



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Las interacciones epistáticas entre las subunidades catalíticas de la PKA gobiernan la actividad de los factores de transcripción de *Saccharomyces cerevisiae*, Hsf1 y Skn7, durante el crecimiento en glucosa y en respuesta a calor.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Sergio Pérez Landero

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jorge Nieto Sotelo

Departamento de Biología Molecular de Plantas – IBT-UNAM
Laboratorio de Fisiología Molecular del Jardín Botánico –IB-UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Enrique Merino Pérez – IBT-UNAM

Dr. José Luis Reyes Taboada – IBT-UNAM

Dr. Santiago Sandoval Motta - INMEGEN

Dr. Luis Covarrubias Robles – IBT-UNAM

Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop - IBT-UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

OF. PMDCB/IBT/72/2019

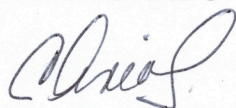
C.P. AGUSTÍN MERCADO
Director General de Administración Escolar, UNAM
P R E S E N T E

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico, del día 13 de febrero de 2019, se acordó nombrar el siguiente Jurado para el Examen de Doctora en Ciencias de la **M. EN C. PÉREZ LANDERO SERGIO**, con número de cuenta **504012341** con la tesis titulada, "**Las interacciones epistáticas entre las subunidades catalíticas de la PKA gobiernan la actividad de los factores de transcripción de *Sacchaomyces cerevisiae* Hsf1 y Skn7, durante el crecimiento en glucosa y en respuesta a calor**" dirigida por el Dr. Jorge Nieto sotelo

PRESIDENTE:	Dr.	Enrique Merino Pérez
SECRETARIO:	Dr.	José Luis Reyes Taboada
VOCAL:	Dra.	Martha Verónica Vázquez Laslop
VOCAL:	Dr.	Santiago Sandoval Motta
VOCAL:	Dr.	Luis Covarrubias Robles

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor; a 13 de febrero 2019
COORDINADORA DEL POSGRADO



DRA. ANA BRIGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
C.c.p.

A Claudia

Agradecimientos Institucionales

Al proyecto PAPIIT-UNAM (IA200714, IN209599 y IN226506-3)), al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP-2010), al CONACYT (165709, 3461-N9310, 25303-N, 129471 y C01-39935) y al Posgrado de Ciencias Bioquímicas.

A Luz María Martínez Mejía, Claudia Martínez Anaya por los aprendizajes transmitidos.

A Jorge Nieto Sotelo por la confianza y paciencia.

A la UNAM y para tod@s aquell@s que han luchado por la libertad y el conocimiento.

Agradecimientos Personales

A mis abuelas Laurentina Galicia Ramos y a Epifanía Reyes Peralta porque con su sabiduría me han guiado en este mundo. A mis abuelos Elfego Landero Pérez y Raúl Pérez Luna por su rebeldía y arduo trabajo.

A mis padres Oliva Landero Reyes e Inocente Pérez Galicia por todo su esfuerzo y amor. A mis hermanas Ana Ruth y Yosselim por ser tan valientes y a Marisol y MariJo, son un motivo para seguir. A mis otros hermanos Tino, Raúl, Álvaro, Memo, Luis, Omar, Adrián, Jesús, Cristofer, Joanthan A mis hermanas Julia, Cecy, Magda, Mara, Kari, Tina, Ma. de los Ángeles A toda mi familia que nunca se ha dejado y vive de una forma maravillosa.

A mi otra familia Paty, Diana, Claudia, Fernada, Antonio, Emanuel, oliver, monett, dimonch, taz, naty; gracias.

A Claudia que me dio su amor y cada paso es una enseñanza para siempre.

Resumen

En esta investigación se abordó la relación fenotipo-genotipo, y se utiliza a *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo para describir las interacciones genéticas que controlan la respuesta al estrés por calor. Con base en la ontología génica y en evidencias experimentales se propuso una red de interacciones genéticas entre los elementos de la Red de Regulación Ras-PKA (RR-PKA) y los factores de transcripción Hsf1 y Skn7. A través de un modelo discreto, con múltiples estados, se reprodujo el comportamiento experimental de la expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ*. Se encontraron evidencias de la actividad antagónica de la cinasa Tpk2 frente a las cinasas Tpk1 y Tpk3 en la regulación de la expresión del gen reportero, lo que implica un avance en la comprensión de la dinámica de la RR-PKA. Además, se descubrió que las chaperonas Ssa1 y Ssa2 median la relación entre las cinasas Tpk's y los factores de transcripción Hsf1 y Skn7. El uso de herramientas matemáticas y genéticas permitió comprender la dinámica de esta Red de Regulación compleja y autorregulada, lo cual podría extenderse a otras redes de señalización que permiten la aclimatación de las células al ambiente.

Abstract.

This research addresses the phenotype-genotype relationship. Saccharomyces cerevisiae was used as a model system to describe the genetic interactions that control the heat stress response. Based on genetic ontology and experimental evidences, a network of genetic interactions between the elements of the Regulatory Network Ras-PKA (RR-PKA) and Hsf1 and Skn7 transcription factors was proposed. By means of a discrete model, with multiple states, the experimental behavior of the expression of the HSE-CYC1-lacZ reporter gene was simulated. Evidence for the antagonism between Tpk2 protein kinase and Tpk1 and Tpk3 kinases on the regulation of the reporter gene was found, advancing our knowledge on RR-PKA dynamics. Moreover, it was discovered that Ssa1 and Ssa2 chaperones mediate the interaction between the Tpk's and Hsf1 and Skn7 transcription factors. The utilization of genetic and mathematical tools allowed the comprehension of the dynamics of this self and complex regulatory system, as is the case of the signaling networks that enable acclimation of the cell to the environment.

Abreviaturas utilizadas en el texto

ESR – respuesta al estrés ambiental (Environmental Stress Response)

ROS – especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)

DBD – dominio de unión al ADN (DNA-Binding Domain)

GPCR – receptores acoplados a proteínas G (G Protein-Coupled Receptors)

AC – adenilato ciclasa

FT – factor de transcripción

Ft's – factores de transcripción

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARN – ácido ribonucleico

NLS – señal de localización nuclear (Nuclear Localization Signal)

PKA – cinasa de proteínas dependiente de AMPc

GDP – guanosina -5'-difosfato

GTP – guanosina -5'- trifosfato

AMP – adenosina-5'- monofosfato

ATP – adenosina -5'- trifosfato

AMPc – AMP cíclico, adenosina cíclica -5',3'- monofosfato

GFP – proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GEF – Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*Guanine nucleotide Exchange Factor*)

ORF – marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*)

HSE – Elemento de choque de calor (*Heat Shock Element*)

HSP – Proteína de choque de calor (*Heat Shock Protein*)

Zn – Zinc

pb – pares de bases

Mb – mega pares de bases

RR-PKA – Red de Regulación PKA

WDM - Modelo de Ventanas Discretas [*Windowed Discrete Model*]

ÍNDICE

Proemio	1
CAPÍTULO I	
La vida y el estrés	3
Las chaperonas moleculares	4
Mecanismos celulares de respuesta al estrés	6
El control transcripcional de la expresión génica en respuesta al estrés	6
Los factores de transcripción y la respuesta al estrés	7
Los factores de transcripción Msn2 y Msn4	8
El factor de transcripción Hsf1	10
Los mecanismos de regulación de la actividad de Hsf1	11
El efecto de las proteínas de choque térmico -HSP's- en la actividad del Hsf1	13
El factor de transcripción Skn7	13
La regulación de la transducción de señales	14
La señalización a través de la PKA	15
Componentes de la Red de Regulación Ras-PKA	16
Las cinasas Tpk's (PKA); estudios genéticos y funciones asignadas	18
Dinámica de la regulación de la actividad de la PKA	19

ANTECEDENTES

HIPÓTESIS

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento y medios utilizados	27
Ensayos de termotolerancia	27
Microorganismos utilizados y reemplazos genéticos	27
Estrategia para la complementación de la cepa <i>tpk2Δ tpk3Δ TPK1</i>	32
Ensayos de la actividad de β-galactosidasa	33
Extracción de las proteínas solubles para medir la actividad de PKA total	34
Plásmidos utilizados	34
Clonación del gen <i>TPK2</i>	35
Estimación del número de copias del plásmido pRY016 en los distintos genotipos	36
Pruebas estadísticas	37

RESULTADOS

Efecto del fondo genético en la regulación de las interacciones epistáticas entre los intercambiadores de guanina <i>CDC25 - SDC25</i> y los fenotipos de crecimiento y termotolerancia	38
Los fenotipos de termotolerancia y crecimiento de cepas mutantes de la GTPasa o proteína G -Ras2- y el efecto del fondo genético	39
Efecto en los fenotipos de termotolerancia y crecimiento de cepas mutantes en <i>BCY1</i> - subunidad represora de la PKA- en los fondos genéticos BY4741, KT1112 y W303	42
Relaciones antagónicas de las subunidades catalíticas de la PKA Sobre el complejo Hsf1/Skn7	43
Validación genética del antagonismo entre las cinasas PKA	45
Actividad de PKA <i>in vitro</i> en extractos de distintos genotipos	48

Sistematización de las interacciones entre los nodos
de la Red de Regulación PKA. Primer modelo 49

Modelo matemático discreto para describir
la Red de Regulación – PKA 51

La comparación cuantitativa entre los resultados
teóricos y los experimentales corrobora las interacciones
reguladoras propuestas 55

DISCUSIÓN

Las interacciones genéticas, entre las subunidades
catalíticas de la PKA, permiten proponer un nuevo modelo
de regulación de Hsf1/Skn7 63

Dinámica de la Red de Regulación PKA,
utilizando un modelo matemático discreto y sus implicaciones 68

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS

FUENTES CONSULTADAS 73

APÉNDICES.

Apéndice 1. Cepas y oligos utilizados

Apéndice 2. Análisis de la secuencia de complementación *TPK2*

Apéndice 3. Interacciones epistáticas entre los GEF's Sdc25 y Cdc25.

Apéndice 4. Modelo de Ventanas Discretas. Esquemas de alimentación, cuencas de
atracción, funciones lógicas y suposiciones

Apéndice 5.A tractores totales

Apéndice 6. Valores relativos de la actividad de β -galactosidasa.

Apéndice 7. Artículos publicados y fe de erratas.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bases de datos y recursos útiles para el estudio ómico de <i>S. cerevisiae</i>	2
Tabla 2. Clasificación ontológica de la familia de las proteínas chaperonas de <i>S. cerevisiae</i>	5
Tabla 3. Crecimiento y niveles de termotolerancia basal en cepas silvestres y mutantes en el gen <i>CDC25</i> de <i>S. cerevisiae</i>	38
Tabla 4. Fenotipos de crecimiento y termotolerancia de cultivos silvestres o mutantes en <i>RAS2</i> en los fondos genéticos de las cepas AW3, BY4741, KT1112 y W303	40
Tabla 5. Fenotipos de crecimiento y termotolerancia de cultivos silvestres o mutantes en <i>BCY1</i> en los fondos genéticos de las cepas BY4741, KT1112 y W303	41
Tabla 6. Fenotipos de crecimiento y termotolerancia de cultivos silvestres o mutantes en las subunidades catalíticas de la PKA en los fondos genéticos de las cepas BY4741 y W303	43

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Dendograma de las 112 cinasas de <i>S. cerevisiae</i>	15
Figura 2. La Red de Regulación de la PKA (RR-PKA) en <i>S. cerevisiae</i>	17
Figura 3. Expresión constitutiva de genes de respuesta a estrés en genotipos <i>cdc25</i> , durante el crecimiento en glucosa	22
Figura 4. Expresión génica dependiente de <i>HSE</i> en genotipos <i>CDC25</i> , <i>cdc25Δ</i> y <i>cdc25-21</i> , derivadas de W303	23
Figura 5. Expresión génica dependiente de <i>HSE</i> que comprueba las interacciones epistáticas entre el complejo Hsf1/Skn7 y la RR-PKA, durante condiciones estables y en respuesta a calor	24
Figura 6. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de <i>TPK1</i> por <i>KanMX</i>	28
Figura 7. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo del gen <i>TPK2</i> por <i>KanMX</i>	28
Figura 8. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo del gen <i>TPK3</i> por <i>KanMX</i>	29
Figura 9. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo del gen <i>SSA1</i> por <i>KanMX</i>	29
Figura 10. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo del gen <i>SSA2</i> por <i>KanMX</i>	29
Figura 11. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo del gen <i>TPK3</i> por <i>KanMX</i>	30
Figura 12. Amplificación para confirmar el reemplazo de <i>SSA1</i> por <i>KanMX</i>	31
Figura 13. Amplificación para confirmar el reemplazo del gen <i>RAS2</i> por <i>KanMX</i>	32
Figura 14. Amplificación por PCR para confirmar la integración del gen <i>URA3</i> en la cepa KS590	33

Figura 15. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de <i>tpk2::URA3</i> por el gen <i>TPK2</i> en la cepa KS590-URA3	33
Figura 16. Efecto del promotor sintético <i>HSE-CYC</i> en la actividad de β -galactosidasa en los genotipos WT y mutantes, en W303	35
Figura 17. Análisis de correlación entre el número de copias del plásmido pRY016 y la actividad de β -galactosidasa de cultivos a 25°C	37
Figura 18. Niveles de expresión del gen reportero <i>HSE-CYC1-lacZ</i> en la cepa silvestre (LRA89) y mutante (LRA25) en el gen <i>CDC25</i> de <i>S. cerevisiae</i> (fondo genético LRA)	39
Figura 19. Efecto de mutaciones en el gen <i>RAS2</i> en la expresión del gen reportero <i>HSE-CYC1-lacZ</i> en los fondos genéticos de las cepas AW3, BY4741, KT112 y W303	40
Figura 20. Análisis de la expresión dependiente de <i>HSE</i> en mutantes <i>bcy1</i> Δ en los fondos genéticos BY4741, KT112 y W303	42
Figura 21. Análisis de la expresión del reportero <i>HSE-CYC1-lacZ</i> en mutantes sencillas y dobles en las subunidades catalíticas de la PKA (genes <i>TPK1</i> , <i>TPK2</i> o <i>TPK3</i>) en los fondos genéticos de las cepas BY4741 y W303	44
Figura 22. Expresión de elementos STRE en mutantes sencillas, dobles de las subunidades catalíticas, así como en la subunidad regulatoria, Bcy1, de la PKA	45
Figura 23. Complementación genética con <i>TPK2</i> , en plásmido de bajo números de copias <i>CEN</i> (A), de alto número de copias <i>2μ</i> (B) y <i>delitto perfetto</i> (C)	46
Figura 24. Actividad total de PKA medida <i>in vitro</i> en extractos proteicos de células mutantes en la PKA, en el fondo genético W303	48
Figura 25. Modelo de las interacciones de la Red de Regulación PKA sobre la actividad de los FT's Hsf1 y Skn7 durante la fase logarítmica del crecimiento de cultivos en medio con glucosa	50
Figura 26. Actividad de Hsf1/Skn7 en mutantes <i>Hsp70</i> (<i>ssa1</i> Δ y/o <i>ssa2</i> Δ) durante el crecimiento en glucosa y en respuesta a calor, en genotipos silvestre y <i>tpk2</i> Δ	51

Figura 27. Comparación de la actividad de <i>HSE-CYC1-lacZ</i> entre los datos experimentales y las predicciones con el modelo WDM	55
Figura 28. Comparación de los distintos esquemas de actualización de WDM	56
Figura 29. Red reducida utilizada para calcular la estructura del paisaje de atractores	56
Figura 30. Estructura del paisaje de atractores que muestra la RR-PKA reducida, en el genotipo W303	57
Figura 31. Dinámica temporal de los nodos Bcy1, AMPc, <i>HSE-lacZ</i> y Tpk3, en la cepa silvestre y en tres mutantes ($\Delta ssa1\Delta ssa2$, $\Delta tpk2$ y $\Delta bcy1$)	59
Figura 32. Interacción epistática entre <i>SDC25</i> y <i>CDC25</i>	62
Figura 33. Recuperación del crecimiento de la doble <i>cdc25Δ sdc25Δ</i> con el plásmido pRS- <i>CDC25</i> y su mantenimiento en medio rico en nutrientes que no selecciona a favor de la prototrofia para histidina	62

Proemio

Con la automatización de las técnicas de secuenciación masiva de ADN, se abrió la posibilidad de conocer –de manera casi instantánea– información conservada en el genoma de los organismos. El primer genoma eucarionte secuenciado y ensamblado fue el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Goffeau *et al.*, 1996; Cherry *et al.*, 1997). Este estudio reveló que su genoma es de 13 Mb y es el resultado de una duplicación ocurrida hace aproximadamente 100 millones de años (Wolfe y Shields, 1997). La relativa fácil manipulación genética de este organismo ha permitido emprender proyectos postgenómicos y epigenéticos, que han sido de utilidad para analizar la dinámica bioquímica de los seres vivos. Por ejemplo, se ha puesto al descubierto el mapa de las interacciones de las cinasas y de las fosfatasa (Breitkreutz *et al.*, 2010); se ha logrado estimar la cantidad de moléculas de cada proteína (Ghaemmaghami *et al.*, 2003) y su localización temporal en los compartimentos de la célula (Huh *et al.*, 2003); se han identificado los genes esenciales para el crecimiento en distintas cepas, e incluso se han descrito las interacciones de entre los genes –**epistasis**– (Costanzo *et al.*, 2010). Con estos datos se han construido mapas de las redes de interacciones físicas y genéticas, que ilustran la complejidad con la que interaccionan los genes y sus productos –**ontología génica**– (Cherry *et al.*, 1997). También, se han comparado de manera sistemática los fenotipos mostrados por 36 cepas de *S. cerevisiae* y de 35 de *Saccharomyces paradoxus* en 67 condiciones ambientales, entre otros proyectos (Liti *et al.*, 2009). Sin embargo, pese a que desde 1997 se conoce la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae*, es posible predecir la ontología del 75% de sus genes. Todo este cúmulo de información puede ser obtenido en diversas bases de datos (Tabla 1). Estas herramientas de manipulación y la información ómica posicionan a *S. cerevisiae* como un modelo de estudios apropiado en genética de poblaciones. La comparación de los mecanismos que subyacen en los procesos celulares, con los de otras especies, pueden facilitar los estudios en genómica evolutiva, la evolución de las redes de señalización, la ingeniería metabólica y la biología de sistemas.

Pese a los impresionantes avances en el conocimiento de los canales de transmisión de la información (evolución), el genético y el epigenético, se tienen limitaciones teóricas y técnicas para entender la interacción entre todos los elementos, sus dinámicas y las propiedades emergentes de los sistemas biológicos.

Nombre	URL	Descripción rápida
<i>Saccharomyces</i> Genome Database (SGD)	http://www.yeastgenome.org	Integra la información sobre la función de las secuencias intergénicas y de cada marco de lectura abierto (ORF).
The Yeast Microarray Global Viewer (yMGV)	http://transcriptome.ens.fr/ymgv/about_ymgv.php	Proporciona una visión sintética de los perfiles de expresión transcripcional de los genes de <i>S. cerevisiae</i> .
Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD-MIPS)	http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast/index.jsp	Contiene información de la estructura molecular y redes funcionales de <i>S. cerevisiae</i> .
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kinase and Phosphatase Interactome (KPI)	www.YeastKinome.org	Reúne la información de las interacciones de las cinasas y fosfatasa de proteínas.
Yeast GFP Fusion Localization Database	http://yeastgfp.yeastgenome.org	Información sobre la localización subcelular de las proteínas mediante fusiones con GFP.
Yeast Protein Localization Database (YPL)	http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html	Localización subcelular de las proteínas fusionadas con GFP.
Data Repository of Yeast Genetic INteractions	http://drygin.cabr.utoronto.ca/	Descripción de las interacciones génicas.

Tabla 1. Bases de datos y recursos útiles para el estudio “ómico” de *S. cerevisiae*.

Epistasia: Es un mecanismo de interacción entre genes. Se da cuando un gen interfiere la manifestación fenotípica de otro gen. Proceso que es importante para entender la estructura y la función de las rutas genéticas y la dinámica evolutiva de sistemas genéticos complejos (Phillips, 2008).

CAPÍTULO I

El proceso de adaptación de los seres vivos está intrínsecamente relacionado con la articulación de los mecanismos de monitoreo del medio ambiente y al de la remodelación de su dinámica interna; por lo tanto, los componentes y las interacciones de las redes de señalización son interesantes para entender los mecanismos de adaptación a las condiciones ambientales.

La vida y el estrés

En este trabajo se define el estrés como cualquier condición que comprometa el crecimiento, el desarrollo y/o reproducción de un organismo. Esta categoría permite describir estrategias de adaptación de los seres vivos para la colonización de distintos nichos, como las ostras (*Crassostrea gigas*), que crecen en condiciones extremas (Zhang *et al.*, 2012). Estos mecanismos son importantes para que los sistemas biológicos presenten un balance específico y delicado de las condiciones internas.

El aumento repentino de la temperatura afecta procesos celulares básicos, por ejemplo:

- Disminución de la respiración y de la fosforilación oxidativa, lo cual compromete la producción de ATP (Patriarca y Maresca, 1990; Gancedo, 1998).
- Desestabilización de las estructuras proteicas y de las membranas celulares (Parsell *et al.*, 1993).
- Alteración del citoesqueleto (Falkner *et al.*, 1981) y del huso mitótico (Debec *et al.*, 1997).
- Inhibición del procesamiento de los ARNs (Yost y Lindquist, 1991).
- Interrupción de los flujos metabólicos (Hohmann y Mager, 2003).
- Inactivación de la ARN polimerasa tipo II (ocurre a temperaturas mayores de 42°C) (Yamamoto *et al.*, 2008).

Bajo estas condiciones, las células presentan respuestas integrales y específicas con las que se mantienen procesos esenciales, sin comprometer la viabilidad. En el caso de la respuesta al calor, se han determinado cuáles son los factores de transcripción que gobiernan los

cambios en la expresión genética (ver más adelante) y la reprogramación metabólica que permite a las células resistir la exposición crónica a temperaturas subletales.

S. cerevisiae es un organismo mesófilo que crece óptimamente entre 25 y 30°C. Cuando la temperatura sobrepasa los 36°C, en las células se activa la transcripción de un programa de protección, denominado de respuesta al choque de calor “heat shock response” (HSR), con el cual se altera la fisiología celular (Hohmann y Mager, 2003).

Las chaperonas moleculares

Se ha descrito que en respuesta al estrés por calor aumenta de manera súbita la síntesis de las proteínas de choque de calor “Heat Shock Proteins” (HSP) (Daniels *et al.*, 1984; Lindquist y Craig, 1988). Un tipo de HSP son las chaperonas moleculares (Tabla 2). La función de éstas se relaciona con la protección/prevención de los componentes celulares básicos siendo capaces, incluso, de reordenar a aquellas proteínas que han sido desnaturalizadas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Las secuencias primarias de las chaperonas están altamente conservadas entre los distintos reinos. La gran mayoría de ellas utilizan la energía del ATP para plegar, madurar o desagregar a otras proteínas. En condiciones estables, el trabajo de estas proteínas es importante para mantener procesos como la división celular, la síntesis del ADN, la transcripción de los genes, la síntesis y la degradación de las proteínas y la transducción de señales (Hohmann y Mager, 2003). También se les ha implicado en la regulación de la variación fenotípica (evolucionabilidad), sobre la cual actúa la selección natural (Pigliucci, 2007) y se permite el cambio evolutivo en respuesta al ambiente (Rutherford, 2003; Jarosz y Lindquist, 2010).

Evolucionabilidad: es la capacidad de las poblaciones para adaptarse –generar variabilidad e innovaciones en la escala evolutiva– (Draghi y Wagner, 2009, Aldana *et al.*, 2007).

La clasificación de las chaperonas de *S. cerevisiae* se fundamenta con base en tres criterios principales (Tabla 2):

1. Por el peso molecular,
2. por la similitud entre las secuencias primarias y
3. por la ontología génica (las funciones en las que se les ha implicado).

Familia	Miembros	Ontología génica
Hsp100/ClpB	Hsp104	La desagregación de proteínas, la propagación de priones y la tolerancia al estrés.
Hsp90	Hsc81, Hsp82	El plegado de las proteínas y la tolerancia al estrés. Los sustratos parecen estar involucrados en la transducción de las señales intracelulares. Se les considera capacitores de la evolución.
Hsp70	Ssa1-4, Ssb1-2, Sse1-2, Ssz1	El plegado de las proteínas y la tolerancia al estrés.
Hsp40	Ydj1, Sis1	Estimulan la actividad de ATPasa de Hsp70. Sis1 se ha involucrado en el inicio de la transcripción.
cofactores Hsp70/90	Sti1, Cpr6, Cpr7, Cns1	Hsp70 y Hsp90 ayudan al ciclo del plegado de las proteínas. Sti1 conecta a Hsp70 con Hsp90 y regula la actividad de ATPasa de ambas proteínas.
Hsps pequeñas	Hsp26, Hsp12, Hsp42	Forman oligómeros complejos con las proteínas desplegadas y previenen su la agregación.

Tabla 2. Clasificación ontológica de la familia de las proteínas chaperonas de *S. cerevisiae*.

Los avances en el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de respuesta al estrés tienen aplicaciones en medicina, agricultura, evolución o economía. Por ejemplo, se ha comprobado que ciertos factores de estrés, como Hsf1, contribuyen al envejecimiento celular y están implicados en la etiología del cáncer (Dai *et al.*, 2007). También se ha comprobado que la chaperona Hsp104 disminuye la agregación de las poli-glutaminas asociadas a la enfermedad de Huntington en sistemas experimentales modelo como *Caenorhabditis elegans* y el ratón, promoviendo el crecimiento, el desarrollo y la sobrevivencia del gusano (Satyal *et al.*, 2000; Vacher *et al.*, 2005). En el jitomate se ha observado que, al sobreexpresar de manera constitutiva al factor de transcripción HsfA1, aumenta su tolerancia al calor (Mishra *et al.*, 2002). Algo similar sucede en el arroz cuando se sobreexpresa a la chaperona Hsp101 (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2003).

Mecanismos celulares de respuesta al estrés

La coordinación adecuada de los componentes celulares es crucial para la supervivencia de los organismos. Para el monitoreo del ambiente circundante se articulan proteínas, membranas celulares y metabolitos secundarios que generan información que se integra y consensa en distintos niveles, y se desencadena un programa de respuesta ante los estímulos. A continuación, se detallan estas etapas.

El control transcripcional de la expresión génica en respuesta al estrés

Comúnmente se cree que el estado fenotípico de la célula está determinado por la expresión de una fracción de la totalidad de sus genes. Este pensamiento ha llevado a enfocar los esfuerzos de distintos laboratorios en determinar los patrones de expresión génica ante varios estímulos.

La caracterización del programa de expresión genómica en levaduras ha permitido identificar los procesos celulares que se fortalecen y los que se atenúan ante distintas condiciones ambientales, mecanismo denominado de respuesta al estrés ambiental (ESR). Se ha descrito que la expresión de ~600 genes disminuye en ESR; al producto de éstos se le asocia con la síntesis de proteínas, la transcripción de genes, la biosíntesis de la pared celular, los componentes del citoesqueleto, la secreción y la glicosilación de las proteínas, el metabolismo de los aminoácidos y del piruvato, la biosíntesis de nucleótidos y la replicación del ADN, entre otros procesos (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Hohmann y Mager, 2003). Estos genes se expresan abundantemente durante el crecimiento en glucosa (Holstege *et al.*, 1998). Al bajar la transcripción de estos genes se favorece el ahorro de energía. Esto se correlaciona con la disminución en la síntesis de las proteínas, con la interrupción transitoria del ciclo celular y del crecimiento durante el estrés (Johnston y Singer, 1980; Kuhn *et al.*, 2001). A la par, aumenta la transcripción de ~300 genes. De este grupo no se ha podido caracterizar la función del 45%, mientras que del 55% restante se sabe que están relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, con la degradación, el plegamiento y la desagregación de las proteínas, con la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), la autofagia, la reorganización del citoesqueleto, la reparación del daño al ADN, el

transporte de metabolitos, el mantenimiento de las funciones de la mitocondria y de las vacuolas, y la señalización intracelular, entre otras tareas (Mager y Ferreira, 1993; Hohmann y Mager, 2003; Brown, 2017; Causton *et al.*, 2001). La función de estas proteínas –estructura central de respuesta al estrés– es crítica para mantener la homeostasis interna, mediante el balance de la osmolaridad (Hohmann, 2002_a) y el potencial de óxido-reducción (Brown, 2017; Hohmann y Mager, 2003; Herrero *et al.*, 2008). También se procura el almacenamiento de energía, promoviendo la acumulación de la trealosa y el glicerol (Lillie y Pringle, 1980; de Virgilio *et al.*, 1994; Hottiger *et al.*, 1994) y soportan estructuras celulares básicas como las membranas (Levin, 2005; Shaner *et al.*, 2008; Guimaraes *et al.*, 2011), los complejos de proteínas (Lafer, 2002) o los cromosomas (Saibil, 2008). Esta estructura central de respuesta al estrés asegura el funcionamiento de las labores esenciales, e incluso la viabilidad perdura con estos procesos a su mínima actividad.

Dado que es similar el programa de alteración de la expresión del genoma ante el estrés en las distintas especies de hongos, se concluye que los mecanismos de adaptación y de evolución están conservados en este reino (Gasch *et al.*, 2000; Gasch, 2007).

Los factores de transcripción y la respuesta al estrés

En los eucariontes, el estado transcripcional de cada gen está gobernado tanto por la estructura que adquiere la cromatina como por los factores de transcripción (FT's) –promotores–, que son capaces de reclutar a la ARN polimerasa tipo II y promover la síntesis de RNA (Komili *et al.*, 2008). Este proceso requiere de la coordinación de varios complejos de proteínas. Se parte con la unión de los FT's, –promotores o represores– a las secuencias específicas ubicadas cerca del inicio de la transcripción, lo cual determina el tiempo y el espacio en el que se expresan los genes (Istrail y Davidson, 2005).

Con la información de los perfiles de expresión de los genes (empleando microarreglos de ARN) y con los análisis de localización de los FT's en el ADN (usando microarreglos de ADN, con los que se puede identificar a la cromatina inmuno-precipitada con anticuerpos específicos anti-FT [ChiP-Chip]), se han desarrollado modelos de redes que muestran las interacciones y el entrecruzamiento de la actividad de estos elementos ante distintas

condiciones ambientales (Lin *et al.*, 2007). Se postula que la remodelación de la expresión genética se organiza de forma jerárquica, dependiendo del estímulo se pueden identificar FT's –nodos– que consensan la información generada (o fluye la información). Por ejemplo, en respuesta a un choque de calor o al aumento paulatino en la temperatura, el FT que interviene es Hsf1, ya que se requiere para la inducción de 165 genes (Hahn *et al.*, 2004_a). También otros FT's, como Msn2, Msn4, Yap1 y Skn7, colaboran en la inducción de la expresión de las HSP (Wu y Li, 2008). Con esta información podemos construir modelos causales de sistemas enteros, para describir los grandes mecanismos de flujo de información de los sistemas celulares en respuesta al estrés ambiental (Bor-Sen y Cheng-Wei, 2017).

A continuación, se describen los mecanismos de regulación y los nodos de mayor jerarquía en la regulación de la respuesta al calor.

Los factores de transcripción Msn2 y Msn4

Los genes *MSN2* y *MSN4* codifican para los FT's Msn2 y Msn4, respectivamente, los cuales conservan un dominio de unión al ADN del tipo dedo de zinc. Ambos participan en la respuesta a la limitación de nutrientes y al estrés en *S. cerevisiae* (Boy-Marcotte *et al.*, 1998; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt y McEntee, 1996). Estos FT's reconocen elementos consenso del tipo *STRE* (5'-CCCCT-3'), y promueven el aumento de la expresión de 200 a 300 genes en réplica a distintas condiciones como son: los cambios de la temperatura, el choque osmótico, el estrés oxidativo, la disminución del pH, el agotamiento de la glucosa o el aumento del ácido ascórbico o del etanol (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001).

Entre Msn2 y Msn4 se mantiene el 41% de identidad de secuencia de nucleótidos (Estruch *et al.*, 1993) y su función es en gran parte redundante, aunque no completamente (Estruch, 2000). Se estima que el número de moléculas de Msn2 por célula es de aproximadamente 125, mientras que la cantidad de Msn4 no se ha podido determinar con precisión (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). En ausencia de estímulo se localiza en el citoplasma, lo cual impide que active a sus genes blancos (Gorner *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 1999; Jacquet *et al.*, 2003). La proteína de anclaje tipo 14.3.3, Bmh2, participa en la retención del citoplasma de estos FT's, la cual depende del estado fosforilado dado, en forma parcial, por la actividad de

TOR (*Target Of Rapamycin*) (Schmidt *et al.*, 1998). La PKA también participa en la retención de Msn2/4 en el citoplasma al fosforilar el dominio NLS (Garmendia-Torres *et al.* 2007; Gorner *et al.*, 2002). Por el contrario, la des-fosforilación de este dominio está controlada por la fosfatasa Glc7 (De Wever *et al.*, 2005). En condiciones de estrés, los FT Msn2/4 son hiper-fosforilados (Garreau *et al.*, 2000), y rápidamente re-localizados al núcleo (Gorner *et al.*, 1998), oscilando dinámicamente entre el núcleo y el citoplasma (Jacquet *et al.*, 2003). Ya en el núcleo, la unión de Msn2 al ADN es promovida por la cinasa Gsk3 (Hirata *et al.*, 2003) e inhibida por la PKA (Gorner *et al.*, 2002). El aumento en la actividad de Msn2 se relaciona con el estado de hiper-fosforilación que presenta durante el estrés. La hiper-fosforilación de Msn2 requiere de la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas Ssn3 y Srb10. Ambas cinasas están involucradas en la actividad de la ARN polimerasa tipo II. Otro mecanismo para modular a Msn2 es su degradación en el núcleo, a través del proteosoma 26S (Lallet *et al.*, 2004), la cual es dependiente de la actividad del “Mediator” (Srb10) (Lallet *et al.*, 2006).

De lo anteriormente expuesto, se establece el complejo mecanismo de la dinámica de Msn2/4 y se visualiza la importancia de este nodo para modular el programa de respuesta ambiental.

Se han identificado genes ortólogos a *MSN2* y a *MSN4* en *Schizosaccharomyces pombe* (Kunitomo *et al.*, 2000), en *Trichoderma atroviride* (Peterbauer *et al.*, 2002), en *Candida glabrata* (Roetzer *et al.*, 2008) y en *C. albicans* (Nicholls *et al.*, 2004). Sin embargo, en el patógeno *C. albicans* las proteínas homólogas a Msn2/4 no participan de manera importante en la regulación de la respuesta al estrés (Nicholls *et al.*, 2004). Al contrario, en *C. glabrata* y en *S. cerevisiae*, Msn2 y Msn4 participan activamente en la regulación de la respuesta al estrés.

El factor de transcripción Hsf1

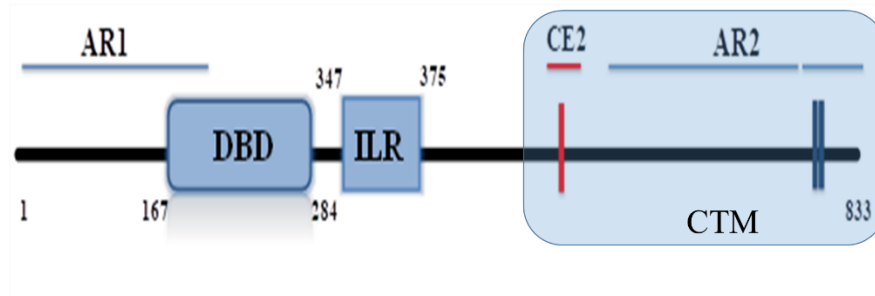
La familia de los FT's llamados HSF1 (Factor del Choque de Calor 1 o “Heat Shock Factor 1) se ha conservado evolutivamente entre los eucariontes (Wiederrecht *et al.*, 1987; Sarge *et al.*, 1991; Wu, 1995; Von Koskull-Doring *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011). Algunos de ellos son los reguladores principales de la expresión de genes en respuesta al

choque de calor. En metazoarios existen múltiples isoformas, algunos son activos sólo ante ciertos estímulos (Zhang y Qian, 2011), mientras que otros tienen una mayor relevancia en determinadas etapas del desarrollo (Morange, 2006).

En *S. cerevisiae*, *HSF1* es esencial (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990) ya que la proteína para la que codifica es requerida para la expresión de cientos de genes que participan en el crecimiento normal de la célula, incluyendo los genes involucrados en el plegamiento de las proteínas, la detoxificación, la generación de energía, el metabolismo de los carbohidratos, en la señalización, en la organización de la pared celular y en la longevidad (Hahn *et al.*, 2004_{a,b}; Eastmond y Nelson, 2006; Sakurai y Ota, 2011).

En la levadura hay otras cuatro proteínas con alta similitud en estructura y secuencia al dominio de unión al ADN (DBD) de Hsf1, que son:

- Skn7, que participa en la activación de la transcripción de los genes de respuesta al estrés (ver más adelante).
- Sfl1, que es un represor de la transcripción de los genes relacionados con el crecimiento pseudohifal e invasivo (Fujita *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 2009).
- Mga1 y Hms2, que están involucradas en la diferenciación pseudohifal (Lorenz y Heitman, 1998).



En varios organismos el FT Hsf1 presenta dos motivos altamente conservados: el dominio de unión al ADN (DBD “DNA-binding domain), con estructura secundaria hélice-vuelta-hélice y el dominio de trimerización (ILR), con estructura secundaria del tipo “coiled-coil” (Sorger y Nelson *et al.*, 1989; Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Jakobsen y Pelham, 1991). Se han mapeado dos dominios de activación en *S. cerevisiae*: el dominio AR1 (residuos del 1-172) y el dominio AR2 (residuos del 589-833), localizados en los extremos amino- y carboxilo-terminal, respectivamente. Se ha reportado que AR2 está implicado en el aumento de la actividad transcripcional en respuesta al choque de calor y es requerido para el crecimiento sostenido en temperaturas elevadas (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Sorger, 1990; Chen *et al.*, 1993). El reconocimiento de los elementos *HSE* “imperfectos”, del tipo escalonados y separados, requiere de la hiper-fosforilación de residuos ubicados en el dominio modular carboxilo terminal –CTM “carboxil-terminal modulator”–. El estado de baja actividad transcripcional de Hsf1, que se presenta durante condiciones óptimas, correlaciona con la fosforilación del dominio CE2 (residuos 410-648) (Jakobsen y Pelham, 1991).

Los mecanismos de regulación de Hsf1

En condiciones estables de alimentos y de temperatura, el Hsf1 se localiza en el núcleo –con un patrón de fosforilación– y está unido a elementos *cis* tipo *HSE* “Heat Shock Elements” (Singh *et al.*, 2006; Enoki y Sakuraiy, 2011), en un estado de baja actividad. En ciertas condiciones de estrés tales como el pH alcalino; el incremento en las concentraciones del salicilato; el estrés oxidativo; el choque de calor o la falta de glucosa, el Hsf1 es hiperfosforilado adoptando rápidamente una conformación activa que ocasiona el aumento de la expresión de genes que contienen elementos *HSE* en sus promotores (Sorger y Pelham, 1987; Anckar *et al.*, 2006).

A continuación se describen los reguladores postranscripcionales de Hsf1 que se han comprobado. Por ejemplo, ante la falta de glucosa la cinasa activada por AMP –Snf1– hiperfosforila a Hsf1 (Hahn y Thiele, 2004). Mientras que en la fase de cambio diáuxico la cinasa Yak1 es la encargada de la fosforilación (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguna de las dos cinasas es responsable de mantener la baja actividad que Hsf1 presenta durante el crecimiento en glucosa (Hahn y Thiele, 2004; Lee *et al.*, 2008). De hecho, en estas condiciones, Snf1 (Wiatrowski y Carlson, 2003), la cinasa Tpk1 [y posiblemente la cinasa Tpk2] (Ptacek *et al.*, 2005) y la proteína 14.3.3.3 Bmh1 (Lee *et al.*, 2011) mantienen a Yak1 en el citoplasma. No es muy claro el mecanismo que Tpk2 ejerce sobre Yak1 en el

citoplasma, ya que Tpk2 se localiza primordialmente en el núcleo (Tudisca *et al.*, 2010). En cambio al disminuir la actividad de la PKA, por ejemplo, durante el cambio diáuxico, Yak1 es translocada al núcleo activando a Hsf1 y, posiblemente, a Msn2 y Msn4 (Lee *et al.*, 2008).

Los elementos *cis* tipo *HSE* están formados por tres secuencias repetidas 5'-nGAAn-3', que se encuentran arregladas en orientaciones alternadas (Sorger, 1991). Se han descrito tres tipos de *HSE*: el *HSE*-perfecto, que consiste de tres o más unidades repetidas, continuas e invertidas (nTTCnnGAAnnTTCn); el *HSE*-separado, que consiste de dos unidades invertidas y separadas por 5 pb de una tercera unidad (nTTCnnGAAn(5pb)nGAAn); y el *HSE*-escalonado, que consiste de dos unidades repetidas directas, ya sean los motivos nGAAn o nTTCn, ambas separadas por 5 pb (nGAAnn(5pb)nGAAn(5pb)nGAAn) (Hashikawa y Sakurai, 2004; Enoki *et al.*, 2011).

Con respecto al complejo Snf1, durante el crecimiento en medio con glucosa, la actividad de la PKA mantiene a la subunidad catalítica de Snf1 en la membrana vacuolar y a la subunidad β –Sip1– en el citoplasma (Hedbacker *et al.*, 2004). Por lo tanto, la localización espacio-temporal de estas cinasas no coincide con la de Hsf1 durante el crecimiento en glucosa.

