. Hog1p puede ser activada por Ste11p a través del enlace con el andamio Pbs2p unido al sensor de membrana plasmática, Sho1p. También es activado por un sistema de retransmisión de doble componente que involucra al sensor Sln1p (una proteína histidina-cinasa autofosforilativa), una proteína de fosfotransferencia, Ypd1p, y un receptor, Ssk1p, que activa dos MAPKKKs Ssk2p y Ssk22p que activan la MAPKK Pbs2p. Mpk1p (y posiblemente Mpl2p) regula la integridad celular y es activada por la MAPKKK Bck1p, y las MAPKKs Mkk1p y Mkk2p en respuesta a la estimulación de proteínas de tipo integrinas (i.e. Wsc1-4p, Mid2p) unidas a factores de intercambio de nucleótidos de guanina (Rom1p y Rom2p) que activan la GTPasa Rho1p, la cual activa la proteína cinasa C1 (PKC, por sus siglas en Inglés: *Protein Kinase C*), una MAPKKK para la vía (Garrington y Johnson, 1999).

Las proteínas de andamiaje son esenciales para la señalización del apareamiento y alta osmolaridad. Ste5p y Pbs2p proveen especificidad por medio de la segregación de cinasas compartidas con cinasas específicas y receptores que detectan el estímulo. Ste5p confiere sitios separados de unión para Ste11p, Ste7p y Fus3p y estimula la retransmisión de fosfato por efectos de proximidad, oligomerización, y cambios conformacionales (Garrington y Johnson, 1999; Breikreutz y Tyers, 2006). El andamio Pbs2p une Ste11p con Hog1p y también une Ste11p con Cdc42p asociada por GTP a Ste20p, por medio de la unión de su dominio rico en prolina con un dominio SH3 de Sho1p, el cual también une a Ste11p.

Las MAPKs de levadura desempeñan papeles importantes en la fisiología celular a pesar de no ser esenciales. Las MAPKs son inhibidas en varios puntos por las fosfatasa de MAPK, Msg5p y Sdp1p, las fosfatasa de tirosina, Ptp2p y Ptp3p, y Ptc1p —un tipo de fosfatasa 2C Ser/Thr (PP2C) (Garrington y Johnson, 1999).

Las MAPKs de levadura ayudan a mantener la especificidad de la señalización: Hog1p previene la activación errónea de Fus3p y Kss1p por Ste11p durante un alto estrés de osmolaridad, y Fus3p induce la degradación del regulador Tec1 de crecimiento invasivo y atenúa Kss1p. Factores adicionales pueden prevenir la activación errónea de la vía a alta osmolaridad por Ste11p activado durante el apareamiento y el crecimiento filamentosos y aumentan la activación de Fus3p sobre la de Kss1p durante el apareamiento.

1.2 Vías de MAPK de mamíferos

Las vías de MAPK de mamíferos son difíciles de designar debido a la existencia de múltiples cinasas, líneas celulares, tipos de tejidos, condiciones experimentales (que pueden generar resultados conflictivos) y redundancia funcional. Sin embargo, el análisis genético en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* ha ayudado sobremanera. Se han identificado cinco familias de MAPKs en células de mamífero: cinasas extracelulares reguladas por señales (ERK1 y ERK2), cinasas Jun N-terminales (JNK1, JNK2 y JNK3); isozimas cinasas p38 (p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ); ERK3/ERK4; y ERK5 (Garrington y Johnson, 1999) (Fig. 1a). Las primeras tres, junto con sus activadores, están implicadas en enfermedades humanas y son el objetivo del desarrollo de fármacos. Los módulos de MAPK de mamíferos pueden asociarse con numerosas proteínas de andamiaje que regulan su actividad y localización en varias células. Las proteínas de andamiaje pueden unirse a otras proteínas, incluyendo fosfatasa y proteínas del citoesqueleto. A pesar de que el significado de andamiaje aún no está bien definido en la mayoría de los casos, parece ser un método generalmente usado para segregar los módulos individuales de MAPK y puede ayudar a definir vías específicas de MAPK.

ERK1 y ERK2 regulan la proliferación, diferenciación y meiosis, aprendizaje y memoria en las células nerviosas. Son activadas por estímulos mitogénicos tales como factores de crecimiento, citocinas y ésteres de forbol, que activan una variedad de receptores y proteínas G. Sólo se ha definido una vía completa desde receptor hasta MAPK para las cinasas ERK1 y ERK2, que actúan posteriores a la proto-oncoproteína Ras (Garrington y Johnson, 1999). Las ERKs son expresadas en muchos tejidos y forman parte de un módulo de MAPK que incluye MAPKKs Raf (A-Raf, B-Raf, C-Raf/Raf1) y la MAPKK MEK1/MEK2. La vía es facilitada por la proteína de andamiaje KSR, que une los tres niveles de cinasas a Ras. Otras proteínas de andamiaje también pueden atar el módulo ERK, incluyendo la β -arrestina1/2 y MP-1 (Garrington y Johnson, 1999; Breitskreutz y Tyers, 2006). Dependiendo de la magnitud y duración del estímulo, la activación de las MAPKs ERK1/ERK2 puede derivar en la proliferación o diferenciación.

Los miembros de la familia JNK representan papeles cruciales en la regulación de respuestas a varios tipos de estrés, y en el desarrollo neural, inflamación, y apoptosis. Ellos son activados por radiación u otros tipos de estrés y por factores de crecimiento. JNK3 se expresa específicamente en el cerebro. Los módulos de MAPK JNK son regulados por distintas proteínas de andamiaje,

incluyendo JIP1, JIP2, JIP3/JSAP1, JIP4, β -arrestina 2, filamina y CrkII (Garrington y Johnson, 1999). Las proteínas de andamiaje presuntamente dirigen los módulos de MAPK hacia distintos sitios dentro de la célula y poseen papeles importantes en la activación de cinasas y en la selección de sustratos. Actualmente no se entiende bien si estos andamios están ligados a elementos previos en la vía, de forma similar a Ste5p, Pbs2p, y KSR.

Las MAPKs p38 desempeñan un papel importante en el asma y la autoinmunidad en humanos, y son activadas por numerosos tipos de estrés físico y químico, incluyendo hormonas, radiación UV, isquemia, citocinas como la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral, choque osmótico y choque térmico (Garrington y Johnson, 1999; Qi y Elion, 2005-II). Los módulos de MAPK p38 también están ligados a proteínas de andamiaje que incluyen a JIP2, JIP4 y la proteína OSM recientemente descrita, que interactúa con el citoesqueleto de actina.

1.3 Proteínas de andamiaje para las vías de MAPK en levaduras

Ste5 es un andamio para el módulo de MAPK de respuesta a feromona (Fig. 2a). Mediante el análisis por doble híbrido, se ha demostrado que distintas regiones de Ste5p unen a Ste11p, Ste7p, Fus3p y Ste4p. Estos hallazgos predicen que Ste5p asocia $G\beta\gamma$ con la regulación de la vía de apareamiento mediada por MAPK. Así, está claro que por medio de la unión de las cinasas de la vía de apareamiento mediada por MAPK, Ste5p funciona organizando un complejo multicomponente de señalización que permite la regulación de la señal del complejo $G\beta\gamma$ y, por tanto, la regulación de la respuesta a feromona (Breitkreutz y Tyers, 2006).

Un segundo ejemplo de la organización de los módulos de MAPK por medio de las proteínas de andamiaje es la vía de respuesta a alta osmolaridad de *S. cerevisiae*. Esta vía de respuesta osmosensible incluye Sho1 (un osmosensor), Ste11p (la misma MKKK empleada en la vía de apareamiento), Pbs2p (una MKK) y Hog1p (una MAPK). Pbs2p también actúa como un andamio, uniendo Sho1p, Ste11p y Hog1p (Fig. 2b). A pesar del uso común de Ste11p en ambos módulos de MAPK, no existe intercomunicación entre las dos vías. La razón de esto es que Pbs2p es un andamio que une a Ste11p y regula selectivamente su activación por Sho1p, y Ste5p controla la activación de Ste11p por el complejo $G\beta\gamma$. Por tanto, las proteínas de andamiaje permiten el uso común de una MKKK en la activación diferencial por estímulos corriente arriba y regulan las distintas MKK-MAPKs corriente abajo (Qi y Elion, 2005-II).

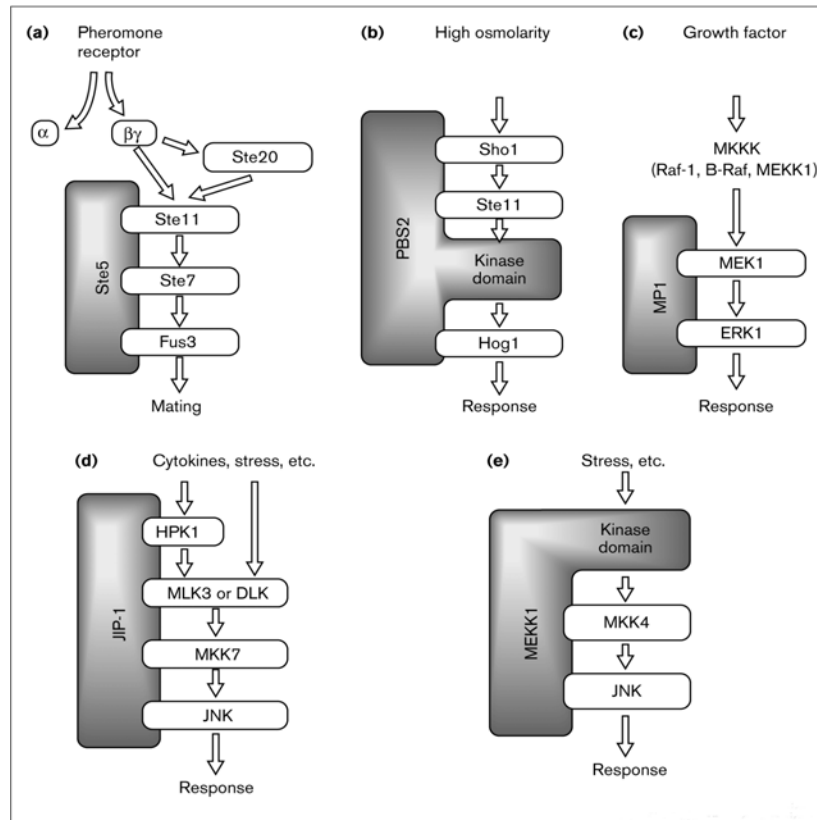


Fig. 2 Proteínas de andamiaje. La proteína de andamiaje para cada ejemplo está sombreada **(a)** Vía de respuesta a feromona. **(b)** Vía de respuesta a alta osmolaridad. **(c)** Vía de respuesta a factor de crecimiento. **(d)** Vía de respuesta a citocinas. **(e)** Vía de respuesta a estrés. Los módulos de a y b son de levadura y los de c, d y e son de mamíferos. (Tomado de Garrington y Johnson, 1999)

1.4 Proteínas de andamiaje para las vías de MAPK en mamíferos

En 1998, fue identificada una proteína nombrada MP1 (compañero 1 de MEK) que parecía ser una proteína de andamiaje para la vía de cinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Garrington y Johnson, 1999). Se encontró que MP1 unía específicamente MEK1 (una MKK) y ERK1 (una MAPK) (Fig. 2c). Cuando se sobreexpresa en células COS, MP1 aumenta la activación de ERK1. La predicción es que MP1 funciona incrementando la eficiencia de la activación de MKKK de la vía MEK1-ERK1. La MKKK predominante en esta vía es Raf-1 o B-Raf, aunque MEKKK1 también contribuye en la activación de ERK.

Una segunda proteína de andamiaje de mamífero es JIP-1 (proteína-1 reactiva a cinasa Jun amino-terminal [JNK]). Se encontró que JIP-1 une a la cinasa-1 progenitora hematopoyética (HPK-1), un homólogo de Ste20p que funciona como una MKKKK (Garrington y Johnson, 1999). JIP-1 también une a MLK3 y DLK, miembros del grupo de cinasas MKKKs de linaje mixto (MLK), y a MKK7, una

MKK conocida en la vía JNK (Fig. 2d). La coexpresión de JIP-1 con estos miembros de componentes corriente arriba de la vía JNK mediada por MAPK, aumentan la activación de JNK. En conjunto, estos resultados implican que JIP-1 es un andamio que une una MKKKK, una MKKK y una MKK para la regulación selectiva de la activación de JNK.

MEKK1 es una proteína grande (196 kDa) que funciona en las vías de JNK y ERK. Se ha mostrado que MEKK1 interactúa con MKK4, su sustrato en el módulo de MAPK de JNK. MEKK1 también une directamente a JNK, la MAPK corriente abajo de MKK4. Por tanto, MEKK1 puede funcionar como una MKKK que une una MKK específica (MKK4) y una MAPK (JNK) (Fig. 2e). Se ha mostrado que dos MKKKKs fosforilan MEKK1, HPK-1 y la cinasa reactiva a Nck (NIK) (Garrington y Johnson, 1999). Los hallazgos son consistentes con que MEKK1 sea un andamio MKKK en la regulación de la vía JNK.

2 Vía de respuesta a feromona sexual de levadura

Todas las células eucarióticas usan redes de transducción de señales para responder de formas específicas a las señales externas provenientes del ambiente, y para coordinar los complejos cambios celulares al nivel del metabolismo, la expresión génica, la división celular, la morfología y el destino de la célula. El proceso de apareamiento en *S. cerevisiae* es uno de los ejemplos mejor estudiados de respuesta celular a una señal externa. Las células haploides se estimulan mutuamente por medio de la secreción de hormonas peptídicas que se unen a receptores de la superficie celular de células del sexo opuesto. La unión de la feromona al receptor estimula varias respuestas celulares, que incluyen cambios globales en la transcripción, arresto del ciclo celular en fase G1 y morfogénesis polarizada. Estas respuestas le permiten a las células individuales sincronizar sus ciclos celulares, elongarse y formar una proyección, para posteriormente unirse y fusionarse con una célula compañera, generando así un cigoto diploide que finalmente entrará de nuevo al ciclo mitótico. Una cascada de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), unida al receptor asociado a proteína G, media todas las respuestas a feromona (Fig. 3). Los elementos básicos de una cascada de MAPK son tres proteínas cinasas activadas secuencialmente, nombradas de acuerdo con la última cinasa de la cascada. La vía de apareamiento incluye una cinasa de tipo PAK (proteína cinasa p21-activada), Ste20p, una MAPKKK, Ste11p, una MAPKK, Ste7p, y dos MAPKs, Fus3p y Kss1p de las cuales Fus3p es la cinasa crítica. Un objetivo principal de las MAPKs es el factor de transcripción Ste12p, que incrementa la expresión de más de 200 genes para mediar las distintas respuestas (Elion, 2000).

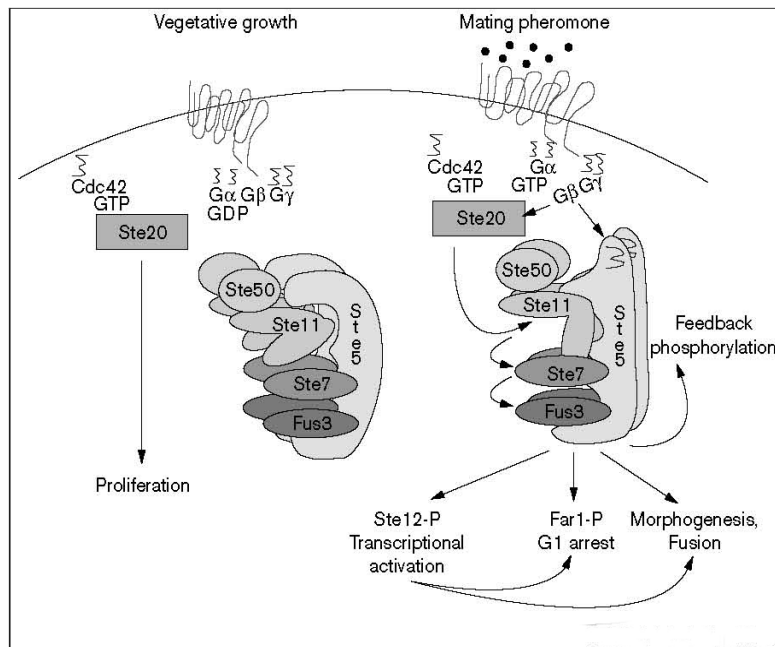


Fig. 3 Ilustración del mecanismo de activación para la vía de respuesta a feromona. (Tomado de Elion, 2000)

Muchos de los componentes de la vía de respuesta a feromona son empleados por otras tres cascadas de MAPK. Ste20p y Ste11p funcionan en la vía de respuesta a alta osmolaridad que les ayuda a las células a sobrevivir a estrés osmótico. Ste20p, Ste11p, Ste7p, Kss1p y Ste12p son empleadas por la vía de crecimiento invasivo que promueve la alimentación bajo escasez de nutrientes, y por la vía de crecimiento vegetativo, que promueve la integridad de la pared celular en paralelo a la vía de la proteína cinasa C. Esta cascada básica de MAPK está elaborada por componentes de señalización específicos a feromona que incluyen receptores de feromona (Ste2p y Ste3p), proteínas G (Gpa1p, Ste4p, Ste18p), un andamio para la cascada de MAPK (Ste5p), y una MAPK especializada (Fus3p) que promueve la respuesta a feromona. La especificidad adicional de la vía se logra por la prevención de la intercomunicación de las MAPKs (Elion, 2000).

Ste5p es un andamio para la cascada de MAPK que sujeta a las cinasas Ste11p, Ste7p y Fus3p formando un complejo molecular de alto peso, que es esencial para la activación de las tres cinasas, inducida por feromona. Recientemente se han descrito numerosos análogos de Ste5p, que sugieren un amplio uso de las proteínas de tipo andamio en la regulación de las cascadas de MAPK (Elion, 2000).

Las células que se aparean perciben la dirección de la fuente de feromona de un compañero del sexo opuesto y sufren crecimiento polarizado, formando una proyección hacia la fuente. A esta respuesta se le denomina quimiotropismo y se piensa que involucra la generación de una frontera interna que refleja el eje de la señal externa de feromona y anula las pautas espaciales internas que normalmente controlan la formación de brotes (Elion, 2000). La formación de las proyecciones es mediada por el citoesqueleto de actina y por muchas otras proteínas que normalmente controlan la emergencia del brote, generando una organización asimétrica del citoesqueleto, el sistema secretor, la membrana plasmática y la pared celular a lo largo del eje definido por la fuente de feromona.

La formación de la proyección es controlada en parte por la MAPK Fus3p con una pequeña contribución de la MAPK Kss1p. Las MAPKs de apareamiento activan una variedad de genes requeridos para la morfogénesis, que incluyen componentes de la vía de la proteína cinasa C que regula la remodelación de la pared celular y la supervivencia (Elion, 2000). La capacidad de Fus3p para promover la morfogénesis está fuertemente asociada con su propiedad para promover el arresto eficiente en G1, mostrando que ambos procesos están acoplados. Dicho acoplamiento probablemente esté ligado a Far1p, un sustrato bifuncional de Fus3p que promueve el arresto en G1 por medio de la inhibición de la cinasa dependiente de ciclina G1 y que ayuda a establecer el sitio de crecimiento polarizado.

Se piensa que el quimiotropismo surge de la formación de fronteras localizadas que consisten de subunidades de proteínas G activadas por un receptor, en los que las subunidades G $\beta\gamma$ se unen a efectores involucrados en la morfogénesis y estabilizan el eje de polaridad en dirección a la fuente de feromona. Los hallazgos recientes sugieren que la frontera podría ser un complejo estable del receptor y las subunidades $\alpha\beta\gamma$ de la proteína G. Se ha mostrado que G $\beta\gamma$ activada localmente recluta posteriormente un complejo de proteínas de establecimiento de polaridad que incluyen a

Far1p, Cdc24p, Cdc42p y Bem1p (Fig. 4). Al igual que Ste5p, Far1p se une a G β por medio de un dominio RING-H2 y sirve como andamio para Cdc24p, Cdc42p y Bem1p, uniéndolas a G β . Posteriormente, Cdc42-GTP activada localmente se presume que une efectores tales como Ste20p, Bni1p, Gic1p y Gic2p para regular el citoesqueleto (Elion, 2000).

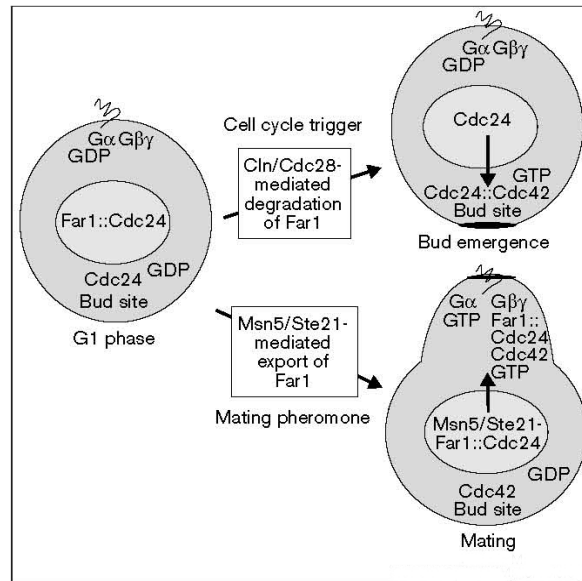


Fig. 4 Far1p nuclear secuestra Cdc24p en el núcleo y previene su acceso a la periferia celular. (Tomado de Elion, 2000)

3 La proteína de andamiaje Ste5p de *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 Generalidades

El primer andamio de MAPK en ser descrito fue la proteína Ste5 (i.e. Ste5p), que se asocia con la proteína G, MAPKKK, MAPKK, y MAPK de la vía de apareamiento. A partir de su descubrimiento, se han descrito varios análogos de Ste5p en levaduras y mamíferos.