El complejo heterotrimérico Snf1 está compuesto por la subunidad catalítica α (Snf1), por la subunidad β , que es una proteína de anclaje con función regulatoria (Gal83, Sip1 o Sip2) y por la subunidad regulatoria γ (Snf4) (Celenza *et al.*, 1989; Celenza y Carlson, 1989; Yang *et al.*, 1994; Jiang y Carlson, 1996; McCartney *et al.*, 2005). En presencia de la glucosa, la cinasa de serinas/treoninas Snf1 permanece en estado inactivo, lo cual correlaciona con la baja expresión de genes que no son requeridos durante el crecimiento fermentativo, por ejemplo, los genes que codifican para enzimas involucradas en la gluconeogénesis, en el ciclo de Krebs, en la respiración y en el metabolismo de fuentes alternas de carbono (Ronne, 1995; Gancedo, 1998; Hedbacker y Carlson, 2008). Cuando los niveles de la glucosa son altos, el dominio catalítico amino terminal y el regulatorio carboxilo interaccionan, inactivando a la cinasa Snf1. Esta autoinhibición se revierte ante la disminución de la glucosa (Jiang y Carlson, 1996). Cuando la treonina 210 (Thr120) permanece fosforilada, Snf1 alcanza su actividad máxima (Estruch *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1996; McCartney y Schmidt, 2001; Rubenstein *et al.*, 2008). También las cinasas de proteínas Sak1, Elm1 y Tos3 fosforilan a este aminoácido (Sutherland *et al.*, 2003). Por el contrario, el complejo de las fosfatasa Glc7–Reg1 lo desfosforilan (Rubenstein *et al.*, 2008). Otro nivel de regulación está dado por la localización celular del complejo Snf1, que depende de la subunidad β . Durante el crecimiento en glucosa, los componentes del complejo Snf1 se encuentran en el citoplasma y cuando la glucosa se agota, el complejo Snf1/Sip1 se desplaza a la vacuola, el complejo Snf1/Gal83 al núcleo y el complejo Snf1/Sip2 permanece en el citoplasma (Vincent *et al.*, 2001; Hedbacker *et al.*, 2004).

El efecto de las proteínas de choque térmico –HSP’s– en la actividad del Hsf1

El mecanismo de acción anterior implica que Hsf1 tiene una actividad basal y que, en respuesta al estrés, ésta aumenta rápidamente. Sin embargo, el proceso exacto por el cual Hsf1 percibe y responde al choque de calor no se ha esclarecido. Un modelo propuesto sugiere que el aumento de la temperatura disocia la unión entre Hsf1 y las HSP’s, del tipo Hsp70 y Hsp90 (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Stone y Craig, 1990; Halladay y Craig, 1995; Bonner *et al.*, 2000_{a,b}; Duina *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2001; Liou *et al.*, 2007; Nadaeu *et al.*, 1993). En condiciones normales, Hsp70 se une a Hsf1, y este complejo se asienta sobre los elementos *HSE*, condición que genera un estado de baja actividad. Durante el estrés por calor aumentan los niveles de las proteínas desnaturalizadas. Un efecto similar se observa durante el tratamiento con AZC (azetidina 2-carboxilato, un análogo de la prolina), lo cual requiere de la participación de las HSP’s para reordenar a las proteínas afectadas o dirigir éstas a su degradación. Esto implica una disminución de la poza libre de chaperonas, con lo que Hsf1 adquiere un estado de mayor actividad. Con el tiempo, el aumento en la síntesis de las chaperonas restablecería la capacidad para inactivar a Hsf1 (Craig y Gross, 1991). En *S. cerevisiae* esta hipótesis es apoyada por el fenotipo de elevada termotolerancia y de alta expresión de HSP’s en cepas mutantes *ssa1Δ ssa2Δ* (Craig *et al.*, 1995; Halladay y Craig, 1995; Bonner *et al.*, 2000_a). Las observaciones acerca de que Ssa4 (Hsp70), Hsp82 y Hsc82 (Hsp90) se mantienen en el núcleo, en respuesta al estrés, apoya el argumento anterior (Chughtai *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 2004; Tapia y Morano, 2010).

El factor de transcripción Skn7

El Skn7 está involucrado en la regulación de la expresión de genes esenciales para la biosíntesis de la pared celular, en la progresión del ciclo celular (Brown *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1995) y en la respuesta al estrés oxidativo y al estrés osmótico.

Cuando Skn7 el aspartato (D427), a través del sistema de dos componentes Sln1-Ypd1 se favorece la expresión de transcritos relacionados con la alteración de la membrana celular o al estrés osmótico. Tal es el caso de *OCHI*, que codifica a la β -1,6 manosil-transferasa (Li *et al.*, 2002). Una segunda vía de estimulación de Skn7, independiente de la fosforilación del

D427, permite la inducción de genes de respuesta al estrés oxidativo a través de los elementos *HSE*, como *TRX2*, que codifica para la tiorredoxina citoplasmática, o a *SSA1*, que codifica a una Hsp70 (Raitt *et al.*, 2000). De los 81 genes que se inducen en respuesta al estrés oxidativo, sólo *DNM1* y *OLA1* dependen exclusivamente de Skn7 (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, el mecanismo con el que Skn7 responde al estrés oxidativo aún no se describe. Se ha observado que cuando hay alta actividad de la Red de Regulación PKA (RR-PKA), la respuesta al estrés oxidativo se encuentra reprimida, como resultado de la inhibición de la actividad de los FT's Skn7 y Yap1 (Charizanis *et al.*, 1999). Entonces, Skn7 colabora de diversas maneras con Yap1 y Hsf1 para regular la respuesta al estrés oxidativo (Raitt *et al.*, 2000; Mulford y Fassler, 2011).

Debido a que la secuencia primaria del dominio de unión al ADN del FT Skn7 es similar al de Hsf1, se propuso y comprobó que Skn7 se une a los elementos *HSE*, como los localizados en los promotores de los genes *TRX2*, *SSA1* y *OCHI*, aunque únicamente en respuesta al estrés oxidativo y no en respuesta al choque de calor (Raitt *et al.*, 2000). Además, Skn7 interacciona con otras proteínas, como son el factor de transcripción que regula el ciclo celular, Mbp1 (Bouquin *et al.*, 1999) y el factor de transcripción de respuesta al calcio, Crz1 (Williams y Cyert, 2001). La actividad de Skn7 es modesta, pero colabora con otros factores en la regulación de la respuesta a distintos estímulos.

Consenso e integración de información. Mecanismos de transducción de señales

La señalización basada en grupos fosfato está presente en la mayoría de los organismos y es fundamental para regular los procesos celulares en las arqueas, en los protistas y en los eucariontes (Kannan *et al.*, 2007). En el genoma de *S. cerevisiae* se encuentran 127 cinasas de proteínas, de las cuales 117 son típicas de eucariontes y las restantes 10 son atípicas (Figura 1) (Hunter y Plowman, 1997; Rubenstein y Schmidt, 2007).

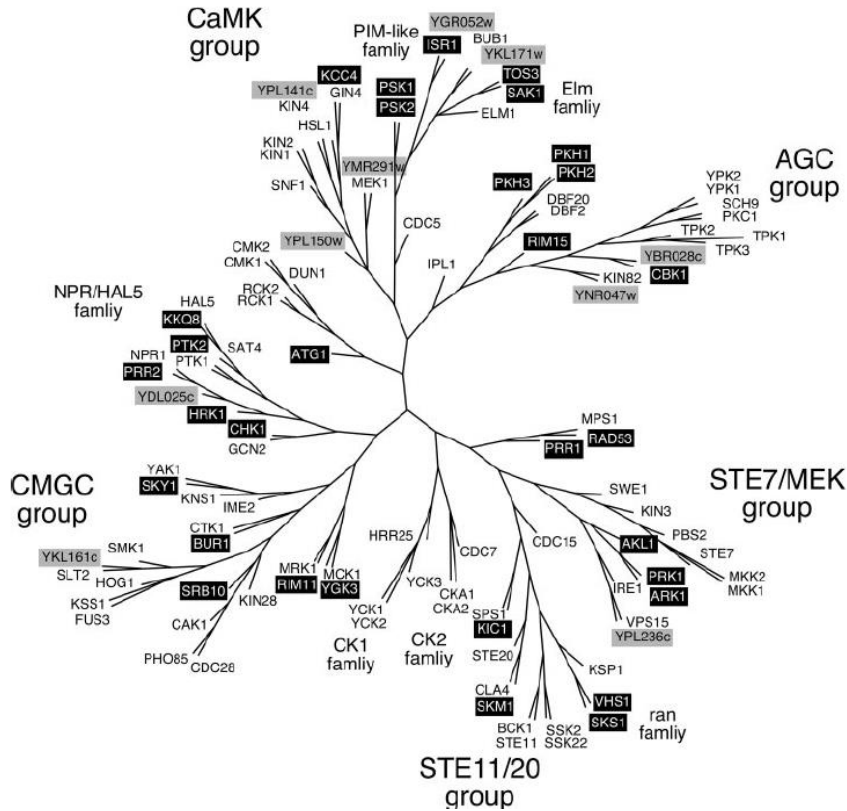


Figura 1. Dendrograma de las 112 cinasas de *S. cerevisiae*. Tomado de: Rubenstein y Schmidt, 2007.

La señalización a través de la PKA

La levadura *S. cerevisiae* prolifera cuando dispone de nutrientes y, por el contrario, crece lentamente cuando éstos escasean o cuando las condiciones físico-químicas del medio le son adversas (Thevelein y de Winde, 1999). Para modular su crecimiento, las células monitorean el ambiente circundante mediante estrategias diversas, integrando los estímulos o señales generadas y reestructurando, incluso, el estado transcripcional del genoma (Thevelein y de Winde, 1999; Santangelo, 2006). Esto es coordinado de manera compleja por varias redes de señalización (Carlson, 1999; Thevelein *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2002; Rohde *et al.*, 2004; Zaman *et al.*, 2008; Smets *et al.*, 2010).

En *S. cerevisiae*, una de las rutas principales de señalización que regula el metabolismo y el crecimiento en respuesta a la presencia de nutrientes, y a las condiciones de estrés, involucra a la cinasa de proteínas dependiente del AMP cíclico [PKA] (Thevelein y de Winde, 1999),

la cual estimula tanto a las enzimas de la glucólisis y fermentación como a aquellas involucradas en el desarrollo y en la proliferación celular. Además, se presenta la inhibición de las proteínas involucradas en la resistencia al estrés, en la gluconeogénesis y en la síntesis de la trealosa y del glucógeno (Figura 2) (Thevelein y De Winde, 1999; Santangelo, 2006; Rubio-Teixeira *et al.*, 2010; Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Componentes de la Red de Regulación Ras-PKA

Para monitorear el ambiente circundante, la levadura utiliza a los receptores acoplados a las proteínas G (GPCR), por lo que para la Red de Regulación Ras-PKA se asume (véase Figura 2):

1. El módulo Gpa1-Gpr2, que es el equivalente funcional de las proteínas G heterotriméricas de los mamíferos, percibe la glucosa o la sacarosa extracelular a través de la proteína receptora transmembranal –Gpr1–. Al percibir la glucosa, el receptor estimula el intercambio del GDP por el GTP de la proteína Gpa2 (proteína tipo $G\alpha$). Unido el GTP a Gpa2, la adenilato ciclasa (AC) –Cyr1– es estimulada, se aumentan los niveles de AMPc y la actividad de las cinasas Tpk's (PKA). Por el contrario, la subunidad reguladora Rgs2 (RGS “Regulator of G-protein Signaling”) promueve la retroinhibición de la cascada, promoviendo la actividad GTPasa de la proteína Gpa2 (Rubio-Teixeira *et al.*, 2010). Un segundo punto de control negativo de la actividad de Gpa2 lo constituye la proteína Asc1, que al unirse a el complejo Gpa2-GDP inhibe el intercambio de GDP por GTP (Rubio-Teixeira *et al.*, 2010).
2. El módulo Cdc25-Ras eleva la actividad de la PKA cuando los niveles de glucosa fosforilada aumentan dentro de la célula. Se postula que cuando la glucosa se encuentra fosforilada, la unión del GTP a las proteínas G monoméricas Ras (Ras1 y Ras2) aumenta de dos a tres veces (Thevelein *et al.*, 2000). Esto es relevante, ya que la isoforma Ras-GTP también estimula a la adenilato ciclasa –elevada actividad–. La estimulación de la AC por Ras-GTP requiere de elementos adicionales, como la proteína asociada a la AC –Srv2– o la proteína Sgt1, que puede actuar como chaperona (Santangelo, 2006). El intercambio del GDP por el GTP de Ras requiere de los factores de intercambio de nucleótidos Cdc25 y Sdc25 (Boy-Marcotte *et al.*, 1996; Thevelein *et al.*, 2000; Folch-

Mallol *et al.*, 2004). Por el contrario, las proteínas Ira, Ira1 e Ira2 inhiben a Ras acelerando su actividad intrínseca de GTPasa (Thevelein y de Winde, 1999; Thevelein *et al.*, 2000).

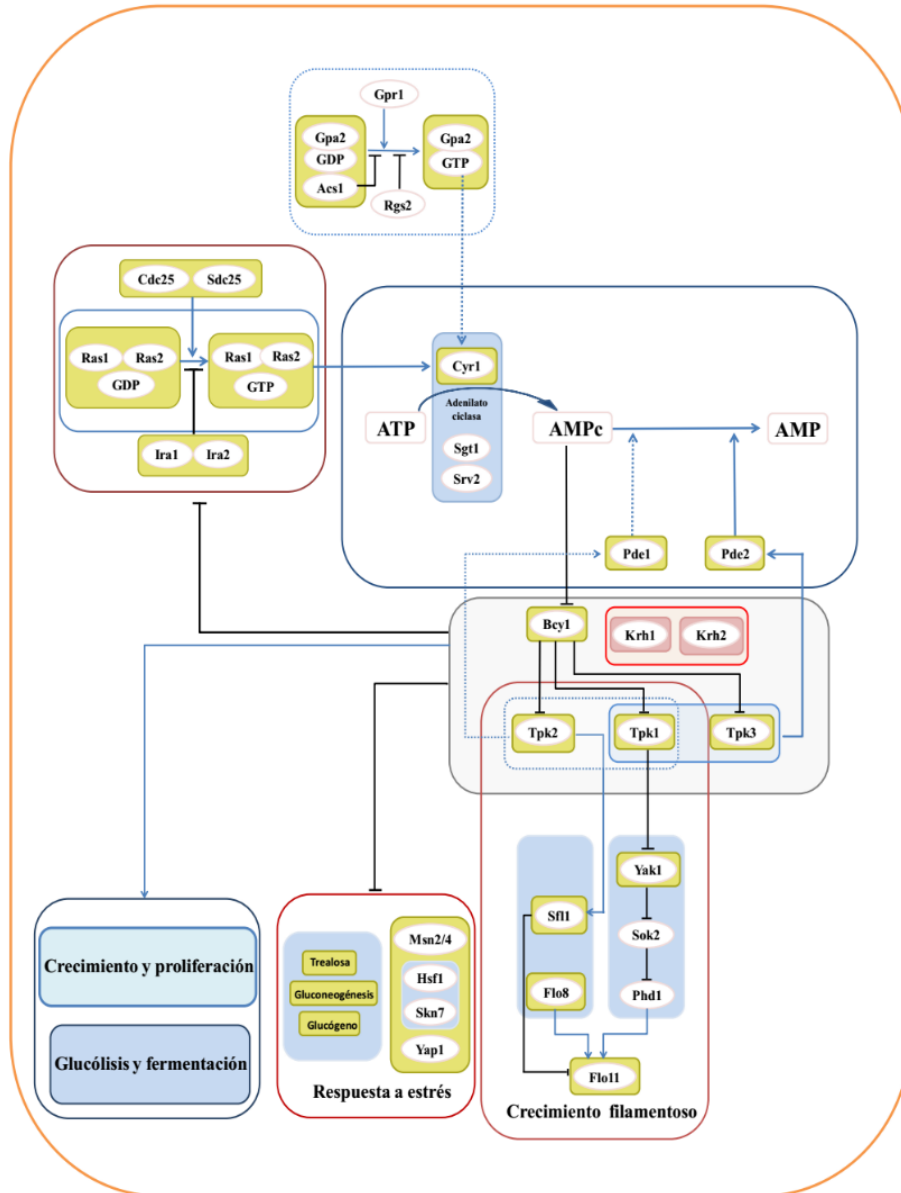


Figura 2. La Red de Regulación de la PKA (RR-PKA) en *S. cerevisiae*. Los cuadros representan componentes de la vía que actúan de manera más íntima, permitiendo apreciar más claramente las interacciones entre los distintos módulos que la componen. La ubicación espacial intracelular y la dinámica temporal de las interacciones implican niveles de regulación no representados en este esquema. Las líneas discontinuas indican las relaciones que se han demostrado entre los módulos durante la fase “lag” en cultivos líquidos. Las líneas continuas indican las relaciones que se han demostrado entre los módulos durante el crecimiento exponencial en un medio rico en nutrientes. Tomado de: Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2013.

Las cinasas Tpk's (PKA): estudios genéticos y funciones asignadas

La PKA en *S. cerevisiae* consta de tres subunidades catalíticas (C) codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (Toda *et al.*, 1987_b). Estas cinasas son reguladas negativamente por Bcy1 (R), mediante la formación de un complejo tetramérico inactivo, compuesto por dos proteínas R unidas a dos C (Cannon y Tatchell, 1987; Johnson *et al.*, 1987; Toda *et al.*, 1987_{a,b}). Al contrario, con el aumento en la concentración de AMPc se activan las cinasas Tpk's, mediante el siguiente mecanismo: dos moléculas del nucleótido cíclico se unen a cada una de las subunidades R; esto promueve un cambio conformacional que desencadena en la disociación del complejo R-C y, en consecuencia, la liberación/activación de las subunidades Tpk1, Tpk2 y Tpk3 (Cannon y Tatchell, 1987).

Las Tpk's reconocen residuos de serina o treonina ubicados dentro de las secuencias consenso R-R/K-X-S*/T* > R-X2-S*/T* = R-X-S*/T* (Kennelly y Krebs, 1991). Los análisis filogenéticos sugieren que las isoformas Tpk1 y Tpk3 tienen mayor cercanía evolutiva (Hunter y Plowman, 1997). El dominio de menor conservación en longitud y secuencia entre las estas cinasas es el amino-terminal; el de Tpk2 es de 66 aminoácidos y los de Tpk1 y Tpk3 constan de 83 y 84 residuos, respectivamente (Toda *et al.*, 1987_b). Esto ha llevado a sugerir que este segmento determina la especificidad hacia sus sustratos. Esta hipótesis se basa en el análisis de quimeras entre los dominios amino-terminal de las Tpk1 y Tpk2 de *C. albicans*, donde se demostró la relevancia del segmento de Tpk2 en la regulación del crecimiento invasivo (Bockmühl *et al.*, 2001).

Se ha concluido que la actividad de las PKA's (3) de *S. cerevisiae* es redundante en la regulación los procesos celulares implicados en la estimulación del crecimiento, la progresión del ciclo celular y la inhibición de la gluconeogénesis (Thevelein *et al.*, 2000; Santangelo, 2006; Tamaki, 2007; Gancedo, 2008). Experimentos *in vitro* han demostrado que Tpk1, Tpk2 y Tpk3 fosforilan a 256, 29 y 79 sustratos, respectivamente. Únicamente ocho de este conjunto de blancos son fosforilados por las tres cinasas, mientras que 39 fueron reconocidos por dos de las tres. Estas observaciones sostienen la hipótesis que cada una de las subunidades catalíticas tiene una especificidad distinta hacia las proteínas blanco (Ptacek *et al.*, 2005). Por lo anterior, se puede sugerir que las Tpk's no tienen funciones redundantes.

Sin embargo, aún no es claro si este patrón de fosforilación ocurre en la célula, por lo que será necesario extender estos análisis a sistemas *in vivo*.

Se conocen algunos procesos celulares que de manera específica se regulan por cada una de las Tpk's. Se ha demostrado que la subunidad Tpk2 participa en la estimulación del crecimiento pseudohifal (Robertson *et al.*, 1998), en la desrepresión de genes involucrados en la degradación de la trehalosa, en la asimilación del hierro y en la homeostasis del agua (Robertson *et al.*, 2000); la cinasa Tpk1 estimula la expresión de genes que participan en la respiración de la célula y en la biosíntesis de aminoácidos con cadenas ramificadas (Robertson *et al.*, 2000). Mientras que la subunidad Tpk3 estimula el contenido enzimático de la mitocondria durante el crecimiento fermentativo (Chevtzoff *et al.*, 2005) e hiperfosforila a Rgt1, que es un factor de transcripción involucrado en la represión del gen *HXK2* –hexocinasa 2– cuando la concentración de la glucosa es alta.

Dinámica de la actividad de las PKA

El mecanismo mediante el cual Bcy1 inhibe las Tpk's –favorecido cuando los niveles de AMPc son bajos– está bien caracterizado. Aunque se ha propuesto que las proteínas tipo Kelch, Krh1 y Krh2 facilitan la interacción entre Bcy1 y las cinasas (Peeters *et al.*, 2006). Cuando *S. cerevisiae* se cultiva en medio nutritivo con glucosa, los niveles de la proteína Bcy1 son aproximadamente el doble de la suma de las tres Tpk's (Tudisca *et al.*, 2010). Esto aseguraría la formación del tetrámero R-C. Sin embargo, en estas condiciones es cuando la PKA presenta mayor actividad. Es posible que este efecto se deba –parcialmente– a diferencias en la compartimentalización intracelular de estos componentes. De hecho, se sabe que la localización subcelular de las subunidades de la PKA no es homogénea, ya que durante el crecimiento en glucosa la mayoría de las moléculas de Bcy1 se encuentran en el núcleo al igual que Tpk2, mientras que la mayor parte de las moléculas de Tpk1 y Tpk3 se localizan en el citoplasma (Griffioen *et al.*, 2000; Tudisca *et al.*, 2010). Además, en la cepa *bcy1Δ* –con alta actividad de PKA– la fosfodiesterasa –Pde2– se localiza principalmente en el núcleo (Hu *et al.*, 2010). Lo anterior, permite sugerir la hipótesis de que los gradientes en la concentración del AMPc son drásticos entre los diferentes compartimentos subcelulares.

La oscilación de las concentraciones de AMPc es crucial para la dinámica de activación de la PKA. Cuando un cultivo de levaduras en ayuno recibe una fuerte dosis de glucosa (fase “lag” de la curva de crecimiento) se dispara la síntesis rápida y vigorosa de AMPc, por acción de la AC. Este pico de AMPc disminuye por efecto de la fosfodiesterasa Pde1, que inmediatamente es activada por la PKA (Ma *et al.*, 1999). Esta retroinhibición depende de las cinasas Tpk1 y Tpk2 (Nikawa *et al.*, 1987; Mbonyi *et al.*, 1990).

Después del choque de glucosa –la fase lag–, y conforme prosigue el crecimiento de la levadura, la degradación del AMPc se da principalmente por la fosfodiesterasa de alta afinidad –Pde2– (Park *et al.*, 2005). Lo anterior es favorecido por Tpk1 y Tpk3 –y no Tpk2–, a través de la activación y estabilización de Pde2 (Hu *et al.*, 2010). De manera interesante, al cambiar la fuente de carbono de glucosa a rafinosa, o cuando la actividad de la PKA disminuye, la Pde2 se localiza mayoritariamente en el citoplasma (Hu *et al.*, 2010).

Otro punto clave de retroregulación de la PKA, es mediante el control de Ras. Se ha sugerido que la función de las proteínas G –Ras– puede estar relacionada con la percepción y la transmisión de las señales de estrés. Mecanismo donde participa Cdc25, dado que su permanencia en la membrana plasmática es dependiente de Ssa1 –chaperona tipo Hsp70– (Geymonat *et al.*, 1998). Durante el estrés oxidativo o de calor, los niveles de Cdc25 disminuyen (Wang *et al.*, 2004). Se plantea que este efecto es debido a que en condiciones de estrés aumentan los niveles de las proteínas desnaturalizadas, requiriéndose de la maquinaria de protección –chaperonas como Hsp70 (Ssa1)–. En consecuencia, los niveles de Cdc25 anclados a la membrana son menores, lo que provoca a su vez la inactivación de la PKA. También la PKA afecta la localización de Ras2, ya que, al adicionar glucosa a células ayunadas de nutrientes, Ras2 se relocaliza en el citoplasma (Dong *et al.*, 2011). La localización espacio-temporal de los componentes de la Red de señalización Ras-Cdc25-PKA permite sugerir que la compartimentalización de los componentes es un mecanismo relevante para la regulación del crecimiento y de respuesta al estrés.

ANTECEDENTES

En presencia de nutrientes *S. cerevisiae* despliega un programa metabólico que favorece la proliferación celular. En contraste, durante periodos de escasez el ciclo celular se detiene, y se promueve la entrada a la fase estacionaria o G₀, lo que implica un periodo de reposo metabólico (Werner-Washburne *et al.*, 1996; Hohmann y Mager, 2003; Zaman *et al.*, 2008; Smets *et al.*, 2010). Dada la complejidad del sistema a estudiar, en este trabajo nos enfocaremos en analizar la dinámica de los componentes genéticos y proteicos denominados Red de Regulación Ras-PKA (RR-PKA), en condiciones estables de temperatura (25°C) y en respuesta al estrés por calor –termotolerancia inducida y basal– (ver adelante). Esta red participa en el control de metabolismo del C (carbono) y constituye un núcleo central en la regulación del crecimiento y la adaptación a las condiciones ambientales. En apoyo a esta idea se cuenta con la evidencia de que en cepas mutantes, donde se aumenta la actividad de la PKA, se presentan fenotipos asociados con el crecimiento fermentativo, es decir, las células crecen rápidamente y son sensibles al estrés; ejemplo de ello son las cepas mutantes en *pde2Δ* -fosfodiesterasa 2-, *bcy1Δ* -subunidad regulatoria de la PKA- o *RAS2^{val19}* -GTPasa 2- (Engelberg *et al.*, 1994; Ma *et al.*, 1999; Poplinski *et al.*, 2007). Por el contrario, en las cepas mutantes donde se reduce la actividad de la PKA, se presentan fenotipos asociados al crecimiento respiratorio y otros que asemejan condiciones de limitación de nutrientes; ejemplo de lo anterior son las cepas mutantes en *cdc25* –factor de intercambiador de nucleótido de guanina–, *cyr1*-adenilato ciclasa-, *ras1*- GTPasa 1- o *ras2^{ts}*- GTPasa 2-, que crecen lentamente y presentan termotolerancia durante la fase exponencial (Tatchell, 1986; Iida, 1988; Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Como parte de los experimentos diseñados por el grupo de trabajo del Dr. Jorge Nieto Sotelo para estudiar los elementos genéticos relacionados con la respuesta a estrés en *S. cerevisiae*, se promovieron mutaciones, mediante mutagenesis con metasulfonato de etilo (EMS), en cultivos líquidos con glucosa y en fase de crecimiento exponencial: experimento del cual se comprobó que las cepas mutantes *cdc25-21* y *cdc25-22* muestran el 90% de sobrevivencia a condiciones letales –un choque de 50°C durante 20 minutos–, a lo que llamaremos termotolerancia basal; en contraste con la sobrevivencia de la cepa control (silvestre) que es del 0.01%. Asociado a esta elevada termotolerancia, el tiempo para duplicar la población de

estas cepas mutantes es de más de cinco horas, el doble del control. Esto se debe a que en las mutantes en *CDC25*, la fase G₁ del ciclo celular es prolongada. La sobrevivencia elevada se relaciona, entre otras cosas, al aumento en la expresión de genes de choque de calor –como *HSP104*– y otros genes implicados en la protección de los complejos celulares (Figura 3 y datos no mostrados) (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

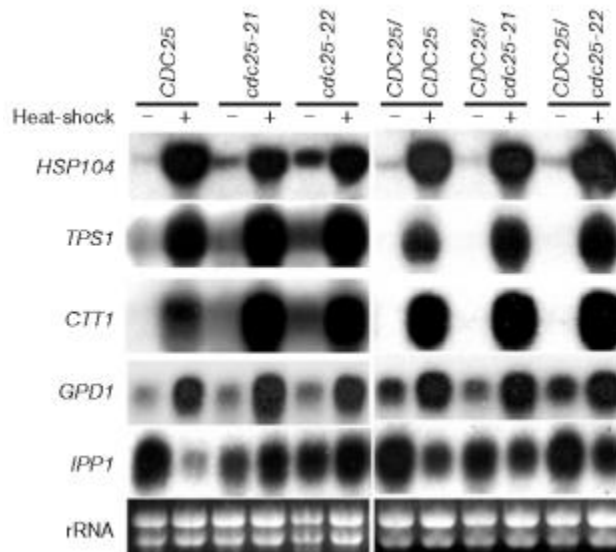


Figura 3. Expresión constitutiva de genes de respuesta a estrés en cepas *CDC25* – control– y en las cepas mutantes *cdc25-21* y *cdc25-22* durante el crecimiento en glucosa. La imagen muestra los resultados del experimento tipo Northern para medir los niveles de los transcritos de los genes de respuesta a estrés *HSP104*, *TPS1*, *CTT1* y *GPD1* y como el control *IPP1*, en células crecidas a 25°C y en respuesta a un choque térmico a 39°C durante 15 min en cepas haploides o diploides (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

El efecto de baja actividad de PKA, obtenido en las cepas mutantes de *cdc25*, correlaciona con el mecanismo de inhibición descrito para la subunidad reguladora –Bcy1–, esto genera el aumento en la actividad de los FT’s Msn2/Msn4 (ver Introducción) y Yap1 (Ventura-García, 2004). Pero notoriamente también aumenta la expresión de los genes mediada por los elementos *cis* del tipo *HSE* (Figuras 3 y 4).

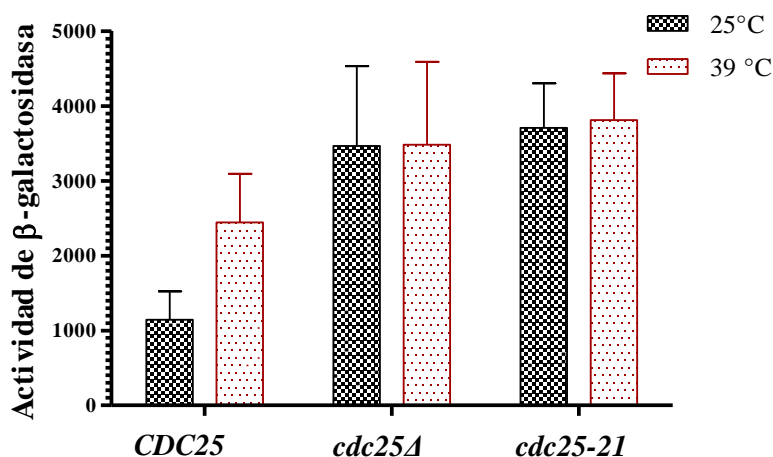


Figura 4. Expresión génica dependiente de *HSE* en cepas con genotipos *CDC25* (control), *cdc25Δ* y *cdc25-21*, derivadas de W303. Los ensayos se realizaron durante crecimiento exponencial en glucosa a 25°C y en respuesta a un choque de calor a 39°C (Pérez Landero, 2007).

Con herramientas de ingeniería genética, se comprobó que la expresión constitutiva del *HSE-CYC1-lacZ* y la sobrevivencia al choque de calor en los mutantes *cdc25Δ*, en fondo genético denominado W303 (*MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1*), se da a través de los FT's Hsf1 y Skn7, ya que al eliminar el dominio carboxilo-terminal de Hsf1 (*cdc25Δ hsf1ΔCTA¹⁻⁵⁸⁷*) o al eliminar *SKN7* (*cdc25Δ skn7Δ*), la expresión del gen reportero es baja, tanto a 25°C como a 39°C. Además, no hay temoinducción del gen reportero en las mutante *cdc25Δ hsf1ΔCTA¹⁻⁵⁸⁷*. Mientras que en la cepa mutante *cdc25Δ skn7Δ* la expresión del reportero disminuye a 25°C, pero no en respuesta a calor, ya que se induce a niveles de control (Figura 5) (Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2007). Basados en estas observaciones, se concluye que en condiciones de actividad baja de la PKA a 25°C, tanto Hsf1 como Skn7 contribuyen a la expresión de genes con elementos *HSE*. En contraste ante el estímulo por calor a 39°C, únicamente Hsf1 opera en el aumento en la expresión de genes con elementos *HSE* en los promotores (figura 5).

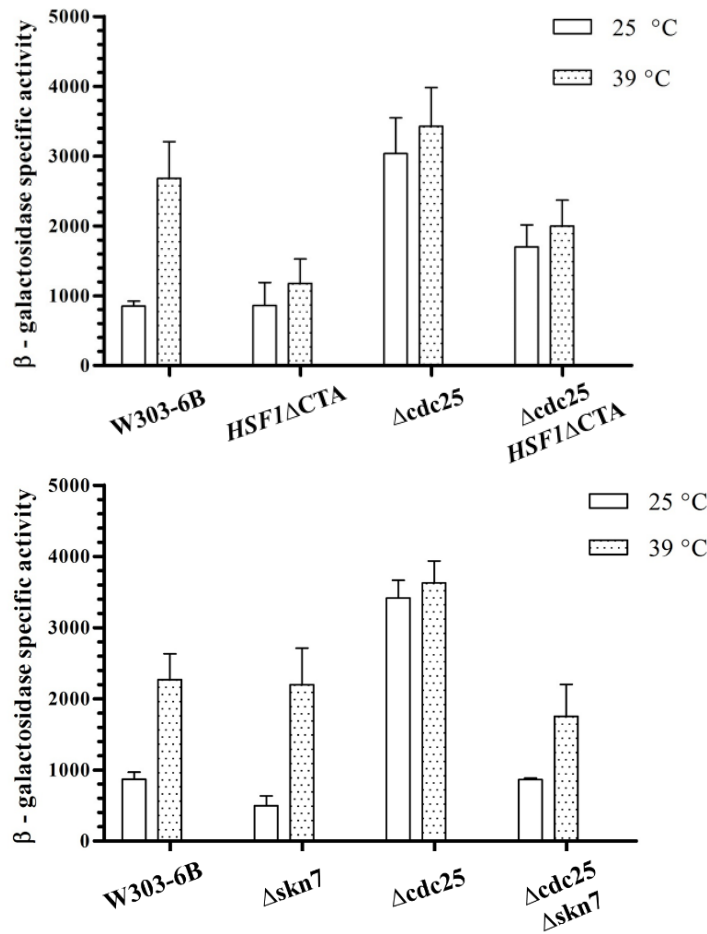


Figura 5. Expresión génica dependiente de *HSE* que comprueba las interacciones epistáticas entre el complejo Hsf1/Skn7 y la RR-PKA, durante condiciones estables y en respuesta a calor (Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2007).

Estos resultados se contraponen a lo reportado en dos publicaciones previas a este trabajo, en las que se concluyó que la actividad de Hsf1 es independiente de la influencia de la PKA. En dichos experimentos se utilizan los fondos genéticos denominados SP1 (*Mata his3 leu2 ura3 trp1 ade8 can*) y WS17-5D (*Mata leu2 ura3 his3 trp1 ade8*) y se comprueba que el nivel de fosforilación de Hsf1; la unión a los sitios consenso *HSE* y la expresión de genes con cajas *HSE* NO es afectada en mutantes que aumentan –tales como *RAS2^{val19}* y *bcy1*– o reducen – como *cyr1* y *ras2*– la actividad de la PKA (Marchler *et al.*, 1993; Engelberg *et al.*, 1994). Sin embargo, en coincidencia con nuestras observaciones, un cuarto trabajo reporta que la expresión de *HSP12* y *HSP26* es elevada cuando no hay actividad de la PKA, y este aumento es dependiente de Hsf1 (Ferguson *et al.*, 2005). De las evidencias anteriores emerge la

posibilidad de analizar a detalle la dinámica de la red de señalización de la PKA y su conexión con la actividad de los FT's Hsf1 y Skn7.

HIPÓTESIS

La RR-PKA modula la actividad de los FT's Hsf1/Skn7 durante el estrés por calor, en ciertas cepas de *S. cerevisiae* de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento y medios utilizados

Los cultivos de levadura se crecieron a 25°C en medio YPDA o MM. En medio líquido, los cultivos se agitaron a 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4. En medio sólido se usaron cajas con agar al 2 %.

1. Medio YPDA líquido: Extracto de levadura al 1%, bacto-peptona al 2%, glucosa al 2% y sulfato de adenina 40 mg/l, ajustando el pH a 7.5 (Guthrie y Fink, 1991).
2. Medio mínimo líquido (MM): Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos al 0.67%, dextrosa al 2%, más las auxotrofías requeridas de acuerdo con la cepa. Se suplementaron aminoácidos (L-metionina 20 mg/l, L-arginina 20 mg/l, L-triptófano 2 mg/l, L-histidina 20 mg/l, L-leucina 3 mg/l) y nucleótidos (sulfato de adenina 40 mg/l, uracilo 20 mg/l), ajustándose el pH a 7.5 (Guthrie y Fink, 1991).

Ensayos de termotolerancia

Para cuantificar la termotolerancia basal de las cepas, se siguió el protocolo descrito por Folch-Mallol y col. (2004). Para los ensayos de termotolerancia inducida los cultivos fueron crecidos durante 1 h a 39°C, antes de exponerlos a 50°C (Pérez-Landero y Nieto Sotelo, 2007).

Microorganismos utilizados y reemplazos genéticos

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas se enlistan en la Tabla S1 (Apéndice 1). La delección de los genes *RAS2* (cepas Wras y AW3-ras2, Figura 13), *TPK1* (cepa KG712, Figura 6), *TPK2* (cepa KG604, Figura 7), *TPK3* (cepas KS580, KS590 y KS700, Figuras 8 y 11), *BCY1* (cepa CM0095, obtenida por C. Martínez-Anaya, C), *SSA1* (cepas S001, S002 y SL708, Figuras 9 y 12) y *SSA2* (cepas SL622 y SL623, Figura 10) se llevó a cabo en el fondo genético W303. La elevada tasa de recombinación homóloga en células mitóticas de *S. cerevisiae* permite reemplazar el marco de lectura abierto de los genes por los marcadores de selección *KanMX6* o *loxP-KanMX4-loxPK*, usando las metodologías descritas por Longtine y col. (Longtine,

1998) y por Guldener y col. (Guldener *et al.*, 1996), respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados para las deleciones se enlistan en la Tabla S2 (Apéndice 1).

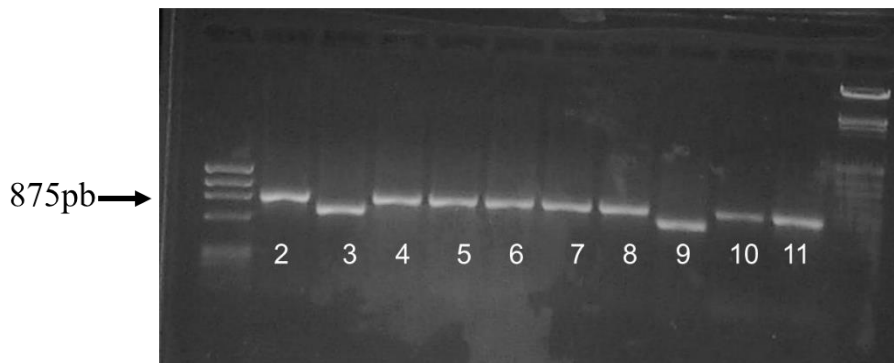


Figura 6. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *TPK1* por *KanMX*. Carriles 1 y 12, marcadores de peso molecular. Carril 2, W303-1a; carril 3, KG712 (*tpk1Δ::KanMX6*); carril 4, KG604 (*tpk2Δ::loxP*); carril 5, KS580 (*tpk3Δ::loxP*); carril 6, KS570 (*tpk3Δ::loxP KanMX4 loxP*); carril 7, KS585 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP-kanMX4-loxP*); carril 8, KS590 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP*); carril 9, KS710 (*tpk2Δ::loxP tpk1Δ::KanMX6*); carril 10, cepa SL2000 (*tpk2 Δ::loxP bcy1Δ::loxP*); carril 11, cepa SL2001 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP bcy1Δ::KanMx*). La flecha señala al producto esperado para *TPK1*, la NO integración del marcador *KanMx*.

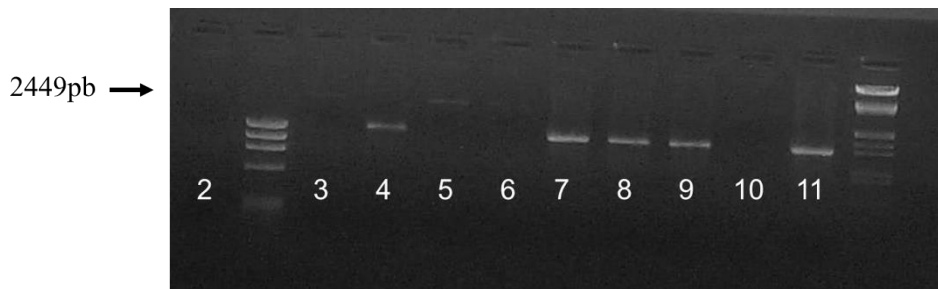


Figura 7. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *TPK2* por *KanMX*. Carriles 1 y 12, marcadores de peso molecular. Carril 2, W303-1a; carril 3, KG712 (*tpk1Δ::KanMX6*); carril 4, KG604 (*tpk2Δ::loxP*); carril 5, KS580 (*tpk3Δ::loxP*); carril 6, KS570 (*tpk3Δ::loxP KanMX4 loxP*); carril 7, KS585 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP-kanMX4-loxP*); carril 8, KS590 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP*); carril 9, KS710 (*tpk2Δ::loxP tpk1Δ::KanMX6*); carril 10, cepa SL2000 (*tpk2 Δ::loxP bcy1Δ::loxP*); carril 11, cepa SL2001 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP bcy1Δ::KanMx*). La flecha señala al producto esperado para *TPK2*.

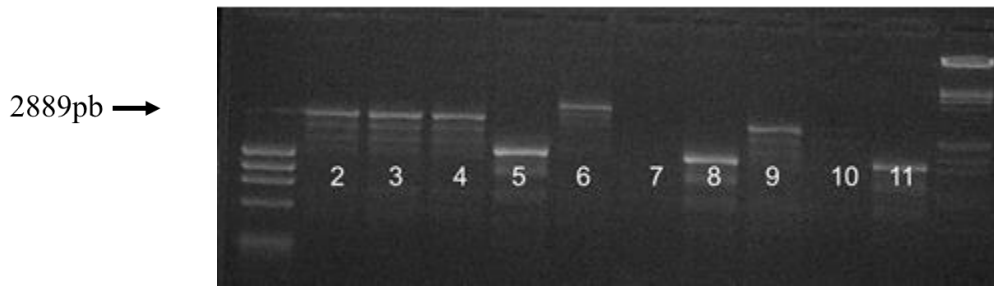


Figura 8. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *TPK3* por *KanMX*. Carriles 1 y 12, marcadores de peso molecular. Carril 2, W303-1a; carril 3, KG712 (*tpk1Δ::KanMX6*); carril 4, KG604 (*tpk2Δ::loxP*); carril 5, KS580 (*tpk3Δ::loxP*); carril 6, KS570 (*tpk3Δ::loxP KanMX4 loxP*); carril 7, KS585 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP-kanMX4-loxP*); carril 8, KS590 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP*); carril 9, KS710 (*tpk2Δ::loxP tpk1Δ::KanMX6*); carril 10, cepa SL2000 (*tpk2 Δ::loxP bcy1Δ::loxP*); carril 11, cepa SL2001 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP bcy1Δ::KanMx*). La flecha señala al producto esperado para *TPK3*.

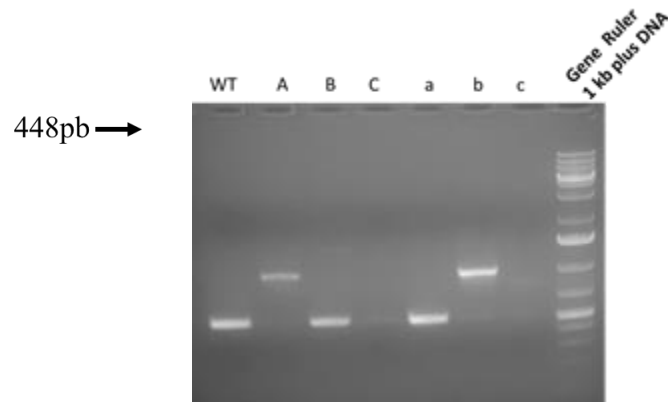


Figura 9 Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *SSA1* por *KanMX*. Los carriles A-C muestran a las candidatas de la transformación de la cepa W303-1a, mientras que los carriles a-c muestran a las transformantes de la cepa KG712. La flecha señala al producto esperado para *SSA1*.

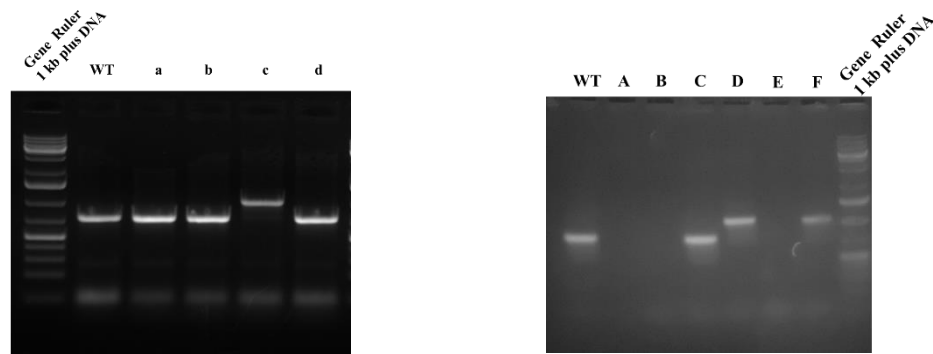


Figura 10. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *SSA2* por *KanMX*. En la imagen de la izquierda, los carriles a-d muestran a las candidatas de la transformación de la cepa KG712, mientras que en la imagen de la derecha los carriles A-E muestran a las transformantes de la cepa W303-1a. La flecha señala al producto esperado para *SSA2*.

Para obtener la mutante doble *tpk1Δ::KanMX6::NAT3 tpk3Δ::loxP* (KS700), primero se cambió el marcador de selección *KanMX6* de la cepa KG712 (*tpk1Δ::KanMX6*), por el marcador *NAT3*, que confiere resistencia a la droga cloNAT (nourseotricina “nourseothricin” WERNER BioAgents, Batch No. 22022000) (Goldstein *et al.*, 1999). Se digirió 1 µg del plásmido integrativo pAG25 (p3014 EUROSCARF) con la enzima *EcoR1*. El producto de esta digestión enzimática se utilizó para transformar a la cepa KG712. Una vez transformadas, las células se sembraron en medio YPD-cloNAT (100 µg/ml). Posteriormente se verificó que las candidatas fuesen sensibles a G-418. De las colonias resistentes a cloNAT se recuperaron aquellas que conservasen los fenotipos originales de la cepa *tpk1Δ::KanMX6* (KG712), como son la velocidad de crecimiento en medio sólido y líquido, así como el nivel de termotolerancia basal. En seguida se transformó a la cepa *tpk1Δ::KanMX6::NAT3* (KG712-N) con el producto de la amplificación de los oligonucleótidos FTPK3i y RTPK3i, se utilizó como patrón al plásmido TPK3-pRS316 (Figura 11).

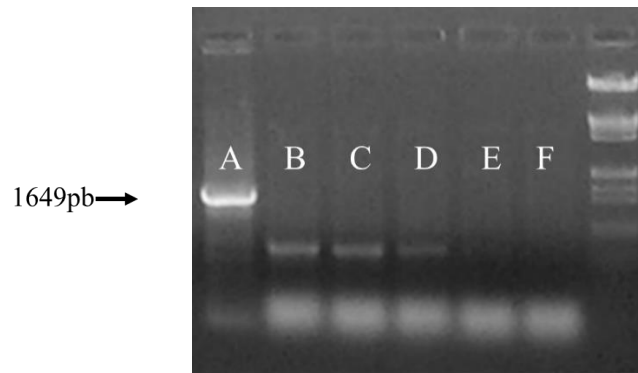


Figura 11. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *TPK3* por *KanMX*. El carril A muestra a la cepa silvestre W3031a; los carriles B-F muestran a las transformantes de la cepa KG712-N (*tpk1Δ::KanMX6::NAT3*). La flecha señala al producto esperado para *TPK3*.

Para la construcción de la triple mutante *tpk2Δ ssa1Δ ssa2Δ* (cepa SL708, Figura 12) se siguió la siguiente estrategia: la cepa KG604 (*tpk2Δ*) se transformó con 1 µg del producto de amplificación obtenido con los oligonucleótidos FDSSA2 y RDSSA2 y el ADN genómico de la cepa YLL024C (*ssa2Δ::KanMX4*, obsequiada por la MC. Adriana Espinoza del laboratorio “GENETIC SYSTEMS BIOLOGY” del LANGEBIO). Una colonia que mostró el producto esperado para la integración del alelo *ssa2Δ::KanMX4* –usando los oligonucleótidos FDSSA2 y SPL05– (SL623 *tpk2Δ ssa2Δ::KanMX4*), se transformó con el protocolo descrito arriba para el plásmido pAG25, con el objeto de cambiar el marcador *KanMX4* por *NAT3*. La colonia seleccionada (SL623-N *tpk2Δ ssa2Δ::KanMX4::NAT3*) se transformó con 1 µg del producto de la amplificación del ADN genómico de la cepa YAL005C (*ssa1Δ::KanMX4*) –usando los oligos FDSSA1 y RDSSA1–. Finalmente se seleccionó una colonia cuyo ADN amplificó por PCR con los oligos FDSSA1 y SPL05 y se designó SL708 (*tpk2Δssa2Δ::KanMX4::NAT3 ssa1Δ::KanMX4*) (Figura 12).

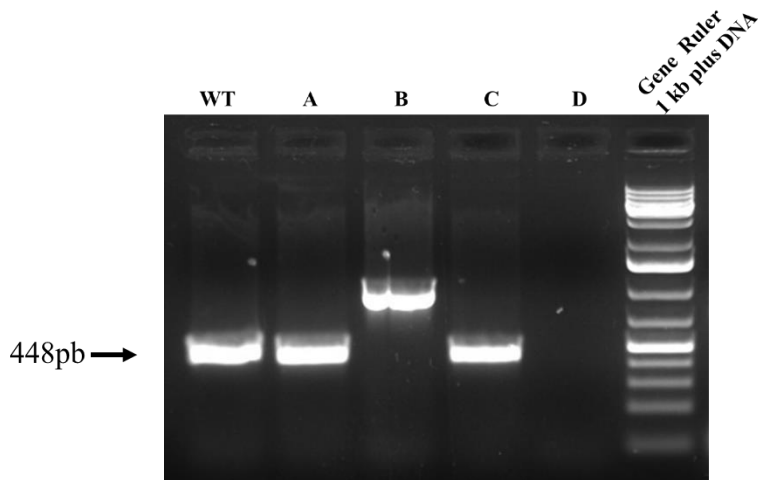


Figura 12. Amplificación para confirmar el reemplazo de *SSA1* por *KanMX*. Los carriles A-D muestran los productos de la amplificación por PCR para detectar a las colonias deletas en *SSA1*. La flecha señala al producto esperado para *SSA1*.

La delección del gen *RAS2* se realizó como a continuación se describe: se amplificó la construcción genética *ras2Δ::KanMX4* a partir del ADN de la cepa Y02978 –EUROSCARF, Y02978– (Winzeler *et al.*, 1999) con los oligonucleótidos FDRas2 y RDRas2. Las células se transformaron con 1 µg del producto de está amplificación por PCR, usando el protocolo de

transformación que usa acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995). Las células transformadas se sembraron en cajas con medio YPDA-G418 (300 μ gr/ml de GENETICIN®, GIBCO, Cat. No. 11811-023). A las colonias que crecieron en YPDA-G418 se les extrajo el ADN y con oligonucleótidos específicos (ver Tabla S2, del apéndice 1) –uno localizado antes del ATG del marco de lectura abierta y otro a la mitad del marcador de selección *KanMX6* (SPL05) se amplificó el templado para seleccionar aquellas células donde el reemplazo fuese exitoso.

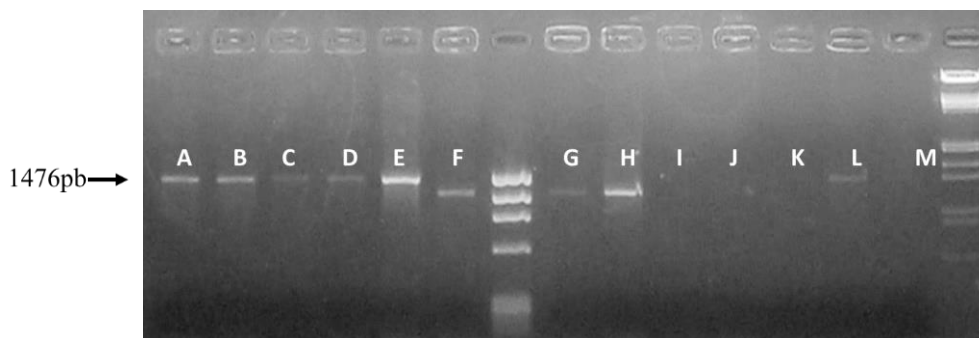


Figura 13. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *RAS2* por *KanMX*. Carril A, cepa W303; carriles B-F, candidatas de la transformación de la cepa KT1112; carriles G-M, candidatas de la transformación de la cepa AW3. La flecha señala al producto esperado para *RAS2*.

Estrategia para la complementación de la cepa *tpk2Δ tpk3Δ TPK1*

Para reintroducir el gen *TPK2* a la cepa KS590 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP*), se adaptó el protocolo del *delitto perfetto* (Storici *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2005). Esto se logró en dos pasos: en el primer paso se usó como templado al plásmido pRS306 (Sikorski *et al.*, 1989) para amplificar mediante PCR el gen *URA3* flanqueado por 40 pb, correspondientes a la secuencia que a su vez flanquea a *tpk2Δ::loxP* usando los oligonucleótidos FTPK2-URA3 y RTPK2URA3 (Figura 14). Una vez obtenida la cepa KS590-URA3 (*tpk2Δ::URA3 tpk3Δ::loxP*), el segundo paso consistió en reintegrar el gen *TPK2* usando el producto de PCR que se obtuvo de la reacción con los oligonucleótidos TPK2-Ucl y TPK2-Lcl y el DNA genómico de W303-1a, que son complementarios a las regiones intergénicas arriba y abajo del marco de lectura de *TPK2*, respectivamente. La cepa resultante KS590-URA3-TPK2 (*tpk2Δ::TPK2 tpk3Δ::loxP*) se seleccionó mediante resistencia en medio YPDA con FOA a 1 mg/ml (Burke *et al.*, 2000). Por PCR se confirmó la incorporación de *TPK2* al genoma (Figura 15). Finalmente se secuenció el producto anterior (Apéndice 2).

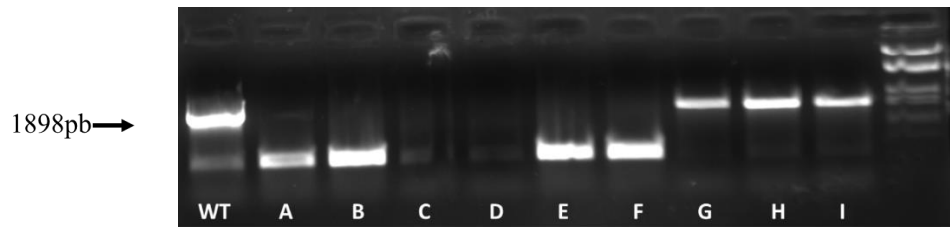


Figura 14. Amplificación por PCR para confirmar la integración del gen *URA3* en la cepa KS590. El carril WT muestra el producto de la cepa silvestre. Los carriles A-I son candidatas de la transformación de la cepa KS590 (*tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP*). La flecha señala al producto esperado para *TPK2*.

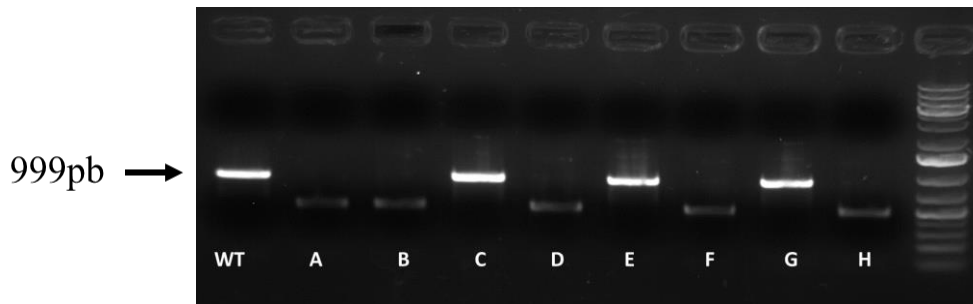


Figura 15. Amplificación por PCR para confirmar el reemplazo de *tpk2::URA3* por el gen *TPK2*. El carril WT muestra el producto de la cepa silvestre. Los carriles A-H son candidatas de la transformación de *TPK2* en la cepa KS590::*URA3* (*tpk2Δ::URA3 tpk3Δ::loxP*). La flecha señala al producto esperado para la integración del gen *TPK2*.

Ensayos de la actividad de β -galactosidasa

Los ensayos de β -galactosidasa se hicieron en cultivos crecidos en MM hasta fase exponencial, con DO_{600} entre 0.4 y 0.5. Para estimar el fenotipo de respuesta a calor, se tomaron 5 ml del cultivo y se crecieron –durante 1 h a 39°C–, en seguida –otra h a 25°C–. Las células se recolectan por centrifugación, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en 100 μ l de buffer de lisis (ditiotretitol 1 mM, glicerol al 20% y Tris-HCl 100 mM pH 8); para su posterior análisis, se congelaron con nitrógeno líquido. El resto del cultivo –control–, se mantiene a 25°C durante 2 h (Burke *et al.*, 2000; Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2007); se trata de la manera descrita anteriormente.

Las muestras se lisan por agitación en vortex –durante 5 minutos, en ciclos de 15 segundos–. Se mantienen en frío y se les agrega 100 μ l de buffer de lisis + PMSF (40 mM). Se toman 25 μ l de los extractos para la cuantificación de la actividad de β -galactosidasa, de acuerdo

con el protocolo descrito en el manual editado por Burke (Burke *et al.*, 2000). La concentración de proteínas se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976). La actividad específica de β -galactosidasa se cuantificó en nmol de ONPG hidrolizados por min por mg de proteína.

Extracción de las proteínas solubles para medir la actividad de PKA total

Se cultivaron las células en 50 ml de medio SD hasta alcanzar una DO_{600} de 0.4. El cultivo se centrifugó inmediatamente a 4,000 rpm a una temperatura de 4°C durante 3 min. La pastilla celular se lavó con agua MQ fría y se centrifugó nuevamente. Se decantó el agua y rápidamente se congelan las células en nitrógeno líquido. Posteriormente las células congeladas se trituraron por maceración con mortero y pistilo, agregando nitrógeno líquido para evitar el calentamiento de las muestras. Las células trituradas se suspendieron en el buffer de extracción: TRIS tris-hidroximetilaminometano a 50 mM pH 7.4 + β -mercaptoetanol a 20 mM + PMSF a 0.5 mM (disuelto en etanol) + la mezcla de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (4 mg/ml, BOEHRINGER MANNHEIM, cat. Núm. 1697498). El extracto se centrifugó –durante 10 min a 13,000 rpm a 4°C–, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó –durante 10 min a 13, rpm. El sobrenadante final se recuperó y se usó para cuantificar la cantidad de proteína por el método de BCA (BCATM *Protein Assay Kit*, Prod #23227, PIERCE). Para medir la actividad de PKA, se tomó lo correspondiente a 4 mg de proteínas solubles y se ensayaron de acuerdo con las indicaciones del protocolo *Pep Tag*® (PROMEGA, cat. # V5340 Lote # 268613). Se probaron mediciones en ausencia y presencia de AMPc (1 μ M).

Plásmidos utilizados

Para generar cepas deletas en distintos genes se utilizaron los plásmidos pUG6 (Guldener *et al.*, 1996) y pFA6aKanMX6 (Longtine *et al.*, 1998).

La construcción del plásmido reportero pRY016 (*HSE-CYC-lacZ*) la realizó la Dra. Runying Yang, para esto se alinearon los oligonucleotidos HSEA y HSEB. Los extremos no apareados, que son los adaptadores con el sitio de restricción *Bgl*III, se rellenaron con la

enzima Klenow. El fragmento generado fue cortado con *Bgl*III, fosforilado e insertado en el sitio de restricción *Bgl*III del plásmido pLGΔBS. El plásmido pLGΔBS es un vector multicopia del tipo 2μ en donde la fusión *CYC1-lacZ* carece de secuencias de activación y deriva del vector pLG669Z (Harshman *et al.*, 1988). En el vector resultante, pRY016, se identificaron nueve unidades continuas de la secuencia *nGAA*n, que es el consenso *HSE* (Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2007). La actividad de β -galactosidasa que depende del promotor mínimo *CYC1* del plásmido pLGΔBS es mínima, comparada con la que depende de los *HSE* clonados en el plásmido pRY016 (Figura 16) (Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2007).

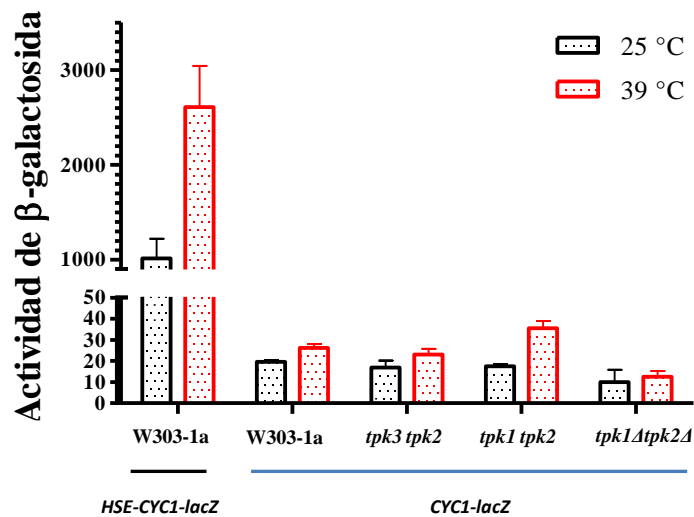


Figura 16. Efecto del promotor sintético *HSE-CYC* en la actividad de β -galactosidasa en los genotipos WT y mutantes, en W303. Tomado de: Pérez-Landero y Nieto Sotelo, 2007.

Para medir la expresión de *STRE-lacZ*, las cepas se transformaron con el producto de la digestión del plásmido pCTT1-18/7x con la enzima *Nco*I, el cual contiene la construcción *STRE-lacZ* y el locus *URA3*; y por recombinación homóloga se integra al genoma (Marchler *et al.*, 1993). Las células transformadas muestran prototrofia a uracilo.

Clonación del gen *TPK2*

Este trabajo fue realizado por la Dra. Karina Guillén Navarro. Para clonar al gen *TPK2*, se amplificó DNA genómico de la cepa W303-1a, usando la DNA polimerasa *PWO* + los oligonucleótidos TPK2-Ucl y TPK2-Lcl. El producto se clonó en el sitio *SmaI* del plásmido pRS315 (*CEN*) generando el plásmido pRS315-TPK2. Por secuenciación del ADN, se determinó que la secuencia clonada fuese la correcta. El inserto del gen *TPK2* se clonó entre los sitios de restricción *XhoI* y *BamHI* del vector pRS425 (2 μ), generando el plásmido pRS425-TPK2.

Estimación del número de copias del plásmido pRY016 en las distintas cepas

Este análisis se hizo con el objeto de evaluar el efecto del número de copias del plásmido pRY016 en los niveles de la actividad de β -galactosidasa. Esto se hizo mediante la técnica del “Southern blot” en las cepas W303-6B, SL5001, W303-1a, KG712, KG604, YMR64, YMR68, YMR71a, KG710 y CMOO95. Las levaduras se crecieron como se describe anteriormente. Alícuotas de 20 μ g de ADN total se digirieron con la enzima *PstI*. Como sonda de hibridación se utilizó el fragmento que contiene la secuencia 5' del gen *URA3* al digerir el plásmido pRS3 con *PstI* y *ScaI*. La intensidad de las bandas del autorradiograma, correspondientes al plásmido y al genoma, se estimó mediante densitometría de la imagen con el software NIH 1.62. El cociente de las señales *URA3* del plásmido y del genoma, sirvió para determinar el número de copias de pRY016 (Figura 17).

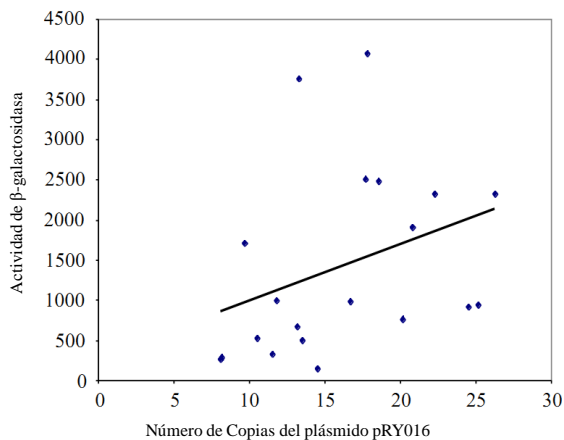


Figura 17. Análisis de correlación entre el número de copias del plásmido pRY016 y la actividad de β -galactosidasa de cultivos a 25°C (n = 20). El coeficiente de correlación de Pearson (r) = 0.34. Se hizo una prueba tipo t, con 18 grados de libertad. Se obtuvo una $t = 1.54$. Dado que, en t, la $P_{0.05} = 2.101$, se soporta la hipótesis de que no hay correlación entre la actividad de β -galactosidasa y el número de copias del plásmido pRY016.

Se determinó que no existe correlación entre el número de copias del plásmido pRY016 y la expresión dependiente de *HSE*. Por lo tanto, podemos concluir que la variación en la actividad de β -galactosidasa es el reflejo de la dinámica de regulación en la expresión génica dependiente de los elementos *cis* presentes en el promotor del plásmido reportero.

Pruebas estadísticas

Los experimentos descritos en este trabajo representan el promedio de al menos tres repeticiones biológicas llevadas a cabo en días distintos. Los datos obtenidos fueron almacenados y analizados con el programa Excell (Microsoft), donde se calcularon sus promedios y desviaciones estándar, así como la tabulación o graficado de los mismos. En algunos casos se realizó la prueba de Student o prueba-t (entre dos muestras no apareadas, con dos colas) disponible en el programa Excell. En el caso de las comparaciones múltiples los datos fueron sometidos al análisis de varianza o ANOVA y las diferencias entre los promedios fueron comparadas con las post-pruebas de Tukey, para el caso de análisis de una vía, o de Bonferroni, para el caso de análisis de dos vías. Las pruebas de ANOVA se realizaron con el paquete estadístico Prism 5.0.

RESULTADOS

Efecto del fondo genético en la regulación de las interacciones epistáticas entre los intercambiadores de guanina *CDC25* - *SDC25* y los fenotipos de crecimiento y termotolerancia

Se hizo un análisis cuidadoso y sistemático en mutantes en cada elemento de la RR-PKA, para analizar la influencia de la RR-PKA sobre la actividad de los FT's Hsf1/Skn7 en la regulación de la respuesta a estrés por calor y el crecimiento. Para explicar las discrepancias existentes en la literatura (Marchler *et al.*, 1993; Engelberg *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 2005; Pérez-Landero y Nieto-Sotelo, 2007), se compararon los fenotipos de crecimiento, termotolerancia y la expresión de *HSE-CYC1-lacZ*—como una medida de la actividad *in vivo* de los FT's Hsf1/Skn7—, en las cepas de laboratorio W303, BY4741, AW3 y KT112 (fondo genético).

El primer elemento de la RR-PKA que se exploró fue el intercambiador de nucleótidos de guanina *Cdc25*. Se midió el efecto de este nodo en los fenotipos de crecimiento y termotolerancia en las cepas W303 y LRA con alelos mutantes de *cdc25*, que se generaron mediante delección (*cdc25Δ*) y mutagénesis al azar (*cdc25-21* y *cdc25-1*)-(Tabla 3).

Genotipo	Tiempo de duplicación (h)	Termotolerancia Basal (%)
<i>CDC25</i> (W303-1a)	2.5 ± 0.02	0.01 ± 0.01
<i>Δcdc25</i> (JF3005)	6.3 ± 0.1	85 ± 33***
<i>cdc25-21</i> (JF314)	5.7 ± 0.2	74 ± 2***
<i>CDC25</i> (LRA89)	2.7 ± 0.15	0.03 ± 0.02
<i>cdc25-1</i> (LRA25)	3.5 ± 0.02	65 ± 5**

Tabla 3. Fenotipos de crecimiento y niveles de termotolerancia basal en cepas silvestres y mutantes en el gen *CDC25* de *S. cerevisiae*.

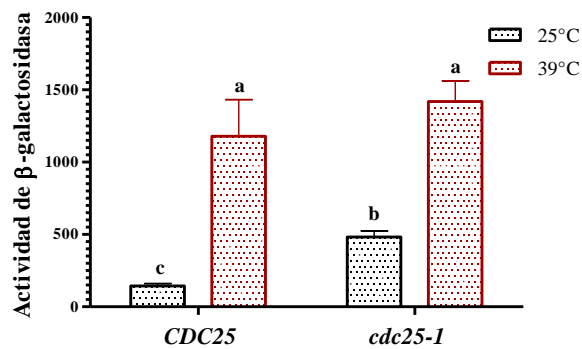


Figura 18. Niveles de expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ* en la cepa silvestre (LRA89) y mutante (LRA25) en el gen *CDC25* de *S. cerevisiae* (fondo genético LRA). Véase **Figura 4.**

Los datos anteriores muestran que los fenotipos de crecimiento, termotolerancia basal y de expresión de *HSE-CYC1-lacZ*, son regulados de forma negativa por *CDC25*. Este comportamiento se conserva en los dos fondos genéticos analizados, el W303 y LRA (Figura 18 y véase Figura 4), aunque en el primero es mayor la intensidad de la expresión del gen reportero.

Los fenotipos de termotolerancia y crecimiento de cepas mutantes de la GTPasa o proteína G -Ras2- y el efecto del fondo genético

La proteína G -Ras2- es otro nodo importante de la RR-PKA. Por lo que para evaluar su participación en los fenotipos de crecimiento y termotolerancia, se utilizaron los fondos genéticos - KT1112, BY4741, AW3 (Marchler *et al.*, 1993) y la W303 con mutaciones en *ras2* (Figura 19 y Tabla 4).

Genotipo (cepa)	Tiempo de duplicación (h)	Termotolerancia basal (%)	Veces que aumenta la termotolerancia
<i>RAS2</i> (AW3-RAS+)	2.4 +/- 0.003	0.9 +/- 0.3	
<i>ras2</i> (AW3- <i>ras2</i>)	2.1 +/- 0.01***	3.7 +/- 1.0**	4.1
<i>ras2Δ</i> (AW3- Δ <i>ras2</i>)	2.3 +/- 0.04*	3.1 +/- 0.4*	3.4
<i>RAS2</i> (BY4741)	2.4 +/- 0.01	0.03 +/- 0.02	
<i>ras2Δ</i> (Y02978)	2.5 +/- 0.02	0.08 +/- 0.05	2.6
<i>RAS2</i> (KT1112)	2.5 +/- 0.03	0.02 +/- 0.01	
<i>ras2Δ</i> (KT Δ <i>ras2</i>)	2.5 +/- 0.02	4.0 +/- 1.5 *	200
<i>RAS2</i> (W303-1a)	2.5 +/- 0.02	0.01 +/- 0.01	
<i>ras2Δ</i> (W Δ <i>ras2</i>)	2.7 +/- 0.02	2.4 +/- 1.5***	240

Tabla 4. Fenotipos de crecimiento y termotolerancia de cultivos silvestres o mutantes en *RAS2* en los fondos genéticos de las cepas AW3, BY4741, KT1112 y W303. Los asteriscos indican que la diferencia en el valor de la muestra, con respecto a la cepa silvestre, es estadísticamente significativa a: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

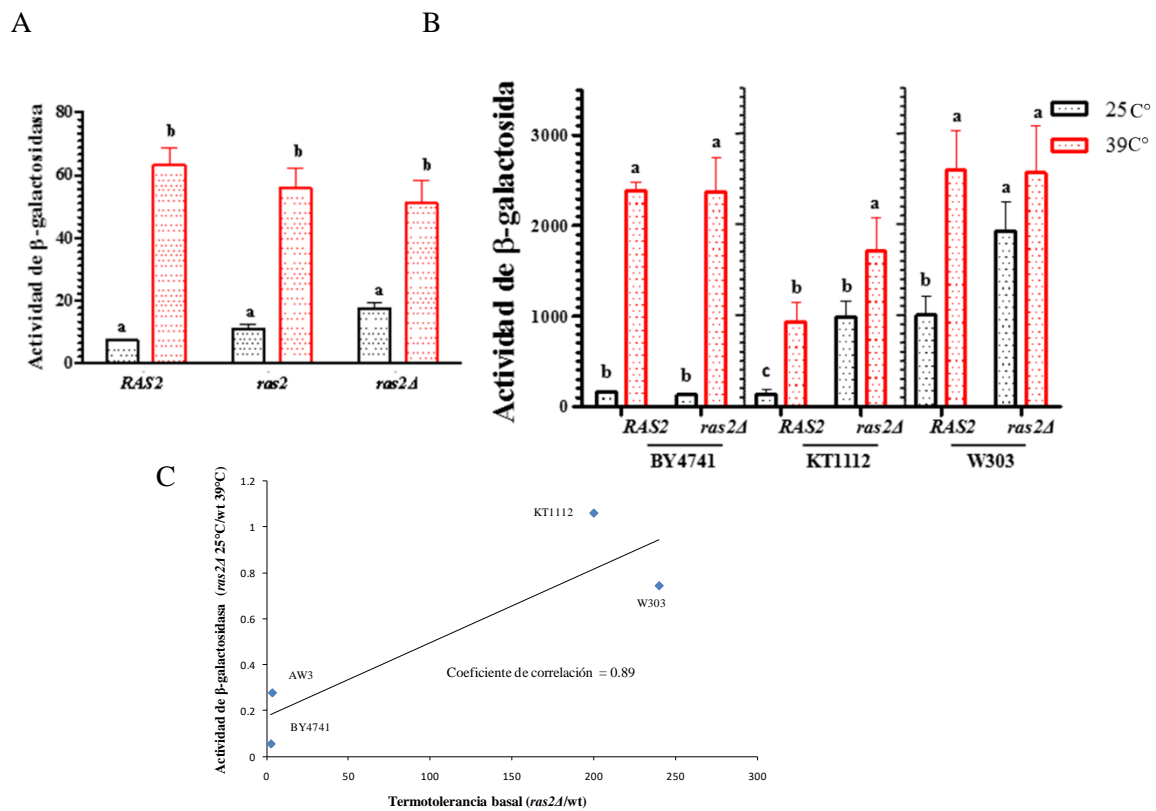


Figura 19. Efecto de mutaciones en *RAS2* en la expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ* en los fondos genéticos de la cepa AW3 (panel **A**) y las cepas BY4741, KT112 y W303 (panel **B**).

En el panel (**C**) se muestra la correlación entre el cociente de la termotolerancia basal de cultivos *ras2* respecto a cultivos *RAS2* en cada fondo genético, y el cociente de la actividad de β -galactosidasa a 25°C de cultivos *ras2* respecto a cultivos *RAS2* a 39°C en su correspondiente fondo genético.

El fenotipo de crecimiento no fue alterado en las cepas mutantes *ras2* de los fondos W303, BY4741 y KT1112, pero sí en AW3. Sólo en la cepa *ras2* del fondo BY4741 (Y02978) no cambiaron significativamente los fenotipos de crecimiento y de termotolerancia. En cambio, en las cepas mutantes de *ras2* de KT2249 y AW3 este fenotipo aumentó de 200 y 240 veces, respectivamente. También la expresión de *HSE-CYC1-lacZ* a 25°C aumentó significativamente. El análisis de correlación entre el cociente de termotolerancia basal *ras2*/WT y el cociente de la expresión de *HSE-CYC1-lacZ* de *ras2* a 25°C/WT a 39°C separa los fondos genéticos en dos grupos: [W303 – KT1112] y [BY4741 – AW3]. Esto comprueba que la dinámica de la RR-PKA es dependiente del fondo genético (o cepa de laboratorio) analizado.

Efecto en los fenotipos de termotolerancia y crecimiento de cepas mutantes en *BCY1* – subunidad represora de la PKA– en los fondos genéticos BY4741, KT1112 y W303

En los experimentos descritos anteriormente se analizaron mutantes que inhiben la actividad de la RR-PKA. Ahora utilizando mutantes carentes de *bcy1Δ* (Marchler *et al.*, 1993; Engelberg *et al.*, 1994); las cuales deberían presentar características del crecimiento fermentativo, se midieron los fenotipos de termotolerancia y expresión de *HSE-CYC1-lacZ* en los fondos genéticos BY4741, KT1112 y W303. Como se mencionó en la introducción, Bcy1 es el regulador negativo de las subunidades catalíticas de las cinasas Tpk1, Tpk2 y Tpk3 –PKA- (ver arriba, Tabla 5 y Figura 20).

Genotipo (cepa)	Tiempo de duplicación (h)	Termotolerancia Inducida (%)
<i>RAS2</i> (BY4741)	2.4 +/- 0.003	73 +/- 11
<i>bcy1Δ</i> (BYΔ <i>bcy1</i>)	2.9 +/- 0.01**	0.6 +/- 0.8**
<i>RAS2</i> (KT1112)	2.6 +/- 0.04	40 +/- 14
<i>bcy1Δ</i> (KTΔ <i>bcy1</i>)	2.9 +/- 0.02	8 +/- 2*
<i>RAS2</i> (W303)	2.3 +/- 0.02	70 +/- 3
<i>bcy1Δ</i> (CM0095)	2.1 +/- 0.01*	0.22 +/- 0.4***

Tabla 5. Fenotipos de crecimiento y termotolerancia de cultivos silvestres o mutantes en *BCY1* en los fondos genéticos de las cepas BY4741, KT1112 y W303. Los asteriscos indican que la diferencia en el valor de la muestra, con respecto a la cepa silvestre, es estadísticamente significativa a: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; comparadas entre cada uno de los controles, representados en distintos tonos del color azul de cada fondo genético.

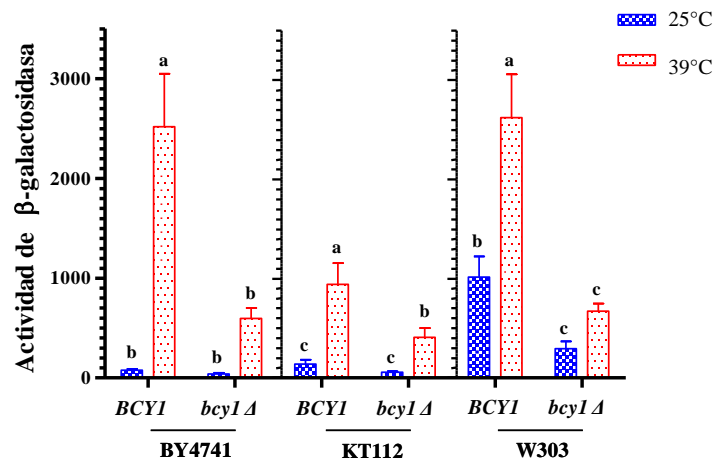


Figura 20. Análisis de la expresión dependiente de *HSE* en cepas mutantes $\Delta bcy1$ de los fondos genéticos BY4741, KT1112 y W303. Las diferencias entre las barras que no comparten la misma letra son estadísticamente significativas entre sí a $P < 0.05$.

Las cepas con mutación en *BCY1* presentan fenotipos distintos al de la cepa de referencia. El tiempo de duplicación de la cepa *bcy1Δ* en el fondo BY4741 se prolongó significativamente, respecto al de la cepa control. Contrario a lo que presentó en la cepa *bcy1Δ* del fondo W303, el tiempo de duplicación es menor. La mutación no generó cambios significativos en el fondo KT1112.

El fenotipo de termotolerancia basal no mostró ser un carácter adecuado para evaluar la influencia de mutaciones *bcy1Δ*, ya que, salvo en el fondo BY4741, la sobrevivencia fue similar a la cepa control (datos no mostrados). Por el contrario, el fenotipo de termotolerancia inducida disminuyó invariablemente en los tres fondos: BY4741, KT1112 y W303 (Tabla 5). Otro rasgo característico de las mutantes *bcy1Δ* fue la pérdida de viabilidad cuando los nutrientes del cultivo se consumieron por completo (datos no mostrados).

Otro fenotipo característico de la elevada actividad de la PKA fue la inhibición total de la expresión del gen reportero *STRE-CYC1-lacZ*, en el fondo W303 (Figura 22). Las alteraciones en la termotolerancia inducida, la pérdida de la viabilidad durante la fase post-diáuxica y la represión alta de la expresión génica dependiente de STRE son fenotipos esperados como resultado de la hiper/activación de la PKA (Boy-Marcotte, *et. al.* 2006 y Tudisca, *et. al.* 2012).

La expresión de *HSE-CYC1-lacZ* a 25°C no es de la misma intensidad entre los controles silvestre de los fondos BY4741, KT1112 y W303. La mayor expresión se da en W303, lo cual nos ayuda a demostrar la relación entre la PKA y la expresión dependiente de *HSE*. Lo que sí coincide en los tres fondos, en las mutantes *bcy1Δ*, es la pérdida significativa de la capacidad de termoinducir al gen reportero (Figura 20).

Relaciones antagónicas de las subunidades catalíticas de la PKA sobre el complejo Hsf1/Skn7

El siguiente paso consistió en analizar el nodo efector, conformado por las cinasas Tpk1, Tpk2 y Tpk3. Para este caso se compararon los fenotipos de las mutantes simples, en los fondos genéticos BY4741 y W303, y dobles en el fondo W303. Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados reportan que las funciones de estas cinasas son redundantes en la regulación del crecimiento y de la respuesta al estrés (Marchler *et al.*, 1993; Engelberg *et al.*, 1994).

Genotipo (Cepa)	Tiempo de duplicación (h)	Termotolerancia basal (%)	Termotolerancia inducida (%)
<i>TPK1 TPK2 TPK3</i> (BY4741)	2.5 +/- 0.1	0.22 +/- 0.01	70 +/- 12
<i>tpk1Δ TPK2 TPK3</i> (YJL164C)	3.2 +/- 0.2**	0.66 +/- 0.36	93 +/- 17
<i>TPK1 TPK2 tpk3Δ</i> (YPL203W)	2.6 +/- 0.2	0.45 +/- 0.33	82 +/- 10
<i>TPK1 tpk2Δ TPK3</i> (YKL166C)	2.4 +/- 0.2	0.12 +/- 0.06	74 +/- 13
<i>TPK1 TPK2 TPK3</i> (W303)	2.3 +/- 0.2	0.02 +/- 0.01	70 +/- 9
<i>tpk1Δ TPK2 TPK3</i> (KG712)	4.2 +/- 0.2***	0.22 +/- 0.05	54 +/- 19*
<i>TPK1 TPK2 tpk3Δ</i> (KS580)	2.5 +/- 0.2	0.05 +/- 0.04	66 +/- 16
<i>TPK1 tpk2Δ TPK3</i> (KG604)	2.3 +/- 0.1	0.05 +/- 0.03	41 +/- 19**
<i>TPK1 tpk2Δ tpk3Δ</i> (KS590)	2.3 +/- 0.1	0.02 +/- 0.03	63 +/- 9
<i>tpk1Δ tpk2Δ TPK3</i> (KS710)	2.4 +/- 0.2	0.08 +/- 0.02	53 +/- 14*
<i>tpk1Δ tpk3Δ TPK2</i> (KS700)	3.8 +/- 0.3***	1.35 +/- 0.52***	71 +/- 12

Tabla 6. Fenotipos de crecimiento y de termotolerancia de cultivos silvestres o mutantes en las subunidades catalíticas de la PKA en los fondos genéticos de las cepas BY4741 (panel a) y W303 (panel b). La Tabla muestra el promedio y la desviación estándar de los valores consignados. Los asteriscos indican que la diferencia en el valor de la muestra, con respecto a la cepa silvestre, es estadísticamente significativa a: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

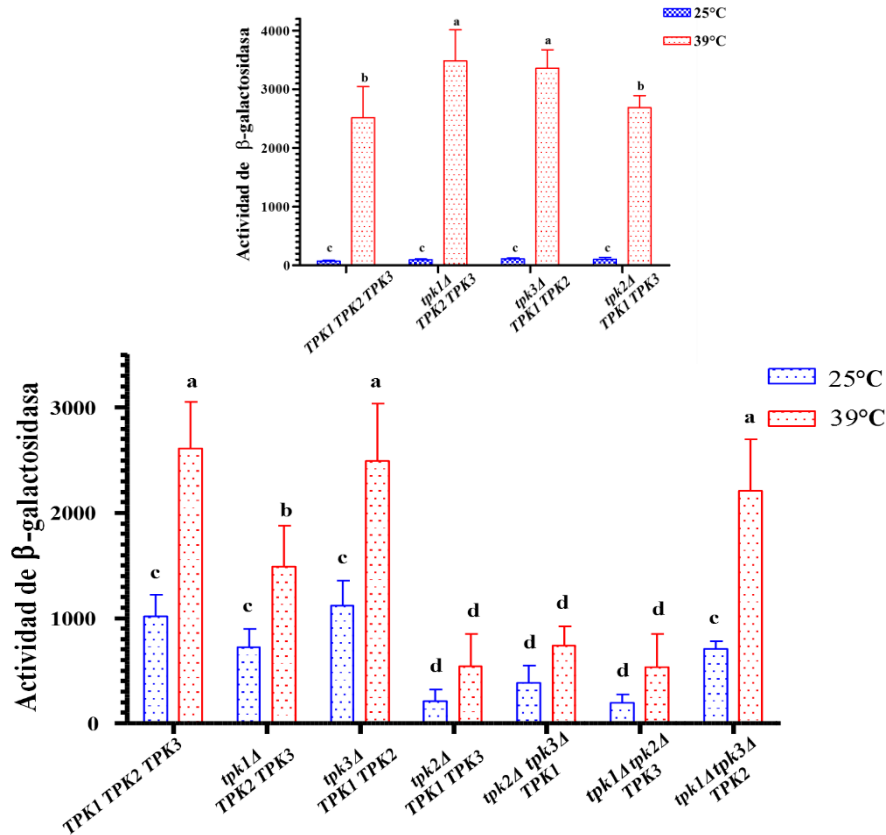


Figura 21. Expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ* en cepas con mutaciones sencillas y dobles en las subunidades catalíticas de la PKA (*TPK1*, *TPK2* o *TPK3*), en los fondos genéticos de las cepas BY4741 (panel izquierdo) y W303 (panel derecho). Las diferencias entre las barras que no comparten la misma letra son estadísticamente significativas entre sí ($P < 0.05$).