Muchos de los componentes de la cascada de MAPK de apareamiento son empleados en otras cascadas de MAPK. Ste20p y Ste11p se usan en la vía de alta osmolaridad/glicerol (HOG) para ayudar a las células a sobrevivir al estrés osmótico. Ste20p y Ste11p también se emplean junto con la MAPKK Ste7p y la MAPK Kss1p tanto en la vía de crecimiento invasivo como en la de desarrollo de pseudohifas para promover la recolección de alimento durante la escasez de nutrientes en haploides y diploides y en la vía de crecimiento vegetativo estéril (SVG) que promueve la integridad de la pared celular (Elion, 2001) (Fig. 5).

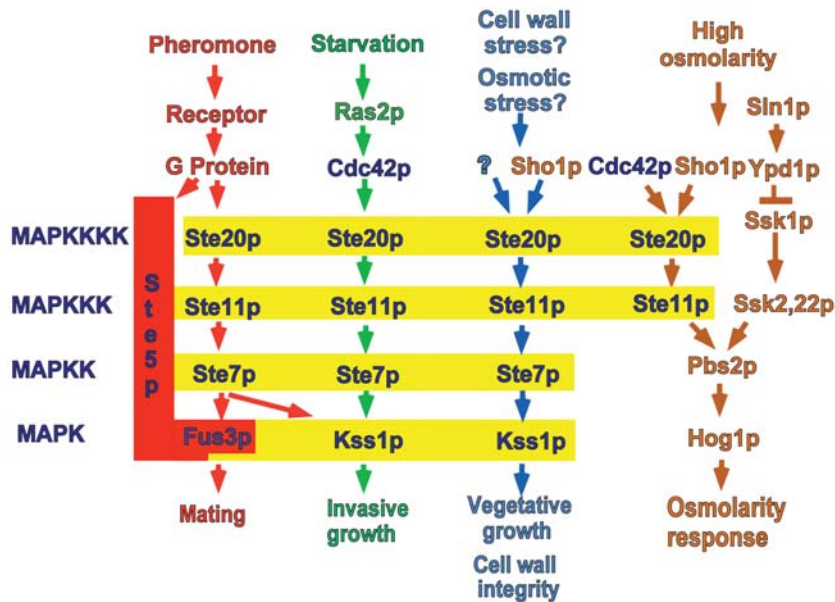


Fig. 5 Diversas cascadas de MAP cinasas emplean componentes compartidos para regular el crecimiento y la diferenciación en *S. cerevisiae*. (Tomado de Elion, 2001)

Por otra parte, los experimentos genéticos han demostrado que Ste5p es esencial para la transducción de la señal de la vía de feromona. Los primeros mutantes *ste5* fueron aislados de tamices genéticos para mutantes incapaces de aparearse o sufrir arresto en fase G₁ en presencia de feromona. Subsecuentes clonaciones del gen *STE5* y análisis de cepas que abrigan mutaciones *ste5* nulas demostraron que la proteína Ste5p regula positivamente el apareamiento. A pesar de

que la secuencia de aminoácidos predicha de Ste5p no fue informativa respecto a la definición de su funcionamiento, las pruebas de epistasia ofrecieron evidencia funcional concreta de su papel esencial en la señalización e indicaron que funciona entre Ste20p y Ste11p en la cascada de MAPK (Elion, 2001).

3.1.1 Ste5p como un andamio para la cascada de MAPK. Se postula a Ste5p como un andamio para la cascada de MAPK de acuerdo con las siguientes evidencias: Primero, Ste5p se asocia selectivamente con Ste11p, Ste7p y Fus3p. Segundo, Ste5p se une a las cinasas de la cascada de MAPK por medio de sitios de unión diferenciados. Tercero, Ste5p une simultáneamente a las cinasas (Elion, 2001).

Ste5p no es un andamio pasivo; desempeña una función directa en la activación de la MAPKKK Ste11p. Varias líneas de evidencia han sugerido que la unión de Ste5p a Ste11p es esencial para su activación por feromona. Ste5p es requerida para la completa actividad basal de mutantes Ste11p hiperactivos, mientras que la subunidad G β Ste4p no lo es. Ste5p se asocia con el dominio regulatorio N-terminal de Ste11p, y en un gradiente de glicerol, Ste11p cosedimenta en un mayor porcentaje con Ste5p que con Ste7p o Fus3p. Estudios más recientes de hecho sugieren que Ste5p desempeña dos funciones en la activación de Ste11p: (1) la localización de Ste11p junto a la MAPKKK Ste20p en la corteza celular; y (2) el control alostérico de Ste11p o de las otras cinasas asociadas (Elion, 2001).

3.1.2 Reclutamiento de Ste5p hacia G $\beta\gamma$ (Ste4p/Ste18p) en la membrana plasmática. La subunidad G β (Ste4p) de la proteína G heterotrímica transduce la señal de la feromona por medio de la unión de Ste5p además de Ste20p (Fig. 6). En presencia de feromona, Ste4p se une a Ste20p a través de un dominio C-terminal en Ste20p. Ste4p también se une a Ste5p a través de un dominio RING-H2 en Ste5p, y esta interacción también es dependiente de feromona. Evidencia genética sugiere que Ste4p se une a Ste20p y a Ste5p por medio de dominios distintos, sugiriendo la posibilidad de que un solo dímero G $\beta\gamma$ pueda simultáneamente reclutar Ste20p y Ste5p (Elion, 2001). Ambas interacciones son esenciales para la activación inducida por feromona de Ste11p.

Hallazgos adicionales apoyan la evidencia de que la subunidad G β del dímero G $\beta\gamma$ (que consta de Ste4p y de Ste18p) recluta tanto a Ste20p como a Ste5p en presencia de feromona y que estas interacciones se requieren para que Ste20p active Ste11p (Fig. 6). El dímero G $\beta\gamma$ parece unirse a Ste20p que se encuentra en la corteza celular debido a su interacción con Cdc42p-GTP, porque esta interacción se requiere para la transmisión eficiente de la señal inducida por la subunidad G β Ste4p. En contraste, Ste5p parece ser reclutada rápidamente hacia la membrana plasmática por el estímulo de feromona (Elion, 2001).

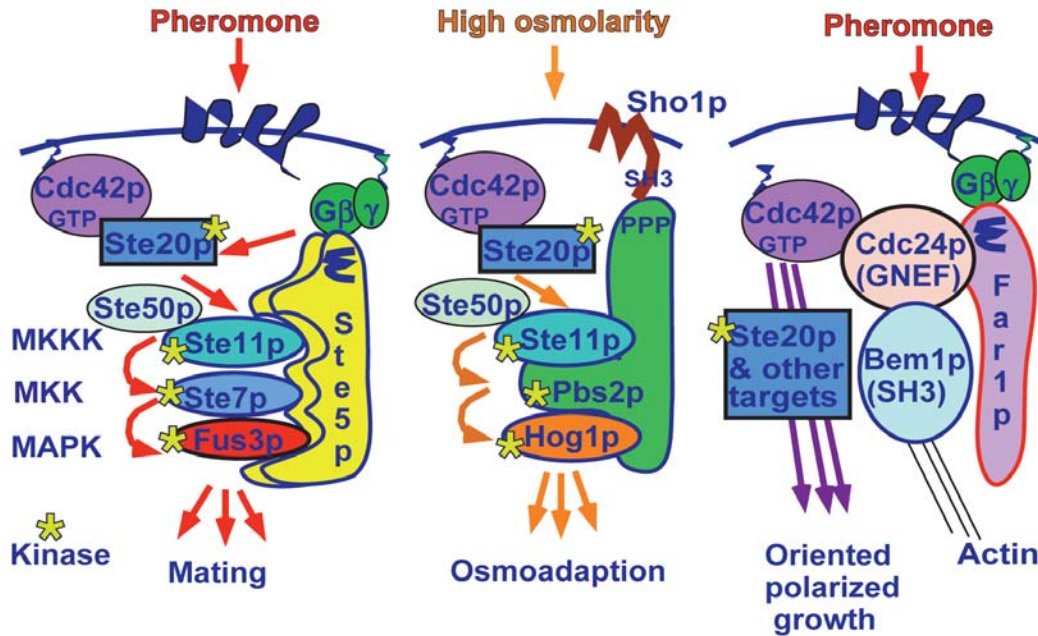


Fig. 6 Ilustración de las proteínas de andamiaje Ste5p, Pbs2p y Far1p y los procesos en los que participa cada una en la levadura. (Tomado de Elion, 2001)

3.1.3 Oligomerización y cambios conformacionales. Ste5p se asocia consigo misma a través de dos dominios: el dominio RING-H2, que se une al dímero $G\beta\gamma$; y el dominio distal que se superpone con el "zipper" potencial de leucina y el sitio de unión de Ste11p. El dominio RING-H2 de Ste5p pertenece a una familia de dominios de unión de Zn ricos en cisteína que se homooligomerizan y promueven el ensamblaje de estructuras macromoleculares. La mutación del dominio RING-H2 interfiere simultáneamente con su capacidad de oligomerizarse y asociarse con $G\beta\gamma$ (Elion, 2001). Por tanto, un gran complejo que consiste de un dímero Ste5p y dos moléculas de Ste11p, Ste7p y Fus3p se transloca en conjunto hacia la membrana plasmática.

Varias líneas de evidencia indirecta sugieren que Ste5p regula positivamente la actividad de las cinasas asociadas independientemente de su capacidad para reclutarlas hacia Ste20p en la membrana plasmática. Estudios recientes sostienen que Ste5p regula directamente la actividad de las cinasas asociadas, al producir cambios conformacionales. Estos resultados condujeron a la interesante propuesta de que Ste5p existe como un dímero de hebras paralelas o como un dímero de hebras antiparalelas, y que la unión del dímero $G\beta\gamma$ altera la conformación de cualquiera de las estructuras cerradas de forma que Ste20p, Ste11p, Ste7p y Fus3p se alinean óptimamente para la fosforilación en serie (Fig. 7) (Elion, 2001).

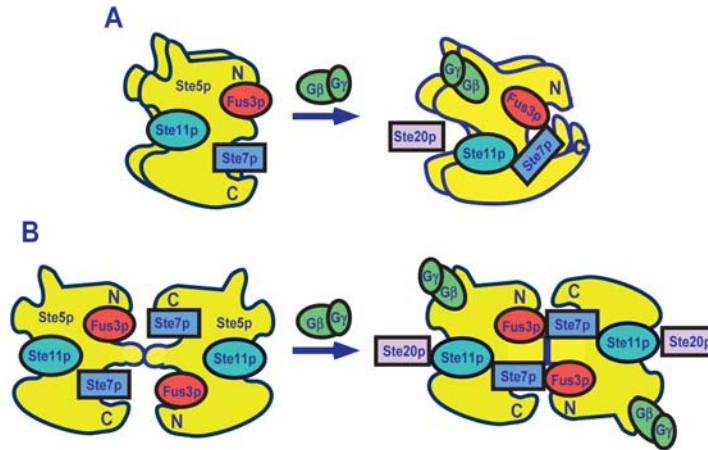


Fig. 7 Modelos conformacionales de Ste5p. Estos son dos modelos que muestran cómo es que la unión de Gβγ a Ste5p induce un cambio conformacional ya sea como **(A)** un dímero plegado o como **(B)** un dímero antiparalelo que se forma por medio de interacciones entre las mitades N- y C-terminales de Ste5p. (Tomado de Elion, 2001)

3.1.4 Modelo de oligomerización para el reclutamiento. Un modelo alternativo propone que Ste5p existe como dos formas: como un monómero o dímero menos activo, plegado o cerrado en el que el dominio RINGH-H2 no está disponible para unir Gβγ y la señalización basal es reprimida (Fig. 8A); y como un dímero abierto activo de hebras paralelas (Fig. 8B) en el que el dominio RING-H2 se une a Gβγ y las interacciones que involucran las porciones N- y C-terminal generan la formación de multímeros de punta a punta (Fig. 8C).

Se necesita más trabajo para aclarar la naturaleza del oligómero Ste5p y su relación con el reclutamiento y la transmisión de la señal.

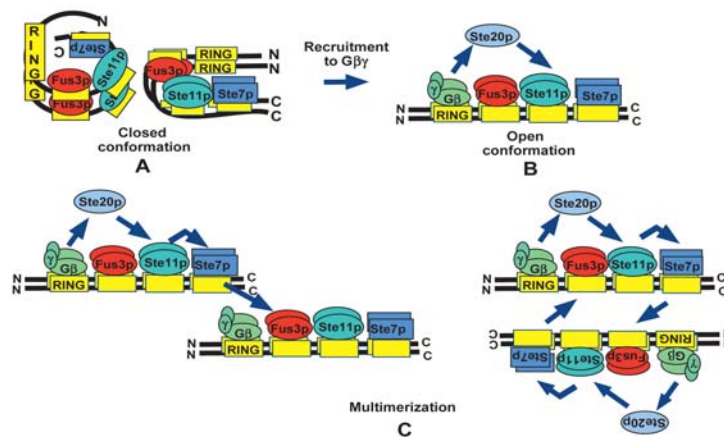


Fig. 8 Modelo de oligomerización y reclutamiento de Ste5p Un modelo alternativo, en el que el dímero Ste5p forma oligómeros de mayor orden por su unión a Gβγ. (Tomado de Elion, 2001)

3.1.5 Traslado nuclear de Ste5p y enlaces en la activación de la vía. El reclutamiento de Ste5p a Gβγ en la membrana plasmática es regulado e involucra el lanzamiento previo de Ste5p desde el núcleo. La carga citoplásmica de Ste5p se traslada continuamente por el núcleo, y el lanzamiento nuclear requiere del receptor de importación Kap95p (Rsl1p) y del receptor de exportación Msn5p (Ste21p) (Elion, 2001). La feromona induce la exportación nuclear de Ste5p.

3.1.6 Interacciones entre Ste5p y reguladores de la morfogénesis polarizada. Las células que se aparean detectan la dirección de la fuente de feromona y sufren un crecimiento polarizado hacia ella, formando una proyección en forma de pera, mediante un proceso llamado quimiotropismo. Esto es mediado por el citoesqueleto de actina y por muchas otras proteínas que controlan normalmente la emergencia del brote. En presencia de feromona, Far1p funciona parecida al andamio Ste5p y se une a Gβγ por medio de un dominio RING-H2 homólogo y también se une a Cdc24p. Cdc24p se une tanto a Cdc42p como a Bem1p, ésta última proteína ayuda a localizar las proteínas de establecimiento de la polaridad en el citoesqueleto de actina (Fig. 9).

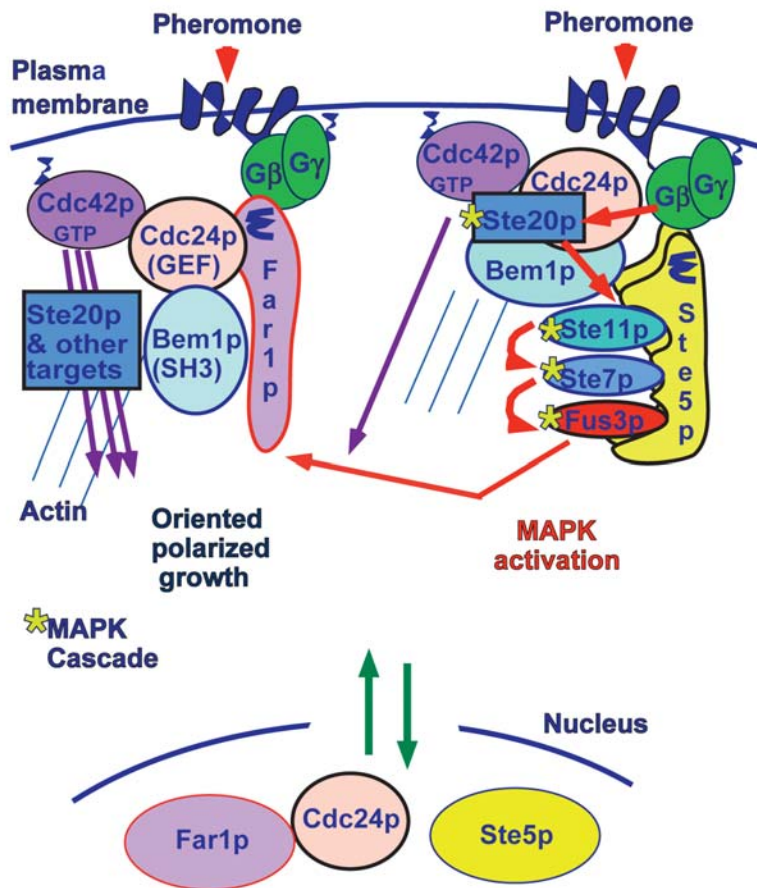


Fig. 9 Interacciones entre Far1p y Ste5p. (Tomado de Elion, 2001)

A pesar de que la evidencia genética sostenga que Cdc24p (un factor de intercambio de nucleótido de guanina [GNEF]), Cdc42p (una proteína G), Ste20p, y Bem1p (una proteína de adaptación) promuevan el crecimiento polarizado independientemente de la cascada de MAPK de apareamiento, está claro que la respuesta morfogénica requiere de suficiente señalización a través de la cascada de MAPK (Elion, 2001). El reclutamiento de Ste5p, al igual que las proteínas de morfogénesis, es asimétrico y enriquecido en los sitios de crecimiento y sugiere que la maquinaria de localización refuerza las vías que conducen hacia la localización activada de la cascada de MAPK y probablemente también localice Fus3p hacia sustratos relevantes (tales como Far1p).

3.1.7 Ste5p y la especificidad de la vía. Existen varias hipótesis respecto a la especificidad: que recae en el nivel de la unión selectiva de Ste5p a la MAPK Fus3p, en la localización de la MAPK Fus3p hacia objetivos específicos, en el mantenimiento de Fus3p en un estado de alta actividad específica o en la capacidad de restringir las cinasas al sitio de la activación de la vía. Actualmente, no existe evidencia que apruebe o desapruebe alguna de estas posibilidades (Elion, 2001).

Cierta evidencia indica que la activación de Fus3p, y no Kss1p, determina si las células se aparean (Elion, 2001). Es posible que Ste5p ayude a localizar Fus3p hacia sus sustratos, dado que sus patrones de localización se traslapan.

Otro modo en el que Ste5p pueda promover la especificidad de la vía es previniendo la activación de las cinasas que participan en otras vías (Elion, 2001).

3.2 Dominios de Ste5p

3.2.1 Dominio RING-H2. El andamio Ste5p activa una cascada asociada de proteína cinasa activada por mitógeno por la unión a través de su dominio RING-H2 (Fig. 10) a un dímero G β γ (Ste4p/Ste18p) en la membrana plasmática en un evento de reclutamiento que requiere el lanzamiento nuclear previo de Ste5p. La evidencia genética sugiere que Ste5p se debe oligomerizar para funcionar, pero se desconoce su impacto en la función y la localización. La mayoría de Ste5p es monomérica, lo que sugiere que la oligomerización está estrechamente regulada. El incremento en la cantidad de oligómeros de Ste5p incrementa la asociación con Ste11p. Notablemente, los oligómeros de Ste5p también son exportados más eficientemente desde el núcleo, retenidos en el citoplasma por Ste11p y mejor reclutados hacia la membrana plasmática, lo cual resulta en la activación constitutiva de la cascada de apareamiento de proteína cinasa activada por mitógeno (Elion, 2001). Los ensayos de coprecipitación muestran que el dominio RING-H2 es la clave determinante para la oligomerización. Los análisis mutacionales sugieren que el dominio rico en leucina limita la accesibilidad del dominio RING-H2 e inhibe la exportación y el reclutamiento además de promover la asociación de Ste11p y su activación (Wang

y Elion, 2003). Otros resultados sugieren que la forma principal de Ste5p es un monómero inactivo con un dominio RING-H2 y un sitio de unión de Ste11p inaccesibles, mientras que la forma activa es un oligómero que se exporta y recluta más eficientemente y tiene un dominio RING-H2 y un sitio de unión de Ste11p más accesibles.

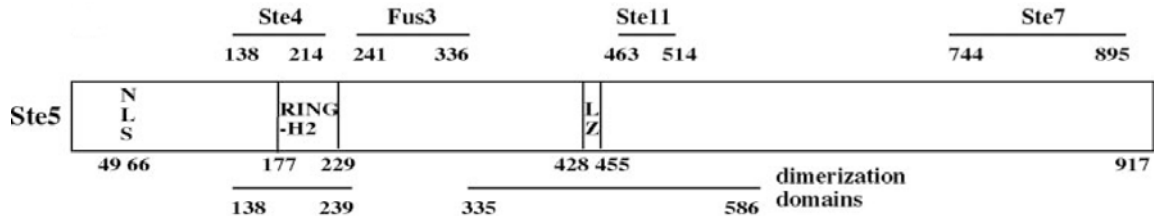


Fig. 10 El dominio RING-H2 es esencial para la oligomerización completa de Ste5p. Ilustración de Ste5p y las proteínas con las que interactúa. NLS, señal de localización nuclear; LZ, "zipper" de leucina. (Tomado de Wang y Elion, 2003)

3.2.2 Dominio PM/NLS. Se ha identificado un motivo en la porción N-terminal de Ste5p (el dominio PM/NLS) que se une a membranas ácidas de fosfolípidos (Winters *et al.*, 2005), dicho dominio refleja una propensión a formar una α hélice anfipática. Aunque distinto del dominio de unión a $G\beta\gamma$, el dominio PM/NLS se requiere para que Ste5p se una a $G\beta\gamma$ en la membrana plasmática y, de ahí, medie las respuestas de señalización a feromona (Fig. 11). Así, se ha propuesto que el reclutamiento en membrana de Ste5p se requiere para el efecto cooperativo de dos interacciones separadas débiles: una interacción Ste5p- $G\beta\gamma$ y una interacción Ste5p-membrana.