El análisis de las cepas mutantes en uno solo de los genes *TPK*'s en el fondo BY4741 mostró que el tiempo de duplicación aumentó significativamente en la cepa *tpk1* Δ . Mientras que los fenotipos de termotolerancia basal o inducida no fueron significativamente distintos en ninguna de las cepas mutantes, con respecto a la cepa silvestre (Tabla 6). La expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ* a 25°C tampoco mostró efectos significativos en las cepas mutantes. Sin embargo, en las mutantes sencillas *tpk1* Δ y *tpk3* Δ se detectó des-represión del gen reportero a 39°C (Figura 21).

El fondo genético W303 resultó apropiado para analizar de forma diferencial la actividad de las subunidades catalíticas de la PKA. La tasa de crecimiento disminuyó en las cepas *tpk1* Δ (KG712) y *tpk1* Δ *tpk3* Δ (KS700) (Tabla 6); la termotolerancia basal aumentó en la cepa *tpk1* Δ *tpk3* Δ (KS700) y la termotolerancia inducida disminuyó en las cepas *tpk1* Δ (KG712) y *tpk2* Δ (KG604), así como en la cepa *tpk1* Δ *tpk2* Δ (KS710) (Tabla 6).

Lo interesante aparece al evaluar la expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ*, ya que al eliminar al gen *TPK2* su actividad se inhibe significativamente, lo cual revela participación de estas cinasas en la regulación de la actividad de Hsf1/Skn7. Esto se observa en las cepas mutantes *tpk2Δ* (KG604), *tpk1Δ tpk2Δ* (KS710) y *tpk2Δ tpk3Δ* (KS590) a ambas temperaturas (Figura 21). La expresión baja del reportero en las cepas mutantes *tpk2Δ* (KG604) y *tpk1Δ tpk2Δ* (KS710) correlacionó con la disminución de la termotolerancia inducida (Tabla 6). Igualmente, la expresión baja del reportero en la cepa *tpk1Δ* (KG712) (Fig. 21) correlacionó con su termotolerancia inducida baja (Tabla 6). Sin embargo, en el caso de la cepa *tpk1Δ tpk3Δ* (KS700), la expresión del reportero y la termotolerancia inducida no.

El comportamiento antagónico descrito anteriormente no se conserva para la regulación de la expresión del gen reportero *STRE-lacZ*. Ninguna de las mutaciones sencillas o dobles de las subunidades catalíticas de la PKA mostró alteración significativa del gen reportero a 25°C. Sólo se registra variación a 39°C en las cepas mutantes *tpk1Δ* (KG712), *tpk1Δ tpk2Δ* (KG710) y *tpk2Δtpk3Δ* (KS590) (Figura 22).

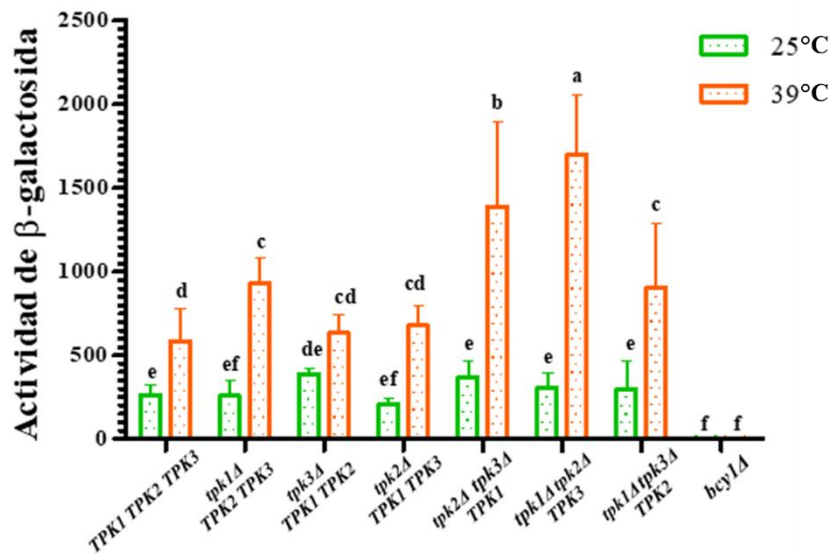


Figura 22. Expresión de elementos *STRE* en cepas mutantes sencillas y dobles de las subunidades catalíticas (C), así como en la subunidad reguladora Bcy1 (R) de la PKA.

Estos resultados revelan que la actividad de cada cinasa es específica en el control de distintos procesos celulares y que sus interacciones son complejas.

Validación genética del antagonismo entre las cinasas PKA

Con los resultados anteriores se propone un modelo de la RR-PKA durante el crecimiento exponencial en medio con glucosa; la subunidad catalítica Tpk2 está ejerciendo un efecto antagónico en la actividad de Tpk1 y Tpk3 sobre los FT's Hsf1/Skn7. Para someter a prueba esta hipótesis, en cepas mutantes *tpk2Δ* (KG604) y *tpk1 tpk2Δ* (KS710) del fondo W303, se cuantificó la expresión del reportero *HSE-CYC1-lacZ* al introducir el gen silvestre *TPK2*, ya sea clonado en un plásmido de bajo número de copias (tipo *CEN*), en otro de alto número de copias (tipo 2μ) o por la reincorporación de *TPK2* al genoma mediante la técnica *delitto perfetto* (Figura 23).

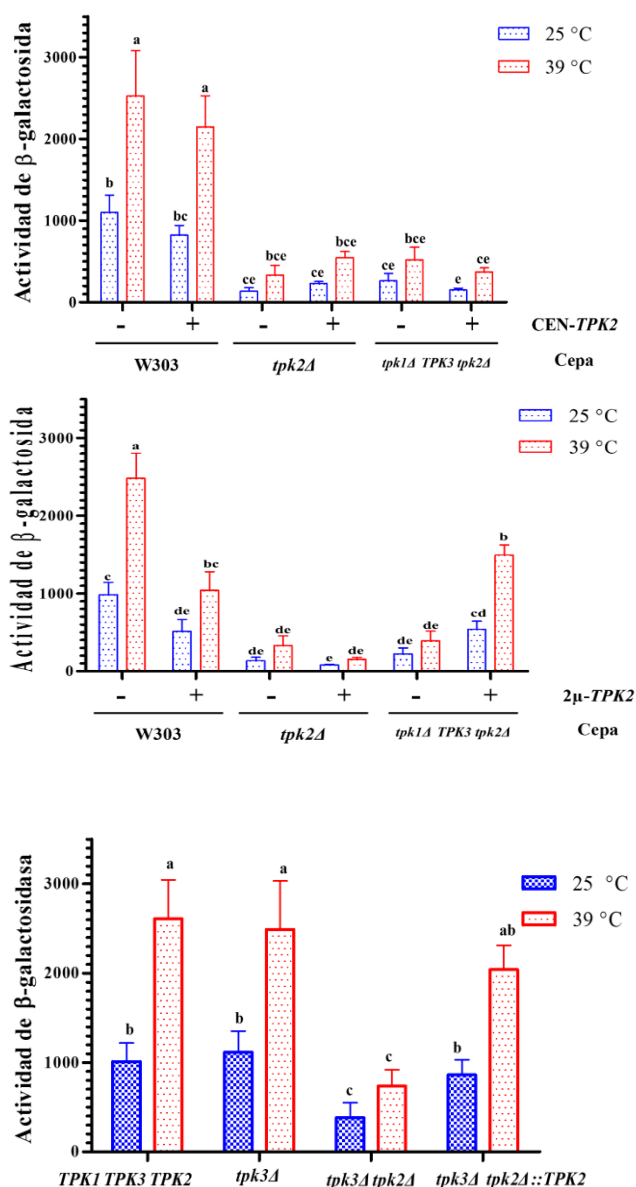


Figura 23. Complementación genética con *TPK2*, en plásmido de bajo número de copias *CEN* (A), de alto número de copias 2μ (B) y *delitto perfetto* (C). Las diferencias entre las barras que no comparten la misma letra son estadísticamente significativas entre sí a $P < 0.05$.

Lo que se observa con estas estrategias genéticas de complementación, es que la expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ* no se restablece en las cepas mutantes *tpk2Δ* (KG604) y *tpk1 tpk2Δ* (KS710) cuando se introduce a *TPK2*; ya sea en plásmidos de bajo (Figura 23, panel A) o alto número de copias (Figura 23, Panel B). Es con la estrategia de *delitto perfetto* cuando se reincorpora a *TPK2* en el genoma de la mutante *tpk3Δ tpk2Δ* (KS590), que se alcanzan niveles de expresión de *HSE-CYC1-lacZ*, tanto a 25°C y a 39°C, similares a los que presentan en la cepa control o en la *tpk3Δ* (KS580) (Figura 23C).

Actividad de PKA *in vitro* en extractos de distintos genotipos

A partir de ahora sólo se utilizará el fondo genético W303 para descubrir los mecanismos que controlan las interacciones entre las cinasas PKA y la actividad de los FT's HSf1 y Skn7. La activación de las Tpk's se da ante el aumento de las concentraciones de AMPc en el citoplasma, lo que provoca la disociación de la holoenzima tetramérica R-C (Johnson y Singer, 1987; Cannon y Tatchell, 1987; Werner-Washburne *et al.*, 1991). Sin embargo, las evidencias experimentales muestran que el número de moléculas por célula de Tpk1 es mayor que el de Tpk2 durante el crecimiento exponencial, y que la cinasa Tpk3 es la de menor abundancia (Tudisca *et al.*, 2010). Por lo que se espera que al eliminar los genes *TPK1* y/o *TPK2* disminuyese en gran parte de la actividad total de PKA. Para estimar la cantidad de moléculas de las cinasas PKA se hicieron ensayos de la actividad *in vitro* en extractos de proteínas totales en cepas mutantes de la RR-PKA (Figura 24, ver métodos); de los cuales una cantidad constante se incubó con el péptido sintético *PepTag*, que es un péptido que contiene los residuos que son blanco de las cinasas PKA.

L-R-R-A-S-L-G (Kemptide).

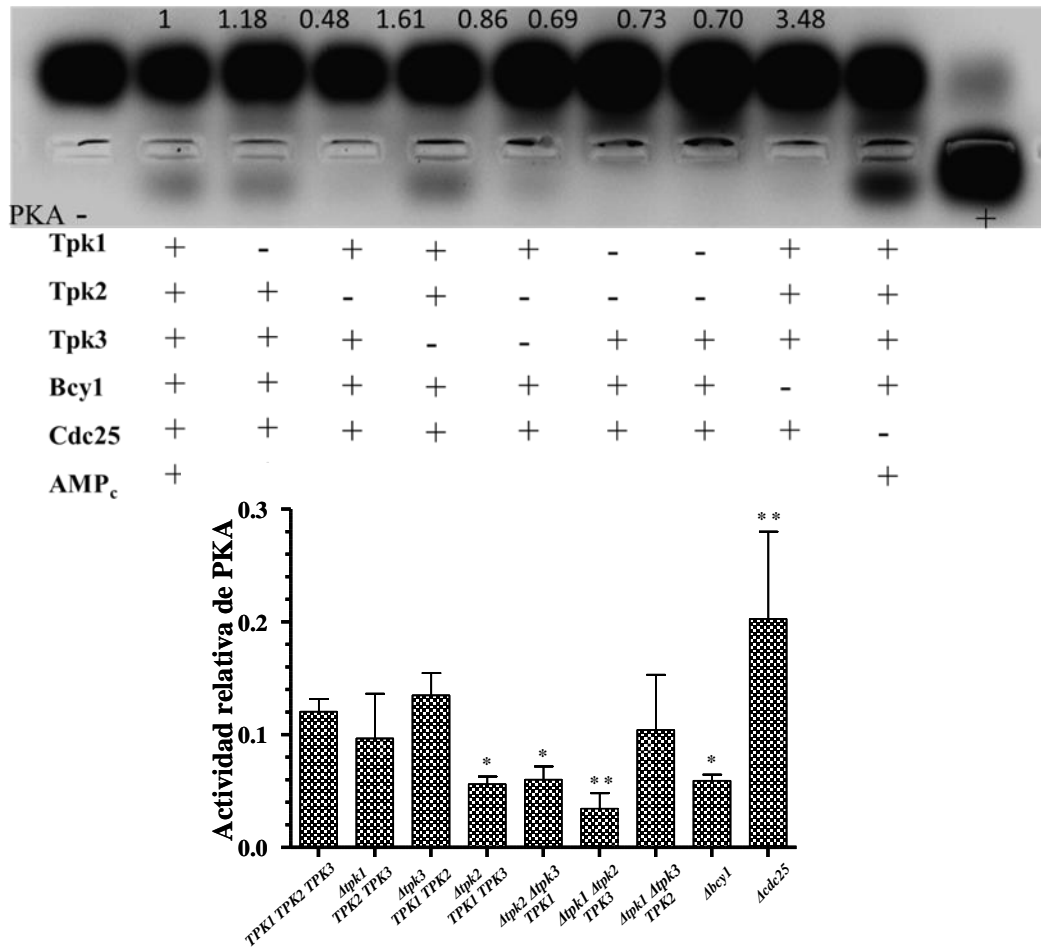


Figura 24. Actividad relativa de PKA medida *in vitro* en extractos proteicos de células mutantes en la RR PKA, en el fondo genético W303. La gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de los valores de actividad relativa de PKA. Los asteriscos indican que las diferencias en los valores de las muestras son estadísticamente significativas en relación con el valor de la cepa silvestre. * P < 0.05 y ** P < 0.01.

Al realizar el experimento sin la adición exógena de AMPc, el sustrato usado para evaluar la actividad de cinasa de la PKA [péptido *PepTag*] presenta fosforilación únicamente en los extractos proteicos de la cepa mutante *bey1Δ* (CM0095) (datos no mostrados). Esto era de esperarse, ya que en esta cepa no hay represor que inhiba a las subunidades catalíticas, por lo que la adición del AMPc para activarlas se vuelve innecesaria.

Al realizar el experimento con la adición de AMPc a los extractos proteicos de todas las cepas analizadas aumentó la fosforilación del *PepTag*, lo que permitió confirmar que la actividad

de cinasa obtenida corresponde a las PKA. Al estimar la actividad relativa de PKA en las cepas *tpk1Δ* (KG712), *tpk3Δ* (KS580) y *tpk1Δ tpk3Δ* (KS700) se observó que es similar a la de la cepa silvestre (Figura 24). En cambio, la actividad de PKA disminuyó estadísticamente en la cepa *tpk2Δ* (KG604), en la *tpk1Δ tpk2Δ* (KS710) y en la *tpk3Δ tpk2Δ* (KS590). En la cepa *bcy1Δ* (CMOO95) la actividad de PKA fue baja, en tanto que en la *cdc25Δ* la fosforilación del *PepTag* fue superior a la de la cepa silvestre. La disminución de la actividad relativa de PKA observada en las cepas mutantes *tpk2Δ* (KG604), *tpk1Δ tpk2Δ* (KS710) y *tpk3Δ tpk2Δ* (KS590) coincide con las observaciones de que Tpk2, junto a Tpk1, son las cinasas de mayor abundancia en la célula silvestre en crecimiento exponencial (Ghaemmaghami *et al.*, 2003 y Mazon 1993). También, en la cepa mutante *tpk1Δ* (KG712) y en la *tpk1Δ tpk3Δ* (KS700) se observó disminución en la actividad relativa de PKA, aunque los cambios no fueron significativos con respecto a la cepa silvestre. Esto último es un dato inesperado de acuerdo con un simple modelo lineal, ya que Tpk1 es la subunidad catalítica de mayor abundancia en la célula silvestre. Estos datos sugieren la hipótesis de que el control de la abundancia de cada una de las subunidades es dinámico y cambia de acuerdo con la presencia o ausencia de las otras subunidades catalíticas y de la subunidad regulatoria Bcy1.

Sistematización de las interacciones entre los elementos de la Red de Regulación PKA.

Primer modelo

Con estos experimentos de sustitución genética se propone un modelo de interacciones – físicas y genéticas– entre los elementos de la Red de Regulación PKA, que describe los mecanismos que suceden durante la fase exponencial de crecimiento en medio con glucosa; tanto a temperatura óptima como en respuesta a un choque de calor. En este análisis se utilizó como prototipo el fondo genético de la cepa W303 de *S. cerevisiae* (Figura 25).

Para explicar la inhibición de la expresión de *HSE-CYC-lacZ*, obtenido en las cepas que mantienen únicamente la función de Tpk1 o Tpk3 y que Tpk2, por sí sola mantiene la expresión del gen reportero a los niveles del control (Figura 21, ver W303). Se asume que el módulo de retroregulación sobre las fosfodiesterasas –Pde2 y Pde1– está participando en la generación de condiciones para que Tpk2 inhiba el efecto de activación que Tpk1 y Tpk3 ejerce sobre los FT's Hsf1 y Skn7. Basados en las observaciones de Tpk1 y Tpk3 activan a

Pde2 (ver en Introducción) (Hu *et al.*, 2010). Por el contrario, Tpk2 no afecta la actividad de Pde2 (Hu *et al.*, 2010). Es pertinente señalar que ya se ha reportado un efecto antagonico entre Tpk2 y Tpk1 y Tpk3, en el control del crecimiento pseudohifal y en la absorción de hierro (Robertson y Fink, 1998; Robertson *et al.*, 2000). En conjunto se comprueba el antagonismo entre las subunidades catalíticas de la PKA. Con estos análisis se propone un modelo de interacciones epistáticas entre los elementos de la Red de Regulación PKA.

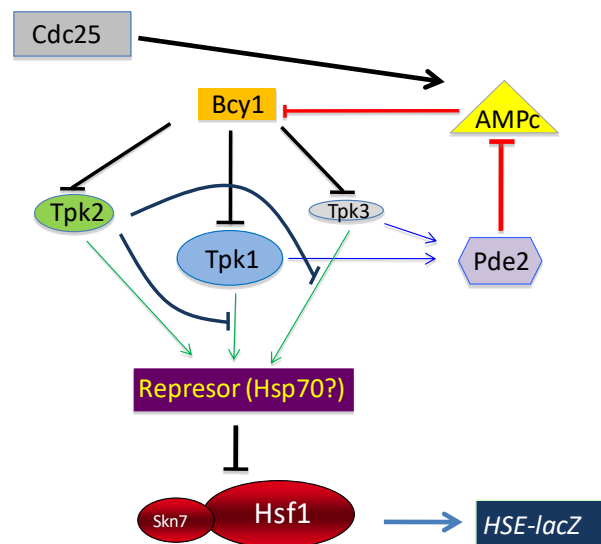


Figura 25. Modelo de las interacciones de la Red de Regulación PKA sobre la actividad de los FT's Hsf1 y Skn7 durante la fase logarítmica del crecimiento de cultivos en medio con glucosa. En este modelo se presentan tres puntos fundamentales de interacción: 1- Las actividades conjuntas de Tpk1, Tpk2 o Tpk3 reprimen la expresión del reportero *HSE-CYC1-lacZ*, por medio de la activación de un represor (HSP70); probablemente al favorecer la formación del complejo HSP70-Hsf1/Skn7. 2 - La activación del represor (HSP70) por medio de Tpk1 y Tpk3 es controlada de forma negativa por Tpk2, debido a que la expresión del reportero *HSE-CYC1-lacZ* disminuye al eliminar a *TPK2*. 3 -En cepas mutantes carentes de Tpk1 y/o Tpk3, la retroinhibición de la síntesis del AMPc a nivel de Pde2 disminuye. Esto resulta en el aumento de la actividad de las subunidades catalíticas restantes, que mantienen la expresión de *HSE-CYC1-lacZ* a un nivel similar al control silvestre.

Pero dado que no hay evidencia experimental que demuestre que las Tpk's fosforilen a Hsf1 (Ptacek *et al.*, 2005) y que el FT es hiperfosforilado en respuesta a un choque de calor, aun cuando se eliminen a las tres Tpk's (Ferguson *et al.*, 2005). Se incluye en el modelo un módulo que medie esta interacción, el cual puede ser las proteínas chaperonas Hsp70 –Ssa1 y Ssa2 (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Stone y Craig, 1990; Halladay *et al.*, 1995; Bonner *et al.*, 2000; Liou *et al.*, 2007). De acuerdo con lo anterior, se postula que las Tpk's promueven la

formación del complejo Hsp70-Hsf1/Skn7. Por lo tanto, ante la ausencia de Tpk2 las cinasas Tpk1 y Tpk3 promueven la formación del complejo [Hsp70-Hsf1/Skn7], y como consecuencia la inhibición de la expresión de *HSE* (Figuras 21 y 25).

Para someter a un análisis genético esta hipótesis, se eliminaron los genes *SSA1* y *SSA2* en la cepa silvestre y en la mutante *tpk2*.

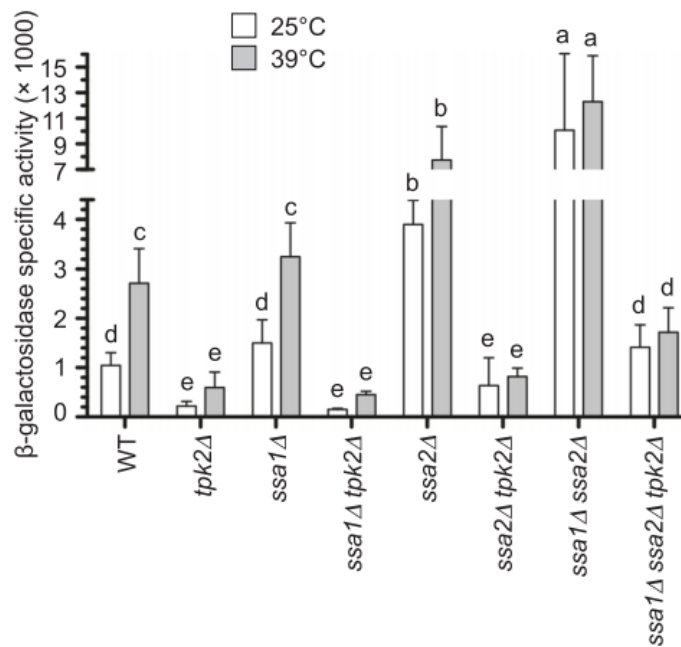


Figura 26. Actividad de Hsf1/Skn7 en mutantes *Hsp70* (*ssa1Δ* y/o *ssa2Δ*) durante el crecimiento en glucosa y en respuesta a calor, en genotipos silvestres y *tpk2Δ*. Tomado de Pérez-Landero, S. *et al.*, 2015.

La expresión del reportero *HSE-CYC1-lacZ* no se afectó por la eliminación de *SSA1*, ni se recuperó la actividad del gen reportero en la mutante *ssa1Δtpk2Δ*. En cambio, al eliminar *SSA2* se desreprimió la expresión del reportero. La falta de *SSA1* y *SSA2* provoca el aumento de la expresión del gen reportero, mientras que en la mutante triple *ssa1Δ ssa2Δ tpk2Δ* se restablece por completo la expresión de *HSE-CYC1-lacZ* a 25°C y a 39°C, aunque a 39°C la recuperación fue parcial (Figura 26).

Modelo matemático discreto para describir la Red de Regulación-PKA

Se han propuesto modelos matemáticos para describir el comportamiento de la RR-PKA (Cazzaniga *et al.*, 2008; Williamson *et al.*, 2009). En estos trabajos se desarrollan modelos continuos, con ecuaciones diferenciales o con simulaciones estocásticas. En el modelo matemático continuo se reproduce la actividad de la RR-PKA, incluyendo el bucle de retroinhibición a través de Pde2, pero se considera que la actividad de las Tpk's es redundante (Williamson *et al.*, 2009). El modelo con simulaciones estocásticas se enfoca en estimar la cantidad relativa de los componentes de la RR-PKA, pero igual que el anterior, también se considera redundante la actividad de las cinasas Tpk's (Cazzaniga *et al.*, 2008).

Por lo que a partir de las interacciones genéticas entre los componentes de la RR-PKA, demostrada en trabajos previos y con las observaciones obtenidas en este trabajo, y la relación de los elementos de la red sobre la expresión del reportero *HSE-CYCI-lacZ*; se propone un modelo dinámico discreto. Este modelo se fundamenta como una extensión de los modelos discretos síncronos, los cuales se han utilizado para predecir el comportamiento de redes biológicas. La ventaja de los modelos discretos es que únicamente requieren establecer la naturaleza reguladora (relación) de las interacciones entre los componentes de la red. En cambio, en la formalización con ecuaciones diferenciales, basados en cinéticas de reacción, se requieren los valores precisos para todos los parámetros cinéticos y los exponentes de cooperatividad de los elementos de la red.

Para desarrollar el modelo dinámico discreto de la RR-PKA, se calibraron 15 Tablas de relaciones que simulan los aspectos esenciales de la dinámica de los componentes de la red. Las interacciones de los componentes se describen a continuación (Figura 25):

- 1) la actividad del intercambiador de nucleótidos de guanina -Cdc25-,
- 2) la concentración del AMPc,
- 3) la actividad de inhibición de Bcy1, sobre las Tpk's,
- 4) el antagonismo de Tpk2, sobre Tpk1 y Tpk3 en la estimulación del represor Hsp70,
- 5) la activación de Pde2, por las cinasas Tpk1 y Tpk3,
- 6) la inhibición de Hsf1/Skn7, por Hsp70 y

- 7) la expresión dependiente de *HSE*, que está
- 8) determinada por los factores de transcripción Hsf1-Skn7.

El modelo de la RR-PKA comienza con el nodo Cdc25-Ras. La abundancia y la actividad de Cdc25 dependen de las chaperonas Hsp70 –Ssa1 y Ssa2– (Geymonat *et al.*, 1998). En condiciones óptimas de temperatura y nutrientes, Cdc25 actúa como regulador positivo de Ras2 (Broek *et al.*, 1987; Field *et al.*, 1987), que a su vez activa a Cyr1 –adenilato ciclasa– (Kataoka *et al.*, 1985). El AMPc, producto de Cyr1, regula negativamente la inhibición sobre las subunidades catalíticas (C) Tpk1, Tpk2 y Tpk3, impuestas por Bcy1 (R) (Thevelein y de Winde, 1999). Las C se modelaron como un módulo con antagonismo, como se mostró en las Figuras 21 y 25 y en trabajos previos (Pan *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2000; Robertson y Fink, 1998). Se propone que la cinasa Tpk2 inhibe la activación de Ssa1 y Ssa2, que generan las cinasas Tpk1 y Tpk3. La implicación de esta interacción es que, en un contexto silvestre, donde las tres cinasas son activas, sólo la Tpk2 es eficaz en la activación de las chaperonas Ssa1 y Ssa2. La base mecanicista de este antagonismo quedará pendiente de estudiar. Un estudio *in vitro* de las cinasas de *S. cerevisiae* mostró que Tpk1 fosforila a Tpk2 y Tpk3, que Tpk3 fosforila a Tpk2, y que Tpk2 fosforila a Tpk3 (Ptacek *et al.*, 2005). Queda por someter a prueba el antagonismo entre las Tok's y si éste es causado por su fosforilación mutua o si se produce a través de otros mecanismos indirectos. Como se ha mencionado anteriormente (Figura 26), la inhibición que la RR-PKA causa que la expresión génica dependiente de *HSE* requiere de la activación de un intermediario que inhiba al complejo Hsf1 y Skn7. Por consiguiente, se introdujeron las chaperonas Ssa1 y Ssa2 –Hsp70– como represores de la expresión dependiente de *HSE* (Bonner, *et al.*, 2000_{a,b}; Stone y Craig, 1990), ya que los datos experimentales de esta tesis fueron acordes con esta hipótesis (Figuras 23, 25, 28 y 29). Además, con base en los niveles de expresión del mutante triple *ssa1Δ ssa2Δ tpk2Δ*, se incluyó un tercer elemento represor de Hsf1/Skn7 [RepX] (Figura 27), que se activa exclusivamente cuando Tpk1 y Tpk3 se convierten en la única subunidad catalítica, es decir, cuando Tpk2 está ausente o en niveles mínimos.

El modelo general consiste en N nodos $\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N\}$, a los cuales se les asignaron valores enteros [estados] de actividad que van de 0 a m_i , donde m_i es el nivel máximo de actividad (o nivel de expresión) para el elemento σ_i . Normalmente en este tipo de modelos

sólo se implementan dos niveles de actividad: el del nodo activo ($\sigma_i = 1$) o el del nodo inactivo ($\sigma_i = 0$). Sin embargo, a menudo la funcionalidad de los niveles de la actividad de un nodo varía de bajo, a suave o a alto, por lo que la descripción binaria no es suficiente. Éste fue el caso de la RR-PKA, ya que los experimentos indicaron que algunos nodos requieren de hasta seis niveles de actividad (Apéndice 4, secciones 3 y 4). Dada la ausencia de las escalas de tiempo que están implicadas en la dinámica de red, se presentaron los resultados utilizando un esquema de actualización síncrona.

Para determinar los estados estables (atractores) de cada red, consideraremos cada genotipo, control o mutante –silvestre, *tpk1Δ*, *tpk3Δ*, etc.–, como redes diferentes y se probaron aproximadamente el 10% del total de las condiciones iniciales, que consta de más de 4 mil millones de puntos (véase en el Apéndice 5 el Texto S1). Dado que varias condiciones iniciales pueden caer en el mismo atractor, definimos el tamaño de la cuenca de atracción B_k como el número de condiciones iniciales que caen en el atractor K . Nuestra extensión del marco de modelado tradicional consistió en dos modificaciones simples: en primer lugar, se promedió el nivel de expresión de cada elemento en una ventana de tiempo cuya longitud igualaba el periodo de atracción. Esto nos dio un único valor continuo A^{ik} para cada elemento σ_i en el $k^{\text{ésimo}}$ atractor. En segundo lugar, para comparar las mediciones experimentales a partir de cultivos líquidos donde se obtiene un único nivel de expresión, se promediaron las cantidades A^{ik} sobre todos los atractores de la red ponderados por el tamaño de la cuenca de atracción correspondiente. Por lo tanto, contrariamente a otros estudios (Chaos *et al.*, 2006; Kim, *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2004) se evitó descartar cualquier atractor "no biológicamente relevante" alcanzado por la red. A este modelo nos referimos como el Modelo de Ventanas Discretas [“Windowed Discrete Model”, WDM] (Pérez-Landero *et al.*, 2015). La red de interacción control –silvestre– considerada se muestra en la Figura 25, y las reglas lógicas que rigen la dinámica del sistema se presentan en el apéndice 4 y la sección 3 de la información suplementaria del artículo de Pérez Landero y colaboradores (2015). Este tratamiento estadístico de los datos está respaldado por estudios experimentales que muestran que en los cultivos de levadura se presentan diferentes fases del ciclo celular, estados fisiológicos y patrones de expresión génica, que resultan en una población heterogénea (Folch-Mallol *et al.*, 2004; Holland *et al.*, 2014; Lidstrom *et al.*, 2010). Con este

procedimiento se compararon directa y semicuantitativamente las predicciones del modelo y las mediciones experimentales.

La comparación cuantitativa entre los resultados teóricos y los experimentales corrobora las interacciones reguladoras propuestas

Para validar las simulaciones de nuestro modelo, se compararon los resultados de la expresión dependiente de *HSE* obtenidos computacionalmente y los obtenidos experimentalmente en alelos mutantes. Las mediciones de la población se presentan como la relación (nivel de expresión de cepa mutante / nivel de expresión de WT) (Figura 27 y apéndice 6: Tabla S4). Los resultados obtenidos con el WDM correlacionaron con los resultados obtenidos experimentalmente. La concordancia entre la teoría y el experimento sugiere que las relaciones propuestas para la RR-PKA tienen alta probabilidad.

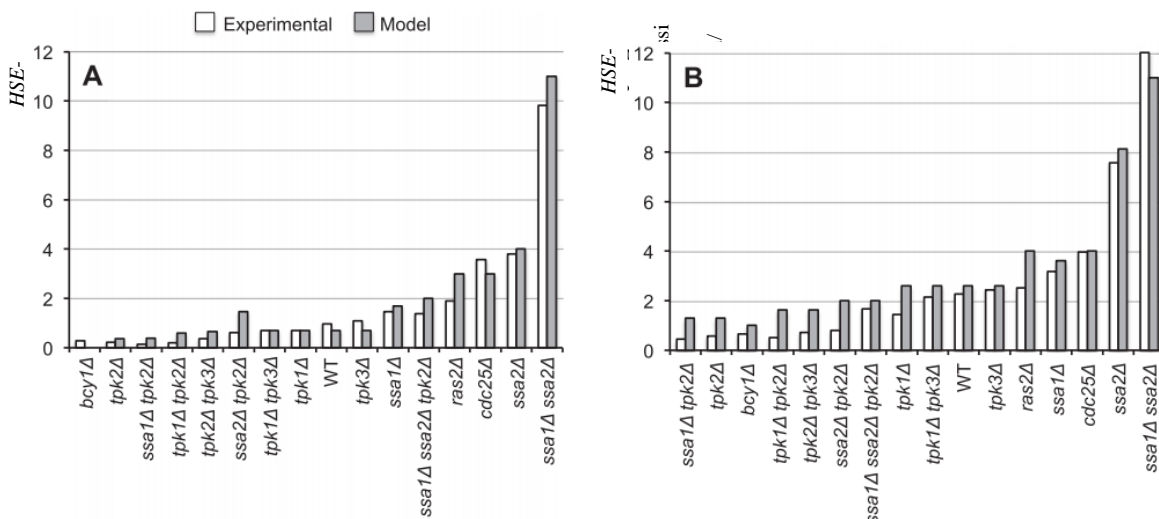


Figura 27. Comparación de la actividad de *HSE-CYC1-lacZ* entre los datos experimentales y las predicciones con el modelo WDM. Tomado de: Pérez-Landero *et al.*, 2015.

Para visualizar las cuencas de atracción de la red, se probaron distintos esquemas de actualización, tanto la sincrónica como la asincrónica (Figura 28). Este análisis fue relevante porque para las redes particulares (una sola célula) se usa la actualización asincrónica, y esto puede desencadenar en cambios en la dinámica de los atractores de la red y visualizar escenarios inadecuados (Di Paolo, 2001; Harvey *et al.*, 1997).

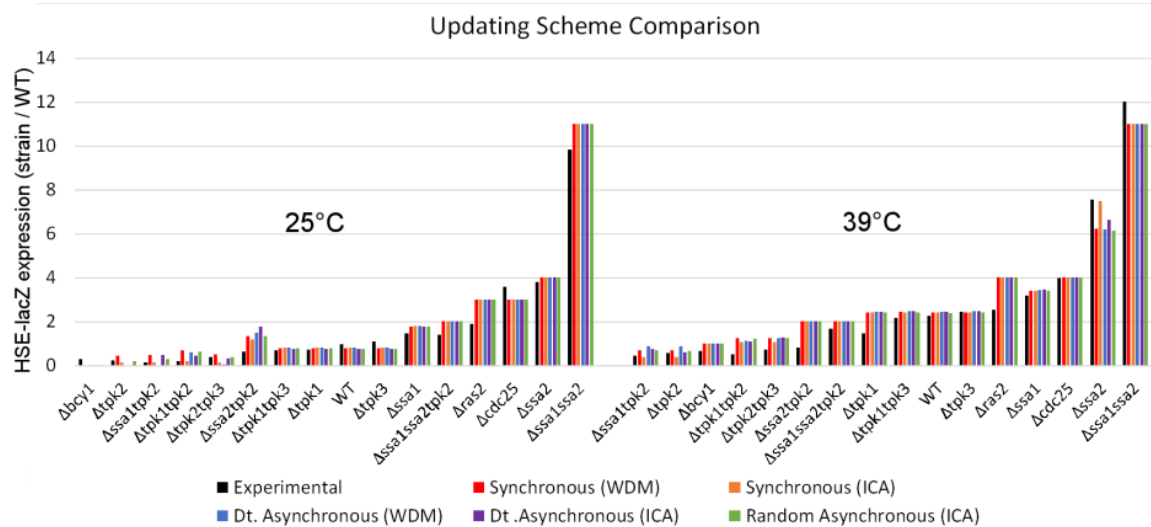


Figura 28. Comparación de los distintos esquemas de actualización de WDM. Tomado de: Pérez-Landero *et al.*, 2015.

Para presentar la estructura del paisaje de atractores de la red en la cepa control –silvestre– W303, se usó la actualización sincrónica en una red reducida (Figura 29). Se obtuvieron cuencas de atracción con tamaños variados (Figura 30). El WDM generado tomó en cuenta los subgrupos de redes correspondientes a diferentes cuencas de atracción.

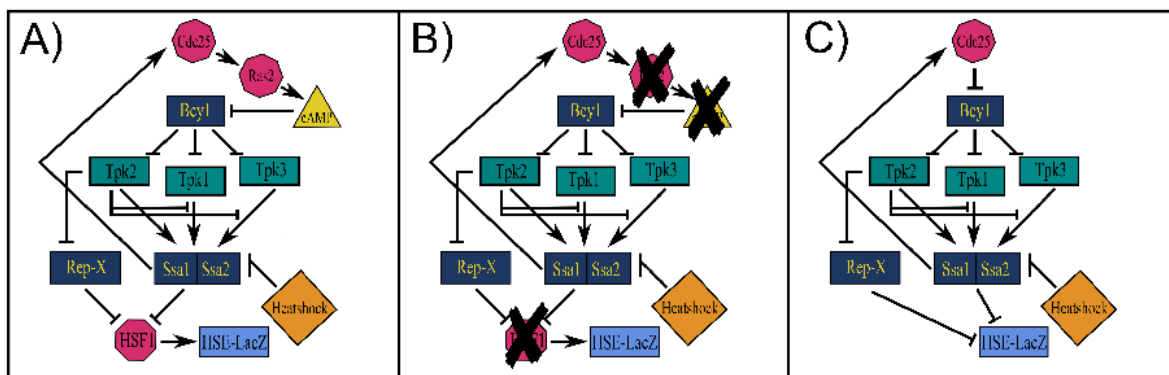


Figura 29. Red reducida utilizada para calcular la estructura del paisaje de atractores. **A)** Red que muestra todos los elementos utilizados en la sección resultados. **B)** Eliminación de elementos imitadores / intermediarios. Ras2 y cAMP están regulados positivamente en un modo en cascada por Cdc25 y su regulación es lineal, similar a Hsf1 con respecto a *HSE-lacZ*. **C)** Red final reducida. Tomado de: Pérez-Landero *et al.*, 2015.

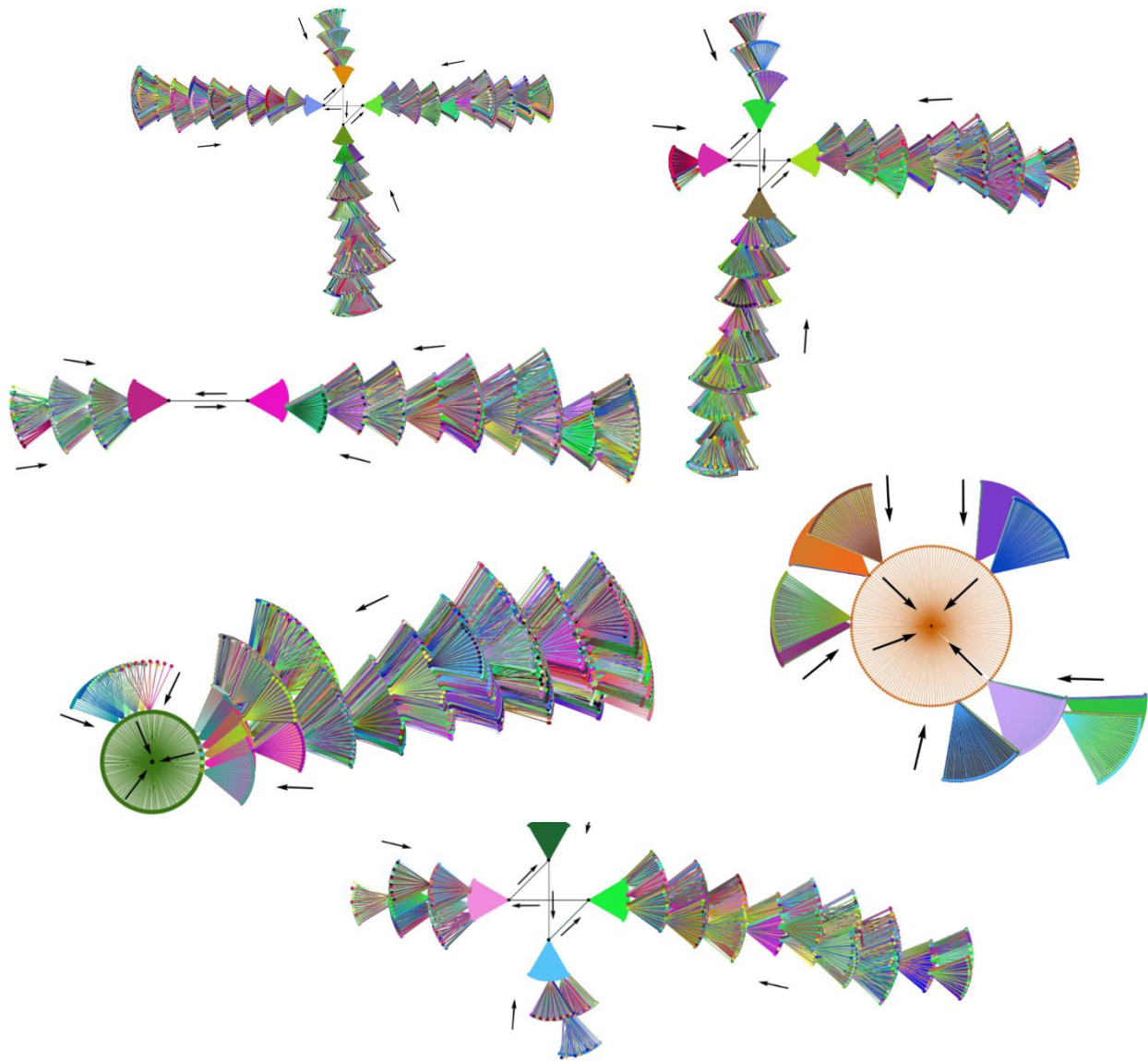


Figura 30. Estructura del paisaje de atractores que muestra la RR-PKA reducida, en el genotipo W303. Tomado de: Pérez-Landero *et al.*, 2015.

La red reducida tuvo aproximadamente 10^7 estados (la red completa tiene más de 10^9 estados, que son computacionalmente intratables). Estos estados se organizaron en cuencas de atracción correspondientes a diferentes atractores. Cada estado de la red se representó por un punto. Dos puntos están interconectados cada vez que un punto es el precursor del segundo punto debajo de la dinámica. Las estructuras en forma de abanico representan todos los precursores de un estado. Las flechas indican el flujo de la dinámica, que finalmente convergió en un estado estable. Se encontraron seis atractores, cada uno con su

correspondiente cuenca de atracción. Tres atractores consistieron en cuatro estados, uno con dos estados y dos con un solo estado. La heterogeneidad de los atractores y sus cuencas de atracción ilustró la necesidad de realizar un promedio ponderado al calcular los niveles de expresión utilizados para comparar con las mediciones realizadas en cultivos de células.

Además de las mediciones de población, se realizaron simulaciones para predecir la dinámica temporal de los siguientes elementos de la RR-PKA: Bcy1, cAMP, *HSE-CYCI-lacZ* y Tpk3 que, presumiblemente, podrían ser válidos para las mediciones de una sola célula (Figura 31). Cada curva representa la simulación correspondiente a un genotipo (silvestre, *ssa1Δ ssa2Δ*, *tpk2Δ* y *tpk1Δ tpk3Δ*), partiendo de una condición inicial aleatoria. En el instante t_0 , se simuló un aumento de la temperatura activando el nodo de choque térmico. En ausencia de *SSA1* y *SSA2* (Figura 31, líneas rojas), los niveles de la actividad *HSE-CYCI-lacZ* y el nodo Bcy1 aumentaron, mientras que los niveles de cAMP y del nodo Tpk3 disminuyeron. En contraste, el comportamiento de Tpk1 y Tpk2 fue idéntico a Tpk3 (datos no presentados). Las dinámicas particulares-temporales de estas simulaciones (comportamiento oscilatorio, picos, etc.) aún no se han confirmado experimentalmente. No obstante, las predicciones presentadas se ajustaron a los datos experimentales de las mutantes *ssa1Δ ssa2Δ*, ya que son resistentes de manera constitutiva al calor, presentan niveles elevados de Hsp y tasas de crecimiento lentas (Halladay y Craig, 1995). También, con la eliminación de *TPK2* se disminuye la expresión de *HSE-CYCI-lacZ*, con respecto a la cepa control –silvestre–, pero con mayor claridad a 39°C que a 25°C, en consonancia con el menor nivel de termotolerancia inducida en esta mutante (Tabla 6).

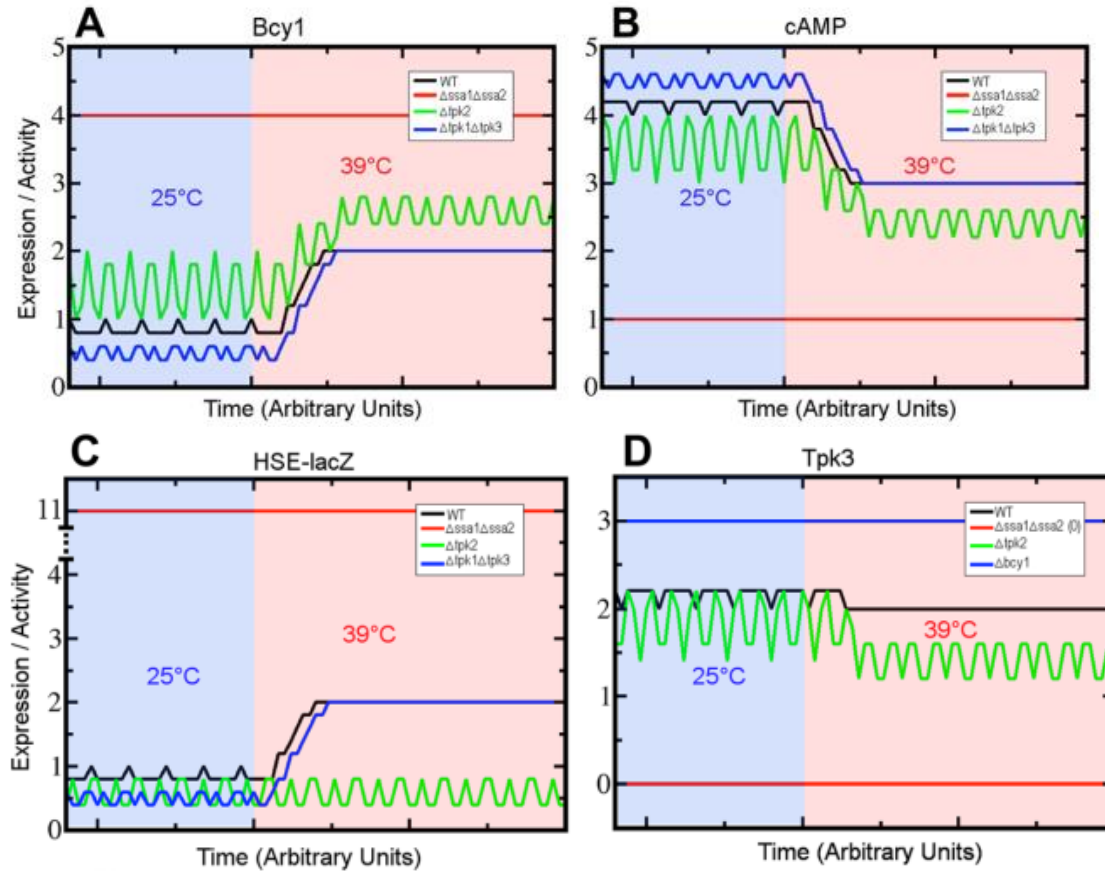


Figura 31. Dinámica temporal de los nodos Bcy1 (a), AMPc (b), *HSE-lacZ*(c), y Tpk3 (d), en la cepa silvestre y en tres cepas mutantes (*ssa1* Δ *ssa2* Δ , *tpk2* Δ y *bcy1* Δ). Tomado de: Pérez-Landero *et al.*, 2015.

DISCUSIÓN

Es el interés de esta investigación avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos implicados en la adaptación de los organismos a los cambios ambientales. En específico la relación de los elementos genéticos de la RR-PKA sobre la regulación del crecimiento y la sobrevivencia al calor [interacciones genotipo–fenotipo] en *S. cerevisiae*. A través de un modelamiento computacional fundamentado en la ontología genética de los componentes de la RR–PKA, se monitoreó la dinámica de expresión de *HSE-CYCI-lacZ* para inferir la actividad de los factores de transcripción Hsf1/Skn7, que son elementos centrales para la respuesta a estrés. Este trabajo de tesis permitió concluir que el fondo genético de la cepa en la cual se realiza el análisis genético influye en la descripción del comportamiento de la RR-PKA (Figuras 18, 19 y 20). Esto se observa en la expresión constitutiva de *HSE-CYCI-lacZ*, a 25°C, de las cepas control con distintos fondos genéticos; en BY4741 y KT1112 la expresión del gen reportero es baja (menor a 100 U de actividad de β-galactosidasa), en contraste con W303 (1000 U de actividad de β-galactosidasa). Este comportamiento nos permitió utilizar a W303 para comparar los estados de la RR-PKA. Esto no se lograría en otra cepa con distinto fondo genético. Estas observaciones explicarían por qué en trabajos previos, donde se utilizan diseños experimentales similares, concluyeron que en cepas mutantes de la RR- PKA no se afecta la actividad de Hsf1 (Marchler *et al.*, 1993; Engelberg *et al.*, 1994).

Lo descrito anteriormente se observa en las cepas control y mutantes *-cdc25Δ*, *rasΔ2* y *bcy1Δ*- del fondo W303, donde los niveles de actividad del reportero mostraron un rango dinámico amplio [elevado, medios o bajo] (Figuras 18, 19, 20, 21, 22 y 23). Al contrario, en las cepas control y mutantes *-ras2* y *bcy1-* de los fondos genéticos KT1112 y BY4741, los niveles de expresión del gen reportero a 25°C son similares (Figuras 19 y 20). Este comportamiento se conserva en el fenotipo de termotolerancia. Mientras que las cepas W303 y KT1112 con alelos *ras2* son termotolerantes –lo cual se interpreta como una disminución en la actividad de la RR-PKA–cepas BY4741y AW3 la termotolerancia basal fue similar al control silvestre (Tabla 4). El coeficiente de correlación entre el cociente de la termotolerancia basal relativa y el cociente de la expresión relativa del reportero *HSE-CYCI-lacZ* de las cepas mutantes (Figura 19) separó a los genotipos en dos grupos: el de baja

actividad-conformado por las cepas con fondo genético AW3 y BY4741, y el de alta actividad de PKA - conformado por W303 y KT1112. Debido a que la termotolerancia es controlada por varios FT's –como Msn2/4, Hsf1, Skn7, Yap1, etc.- y que estos son reprimidos por la RR PKA u otros mecanismos de señalización. Se concluye que el fenotipo de termotolerancia puede ser controlado por interacciones epistáticas aún no establecidas, las cuales estarían implicadas en la variación de este fenotipo entre las cepas analizadas.

Los datos anteriores eliminan la posibilidad de que las discrepancias encontradas por distintos autores (Marchler *et al.*, 1993; Engelberg *et al.*, 1994; Ferguson *et al.*, 2005; Pérez-Landero, 2007), en relación con el control de la actividad de Hsf1 por la vía PKA, se deban a diferencias experimentales en la realización de los ensayos o a diferencias funcionales entre los reporteros utilizados. Por el contrario, confirman que estas diferencias se deben primordialmente a la cepa de origen analizada, resaltando la importancia del fondo genético en el análisis de la actividad de los factores Hsf1 y Skn7.

La variabilidad fenotípica de 36 cepas de *S. cerevisiae* se ha comprobado de forma sistémica mediante el análisis del crecimiento en 67 condiciones ambientales. En este trabajo se pone en evidencia el comportamiento distinto entre las cepas silvestres (en el sentido amplio y verdadero de la palabra) o domesticadas en el laboratorio o "cepas de laboratorio" (Liti *et al.*, 2009). Observaciones que coinciden con nuestros resultados.

Fenómeno que ya ha sido descrito por otros laboratorios, que han comprobado que el fenotipo de “morfología rugosa,” en respuesta a la limitación de nutrientes, varía dependiendo del contexto genético. En este caso, una mutación puntual en la cinasa Rim15 [*rim15*:1216G] es la que impide a células diploides generar dicho fenotipo (Granek y Magwene, 2010).

Para nuestra investigación, un ejemplo de la epistasis que existe entre los elementos de la RR-PKA, es el caso de la esencialidad de *CDC25*, cuya delección es letal en las cepas BY4741 y LRA, mas no en la cepa W303 (Folch-Mallol *et al.*, 2004), ya que el gen parálogo *SDC25* sostiene el crecimiento mitótico en ausencia de *CDC25* (Martínez *et al.*, datos no publicados). Por el contrario, en las cepas BY4741 y LRA, *SDC25* es un pseudogen no funcional. Estas observaciones se lograron mediante un análisis genético para evaluar la epistasis entre *CDC25* y *SDC25* en cepas del fondo genético W303 (Martínez Anaya, C., datos no publicados). Se demuestra que la expresión del transcrito de *SDC25* en cepas mutantes

cdc25Δ es 10 veces mayor que en la cepa control, lo cual permite mantener viable a las cepas *cdc25Δ* (Figura 32). También es posible restituir el crecimiento de la cepa *cdc25Δ sdc25Δ* mediante la introducción del plásmido *CDC25* (Figura 33) (Folch-Mallol *et al.*, 2014), lo cual comprueba las interacciones epistáticas entre los genes parálogos *SDC25* y *CDC25* (Apéndice 3 y Figuras 32 y 33).

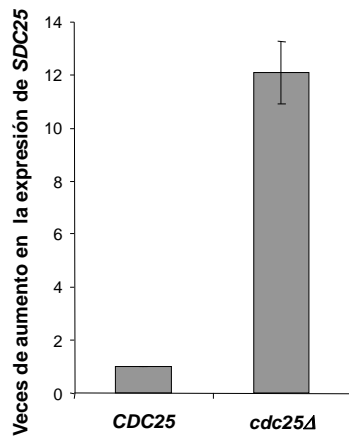


Figura 32. Interacción epistática entre *SDC25* y *CDC25*. Se muestra el número de veces que aumentan los niveles del transcrito de *SDC25*, en la cepa *cdc25Δ* en relación con la cepa control en W303 (tomado de Martínez Anaya, C., datos no publicados).

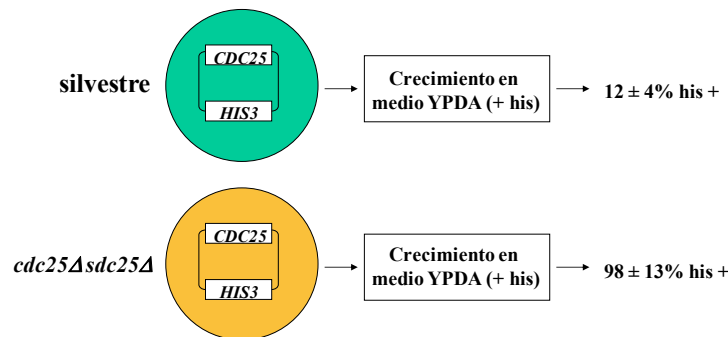


Figura 33. Recuperación del crecimiento de la CEPA *cdc25Δ sdc25Δ* con el plásmido pRS-*CDC25* y su mantenimiento en medio mínimo carente de histidina. Se muestra el porcentaje de células que son protrófofas para histidina (tomado de Martínez Anaya, C., datos no publicados).

Estos ejemplos ilustran cómo los fenotipos pueden variar por el cambio en las interacciones entre genes que son parte de un mismo módulo (epistasis), fundamento que puede ser útil para explicar la manifestación de diferentes fenotipos en mutantes equivalentes, dependiendo del contexto genómico de procedencia. Bajo este argumento, se podría especular que la falta de *RAS2* en las cepas AW3 y BY4741 podría ser compensada por *RAS1* u otros supresores extragenéticos, lo que ocasionaría que la participación de la proteína Ras2 en la regulación de la expresión génica dependiente de *HSE-CYC-lacZ* no sea evidente. Mientras que en las cepas

W303 y KT1112 la falta de Ras2 no es compensada por el producto de otro gen, siendo entonces evidente su efecto en la expresión génica dependiente de elementos *HSE-CYC-lacZ* (Figura 19). Contrario a lo observado en cepas mutantes en *bcy1*, ya que los fenotipos de respuesta a estrés no pueden ser enmascarados por algún supresor. Esto confirma la idea prevalente de que Bcy1 es el único regulador negativo de la PKA, lo que permite explicar que en los tres fondos genéticos se presenten los mismos efectos fenotípicos: la disminución de la termotolerancia inducida (Tabla 5), la pérdida de la viabilidad al entrar a la fase post-diáuxica y la disminución de la expresión génica dependiente de *HSE* (Figura 20). Estos tres fenotipos están asociados a un aumento en la actividad de la PKA.

Las interacciones genéticas, entre las subunidades catalíticas de la PKA, permiten proponer un nuevo modelo de regulación de Hsf1/Skn7

Un dato relevante en nuestro trabajo es la comprobación de la actividad antagónica entre las tres subunidades –Tpk1, Tpk2 y Tpk3 – en la regulación de Hsf1/Skn7. Si bien ya se había demostrado este comportamiento para la regulación de los fenotipos de crecimiento pseudohifal y en la absorción de fierro (Robertson y Fink, 1998; Robertson *et al*, 2000), no se han hecho modelos matemáticos considerando este antagonismo. Con la estrategia experimental utilizada en este trabajo, se logra elucidar la influencia de cada una de las cinasas en la regulación de la respuesta al estrés por calor. Se observó que la actividad de la cinasa Tpk2 es antagónica a las de Tpk1 y Tpk3, en el fondo genético W303 (Figuras 21 y 23). En contraste, cuando se analizó este problema en el fondo genético BY4741, no fue posible observar este antagonismo (Figura 21).

El modelo propuesto plantea que en células mutantes *tpk2Δ* de la cepa W303 la concentración de Tpk1 y Tpk3 disminuye en el citoplasma y aumenta en el núcleo, en tanto que Bcy1 se mueve en la dirección opuesta: del núcleo al citoplasma, permitiendo de esta manera que Tpk1 y Tpk3 activen a las proteínas Hsp70 y, en consecuencia, se inhiba la actividad de Hsf1/Skn7. Esta idea es coherente con la dinámica de expresión de *HSE-CYC1-lacZ* en cepas mutantes *TPK's* de la cepa W303 (Figura 21). El antagonismo propuesto de Tpk2 sobre la actividad de Tpk1 y Tpk3 parece ser exclusivo para activar a Hsp70 y no para el total de las proteínas blanco de las subunidades catalíticas, como lo pueden ser Msn2/4. Idea que se

fundamenta en la observación de que la expresión del reportero *STRE-lacZ* no es alterada a 25°C en ninguna de las mutantes en los genes *TPK*'s (Figura 22). Es posible que en la cepa *tpk2Δ* la inestabilidad o la degradación de Bcy1 en el citoplasma aumente a 25°C, o que exista otro factor dependiente de Tpk2 que promueve la asociación de Bcy1 con las Tpk's (por ejemplo, las proteínas tipo Kelch, Krh1 y Krh2), o que algún factor negativo, también dependiente de Tpk2, le impida inhibir completamente a Tpk1 y a Tpk3, lo cual permite explicar que cualquiera de las tres cinasas sea suficiente para reprimir el paso de Msn2/4 al núcleo (Figura 22). La actividad del reportero *STRE-lacZ* a 39°C en la mutante *tpk1Δ* y en las tres cepas [*tpk1Δ tpk2Δ*, *tpk1Δ tpk3Δ* y *tpk2Δ tpk3Δ*] fue superior a la cepa silvestre o a las cepas *tpk2Δ* y *tpk3Δ* (Figura 22). Estos datos son coherentes con la idea de que Bcy1 reprime a las Tpk's durante el choque a 39°C debido a la disminución de la actividad de la ruta Cdc25-Ras (Geymonat *et al.*, 1998); permitiendo la translocación de Msn2/4 al núcleo. Sin embargo, este modelo no basta para explicar por qué a 39°C existen diferencias de expresión del reportero *STRE-lacZ* entre las mutantes *TPK*; por lo que es concebible que otro nivel de regulación sea el aumento de los niveles de Tpk2 y Tpk3 cuando Tpk1 de está ausente, lo cual puede compensar el aumento de la represión de Bcy1 sobre ellas en estas condiciones. Este modelo permite explicar, al mismo tiempo, la discrepancia entre los patrones de expresión de los reporteros *HSE-CYCI-lacZ* y *STRE-lacZ* en las cepas mutantes analizadas (Figuras 21 y 22).

En apoyo a la idea de que la eliminación de componentes de la PKA puede alterar la localización subcelular de otros componentes, existe evidencia de que la eliminación de *BCY1*, y de *TPK2*, afecta la localización de las cinasas Ksp1 y Sks1 durante el crecimiento filamentoso (Bharucha *et al.*, 2008), y que Pde2 se localiza preferentemente en el núcleo cuando la actividad PKA es alta (Tudisca *et al.*, 2010).

En los modelos de la Figuras 25 y 29 se propone que las subunidades catalíticas de la PKA estimulan a un represor de la actividad de Hsf1. La activación (fosforilación) de Hsp70 (represor de Hsf1) explica la inhibición de la expresión de *HSE-CYCI-lacZ* en la cepa *bcy1Δ* y la desrepresión mostrada en la cepa *cdc25Δ*. Con la relación contraria – represión de Hsp70 por las Tpk's – se obtendría un resultado diametralmente opuesto a los resultados experimentales. Como se mencionó anteriormente, el antagonismo entre Tpk2 y las

subunidades Tpk1 y Tpk3 ya ha sido descrito en el estudio de la regulación del crecimiento pseudo-hifal (Robertson y Fink, 1998) y en la expresión de genes involucrados en la asimilación de hierro (Robertson *et al.*, 2000). A pesar de que se han descrito los componentes involucrados en la estimulación del crecimiento filamentoso (en respuesta a la limitación de nitrógeno), el mecanismo que gobierna las cinasas Tpk's para controlar esta morfología no se ha esclarecido.

La fosforilación de Msn2 y Msn4 por la PKA ha sido descrita en varios trabajos (Schmitt *et al.*, 1996; Kaida *et al.*, 2002; De Wever *et al.*, 2005). Al disminuir la actividad de la PKA, Msn2 se acumula en el núcleo e incrementa notablemente su actividad como factor de transcripción (Garreaou *et al.*, 2000; Gorner *et al.*, 1998; Schmith *et al.*, 1996; Jacquet *et al.*, 2003; Garmendia-Torres *et al.*, 2007). Un análisis de cepas en el fondo genético S288c, con mutaciones en los genes que codifican para las subunidades catalíticas, indicó que la expresión del reportero *HSP12-GFP* que depende de Msn2/Msn4 no varía en respuesta a calor -39°C –; en cambio a 25°C se comportan de distinta forma: la cepa *tpk1Δ* menor en la *tpk2Δ* y mayor en la *tpk3Δ* (Sadeh *et al.*, 2011). Por el contrario, nuestros análisis revelaron que la actividad de cualquiera de las tres subunidades es suficiente para mantener reprimidos a Msn2/4 a 25°C y limitante a 39°C (Figura 22). Nuevamente, se observa cómo el fondo genético repercute en los efectos de la RR-PKA sobre sus genes blanco. Como se discutió previamente, en W303 es posible que a 25°C existan en el citoplasma suficientes Tpk1, Tpk2 o Tpk3 para mantener a Msn2 en el citoplasma. En contraste, en respuesta a un choque de 39°C , *tpk1Δ* y las dobles mutantes que sólo cuentan con Tpk1, con Tpk2 o con Tpk3, desreprimen al reportero *STRE-lacZ* (Figura 22). Esto permite suponer que a esta temperatura se inactivan las Tpk's localizadas en el citoplasma y, por lo tanto, Msn2 es translocado al núcleo. Proceso que es controlado por la cantidad de subunidades catalíticas y disminuye en el citoplasma (por su traslado al núcleo, baja en su síntesis o por degradación) y/o porque la concentración de Bcy1 aumenta en este compartimento celular.

La oscilación de los componentes de la RR-PKA –Tpk1, Tpk2, Tpk3, Pde2 y Bcy1– entre los compartimentos subcelulares, en respuesta a las condiciones fisiológicas de la célula, ya ha sido documentada en la literatura (Griffioen *et al.*, 2000 y 2001; Griffioen y Thevelein, 2002; Anckar *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2010; Tudisca *et al.*, 2010). Cuando las células crecen

en condiciones óptimas se ha visto que Tpk3 y Tpk1 se distribuyen preferentemente en el citoplasma (Tudisca *et al.*, 2010), mientras que Bcy1, Pde2 y Tpk2 mayoritariamente se encuentran en el núcleo (Hu *et al.*, 2010). Cuando la concentración del AMPc disminuye, la mayor parte de las moléculas de Tpk1 se trasladan al núcleo (Griffioen *et al.*, 2000). Otro punto importante es la localización de la Pde2, ya que se ha demostrado que esta proteína abunda en el núcleo, de manera dependiente de la actividad de la PKA (Hu *et al.*, 2010). En cambio, al agotarse los nutrientes, Tpk2, Tpk3, Pde2 y Bcy1 se encuentran en mayor abundancia en el citoplasma (Tudisca *et al.*, 2010). Considerando las evidencias anteriores, nos preguntamos: ¿se afecta la localización de las subunidades catalíticas, o la de Bcy1, cuando una o varias de estas subunidades se eliminan de la célula, como en el caso de las cepas mutantes que fueron estudiadas en este trabajo? ¿Qué otros factores (proteínas) determinan la compartimentalización de las subunidades de la PKA? Esto queda aún por determinarse.

Quedan por evaluar los niveles y la localización subcelular de algunos de los elementos de este modelo, en presencia o ausencia de *TPK2* en derivados de la cepa W303, para lo cual se necesitan fusiones Tpk1-GFP, Tpk3-GFP y Bcy1-GFP. Con este material genético podremos evaluar el efecto de la ausencia de Tpk2 en la abundancia y/o localización de las otras subunidades catalíticas y/o de Bcy1, lo cual implicaría una manera aún no descrita de regulación de la PKA en el espacio subcelular. Los estudios preliminares hechos en la cepa BY4741 muestran que los niveles de la cinasa Tpk1 disminuyen en la cepa *tpk2Δ* (Odín Sandoval, datos no publicados).

Tanto la actividad como la estabilidad de las Tpk's, y por ende la actividad de la RR-PKA, dependen principalmente de la interacción de Bcy1 con las Tpk's. En la *cdc25Δ*, la baja actividad de la RR-PKA se refleja en un aumento en la interacción entre Bcy1 con las Tpk's, contrario a lo que sucede en la *bcy1Δ*. En el ensayo de la Figura 24, la disociación del tetrámero Bcy1-Tpk's, por adición de AMPc a los extractos totales, refleja los niveles relativos de proteína de las subunidades catalíticas. Por lo tanto, la actividad catalítica total de PKA es un indicativo indirecto de los niveles de las Tpk's. La observación de que la actividad de PKA aumenta en extractos de células *cdc25Δ* y disminuye de manera significativa en extractos de la *bcy1Δ*, permite suponer que Bcy1 aumenta la estabilidad y los

niveles de las subunidades catalíticas. Alternativamente, podemos pensar que la actividad catalítica elevada de las Tpk's, en ausencia de Bcy1, promueve su propia degradación vía el proteosoma. El mecanismo exacto por el cual esto ocurre queda aún por determinarse.

Estas observaciones no son lineales y son soportadas por los experimentos genéticos de sobreexpresión de *TPK1* en células control, donde se demuestra que la cantidad de Tpk1 no aumentaba. Se logró detectar aumento de Tpk1 sólo al sobreexpresar al mismo a tiempo a Bcy1 (Zoller *et al.*, 1988). Estas observaciones permiten suponer que Bcy1, además de inhibir la actividad catalítica de Tpk1 formando el complejo inactivo Tpk1-Bcy1, también previene su degradación y quizá la de las otras subunidades catalíticas. Esto correlaciona con lo observado en la *cdc25Δ*, donde la vía PKA está atenuada, lo cual favorecería la formación del complejo tetrámerico Tpk-Bcy1, reflejándose en una mayor estabilidad de las Tpk's y, por lo tanto, una mayor actividad de PKA medida *in vitro* (Figura 24). Por el contrario, en células carentes de *BCY1*, la actividad de PKA medida *in vitro* relativa a la cepa silvestre es baja, pese a que los fenotipos observados correlacionan con una alta actividad de PKA *in vivo* (Tabla 5, Figura 20). En estudios llevados a cabo por el Biól. Odín Sandoval mediante la técnica del *Western*, se observó que la subunidad Tpk1, y en menor medida Tpk2 y Tpk3, disminuyen sus niveles en células *bcy1Δ* (Odín Sandoval, datos no publicados). Sin embargo, dado que estos análisis se hicieron en la cepa BY4741, se propone someter a prueba esta hipótesis en la cepa W303.

La disminución de la actividad total de PKA en los extractos de las cepas carentes de *TPK2* apoya la hipótesis de que las cinasas Tpk1 y Tpk3 son inestables cuando presentan mayor actividad. Si bien Tpk2 muestra una abundancia intermedia en células silvestres, en la cepa *tpk2Δ* la actividad de PKA *in vitro* es la menor actividad, paradójicamente disminuyen la expresión del reportero *HSE-CYC1-lacZ*. Por último, se podría postular que Tpk2 controla a Tpk1 y a Tpk3 a nivel de fosforilación, ya que se ha demostrado que las subunidades catalíticas de la PKA se fosforilan entre sí (Ptacek *et al.*, 2005). Sin embargo, el efecto de estas modificaciones aún no se ha establecido.

Fundamentados en estas observaciones, se postula que la Red de Regulación Cdc25-Ras-PKA regula la actividad de los Ft Hsf1 y Skn7 durante el crecimiento en glucosa. A pesar de que Hsf1 tiene varios sitios de fosforilación consenso de la PKA, no se ha demostrado que

estas cinasas lo fosforilen. En cambio, la cinasa Yak1 fosforila a Hsf1 cuando la actividad de PKA es baja y cuando la concentración de la glucosa en el medio disminuye (Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011). Esto implica que Yak1 no mantiene a Hsf1 en estado de baja actividad durante el crecimiento en glucosa. Además, la localización espacio-temporal de Yak1 no correlaciona con la de Hsf1 en estas condiciones (Wiatrowski *et al.*, 2003). Lo anterior indica que es necesario realizar otros estudios para establecer el mecanismo mediante el cual la PKA regula a Hsf1.

Dinámica de la Red de Regulación PKA utilizando un modelo matemático discreto y sus implicaciones

Con el uso de modelos matemáticos para sistematizar las relaciones entre los elementos de la RR-PKA y los fenotipos de crecimiento y respuesta a estrés, es posible plantear interacciones a distintas escalas y niveles de organización celular. Anteriormente, se han empleado modelos matemáticos que utilizan el análisis determinístico, el cual se enfoca en la cuantificación exacta de los productos que participan en la RR-PKA y toman como redundante la actividad de las Tpk's. En este sentido, en el presente trabajo de tesis se propone un modelo discreto de interacción capaz de predecir los niveles de expresión de *HSE-CYC1-lacZ* y elucidar el comportamiento del módulo R-C, tanto a 25°C como en respuesta a un choque a 39°C. El uso de este tipo de modelos matemáticos ayuda no sólo a sistematizar la información experimental, sino a proponer, como fue nuestro caso, otros elementos que estén participando en la red de regulación. Esto se observa en la cepa *ssa1Δ ssa2Δ tpk2Δ*, ya que la expresión de *HSE-CYC-lacZ* no es inhibida a niveles de la cepa *tpk2Δ*, ni promovida como en las cepas *ssa1Δ ssa2Δ* (Figura 26).

Otro candidato plausible como represor podría ser Hsp90. Ya que esta chaperona se une a Hsf1 (Nadeau *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1998) y su supresión aumenta la expresión dependiente de *HSE* (Duina *et al.*, 1998). Por otra parte, Tpk1 y Tpk3 fosforilan *in vitro* a Hsp82 (Hsp90) (Ptacek *et al.*, 2005); aunque el significado funcional de esta interacción es desconocido. Es plausible que la unión de Hsp90 a Hsf1 sea promovida por la Tpk1 o Tpk3, pero esto debe ser abordado experimentalmente. Del mismo modo, Tpk1 y Tpk3 podrían aumentar la represión de Hsf1 ejercida por otros miembros de la familia Hsp70, como Ssb1 o Ssb2, ya

que se sabe que Ssb1 y Ssb2 forman complejos con Hsf1 y afectan la expresión dependiente de *HSE* (Bonner *et al.*, 2000). Sin embargo, será necesario llevar a cabo otros experimentos para identificar al tercer represor que se desenmascara en ausencia de Tpk2, ya que el modelamiento de la dinámica de la RR-PKA requirió de la inclusión de tres represores –Ssa1, Ssa2 y el tercer represor putativo– para lograr reproducir las mediciones experimentales del presente trabajo de tesis.

El desarrollo de modelos computacionales similares al propuesto en esta tesis podría aplicarse para describir los efectos de la RR-PKA en otros procesos, como son el crecimiento filamentoso o la asimilación del hierro.

CONCLUSIONES

- Las cepas de laboratorio KT1112, BY4741 y W303 revelan que las conjeturas genéticas sobre la regulación de la respuesta a estrés y el crecimiento en *S. cerevisiae* pueden variar.
- La Red de Regulación Ras-PKA es un importante nodo de regulación del crecimiento y la respuesta a estrés.
- Existen interacciones epistáticas entre las subunidades catalíticas de la PKA que fueron reveladas en el fondo genético W303, pero no en otras cepas de laboratorio, lo que indica que son fuertemente influidas por el contexto genético (cepa).
- Las chaperonas Ssa1 y Ssa2 son los intermediarios negativos entre el módulo de las subunidades catalíticas de la PKA y los factores de transcripción Hsf1 y Skn7.
- Con la herramienta de modelos matemáticos discretos se pueden reproducir conjeturas experimentales genéticas, con los que se pueden entender los mecanismos de las redes de interacción (epistasis) en los sistemas vivos.

PERSPECTIVAS

- Para avanzar en el conocimiento del mecanismo con el que la RR PKA percibe y consensa las señales recibidas, es necesario integrar los efectos conocidos sobre elementos *in vivo* y no reporteros sintéticos. Para lo cual se sugiere convocar a especialistas para construir un modelo de mayor complejidad.
- Utilizar herramientas de aprendizaje autónomo para encontrar otros elementos que pudiéramos incluir en la RR-PKA.
- Generar perturbaciones de la RR-PKA que afecten su dinámica y monitorear la expresión *HSE-CYC-lacZ*. Perturbaciones que no sean necesariamente genéticas, como la geldamicina para bloquear a las Hsp90.

FUENTES CONSULTADAS

- Aldana, M. *et al.* (2007). "Robustness and evolvability in genetic regulatory networks". *Journal of Theoretical Biology*, 245(3): 433-48.
- Anckar, J. *et al.* (2006). "Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors". *Molecular and Cellular Biology*, 26(3): 955-964.
- Beck, T. y Hall, M. N. (1999). "The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors". *Nature*, 402(6762): 689-692.
- Bharucha, J.P. *et al.* (2008). "*Saccharomyces cerevisiae* Afr1 protein is a protein phosphatase 1/Glc7-targeting subunit that regulates the septin cytoskeleton during mating". *Eukaryotic Cell*, 7(8): 1246-55.
- Bockmühl, D. P. *et al.* (2001). "Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*". *Molecular Microbiology*, 42(5): 1243-57.
- Bonner, J. J. *et al.* (2000_a). "Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor". *Molecular Biology of the Cell*, 11(5): 1739-1751.
- Bonner, J. J. *et al.* (2000_b). "Structural analysis of yeast HSF by site-specific crosslinking". *Journal of Molecular Biology*, 302(3): 581-592.
- Bor-Sen, C. y Cheng-Wei, L. (2017). "Chapter 6", en *Big Mechanisms of Information Flow in Cellular Systems in Response to Environmental Stress Signals via System Identification and Data Mining*, en *Big Mechanisms in Systems Biology*. Academic Press: 155-248 [ISBN 9780128094792]
- Bouquin, N. *et al.* (1999). Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast". *Molecular Biology of the Cell*, 10(10): 3389-3400.
- Boy-Marcotte, E. *et al.* (1996). "SDC25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation". *Molecular Biology of the Cell*, 7(4): 529-539.
- Boy-Marcotte, E. *et al.* (1998). "Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Bacteriology*, 180(5): 1044-1052.
- Boy-Marcotte, E. *et al.* (2006). "The transcriptional activation region of Msn2p, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signalling pathway". *Molecular Genetics and Genomics*, 275(3): 277-87.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Breitkreutz, A. *et al.* (2010). "A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast". *Science*, 328(5981): 1043-1046.
- Broek, D. *et al.* (1987). "The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway". *Cell*, 48: 789-99.
- Brown, A. J. P. *et al.* (2017). "Stress Adaptation". *Microbiology Spectrum*, 5(4).
- Brown, J. L. *et al.* (1993). "SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors". *Journal of Bacteriology*, 175(21): 6908-6915.
- Burke, D. *et al.* (2000). *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Cannon, J. F. y Tatchell, K. (1987). "Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase". *Molecular and Cellular Biology*, 7(8): 2653-2663.
- Carlson, M. (1999). "Glucose repression in yeast". *Current Opinion in Microbiology*, 2(2): 202-207.
- Causton, H. C. *et al.* (2001). "Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes". *Molecular Biology of the Cell*, 12(2): 323-337.
- Cazzaniga P. *et al.* (2008). "Modeling and stochastic simulation of the Ras/cAMP/PKA pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* evidences a key regulatory function for intracellular guanine nucleotides pools". *Journal Biotechnol*, 133(3): 377-85.
- Celenza, J. L. y Carlson M. (1989). "Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein". *Molecular and Cellular Biology*, 9(11): 5034-5044.
- Celenza, J. L. *et al.* (1989). "Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase". *Molecular and Cellular Biology*, 9(11): 5045-5054.
- Charizanis, C. *et al.* (1999). "The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and General Genetics*, 261(4-5): 740-752.
- Chaos, A. *et al.* (2006). "From genes to flower pattern and evolution: dynamic models of gene regulatory networks". *Journal of Plant Growth Regulation*, 25: 278-89.
- Chen, Y. *et al.* (1993). "Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity". *The EMBO Journal*, 12(13): 5007-5018.
- Cherry, J. M. *et al.* (1997). "Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*". *Nature*, 387(6632 Suppl): 67-73.
- Chevtzoff, C. *et al.* (2005). "The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1706(1-2): 117-125.
- Chughtai, Z. S. *et al.* (2001). "Starvation promotes nuclear accumulation of the hsp70 Ssa4p in yeast cells". *Journal of Biological Chemistry*, 276: 20261-20266.
- Costanzo, M. *et al.* (2010). "The genetic landscape of a cell". *Science*, 327(5964): 425-431.
- Craig, E. *et al.* (1995). "Complex multigene family of functionally distinct Hsp70s of yeast". *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 60: 441-449.
- Craig, E. A. y Gross, C. A. (1991). "Is hsp70 the cellular thermometer". *Trends in Biochemical Sciences*, 16(4): 135-140.
- Dai, C. *et al.* (2007). "Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis". *Cell*, 130(6): 1005-1018.
- Daniels, C. J. *et al.* (1984). "Archaeobacterial heat shock proteins". *The EMBO Journal*, 3: 745-49,
- De Virgilio, C. *et al.* (1994). "The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant". *European Journal of Biochemistry*, 219(1-2): 179-186.
- De Wever, V. *et al.* (2005). "A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation". *The EMBO Journal*, 24(23): 4115-4123.
- Debec, A. y Marcaillou, C. (1997). "Structural alterations of the mitotic apparatus induced by the heat shock response in *Drosophila* cells". *Biology of the Cell*, 89(1): 7-78.
- Di Paolo, E. A. (2001). "Rhythmic and non-rhythmic attractors in asynchronous random Boolean networks". *BioSystems*, 59:185-95.

- Draghi, J. y Wagner, G. P. (2009). "The evolutionary dynamics of evolvability in gene network model". *Journal of Evolutionary Biology*, 22(3): 599-611.
- Dong, J. y Bai, X. (2011). "The membrane localization of Ras2p and the association between Cdc25p and Ras2-GTP are regulated by protein kinase A (PKA) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *FEBS Letters*, 585(8): 1127-1134.
- Duina, A. A. *et al.* (1998). "Requirement for Hsp90 and a Cyp – 40- type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response". *Journal of Biological Chemistry*, 273: 18974-18978.
- Eastmond, D. L. y Nelson, H. C. (2006). "Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response". *Journal Biological Chemistry*, 281(43): 32909-32921.
- Engelberg, D. *et al.* (1994). "The yeast and mammalian Ras pathways control transcription of heat shock genes independently of heat shock transcription factor". *Molecular and Cellular Biology*, 14(7): 4929-4937.
- Enoki, Y. y Sakurai, H. (2011). "Diversity in DNA recognition by heat shock transcription factors (HSFs) from model organisms". *FEBS Letters*, 585(9): 1293-1298.
- Estruch, F. (2000). "Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast". *FEMS Microbiology Review*, 24(4): 469-486.
- Estruch, F. y Carlson, M. (1993). "Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and the Cellular Biology*, 13(7): 3872-3881.
- Estruch, F. *et al.* (1992). "N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function". *Genetics*, 132(3): 639-650.
- Falkner, F. G. *et al.* (1981). "Two *Drosophila melanogaster* proteins related to intermediate filament proteins of vertebrate cells". *Journal of Cell Biology*, 91(1): 175-183.
- Ferguson, S. B. *et al.* (2005). "Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics*, 169(3): 1203-1214.
- Field, J. *et al.* (1987). "Guanine nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and Cellular Biology*, 7: 2128-33.
- Folch-Mallol, J. L. *et al.* (2004). "New roles for *CDC25* in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology*, 150(Pt 9): 2865-2879.
- Fujita, A. *et al.* (1989). "Domains of the SFL1 protein of yeasts are homologous to Myc oncoproteins or yeast heat-shock transcription factor". *Genetic*, 85(2): 321-328.
- Gancedo, J. M. (1998). "Yeast carbon catabolite repression". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2): 334-61.
- Gancedo, J. M. (2008). "The early steps of glucose signalling in yeast". *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4): 673-704.
- Garmendia-Torres, C. *et al.* (2007). "Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation". *Current Biology*, 17: 1044-1049.
- Garreau, H. *et al.* (2000). "Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology*, 146 (Pt 9): 2113-2120.
- Gasch, A. P. (2007). "Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi". *Yeast*, 24(11): 961-976.