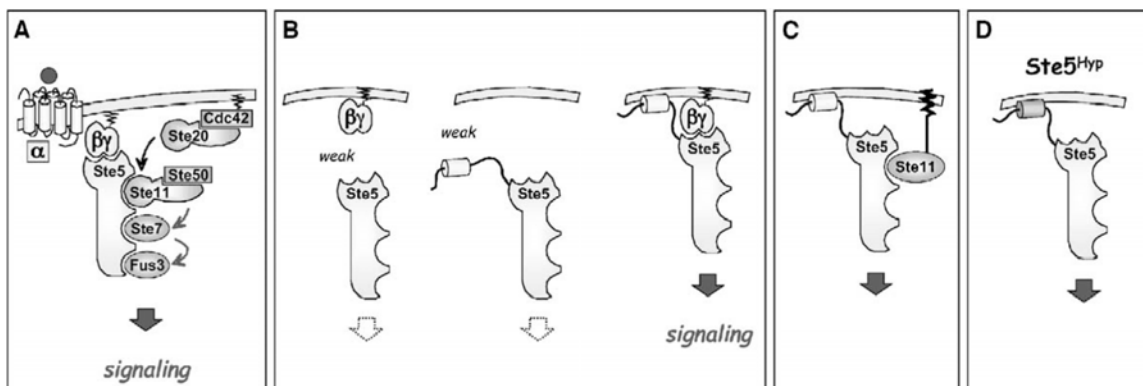


Fig. 11 Modelo de la función de unión a membrana en la localización y señalización de Ste5p. Para mayor claridad algunos componentes de la vía se han omitido en las viñetas (B)-(D). **(A)** Modelo original del reclutamiento en membrana de Ste5p desencadenado por $G\beta\gamma$. **(B)** Reclutamiento de Ste5p en membrana que requiere de la cooperación de una interacción débil de Ste5p- $G\beta\gamma$ y una interacción débil de Ste5p-membrana. El cilindro denota la α -hélice anfipática putativa formada por el dominio PM/NLS. **(C)** La interacción en membrana de Ste5p también puede ocurrir a la par de la interacción Ste5p-Ste11p en células con Ste11p sujeta a membrana. **(D)** Mutantes hiperactivos de Ste5p con dominios PM/NLS de mayor afinidad a membrana. (Tomado de Winters *et al.*, 2005)

La unión débil a membrana claramente es ventajosa, ya que una unión más fuerte por el dominio PM/NLS de Ste5p causa una señalización no regulada. Los dominios PH individuales pueden tener interfaces separadas de unión a lípidos y de unión a proteínas que actúan en concierto para gobernar la localización subcelular.

También se ha propuesto que la regulación de la señalización de Ste5p involucra cambios en la localización, conformación y oligomerización de Ste5p.

Por otra parte, se ha mostrado que el dominio PM/NLS de Ste5p gobierna la localización tanto en la membrana plasmática como en el núcleo. En estudios previos, se ha propuesto que el traslado nuclear de Ste5p se requiere para su reclutamiento en membrana, basado ampliamente en los fenotipos de mutaciones de acción *cis* que interrumpen el traslado nuclear pero que en retrospectiva también parecen interrumpir la unión directa a membrana por Ste5p (Winters *et al.*, 2005). Además, Ste5p se recluta pobremente en la membrana si se secuestra en el núcleo. La localización nuclear puede ayudar a minimizar el contacto membranal promiscuo al reducir las concentraciones citoplásmicas de Ste5p, y varias observaciones sugieren que el secuestro nuclear de Ste5p es inhibitorio. Notablemente, la localización nuclear de Ste5p no se requiere para propagar la señal al núcleo, porque el atrapar a Ste5p en la membrana plasmática no interrumpe la señalización (Winters *et al.*, 2005). En cambio, Fus3p parece acarrear la señal al núcleo después de la activación en Ste5p localizada en membrana.

Interesantemente, los motivos de localización de doble función no son únicos de Ste5p, ya que recientemente se reportaron dos ejemplos relacionados: uno en el factor de transcripción Opi1p de *S. cerevisiae* y otro en el factor de citocinesis Mid1p de *S. pombe* (Winters *et al.*, 2005).

3.2.3 Dominio PH. Ambas bases de datos PFAM y BLAST CDD predicen un dominio PH (homología a pleckstrina, residuos 400-512) en Ste5p de *S. cerevisiae* (Garrenton *et al.*, 2006) (Fig. 12). Este elemento se encuentra en una región un poco más grande (residuos 388-512) que está altamente conservada entre la Ste5p de *S. cerevisiae* y sus ortólogos en otras especies de *Saccharomyces* e incluso en levaduras más alejadas filogenéticamente. (Fig. 13A) Este segmento posee las secuencias específicas encontradas en los dominios PH bien caracterizados, a pesar de que los dominios PH en general pueden compartir poca identidad de aminoácidos de 10%-15% (Fig. 13B). A pesar de la poca similitud de secuencia, todos los dominios PH auténticos adoptan un plegamiento proteico característico, que consiste de un sándwich de β -hebras que terminan con una α -hélice C-terminal (Garrenton *et al.*, 2006).

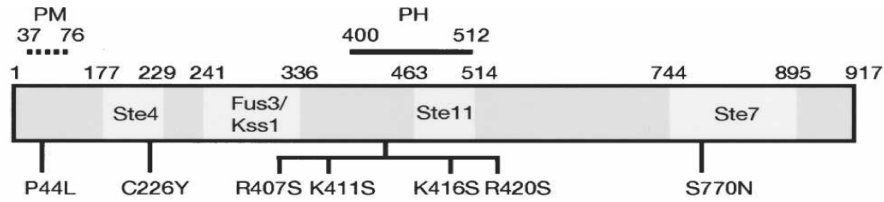


Fig. 12 Estructura primaria de Ste5p. (Áreas claras) Regiones implicadas en la unión de las proteínas indicadas; (línea punteada) localización del motivo PM; (línea sólida) localización del dominio PH. (Tomado de Garrenton *et al.*, 2006)

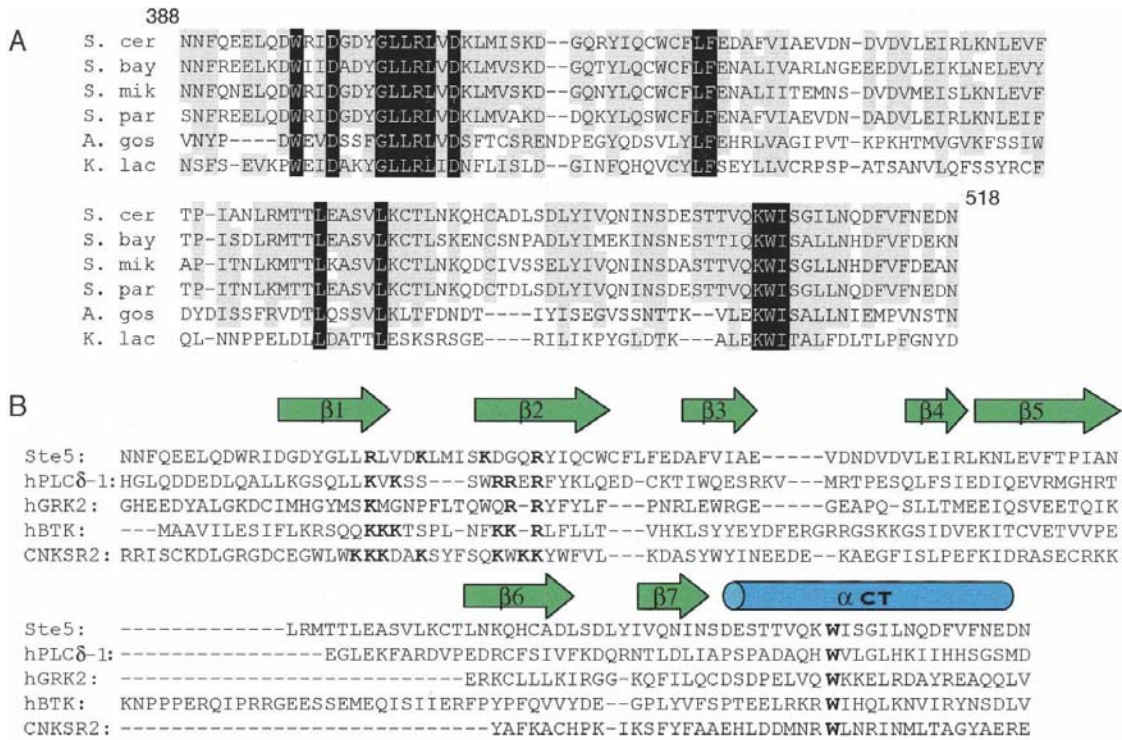


Fig. 13 Análisis de secuencias y análisis del dominio PH de Ste5p de *Saccharomyces cerevisiae*. **(A)** Alineamiento del dominio PH de Ste5p de *S. cerevisiae* (residuos 388-518) con las correspondientes secuencias de ortólogos en *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Ashbya gossypii*, y *K. lactis*. **(B)** Alineamiento del dominio PH de Ste5 de *S. cerevisiae* con algunos dominios PH de mamífero. Elementos de estructura secundaria (flechas verdes, β -hebras; cilindros azules, α -hélices). Los residuos básicos del "loop" β 1- β 2 y Trp conservado de la hélice C-terminal están resaltados (negritas). (Tomado de Garrenton *et al.*, 2006)

La acción coordinada de $G\beta\gamma$, el motivo PM —una α -hélice anfipática N-terminal de unión a membrana—, y el dominio PH se requiere para el reclutamiento estable de Ste5p en la membrana plasmática y para la activación robusta de la vía (Fig. 14).

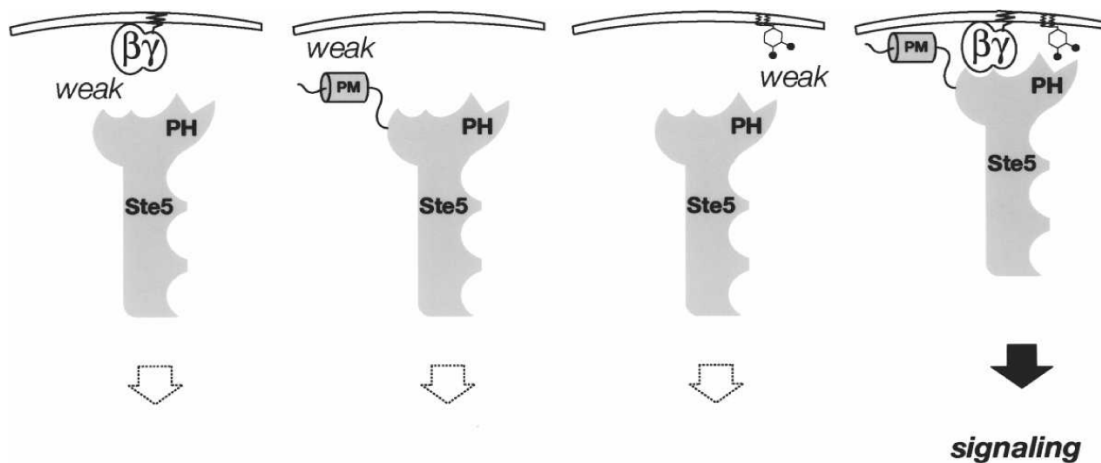


Fig. 14 Requerimiento del dominio PH para el anclaje a membrana y señalización de Ste5p. La acción coordinada de Gβγ, el motivo PM, y el dominio PH se requiere para el reclutamiento estable de Ste5p en membrana y la activación robusta de la vía. (Tomado de Garrenton *et al.*, 2006)

3.2.4 Dominio de Unión a Ste7p. Mediante la aplicación de la técnica de tamiz génico localizado en *STE5* se han identificado repetidamente mutaciones recesivas en un residuo conservado, E756, en el dominio de unión a Ste7p que causan la activación errónea de la vía de MAPK de filamentación por la señalización de la feromona (Schwartz y Madhani, 2006). Las células mutantes exhiben un incremento en el patrón de activación de MAPK tal que la MAPK Kss1p de filamentación se activa predominantemente en respuesta a feromona (Fig. 15). Los estudios de velocidad de sedimentación muestran que el andamio mutante es defectuoso en la unión a una subpoblación fosforilada de Ste7p. Ciertos resultados sugieren que la disociación incrementada de la cinasa activada Ste7p por el andamio mutante puede causar el incremento observado en la activación de la MAPK Kss1p en vez de Fus3p y la pérdida de especificidad resultante. La intercomunicación en células *ste5-E756G* se debe a la activación incrementada de Kss1p y a la reducida degradación dependiente de Fus3p del factor de transcripción Tec1p de la vía de filamentación (Schwartz y Madhani, 2006). Estos resultados demuestran una función para un andamio endógeno en la especificidad de la señalización.

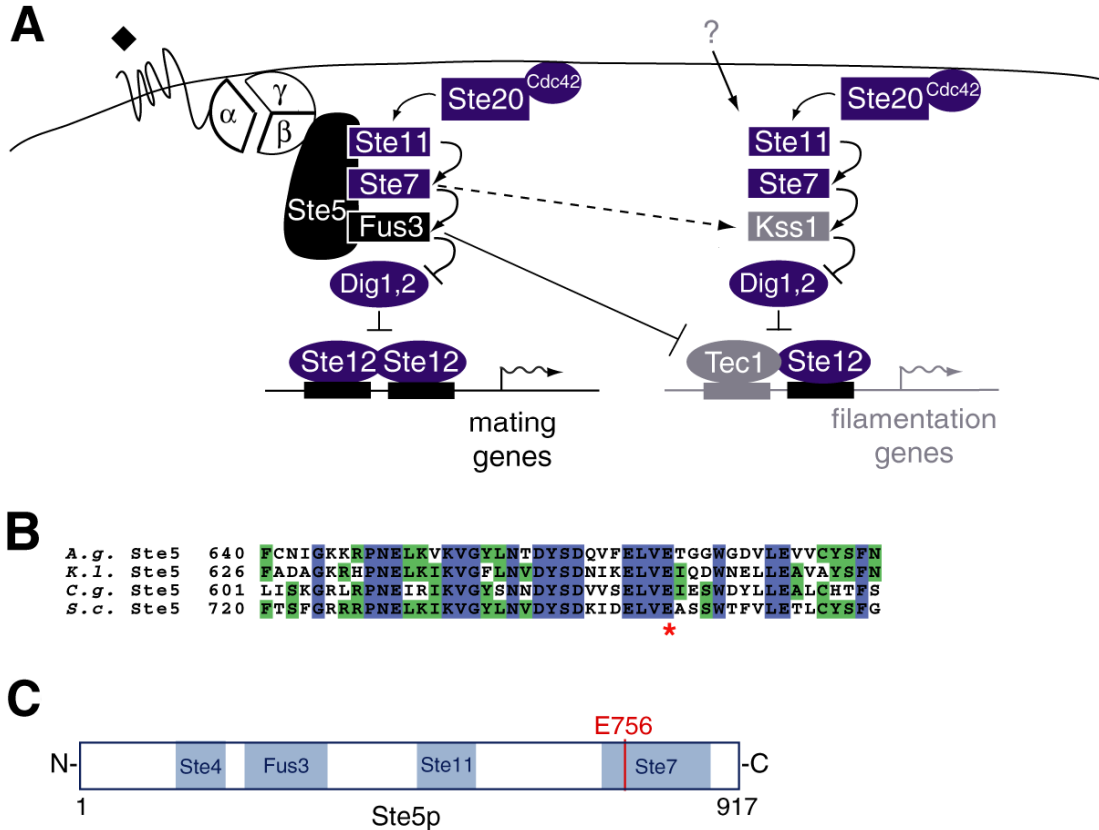


Fig. 15 (A) Diagrama de las vías de MAPK de apareamiento y filamentación en *S. cerevisiae*. Los componentes específicos del apareamiento se muestran en *negro*, los componentes específicos de la filamentación en *gris*, y los componentes compartidos en *azul*. **(B)** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de homólogos de Ste5p de cuatro especies de levaduras de ascomicetos. La mostrada es una porción del dominio de unión de Ste7p de los homólogos. *S.c.* *Saccharomyces cerevisiae*, *C.g.* *Candida glabrata*, *K.l.* *Kluyveromyces lactis*, *A.g.* *Ashbya gossypii*. E756 de *S. cerevisiae* está marcada con un asterisco. **(C)** Arquitectura del dominio de Ste5p, se indica la localización aproximada del residuo E756. (Tomado de Schwartz y Madhani, 2006)

Antes de la inducción, Ste7p se une al andamio, pero se puede disociar con una rapidez moderada. Una vez que Ste7p se ha activado, raramente se disocia porque está en una conformación que se une de manera diferente a Ste5p. Este modo de unión distinta requiere de contactos entre E756 y Ste7p. La mutante *ste5-E756G* tiene una afinidad similar para la Ste7p inactiva. Sin embargo, una vez que Ste7p es activada, se pierde la unión incrementada, porque el sitio de unión en Ste5p para la Ste7p activada está interrumpido por la mutación E756. Ste7p activada se disocia rápidamente, lo que resulta en una activación disminuida de Fus3p y en una activación incrementada de Kss1p, lo cual conlleva a la intercomunicación (Schwartz y Madhani, 2006) (Fig. 16).

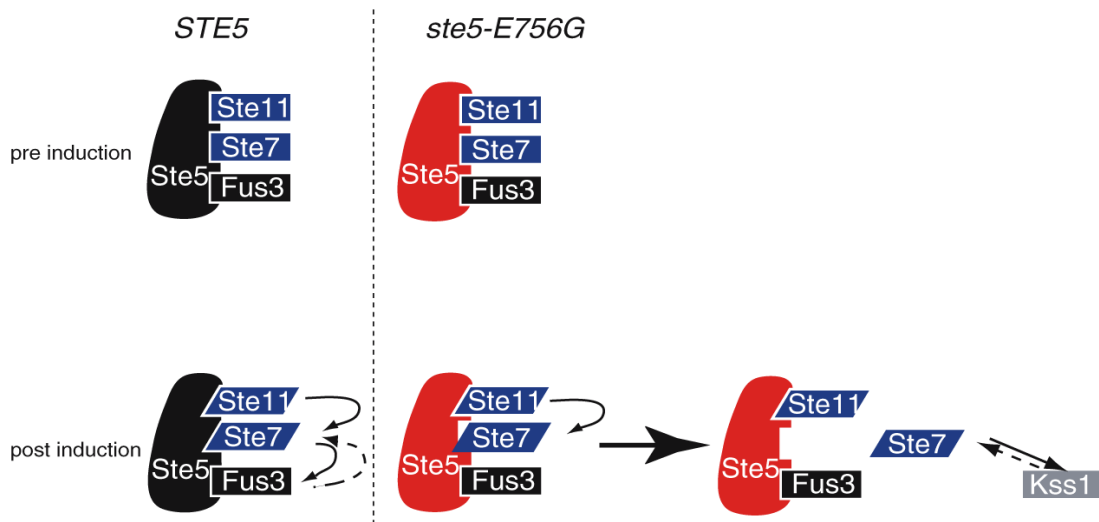


Fig. 16 Una subpoblación de Ste7p fosforilada aparece disociada del andamio Ste5p-E756G. Modelo de la función de Ste5p en la especificidad de la señal. Los componentes específicos del apareamiento están indicados en *negro*, los componentes específicos de la filantación en *gris*, los componentes compartidos en *azul*, el componente mutante en *rojo*. Las cinasas activas están indicadas con paralelogramos. (Tomado de Schwartz y Madhani, 2006)

3.3 Traslado nuclear de Ste5p

El reclutamiento de las proteínas citoplásmicas de señalización hacia la membrana plasmática en respuesta a una señal extracelular es una etapa esencial en la activación de las cascadas de proteína cinasa. Las proteínas de andamiaje y de adaptación que unen enzimas de señalización también parecen localizarse en la periferia a fin de transmitir las señales recibidas a través de la membrana plasmática. Mientras que está claro que la localización apropiada de los componentes citoplásmicos de señalización es una característica esencial de la transmisión de la señal, se sabe poco acerca de los mecanismos que aseguran que estos componentes de señalización (1) se localicen hacia la membrana plasmática en el tiempo correcto y (2) que se evite la activación errónea de las vías de transducción de señales en ausencia de la señal apropiada (Mahanty *et al.*, 1999).

La localización de Ste5p hacia G β en la membrana plasmática es esencial para la transmisión de la señal de feromona a las enzimas asociadas de la cascada de MAP cinasa. Se ha mostrado que esta localización crucial requiere del traslado previo de Ste5p a través del núcleo, Ste5p se traslada constitutivamente por el núcleo durante el crecimiento vegetativo. La feromona aumenta la exportación nuclear de Ste5p, y este acervo se transloca hacia la periferia celular. Es importante resaltar que Ste5p incapaz de transitar por el núcleo no puede localizarse en la periferia y activar la vía, mientras que Ste5p con tránsito aumentado hacia el núcleo tiene una capacidad incrementada para localizarse en la periferia y activar la vía (Mahanty *et al.*, 1999). Por tanto, se

sugiere que Ste5p se localiza en la periferia celular a través de una vía de clasificación que se origina en el núcleo (Fig. 17). El reclutamiento en membrana de Ste5p sólo se detecta en células que no han tenido brotes y en las puntas de proyecciones de apareamiento, sosteniendo fuertemente que se involucra un mecanismo de clasificación polarizada (Mahanty *et al.*, 1999). Durante el apareamiento, las células de levadura sufren un crecimiento polarizado hacia su pareja de apareamiento por medio de la detección de un gradiente de feromona. El crecimiento polarizado involucra al citoesqueleto de actina y el movimiento polarizado de vesículas secretoras que se originan del retículo endoplásmico (ER) que está contiguo a la envoltura nuclear, mientras que los microtúbulos del núcleo permiten la migración nuclear hacia la corteza celular. Así, el reclutamiento asimétrico de Ste5p hacia la corteza celular puede involucrar componentes del citoesqueleto y/o la maquinaria secretora que se intersecta con el núcleo.

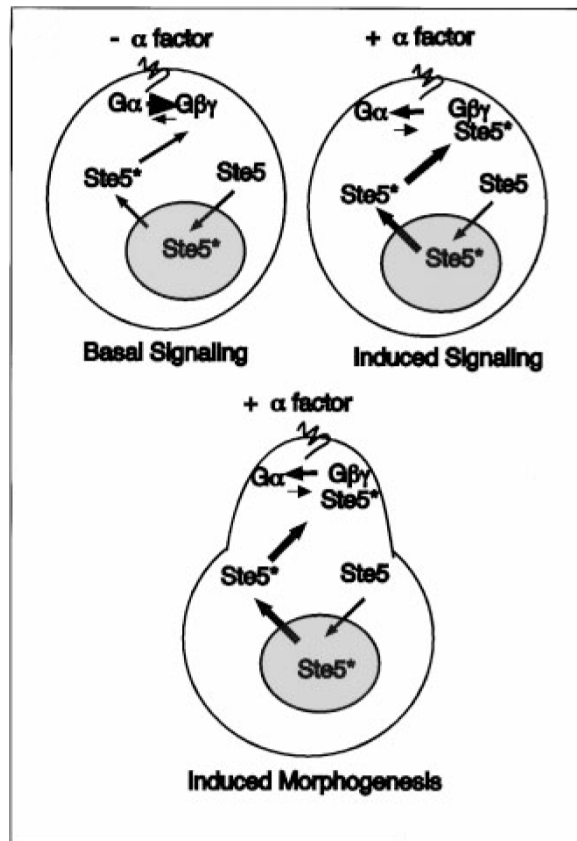


Fig. 17 Modelo de la localización de Ste5p en la membrana plasmática. El asterisco indica que Ste5p es competente para localizarse en la membrana plasmática. (Tomado de Mahanty *et al.*, 1999)

Este esquema de regulación puede asegurar que Ste5p citoplásmico no active las cinasas río abajo en ausencia de feromona y puede ser aplicable a otras proteínas de señalización reclutadas en la membrana.

3.3.1 Cdc24p regula el traslado nuclear y el reclutamiento del andamio Ste5p. El factor de intercambio de nucleótido de guanina Cdc24p de *S. cerevisiae* regula el crecimiento polarizado al unirse a Cdc42p, una GTPasa de tipo Rho que tiene muchos efectores, incluyendo la cinasa Ste20p, que activa múltiples cascadas de MAPK (Mahanty *et al.*, 1999). Cdc24p promueve la señalización de MAPK durante el apareamiento a través de interacciones con Ste5p, un andamio que debe trasladarse por el núcleo y unirse a la subunidad β (Ste4p) de una proteína G para que Ste20p active la cascada sujeta a MAPK. Ste5p se recluta basalmente en sitios de crecimiento de células en fase G_1 independientemente de Ste4p. La pérdida de Cdc24p inhibe la importación nuclear y bloquea el reclutamiento basal inducido por feromona de Ste5p. Ste5p no se recluta basalmente y la MAPK Fus3p no se activa basalmente en presencia de una mutante Cdc24p (G168D) que sin embargo activa a Cdc42p, sugiriendo que Cdc24p regula a Ste5p y la cascada asociada de MAPK por medio de una función que no es dependiente de su actividad de factor de intercambio de nucleótido de guanina. Esto sugiere que Cdc24p media la localización específica de sitio de Ste5p hacia una proteína G heterotrimérica y por tanto puede asegurar la activación localizada de la cascada de MAPK asociada (Wang *et al.*, 2005).

3.3.2 Los filamentos de actina se requieren para el reclutamiento polarizado de Ste5p. La localización del andamio Ste5p en la corteza celular es polarizada y requiere del lanzamiento nuclear previo, que también se necesita para la activación de Fus3p. En ausencia de feromona, una pequeña cantidad de Ste5p se acumula en sitios corticales en las fases celulares G_2/M y G_1 por medio de un proceso que involucra a Cdc42p, Cdc24p y Bem1p, y es dependiente de Ste4p y del citoesqueleto de actina. Cdc24p se traslada al núcleo, se une a Ste5p y promueve la acumulación nuclear y el reclutamiento de Ste5p. Estos y otros hallazgos, sugieren que Ste5p se recluta basalmente por pautas internas establecidas por Bem1p, Cdc42p y Cdc24p, que deben trasladarse por el núcleo y reclutarse con Ste5p como un complejo (Qi y Elion, 2005-I). Durante la estimulación de feromona, el reclutamiento polarizado de Ste5p se hace dependiente del citoesqueleto de actina además de Ste4p. Ste5p se detecta en la corteza de las células en fase G_1 a los pocos minutos de la adición del factor α y se encuentra en las puntas de los shmoo en crecimiento. También se ha demostrado que durante la estimulación de feromona, la forma Bni1p es esencial para el reclutamiento del andamio Ste5p en sitios corticales y controla el reclutamiento de Ste5p por medio de filamentos de actina (Qi y Elion, 2005-I). Bni1p también se requiere para el reclutamiento cortical de Cdc24p, para la activación eficiente de Fus3p y para el reclutamiento estable de Fus3p en la membrana celular.

3.4 Fosforilación de Ste5p

Ste5p está sujeta a dos tipos de fosforilación e incrementos en la abundancia como resultado de la activación de MAPK. Durante el crecimiento vegetativo, Ste5p se fosforila basalmente por medio

de un proceso regulado por la CDK Cdc28p (Flotho *et al.*, 2004). Durante la señalización de feromona, Ste5p sufre una fosforilación incrementada por la cascada de MAPK de apareamiento. La fosforilación inducida por feromona requiere de la localización de Ste5p en la membrana. Múltiples cinasas de la cascada de MAPK de apareamiento contribuyen a la fosforilación inducida por feromona de Ste5p, donde las MAPKs de apareamiento Fus3p y Kss1p hacen la mayor contribución. Así, la fosforilación inducida por feromona de Ste5p es estrictamente dependiente de su reclutamiento en la membrana plasmática, a pesar de que Ste5p está distribuida en el citoplasma y el núcleo. Sorprendentemente, el incremento en el nivel de activación de las MAPKs de apareamiento incrementa la cantidad de Ste5p en la corteza celular (Flotho *et al.*, 2004).

4 Proteínas de andamiaje en la vía de respuesta a estrés osmótico de *Saccharomyces cerevisiae*

La MAPKKK Ste11p de levadura actúa en al menos tres vías separadas: la vía de respuesta a apareamiento (feromona), la vía de crecimiento filamentoso, y la vía de respuesta a alta osmolaridad. No obstante, en las cepas silvestres, no existe intercomunicación entre estas vías distintas de MAPK, debido en parte por la función de las proteínas de andamiaje. Por ejemplo, en la vía de respuesta a apareamiento, la proteína de andamiaje Ste5p interactúa con la proteína G β Ste4p así como con las cinasas Ste11p, Ste7p, y Fus3p. Debido a que el andamio organiza estas proteínas en un complejo distinto, las moléculas de Ste11p activadas por la señal de feromona se dirigen específicamente para activar las cinasas de apareamiento río abajo Ste7p y Fus3p (Fig. 18A).

De manera similar, en una rama de la vía de respuesta a alta osmolaridad, la MAPKK Pbs2p actúa como un andamio y también como una cinasa (Fig. 18A). Esta proteína contiene un dominio rico en prolina que interactúa con un dominio homólogo a Src3 (SH3) en el osmosensor Sho1p. Además, Pbs2p interactúa con la MAPKKK Ste11p y la MAPK Hog1p. Así, las moléculas de Ste11p que se activan por el estrés de alta osmolaridad por medio de Sho1p se dirigen para activar las cinasas río abajo Pbs2p y Hog1p. La importancia de las interacciones de andamiaje en la dirección del flujo de información se demuestra por el hecho de que las moléculas quiméricas de andamiaje se pueden diseñar para que redirijan la señal de apareamiento a una respuesta de osmolaridad (Zarrinpar *et al.*, 2004).

Sin embargo, algunas etapas de la vía de MAPK de respuesta a alta osmolaridad pueden ocurrir aún en ausencia del andamio Pbs2p. Específicamente, en cepas carentes de Pbs2p (MAPKK y andamio) o Hog1p (MAPK), se observa que la estimulación por estrés de alta osmolaridad resulta en la intercomunicación con la respuesta de apareamiento. Esta intercomunicación inducida por mutación es consistente con un modelo en el que la respuesta a osmolaridad resulta normalmente en la inhibición por retroalimentación del osmosensor Sho1p por la Hog1p activada. Así, si alguna cinasa río abajo se suprime, esta inhibición de retroalimentación se pierde, lo cual resulta en una acumulación de Ste11p activada que entonces puede activar la MAPKK de apareamiento Ste7p río abajo (Fig. 18B). Por tanto, Sho1p y Ste11p son esenciales para la intercomunicación.

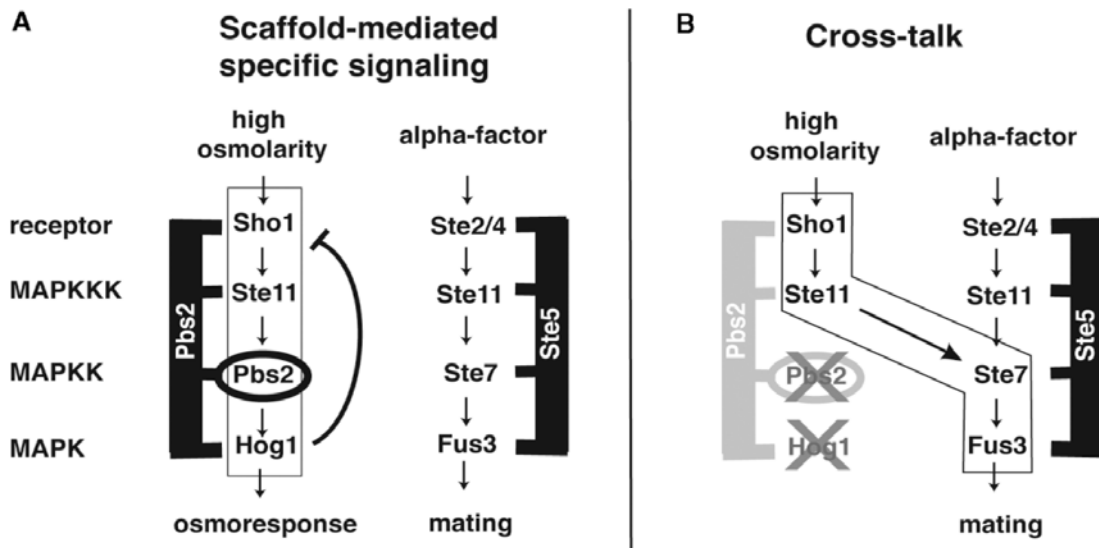


Fig. 18 Proteínas de andamiaje en las vías de MAPK de respuesta a alta osmolaridad y apareamiento en levadura. **(A)** La MAPKK Pbs2p participa en la respuesta a alta osmolaridad y sirve como un andamio para la rama Sho1p de la vía. Para mayor claridad, varios componentes de las vías no se muestran. **(B)** Cuando Pbs2p o Hog1p se suprimen, se observa intercomunicación de un estímulo de alta osmolaridad con la vía de respuesta a apareamiento. (Tomado de Zarrinpar *et al.*, 2004)

Se ha reportado que la MAPKKK Ste11 puede unir directamente una región en la cola citoplásmica del osmosensor transmembranal Sho1p (residuos ~170 a ~210) (Zarrinpar *et al.*, 2004). También se ha mostrado que esta región se requiere para activar a Ste11p de manera dependiente de Pbs2p: esta región de Sho1p y no un dominio SH3 funcional (que une a Pbs2p) es necesaria para generar la intercomunicación con la vía de apareamiento. Pbs2p se considera como el andamio canónico de esta rama de la vía de respuesta a osmolaridad.

A pesar de que Pbs2p desempeña una función clave —organizar los componentes de esta vía y dirigir el flujo de información— los resultados actuales sugieren que Sho1p también desempeña una función importante de andamiaje. Sho1p une físicamente dos compañeros: Ste11p y Pbs2p. La interacción con Ste11p contribuye principalmente en su activación, pues la recluta hacia Ste20p y la activa en la membrana celular. Ambas Sho1p y Ste20p se localizan en sitios de polarización. La interacción de Sho1p con Pbs2p, por medio del dominio SH3 de Sho1p, se requiere entonces para dirigir la acción de Ste11p activada hacia Pbs2p. Cuando la interacción mediada por SH3 se interrumpe, ocurre intercomunicación inapropiada con la vía de apareamiento (activación de la MAPKK Ste7p).

Así, es más apropiado considerar a Sho1p y Pbs2p como andamios que cooperan en la vía de respuesta a osmolaridad, equiparando su función por separado, con la de Ste5p de la vía de apareamiento. Los estudios previos han demostrado que cuando Ste11p y Pbs2p se fusionan covalentemente, la activación de Ste11p sólo conduce a la respuesta osmótica y no a la respuesta de apareamiento (Zarrinpar *et al.*, 2004). Estos datos son consistentes con un modelo en el que Sho1p desempeña normalmente la función de adaptador, uniendo a Ste11p y Pbs2p.

Es posible que la interacción de Sho1p con Ste11p sea una de las etapas reguladas por el estrés osmótico. En el contexto silvestre, se sugiere que un conjunto de interacciones redundantes trabajan a la vez para reclutar a Ste11p hacia el complejo de señalización —las interacciones con múltiples regiones de Sho1p así como con Pbs2p.

Existen varios modelos distintos de cómo es que Sho1p y Pbs2p funcionan juntas para dirigir los eventos de activación de las cinasas en la vía de respuesta a osmolaridad. En uno de ellos se propone que ambas moléculas y sus interacciones coordinadas funcionan para ensamblar cooperativamente a los miembros de la vía para mediar la activación de Ste11p y Ste20p, y la transmisión apropiada de la señal de Ste11p a Pbs2p a Hog1p (Fig. 19A). Sin embargo, también son posibles los modelos alternativos en los que Sho1p y Pbs2p coordinan los eventos de ensamblaje en secuencia. Por ejemplo, Sho1p podría coordinar la activación inicial de Ste11p por Ste20p, mientras que la interacción subsecuente de Sho1p con Pbs2p puede permitir la transferencia de Ste11p activada a un sitio de atraque en Pbs2p a través del cual puede comunicarse con sus compañeros río abajo (Zarrinpar *et al.*, 2004) (Fig. 19B).

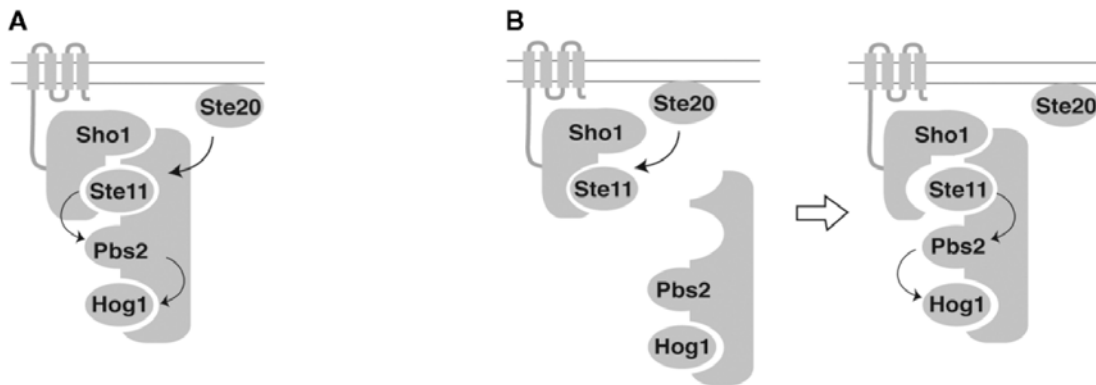


Fig. 19 Modelos de cómo es que Sho1p y Pbs2p pueden funcionar juntas para dirigir el flujo de información en la vía de MAPK de osmolaridad. **(A)** Sho1p y Pbs2p pueden formar una red de cooperación de interacciones que permita la activación de Ste11p por Ste20p, seguida de la activación subsecuente de Pbs2p y Hog1p. **(B)** Sho1p y Pbs2p pueden formar interacciones secuenciales con componentes de la vía. (Tomado de Zarrinpar *et al.*, 2004)

5 Proteínas de andamiaje en el crecimiento polarizado de *Saccharomyces cerevisiae*

Tanto en los organismos unicelulares como en los multicelulares, el crecimiento celular polarizado es crucial para la formación de morfologías celulares precisas que le permiten a la célula realizar funciones especializadas. Por ejemplo, el desarrollo de neuritas les permite a las células nerviosas llevar a cabo la transducción sensorial, la formación de microvellosidades les permite a las células epiteliales absorber nutrientes, y el crecimiento de tubos de polen en los estilos de flores facilita la fertilización de plantas. A pesar de que los eventos citológicos involucrados en el crecimiento celular polarizado han sido bien estudiados, los mecanismos moleculares involucrados en este proceso no están claros (van Drogen y Peter, 2002).

S. cerevisiae presenta crecimiento celular polarizado en varias etapas de su ciclo celular. El crecimiento polarizado es prominente en la gemación durante el crecimiento vegetativo y en la formación de pseudohifas y durante la formación de la proyección en respuesta a feromona. El crecimiento polarizado en una célula vegetativa comienza en G₁ tardía, cuando un brote emerge de un sitio específico dictaminado por el locus sexual y el pedigrí de la célula. El crecimiento celular ocurre inicialmente en la punta del brote (crecimiento apical) y después continúa isotrópicamente conforme crece el brote. Finalmente, justo antes de la citocinesis, ocurre la formación de nueva pared celular y membrana en el cuello de la célula madre. Cuando las levaduras están limitadas de fuentes de nitrógeno, también sufren gemación pero adoptan una morfología alargada y forman cadenas de células conectadas llamadas pseudohifas, que le permiten a las células diseminarse a través de la superficie para obtener acceso a los nutrientes. Durante el apareamiento, las células haploides responden a feromona de células del sexo opuesto y forman proyecciones hacia sus compañeras de apareamiento; estas proyecciones son importantes para la fusión celular (van Drogen y Peter, 2002).

En la levadura, el crecimiento celular polarizado es un proceso complejo que involucra la organización polarizada del citoesqueleto de actina, la función coordinada de muchas proteínas de polaridad, y la regulación de cascadas de transducción de señales. Los parches de actina corticales están concentrados en sitios de crecimiento polarizado, y los filamentos de actina corren en paralelo al eje de polarización (al eje de la célula madre durante la gemación y longitudinalmente a la proyección durante el apareamiento). Se cree que el citoesqueleto de actina dirige vesículas secretoras que contienen componentes de crecimiento (e.g. pared celular y membrana plasmática) hacia sitios de crecimiento (van Drogen y Peter, 2002).

5.1 Spa2p

La proteína Spa2p de levadura se localiza en sitios de crecimiento y es importante para la morfogénesis polarizada durante la gemación, el apareamiento y el crecimiento de pseudohifas. Por el sistema de doble híbrido se ha determinado que Spa2p interactúa con Pea2p y Bud6p (Aip3p); estas tres proteínas están involucradas en el mismo proceso biológico (Sheu *et al.*, 1998). Los experimentos de coimmunoprecipitación demuestran que Spa2p y Pea2p están asociados estrechamente *in vivo*.

Los experimentos de velocidad de sedimentación sugieren que una porción considerable de Spa2p, Pea2p, y Bud6p cosedimenta, generando la posibilidad de que estas proteínas formen un gran complejo multiproteico 12S. Por otra parte, se ha mostrado que Bud6p interactúa con actina, lo cual sugiere que el complejo 12S funciona para regular el citoesqueleto de actina (Sheu *et al.*, 1998).

Los análisis de delección han revelado que varias regiones de Spa2p están involucradas en su localización a sitios de crecimiento (Sheu *et al.*, 1998). Una de las regiones involucradas en la estabilidad y localización de Spa2p interactúa con Pea2p; esta región contiene un dominio conservado, SHD-II.

Por medio del uso de un sistema de doble híbrido, también se ha encontrado que Spa2p y Bud6p interactúan con componentes de dos vías de proteínas cinasas activadas por mitógeno importantes para el crecimiento celular polarizado (Fig. 20). Spa2p interactúa con Ste11p y Ste7p de la vía de señalización de apareamiento así como con las MEKs Mkk1p y Mkk2p de la vía MAPK Slt2p (Mpk1p); para ambas Mkk1p y Ste7p, se ha mapeado la región interactiva de Spa2p en el dominio regulatorio putativo N-terminal. También se ha encontrado que Bud6p interactúa con Ste11p. La región de Spa2p que interactúa con MEK corresponde con el dominio SHD-I altamente conservado (Sheu *et al.*, 1998), el cual es importante para el apareamiento y la señalización de MAPK. De acuerdo con lo anterior, se ha propuesto que Spa2p, Pea2p, y Bud6p funcionan conjuntamente, probablemente como un complejo, para promover la morfogénesis polarizada a través de la regulación del citoesqueleto de actina y las vías de señalización.