- Gasch, A. *et al.* (2000). “Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes”. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12): 4241-4257.
- Geymonat, M. *et al.* (1998). “Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Molecular Microbiology*, 30(4): 855-864.
- Ghaemmaghami, S. *et al.* (2003). “Global analysis of protein expression in yeast”. *Nature*, 425(6959): 737-741.
- Gietz, R. D. *et al.* (1995). “Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure”. *Yeast*, 11(4): 355-360.
- Goffeau, A. *et al.* (1996). “Life with 6000 genes”. *Science*, 274(5287): 546, 563-547.
- Goldstein, A. L. y McCusker, J. H. (1999). “Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Yeast*, 15(14): 1541-1553.
- Gorner, W. *et al.* (1998). “Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity”. *Genes & Development*, 12(4): 586-597.
- Gorner, W. *et al.* (2002). “Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor”. *The EMBO Journal*, 21(1-2): 135-144.
- Granek, J. A. y Magwene, P. M. (2010). “Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast”. *PloS Genetic*, 6(1): e1000823.
- Gray, M. *et al.* (2005). “Two-step method for constructing unmarked insertions, deletions and allele substitutions in the yeast genome”. *FEMS Microbiology Letters*, 248(1): 31-36.
- Griffioen, G. *et al.* (2000). “Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2): 1449-56.
- Guimaraes, A. J. *et al.* (2011). “Histoplasma capsulatum heat-shock 60 orchestrates the adaptation of the fungus to temperature stress”. *PloS One*, 6(2): e14660.
- Guldener, U. *et al.* (1996). “A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast”. *Nucleic Acids Research*, 24(13): 2519-2524.
- Guo, J. *et al.* (2008). “Genome-wide analysis of heat shock transcription factor families in rice and Arabidopsis”. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(2): 105-118.
- Guthrie, C. y Fink, G. (1991). “Guide to yeast genetics and molecular biology”. *Methods in Enzymology*, 194: 3-933.
- Hahn, J. S. *et al.* (2004_a). “Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor”. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12): 5249-5256.
- Hahn, J. S. y Thiele, D. J. (2004_b). “Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase”. *Journal Biological Chemistry*, 279(7): 5169-5176.
- Halladay, J. T. y Craig, E. A. (1995). “A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast HSP70 mutant”. *Molecular and Cellular Biology*, 15(9): 4890-4897.
- Harris, N. *et al.* (2001). “Increasing *Saccharomyces cerevisiae* stress resistance, through the overactivation of the heat shock response resulting from defects in the Hsp90 chaperone, does not extend replicative life span but can be associated with slower chronological ageing of nondividing cells”. *Molecular Genetic and Genomics*, 265: 258-263.
- Harshman, K. D. *et al.* (1988). “Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4”. *Cell*, 53(2): 321-330.

- Hartl, F. U. y Hayer-Hartl, M. (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein". *Science*, 295(5561): 1852-1858.
- Harvey, I. y Bossomaier, T. (1997). *Time out of joint: attractors in asynchronous random Boolean networks*. In *Proceedings of the Fourth European Conference on Artificial Life*. Edited by Husbands P., Harvey, I. Cambridge, MA. MIT Press: 67-75.
- Hashikawa, N. y Sakurai, H. (2004). "Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element". *Molecular and Cellular Biology*, 24(9): 3648-3659.
- Hedbacker, K. y Carlson, M. (2008). "SNF1/AMPK pathways in yeast". *Frontiers in Bioscience*, 13: 2408-2420.
- Hedbacker, K. *et al.* (2004). "Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase". *Molecular and Cellular Biology*, 24(5): 1836-1843.
- Herrero, E. *et al.* (2008). "Redox control and oxidative stress in yeast cells". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780(11): 1217-1235.
- Hirata, Y. *et al.* (2003). "Yeast glycogen synthase kinase-3 activates Msn2p-dependent transcription of stress responsive genes". *Molecular Biology of the Cell*, 14(1): 302-312.
- Hohmann, S. (2002_a). "Osmotic adaptation in yeast--control of the yeast osmolyte system". *International Review of Cytology*, 215: 149-187.
- Hohmann, S. (2002_b). "Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2): 300-372.
- Hohmann, S. y Mager, W. H. (eds.) (2003). *Yeast Stress Responses*. Berlín, Springer-Verlag [ISBN 978-3-642-07875-0]: 389 pp.
- Holland, S. L. *et al.* (2014). "Phenotypic heterogeneity is a selected trait in natural yeast populations subject to environmental stress". *Environmentla Microbioly*, 16: 1729-40.
- Holstege, F. C. *et al.* (1998). "Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome". *Cell*, 95(5): 717-728.
- Hottiger, T., *et al.* (1994). "The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro". *European Journal Biochemistry*, 219(1-2): 187-193.
- Hu, Y. *et al.* (2010). "The localization and concentration of the PDE2-encoded high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by cAMP-dependent protein kinase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Yeast Research*, 10(2): 177-187.
- Huh, W. K. *et al.* (2003). "Global analysis of protein localization in budding yeast". *Nature*, 425(6959): 686-691.
- Hunter, T. y Plowman, G. D. (1997). "The protein kinases of budding yeast: six score and more". *Trends in Biochemical Sciences*, 22(1): 18-22.
- Iida, H. (1988). "Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene". *Molecular and Cellular Biology*, 8(12): 5555-5560.
- Istrail, S. y Davidson, E. H. (2005). "Logic functions of the genomic cis-regulatory code". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14): 4954-4959.
- Jacquet, M. *et al.* (2003). "Oscillatpreory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Cell Biology*, 161(3): 497-505.

- Jakobsen, B. K. y Pelham, H. R. (1991). "A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor". *The EMBO Journal*, 10(2): 369-375.
- Jarosz, D. F. y Lindquist, S. (2010). "Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation". *Science*, 330(6012): 1820-1824.
- Jiang, R. y Carlson, M. (1996). "Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex". *Genes & Development*, 10(24): 3105-3115.
- Johnson, K. E. *et al.* (1987). "Expression in Escherichia coli of BCY1, the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization". *Journal of Biological Chemistry*, 262(18): 8636-8642.
- Johnston, G. C. y Singer, R. A. (1980). "Ribosomal precursor RNA metabolism and cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and General Genetics*, 178(2): 357-360.
- Jorgensen, P. *et al.* (2002). "Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast". *Science*, 297(5580): 395-400.
- Kaida, D. *et al.* (2002). "Yeast Whi2 and Psr1-phosphatase form a complex and regulate STRE-mediated gene expression". *Genes to Cells*, 7(6): 543-52.
- Kannan, N. *et al.* (2007). "Structural and functional diversity of the microbial kinome". *PLoS Biology*, 5(3): e17.
- Kataoka, T. *et al.* (1985). "DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase". *Cell*, 43 (2 Pt 1): 493-505.
- Katiyar-Agarwal, S. *et al.* (2003). "Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101". *Plant Molecular Biology*, 51(5):677-86.
- Kennelly, P. J. y Krebs, E. G. (1991). "Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases". *Journal of Biological Chemistry*, 266(24): 15555-15558.
- Kim, J. *et al.* (2014). "Robustness and Evolvability of the Human Signaling Network". *PLoS Computational Biology*, 10(7).
- Komili, S. y Silver, P. A. (2008). "Coupling and coordination in gene expression processes: a systems biology view". *Nature Review Genetics*, 9(1): 38-48.
- Kuhn, K. M. *et al.* (2001). "Global and specific translational regulation in the genomic response of *Saccharomyces cerevisiae* to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source". *Molecular and Cellular Biology*, 21(3): 916-927.
- Kunitomo, H. *et al.* (2000). "A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11(+)* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development". *Molecular of the Biology Cell*, 11(9): 3205-3217.
- Lafer, E. M. (2002). "Clathrin-protein interactions". *Traffic*, 3(8): 513-520.
- Lallet, S. *et al.* (2006). "Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular Microbiology*, 62(2): 438-452.
- Lallet, S. y Garreau, H. *et al.* (2004). "Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus". *Molecular Genetic and Genomics*, 272(3): 353-362.
- Lee, P. *et al.* (2008). "Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4". *Molecular Microbiology*, 70(4): 882-895.
- Lee, P. *et al.* (2011). "Regulation of yeast Yak1 kinase by PKA and autophosphorylation-dependent 14-3-3 binding". *Molecular Microbiology*, 79(3): 633-646.

- Levin, D. E. (2005). "Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2): 262-291.
- Li, F. *et al.* (2004). "The yeast cell-cycle network is robustly designed". *Proc Natl Acad Sci*, 101: 4781-6.
- Li, S. *et al.* (2002). "The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p". *Molecular Biology of the Cell*, 13(2): 412-424.
- Lidstrom, M. E. y Konopka, M. C. (2010). "The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior". *Nature Chemical Biology*, 6:705-12.
- Lillie, S. H. y Pringle, J. R. (1980). "Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation". *Journal Bacteriology*, 143(3): 1384-1394.
- Lin, L. H. *et al.* (2007). "A systematic approach to detecting transcription factors in response to environmental stresses". *BMC Bioinformatics*, 8: 473.
- Lin, Y. X. *et al.* (2011). "Genome-wide identification, classification and analysis of heat shock transcription factor family in maize". *BMC Genomics*, 12: 76.
- Lindquist, S. y Craig, E. A. (1988). "The heat-shock proteins". *Annual Review of Genetic*, 22: 631-677.
- Liou, S. T. *et al.* (2007). "SGT2 and MDY2 interact with molecular chaperone YDJ1 in *Saccharomyces cerevisiae*". *Cell Stress & Chaperones*, 12(1): 59-70.
- Liti, G. *et al.* (2009). "Population genomics of domestic and wild yeasts". *Nature*, 458(7236): 337-341.
- Longtine, M. S. *et al.* (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast*, 14(10): 953-961.
- Lorenz, M. C. y Heitman, J. (1998). "Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains". *Genetics*, 150(4): 1443-1457.
- Ma, P. *et al.* (1999). "The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling". *Molecular Biology of the Cell*, 10(1): 91-104.
- Mager, W. H. y Ferreira, P. M. (1993). "Stress response of yeast". *Biochemical Journal*, 290 (Pt 1): 1-13.
- Mbonyi, K. *et al.* (1990). "Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase". *Molecular and Cellular Biology*, 10(9): 4518-23.
- Marchler, G. *et al.* (1993). "A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions". *The EMBO Journal*, 12(5): 1997-2003.
- Martinez-Pastor, M. T. *et al.* (1996). "The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE)". *The EMBO Journal*, 15(9): 2227-2235.
- Mazon, M. J. *et al.* (1993). "Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene". *European Journal of Biochemistry*, 213(1): 501-506.
- McCartney, R. R. *et al.* (2005). "Snf1 kinase complexes with different beta subunits display stress-dependent preferences for the three Snf1-activating kinases". *Current Genetics*, 47(6): 335-344.
- McCartney, R. R. y Schmidt, M. C. (2001). "Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit". *Journal of Biological Chemistry*, 276(39): 36460-36466.

- Mishra, S. K. *et al.* (2002). "In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato". *Genes & Development*, 16(12): 1555-1567.
- Morange, M. (2006). "HSFs in development. Molecular Chaperones in Health and Disease". *Part of the Handbook of Experimental Pharmacology book series (HEP)*, (172): 153-169.
- Morgan, B. A. *et al.* (1995). "A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins". *The EMBO Journal*, 14(22): 5679-5689.
- Mulford, K. E y Fassler, J. S. (2011). "Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response". *Eukaryotic Cell*, 10(6): 761-9.
- Nadeau, K. *et al.* (1993). "Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases". *Journal of Biological Chemistry*, 268: 1479-87.
- Nicholls, S. *et al.* (2004). "Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*". *Eukaryotic Cell*, 3(5): 1111-1123.
- Nieto-Sotelo, J. *et al.* (1990). "The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions". *Cell*, 62(4): 807-817.
- Nikawa, J. (1987). "Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genes & Development*, 1(10): 1351.
- Pan X, Heitman J. (2002). "Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation". *Mol Cell Biol*, 22: 3981-93.
- Park, J. I. *et al.* (2005). "The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(1): 311-319.
- Parsell, D. A. y Lindquist, S. (1993). "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins". *Annual Review of Genetics*, 27: 437-496.
- Patriarca, E. J. y Maresca, B. (1990). "Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*". *Experimental Cell Research*, 190(1): 57-64.
- Peeters, T. *et al.* (2006). "Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast". *PNAS*, 103(35): 13034-13039.
- Pérez-Landero, S. y Nieto-Sotelo, J. (2007). *El Papel de Hsf1 y Skn7 en la Regulación de la Respuesta a Estrés en Saccharomyces cerevisiae a través de la vía Ras-AMPC-PKA*. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Cuernavaca, Morelos, México, UNAM. 87 páginas.
- Pérez-Landero, S. y Nieto-Sotelo, J. (2013). "La ruta de señalización de la Cinasa de proteínas tipo A dependiente del AMPC en *Saccharomyces cerevisiae*". *Revista educación en bioquímica*, 32(3): 97-105 [ISSN 1665-1995].
- Pérez-Landero, S. *et al.* (2015). "Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational evidences". *BMC Systems Biology*, 9: 42.
- Peterbauer, C. K. *et al.* (2002). "The *Trichoderma atroviride* seb1 (stress response element binding) gene encodes an AGGGG-binding protein which is involved in the response to high osmolarity stress". *Molecular Genetics and Genomics*, 268(2): 223-231.
- Philips, P. C. (2008). "Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems". *Nature Review Genetics*, 9(11): 855-67.

- Pigliucci, M. (2007). "Do we need an extended evolutionary synthesis?" *Evolution*, 61-12: 2743-2749.
- Poplinski, A. *et al.* (2007). "Ste50 adaptor protein influences Ras/cAMP-driven stress-response and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*". *Current Genetics*, 51(4): 257-268.
- Ptacek, J. *et al.* (2005). "Global analysis of protein phosphorylation in yeast". *Nature*, 438(7068): 679-684.
- Quan, X. *et al.* (2004). "Regulated nuclear accumulation of the yeast hsp70 Ssa4p in ethanol- stressed cells is mediated by the N-terminal domain, requires the nuclear carrier Nmd5p and protein kinase C". *The FASEB Journal*, 18: 899-901.
- Raitt, D. C. *et al.* (2000). "The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress". *Molecular Biology of the Cell*, 11(7): 2335-2347.
- Robertson, L. S. *et al.* (2000). "The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function". *PNAS*, 97(11): 5984-5988.
- Robertson, L. S. y Fink, G. R. (1998). "The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth". *PNAS*, 95(23): 13783-13787.
- Roetzer, A. *et al.* (2008). "*Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors". *Molecular Microbiology*, 69(3): 603-620.
- Rohde, J. R. *et al.* (2004). "TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors". *Molecular and Cellular Biology*, 24(19): 8332-8341.
- Ronne, H. (1995). "Glucose repression in fungi". *Trends in Genetics*, 11(1): 12-17.
- Rubenstein, E. M. *et al.* (2008). "Access denied: Snf1 activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PPI phosphatase". *Journal of Biological Chemistry*, 283(1): 222-230.
- Rubenstein, E. M. y Schmidt, M. C. (2007). "Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic Cell*, 6(4): 571-83.
- Rubio-Teixeira, M. *et al.* (2010). "*Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling". *FEMS Yeast Research*, 10(2): 134-149.
- Rutherford, S. L. (2003). "Between genotype and phenotype: protein chaperones and evolvability". *Nature Review Genetic*, 4(4): 263-274.
- Sadeh A. *et al.* (2011). "Fine-tuning of the Msn2/4-mediated yeast stress responses as revealed by systematic deletion of Msn2/4 partners". *Molecular Biology of the Cell*, 22: 3127-3138.
- Saibil, H. R. (2008). "Chaperone machines in action". *Current Opinion Structural Biology*, 18(1): 35-42.
- Sakurai, H. y Ota, A. (2011). "Regulation of chaperone gene expression by heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*: importance in normal cell growth, stress resistance, and longevity". *FEBS Letter*, 585(17): 2744-8.
- Santangelo, G. M. (2006). "Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1): 253-282.
- Sarge, K. D. *et al.* (1991). "Cloning and characterization of two mouse heat shock factors with distinct inducible and constitutive DNA-binding ability". *Genes & Development*, 5(10): 1902-1911.
- Satyal, S. H. *et al.* (2000). "Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*". *PNAS*, 97(11): 5750-5755.
- Schmidt, A. *et al.* (1998). "The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease". *The EMBO Journal*, 17(23): 6924-6931.

- Schmitt, A. P. y McEntee, K. (1996). "Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*". *PNAS*, (12): 5777-5782.
- Shaner, L. *et al.* (2008). "The Hsp110 protein chaperone Sse1 is required for yeast cell wall integrity and morphogenesis". *Current Genetic*, 54(1): 1-11.
- Sikorski, R. S. y Hieter, P. (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics*, 122(1): 19-27.
- Singh, H. *et al.* (2006). "A functional module of yeast mediator that governs the dynamic range of heat-shock gene expression". *Genetics*, 172(4): 2169-2184.
- Smets, B. *et al.* (2010). "Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*". *Current Genetics*, 56(1): 1-32.
- Sorger, P. K. (1990). "Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators". *Cell*, 62(4): 793-805.
- Sorger, P. K. (1991). "Heat shock factor and the heat shock response". *Cell*, 65(3): 363-366.
- Sorger, P. K. y Nelson, H. C. (1989). "Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif". *Cell*, 59(5): 807-813.
- Sorger, P. K. y Pelham, H. R. (1987). "Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast". *The EMBO Journal*, 6(10): 3035-3041.
- Stone, D. E. y Craig, E. A. (1990). "Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and Cellular Biology*, 10(4): 1622-1632.
- Storici, F. *et al.* (2001). "In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides". *Nature Biotechnology*, 19(8): 773-776.
- Sutherland, C. M. *et al.* (2003). "Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex". *Current Biology*, 13(15): 1299-1305.
- Tamaki, H. (2007). "Glucose-stimulated cAMP-protein kinase a pathway in yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4): 245-250.
- Tapia, H., y Morano, K. A. (2010). "Hsp90 nuclear accumulation in quiescence is linked to chaperone function and spore development in yeast". *Molecular Biology of the Cell*, 21: 63-72.
- Tatchell, K. (1986). "RAS genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal Bacteriology*, 166(2): 364-367.
- Thevelein, J. M. y de Winde, J. H. (1999). "Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Moleculllar Microbiology*, 33(5): 904-18.
- Thevelein, J. M. *et al.* (2000). "Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance, and growth in yeast". *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10): 819-825.
- Toda, T. *et al.* (1987_a). "Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and Cellular Biology*, 7(4): 1371-1377.
- Toda, T. *et al.* (1987_b). "Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase". *Cell*, 50(2): 277-287.
- Tudisca, V. *et al.* (2010). "Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions". *European Journal of Cell Biology*, 89(4): 339-348.

- Tudisca, V. *et al.* (2012). "PKA isoforms coordinate mRNA fate during nutrient starvation". *Journal of Cell Science*, 125(21): 5221-32.
- Vacher, C. *et al.* (2005). "Overexpression of yeast hsp104 reduces polyglutamine aggregation and prolongs survival of a transgenic mouse model of Huntington's disease". *Human Molecular Genetics*, 14(22): 3425-3433.
- Ventura-García, L. E. y Nieto-Sotelo, J. (2004). *La actividad de los genes de respuesta a estrés en las mutantes hsr de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades. Cuernavaca, Morelos, UNAM. 69 páginas.
- Vincent, O. *et al.* (2001). "Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism". *Genes & Development*, 15(9): 1104-1114.
- Von Koskull-Doring, P. *et al.* (2007). "The diversity of plant heat stress transcription factors". *Trends in Plant Science*, 12(10): 452-457.
- Wang, L. *et al.* (2004). "Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology*, 150(10): 3383-3391.
- Werner-Washburne, M. *et al.* (1996). "Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular Microbiology*, 19(6): 1159-1166.
- Werner-Washburne, M. *et al.* (1991). "Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell". *The Journal of Biological Chemistry*, 266(29): 19704-19709.
- Wiatrowski, H. A. y Carlson, M. (2003). "Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic Cell*, 2(1): 19-26.
- Wiederrecht, G. *et al.* (1987). "The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties". *Cell*, 48(3): 507-515.
- Williamson T, *et al.* (2009). "Deterministic mathematical models of the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*". *BMC Systems Biology*, 3: 70.
- Williams, K. E. y Cyert, M. S. (2001). "The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p". *The EMBO Journal*, 20(13): 3473-3483.
- Wilson, W. A. *et al.* (1996). "Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio". *Current Biology*, 6(11): 1426-1434.
- Winzeler, E. A. *et al.* (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis". *Science*, 285(5429): 901-906.
- Wolfe, K. H. y Shields, D. C. (1997). "Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome". *Nature*, 387(6634): 708-713.
- Wu, C. (1995). "Heat shock transcription factors: structure and regulation". *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11: 441-469.
- Wu, W. S. y Li, W. H. (2008). "Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast". *BMC Genomics*, 9: 439.
- Yamamoto, N. *et al.* (2008). "Regulation of thermotolerance by stress – induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic Cell*, 7(5):783-90.
- Yang, X. *et al.* (1994). "A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex". *The EMBO Journal*, 13(24): 5878-5886.

- Yost, H. J. y Lindquist, S. (1991). "Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*". *Molecular and Cellular Biology*, 11(2): 1062-1068.
- Zaman, S. *et al.* (2008). "How *Saccharomyces* responds to nutrients". *Annual Review of Genetics*, 42: 27-81.
- Zhang, X. y Qian, S. B. (2011). "Chaperone-Mediated Hierarchical Control in Targeting Misfolded Proteins to Aggresome". *Molecular Biology Cell*, 22(18): 3277-88
- Zhang, G. *et al.* (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*. 90 (49–54).
- Zhu, C. *et al.* (2009). High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Research*. 19(4): 556-566.
- Zoller, M. J. *et al.* (1988). "Purification and characterization of C1, the catalytic subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase encoded by TPK1". *Journal of Biological Chemistry*, 263(19): 9142-8.
- Zou, J. *et al.* (1998). "Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1". *Cell*, 94:471-80.

Tabla S1 – Cepas utilizadas en este estudio.

Nombre	Genotipo
W303-6B	<i>MAT</i> α <i>can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1</i>
W303-1 ^a	<i>MAT</i> <i>a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1</i>
CM0095	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 bcy1Δ::kanMX6</i>
JF099	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11 , 15 leu2-3 , 12 ura3-1 cdc25-21</i>
JF3000	<i>MATa/MATa can1-100/can1-100 ade2-1/ade2-1 his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/LEU2 trp1-1/TRP1 ura3-1/ura3-1 CD25/cdc25Δ::loxP-kanMX4-loxP</i>
JF3100	<i>MATa/MATa can1-100/can1-100 ade2-1/ade2-1his3-11,15/his3-11,15 leu2-,112/LEU2 trp1-1/TRP1ura3-1/ura3-1 CD25/cdc25Δ::loxP</i>
JF410	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11 , 15 leu2-3 , 12 ura3-1 cdc25-22</i>
KG604	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1his3-11,15 tpk2Δ::loxP</i>
KG712	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1his3-11,15 tpk1Δ::kanMX6</i>
KS570	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk3Δ:: loxP-kanMX4-loxP</i>
KS580	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk3Δ::loxP</i>
KS585	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP-kanMX4-loxP</i>
KS590	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP</i>
CM032	<i>MAT</i> α / <i>MAT a can1-100/can1-100 ade2-1/ade2-1 his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,12/ leu2-3,12 trp1-1/ trp1-1 ura3-1/ura3-1 SDC25/sdc25Δ::KanMX6 CDC25/ cdc25Δ::loxP</i>
CM033	<i>MAT</i> α <i>can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 sdc25Δ::KanMX6</i>
Wras2	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ras2Δ:: kanMX6</i>
KG712-N	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk1Δ:: kanmx6::NAT3</i>
W Δ ras2	<i>MATa leu2 arg1 ura3 trp1 HSE-LEU2-lacZ Δras2:: kanMX6</i>

Nombre	Genotipo
KS590-URA3-TPK2	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1his3-11,15 tpk2Δ::TPK2 tpk3Δ::loxP</i>
KS700	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk1Δ::kanmx6::NAT3 tpk3Δ::loxP</i>
KS710	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 Δtpk1::kanMX6 Δtpk2::loxP</i>
S001	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1his3-11,15 Δssa1::kanMX6</i>
S002	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1his3-11,15 tpk2Δ::loxP Δssa1::kanMX6</i>
LM020	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 hsf1-ΔCTA::kanMX6</i>
SE1000	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 skn7Δ::kanMX6</i>
JF3005	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 cdc25Δ::loxP-kanMX4-loxP</i>
SL5001	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 cdc25Δ::loxP-kanMX4-loxP</i>
SE1000	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 skn7Δ::KanMX6</i>
LM020	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 Hsf1ΔCTA₁₋₅₈₇::KanMX6</i>
SL6001	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δcdc25::loxP-loxP Hsf1ΔCTA₁₋₅₈₇::KanMX6</i>
SL4001	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 skn7Δ::KanMX6 cdc25Δ::loxP-kanMX4-loxP</i>
YMR60	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk1::URA3</i>
YMR62	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk2::HIS3</i>
YMR64	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk3::TRP1</i>
YMR68	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk2::HIS3, tpk3::TRP1</i>
YMR70	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk1::URA3 tpk2::HIS3</i>
YMR71	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk1::URA3 tpk3::TRP1</i>

YMR60a	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk1::ura3::ADE2</i>
--------	--

Nombre	Genotipo
YMR70a	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk1::ura3::ADE2 tpk2x::HIS3</i>
YMR71a	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 tpk1::ura3::ADE2 tpk3::TRP1</i>
LRA89	<i>MATa his4 leu2 ura3-52</i>
LRA25	<i>MATa his4 leu2 ura3-52 cdc25-1</i>
KT1112	<i>MATa leu2 his3 ura3-52</i>
KT2249	<i>MATa leu2 his3 ura3-52 Δras2:: kanMX6</i>
KT Δ bcy1	<i>MATa leu2 his3 ura3-52 Δbcy1:: kanMX6</i>
KT1567	<i>MATa leu2 his3 ura3-52 trp1 bcy1-16</i>
HE61-6C	<i>MATa his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 gal</i>
HE61-4B	<i>MATa his3-Δ1 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 gal hsr1</i>
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
Y02978	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ras2Δ:: kanMX4</i>
YJL164C	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tpk1Δ:: kanMX4</i>
YPL203W	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tpk2Δ:: kanMX4</i>
YKL166C	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tpk3Δ:: kanMX4</i>
BY Δ bcy1	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bcy1Δ:: kanM4</i>
SL2000	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP bcy1::loxP</i>
SL2001	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP tpk3Δ::loxP bcy1Δ::KanMX4</i>
AW3	<i>MATa leu2 arg1 ura3 trp1 HSE-LEU2-lacZ</i>
AW3-ras2	<i>MATa leu2 arg1 ura3 trp1 HSE-LEU2-lacZ ras2Δ:: kanMX6</i>

Nombre	Genotipo
SL708	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP ssa1Δ::kanMX6 ssa2Δ::kanmx6::NAT3</i>
SL625	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ssa1Δ::HIS3 ssa2Δ::kanMX6</i>
SL623-N	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP ssa2Δ:: kanmx6::NAT3</i>
SL623	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 tpk2Δ::loxP ssa2Δ::kanMX6</i>
SL622-N	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ssa2Δ:: kanmx6::NAT3</i>
SL622	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ssa2Δ::kanMX6</i>

Tabla S2. Secuencia de oligos utilizados en esta investigación.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Ontología Genética
SPL05	GATGGTCGGAAGAGGCATAA	<i>KANMX</i>
FORSPL05	TTATGCCTCTTCCGACCATC	<i>KANMX</i>
CONFTPK1	GGCTTGCTTGCATTTTCAATC	<i>TPK1</i>
CONRTPK1	TAACGACCTCGGGTGCTATG	<i>TPK1</i>
FDTPK1	TTCAATCGGCTTCAAAGGTAGCACAGAAAGTAGTGTTCTCGGATCCCCGGGTAAATTA	<i>TPK1</i>
RDTPK1	GAAAAGATCAGCATATGGGTCTTCACCTTGAACACCGTAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	<i>TPK1</i>
TPK2-Ucl	CAGCCGCCTCAAGATAAACCAG	<i>TPK2</i>
TPK2-LcL	CGAAGCGTTGCTTCATTTCAAC	<i>TPK2</i>
TPK2-L2	AGGGCAACGCTTGTTCTTCTCA	<i>TPK2</i>
CFDTPK2	CAATCACGAGACGATAACGACG	<i>TPK2</i>
CRDTPK2	ATCAGGAGTCCCACAAAGCG	<i>TPK2</i>
FTP3i	TAACGATAAAAGCATTCACTGCCC	<i>TPK3</i>
RTP3i	ACTCTGGCACCCATATGTCCATTG	<i>TPK3</i>
TPK3-P1	GCCAAGACAGAAACAACCTCC	<i>TPK3</i>
Fcssa1	CTGATCGTTTCGAGGACTTC	<i>SSA1</i>
Rcssa1	TTCATGTCAGCCTGCACTTC	<i>SSA1</i>
FDRas2	GCCGTTGTCTTCTTATCG	<i>RAS2</i>
RDRas2	GGTGGAACACCTCTTTCTTG	<i>RAS2</i>

072

TTAGCTTAGAAACACAGTTGTCAAGATGAAACAGGTTGAACATACCAATGACGAACGACGTATGCTAAAGC
TTGTGGAGCATCCGTTTCTGATTAGAATGTGGGGTACGTTTCAAGATGCTAGGAATATCTTTATGGTGATGG
ATTATATCGAAGGTGGTGAACCTTTCTCGTTACTGAGAAAGTCACAAAGATTTCTAATCCTGTAGCAAAT
TTTACGCTGCGGAAGTCATACTGGCATTAGAGTACTTGCATGCTCATAATATCATCTACAGGGATTTAAAGC
CAGAAAATATCTTGCTGGATAGAAATGGCCACATTAATAACCGATTTTGGGTTCCCAAAGAGGTACAA
ACTGTCACATGGACGCTTTGTGGGACTCCTGATTACATTGCTCCTGAAGTTATTACCACAAAGCCATATAATA
AGTCGGTGGATTGGTGGTCTCTAGGTGTTCTAATCTACGAAATGTTAGCTGGTTATACACCCTTTTACGATA
CTACTCCAATGAAGACGTATGAAAAGATTTTACAAGGTAAAGTAGTATATCCACCATATTTTCATCCCGACG
TCGTGGATCTACTAAGCAAAGTACTGACTGCAGATTTGACAAGAAGAATCGGTAATTTACAAAGCGGTTCCA
GGGACATCAAAGCTCACCCATGGTTTAGTGAAGTTGTATGGGAAAGATTGTTAGCAAAGGATATTGAAACT
CCATACGAGCCTCCTATCACATCAGGTATCGGTGACACGTCTTTATTTCGATCAATATCCCGAGGAGCAGCTA
GATTATGGTATTCAAGGCGATGATCCATATGCTGAATACTTTCAAGATTTCTAAGTCCATGAACCAAAAAA
CACAAAAACAATTTTCAAGTACTTTCTCTACTCCTTTCTTTCTTTTTCTCCACCAAAAATCTGGCGCAC
TTTCTTTATATTTTACCTAACGGATGCCTTATTTTGTGGTCTGTTTTAAGCTAGTCATATTGTCAGAGATAGAG
TGTC

076

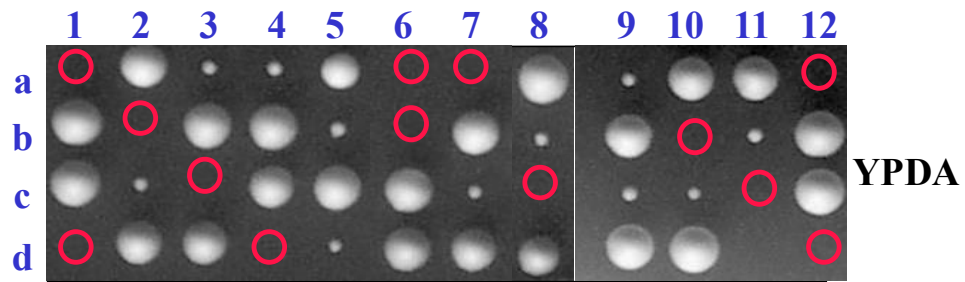
TTGTCTAATGAACTCGCTCCGACAGACCACAAATAAGGCATCCGTTAGGTAAAATATAAAGAAAGTGCGCC
AGATTTTGGTGGAGGAAAAAGAGAAAGGAAAAGGAGTGAGAGAAAGTACTTGAAAATCGTTTTTGTGTT
TTTTGGTTCACGGAAGTTAGAAATCTCGAAAGTATTCAGCATAACGGATCATCGCCTTGAATACCATAATCTA
GCTGCTCCTCGGGATATCGATCGAATAAAGACGTGTCACCGATACCTGATGTGATAGGAGGCTCGTATGGA
GTTTCAATATCCTTTGCTAACAATCTTTCCATACAACCTTCACTAAACCATGGGTGAGCTTTGATGTCCCTGG
AACCGCTTTGTAAATTACCGATTCTTCTGTCAAATCTGCAGTGATCAGTTTGCTTAGTAGATCCACGACGTC
GGGATGAAAATATGGTGGATATACTACTTTACCTTGTAATACTTTTCATACGTCTTCATTGGAGTAGTATCG
TAAAAGGGTGTATAACAGCTAACATTTTCGTAGATTAGAACACCTAGAGACCACCAATCCACCGACTTATTA
TATGGCTTTGTGGTAATAACTTCAGGAGCAATGTAATCAGGAGTCCCACAAAGCGTCCATGTGACAGTTTGT
ACCTCTTTGGCGAACCAAAAATCGGTTATTTAATGTGGCCATTTCTATCCAGCAAGATATTTTCTGGCTTTA
AATCCCTGTAGATGATATTATGAGCATGCAAGTACTCTAATGCCAGTATGACTTCCGCAGCGTAAAATTTTG
CTACAGGATTAGGAAATCTTTGTGACTTTCTCAGTAACGAGAAAAGTTCACCACCTTCGATATAATCCATCAC
CATAAAGATATTCCTAGCATTTTGAACGTACCCCCCATCTAATCAGAAAACGGATGCCCTCACAAAGCTT
TAGCATACCGTCGTTCCGTCATTGGTATGTTTCAACCCTGGTTTCATCTTGACAACCTGTTGTTTCTTAAACT
TTTAGAAACGCTGAGAATACCCGCCAGAACCA

Apéndice 2. Análisis de la secuencia de complementación *TPK2*

>Consensus

```
ACGAACGACGTATGCTAAAGCTTGTGGAGCATCCGTTTCTGATTAGAATGTGGGGTACGTTTCAAGATGCT
AGGAATATCTTTATGGTGATGGATTATATCGAAGGTGGTGAACTTTTCTCGTTACTGAGAAAGTCACAAAGA
TTTCCTAATCCTGTAGCAAATTTTACGCTGCGGAAGTCATACTGGCATTAGAGTACTTGCATGCTCATAATA
TCATCTACAGGGATTTAAAGCCAGAAAATATCTTGCTGGATAGAAATGGCCACATTAATAACCGATTTTG
GGTTCGCCAAAGAGGTACAAACTGTCACATGGACGCTTTGTGGGACTCCTGATTACATTGCTCCTGAAGTTA
TTACCACAAAGCCATATAATAAGTCGGTGGATTGGTGGTCTCTAGGTGTTCTAATCTACGAAATGTTAGCTG
GTTATACACCCTTTTACGATACTACTCCAATGAAGACGTATGAAAAGATTTTACAAGGTAAAGTAGTATATC
CACCATATTTTCATCCCGACGTCGTGGATCTACTAAGCAAAGTACTGATCACTGCAGATTTGACAAGAAGAATCG
GTAATTTACAAAGCGGTTCCAGGGACATCAAAGCTCACCCATGGTTTAGTGAAGTTGTATGGGAAAGATTG
TTAGCAAAGGATATTGAAACTCCATACGAGCCTCCTATCACATCAGGTATCGGTGACACGTCTTTATTGAT
CGATATCCCGAGGAGCAGCTAGATTATGGTATTCAAGGCGATGATCCGTATGCTGAATACTTTGAGATTTTC
TAAGTTCCGTGAACCAAAAAACAAAAACGATTTTCAAGTACTTTCTCTCACTCCTTTTCTTTCTTTTTTC
CTCCACCAAATCTGGCGCACTTTCTTTATATTT
```


Apéndice 3. Interacciones epistáticas entre los GEF's Sdc25 y Cdc25.



a	X	S	R	R	R	X	X	R	R	S	S	X	YPDA + G418
b	S	X	S	S	R	X	R	R	R	X	R	S	
c	S	R	X	R	R	S	R	X	R	R	X	S	
d	X	R	R	X	R	S	S	R	R	R		X	

Disección de tétradas de una cepa diploide *CDC25/cdc25Δ::kanMX*
CDC25/sdc25Δ::kanMX ; las esporas *cdc25Δsdc25Δ* no germinan.

Supplementary Information:

Section 1. Synchronous and Asynchronous Updating Schemes.

Apart from the synchronous updating scheme, we have implemented two other updating approaches: 1) A deterministic asynchronous (DA) update and 2) a random asynchronous (RA) update.

In the DA scheme, we randomly choose one permutation $\{l_1, l_2, l_3, \dots, l_N\}$ of the numbers $\{1, 2, 3, \dots, N\}$ (where N is the number of nodes). Then we update one node at each time step in the order given by that permutation. For instance, if the permutation is $\{4, 2, 3, 1\}$ for a network with 4 nodes, then we update the network elements in the order $\sigma_4, \sigma_2, \sigma_3, \sigma_1$ (one at a time). We continue repeating the updating of the network elements using always the same permutation. This is why in this case the updating scheme, although asynchronous, is deterministic (we always know which node is going to be updated next).

For the RA updating, at each time step we randomly choose one network element and update its state.

In both schemes, we take the time step Δt as $\Delta t = 1/N$, so that in one unit of time N nodes are updated. To obtain a single value from the simulation on both updating schemes, we implemented two different approaches. For the DA we use the WDM formalism and for both the DA and the RA we apply an initial condition averaging (ICA). This means that we run the simulation during a time T that is long enough for the system to reach the attractor at the synchronous updating scheme. We then average over many initial conditions the state reached by the system at that time T . We also implemented the ICA approach for the synchronous model.

Figure S3 in the Supplementary Information shows that essentially the same results are obtained with all the updating and averaging schemes: Synchronous WDM, Synchronous ICA, DA with WDM, DA with ICA, and random asynchronous with ICA.

The fact that these updating schemes produce essentially the same results is very interesting, since it indicates that the WDM really captures the population average in batch cultures regardless of the specific updating scheme. To our knowledge, this is the first model with this property.

Section 2. Basins of attraction.

Here, we present a visual representation of the basins of attraction for the WT network. To calculate these basins, one has to follow the trajectory of all the possible initial conditions until an attractor is reached. Due to the huge number of possible initial conditions for our multiple state network (around 4×10^9 conditions), we reduced the size of our network by eliminating the linear regulations of Cdc25 \rightarrow Ras2, Ras2 \rightarrow cAMP, Hsf1 \rightarrow *HSE-lacZ* as illustrated in Figure S5. The elimination of these intermediate regulations, which only introduce temporal delays in the response of the target nodes, produced a much smaller set of possible states (1.9×10^7 conditions), which made a full exploration of the state space tractable. The attractors and their corresponding basins of attraction for this reduced network are presented in Figure S6. Note that the reduced networks were used only to generate the visual display presented in Fig. S6. However, we include a text file (Text S1) containing the complete set of attractors for the full WT network and the mutants *bcy* Δ , *ssa1* Δ *ssa2* Δ , and *tpk1* Δ *tpk3* Δ . We chose these mutants because they exhibited attractors with high and low *HSE-lacZ* expression.

Section 3. Assumptions and logical functions for the Windowed Discrete Model.

Because the exact strengths of the interactions occurring within the PKA-RN are not completely known, we made the following assumptions to construct the Logic Tables presented in Section 4.

Node	Assumption
Cdc25	Cdc25 is regulated positively by Ssa1 and Ssa2 chaperones (Hsp70), which stabilize the Cdc25 protein [1]. In response to a heat shock, the Cdc25-Hsp70 complex dissociates causing a strong reduction in both Cdc25 levels and PKA pathway activity [1]. In our model [2, 3, 4], we considered Ssa2 as the main regulator of Cdc25, whereas Ssa1 only contributed mildly to its activation, as this fitted better our experimental data [5].
Ras2	Ras2 is regulated by Cdc25 [6, 7]. In turn, Ras2 positively regulates adenylate cyclase [8].
Cyr1	Adenylate cyclase is positively and linearly regulated by Ras1 and Ras2 [8, 9]. In our model, its role can be substituted by a direct regulation from Ras1 and Ras2 to cAMP [2, 3, 4].
cAMP	cAMP is the product of adenylate cyclase activity [10, 11]. In our model cAMP is positively, linearly, and directly regulated by Ras1 and Ras2 [2, 3, 4].
Bcy1	Bcy1 is the negative regulatory subunit of the CS (Tpk1, Tpk2, and Tk3) [10, 12, 13]. In our model, Bcy1 is negatively and linearly regulated by cAMP [2, 3, 4].
Tpk1, Tpk3	Tpk1 and Tpk2 are two out of three CS of PKA [13]. Tpk1 and Tpk2 are inhibited by Bcy1 [10, 12, 13]. In our model, Tpk1 and Tpk3 have four functional states and become totally inhibited at high levels of Bcy1 [3, 4].
Tpk1*, Tpk3*	Active states of Tpk1 and Tpk3 that, according to our experimental data, come up in the absence of Tpk2 [5, 14, 15]. According to our model [3, 4], levels of Tpk2 ≥ 2 (it has 6 possible states) suffice to suppress their functionality. The active states of Tpk1 and Tpk3 (Tpk1* and Tpk3*) are included to emphasize that Tpk2 is able to inhibit their activity over Ssa1 and Ssa2, but not necessarily over other possible substrates [3, 4].
Tpk2	Tpk2 is one out of three CS of PKA [13]. Tpk2 is also inhibited by Bcy1 [10, 12, 13]. In our model [3, 4], Tpk2 has 6 functional states (levels 0-5), as it is not completely repressed by Bcy1 as Tpk1/Tpk3. (Activity: 0 = no activity, 1 = minimum, 2 = low, 3 = medium, 4 = high, 5 = maximum activity). At high levels of Bcy1 (≥ 4) Tpk2 still has some activity (level = 1-2). The maximum level of activation of Tpk2 (level 5) corresponds to the maximum level of activation of Tpk1/Tpk3 (level 3) [3, 4].
RepX	RepX is the putative repressor of Hsf1 that, according to our data [15], becomes active when Tpk2 is absent or at minimum levels. RepX has 3 functional states (0-2) and levels of Tpk2 ≥ 1 are enough to suppress its activity completely [3, 4]. RepX maintains Hsf1/Skn7 activity close to that of a WT cell when acting as the sole repressor of Hsf1/Skn7 in the absence of Tpk2 (i.e., in cells <i>tpk2Δ ssa1Δ ssa2Δ</i>). In the absence of Tpk2 (i.e., in <i>tpk2Δ</i> cells) acts synergistically with Ssa1 and Ssa2 to fully repress Hsf1/Skn7 [15].