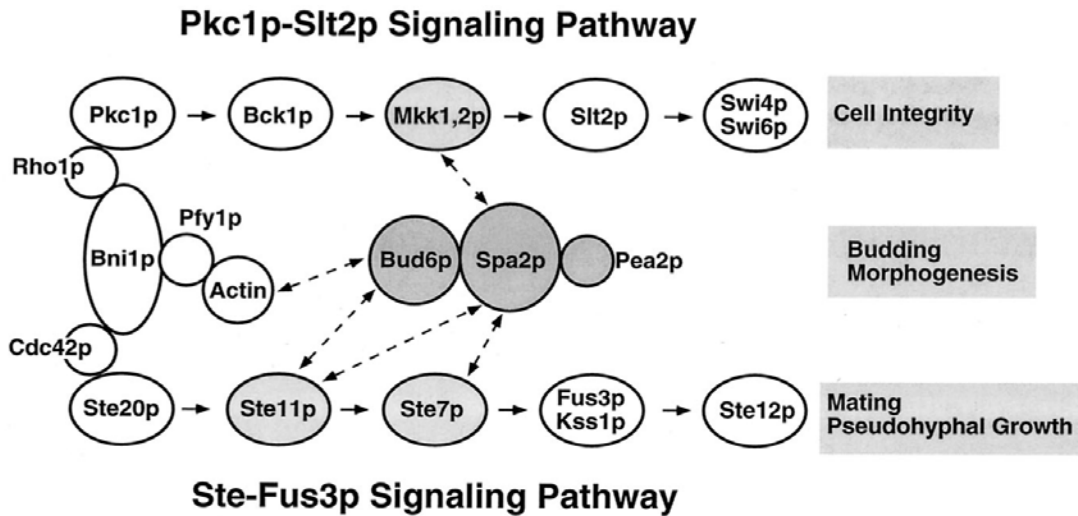


Fig. 20 Resumen de las interacciones distintas entre los constituyentes del complejo 12S y los componentes de señalización. (Tomado de Sheu *et al.*, 1998)

Por otra parte, se sabe que en la levadura, la vía Mpk1p-MAP cinasa funciona para mantener la integridad del citoesqueleto y la pared celular. En este módulo, la MEKK Bck1p funciona río arriba de las MEKs Mkk1p y Mkk2p, que entonces activan la MAP cinasa Mpk1p. Mpk1p regula varios objetivos nucleares, incluyendo los factores de transcripción Rlm1p y SBF, y las dos proteínas de tipo HMG1 NHP6A y NHP6B (Sheu *et al.*, 1998). Además, se ha mostrado que Mpk1p se transporta constitutivamente entre el núcleo y el citoplasma, y que tanto Mpk1p como Mkk1p se localizan en sitios de crecimiento polarizado de manera dependiente de Spa2p.

Varias líneas de evidencia sugieren que Spa2p funciona como una molécula de tipo andamio para reclutar el módulo de Mpk1p-MAP cinasa en sitios de crecimiento polarizado. Primero, Mkk1p y Mpk1p interactúan específicamente con Spa2p. Segundo, Spa2p, Mkk1p, y Mpk1p se acumulan en sitios de crecimiento polarizado de manera dependiente de actina. Tercero, Mpk1p y Mkk1p fallan en acumularse en puntas de brote y proyecciones de apareamiento en células *spa2Δ*. Finalmente, Spa2p-CTM es suficiente para reclutar Mkk1p y Mpk1p a la corteza celular. Mkk1p interactúa con el dominio amino-terminal de Spa2p, el cual no se requiere para su localización. La localización de Spa2p antecede el reclutamiento del módulo Mpk1p-MAP cinasa. Con base en estos resultados, se ha propuesto que Spa2p proporciona una plataforma para la activación de Mpk1p en sitios de crecimiento polarizado, mientras que Mpk1p activo se disocia de Spa2p y se transloca rápidamente al núcleo para fosforilar sustratos río abajo. Spa2p no es esencial para la activación de Mpk1p bajo condiciones de estrés que afecten la corteza celular entera (Sheu *et al.*, 1998). En vez de activar generalmente la Mpk1p, Spa2p se involucra en la concentración de la actividad de Mpk1p hacia regiones específicas de la corteza celular, particularmente hacia sitios de crecimiento polarizado.

5.2 Far1p

A pesar de que las células de levadura son sésiles, son capaces de responder a un gradiente morfogenético durante el apareamiento. En este proceso, dos células haploides de distintos tipos de apareamiento (células α y a) se comunican una con otra por feromonas secretadas (factor α y a , respectivamente). Las células interpretan este gradiente de feromona y polarizan su citoesqueleto en dirección de la mayor concentración de feromona, de ese modo aseguran una fusión eficiente de las dos compañeras de apareamiento.

La activación sitio-específica de la pequeña GTPasa Cdc42p es central para la polarización del citoesqueleto de actina durante la gemación y el apareamiento (Wiget *et al.*, 2004). La forma de GTP unido de Cdc42p es capaz de interactuar con sus efectores, que incluyen a Gic1p y Gic2p, las cinasas tipo PAK Ste20p y Cla4p, y la formina Bni1p. En conjunto, estos efectores de Cdc42p organizan el ensamblaje dinámico del citoesqueleto de actina, que a su vez localizan la fusión de vesículas secretorias al sitio de crecimiento polarizado. Durante el crecimiento vegetativo, el sitio de polarización está marcado por la activación local de la GTPasa pequeña Rsr1p/Bud1p, que se cree que recluta y activa a Cdc24p en el sitio incipiente de brote (Wiget *et al.*, 2004). Durante el apareamiento, la proteína Far1p adaptadora se necesita para interpretar correctamente el gradiente de feromona al orientar al citoesqueleto de actina hacia el sitio de la mayor concentración de feromona. Far1p interactúa a través de distintos dominios con Cdc24p y G $\beta\gamma$, ambas interacciones se requieren para la función de Far1p de orientar el citoesqueleto de actina en un gradiente de feromona.

Poco a poco ha comenzado a surgir un entendimiento detallado de los mecanismos moleculares por los que las células de levadura orientan su crecimiento superficial hacia la pareja de apareamiento en un gradiente morfogenético. Los receptores de feromona distribuidos uniformemente se activan asimétricamente por la unión de feromonas, secretadas por la pareja de apareamiento más cercana. Los receptores activados de feromona desencadenan la disociación local de G α de G $\beta\gamma$. A su vez, G $\beta\gamma$ activa la cascada de señalización de MAP cinasa por la unión a Ste5p, mientras que recluta y activa el GEF Cdc24p por medio de Far1p. Se ha propuesto que la unión de G $\beta\gamma$ recluta a Far1p al sitio de activación del receptor, donde se estabiliza por medio de un dominio de tipo PH (Wiget *et al.*, 2004). La unión de G $\beta\gamma$ también desencadena un cambio conformacional en Far1p, que puede permitir a un dominio carboxi-terminal activar al GEF Cdc24p por un mecanismo que involucra dimerización (Fig. 21). Cdc42p activada localmente promueve la enucleación de actina predominantemente a través de la formina Bni1p, ensamblando de ese modo los filamentos de actina que sirven como pistas para entregar vesículas que contienen nuevo material de membrana al sitio de polarización.

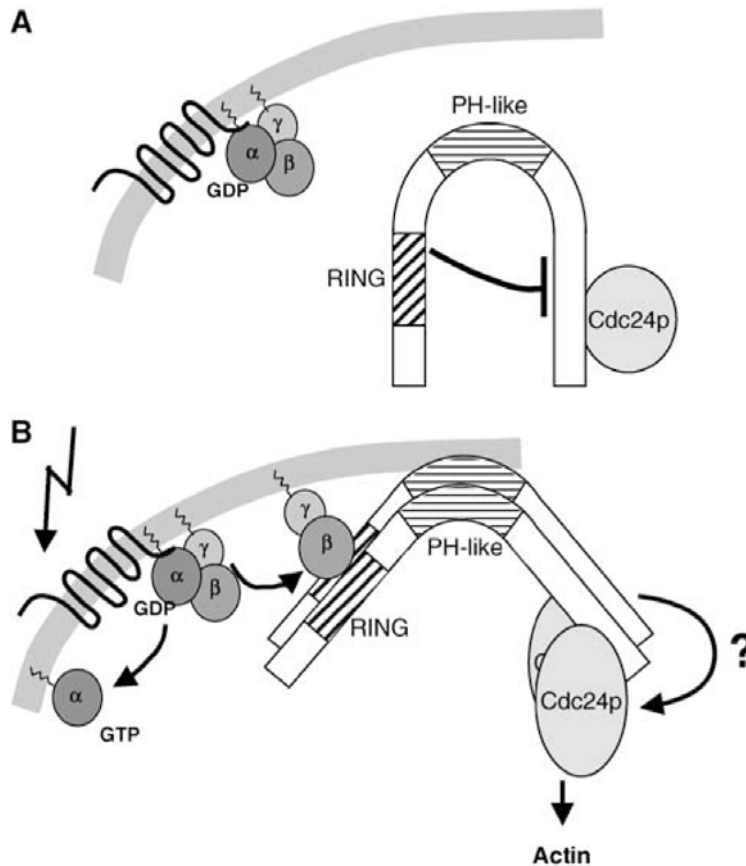


Fig. 21 Modelo para la activación y función de Far1p durante la polarización del citoesqueleto de actina en respuesta a factor- α . **(A)** En ausencia del factor- α , G $\beta\gamma$ está secuestrada por G α -GDP y es incapaz de interactuar con Far1p. Como resultado, Far1p está autoinhibida (indicado esquemáticamente por una flecha roma) y su dominio carboxi-terminal es incapaz de activar a Cdc24p. **(B)** La unión de la feromona a su receptor resulta en la disociación local de G $\beta\gamma$ de G α -GTP. G $\beta\gamma$ interactúa con Far1p y por consiguiente recluta a Cdc24p al sitio de activación del receptor. Además, la unión de G $\beta\gamma$ a Far1p desencadena un cambio conformacional permitiendo al dominio carboxi-terminal de Far1p inducir la actividad de GEF de Cdc24p. (Tomado de Wiget *et al.*, 2004)

5.3 Bem1p

El tamaño total de la célula y la composición macromolecular permanecen inalterados después de ciclos sucesivos de división celular. Este fenómeno también se extiende hasta organelos intracelulares unidos a la membrana, porque el número de copias y el tamaño de cualquier compartimento de organelo permanecen constantes en las células en división. Implícita en este aspecto central de la fisiología celular está una coordinación precisa entre la división celular y la biogénesis de organelos, pero en la mayoría de los casos los mecanismos son un misterio (Han *et al.*, 2005).

Un factor de establecimiento de polaridad central en una variedad de organismos (desde la levadura hasta el ser humano) es Cdc42p, una GTPasa pequeña tipo Rho que orchestra numerosos procesos necesarios para la polarización, tales como la organización de septina y actina y del tráfico de membrana, en respuesta a transiciones del ciclo celular y cambios ambientales (Han *et al.*, 2005). La localización en la membrana de Cdc42p no está restringida a la membrana plasmática, también incluye membranas internas, en especial las membranas vacuolares. Entre los numerosos efectores de Cdc42p y proteínas reactivas, la proteína de andamiaje Bem1p es crítica para la correcta activación de Cdc42p. Bem1p, es una proteína de andamiaje que ayuda a localizar las proteínas de establecimiento de la polaridad en el citoesqueleto de actina. Cdc24p es un factor de intercambio del nucleótido de guanina de Cdc42p (GEF). Una vez que Cdc24p se encuentra en el sitio de gemación, se une a Bem1p y da lugar a la reorganización de actina dependiente de Cdc42p necesaria para la emergencia del brote (Han *et al.*, 2005). Además, se ha mostrado que Bem1p se requiere para la fusión de vacuolas. Sin embargo, existen diferencias entre las funciones de Bem1p en la fusión de vacuolas y en la emergencia del brote; se necesitan futuros experimentos para conocer en todos sus detalles los mecanismos que las generan.

6 Vías de señalización en otros hongos y organismos pluricelulares

6.1 Cascadas de transducción de señales conservadas

Los hongos son organismos eucarióticos que divergieron de un ancestro común junto con los animales eucarióticos multicelulares hace 800 a 1000 millones de años. A pesar de esta divergencia evolutiva, los hongos están más cercanamente emparentados con los animales que con las plantas, algas, bacterias, o arqueas y, por tanto, comparten aspectos importantes con las células de mamífero. Quizá esto es más aparente en las cascadas de señalización que regulan el funcionamiento celular. Los estudios sobre distintos hongos, incluyendo tanto ascomicetos como basidiomicetos, han convergido para definir dos cascadas de transducción de señales altamente conservadas que regulan el desarrollo de hongos y la virulencia (Lengeler *et al.*, 2000). Una es una cascada de MAP cinasa que media las respuestas a feromona. La segunda es una cascada de detección de nutrientes con receptor acoplado a proteína G más proteína G α asociada a proteína cinasa dependiente de cAMP. Estas vías funcionan coordinadamente para regular el apareamiento, la filamentación y la virulencia. La forma en que estas vías están organizadas difiere en detalle, así como la forma en que los organismos han evolucionado para vivir predominantemente como haploides o diploides, para aparearse bajo condiciones ricas o pobres en nutrientes, o para responder a señales del hospedero cuando infectan plantas o animales (Lengeler *et al.*, 2000). Lo que es más sorprendente es cómo se han conservado los mecanismos generales de detección de señales. Por ejemplo, una proteína G α altamente conservada (Gpa2p, gpa2p, GPA1p, y Gpa3p) funciona en una vía de detección de nutrientes para regular la producción de cAMP durante el desarrollo de pseudohifas en *S. cerevisiae*, el apareamiento en *Schizosaccharomyces pombe*, el apareamiento y la virulencia en el hongo patógeno humano *Cryptococcus neoformans*, y el apareamiento y la virulencia del patógeno de maíz *Ustilago maydis* respectivamente (Lengeler *et al.*, 2000). Estos estudios ilustran qué tan flexiblemente pueden ser adoptadas las redes de regulación por organismos divergentes durante la adaptación a imposiciones ambientales únicas.

6.2 Señalización de la proteína G en *Schizosaccharomyces pombe*

Tanto *S. cerevisiae* como *Schizosaccharomyces pombe* utilizan proteínas G para responder a la unión de ligandos por receptores que detectan feromonas y glucosa en el ambiente. Aunque tanto *S. cerevisiae* como *S. pombe* poseen dos subunidades G α , una subunidad G β y una subunidad G γ para mediar la señalización de feromona y glucosa, el uso de estas cuatro subunidades en las dos vías es completamente distinto. En *S. cerevisiae*, la señal de feromona es enviada por medio de una proteína G heterotrimérica, resultando en la activación de una vía de señalización de MAPK por el dímero G $\beta\gamma$. Este mismo dímero G $\beta\gamma$ activa un miembro de la familia PAK, que es requerido para la activación de la vía de MAPK y para una segunda función donde media el crecimiento

celular polarizado para facilitar el contacto y la fusión celular entre compañeros sexuales. Por otra parte, la señalización de glucosa/cAMP es mediada por una subunidad $G\alpha$ monomérica así como por proteínas Ras (Hoffman, 2005). En cambio, en *S. pombe*, es la vía de señalización de glucosa/cAMP que utiliza la proteína G heterotrimérica, en la cual la subunidad $G\alpha$ activa el efector río abajo que es la adenilato ciclasa (Hoffman, 2005). Similar a la vía de glucosa/cAMP de *S. cerevisiae*, la vía de feromona de *S. pombe* involucra tanto una subunidad $G\alpha$ monomérica como un homólogo de Ras que activan las vías de señalización de MAPK y PAK (Hoffman, 2005). Estas similitudes y diferencias resaltan tanto las ventajas como las limitaciones potenciales de los estudios en organismos modelo relativamente simples. Los descubrimientos sorprendentes de la señalización por subunidades $G\alpha$ monoméricas en la vía de glucosa/cAMP de *S. cerevisiae* y de la vía de feromona de *S. pombe* fueron ampliamente facilitados por el hecho de que cada levadura posee sólo un gen *STE4* que codifica para $G\beta$ el cual se ha demostrado genéticamente que actúa en sólo una de las dos vías de señalización. Es mucho más difícil identificar vías de señalización de $G\alpha$ monomérica en humanos, cuyo genoma posee 16 genes para $G\alpha$, 5 para $G\beta$, y 12 para $G\gamma$. Sin embargo, parece poco probable que la capacidad de las subunidades $G\alpha$ monoméricas de mediar las vías de señalización de proteínas G sea restringida sólo a los sistemas fúngicos (Hoffman, 2005).

6.3 *Kluyveromyces lactis*

K. lactis está relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae*. El hábitat natural de *K. lactis* es diverso aunque muchas cepas originalmente se aislaron de productos lácteos en los que la lactosa es la principal fuente de carbono. En su cariotipo se distinguen 6 cromosomas que miden entre 1 y 3 Mb, se estima que el tamaño total del genoma es de 10 a 12 Mb —su genoma ha sido secuenciado y se encuentra disponible en la página <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php> junto con los genomas de otras levaduras.

K. lactis ofrece un modelo atractivo para estudiar los procesos de diferenciación celular en respuesta a señales ambientales y pueden hacerse análisis genéticos fácilmente. Es un organismo unicelular y esencialmente aeróbico y heterotático que posee un ciclo celular convencionalmente organizado.

6.3.1 Vía de respuesta a feromona. Mientras que una gran cantidad de información se ha acumulado referente a las cascadas de transducción de señales en *S. cerevisiae* y otros hongos, una pregunta crítica se refiere a cuáles de las características de los sistemas de transducción son genéricas y cuáles son especie específicas. Por ejemplo, en *K. lactis*, el sistema de transducción de señales que media la respuesta de apareamiento se desencadena tanto por la subunidad $G\alpha$ (Gpa1p de *K. lactis* [KlGpa1p]) como por la subunidad $G\beta$ (KlSte4p) de la proteína G heterotrimérica (Coria *et al.*, 2005). Existen dos diferencias documentadas entre las vías de

respuesta a feromona mediada por la proteína G de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*: primero, mientras que la disrupción de *GPA1*, el gen que codifica la subunidad α de la proteína G en *S. cerevisiae*, produce arresto permanente del crecimiento y por tanto, la muerte de células haploides, la inactivación de $G\alpha$ (KlGpa1p) en *K. lactis* no afecta la viabilidad celular pero produce esterilidad parcial (Coria *et al.*, 2005); segundo, la sobreexpresión de la subunidad $G\beta$ (Ste4p) induce el arresto del crecimiento y el apareamiento en *S. cerevisiae* pero no tiene efecto en *K. lactis*. A pesar de que se ha mostrado que tanto $G\alpha$ como $G\beta$ desencadenan la respuesta a feromona por medio de la activación del factor de transcripción KlSte12p, nada se sabe acerca de los elementos que conectan la proteína G con el factor de transcripción en *K. lactis* (Coria *et al.*, 2005). Actualmente se están investigando las características fenotípicas de mutantes de disrupción de componentes de la vía de respuesta a feromona de *K. lactis* (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes putativos y probados de la vía de respuesta a feromona de *Kluyveromyces lactis*. (Tomado de Coria *et al.*, 2005)

Nombre del Gen	Fenotipo de la mutante	Función	Identificador en la base de datos de <i>K. lactis</i>	Homólogo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
				Identidad (%)	Valor E
<i>KLSTE2</i>	Desconocido	No determinada	KLLA0F25102	48	5e-92
<i>KLSTE3</i>	Estéril	Receptor de feromona	KLLA0A06534	51	1e-131
<i>KL GPA1</i>	Estéril	Actúa como un elemento positivo en la vía de apareamiento	KLLA0F25916	62	8e-154
<i>KLSTE4</i>	Estéril	Actúa como un elemento positivo en la vía de apareamiento	KLLA0D06787	52	1e-119
<i>KLSTE18</i>	Fértil	Desconocida	KLLA0E06138	53	3e-24
<i>KLSTE20</i>	Desconocido	Desconocida	KLLA0B13607	50	0
<i>KLSTE5</i>	Estéril	Desconocida	KLLA0F12023	27	3e-56
<i>KLSTE11</i>	Desconocido	Desconocida	KLLA0B13112	58	1e-60
<i>KLSTE7</i>	Desconocido	Desconocida	KLLA0C16577	52	1e-130
<i>KLFUS3</i>	Desconocido	Desconocida	KLLA0E10527	69	1e-150
<i>KLSTE12</i>	Estéril	Activación de la transcripción de genes de apareamiento	KLLA0E17193	35	1e-107
<i>KLSTE1</i>	Estéril	Fusión celular	KLLA0C01540	33	1e-17

Los componentes de respuesta a feromona han sido identificados y caracterizados en varias especies de hongos. Los promedios de identidad de secuencia entre las proteínas de *K. lactis* y sus ortólogos de otras especies son: 49% para *S. cerevisiae*, 42% para *Candida glabrata*, 34% para *Debaryomyces hansenii*, y 30% para *Yarrowia lipolitica* (Coria *et al.*, 2005). Estos datos concuerdan con los hallazgos obtenidos por estudios de comparación genómica sobre estas especies.

6.3.2 Respuesta a estrés osmótico. La participación de Ste50p, Ste20p y Ste11p en la rama Sho1p de la vía HOG ha sido extensivamente documentada en *S. cerevisiae*. De forma resumida, el osmosensor Sho1p de la vía recluta Pbs2p a la membrana durante la señalización. Tanto Sho1p como Pbs2p pueden unirse a Ste11p. Ste11p es activado por fosforilación mediada por las cinasas

Ste20p y Cla4p y requiere de Ste50p. Ste11p activa a Pbs2p, que en su lugar activa a Hog1p. La vía de respuesta a alta osmolaridad en *S. cerevisiae* también es regulada por la rama Sln1p, que consiste del sistema de transmisión de fosfato Sln1p-Ypd1p-Ssk1p. Sln1p es una histidina cinasa osmosensora, Ypd1p es una proteína de fosfotransferencia, y Ssk1p es un regulador de respuesta. Un choque hiperosmótico desactiva Sln1p, provocando la activación de Ssk2p y Ssk22p (dos cinasas redundantes) por medio del regulador de respuesta Ssk1p. Ssk2p y Ssk22p activan la MAPKK Pbs2p, que a cambio activa, por fosforilación, la MAPK Hog1p (Kawasaki *et al.*, 2008). Las dos ramas de activación de Hog1p no son redundantes, puesto que la rama Sln1p-Ssk1p tiene una función más prominente que la rama Sho1p-Ste11p bajo osmolaridad intermedia (KCl 0.1 M), pero ambas ramas funcionan bajo alta osmolaridad. Actualmente se desconoce si estas dos ramas están activas en *K. lactis*; sin embargo, el fenotipo de alta sensibilidad a sorbitol concentrado (1.0 M) y alta salinidad (KCl 0.5 M) mostrado por las mutantes *KlSte50Δ*, *KlSte20Δ* y *KlSte11Δ*, sugiere fuertemente que la vía Sho1p tiene una participación destacada en la osmoadaptación a condiciones de alto estrés (Kawasaki *et al.*, 2008). Más aún, la disrupción de *KlSTE11* provoca defectos de crecimiento severos en alto estrés osmótico en *K. lactis*, mientras que en las células de *S. cerevisiae*, la inactivación de Ste11p induce la sensibilidad a concentraciones hiperosmóticas sólo en escenarios *ssk1Δ* o *ssk2Δ ssk22Δ* (O'Rourke y Herskowitz, 1998).

Por otra parte, hay evidencia de que la mutante *Klste7Δ* es sensible al estrés osmótico alto y además se ha visto por coimmunoprecipitación que existe una asociación de *KlSte7p* con *KlHog1p* en *K. lactis*. Estos resultados podrían explicarse si *KlPbs2p* carece de actividad de cinasa y *KlSte7p* es capaz de reemplazarla, o bien, si *KlHog1p* puede ser fosforilada por actividades de MAPKK redundantes en la vía HOG (Kawasaki *et al.*, 2008). Ciertos resultados descartan la primera hipótesis puesto que la fosforilación de *KlHog1p* también se observa en las células mutantes *Klste7Δ*. Adicionalmente, se ha mostrado que la fosforilación de *KlHog1p* es completamente dependiente de *KlPbs2p*, lo cual sugiere que *KlHog1p* necesita ser reclutada por la actividad de andamio de *KlPbs2p* para que sea fosforilada por *KlSte7p*; i.e., *KlSte7p* no puede fosforilar *KlHog1p* soluble.

6.4 Homólogos de Spa2p y Bud6p en *Aspergillus nidulans*

En los sitios de crecimiento apical, múltiples complejos proteicos se ensamblan y coordinan para asegurar que el material de construcción entrante alcance los sitios de destino apropiados, y se mantenga el crecimiento polarizado. Uno de estos complejos es el polarisoma que consiste de Spa2p, Bud6p, Pea2p, y Bni1p en *S. cerevisiae*. Las hifas filamentosas difieren en su desarrollo y estilo de vida de las levaduras y asimismo regulan el crecimiento polarizado de distinta forma. Se han buscado homólogos del polarisoma en el hongo filamentoso modelo *Aspergillus nidulans* y se caracterizaron los homólogos Spa2p y Bud6p de *S. cerevisiae*, SpaAp y BudAp. En comparación con Spa2p de *S. cerevisiae*, SpaAp carece del dominio II pero tiene tres dominios adicionales que se

conservan entre los hongos filamentosos. Las cepas con reemplazo de genes y los estudios de localización muestran que SpaAp funciona exclusivamente en la punta de la hifa, mientras que BudAp funciona en sitios de formación de septos y posiblemente en puntas de hifas (Virag y Harris, 2006). También se ha mostrado que SpaAp no se requiere para el ensamblaje o mantenimiento del Spitzenkörper —una estructura presente exclusivamente en las puntas hifales en crecimiento activo, que se visualiza como un punto apical. Así, se propone que la función central del polarisoma en el crecimiento polarizado se mantiene pero con distintas contribuciones de los componentes del polarisoma al proceso.

A la fecha, los únicos hongos filamentosos en los que se han caracterizado homólogos de Spa2p y Bud6p son *Candida albicans*, y *Ashbya gossypii* (Virag y Harris, 2006). Aún más, Spa2p y Bud6p de *C. albicans* tienden a asociarse como un polarisoma equivalente (Virag y Harris, 2006). Sin embargo, debido a que estos hongos están estrechamente emparentados con *S. cerevisiae* (i.e., todos son miembros del subphylum Saccharomycotina), no está claro si ellos son representativos de un mayor espectro de hongos filamentosos.

6.5 KSR, una proteína de andamiaje que facilita la activación de MAPK en organismos multicelulares

Mientras que los andamios para la vía de MAPK están bien documentados en las células de levadura, de mosca y de gusano, la deducción de la importancia y función fisiológica de homólogos de mamífero ha sido menos exitosa (Nguyen *et al.*, 2002). Con base en la unión a múltiples componentes de una vía de señalización de MAPK, se ha sugerido que varias proteínas de mamífero funcionan como andamios de MAPK. Para la vía de señalización de Ras/MAPK, se han implicado tres proteínas —KSR, MP-1, y RKIP (Morrison, 2001). En las vías de estrés que emplean JNK, JIP-1 y MEKK1 se han identificado como andamios potenciales. En general, son definidos como andamios con base en su capacidad para unir dos o más componentes de la vía de cinasas. KSR ha sido clonado en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Nguyen *et al.*, 2002). Mediante experimentos de epistasis genética se ha posicionado KSR después de Ras y antes de MEK en la vía de señalización. KSR interactúa con varios componentes de la cascada de MAP cinasa, incluyendo Raf-1, MEK1/2 y ERK1/2. El modelo que actualmente está surgiendo es uno en el que KSR actúa como una proteína de andamiaje que coordina el ensamblaje de un complejo de MAP cinasa multiproteico localizado en membrana, un paso vital en la transducción de la señal mediada por Ras (Fig. 27).

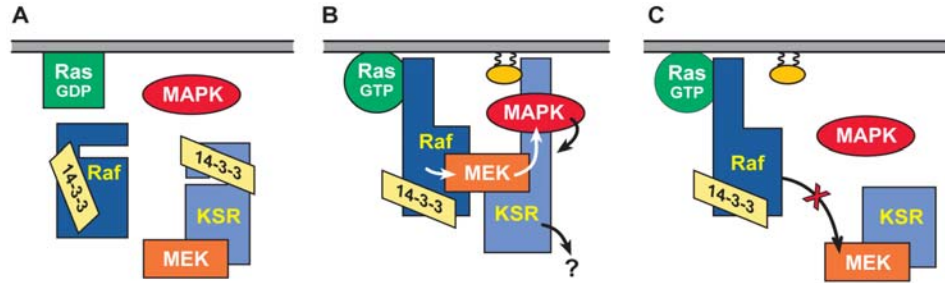


Fig. 27 Modelo de la función de KSR. **(A)** En la célula en reposo, Ras con GDP unido se localiza en la membrana plasmática, y las proteínas inactivas Raf y KSR se encuentran en el citoplasma. MEK inactiva interactúa establemente con el dominio CA5 de KSR; las proteínas 14-3-3 se unen a KSR y Raf y probablemente estabilizan sus conformaciones inactivas. **(B)** En respuesta a eventos de señalización de membrana, Ras cambia a GTP unido, e induce la translocación de Raf a la membrana plasmática, donde se activa. KSR también se transloca a la membrana, llevando a MEK consigo. Como resultado, MEK se localiza con Raf, su activador fisiológico. La liberación de las proteínas 14-3-3 y la localización de KSR en la membrana probablemente exponen los sitios de anclaje de MAPK. **(C)** Efecto inhibitorio del dominio de KSR aislada. MEK está unida al dominio CA5 de KSR y secuestrada en el citosol. Como resultado, la activación de MEK y MAPK está bloqueada. (Tomado de Morrison, 2001)

Los miembros de KSR constituyen una nueva familia de proteínas que muestra una notable similitud estructural global con proteínas de la familia Raf. Todos los miembros conocidos de KSR contienen cinco dominios conservados: una región característica de 40 residuos de las proteínas KSR (CA1), una región rica en prolina (CA2), un dominio de dedos de zinc rico en cisteína (CA3), una región rica en serina/treonina (CA4), y un dominio de cinasa putativa (CA5) (Morrison, 2001). En ambas Raf y KSR, el dominio de cinasa ocupa la mitad C-terminal de la proteína, y los dominios conservados menores se encuentran en la región N-terminal (Fig. 28).

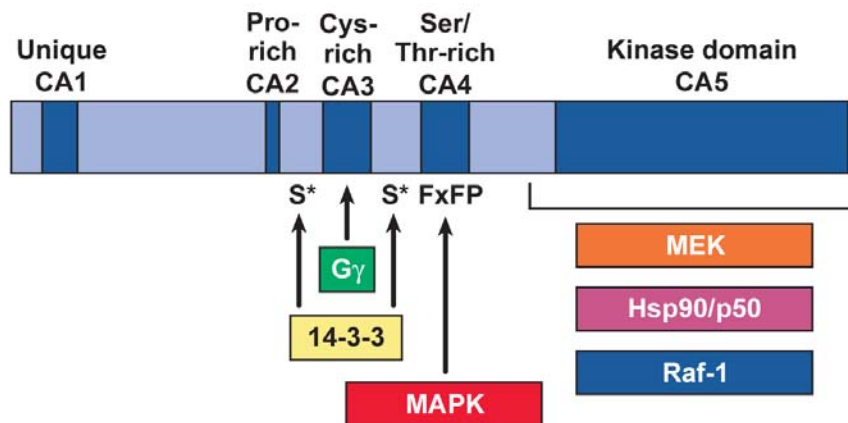


Fig. 28 Representación esquemática de KSR. Los miembros de la familia KSR contienen cinco dominios conservados: un dominio único de las proteínas KSR (CA1), una región rica en prolina (CA2), un dominio rico en cisteína (CA3), una región rica en serina/treonina (CA4), y un dominio de cinasa putativo (CA5). MEK1/2 (MEK), Raf-1, Hsp90 y p50^{cdc37} (Hsp90/p50) interactúan con el dominio CA5; ERK1/2 (MAPK) se une a un motivo FxFP encontrado en el dominio CA4, Las subunidades γ de proteínas G (G γ) se unen al dominio CA3, y las proteínas 14-3-3 interactúan con dos residuos fosfoserina (S*) localizados en ambos lados del dominio CA3. (Tomado de Morrison, 2001)

Además de las homologías de secuencia y de la estructura de dominio, existen otras numerosas similitudes entre KSR y Raf. Al igual que los genes *Raf*, los genes *KSR* se encuentran en vertebrados y mamíferos, pero no existe un homólogo obvio en levadura. Además, la localización subcelular de KSR es dinámica y cambia en respuesta a eventos de señalización, al igual que Raf. En las células en reposo, KSR se encuentra predominantemente en el citosol, pero bajo la activación de Ras, una fracción de KSR se transloca a la membrana plasmática y se encuentra como un complejo de alto peso molecular (Morrison, 2001).

Mientras que la pérdida de la expresión de KSR causa la mortandad del embrión en *D. melanogaster*, la pérdida de KSR tiene poco efecto en *C. elegans*. Aunque la genética apoya la idea de que KSR es un regulador positivo de la vía Ras/MAPK, los estudios de sobreexpresión en células de mamífero sugieren que KSR puede activar e inhibir la señalización de Ras/MAPK (Nguyen *et al.*, 2002).

Para probar la función de KSR como un andamio de MAPK *in vivo* en mamíferos, se han generado ratones deficientes (knock-out) de KSR. Se observó que a pesar de que KSR no es requerida para el desarrollo, la pérdida de KSR disminuye la activación de MAPK (Nguyen *et al.*, 2002). Se concluye por lo tanto que KSR es un andamio para la vía de MAPK que no es indispensable pero funciona principalmente para facilitar la activación de MAPK.

El trabajo experimental tuvo como objetivo caracterizar la proteína de anclaje Ste5p de *K. lactis*. Para ello, se amplificó el gen completo (el cual carece de intrones) empleando DNA genómico proveniente de la cepa 155 de *K. lactis* (*MATa ade2 his3 ura3*) (Fig. 23A); los oligonucleótidos empleados tuvieron la siguiente secuencia: (+1) ATGTCTAGAGGTAATAC (+17) y (+2300) GTTTAGAGAGAGAACGG (+2284). El gen amplificado se clonó en el vector pCR4-TOPO el cual tiene un tamaño de 3.9 Kb y tiene como marcadores selectivos la resistencia a Kanamicina y Ampicilina (Fig. 23A). Se utilizó el protocolo sugerido por el fabricante (Invitrogen) y se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Con las transformantes obtenidas se hicieron minipreparaciones de plásmido para analizarlas mediante digestiones con enzimas de restricción para comprobar que correspondiera al fragmento deseado, además se secuenció y se comparó con la secuencia disponible de la base de datos (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>) para confirmar que se trataba del gen *KISTE5*.

Posteriormente, se subclonó un fragmento de 1.3 Kb (desde +5 hasta +1299) del gen *KISTE5* en el vector YIp352 (Fig. 23B). Es necesario señalar que YIp352 es un vector de integración de levadura, y lleva el marcador *URA3* que sirve para complementar la auxotrofia a uracilo que contiene la cepa receptora. Después de la clonación, el vector YIp352+*KISTE5* Δ se digirió con *HpaI* y *SpeI* para hacerlo lineal y permitir su integración cromosomal por doble recombinación homóloga —la transformación y ensayos genéticos de levaduras se realizaron de acuerdo con las técnicas estándares (Adams *et al.*, 1998). Al transformar las levaduras con esta construcción, se espera un evento de recombinación homóloga en el que el gen silvestre original es interrumpido por el plásmido. Así, quedaron aproximadamente 770 pb del lado 5' del gen original —más 3.8 Kb correspondientes al tamaño total del vector (Fig. 23C). Cabe aclarar que la interrupción del gen *KISTE5* se obtuvo en una cepa de cada sexo: 155 (*MATa*) y 12/8 (*MAT α lysA argA ura3*).

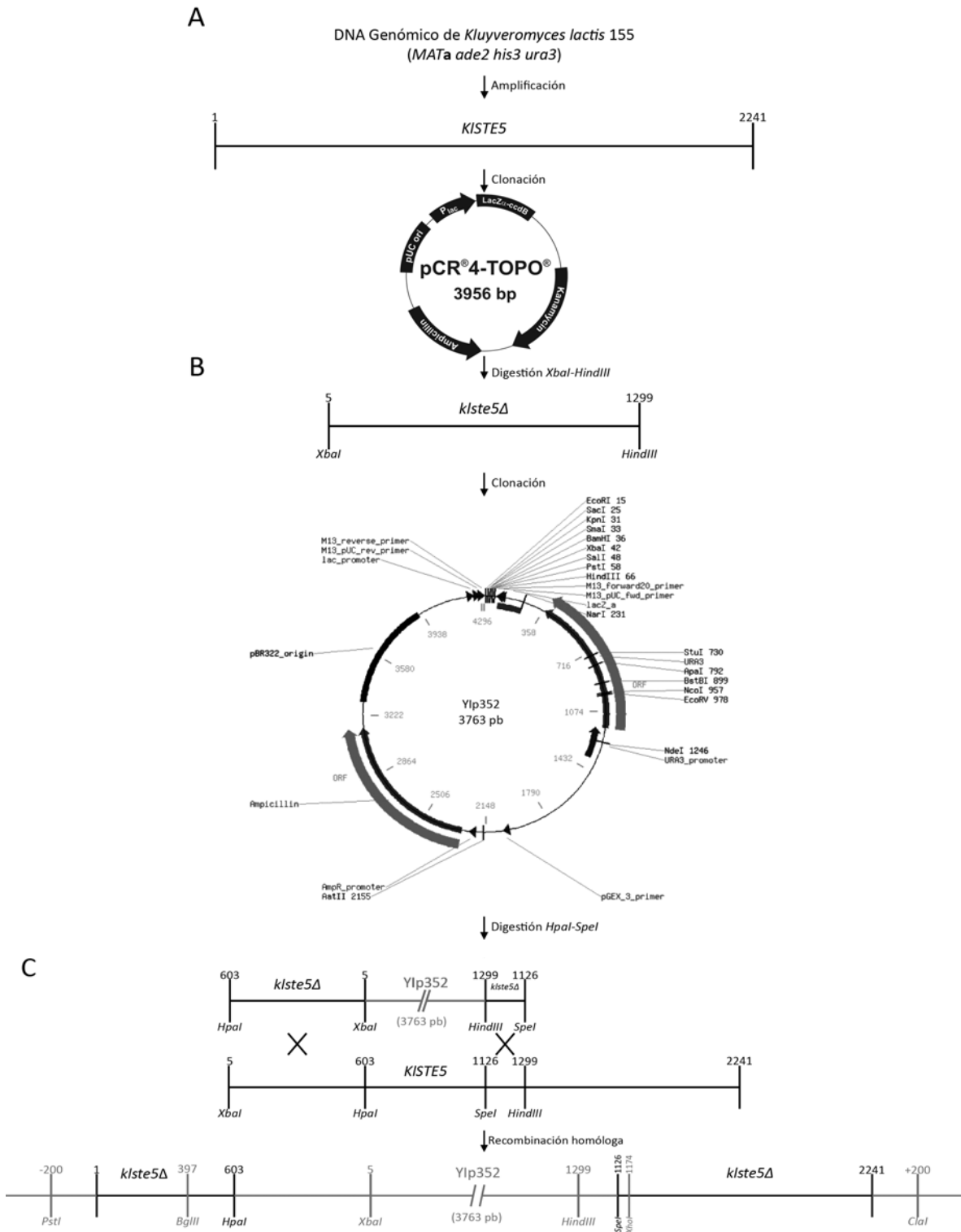


Fig. 23 Interrupción del gen *KISTE5*. **(A)** El gen *KISTE5* se amplificó por PCR a partir de DNA genómico, y se clonó en el vector pCR4-TOPO que confiere resistencia a Kanamicina y Ampicilina. **(B)** Posteriormente se subclonó un fragmento de 1299 pb mediante una digestión *XbaI-HindIII* en el vector Ylp352 el cual lleva un marcador *URA3*. **(C)** El plásmido obtenido en B se digirió con *HpaI* y *SpeI* para hacerla lineal y permitir, por recombinación homóloga, su integración cromosomal. De esta forma se logró la interrupción del gen *KISTE5* tanto en una cepa *MATa* como en una cepa *MATα*. [En la última figura, también se marcan los sitios de restricción empleados en el ensayo de Southern blot (*PstI-ClaI*) descrito más adelante, así como aquellos usados para obtener la sonda (*BglIII-XhoI*).]

Por ensayos de Southern blot —los cuales se hicieron de acuerdo con las técnicas estándares de biología molecular (Sambrook y Russel, 2001)— se comprobó la integración y la interrupción del gen en las mutantes. En dichos ensayos se empleó una sonda *BglIII-XhoI* (777 pb), y el DNA genómico purificado se digirió con *PstI* y *Clal* —que cortan 200 pb río arriba y río abajo de *KISTE5*, sin cortes intermedios (Fig. 23C). Esto generó una banda de hibridación correspondiente a ~6.5 Kb (*Ylp352/KISTE5Δ*) para las cepas mutantes y otra hibridación correspondiente a ~2.5 Kb (*KISTE5*) para las cepas silvestres (Fig. 24).

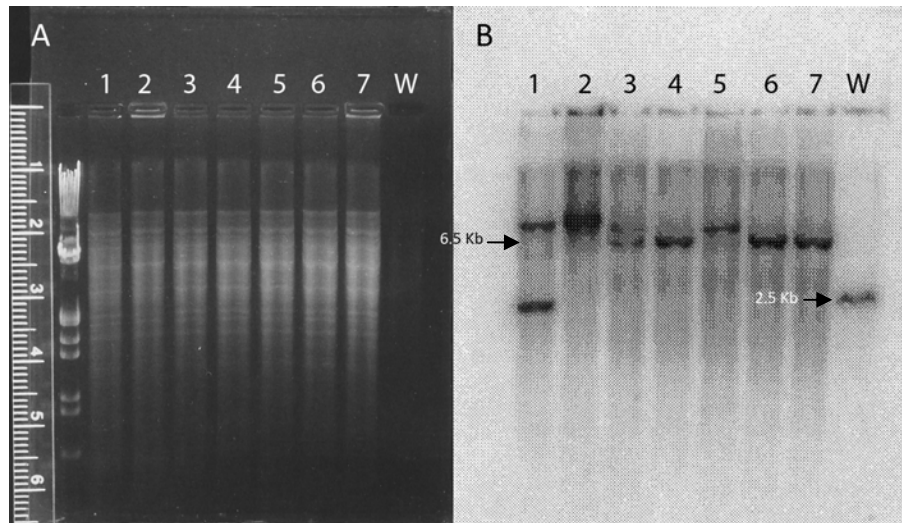


Fig. 24 Ensayo de Southern Blot. Se aprecia la banda esperada de 6.5 Kb para las cepas mutantes en las muestras 3, 4, 6 y 7 y la banda de 2.5 Kb para la cepa silvestre (W). **(A)** Gel con el DNA digerido con *PstI* y *Clal*, que se transfirió a una membrana de nylon para hacer el Southern blot. **(B)** Southern blot realizado con la sonda *BglIII-XhoI*. El DNA se extrajo de la cepa *K. lactis* 155, con el otro sexo se hizo el mismo experimento y también se analizaron las transformantes por Southern blot obteniendo resultados similares.