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

Ssa1	Ssa1 is a chaperone of the Hsp70 family that favors the stability of Cdc25 [1] and, according to our data [15], becomes activated by the CS of PKA. Ssa1 must inhibit Hsf1 activity, as it is known that: a) Hsp70 chaperones repress Hsf1 function [16, 17] and b) Ssa1 and Ssa2 are the most abundant Hsp70s during normal growth [1]. In our model, Ssa1 has only two functional states (0,1). Levels ≥ 1 of any of the Tpk2, Tpk1 and Tpk3 also activate it. We estimate that, in a WT cell, Tpk2 is the major activator of Ssa1. In the absence of Tpk2, or at very low levels of Tpk2, Tpk1 and Tpk3 also activate Ssa1 [3, 4].
Ssa2	Similar to Ssa1, Ssa2 favors the stability of Cdc25 [1] and, according to our data [15], becomes activated by the CS of PKA. Ssa2 must inhibit Hsf1 activity, as it is known that: a) Hsp70 chaperones repress Hsf1 function [16, 17] and b) Ssa2 and Ssa1 are the most abundant Hsp70s during normal growth [1]. We estimate that, in a WT cell, Tpk2 is the major activator of Ssa2. In the absence of Tpk2, or at very low levels of Tpk2, Tpk1 and Tpk3 also activate Ssa2 [3, 4].
Hsf1, Skn7	Hsf1 and Skn7 are transcription factors that recognize the HSE element in the promoters of a large number of stress genes [18, 19]. According to our data [15], and to information in the literature [16, 17], Hsf1/Skn7 are repressed by Ssa1 and Ssa2. Our modeling of the PKA-RN indicates that Hsf1/Skn7 are also inhibited by a third repressor designated RepX. In our model, Ssa1 only represses Hsf1/Skn7 mildly, while a maximum expression of Ssa2 reduces almost all of its activity [2, 3, 4].
HSE-lacZ	<i>HSE-lacZ</i> is our reporter gene and its expression is dependent on Hsf1/Skn7 transcription factors that promote the expression of stress and housekeeping genes [19, 20, 21, 22]. According to our data, the activity of the <i>HSE-lacZ</i> reporter is influenced by the PKA-RN and by temperature [5, 14, 15, 23, 24]. In our model, the <i>HSE-lacZ</i> reporter is positively and linearly activated by Hsf1/Skn7 [2, 3, 4].
Heat Shock	Heat shock causes the accumulation of denatured proteins. As a result, Hsp70 chaperones (i.e., Ssa1, Ssa2) reduce their binding to Hsf1, the transcriptional activity of Hsf1 is de-repressed [16, 17, 20], and the stability of Cdc25 decays [1]. In consequence, the activity of the CS of PKA and the repression of Hsf1 diminishes, whereas the expression of <i>HSE-lacZ</i> increases. In our model, the activity of Ssa2 is reduced whenever the Heat Shock node is turned on [2, 3, 4]. In contrast, Ssa1 activity is not influenced after turning on the Heat Shock node because, compared to Ssa2, its contribution to Hsf1 repression is negligible, as our experimental data shows [15].

Section 4. Logic Tables and discrete regulatory functions in the WT at 25°C.

A total of 15 Tables are presented (Table SI1 to SI15). The name of the regulated element (node) appears between << and >> symbols. Indicated in parenthesis is the presence (true) or absence (false) of the node. In WT cells at 25°C all the nodes are present (true) with the exception of the Heat Shock node (false). The regulators of each node are located on the columns located to the left of the node. In the heading of each Table are indicated the number of entries and the sources in the literature, or in our own data, that support the logic functions.

Table SI1. Cdc25 node.		
Table entries: 36; references: 1, 5.		
Ssa1	Ssa2	<<Cdc25>> (true)
0	0	1
0	1	2
0	2	3
0	3	4
0	4	5
0	5	x
1	0	2
1	1	2
1	2	3
1	3	4
1	4	5
1	5	x
2	0	x
2	1	x
2	2	x
2	3	x
2	4	x
2	5	x
3	0	x
3	1	x
3	2	x
3	3	x
3	4	x
3	5	x
4	0	x
4	1	x
4	2	x
4	3	x
4	4	x
4	5	x
5	0	x
5	1	x
5	2	x
5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	4	x
5	5	x

Table S12. Ras2 node.	
Table entries: 6; references: 6, 7.	
Cdc25	<<Ras2>> (true)
0	0
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

Table S13. cAMP node.	
Table entries: 6; references: 8, 9, 10.	
Ras2	<<cAMP>> (true)
0	0
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

Table S14. Bcy1 node.	
Table entries: 6; references: 10, 11, 12.	
cAMP	<<Bcy1>> (true)
0	5
1	4
2	3
3	2
4	1
5	0

Table S15. Tpk1 node.	
Table entries: 6; references: 10, 12, 13.	
Bcy1	<<Tpk1>> (true)
0	3
1	2
2	2
3	1
4	0
5	0

Table S16. Tpk2 node.	
Table entries: 6; references: 10, 12, 13.	
Bcy1	<<Tpk2>> (true)
0	5

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	4
2	4
3	3
4	2
5	1

Table S17. Tpk3 node.	
Table entries: 6; references: 10, 12, 13.	
Bcy1	<<Tpk3>> (true)
0	3
1	2
2	2
3	1
4	0
5	0

Table S18. Tpk1* node.		
Table entries: 36; references: 5, 14, 15.		
Tpk1	Tpk2	<<Tpk1*>> (true)
0	0	0
0	1	0
0	2	0
0	3	0
0	4	0
0	5	0
1	0	1
1	1	0
1	2	0
1	3	0
1	4	0
1	5	0
2	0	2
2	1	1
2	2	0
2	3	0
2	4	0
2	5	0
3	0	3
3	1	2
3	2	1
3	3	0
3	4	0
3	5	0
4	0	x
4	1	x
4	2	x
4	3	x
4	4	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	5	x
5	0	x
5	1	x
5	2	x
5	3	x
5	4	x
5	5	x

Table S19. Tpk3* node.		
Table entries: 36; references: 5, 14, 15.		
Tpk3	Tpk2	<<Tpk3*>> (true)
0	0	0
0	1	0
0	2	0
0	3	0
0	4	0
0	5	0
1	0	1
1	1	0
1	2	0
1	3	0
1	4	0
1	5	0
2	0	2
2	1	1
2	2	0
2	3	0
2	4	0
2	5	0
3	0	3
3	1	2
3	2	1
3	3	0
3	4	0
3	5	0
4	0	x
4	1	x
4	2	x
4	3	x
4	4	x
4	5	x
5	0	x
5	1	x
5	2	x
5	3	x
5	4	x
5	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

Table SI10. RepX node.	
Table entries: 6; references: 15.	
Tpk2	<<RepX>> (true)
0	2
1	1
2	0
3	0
4	0
5	0

Table SI11. Ssa1 node.				
Table entries: 1296; references: 15, 16, 17.				
Heat	Tpk1*	Tpk2	Tpk3*	<<Ssa1>> (true)
0	0	0	0	0
0	0	0	1	0
0	0	0	2	1
0	0	0	3	1
0	0	0	4	x
0	0	0	5	x
0	0	1	0	0
0	0	1	1	1
0	0	1	2	1
0	0	1	3	1
0	0	1	4	x
0	0	1	5	x
0	0	2	0	1
0	0	2	1	1
0	0	2	2	1
0	0	2	3	1
0	0	2	4	x
0	0	2	5	x
0	0	3	0	1
0	0	3	1	1
0	0	3	2	1
0	0	3	3	1
0	0	3	4	x
0	0	3	5	x
0	0	4	0	1
0	0	4	1	1
0	0	4	2	1
0	0	4	3	1
0	0	4	4	x
0	0	4	5	x
0	0	5	0	1
0	0	5	1	1
0	0	5	2	1
0	0	5	3	1

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	0	5	4	x
0	0	5	5	x
0	1	0	0	0
0	1	0	1	1
0	1	0	2	1
0	1	0	3	1
0	1	0	4	x
0	1	0	5	x
0	1	1	0	1
0	1	1	1	1
0	1	1	2	1
0	1	1	3	1
0	1	1	4	x
0	1	1	5	x
0	1	2	0	1
0	1	2	1	1
0	1	2	2	1
0	1	2	3	1
0	1	2	4	x
0	1	2	5	x
0	1	3	0	1
0	1	3	1	1
0	1	3	2	1
0	1	3	3	1
0	1	3	4	x
0	1	3	5	x
0	1	4	0	1
0	1	4	1	1
0	1	4	2	1
0	1	4	3	1
0	1	4	4	x
0	1	4	5	x
0	1	5	0	1
0	1	5	1	1
0	1	5	2	1
0	1	5	3	1
0	1	5	4	x
0	1	5	5	x
0	2	0	0	1
0	2	0	1	1
0	2	0	2	1
0	2	0	3	1
0	2	0	4	x
0	2	0	5	x
0	2	1	0	1
0	2	1	1	1
0	2	1	2	1
0	2	1	3	1

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	2	1	4	x
0	2	1	5	x
0	2	2	0	1
0	2	2	1	1
0	2	2	2	1
0	2	2	3	1
0	2	2	4	x
0	2	2	5	x
0	2	3	0	1
0	2	3	1	1
0	2	3	2	1
0	2	3	3	1
0	2	3	4	x
0	2	3	5	x
0	2	4	0	1
0	2	4	1	1
0	2	4	2	1
0	2	4	3	1
0	2	4	4	x
0	2	4	5	x
0	2	5	0	1
0	2	5	1	1
0	2	5	2	1
0	2	5	3	1
0	2	5	4	x
0	2	5	5	x
0	3	0	0	1
0	3	0	1	1
0	3	0	2	1
0	3	0	3	1
0	3	0	4	x
0	3	0	5	x
0	3	1	0	1
0	3	1	1	1
0	3	1	2	1
0	3	1	3	1
0	3	1	4	x
0	3	1	5	x
0	3	2	0	1
0	3	2	1	1
0	3	2	2	1
0	3	2	3	1
0	3	2	4	x
0	3	2	5	x
0	3	3	0	1
0	3	3	1	1
0	3	3	2	1
0	3	3	3	1

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	3	3	4	x
0	3	3	5	x
0	3	4	0	1
0	3	4	1	1
0	3	4	2	1
0	3	4	3	1
0	3	4	4	x
0	3	4	5	x
0	3	5	0	1
0	3	5	1	1
0	3	5	2	1
0	3	5	3	1
0	3	5	4	x
0	3	5	5	x
0	4	0	0	x
0	4	0	1	x
0	4	0	2	x
0	4	0	3	x
0	4	0	4	x
0	4	0	5	x
0	4	1	0	x
0	4	1	1	x
0	4	1	2	x
0	4	1	3	x
0	4	1	4	x
0	4	1	5	x
0	4	2	0	x
0	4	2	1	x
0	4	2	2	x
0	4	2	3	x
0	4	2	4	x
0	4	2	5	x
0	4	3	0	x
0	4	3	1	x
0	4	3	2	x
0	4	3	3	x
0	4	3	4	x
0	4	3	5	x
0	4	4	0	x
0	4	4	1	x
0	4	4	2	x
0	4	4	3	x
0	4	4	4	x
0	4	4	5	x
0	4	5	0	x
0	4	5	1	x
0	4	5	2	x
0	4	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	4	5	4	x
0	4	5	5	x
0	5	0	0	x
0	5	0	1	x
0	5	0	2	x
0	5	0	3	x
0	5	0	4	x
0	5	0	5	x
0	5	1	0	x
0	5	1	1	x
0	5	1	2	x
0	5	1	3	x
0	5	1	4	x
0	5	1	5	x
0	5	2	0	x
0	5	2	1	x
0	5	2	2	x
0	5	2	3	x
0	5	2	4	x
0	5	2	5	x
0	5	3	0	x
0	5	3	1	x
0	5	3	2	x
0	5	3	3	x
0	5	3	4	x
0	5	3	5	x
0	5	4	0	x
0	5	4	1	x
0	5	4	2	x
0	5	4	3	x
0	5	4	4	x
0	5	4	5	x
0	5	5	0	x
0	5	5	1	x
0	5	5	2	x
0	5	5	3	x
0	5	5	4	x
0	5	5	5	x
1	0	0	0	0
1	0	0	1	0
1	0	0	2	1
1	0	0	3	1
1	0	0	4	x
1	0	0	5	x
1	0	1	0	0
1	0	1	1	0
1	0	1	2	1
1	0	1	3	1

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	0	1	4	x
1	0	1	5	x
1	0	2	0	0
1	0	2	1	0
1	0	2	2	1
1	0	2	3	1
1	0	2	4	x
1	0	2	5	x
1	0	3	0	1
1	0	3	1	1
1	0	3	2	1
1	0	3	3	1
1	0	3	4	x
1	0	3	5	x
1	0	4	0	1
1	0	4	1	1
1	0	4	2	1
1	0	4	3	1
1	0	4	4	x
1	0	4	5	x
1	0	5	0	1
1	0	5	1	1
1	0	5	2	1
1	0	5	3	1
1	0	5	4	x
1	0	5	5	x
1	1	0	0	0
1	1	0	1	0
1	1	0	2	1
1	1	0	3	1
1	1	0	4	x
1	1	0	5	x
1	1	1	0	0
1	1	1	1	0
1	1	1	2	1
1	1	1	3	1
1	1	1	4	x
1	1	1	5	x
1	1	2	0	0
1	1	2	1	1
1	1	2	2	1
1	1	2	3	1
1	1	2	4	x
1	1	2	5	x
1	1	3	0	1
1	1	3	1	1
1	1	3	2	1
1	1	3	3	1

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	1	3	4	x
1	1	3	5	x
1	1	4	0	1
1	1	4	1	1
1	1	4	2	1
1	1	4	3	1
1	1	4	4	x
1	1	4	5	x
1	1	5	0	1
1	1	5	1	1
1	1	5	2	1
1	1	5	3	1
1	1	5	4	x
1	1	5	5	x
1	2	0	0	0
1	2	0	1	0
1	2	0	2	0
1	2	0	3	1
1	2	0	4	x
1	2	0	5	x
1	2	1	0	0
1	2	1	1	0
1	2	1	2	1
1	2	1	3	1
1	2	1	4	x
1	2	1	5	x
1	2	2	0	0
1	2	2	1	1
1	2	2	2	1
1	2	2	3	1
1	2	2	4	x
1	2	2	5	x
1	2	3	0	1
1	2	3	1	1
1	2	3	2	1
1	2	3	3	1
1	2	3	4	x
1	2	3	5	x
1	2	4	0	1
1	2	4	1	1
1	2	4	2	1
1	2	4	3	1
1	2	4	4	x
1	2	4	5	x
1	2	5	0	1
1	2	5	1	1
1	2	5	2	1
1	2	5	3	1

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	2	5	4	x
1	2	5	5	x
1	3	0	0	1
1	3	0	1	1
1	3	0	2	1
1	3	0	3	1
1	3	0	4	x
1	3	0	5	x
1	3	1	0	1
1	3	1	1	1
1	3	1	2	1
1	3	1	3	1
1	3	1	4	x
1	3	1	5	x
1	3	2	0	1
1	3	2	1	1
1	3	2	2	1
1	3	2	3	1
1	3	2	4	x
1	3	2	5	x
1	3	3	0	1
1	3	3	1	1
1	3	3	2	1
1	3	3	3	1
1	3	3	4	x
1	3	3	5	x
1	3	4	0	1
1	3	4	1	1
1	3	4	2	1
1	3	4	3	1
1	3	4	4	x
1	3	4	5	x
1	3	5	0	1
1	3	5	1	1
1	3	5	2	1
1	3	5	3	1
1	3	5	4	x
1	3	5	5	x
1	4	0	0	x
1	4	0	1	x
1	4	0	2	x
1	4	0	3	x
1	4	0	4	x
1	4	0	5	x
1	4	1	0	x
1	4	1	1	x
1	4	1	2	x
1	4	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	4	1	4	x
1	4	1	5	x
1	4	2	0	x
1	4	2	1	x
1	4	2	2	x
1	4	2	3	x
1	4	2	4	x
1	4	2	5	x
1	4	3	0	x
1	4	3	1	x
1	4	3	2	x
1	4	3	3	x
1	4	3	4	x
1	4	3	5	x
1	4	4	0	x
1	4	4	1	x
1	4	4	2	x
1	4	4	3	x
1	4	4	4	x
1	4	4	5	x
1	4	5	0	x
1	4	5	1	x
1	4	5	2	x
1	4	5	3	x
1	4	5	4	x
1	4	5	5	x
1	5	0	0	x
1	5	0	1	x
1	5	0	2	x
1	5	0	3	x
1	5	0	4	x
1	5	0	5	x
1	5	1	0	x
1	5	1	1	x
1	5	1	2	x
1	5	1	3	x
1	5	1	4	x
1	5	1	5	x
1	5	2	0	x
1	5	2	1	x
1	5	2	2	x
1	5	2	3	x
1	5	2	4	x
1	5	2	5	x
1	5	3	0	x
1	5	3	1	x
1	5	3	2	x
1	5	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	5	3	4	x
1	5	3	5	x
1	5	4	0	x
1	5	4	1	x
1	5	4	2	x
1	5	4	3	x
1	5	4	4	x
1	5	4	5	x
1	5	5	0	x
1	5	5	1	x
1	5	5	2	x
1	5	5	3	x
1	5	5	4	x
1	5	5	5	x
2	0	0	0	x
2	0	0	1	x
2	0	0	2	x
2	0	0	3	x
2	0	0	4	x
2	0	0	5	x
2	0	1	0	x
2	0	1	1	x
2	0	1	2	x
2	0	1	3	x
2	0	1	4	x
2	0	1	5	x
2	0	2	0	x
2	0	2	1	x
2	0	2	2	x
2	0	2	3	x
2	0	2	4	x
2	0	2	5	x
2	0	3	0	x
2	0	3	1	x
2	0	3	2	x
2	0	3	3	x
2	0	3	4	x
2	0	3	5	x
2	0	4	0	x
2	0	4	1	x
2	0	4	2	x
2	0	4	3	x
2	0	4	4	x
2	0	4	5	x
2	0	5	0	x
2	0	5	1	x
2	0	5	2	x
2	0	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	0	5	4	x
2	0	5	5	x
2	1	0	0	x
2	1	0	1	x
2	1	0	2	x
2	1	0	3	x
2	1	0	4	x
2	1	0	5	x
2	1	1	0	x
2	1	1	1	x
2	1	1	2	x
2	1	1	3	x
2	1	1	4	x
2	1	1	5	x
2	1	2	0	x
2	1	2	1	x
2	1	2	2	x
2	1	2	3	x
2	1	2	4	x
2	1	2	5	x
2	1	3	0	x
2	1	3	1	x
2	1	3	2	x
2	1	3	3	x
2	1	3	4	x
2	1	3	5	x
2	1	4	0	x
2	1	4	1	x
2	1	4	2	x
2	1	4	3	x
2	1	4	4	x
2	1	4	5	x
2	1	5	0	x
2	1	5	1	x
2	1	5	2	x
2	1	5	3	x
2	1	5	4	x
2	1	5	5	x
2	2	0	0	x
2	2	0	1	x
2	2	0	2	x
2	2	0	3	x
2	2	0	4	x
2	2	0	5	x
2	2	1	0	x
2	2	1	1	x
2	2	1	2	x
2	2	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

2	2	1	4	x
2	2	1	5	x
2	2	2	0	x
2	2	2	1	x
2	2	2	2	x
2	2	2	3	x
2	2	2	4	x
2	2	2	5	x
2	2	3	0	x
2	2	3	1	x
2	2	3	2	x
2	2	3	3	x
2	2	3	4	x
2	2	3	5	x
2	2	4	0	x
2	2	4	1	x
2	2	4	2	x
2	2	4	3	x
2	2	4	4	x
2	2	4	5	x
2	2	5	0	x
2	2	5	1	x
2	2	5	2	x
2	2	5	3	x
2	2	5	4	x
2	2	5	5	x
2	3	0	0	x
2	3	0	1	x
2	3	0	2	x
2	3	0	3	x
2	3	0	4	x
2	3	0	5	x
2	3	1	0	x
2	3	1	1	x
2	3	1	2	x
2	3	1	3	x
2	3	1	4	x
2	3	1	5	x
2	3	2	0	x
2	3	2	1	x
2	3	2	2	x
2	3	2	3	x
2	3	2	4	x
2	3	2	5	x
2	3	3	0	x
2	3	3	1	x
2	3	3	2	x
2	3	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	3	3	4	x
2	3	3	5	x
2	3	4	0	x
2	3	4	1	x
2	3	4	2	x
2	3	4	3	x
2	3	4	4	x
2	3	4	5	x
2	3	5	0	x
2	3	5	1	x
2	3	5	2	x
2	3	5	3	x
2	3	5	4	x
2	3	5	5	x
2	4	0	0	x
2	4	0	1	x
2	4	0	2	x
2	4	0	3	x
2	4	0	4	x
2	4	0	5	x
2	4	1	0	x
2	4	1	1	x
2	4	1	2	x
2	4	1	3	x
2	4	1	4	x
2	4	1	5	x
2	4	2	0	x
2	4	2	1	x
2	4	2	2	x
2	4	2	3	x
2	4	2	4	x
2	4	2	5	x
2	4	3	0	x
2	4	3	1	x
2	4	3	2	x
2	4	3	3	x
2	4	3	4	x
2	4	3	5	x
2	4	4	0	x
2	4	4	1	x
2	4	4	2	x
2	4	4	3	x
2	4	4	4	x
2	4	4	5	x
2	4	5	0	x
2	4	5	1	x
2	4	5	2	x
2	4	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	4	5	4	x
2	4	5	5	x
2	5	0	0	x
2	5	0	1	x
2	5	0	2	x
2	5	0	3	x
2	5	0	4	x
2	5	0	5	x
2	5	1	0	x
2	5	1	1	x
2	5	1	2	x
2	5	1	3	x
2	5	1	4	x
2	5	1	5	x
2	5	2	0	x
2	5	2	1	x
2	5	2	2	x
2	5	2	3	x
2	5	2	4	x
2	5	2	5	x
2	5	3	0	x
2	5	3	1	x
2	5	3	2	x
2	5	3	3	x
2	5	3	4	x
2	5	3	5	x
2	5	4	0	x
2	5	4	1	x
2	5	4	2	x
2	5	4	3	x
2	5	4	4	x
2	5	4	5	x
2	5	5	0	x
2	5	5	1	x
2	5	5	2	x
2	5	5	3	x
2	5	5	4	x
2	5	5	5	x
3	0	0	0	x
3	0	0	1	x
3	0	0	2	x
3	0	0	3	x
3	0	0	4	x
3	0	0	5	x
3	0	1	0	x
3	0	1	1	x
3	0	1	2	x
3	0	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	0	1	4	x
3	0	1	5	x
3	0	2	0	x
3	0	2	1	x
3	0	2	2	x
3	0	2	3	x
3	0	2	4	x
3	0	2	5	x
3	0	3	0	x
3	0	3	1	x
3	0	3	2	x
3	0	3	3	x
3	0	3	4	x
3	0	3	5	x
3	0	4	0	x
3	0	4	1	x
3	0	4	2	x
3	0	4	3	x
3	0	4	4	x
3	0	4	5	x
3	0	5	0	x
3	0	5	1	x
3	0	5	2	x
3	0	5	3	x
3	0	5	4	x
3	0	5	5	x
3	1	0	0	x
3	1	0	1	x
3	1	0	2	x
3	1	0	3	x
3	1	0	4	x
3	1	0	5	x
3	1	1	0	x
3	1	1	1	x
3	1	1	2	x
3	1	1	3	x
3	1	1	4	x
3	1	1	5	x
3	1	2	0	x
3	1	2	1	x
3	1	2	2	x
3	1	2	3	x
3	1	2	4	x
3	1	2	5	x
3	1	3	0	x
3	1	3	1	x
3	1	3	2	x
3	1	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	1	3	4	x
3	1	3	5	x
3	1	4	0	x
3	1	4	1	x
3	1	4	2	x
3	1	4	3	x
3	1	4	4	x
3	1	4	5	x
3	1	5	0	x
3	1	5	1	x
3	1	5	2	x
3	1	5	3	x
3	1	5	4	x
3	1	5	5	x
3	2	0	0	x
3	2	0	1	x
3	2	0	2	x
3	2	0	3	x
3	2	0	4	x
3	2	0	5	x
3	2	1	0	x
3	2	1	1	x
3	2	1	2	x
3	2	1	3	x
3	2	1	4	x
3	2	1	5	x
3	2	2	0	x
3	2	2	1	x
3	2	2	2	x
3	2	2	3	x
3	2	2	4	x
3	2	2	5	x
3	2	3	0	x
3	2	3	1	x
3	2	3	2	x
3	2	3	3	x
3	2	3	4	x
3	2	3	5	x
3	2	4	0	x
3	2	4	1	x
3	2	4	2	x
3	2	4	3	x
3	2	4	4	x
3	2	4	5	x
3	2	5	0	x
3	2	5	1	x
3	2	5	2	x
3	2	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	2	5	4	x
3	2	5	5	x
3	3	0	0	x
3	3	0	1	x
3	3	0	2	x
3	3	0	3	x
3	3	0	4	x
3	3	0	5	x
3	3	1	0	x
3	3	1	1	x
3	3	1	2	x
3	3	1	3	x
3	3	1	4	x
3	3	1	5	x
3	3	2	0	x
3	3	2	1	x
3	3	2	2	x
3	3	2	3	x
3	3	2	4	x
3	3	2	5	x
3	3	3	0	x
3	3	3	1	x
3	3	3	2	x
3	3	3	3	x
3	3	3	4	x
3	3	3	5	x
3	3	4	0	x
3	3	4	1	x
3	3	4	2	x
3	3	4	3	x
3	3	4	4	x
3	3	4	5	x
3	3	5	0	x
3	3	5	1	x
3	3	5	2	x
3	3	5	3	x
3	3	5	4	x
3	3	5	5	x
3	4	0	0	x
3	4	0	1	x
3	4	0	2	x
3	4	0	3	x
3	4	0	4	x
3	4	0	5	x
3	4	1	0	x
3	4	1	1	x
3	4	1	2	x
3	4	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	4	1	4	x
3	4	1	5	x
3	4	2	0	x
3	4	2	1	x
3	4	2	2	x
3	4	2	3	x
3	4	2	4	x
3	4	2	5	x
3	4	3	0	x
3	4	3	1	x
3	4	3	2	x
3	4	3	3	x
3	4	3	4	x
3	4	3	5	x
3	4	4	0	x
3	4	4	1	x
3	4	4	2	x
3	4	4	3	x
3	4	4	4	x
3	4	4	5	x
3	4	5	0	x
3	4	5	1	x
3	4	5	2	x
3	4	5	3	x
3	4	5	4	x
3	4	5	5	x
3	5	0	0	x
3	5	0	1	x
3	5	0	2	x
3	5	0	3	x
3	5	0	4	x
3	5	0	5	x
3	5	1	0	x
3	5	1	1	x
3	5	1	2	x
3	5	1	3	x
3	5	1	4	x
3	5	1	5	x
3	5	2	0	x
3	5	2	1	x
3	5	2	2	x
3	5	2	3	x
3	5	2	4	x
3	5	2	5	x
3	5	3	0	x
3	5	3	1	x
3	5	3	2	x
3	5	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	5	3	4	x
3	5	3	5	x
3	5	4	0	x
3	5	4	1	x
3	5	4	2	x
3	5	4	3	x
3	5	4	4	x
3	5	4	5	x
3	5	5	0	x
3	5	5	1	x
3	5	5	2	x
3	5	5	3	x
3	5	5	4	x
3	5	5	5	x
4	0	0	0	x
4	0	0	1	x
4	0	0	2	x
4	0	0	3	x
4	0	0	4	x
4	0	0	5	x
4	0	1	0	x
4	0	1	1	x
4	0	1	2	x
4	0	1	3	x
4	0	1	4	x
4	0	1	5	x
4	0	2	0	x
4	0	2	1	x
4	0	2	2	x
4	0	2	3	x
4	0	2	4	x
4	0	2	5	x
4	0	3	0	x
4	0	3	1	x
4	0	3	2	x
4	0	3	3	x
4	0	3	4	x
4	0	3	5	x
4	0	4	0	x
4	0	4	1	x
4	0	4	2	x
4	0	4	3	x
4	0	4	4	x
4	0	4	5	x
4	0	5	0	x
4	0	5	1	x
4	0	5	2	x
4	0	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	0	5	4	x
4	0	5	5	x
4	1	0	0	x
4	1	0	1	x
4	1	0	2	x
4	1	0	3	x
4	1	0	4	x
4	1	0	5	x
4	1	1	0	x
4	1	1	1	x
4	1	1	2	x
4	1	1	3	x
4	1	1	4	x
4	1	1	5	x
4	1	2	0	x
4	1	2	1	x
4	1	2	2	x
4	1	2	3	x
4	1	2	4	x
4	1	2	5	x
4	1	3	0	x
4	1	3	1	x
4	1	3	2	x
4	1	3	3	x
4	1	3	4	x
4	1	3	5	x
4	1	4	0	x
4	1	4	1	x
4	1	4	2	x
4	1	4	3	x
4	1	4	4	x
4	1	4	5	x
4	1	5	0	x
4	1	5	1	x
4	1	5	2	x
4	1	5	3	x
4	1	5	4	x
4	1	5	5	x
4	2	0	0	x
4	2	0	1	x
4	2	0	2	x
4	2	0	3	x
4	2	0	4	x
4	2	0	5	x
4	2	1	0	x
4	2	1	1	x
4	2	1	2	x
4	2	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	2	1	4	x
4	2	1	5	x
4	2	2	0	x
4	2	2	1	x
4	2	2	2	x
4	2	2	3	x
4	2	2	4	x
4	2	2	5	x
4	2	3	0	x
4	2	3	1	x
4	2	3	2	x
4	2	3	3	x
4	2	3	4	x
4	2	3	5	x
4	2	4	0	x
4	2	4	1	x
4	2	4	2	x
4	2	4	3	x
4	2	4	4	x
4	2	4	5	x
4	2	5	0	x
4	2	5	1	x
4	2	5	2	x
4	2	5	3	x
4	2	5	4	x
4	2	5	5	x
4	3	0	0	x
4	3	0	1	x
4	3	0	2	x
4	3	0	3	x
4	3	0	4	x
4	3	0	5	x
4	3	1	0	x
4	3	1	1	x
4	3	1	2	x
4	3	1	3	x
4	3	1	4	x
4	3	1	5	x
4	3	2	0	x
4	3	2	1	x
4	3	2	2	x
4	3	2	3	x
4	3	2	4	x
4	3	2	5	x
4	3	3	0	x
4	3	3	1	x
4	3	3	2	x
4	3	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	3	3	4	x
4	3	3	5	x
4	3	4	0	x
4	3	4	1	x
4	3	4	2	x
4	3	4	3	x
4	3	4	4	x
4	3	4	5	x
4	3	5	0	x
4	3	5	1	x
4	3	5	2	x
4	3	5	3	x
4	3	5	4	x
4	3	5	5	x
4	4	0	0	x
4	4	0	1	x
4	4	0	2	x
4	4	0	3	x
4	4	0	4	x
4	4	0	5	x
4	4	1	0	x
4	4	1	1	x
4	4	1	2	x
4	4	1	3	x
4	4	1	4	x
4	4	1	5	x
4	4	2	0	x
4	4	2	1	x
4	4	2	2	x
4	4	2	3	x
4	4	2	4	x
4	4	2	5	x
4	4	3	0	x
4	4	3	1	x
4	4	3	2	x
4	4	3	3	x
4	4	3	4	x
4	4	3	5	x
4	4	4	0	x
4	4	4	1	x
4	4	4	2	x
4	4	4	3	x
4	4	4	4	x
4	4	4	5	x
4	4	5	0	x
4	4	5	1	x
4	4	5	2	x
4	4	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	4	5	4	x
4	4	5	5	x
4	5	0	0	x
4	5	0	1	x
4	5	0	2	x
4	5	0	3	x
4	5	0	4	x
4	5	0	5	x
4	5	1	0	x
4	5	1	1	x
4	5	1	2	x
4	5	1	3	x
4	5	1	4	x
4	5	1	5	x
4	5	2	0	x
4	5	2	1	x
4	5	2	2	x
4	5	2	3	x
4	5	2	4	x
4	5	2	5	x
4	5	3	0	x
4	5	3	1	x
4	5	3	2	x
4	5	3	3	x
4	5	3	4	x
4	5	3	5	x
4	5	4	0	x
4	5	4	1	x
4	5	4	2	x
4	5	4	3	x
4	5	4	4	x
4	5	4	5	x
4	5	5	0	x
4	5	5	1	x
4	5	5	2	x
4	5	5	3	x
4	5	5	4	x
4	5	5	5	x
5	0	0	0	x
5	0	0	1	x
5	0	0	2	x
5	0	0	3	x
5	0	0	4	x
5	0	0	5	x
5	0	1	0	x
5	0	1	1	x
5	0	1	2	x
5	0	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	0	1	4	x
5	0	1	5	x
5	0	2	0	x
5	0	2	1	x
5	0	2	2	x
5	0	2	3	x
5	0	2	4	x
5	0	2	5	x
5	0	3	0	x
5	0	3	1	x
5	0	3	2	x
5	0	3	3	x
5	0	3	4	x
5	0	3	5	x
5	0	4	0	x
5	0	4	1	x
5	0	4	2	x
5	0	4	3	x
5	0	4	4	x
5	0	4	5	x
5	0	5	0	x
5	0	5	1	x
5	0	5	2	x
5	0	5	3	x
5	0	5	4	x
5	0	5	5	x
5	1	0	0	x
5	1	0	1	x
5	1	0	2	x
5	1	0	3	x
5	1	0	4	x
5	1	0	5	x
5	1	1	0	x
5	1	1	1	x
5	1	1	2	x
5	1	1	3	x
5	1	1	4	x
5	1	1	5	x
5	1	2	0	x
5	1	2	1	x
5	1	2	2	x
5	1	2	3	x
5	1	2	4	x
5	1	2	5	x
5	1	3	0	x
5	1	3	1	x
5	1	3	2	x
5	1	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	1	3	4	x
5	1	3	5	x
5	1	4	0	x
5	1	4	1	x
5	1	4	2	x
5	1	4	3	x
5	1	4	4	x
5	1	4	5	x
5	1	5	0	x
5	1	5	1	x
5	1	5	2	x
5	1	5	3	x
5	1	5	4	x
5	1	5	5	x
5	2	0	0	x
5	2	0	1	x
5	2	0	2	x
5	2	0	3	x
5	2	0	4	x
5	2	0	5	x
5	2	1	0	x
5	2	1	1	x
5	2	1	2	x
5	2	1	3	x
5	2	1	4	x
5	2	1	5	x
5	2	2	0	x
5	2	2	1	x
5	2	2	2	x
5	2	2	3	x
5	2	2	4	x
5	2	2	5	x
5	2	3	0	x
5	2	3	1	x
5	2	3	2	x
5	2	3	3	x
5	2	3	4	x
5	2	3	5	x
5	2	4	0	x
5	2	4	1	x
5	2	4	2	x
5	2	4	3	x
5	2	4	4	x
5	2	4	5	x
5	2	5	0	x
5	2	5	1	x
5	2	5	2	x
5	2	5	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	2	5	4	x
5	2	5	5	x
5	3	0	0	x
5	3	0	1	x
5	3	0	2	x
5	3	0	3	x
5	3	0	4	x
5	3	0	5	x
5	3	1	0	x
5	3	1	1	x
5	3	1	2	x
5	3	1	3	x
5	3	1	4	x
5	3	1	5	x
5	3	2	0	x
5	3	2	1	x
5	3	2	2	x
5	3	2	3	x
5	3	2	4	x
5	3	2	5	x
5	3	3	0	x
5	3	3	1	x
5	3	3	2	x
5	3	3	3	x
5	3	3	4	x
5	3	3	5	x
5	3	4	0	x
5	3	4	1	x
5	3	4	2	x
5	3	4	3	x
5	3	4	4	x
5	3	4	5	x
5	3	5	0	x
5	3	5	1	x
5	3	5	2	x
5	3	5	3	x
5	3	5	4	x
5	3	5	5	x
5	4	0	0	x
5	4	0	1	x
5	4	0	2	x
5	4	0	3	x
5	4	0	4	x
5	4	0	5	x
5	4	1	0	x
5	4	1	1	x
5	4	1	2	x
5	4	1	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	4	1	4	x
5	4	1	5	x
5	4	2	0	x
5	4	2	1	x
5	4	2	2	x
5	4	2	3	x
5	4	2	4	x
5	4	2	5	x
5	4	3	0	x
5	4	3	1	x
5	4	3	2	x
5	4	3	3	x
5	4	3	4	x
5	4	3	5	x
5	4	4	0	x
5	4	4	1	x
5	4	4	2	x
5	4	4	3	x
5	4	4	4	x
5	4	4	5	x
5	4	5	0	x
5	4	5	1	x
5	4	5	2	x
5	4	5	3	x
5	4	5	4	x
5	4	5	5	x
5	5	0	0	x
5	5	0	1	x
5	5	0	2	x
5	5	0	3	x
5	5	0	4	x
5	5	0	5	x
5	5	1	0	x
5	5	1	1	x
5	5	1	2	x
5	5	1	3	x
5	5	1	4	x
5	5	1	5	x
5	5	2	0	x
5	5	2	1	x
5	5	2	2	x
5	5	2	3	x
5	5	2	4	x
5	5	2	5	x
5	5	3	0	x
5	5	3	1	x
5	5	3	2	x
5	5	3	3	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	5	3	4	x
5	5	3	5	x
5	5	4	0	x
5	5	4	1	x
5	5	4	2	x
5	5	4	3	x
5	5	4	4	x
5	5	4	5	x
5	5	5	0	x
5	5	5	1	x
5	5	5	2	x
5	5	5	3	x
5	5	5	4	x
5	5	5	5	x