Una vez que se comprobó que las transformantes numeradas como 3, 4, 6 y 7 tenían el evento de integración deseado, se procedió a analizar el fenotipo durante el apareamiento. El ensayo cualitativo demostró que el fenotipo de las cepas mutantes *klste5Δ* de ambos sexos es de esterilidad, lo que indica que el producto del gen *KISTE5* es esencial en la transmisión del estímulo de la feromona sexual (Fig. 25).

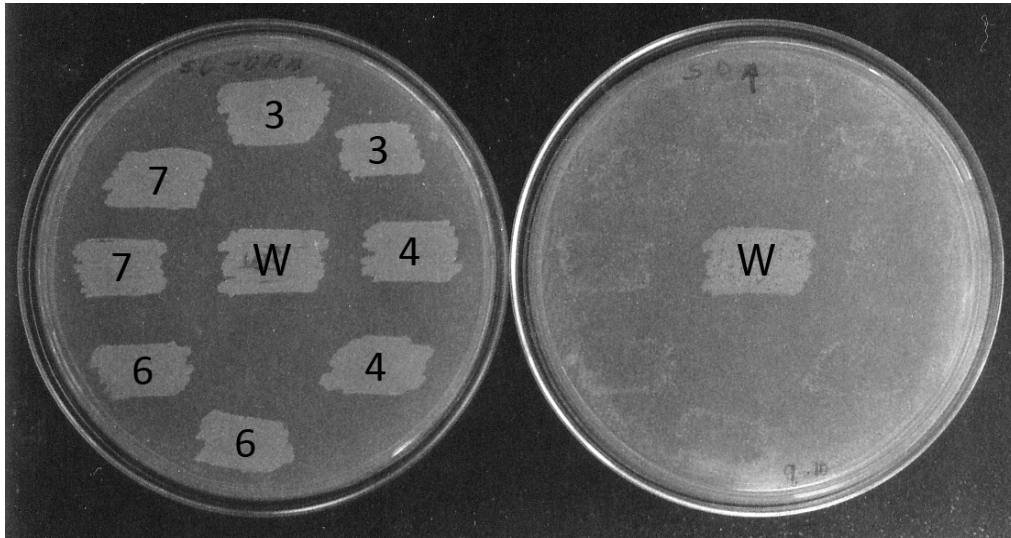


Fig. 25 Apareamiento cualitativo de las transformantes 3, 4, 6 y 7 (todas por duplicado). La caja de la izquierda muestra el crecimiento de los haploides silvestre (W) y mutantes en medio SD-URA, todos correspondientes al sexo *MATa*. La caja de la derecha muestra los diploides obtenidos en medio selectivo al cruzar las cepas de la caja de la izquierda con un césped de células del sexo opuesto (*MATα*). Es claro que sólo la cepa silvestre fue capaz de aparearse, por tanto, las mutantes *klste5Δ* son estériles.

Posteriormente se realizaron ensayos de epistasia, que principalmente consistieron en observar el resultado de apareamiento de una cepa *klste5Δ+Gα** (subunidad α activa de la proteína G heterotrimérica). Esta cepa nos permite saber si *KlSte5p* es indispensable en la vía de apareamiento, y si su ubicación en la vía es anterior o no de $G\alpha$. Para realizar dichos ensayos, primero se tuvo que transformar una cepa *klste5Δ MATa* —obtenida de la construcción descrita previamente— con cada uno de los plásmidos episomales *YEpkD352*, *YEpkD352+Gpa1** y *YEpkD352+Gpa1*. Alternativamente se transformó una cepa *K. lactis MATa* silvestre con cada uno de esos tres plásmidos por separado. Cabe mencionar que el plásmido *YEpkD352* contiene el marcador *HIS3* y sirve para complementar la auxotrofia a histidina que contiene la cepa receptora. Después de comprobar el fenotipo de auxotrofia de las cepas transformantes, se realizaron ensayos de apareamiento cualitativo con los cuales se comprobó que la subunidad $G\alpha$ activa no promueve el apareamiento en una mutante *klste5Δ* (Fig. 26A). En cambio, aquellas cepas en las cuales el gen *KISTE5* era silvestre, se observó que $G\alpha$ activa sí promueve el apareamiento (Fig. 26B). Los resultados anteriores indican que la vía que activa $G\alpha$ requiere de *KlSte5p* y sugiere que en ella participa el módulo completo de MAP cinasas. Alternativamente, se hicieron los mismos experimentos pero con el sexo opuesto y se obtuvieron resultados similares.

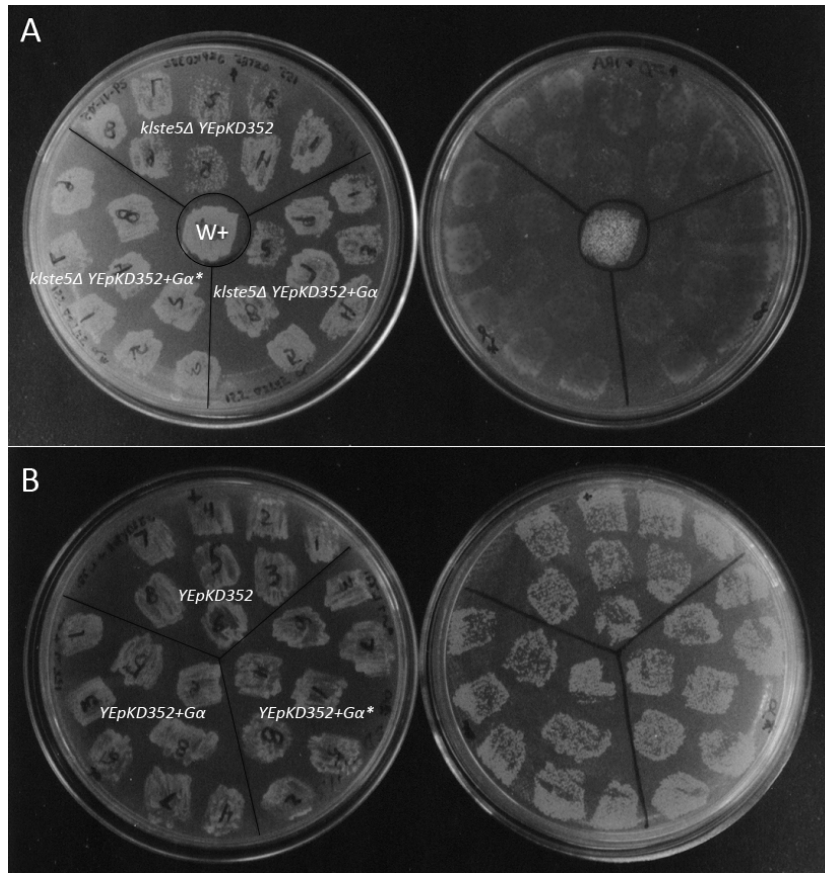


Fig. 26 Ensayos de epistasia. **(A)** Apareamiento de cepas *klste5Δ* YEpKD352, *klste5Δ* YEpKD352+Gα y *klste5Δ* YEpKD352+Gα*. La caja de la izquierda muestra el crecimiento de los haploides silvestre con capacidad de sintetizar histidina (W+) y mutantes, todos correspondientes al sexo *MATa*. La caja de la derecha muestra los diploides obtenidos en medio selectivo al cruzar las cepas de la caja de la izquierda con un césped de células del sexo opuesto (*MATα*). Se aprecia que las tres cepas mutantes han perdido su capacidad de apareamiento. **(B)** Apareamiento de cepas *K. lactis* YEpKD352, YEpKD352 Gα y YEpKD352 Gα*. La caja de la izquierda muestra el crecimiento de los haploides, todos correspondientes al sexo *MATa*. La caja de la derecha muestra los diploides obtenidos en medio selectivo al cruzar las cepas de la caja de la izquierda con un césped de células del sexo opuesto (*MATα*). En todos los casos se ha conservado la capacidad de apareamiento.

DISCUSIÓN

1 Proteínas de andamiaje

La mayoría de las ideas concernientes a las proteínas de andamiaje han sido influenciadas por los trabajos sobre el andamio prototipo de proteína cinasa activada por mitógeno, Ste5p, una proteína de levadura involucrada en la vía de la MAPK Fus3. Además, los trabajos que tienen como premisa que Ste5p une los tres componentes de cinasas de la cascada de MAPK, emplean métodos modernos de interacción proteica que han identificado una lista creciente de moléculas que pueden encajar operacionalmente con esta descripción de un andamio parecido a Ste5p. Ninguno de estos andamios para vías de MAPK muestran homología significativa con Ste5p o entre ellos mismos (con excepción de los dominios de cinasa en Pbs2p y la MAPK cinasa cinasa MEKK1) (Burack y Shaw, 2000).

Se ha dicho que los andamios mantienen la especificidad de la vía de señalización —una función que varios han descrito como “aislante” o como “estabilizadora” de lo que serían, de otra manera, débiles interacciones entre las cinasas de una cascada. También, se ha dicho que los andamios catalizan la activación de los componentes de la vía. Los andamios de MAPK pueden situar las cinasas de manera que se incrementen directamente sus interacciones mutuas, teóricamente aumentando la tasa de transferencia de fosfato. Ejemplos de proteínas que pudieran ser consideradas como “andamios catalíticos” incluyen Ste5p, compañero 1 de MAPK cinasa (MP1), proteína reactiva (JIP1) a cinasa c-jun N-terminal (JNK), proteína JNK/SAPK (proteína cinasa activada por estrés) de activación 1 (JSAP1) y el supresor de cinasa de Ras (KSR) (Breitkreutz y Tyers, 2006).

Existe otra perspectiva sobre la función del andamio en una transducción de señal no mediada por MAPK. En este modelo, el andamio funciona para localizar conjuntamente un grupo de moléculas que participan en el mismo proceso de señalización, en un área específica de la célula. En contraste con las vías mediadas por MAPK, las proteínas localizadas conjuntamente no necesariamente actúan directamente unas con otras, más bien están involucradas en la misma vía de señalización. Estudios recientes sugieren que los andamios incrementan la eficiencia de la propagación de la señal (Breitkreutz y Tyers, 2006).

Ambas perspectivas del funcionamiento de los andamios no son mutuamente excluyentes: los andamios catalíticos también pueden localizar conjuntamente los componentes y dicha localización es una forma de aumentar las interacciones mutuas y por tanto la eficiencia de la señalización.

Se ha sugerido que la naturaleza de varios pasos por parte de las vías de MAPK permite respuestas de tipo interruptor que eliminan eficientemente el “ruido”. El modelo que representa la señalización de tipo interruptor (conocido como el modelo de “ultrasensibilidad”) originado en la vía de MAPK se basa en la naturaleza de multicomponente de la vía y en el requerimiento de dos eventos distintos de fosforilación para activar ambas MAPKK y MAPK (Burack y Shaw, 2000). El modelo requiere dos supuestos relacionados: primero, que todas las enzimas (MAPKKK, MAPKK, y MAPK) se difunden libremente entre sí mismas (i.e. no hay un complejo de señalización); segundo, que las fosforilaciones dobles que activan la MAPKK y la MAPK ocurren de forma de proceso no progresivo. (Proceso no progresivo describe un tipo de reacción en la cual la cinasa se disocia de su proteína sustrato después de que el primer fosfato es transferido. El segundo evento de fosforilación requiere una segunda unión de la cinasa a su proteína sustrato.)

Sin embargo, los modelos actuales de la función de los andamios son incompatibles con el modelo cuantitativo de señalización de “tipo interruptor” porque las funciones del andamio violan los supuestos críticos necesarios del modelo. Primero, los andamios limitarán la difusión mutua de los componentes de la vía. Segundo, al mantener cercanas las cinasas y sus sustratos, el andamio convierte un proceso de reacción no progresivo en uno progresivo. Por tanto, además de limitar la amplificación, la función del andamio también descarta el modelo recientemente propuesto en el cual las vías de MAPK generan respuestas “tipo interruptor”.

Ste5p fue el primer andamio reconocido para una vía de MAPK y una tres proteínas cinasas activadas en secuencia en una vía de MAPK de levadura. En respuesta a feromona sexual, G β recluta Ste5p en la membrana plasmática. La molécula forma oligómeros, en los que aparentemente quedan unidos varios componentes de la vía independientemente de la presencia de feromona. Empleando una combinación de mutantes de importación nuclear, y de moléculas sintéticas de Ste5p que tienen varios grados de eficiencia de importación nuclear, se ha identificado una función inesperada de Ste5p; en específico, el traslado del complejo Ste5p a través del núcleo es requerido para mantener los constituyentes de la vía en un estado competente para participar en la transducción de señales. Esto sugiere que los andamios tienen distintas funciones aparte de ser un sitio de unión para tres distintas cinasas.

Debido a que la función de un andamio es juntar una serie de proteínas distintas, la concentración de un andamio necesita estar titulada cercanamente a la concentración de los componentes que une (Burack y Shaw, 2000). Mucha proteína de andamiaje diluirá los componentes de la vía, al secuestrar una cinasa de activación de su sustrato.

Si un “andamio” desempeña estrictamente una función catalítica y está presente en la célula en cantidades casi estequiométricas, entonces, la sobreexpresión tendrá poco efecto en la transducción. Esto nos sugiere que la “prueba” estándar de un andamio, de que la sobreexpresión aumenta la señalización, es difícil de lograr y quizá sólo sea posible cuando los ligandos del andamio también están sobreexpresados (Burack y Shaw, 2000). Por tanto, la inhibición de la señalización asociada con la sobreexpresión de un candidato a andamio ha de ser un criterio para definir una proteína de andamiaje (Fig. 29).

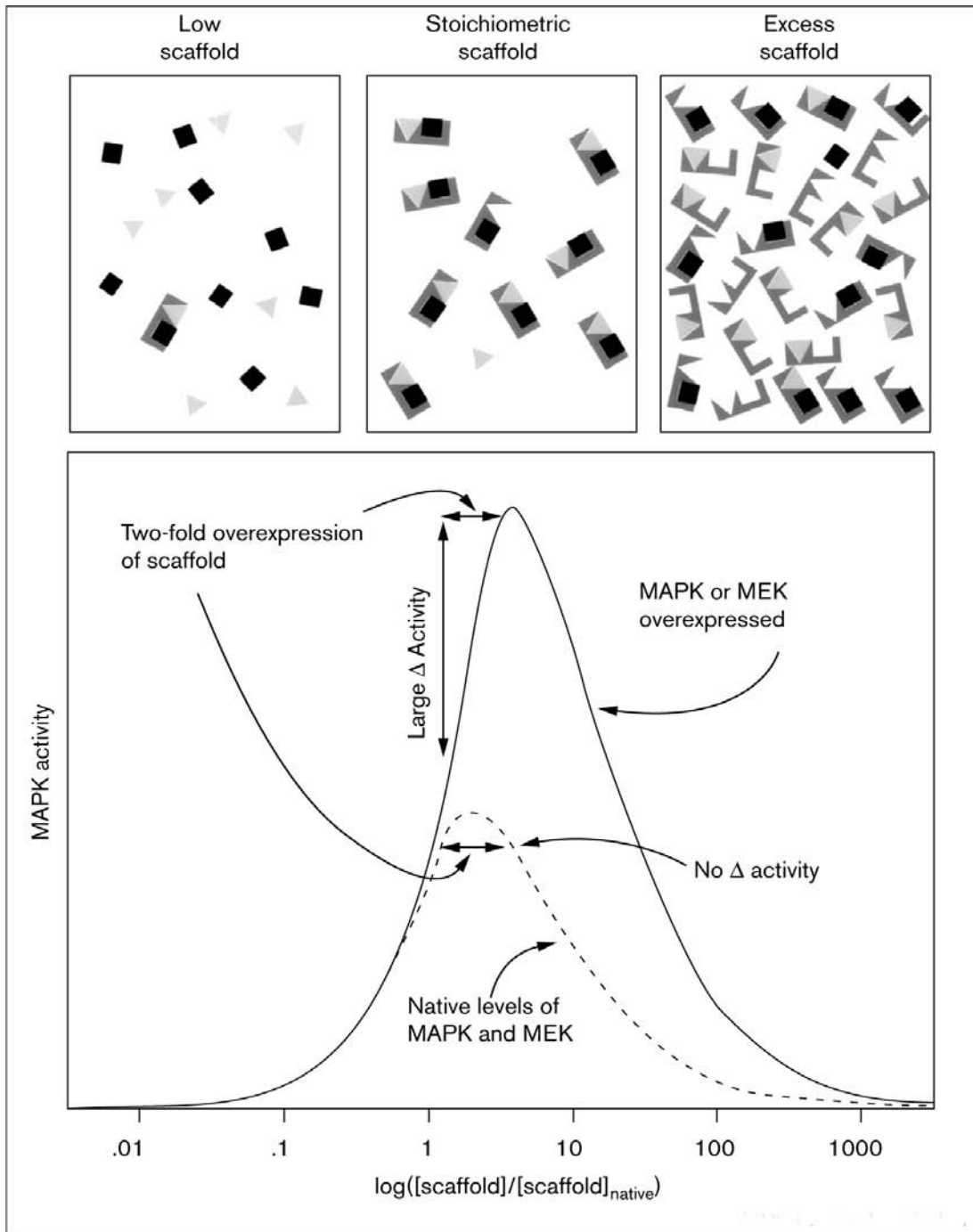


Fig. 29 La sobreexpresión de un andamio simple pasivo puede generar varios resultados distintos dependiendo de la concentración nativa del andamio y las concentraciones relativas de los ligandos. Cuando los andamios y los ligandos están inicialmente presentes en niveles casi estequiométricos (línea punteada), la sobreexpresión del andamio puede resultar en un cambio pequeño o incluso en un decremento del nivel de señalización. La señalización incrementada se predice sólo cuando las moléculas del ligando también se sobreexpresan (línea sólida). (Tomado de Burack y Shaw, 2000)

También se ha supuesto que los andamios sujetan los distintos componentes cercanos a sí mismos, por lo que simplifican la transducción de la señal. Pero si la función de los andamios es la de

reducir la complejidad, ¿por qué es que la evolución ha conservado este complejo sistema de interacción de cinasas? ¿Por qué no sólo usar una cinasa?

Otra posible ventaja de las múltiples etapas es la de permitir varias oportunidades para una regulación fina. Pero no existe información que muestre que una regulación fina ocurre en los pasos distales y mediados por andamio (i.e. la activación de las MAPKKs y las MAPKs), de la cascada.

Como su nombre lo indica, originalmente se pensó que los andamios actuaban como sitios de anclaje pasivos, funcionando para localizar y concentrar los componentes apropiados para la transmisión de la señal. Sin embargo, al menos dos líneas de evidencia insinúan que Ste5p quizá desempeñe una función más activa en la transmisión de la señal. Primero, estudios *in vitro* en donde se reconstituyó la cascada de MAPK de respuesta a feromona de levadura sugieren que Fus3p es activada de manera escalonada distinta, con la mayor actividad lograda en presencia de Ste5p. Segundo, la sujeción sintética de las cinasas a Ste5p por medio de dominios de interacción de proteínas ectópicas rescata sólo parcialmente el defecto de apareamiento de las mutantes *ste5* (Burack y Shaw, 2000).

Se ha cristalizado un polipéptido de Ste5p en complejo con Fus3p (Fig. 30). El péptido de Ste5p se extiende sobre la parte posterior de Fus3p y ocupa un sitio del lóbulo N-terminal de la cinasa (sitio A) y otro en el lóbulo C-terminal (sitio B). Una región intermedia desordenada de ocho residuos enlaza las dos regiones de unión de MAPK del péptido Ste5p. En el sitio A, Ste5p se entrelaza en la estructura normal β -laminar de cinco hebras del lóbulo N-terminal para crear una arquitectura de β -sándwich de siete hebras (Breitkreutz y Tyers, 2006). El sitio B se encima precisamente con un surco en la superficie de la MAPK previamente descrito que se une a péptidos de ataque presentes en una variedad de sustratos, así como en la MAPK río arriba.

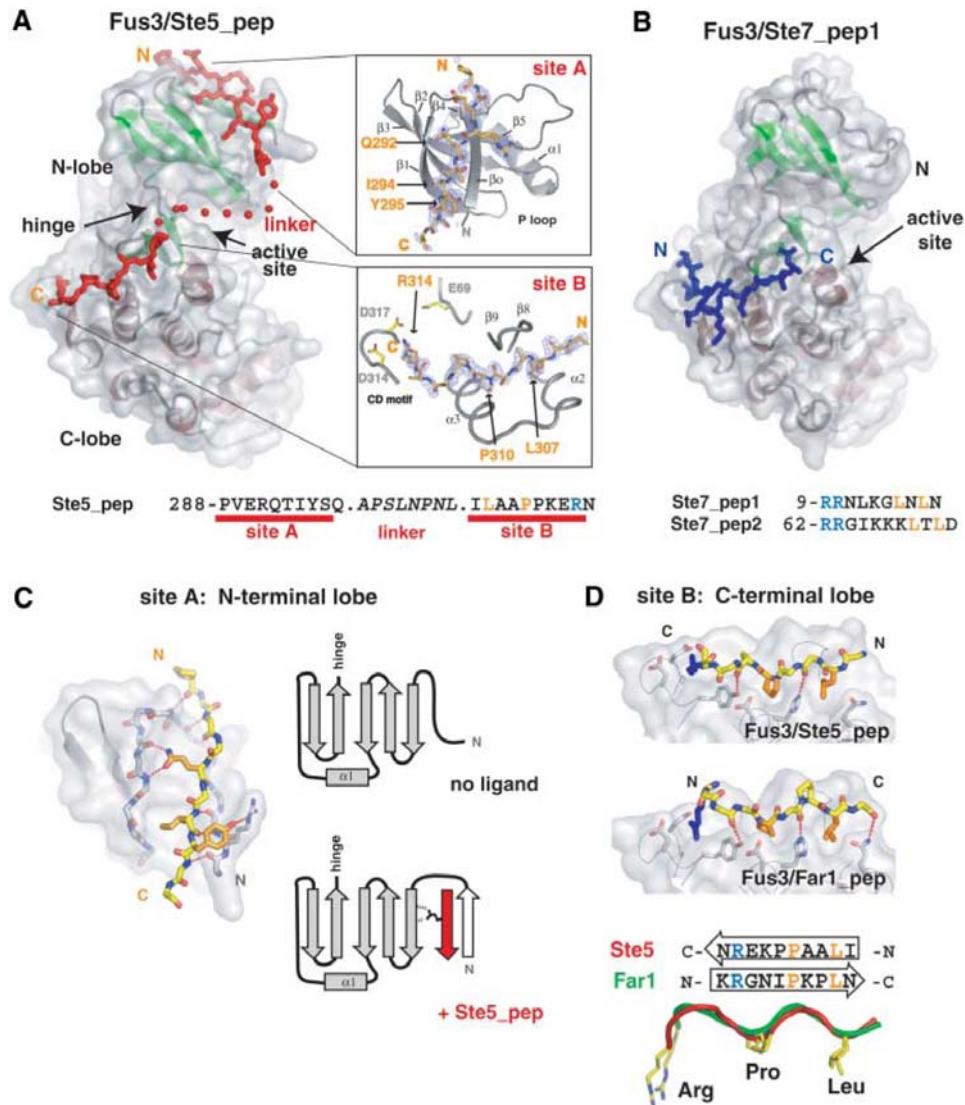


Fig. 30 Estructura del complejo Fus3p-Ste5p y comparación con complejos canónicos de anclaje. **(A)** Estructura cristalizada del complejo Fus3p/Ste5p_pep [Ste5p_pep: polipéptido de ~30 residuos (288 a 316) de Ste5p]. Ste5p (rojo) se une a Fus3p de forma bipartita. A la derecha se muestran acercamientos del sitio A y sitio B. **(B)** Estructura de Fus3p en complejo con un motivo canónico de anclaje de Ste7p (Ste7p_pep1). **(C)** Interacciones proteína-proteína en el sitio A. La mitad N-terminal de Ste5p_pep adopta una conformación β -laminar e inicia la formación de una nueva β -lámina en la porción N-terminal de Fus3p. Esta hebra forma puentes H eje-eje con la región N-terminal de Fus3p (los puentes H están indicados con líneas rojas punteadas). A la derecha se muestra una ilustración esquemática en estructura secundaria de los elementos del lóbulo N-terminal del complejo con Ste5p desenlazado y enlazado. **(D)** Comparación de las interacciones proteína-proteína en el surco canónico de anclaje de MAPK (sitio B) entre los complejos Fus3p/Ste5p_pep y Fus3p/Far1p_pep. (Tomado de Bhattacharyya *et al.*, 2006)

Inesperadamente, el péptido Ste5p induce alostéricamente la autofosforilación de la tirosina en el aro de activación T-X-Y de Fus3p, lo que conlleva a la activación de la cinasa en grado sustancial (Fig. 31). Este evento de autoactivación es de naturaleza intramolecular y requiere un conector de longitud óptima entre las dos regiones de unión de MAPK en el péptido Ste5p. Ste5p también es fosforilado en un residuo de treonina por Fus3p autoactivada. La mutación de este sitio de

modificación de Ste5p incrementa la expresión de un gen que responde a feromona, lo que implica que el módulo Ste5p-MAPK atenúa su propia actividad (Breitkreutz y Tyers, 2006).

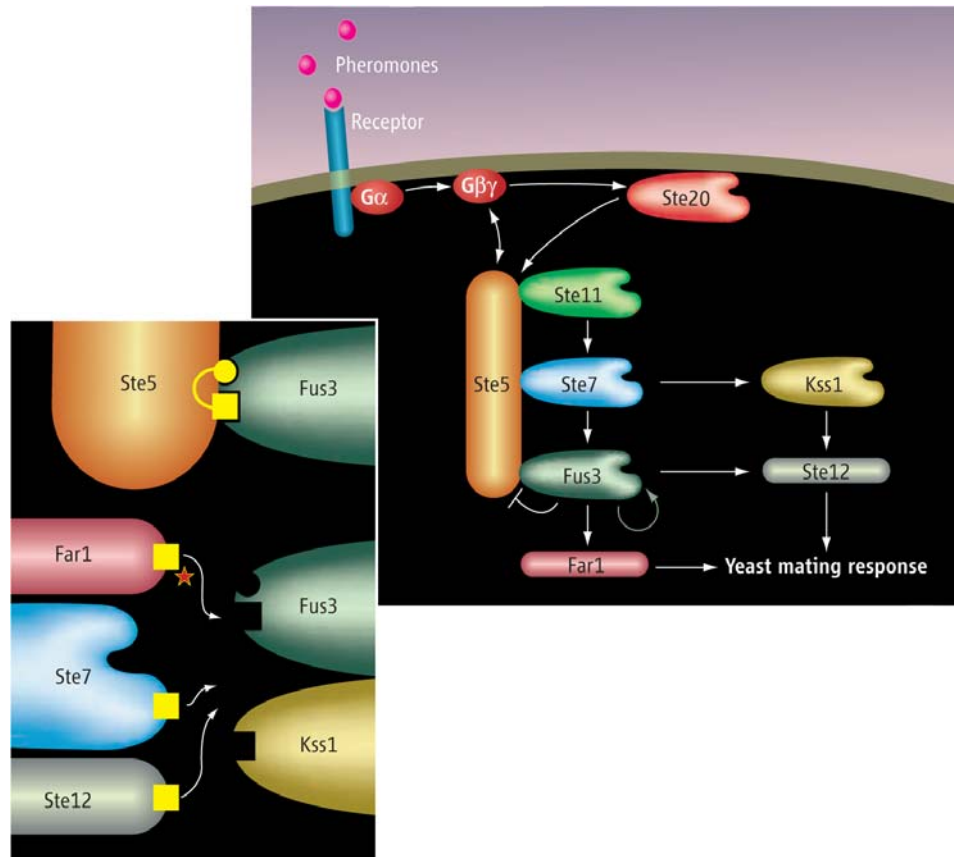


Fig. 31 Vía de apareamiento de levadura. El círculo indica el motivo peptídico de Ste5p que atraca específicamente en el sitio A de Fus3p. Los cuadros indican los motivos peptídicos de Ste5p, de la MAPK cinasa Ste7p, y de varios sustratos que atracan en los sitios B tanto de Fus3p como de Kss1p; la estrella en Far1p indica que es un sustrato específico de Fus3p. No se han representado todos los componentes de señalización o sustratos. (Tomado de Breitkreutz y Tyers, 2006)

No está claro cómo es que la supuesta tensión ejercida por el conector de Ste5p en los lóbulos de Fus3p facilita la autofosforilación. Sin embargo, este tipo de mecanismo no está totalmente sin precedente. Por ejemplo, la modulación del lóbulo N-terminal por medio de interacciones peptídicas se emplea para activar otras cinasas, tales como la proteína cinasa A o la proteína/Akt cinasa B (Breitkreutz y Tyers, 2006). En otro sentido, Ste5p es vagamente análoga a la proteína ciclina, que une y activa las cinasas dependientes de ciclina que controlan el ciclo de división celular. Finalmente, la fosforilación intramolecular también se ha documentado como una etapa de maduración intrínseca de las proteínas cinasas reguladas por una fosforilación de tirosina doble-específica las cuales están distantemente emparentadas con las MAPKs. El hecho de que Fus3 se fosforile a sí misma contradice su clasificación como una cinasa serina-treonina, y abre la pregunta de si Fus3 será capaz de fosforilar otros sustratos sobre residuos de tirosina.

Por otro lado, se sabe que Kss1p también se activa en la respuesta a feromona. Sin embargo, Kss1p no interactúa con el fragmento de Ste5p que une a Fus3p, y en cambio requiere de Ste7p para el reclutamiento a Ste5p. Debido a que Kss1p aún es activada por feromona en presencia de una forma catalíticamente inactiva de Fus3p, parece posible que tanto Fus3p como Kss1p se encuentren juntas en complejos de Ste5p oligomerizado, que son necesarios para la señalización (Burack y Shaw, 2000).

Si Ste5p desencadena la activación parcial de Fus3p por medio de la fosforilación autocatalítica de tirosina, entonces ¿cuál es la función de Ste7p? Se ha demostrado que la respuesta a feromona requiere de la doble fosforilación mediada por Ste7p de Fus3p y no de la monofosforilación mediada por Ste5p (Burack y Shaw, 2000).

A diferencia de los componentes enzimáticos conservados de las redes de señalización, los andamios no son fácilmente reconocidos sólo por similitud de secuencias y por eso han sido poco estudiados a la fecha. Además el vago nombre de “andamio” quizá no ha ayudado al perfil de estas interesantes proteínas.

Las siguientes son una serie de interrogantes que no se han aclarado y que plantean el rumbo por el cual se podría dirigir la investigación sobre las proteínas de andamiaje:

- ¿De qué manera los andamios de MAPK afectan la cinética de las cascadas de cinasas *in vitro*?
- ¿Existe amplificación en la vía de MAPK?
- ¿La señalización de la vía de MAPK en general presenta un comportamiento “tipo interruptor” y cómo es que los andamios afectan este proceso?
- ¿Los andamios para la vía de MAPK realmente funcionan para mantener la fidelidad de la vía (i.e. previenen la intercomunicación)?

2 *Kluyveromyces lactis*

Las cascadas de transducción de señales en *K. lactis* comparten elementos conservados encontrados en las vías de señalización de otras especies de hongos, especialmente en *S. cerevisiae*. Sin embargo, *K. lactis* ha mostrado características especiales y únicas en comparación con otras especies de hongos. Una de las características más sorprendentes es la función de la subunidad KIGpa1 en la vía de apareamiento. Dicha función fue inferida por estudios genéticos de una cepa con el gen *Klgpa1* cancelado, en donde la disrupción del alelo *KIGpa1* resultó en células haploides viables con una deficiencia de apareamiento (Coria *et al.*, 2005). En contraste, Gpa1p de *S. cerevisiae* tiene una función negativa en la vía de respuesta a feromona; lo que significa que la disrupción del gen causa el arresto en la fase G1, con una capacidad temporal de apareamiento, mientras que la sobreexpresión reduce la respuesta a la feromona y el apareamiento.

La vía de respuesta a feromona involucra distintos tipos de señalización por proteínas G. En *S. cerevisiae* la señal de feromona durante el apareamiento es transducida por un dímero $\beta\gamma$ libre, en *Schizosaccharomyces pombe* por una subunidad $G\alpha$ que activa la producción de cAMP, y en *K. lactis* por las subunidades $G\alpha$ y $G\beta$, muy probablemente actuando en paralelo.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la cinasa Ste7p no sólo participa en el apareamiento sino también en el crecimiento filamentoso y en el crecimiento invasivo; sin embargo, una cepa mutante que carezca de Ste7p muestra una osmotolerancia normal, lo que indica que esta cinasa no participa en la respuesta HOG en esta especie de levadura (O'Rourke y Herskowitz, 1998; Kawasaki *et al.*, 2008). Por otra parte, en *K. lactis* se ha aportado evidencia de que KISTe7p, además de KISTe50p, KISTe20p y KISTe11p, también participa en la vía de respuesta a feromona y en la vía de respuesta a alta osmolaridad. A pesar del uso común de las proteínas cinasas en ambas vías, las observaciones también indican que no existe intercomunicación entre estos dos sistemas de señalización; i.e., la feromona sexual no induce la respuesta de alta osmolaridad y las condiciones de alto estrés osmótico no inducen el apareamiento.

En *K. lactis* se ha encontrado que la MAPKKK Ste11p (KISTe11p) actúa tanto en la vía de apareamiento como en la de respuesta osmótica mientras que el andamio KISTe5p y la MAPK KIFus3p son específicos del apareamiento. La cinasa activada p21 KISTe20p y la cinasa KISTe50p participan en ambas vías. Algunos experimentos de asociación proteica muestran interacción de KISTe50p y KISTe20p con $G\alpha$ y $G\beta$, respectivamente, las subunidades de proteína G involucradas en la vía de apareamiento. Tanto KISTe50p como KISTe20p también interactúan con KISTe11p. Mutantes de *K. lactis* con disrupción de los genes *PBS2* (KIPBS2) y *KIHOG1* de la vía canónica de respuesta a estrés osmótico resultan en mutaciones sensibles a alta salinidad y sorbitol concentrado, pero prescindibles para el apareamiento (Kawasaki *et al.*, 2008). Las mutaciones que eliminan la actividad de la MAPKK KISTe7p tienen un fuerte efecto en el apareamiento y también muestran sensibilidad al estrés osmótico.

Los resultados experimentales aquí mostrados indican que K1Ste5p es similar a Ste5p de *S. cerevisiae* tanto en secuencia como en función. El valor de 60.8% de similitud entre estas dos proteínas no es muy alto pero sí es significativo, ya que el alineamiento se realizó contra las secuencias de la base de datos UniProt Knowledgebase, y no hubo otras proteínas que fueran más similares. Sin embargo, el hecho de conocer la secuencia de K1Ste5p no basta para inferir si posee los mismos dominios que Ste5p de *S. cerevisiae*. Es por esto que sería interesante modelar la estructura terciaria de K1Ste5p para poder elucidar la presencia de dominios en común con *S. cerevisiae*. También son necesarios los estudios bioquímicos y moleculares para caracterizar correctamente la proteína. Cabe señalar, que a la fecha tampoco se conocen con exactitud todas las proteínas con las cuales interactúa K1Ste5p. Así, es necesario realizar ensayos de doble híbrido para ubicar la proteína correctamente en la cascada de señalización y para conocer sus interacciones con otros componentes de la vía de MAPK de *K. lactis*.

A pesar de que se desconocen muchos de los aspectos relacionados con K1Ste5p, nuestros ensayos de epistasis sugieren que K1Ste5p es indispensable para que se transmita la señal de apareamiento y que su ubicación en la cascada de señalización es posterior a la activación de la proteína G. Debemos recordar que las mutaciones que causan la activación constitutiva de la vía de respuesta a feromona han sido invaluable para determinar por ensayos de epistasis el orden temporal en el que funcionan varios productos génicos. El orden en el que varios productos génicos actúan en la vía de respuesta a feromona se ha inferido por la capacidad de las mutantes insensibles a feromona de bloquear estas señales constitutivas post receptor. Si la mutante insensible falla en bloquear la señal, entonces se piensa que el producto génico correspondiente ejecuta su función antes de la etapa constitutivamente activa, mientras que si la mutante insensible bloquea la señal, entonces no es posible distinguir si afecta la misma etapa o una etapa siguiente de la vía (Hasson *et al.*, 1994).

Finalmente, queda decir que K1Ste5p es un componente indispensable en la vía de apareamiento de *K. lactis* y que su estudio es fundamental para comprender con mayor profundidad las cascadas de señalización de este organismo. La investigación sobre esta proteína también nos ofrecerá un panorama más claro de las similitudes y diferencias de los sistemas de transducción de señales en los distintos organismos, y en la forma que han evolucionado para adaptarse a diversos medios para su subsistencia. A pesar de que hasta hace poco comenzó a entenderse la relevancia de las proteínas de andamiaje, queda claro que son componentes esenciales para las vías de transducción de señales y que su estudio representa nuevas perspectivas de entendimiento en la biología de los organismos.

3 Palabras finales

Una tendencia común en el trabajo de sistemas modelo es la de extrapolar observaciones específicas para proponer reglas generales que se apliquen a todos los organismos. Tal como se reporta que Jacques Monod dijo, “Lo que es cierto para *E. coli* también es cierto para elefantes, sólo que en mayor cantidad” (Hoffman, 2005). Sin embargo, en lo que hemos visto aquí, dependiendo del nivel de especificidad, lo que es cierto para *S. cerevisiae* no es necesariamente cierto para *K. lactis*, y viceversa, o incluso para otros organismos cercanamente emparentados o distantes. Sin embargo, ambos organismos proveen ejemplos valiosos de estrategias alternativas para la forma en que un eucarionte pueda utilizar un conjunto similar de herramientas relacionadas con proteína G para lograr metas específicas. Para nosotros es tan importante apreciar tal diversidad de mecanismos como comprender cualquier interacción específica que ocurra en las vías de señalización mediadas por proteínas G.

LITERATURA CITADA

- Adams, A., D.E. Gottschling, T. Stearns, y C.A. Kaiser.** 1998. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 177 pp.
- Bardwell, L.** 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**:339–350.
- Bhattacharyya, R. P., A. Reményi, M. C. Good, C. J. Bashor, A. M. Falick, y W. A. Lim.** 2006. The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science* **311**:822-826.
- Breitkreutz, A., y M. Tyers.** 2006. A sophisticated scaffold wields a new trick. *Science* **311**:789-790.
- Burack, W. R., y A. S. Shaw.** 2000. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Current Opinion in Cell Biology* **12**:211–216.
- Coria, R., L. Kawasaki, F. Torres-Quiroz, L. Ongay-Larios, E. Sánchez-Paredes, N. Velázquez-Zavala, R. Navarro-Olmos, M. Rodríguez-González, R. Aguilar-Corachán, y G. Coello.** 2005. The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* **6**:336–344.
- Elion, E. A.** 2000. Pheromone response, mating and cell biology. *Current Opinion in Microbiology* **3**:573–581.
- Elion, E. A.** 2001. The Ste5p scaffold. *Journal of Cell Science* **114**:3967-3978.
- Flotho, A., D. M. Simpson, M. Qi, y E. A. Elion.** 2004. Localized feedback phosphorylation of Ste5p scaffold by associated MAPK cascade. *The Journal of Biological Chemistry* **279**:47391–47401.
- Garrenton, L. S., S. L. Young, y J. Thorner.** 2006. Function of the MAPK scaffold protein, Ste5, requires a cryptic PH domain. *Genes and Development* **20**:1946-1958.
- Garrington, T. P., y G. L. Johnson.** 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **11**:211–218.
- Han, B.-K., L. M. Bogomolnaya, J. M. Totten, H. M. Blank, L. J. Dangott, y M. Polymenis.** 2005. Bem1p, a scaffold signaling protein, mediates cyclin-dependent control of vacuolar homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development* **19**:2606-2618.
- Hasson, M. S., D. Blinder, J. Thorner, y D. D. Jenness.** 1994. Mutational activation of the STE5 gene product bypasses the requirement for G protein β and γ subunits in the yeast pheromone response pathway. *Molecular and Cellular Biology* **14**:1054-1065.

- Hoffman, C. S.** 2005. Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* **4**:495–503.
- Kawasaki, L., M. Castañeda-Bueno, E. Sánchez-Paredes, N. Velázquez-Zavala, F. Torres-Quiroz, L. Ongay-Larios, y R. Coria.** 2008. Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell* **7**:78-85.
- Lengeler, K. B., R. C. Davidson, C. D'Souza, T. Harashima, W.-C. Shen, P. Wang, X. Pan, M. Waugh, y J. Heitman.** 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:746–785.
- Mahanty, S. K., Y. Wang, F. W. Farley, y E. A. Elion.** 1999. Nuclear shuttling of yeast scaffold Ste5 is required for its recruitment to the plasma membrane and activation of the mating MAPK cascade. *Cell* **98**:501–512.
- Morrison, D. K.** 2001. KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *Journal of Cell Science* **114**:1609-1612.
- Nguyen, A., W. R. Burack, J. L. Stock, R. Kortum, O. V. Chaika, M. Afkarian, W. J. Muller, K. M. Murphy, D. K. Morrison, R. E. Lewis, J. McNeish, y A. S. Shaw.** 2002. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **22**:3035–3045.
- O'Rourke, S. M., e I. Herskowitz.** 1998. The HOG1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development* **12**:2874–2886.
- Qi, M., y E. A. Elion.** 2005-I. Formin-induced actin cables are required for polarized recruitment of the Ste5 scaffold and high level activation of MAPK Fus3. *Journal of Cell Science* **118**:2837-2848.
- Qi, M., y E. A. Elion.** 2005-II. MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* **118**:3569-3572.
- Sambrook, J. y D. W. Russel.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3a Edición. 999 pp.
- Schwartz, M. A., y H. D. Madhani.** 2006. Control of MAPK signaling specificity by a conserved residue in the MEK-binding domain of the yeast scaffold protein Ste5. *Current Genetics* **49**:351–363.
- Sheu, Y.-J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan, y M. Snyder.** 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **18**:4053–4069.
- van Drogen, F., y M. Peter.** 2002. Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Current Biology* **12**:1698–1703.

- Virag, A., y S. D. Harris.** 2006. Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryotic Cell* **5**:881–895.
- Wang, Y., y E. A. Elion.** 2003. Nuclear export and plasma membrane recruitment of the Ste5 scaffold are coordinated with oligomerization and association with signal transduction components. *Molecular Biology of the Cell* **14**:2543–2558.
- Wang, Y., W. Chen, D. M. Simpson, y E. A. Elion.** 2005. Cdc24 regulates nuclear shuttling and recruitment of the Ste5 scaffold to a heterotrimeric G protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Of Biological Chemistry* **208**:13084–13096.
- Wiget, P., Y. Shimada, A.-C. Butty, E. Bi, y M. Peter.** 2004. Site-specific regulation of the GEF Cdc24p by the scaffold protein Far1p during yeast mating. *The EMBO Journal* **23**:1063–1074.
- Winters, M. J., R. E. Lamson, H. Nakanishi, A. M. Neiman, y P. M. Pryciak.** 2005. A membrane binding domain in the Ste5 scaffold synergizes with G β y binding to control localization and signaling in pheromone response. *Molecular Cell* **20**:21–32.
- Zarrinpar, A., R. P. Bhattacharyya, M. P. Nittler, y W. A. Lim.** 2004. Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Molecular Cell* **14**:825–832.