Table SI12. Ssa2 node.				
Table entries: 1296; references: 15, 16, 17.				
Heat	Tpk1*	Tpk2	Tpk3*	<<Ssa2>> (true)
0	0	0	0	0
0	0	0	1	1
0	0	0	2	2
0	0	0	3	3
0	0	0	4	x
0	0	0	5	x
0	0	1	0	1
0	0	1	1	2
0	0	1	2	3
0	0	1	3	4
0	0	1	4	x
0	0	1	5	x
0	0	2	0	2
0	0	2	1	2
0	0	2	2	3
0	0	2	3	3
0	0	2	4	x
0	0	2	5	x
0	0	3	0	2
0	0	3	1	2
0	0	3	2	3
0	0	3	3	4
0	0	3	4	x
0	0	3	5	x
0	0	4	0	3
0	0	4	1	3
0	0	4	2	3
0	0	4	3	4
0	0	4	4	x
0	0	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	0	5	0	4
0	0	5	1	4
0	0	5	2	4
0	0	5	3	4
0	0	5	4	x
0	0	5	5	x
0	1	0	0	2
0	1	0	1	2
0	1	0	2	2
0	1	0	3	3
0	1	0	4	x
0	1	0	5	x
0	1	1	0	1
0	1	1	1	2
0	1	1	2	2
0	1	1	3	3
0	1	1	4	x
0	1	1	5	x
0	1	2	0	2
0	1	2	1	2
0	1	2	2	3
0	1	2	3	4
0	1	2	4	x
0	1	2	5	x
0	1	3	0	2
0	1	3	1	3
0	1	3	2	4
0	1	3	3	4
0	1	3	4	x
0	1	3	5	x
0	1	4	0	3
0	1	4	1	3
0	1	4	2	4
0	1	4	3	4
0	1	4	4	x
0	1	4	5	x
0	1	5	0	4
0	1	5	1	4
0	1	5	2	4
0	1	5	3	4
0	1	5	4	x
0	1	5	5	x
0	2	0	0	3
0	2	0	1	3
0	2	0	2	3
0	2	0	3	4
0	2	0	4	x
0	2	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	2	1	0	2
0	2	1	1	2
0	2	1	2	3
0	2	1	3	3
0	2	1	4	x
0	2	1	5	x
0	2	2	0	3
0	2	2	1	3
0	2	2	2	3
0	2	2	3	4
0	2	2	4	x
0	2	2	5	x
0	2	3	0	3
0	2	3	1	3
0	2	3	2	3
0	2	3	3	4
0	2	3	4	x
0	2	3	5	x
0	2	4	0	3
0	2	4	1	3
0	2	4	2	3
0	2	4	3	4
0	2	4	4	x
0	2	4	5	x
0	2	5	0	4
0	2	5	1	4
0	2	5	2	4
0	2	5	3	4
0	2	5	4	x
0	2	5	5	x
0	3	0	0	4
0	3	0	1	4
0	3	0	2	4
0	3	0	3	4
0	3	0	4	x
0	3	0	5	x
0	3	1	0	4
0	3	1	1	4
0	3	1	2	4
0	3	1	3	4
0	3	1	4	x
0	3	1	5	x
0	3	2	0	4
0	3	2	1	4
0	3	2	2	4
0	3	2	3	4
0	3	2	4	x
0	3	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	3	3	0	4
0	3	3	1	4
0	3	3	2	4
0	3	3	3	4
0	3	3	4	x
0	3	3	5	x
0	3	4	0	4
0	3	4	1	4
0	3	4	2	4
0	3	4	3	4
0	3	4	4	x
0	3	4	5	x
0	3	5	0	4
0	3	5	1	4
0	3	5	2	4
0	3	5	3	4
0	3	5	4	x
0	3	5	5	x
0	4	0	0	x
0	4	0	1	x
0	4	0	2	x
0	4	0	3	x
0	4	0	4	x
0	4	0	5	x
0	4	1	0	x
0	4	1	1	x
0	4	1	2	x
0	4	1	3	x
0	4	1	4	x
0	4	1	5	x
0	4	2	0	x
0	4	2	1	x
0	4	2	2	x
0	4	2	3	x
0	4	2	4	x
0	4	2	5	x
0	4	3	0	x
0	4	3	1	x
0	4	3	2	x
0	4	3	3	x
0	4	3	4	x
0	4	3	5	x
0	4	4	0	x
0	4	4	1	x
0	4	4	2	x
0	4	4	3	x
0	4	4	4	x
0	4	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	4	5	0	x
0	4	5	1	x
0	4	5	2	x
0	4	5	3	x
0	4	5	4	x
0	4	5	5	x
0	5	0	0	x
0	5	0	1	x
0	5	0	2	x
0	5	0	3	x
0	5	0	4	x
0	5	0	5	x
0	5	1	0	x
0	5	1	1	x
0	5	1	2	x
0	5	1	3	x
0	5	1	4	x
0	5	1	5	x
0	5	2	0	x
0	5	2	1	x
0	5	2	2	x
0	5	2	3	x
0	5	2	4	x
0	5	2	5	x
0	5	3	0	x
0	5	3	1	x
0	5	3	2	x
0	5	3	3	x
0	5	3	4	x
0	5	3	5	x
0	5	4	0	x
0	5	4	1	x
0	5	4	2	x
0	5	4	3	x
0	5	4	4	x
0	5	4	5	x
0	5	5	0	x
0	5	5	1	x
0	5	5	2	x
0	5	5	3	x
0	5	5	4	x
0	5	5	5	x
1	0	0	0	0
1	0	0	1	1
1	0	0	2	1
1	0	0	3	2
1	0	0	4	x
1	0	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	0	1	0	0
1	0	1	1	1
1	0	1	2	2
1	0	1	3	2
1	0	1	4	x
1	0	1	5	x
1	0	2	0	1
1	0	2	1	1
1	0	2	2	2
1	0	2	3	2
1	0	2	4	x
1	0	2	5	x
1	0	3	0	1
1	0	3	1	1
1	0	3	2	2
1	0	3	3	3
1	0	3	4	x
1	0	3	5	x
1	0	4	0	2
1	0	4	1	2
1	0	4	2	2
1	0	4	3	3
1	0	4	4	x
1	0	4	5	x
1	0	5	0	3
1	0	5	1	3
1	0	5	2	3
1	0	5	3	3
1	0	5	4	x
1	0	5	5	x
1	1	0	0	1
1	1	0	1	1
1	1	0	2	1
1	1	0	3	2
1	1	0	4	x
1	1	0	5	x
1	1	1	0	0
1	1	1	1	1
1	1	1	2	1
1	1	1	3	2
1	1	1	4	x
1	1	1	5	x
1	1	2	0	1
1	1	2	1	1
1	1	2	2	2
1	1	2	3	3
1	1	2	4	x
1	1	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	1	3	0	1
1	1	3	1	2
1	1	3	2	3
1	1	3	3	3
1	1	3	4	x
1	1	3	5	x
1	1	4	0	2
1	1	4	1	2
1	1	4	2	3
1	1	4	3	3
1	1	4	4	x
1	1	4	5	x
1	1	5	0	3
1	1	5	1	3
1	1	5	2	3
1	1	5	3	3
1	1	5	4	x
1	1	5	5	x
1	2	0	0	1
1	2	0	1	1
1	2	0	2	2
1	2	0	3	2
1	2	0	4	x
1	2	0	5	x
1	2	1	0	1
1	2	1	1	1
1	2	1	2	2
1	2	1	3	2
1	2	1	4	x
1	2	1	5	x
1	2	2	0	2
1	2	2	1	2
1	2	2	2	2
1	2	2	3	3
1	2	2	4	x
1	2	2	5	x
1	2	3	0	2
1	2	3	1	2
1	2	3	2	2
1	2	3	3	3
1	2	3	4	x
1	2	3	5	x
1	2	4	0	2
1	2	4	1	2
1	2	4	2	2
1	2	4	3	3
1	2	4	4	x
1	2	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	2	5	0	3
1	2	5	1	3
1	2	5	2	3
1	2	5	3	3
1	2	5	4	x
1	2	5	5	x
1	3	0	0	3
1	3	0	1	3
1	3	0	2	3
1	3	0	3	3
1	3	0	4	x
1	3	0	5	x
1	3	1	0	3
1	3	1	1	3
1	3	1	2	3
1	3	1	3	3
1	3	1	4	x
1	3	1	5	x
1	3	2	0	3
1	3	2	1	3
1	3	2	2	3
1	3	2	3	3
1	3	2	4	x
1	3	2	5	x
1	3	3	0	3
1	3	3	1	3
1	3	3	2	3
1	3	3	3	3
1	3	3	4	x
1	3	3	5	x
1	3	4	0	3
1	3	4	1	3
1	3	4	2	3
1	3	4	3	3
1	3	4	4	x
1	3	4	5	x
1	3	5	0	3
1	3	5	1	3
1	3	5	2	3
1	3	5	3	3
1	3	5	4	x
1	3	5	5	x
1	4	0	0	x
1	4	0	1	x
1	4	0	2	x
1	4	0	3	x
1	4	0	4	x
1	4	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	4	1	0	x
1	4	1	1	x
1	4	1	2	x
1	4	1	3	x
1	4	1	4	x
1	4	1	5	x
1	4	2	0	x
1	4	2	1	x
1	4	2	2	x
1	4	2	3	x
1	4	2	4	x
1	4	2	5	x
1	4	3	0	x
1	4	3	1	x
1	4	3	2	x
1	4	3	3	x
1	4	3	4	x
1	4	3	5	x
1	4	4	0	x
1	4	4	1	x
1	4	4	2	x
1	4	4	3	x
1	4	4	4	x
1	4	4	5	x
1	4	5	0	x
1	4	5	1	x
1	4	5	2	x
1	4	5	3	x
1	4	5	4	x
1	4	5	5	x
1	5	0	0	x
1	5	0	1	x
1	5	0	2	x
1	5	0	3	x
1	5	0	4	x
1	5	0	5	x
1	5	1	0	x
1	5	1	1	x
1	5	1	2	x
1	5	1	3	x
1	5	1	4	x
1	5	1	5	x
1	5	2	0	x
1	5	2	1	x
1	5	2	2	x
1	5	2	3	x
1	5	2	4	x
1	5	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

1	5	3	0	x
1	5	3	1	x
1	5	3	2	x
1	5	3	3	x
1	5	3	4	x
1	5	3	5	x
1	5	4	0	x
1	5	4	1	x
1	5	4	2	x
1	5	4	3	x
1	5	4	4	x
1	5	4	5	x
1	5	5	0	x
1	5	5	1	x
1	5	5	2	x
1	5	5	3	x
1	5	5	4	x
1	5	5	5	x
2	0	0	0	x
2	0	0	1	x
2	0	0	2	x
2	0	0	3	x
2	0	0	4	x
2	0	0	5	x
2	0	1	0	x
2	0	1	1	x
2	0	1	2	x
2	0	1	3	x
2	0	1	4	x
2	0	1	5	x
2	0	2	0	x
2	0	2	1	x
2	0	2	2	x
2	0	2	3	x
2	0	2	4	x
2	0	2	5	x
2	0	3	0	x
2	0	3	1	x
2	0	3	2	x
2	0	3	3	x
2	0	3	4	x
2	0	3	5	x
2	0	4	0	x
2	0	4	1	x
2	0	4	2	x
2	0	4	3	x
2	0	4	4	x
2	0	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	0	5	0	x
2	0	5	1	x
2	0	5	2	x
2	0	5	3	x
2	0	5	4	x
2	0	5	5	x
2	1	0	0	x
2	1	0	1	x
2	1	0	2	x
2	1	0	3	x
2	1	0	4	x
2	1	0	5	x
2	1	1	0	x
2	1	1	1	x
2	1	1	2	x
2	1	1	3	x
2	1	1	4	x
2	1	1	5	x
2	1	2	0	x
2	1	2	1	x
2	1	2	2	x
2	1	2	3	x
2	1	2	4	x
2	1	2	5	x
2	1	3	0	x
2	1	3	1	x
2	1	3	2	x
2	1	3	3	x
2	1	3	4	x
2	1	3	5	x
2	1	4	0	x
2	1	4	1	x
2	1	4	2	x
2	1	4	3	x
2	1	4	4	x
2	1	4	5	x
2	1	5	0	x
2	1	5	1	x
2	1	5	2	x
2	1	5	3	x
2	1	5	4	x
2	1	5	5	x
2	2	0	0	x
2	2	0	1	x
2	2	0	2	x
2	2	0	3	x
2	2	0	4	x
2	2	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	2	1	0	x
2	2	1	1	x
2	2	1	2	x
2	2	1	3	x
2	2	1	4	x
2	2	1	5	x
2	2	2	0	x
2	2	2	1	x
2	2	2	2	x
2	2	2	3	x
2	2	2	4	x
2	2	2	5	x
2	2	3	0	x
2	2	3	1	x
2	2	3	2	x
2	2	3	3	x
2	2	3	4	x
2	2	3	5	x
2	2	4	0	x
2	2	4	1	x
2	2	4	2	x
2	2	4	3	x
2	2	4	4	x
2	2	4	5	x
2	2	5	0	x
2	2	5	1	x
2	2	5	2	x
2	2	5	3	x
2	2	5	4	x
2	2	5	5	x
2	3	0	0	x
2	3	0	1	x
2	3	0	2	x
2	3	0	3	x
2	3	0	4	x
2	3	0	5	x
2	3	1	0	x
2	3	1	1	x
2	3	1	2	x
2	3	1	3	x
2	3	1	4	x
2	3	1	5	x
2	3	2	0	x
2	3	2	1	x
2	3	2	2	x
2	3	2	3	x
2	3	2	4	x
2	3	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	3	3	0	x
2	3	3	1	x
2	3	3	2	x
2	3	3	3	x
2	3	3	4	x
2	3	3	5	x
2	3	4	0	x
2	3	4	1	x
2	3	4	2	x
2	3	4	3	x
2	3	4	4	x
2	3	4	5	x
2	3	5	0	x
2	3	5	1	x
2	3	5	2	x
2	3	5	3	x
2	3	5	4	x
2	3	5	5	x
2	4	0	0	x
2	4	0	1	x
2	4	0	2	x
2	4	0	3	x
2	4	0	4	x
2	4	0	5	x
2	4	1	0	x
2	4	1	1	x
2	4	1	2	x
2	4	1	3	x
2	4	1	4	x
2	4	1	5	x
2	4	2	0	x
2	4	2	1	x
2	4	2	2	x
2	4	2	3	x
2	4	2	4	x
2	4	2	5	x
2	4	3	0	x
2	4	3	1	x
2	4	3	2	x
2	4	3	3	x
2	4	3	4	x
2	4	3	5	x
2	4	4	0	x
2	4	4	1	x
2	4	4	2	x
2	4	4	3	x
2	4	4	4	x
2	4	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	4	5	0	x
2	4	5	1	x
2	4	5	2	x
2	4	5	3	x
2	4	5	4	x
2	4	5	5	x
2	5	0	0	x
2	5	0	1	x
2	5	0	2	x
2	5	0	3	x
2	5	0	4	x
2	5	0	5	x
2	5	1	0	x
2	5	1	1	x
2	5	1	2	x
2	5	1	3	x
2	5	1	4	x
2	5	1	5	x
2	5	2	0	x
2	5	2	1	x
2	5	2	2	x
2	5	2	3	x
2	5	2	4	x
2	5	2	5	x
2	5	3	0	x
2	5	3	1	x
2	5	3	2	x
2	5	3	3	x
2	5	3	4	x
2	5	3	5	x
2	5	4	0	x
2	5	4	1	x
2	5	4	2	x
2	5	4	3	x
2	5	4	4	x
2	5	4	5	x
2	5	5	0	x
2	5	5	1	x
2	5	5	2	x
2	5	5	3	x
2	5	5	4	x
2	5	5	5	x
3	0	0	0	x
3	0	0	1	x
3	0	0	2	x
3	0	0	3	x
3	0	0	4	x
3	0	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	0	1	0	x
3	0	1	1	x
3	0	1	2	x
3	0	1	3	x
3	0	1	4	x
3	0	1	5	x
3	0	2	0	x
3	0	2	1	x
3	0	2	2	x
3	0	2	3	x
3	0	2	4	x
3	0	2	5	x
3	0	3	0	x
3	0	3	1	x
3	0	3	2	x
3	0	3	3	x
3	0	3	4	x
3	0	3	5	x
3	0	4	0	x
3	0	4	1	x
3	0	4	2	x
3	0	4	3	x
3	0	4	4	x
3	0	4	5	x
3	0	5	0	x
3	0	5	1	x
3	0	5	2	x
3	0	5	3	x
3	0	5	4	x
3	0	5	5	x
3	1	0	0	x
3	1	0	1	x
3	1	0	2	x
3	1	0	3	x
3	1	0	4	x
3	1	0	5	x
3	1	1	0	x
3	1	1	1	x
3	1	1	2	x
3	1	1	3	x
3	1	1	4	x
3	1	1	5	x
3	1	2	0	x
3	1	2	1	x
3	1	2	2	x
3	1	2	3	x
3	1	2	4	x
3	1	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	1	3	0	x
3	1	3	1	x
3	1	3	2	x
3	1	3	3	x
3	1	3	4	x
3	1	3	5	x
3	1	4	0	x
3	1	4	1	x
3	1	4	2	x
3	1	4	3	x
3	1	4	4	x
3	1	4	5	x
3	1	5	0	x
3	1	5	1	x
3	1	5	2	x
3	1	5	3	x
3	1	5	4	x
3	1	5	5	x
3	2	0	0	x
3	2	0	1	x
3	2	0	2	x
3	2	0	3	x
3	2	0	4	x
3	2	0	5	x
3	2	1	0	x
3	2	1	1	x
3	2	1	2	x
3	2	1	3	x
3	2	1	4	x
3	2	1	5	x
3	2	2	0	x
3	2	2	1	x
3	2	2	2	x
3	2	2	3	x
3	2	2	4	x
3	2	2	5	x
3	2	3	0	x
3	2	3	1	x
3	2	3	2	x
3	2	3	3	x
3	2	3	4	x
3	2	3	5	x
3	2	4	0	x
3	2	4	1	x
3	2	4	2	x
3	2	4	3	x
3	2	4	4	x
3	2	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	2	5	0	x
3	2	5	1	x
3	2	5	2	x
3	2	5	3	x
3	2	5	4	x
3	2	5	5	x
3	3	0	0	x
3	3	0	1	x
3	3	0	2	x
3	3	0	3	x
3	3	0	4	x
3	3	0	5	x
3	3	1	0	x
3	3	1	1	x
3	3	1	2	x
3	3	1	3	x
3	3	1	4	x
3	3	1	5	x
3	3	2	0	x
3	3	2	1	x
3	3	2	2	x
3	3	2	3	x
3	3	2	4	x
3	3	2	5	x
3	3	3	0	x
3	3	3	1	x
3	3	3	2	x
3	3	3	3	x
3	3	3	4	x
3	3	3	5	x
3	3	4	0	x
3	3	4	1	x
3	3	4	2	x
3	3	4	3	x
3	3	4	4	x
3	3	4	5	x
3	3	5	0	x
3	3	5	1	x
3	3	5	2	x
3	3	5	3	x
3	3	5	4	x
3	3	5	5	x
3	4	0	0	x
3	4	0	1	x
3	4	0	2	x
3	4	0	3	x
3	4	0	4	x
3	4	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	4	1	0	x
3	4	1	1	x
3	4	1	2	x
3	4	1	3	x
3	4	1	4	x
3	4	1	5	x
3	4	2	0	x
3	4	2	1	x
3	4	2	2	x
3	4	2	3	x
3	4	2	4	x
3	4	2	5	x
3	4	3	0	x
3	4	3	1	x
3	4	3	2	x
3	4	3	3	x
3	4	3	4	x
3	4	3	5	x
3	4	4	0	x
3	4	4	1	x
3	4	4	2	x
3	4	4	3	x
3	4	4	4	x
3	4	4	5	x
3	4	5	0	x
3	4	5	1	x
3	4	5	2	x
3	4	5	3	x
3	4	5	4	x
3	4	5	5	x
3	5	0	0	x
3	5	0	1	x
3	5	0	2	x
3	5	0	3	x
3	5	0	4	x
3	5	0	5	x
3	5	1	0	x
3	5	1	1	x
3	5	1	2	x
3	5	1	3	x
3	5	1	4	x
3	5	1	5	x
3	5	2	0	x
3	5	2	1	x
3	5	2	2	x
3	5	2	3	x
3	5	2	4	x
3	5	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	5	3	0	x
3	5	3	1	x
3	5	3	2	x
3	5	3	3	x
3	5	3	4	x
3	5	3	5	x
3	5	4	0	x
3	5	4	1	x
3	5	4	2	x
3	5	4	3	x
3	5	4	4	x
3	5	4	5	x
3	5	5	0	x
3	5	5	1	x
3	5	5	2	x
3	5	5	3	x
3	5	5	4	x
3	5	5	5	x
4	0	0	0	x
4	0	0	1	x
4	0	0	2	x
4	0	0	3	x
4	0	0	4	x
4	0	0	5	x
4	0	1	0	x
4	0	1	1	x
4	0	1	2	x
4	0	1	3	x
4	0	1	4	x
4	0	1	5	x
4	0	2	0	x
4	0	2	1	x
4	0	2	2	x
4	0	2	3	x
4	0	2	4	x
4	0	2	5	x
4	0	3	0	x
4	0	3	1	x
4	0	3	2	x
4	0	3	3	x
4	0	3	4	x
4	0	3	5	x
4	0	4	0	x
4	0	4	1	x
4	0	4	2	x
4	0	4	3	x
4	0	4	4	x
4	0	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	0	5	0	x
4	0	5	1	x
4	0	5	2	x
4	0	5	3	x
4	0	5	4	x
4	0	5	5	x
4	1	0	0	x
4	1	0	1	x
4	1	0	2	x
4	1	0	3	x
4	1	0	4	x
4	1	0	5	x
4	1	1	0	x
4	1	1	1	x
4	1	1	2	x
4	1	1	3	x
4	1	1	4	x
4	1	1	5	x
4	1	2	0	x
4	1	2	1	x
4	1	2	2	x
4	1	2	3	x
4	1	2	4	x
4	1	2	5	x
4	1	3	0	x
4	1	3	1	x
4	1	3	2	x
4	1	3	3	x
4	1	3	4	x
4	1	3	5	x
4	1	4	0	x
4	1	4	1	x
4	1	4	2	x
4	1	4	3	x
4	1	4	4	x
4	1	4	5	x
4	1	5	0	x
4	1	5	1	x
4	1	5	2	x
4	1	5	3	x
4	1	5	4	x
4	1	5	5	x
4	2	0	0	x
4	2	0	1	x
4	2	0	2	x
4	2	0	3	x
4	2	0	4	x
4	2	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	2	1	0	x
4	2	1	1	x
4	2	1	2	x
4	2	1	3	x
4	2	1	4	x
4	2	1	5	x
4	2	2	0	x
4	2	2	1	x
4	2	2	2	x
4	2	2	3	x
4	2	2	4	x
4	2	2	5	x
4	2	3	0	x
4	2	3	1	x
4	2	3	2	x
4	2	3	3	x
4	2	3	4	x
4	2	3	5	x
4	2	4	0	x
4	2	4	1	x
4	2	4	2	x
4	2	4	3	x
4	2	4	4	x
4	2	4	5	x
4	2	5	0	x
4	2	5	1	x
4	2	5	2	x
4	2	5	3	x
4	2	5	4	x
4	2	5	5	x
4	3	0	0	x
4	3	0	1	x
4	3	0	2	x
4	3	0	3	x
4	3	0	4	x
4	3	0	5	x
4	3	1	0	x
4	3	1	1	x
4	3	1	2	x
4	3	1	3	x
4	3	1	4	x
4	3	1	5	x
4	3	2	0	x
4	3	2	1	x
4	3	2	2	x
4	3	2	3	x
4	3	2	4	x
4	3	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	3	3	0	x
4	3	3	1	x
4	3	3	2	x
4	3	3	3	x
4	3	3	4	x
4	3	3	5	x
4	3	4	0	x
4	3	4	1	x
4	3	4	2	x
4	3	4	3	x
4	3	4	4	x
4	3	4	5	x
4	3	5	0	x
4	3	5	1	x
4	3	5	2	x
4	3	5	3	x
4	3	5	4	x
4	3	5	5	x
4	4	0	0	x
4	4	0	1	x
4	4	0	2	x
4	4	0	3	x
4	4	0	4	x
4	4	0	5	x
4	4	1	0	x
4	4	1	1	x
4	4	1	2	x
4	4	1	3	x
4	4	1	4	x
4	4	1	5	x
4	4	2	0	x
4	4	2	1	x
4	4	2	2	x
4	4	2	3	x
4	4	2	4	x
4	4	2	5	x
4	4	3	0	x
4	4	3	1	x
4	4	3	2	x
4	4	3	3	x
4	4	3	4	x
4	4	3	5	x
4	4	4	0	x
4	4	4	1	x
4	4	4	2	x
4	4	4	3	x
4	4	4	4	x
4	4	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	4	5	0	x
4	4	5	1	x
4	4	5	2	x
4	4	5	3	x
4	4	5	4	x
4	4	5	5	x
4	5	0	0	x
4	5	0	1	x
4	5	0	2	x
4	5	0	3	x
4	5	0	4	x
4	5	0	5	x
4	5	1	0	x
4	5	1	1	x
4	5	1	2	x
4	5	1	3	x
4	5	1	4	x
4	5	1	5	x
4	5	2	0	x
4	5	2	1	x
4	5	2	2	x
4	5	2	3	x
4	5	2	4	x
4	5	2	5	x
4	5	3	0	x
4	5	3	1	x
4	5	3	2	x
4	5	3	3	x
4	5	3	4	x
4	5	3	5	x
4	5	4	0	x
4	5	4	1	x
4	5	4	2	x
4	5	4	3	x
4	5	4	4	x
4	5	4	5	x
4	5	5	0	x
4	5	5	1	x
4	5	5	2	x
4	5	5	3	x
4	5	5	4	x
4	5	5	5	x
5	0	0	0	x
5	0	0	1	x
5	0	0	2	x
5	0	0	3	x
5	0	0	4	x
5	0	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	0	1	0	x
5	0	1	1	x
5	0	1	2	x
5	0	1	3	x
5	0	1	4	x
5	0	1	5	x
5	0	2	0	x
5	0	2	1	x
5	0	2	2	x
5	0	2	3	x
5	0	2	4	x
5	0	2	5	x
5	0	3	0	x
5	0	3	1	x
5	0	3	2	x
5	0	3	3	x
5	0	3	4	x
5	0	3	5	x
5	0	4	0	x
5	0	4	1	x
5	0	4	2	x
5	0	4	3	x
5	0	4	4	x
5	0	4	5	x
5	0	5	0	x
5	0	5	1	x
5	0	5	2	x
5	0	5	3	x
5	0	5	4	x
5	0	5	5	x
5	1	0	0	x
5	1	0	1	x
5	1	0	2	x
5	1	0	3	x
5	1	0	4	x
5	1	0	5	x
5	1	1	0	x
5	1	1	1	x
5	1	1	2	x
5	1	1	3	x
5	1	1	4	x
5	1	1	5	x
5	1	2	0	x
5	1	2	1	x
5	1	2	2	x
5	1	2	3	x
5	1	2	4	x
5	1	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	1	3	0	x
5	1	3	1	x
5	1	3	2	x
5	1	3	3	x
5	1	3	4	x
5	1	3	5	x
5	1	4	0	x
5	1	4	1	x
5	1	4	2	x
5	1	4	3	x
5	1	4	4	x
5	1	4	5	x
5	1	5	0	x
5	1	5	1	x
5	1	5	2	x
5	1	5	3	x
5	1	5	4	x
5	1	5	5	x
5	2	0	0	x
5	2	0	1	x
5	2	0	2	x
5	2	0	3	x
5	2	0	4	x
5	2	0	5	x
5	2	1	0	x
5	2	1	1	x
5	2	1	2	x
5	2	1	3	x
5	2	1	4	x
5	2	1	5	x
5	2	2	0	x
5	2	2	1	x
5	2	2	2	x
5	2	2	3	x
5	2	2	4	x
5	2	2	5	x
5	2	3	0	x
5	2	3	1	x
5	2	3	2	x
5	2	3	3	x
5	2	3	4	x
5	2	3	5	x
5	2	4	0	x
5	2	4	1	x
5	2	4	2	x
5	2	4	3	x
5	2	4	4	x
5	2	4	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	2	5	0	x
5	2	5	1	x
5	2	5	2	x
5	2	5	3	x
5	2	5	4	x
5	2	5	5	x
5	3	0	0	x
5	3	0	1	x
5	3	0	2	x
5	3	0	3	x
5	3	0	4	x
5	3	0	5	x
5	3	1	0	x
5	3	1	1	x
5	3	1	2	x
5	3	1	3	x
5	3	1	4	x
5	3	1	5	x
5	3	2	0	x
5	3	2	1	x
5	3	2	2	x
5	3	2	3	x
5	3	2	4	x
5	3	2	5	x
5	3	3	0	x
5	3	3	1	x
5	3	3	2	x
5	3	3	3	x
5	3	3	4	x
5	3	3	5	x
5	3	4	0	x
5	3	4	1	x
5	3	4	2	x
5	3	4	3	x
5	3	4	4	x
5	3	4	5	x
5	3	5	0	x
5	3	5	1	x
5	3	5	2	x
5	3	5	3	x
5	3	5	4	x
5	3	5	5	x
5	4	0	0	x
5	4	0	1	x
5	4	0	2	x
5	4	0	3	x
5	4	0	4	x
5	4	0	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	4	1	0	x
5	4	1	1	x
5	4	1	2	x
5	4	1	3	x
5	4	1	4	x
5	4	1	5	x
5	4	2	0	x
5	4	2	1	x
5	4	2	2	x
5	4	2	3	x
5	4	2	4	x
5	4	2	5	x
5	4	3	0	x
5	4	3	1	x
5	4	3	2	x
5	4	3	3	x
5	4	3	4	x
5	4	3	5	x
5	4	4	0	x
5	4	4	1	x
5	4	4	2	x
5	4	4	3	x
5	4	4	4	x
5	4	4	5	x
5	4	5	0	x
5	4	5	1	x
5	4	5	2	x
5	4	5	3	x
5	4	5	4	x
5	4	5	5	x
5	5	0	0	x
5	5	0	1	x
5	5	0	2	x
5	5	0	3	x
5	5	0	4	x
5	5	0	5	x
5	5	1	0	x
5	5	1	1	x
5	5	1	2	x
5	5	1	3	x
5	5	1	4	x
5	5	1	5	x
5	5	2	0	x
5	5	2	1	x
5	5	2	2	x
5	5	2	3	x
5	5	2	4	x
5	5	2	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

5	5	3	0	x
5	5	3	1	x
5	5	3	2	x
5	5	3	3	x
5	5	3	4	x
5	5	3	5	x
5	5	4	0	x
5	5	4	1	x
5	5	4	2	x
5	5	4	3	x
5	5	4	4	x
5	5	4	5	x
5	5	5	0	x
5	5	5	1	x
5	5	5	2	x
5	5	5	3	x
5	5	5	4	x
5	5	5	5	x

Table SI13. Hsf1 node.

Table entries: 216; references: 15, 16, 17.

RepX	Ssa1	Ssa2	<<Hsf1>> (true)
0	0	0	5
0	0	1	4
0	0	2	3
0	0	3	2
0	0	4	1
0	0	5	x
0	1	0	4
0	1	1	3
0	1	2	2
0	1	3	1
0	1	4	0
0	1	5	x
0	2	0	x
0	2	1	x
0	2	2	x
0	2	3	x
0	2	4	x
0	2	5	x
0	3	0	x
0	3	1	x
0	3	2	x
0	3	3	x
0	3	4	x
0	3	5	x
0	4	0	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

0	4	1	x
0	4	2	x
0	4	3	x
0	4	4	x
0	4	5	x
0	5	0	x
0	5	1	x
0	5	2	x
0	5	3	x
0	5	4	x
0	5	5	x
1	0	0	4
1	0	1	3
1	0	2	2
1	0	3	1
1	0	4	0
1	0	5	x
1	1	0	3
1	1	1	2
1	1	2	1
1	1	3	0
1	1	4	0
1	1	5	x
1	2	0	x
1	2	1	x
1	2	2	x
1	2	3	x
1	2	4	x
1	2	5	x
1	3	0	x
1	3	1	x
1	3	2	x
1	3	3	x
1	3	4	x
1	3	5	x
1	4	0	x
1	4	1	x
1	4	2	x
1	4	3	x
1	4	4	x
1	4	5	x
1	5	0	x
1	5	1	x
1	5	2	x
1	5	3	x
1	5	4	x
1	5	5	x
2	0	0	2

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

2	0	1	1
2	0	2	0
2	0	3	0
2	0	4	0
2	0	5	x
2	1	0	1
2	1	1	0
2	1	2	0
2	1	3	0
2	1	4	0
2	1	5	x
2	2	0	x
2	2	1	x
2	2	2	x
2	2	3	x
2	2	4	x
2	2	5	x
2	3	0	x
2	3	1	x
2	3	2	x
2	3	3	x
2	3	4	x
2	3	5	x
2	4	0	x
2	4	1	x
2	4	2	x
2	4	3	x
2	4	4	x
2	4	5	x
2	5	0	x
2	5	1	x
2	5	2	x
2	5	3	x
2	5	4	x
2	5	5	x
3	0	0	x
3	0	1	x
3	0	2	x
3	0	3	x
3	0	4	x
3	0	5	x
3	1	0	x
3	1	1	x
3	1	2	x
3	1	3	x
3	1	4	x
3	1	5	x
3	2	0	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

3	2	1	x
3	2	2	x
3	2	3	x
3	2	4	x
3	2	5	x
3	3	0	x
3	3	1	x
3	3	2	x
3	3	3	x
3	3	4	x
3	3	5	x
3	4	0	x
3	4	1	x
3	4	2	x
3	4	3	x
3	4	4	x
3	4	5	x
3	5	0	x
3	5	1	x
3	5	2	x
3	5	3	x
3	5	4	x
3	5	5	x
4	0	0	x
4	0	1	x
4	0	2	x
4	0	3	x
4	0	4	x
4	0	5	x
4	1	0	x
4	1	1	x
4	1	2	x
4	1	3	x
4	1	4	x
4	1	5	x
4	2	0	x
4	2	1	x
4	2	2	x
4	2	3	x
4	2	4	x
4	2	5	x
4	3	0	x
4	3	1	x
4	3	2	x
4	3	3	x
4	3	4	x
4	3	5	x
4	4	0	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

4	4	1	x
4	4	2	x
4	4	3	x
4	4	4	x
4	4	5	x
4	5	0	x
4	5	1	x
4	5	2	x
4	5	3	x
4	5	4	x
4	5	5	x
5	0	0	x
5	0	1	x
5	0	2	x
5	0	3	x
5	0	4	x
5	0	5	x
5	1	0	x
5	1	1	x
5	1	2	x
5	1	3	x
5	1	4	x
5	1	5	x
5	2	0	x
5	2	1	x
5	2	2	x
5	2	3	x
5	2	4	x
5	2	5	x
5	3	0	x
5	3	1	x
5	3	2	x
5	3	3	x
5	3	4	x
5	3	5	x
5	4	0	x
5	4	1	x
5	4	2	x
5	4	3	x
5	4	4	x
5	4	5	x
5	5	0	x
5	5	1	x
5	5	2	x
5	5	3	x
5	5	4	x
5	5	5	x

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

Table SI14. HSE-lacZ node.	
Table entries: 6; references: 5, 17, 18, 19, 23.	
Hsf1	<<HSE-lacZ>> (true)
0	0
1	1
2	2
3	3
4	4
5	11

Table SI15. Heat Shock node.	
Table entries: 6; references: 2, 3.	
Heat	<<Heat>> (false)
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0

References supporting Sections 3 and 4:

1. Geymonat M *et al.*: **Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:855-864.
2. Fig. 1, this work.
3. Section 2, Supplementary Information, this work.
4. Section 3, Supplementary Information, this work.
5. Fig. 7, this work.
6. Field J *et al.*: **Guanine nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* 1987, **7**:2128-2133.
7. Broek D *et al.*: **The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway.** *Cell* 1987, **48**: 789-799.
8. Tatchell K: **RAS genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Bacteriol* 1986, **166**:364-367.
9. Toda T *et al.*: **In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase.** *Cell* 1985, **40**:27-36.
10. Thevelein JM, De Winder JH: **Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Microbiol* 1999, **33**:904-918.
11. Kataoka T, *et al.*: **DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase.** *Cell* 1985, **43**:493-505.
12. Wigler M: **Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol* 1987 **7**:1371-1377.
13. Toda T *et al.*: **Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase.** *Cell* 1987, **50**:277-287.
14. Fig. 5, this work.
15. Fig. 6, this work.
16. Craig EA, Gross CA: **Is hsp70 the cellular thermometer?** *Trends Biochem Sci* 1991, **16**:135-140.
17. Wu C: **Heat shock transcription factors: structure and regulation.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:441-469.
18. Fernandes M *et al.*: **Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:167-173.
19. Raitt DC *et al.*: **The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**:2335-2347.
20. Bonner JJ *et al.*: **Complex regulation of the yeast heat shock transcription**

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

factor. *Mol Biol Cell* 2000, **11**:1739-1751.

21. Hahn JS *et al*: **Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:5249-5256.
22. Mollapour M *et al.*: **Swe1^{Wee1}-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function.** *Molecular Cell* 2010, **37**:333-343.
23. Figs. 2, 3, this work.
24. Figs. 4, and 8, this work.

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

Text S1:

The attractors for several simulated strains are presented here. Each row corresponds to a time step in the simulation, and the states are ordered by succession. This means that when multiple states are present in an attractor, the first state will be repeated after the last one over and over again. The average expression (over the attractor) for each node is shown below the dotted line. Basin sizes (sampled) and weights used for the WDM are shown at the end of the list of all the attractors for each network.

Network: WT

Total Attractors: 14

Attractor: 0

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	4	1	2	4	2	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	2	4	2	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	1	2	4	2	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	0	2	4	2	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	1	3	5	3	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	1	2	4	2	0	0	0	1	4	1	1	0

4.17	4.17	4.17	0.83	2.17	4.17	2.17	0.0	0.0	0.0	1.0	3.17	0.83	0.83	0.0

Attractor: 1

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	4	0	2	4	2	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	3	5	3	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	0	2	4	2	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	3	5	3	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	3	5	3	0	0	0	1	4	1	0	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

5 4 5 1 2 4 2 0 0 0 1 4 0 1 0

4.5 4.5 4.5 0.5 2.5 4.5 2.5 0.0 0.0 0.0 1.0 3.5 0.5 0.5 0.0

Attractor: 2

Cdc25 Ras2 cAMP Bcy1 Tpk1 Tpk2 Tpk3 Tpk1* Tpk3* RepX Ssa1 Ssa2 Hsf1 *HSE-lacZ* Heat

5 5 4 1 2 4 2 0 0 0 1 3 0 0 0

4 5 5 1 2 4 2 0 0 0 1 3 1 0 0

4 4 5 0 2 4 2 0 0 0 1 3 1 1 0

4 4 4 0 3 5 3 0 0 0 1 3 1 1 0

4 4 4 1 3 5 3 0 0 0 1 4 1 1 0

5 4 4 1 2 4 2 0 0 0 1 4 0 1 0

4.33 4.33 4.33 0.67 2.33 4.33 2.33 0.0 0.0 0.0 1.0 3.33 0.67 0.67 0.0

Attractor: 3

Cdc25 Ras2 cAMP Bcy1 Tpk1 Tpk2 Tpk3 Tpk1* Tpk3* RepX Ssa1 Ssa2 Hsf1 *HSE-lacZ* Heat

4 4 4 1 2 4 2 0 0 0 1 3 1 1 0

4.0 4.0 4.0 1.0 2.0 4.0 2.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.0 1.0 1.0 0.0

Attractor: 4

Cdc25 Ras2 cAMP Bcy1 Tpk1 Tpk2 Tpk3 Tpk1* Tpk3* RepX Ssa1 Ssa2 Hsf1 *HSE-lacZ* Heat

5 4 5 1 2 4 2 0 0 0 1 3 0 1 0

4 5 4 0 2 4 2 0 0 0 1 3 1 0 0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4	4	5	1	3	5	3	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	0	2	4	2	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	1	3	5	3	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	2	4	2	0	0	0	1	4	1	0	0

4.33	4.33	4.33	0.67	2.33	4.33	2.33	0.0	0.0	0.0	1.0	3.33	0.67	0.67	0.0
------	------	------	------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-----

Attractor: 5

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	0	2	4	2	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	0	3	5	3	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	3	5	3	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	0	3	5	3	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	0	3	5	3	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	1	3	5	3	0	0	0	1	4	0	0	0

4.83	4.83	4.83	0.17	2.83	4.83	2.83	0.0	0.0	0.0	1.0	3.83	0.17	0.17	0.0
------	------	------	------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-----

Attractor: 6

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	5	4	0	2	4	2	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	1	3	5	3	0	0	0	1	3	0	1	0

4.5	4.5	4.5	0.5	2.5	4.5	2.5	0.0	0.0	0.0	1.0	3.5	0.5	0.5	0.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

Attractor: 7

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	4	0	2	4	2	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	3	5	3	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	1	2	4	2	0	0	0	1	4	1	1	0

4.33	4.33	4.33	0.67	2.33	4.33	2.33	0.0	0.0	0.0	1.0	3.33	0.67	0.67	0.0

Attractor: 8

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	1	2	4	2	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	2	4	2	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	0	3	5	3	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	0	3	5	3	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	1	3	5	3	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	2	4	2	0	0	0	1	4	0	0	0

4.5	4.5	4.5	0.5	2.5	4.5	2.5	0.0	0.0	0.0	1.0	3.5	0.5	0.5	0.0

Attractor: 9

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	4	0	2	4	2	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	1	3	5	3	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	2	4	2	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	0	3	5	3	0	0	0	1	3	0	1	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4	5	4	0	3	5	3	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	1	3	5	3	0	0	0	1	4	0	1	0

4.67	4.67	4.67	0.33	2.67	4.67	2.67	0.0	0.0	0.0	1.0	3.67	0.33	0.33	0.0
------	------	------	------	------	------	------	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-----

Attractor: 10

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	5	0	2	4	2	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	0	3	5	3	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	1	3	5	3	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	2	4	2	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	3	5	3	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	2	4	2	0	0	0	1	4	1	0	0

4.5	4.5	4.5	0.5	2.5	4.5	2.5	0.0	0.0	0.0	1.0	3.5	0.5	0.5	0.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Attractor: 11

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	0	2	4	2	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	3	5	3	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	0	3	5	3	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	3	5	3	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	3	5	3	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	1	2	4	2	0	0	0	1	4	0	0	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4.67 4.67 4.67 0.33 2.67 4.67 2.67 0.0 0.0 0.0 1.0 3.67 0.33 0.33 0.0

Attractor: 12

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	5	0	2	4	2	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	0	3	5	3	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	3	5	3	0	0	0	1	4	1	0	0

4.67 4.67 4.67 0.33 2.67 4.67 2.67 0.0 0.0 0.0 1.0 3.67 0.33 0.33 0.0

Attractor: 13

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	0	3	5	3	0	0	0	1	4	0	0	0

5.0 5.0 5.0 0.0 3.0 5.0 3.0 0.0 0.0 0.0 1.0 4.0 0.0 0.0 0.0

Basins of Attraction

A:0 -> Basin: 650156 Percentage: 38.94959574029609% Weight: 0.3894959574029609 TotalConditions: 1669224.0

A:1 -> Basin: 52271 Percentage: 3.131455095301769% Weight: 0.03131455095301769 TotalConditions: 1669224.0

A:2 -> Basin: 203515 Percentage: 12.192192300134673% Weight: 0.12192192300134673 TotalConditions: 1669224.0

A:3 -> Basin: 324488 Percentage: 19.439452104690563% Weight: 0.19439452104690563 TotalConditions: 1669224.0

A:4 -> Basin: 185656 Percentage: 11.122293952159806% Weight: 0.11122293952159806 TotalConditions: 1669224.0

A:5 -> Basin: 3602 Percentage: 0.21578889352178018% Weight: 0.002157888935217802 TotalConditions: 1669224.0

A:6 -> Basin: 16091 Percentage: 0.9639808677565144% Weight: 0.009639808677565144 TotalConditions: 1669224.0

A:7 -> Basin: 90533 Percentage: 5.423657939258002% Weight: 0.054236579392580024 TotalConditions: 1669224.0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

A:8 -> Basin: 56086 Percentage: 3.3600044092344707% Weight: 0.033600044092344704 TotalConditions: 1669224.0

A:9 -> Basin: 13583 Percentage: 0.8137314105236925% Weight: 0.008137314105236925 TotalConditions: 1669224.0

A:10 -> Basin: 51953 Percentage: 3.1124043268009567% Weight: 0.031124043268009566 TotalConditions: 1669224.0

A:11 -> Basin: 14294 Percentage: 0.8563260533038106% Weight: 0.008563260533038106 TotalConditions: 1669224.0

A:12 -> Basin: 6825 Percentage: 0.4088726258429066% Weight: 0.004088726258429066 TotalConditions: 1669224.0

A:13 -> Basin: 171 Percentage: 0.010244281174965134% Weight: 1.0244281174965134E-4 TotalConditions: 1669224.0

Network: *bcy1Δ*

Total Attractors: 1

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	0	3	5	3	0	0	0	1	4	0	0	0

5.0	5.0	5.0	0.0	3.0	5.0	3.0	0.0	0.0	0.0	1.0	4.0	0.0	0.0	0.0

Basins of Attraction

A:0 -> Basin: 1230517 Percentage: 100.0% Weight: 1.0 TotalConditions: 1230517.0

Network: *ssa1Δ ssa2Δ*

Attractors: 1

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
1	1	1	4	0	2	0	0	0	0	0	0	5	11	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

1.0 1.0 1.0 4.0 0.0 2.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 5.0 11.0 0.0

Basins of Attraction

A:0 -> Basin: 1278495 Percentage: 100.0% Weight: 1.0 TotalConditions: 1278495.0

Network: *tpk1Δ tpk3Δ*

Total Attractors: 14

Attractor: 0

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	4	1	0	4	0	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	0	4	0	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	1	0	4	0	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	0	0	4	0	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	1	0	5	0	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	1	0	4	0	0	0	0	1	4	1	1	0

4.17 4.17 4.17 0.83 0.0 4.17 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.17 0.83 0.83 0.0

Attractor: 1

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	5	4	0	0	4	0	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	1	0	5	0	0	0	0	1	3	0	1	0

4.5 4.5 4.5 0.5 0.0 4.5 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.5 0.5 0.5 0.0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

Attractor: 2

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	4	4	0	0	4	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	1	0	5	0	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	0	4	0	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	1	0	4	0	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	0	0	4	0	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	1	0	5	0	0	0	0	1	3	1	1	0

 4.33 4.33 4.33 0.67 0.0 4.33 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.33 0.67 0.67 0.0

Attractor: 3

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	4	5	0	0	4	0	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	0	0	5	0	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	1	0	5	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	1	0	4	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	0	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	0	4	0	0	0	0	1	3	1	0	0

 4.33 4.33 4.33 0.67 0.0 4.33 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.33 0.67 0.67 0.0

Attractor: 4

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	5	0	0	4	0	0	0	0	1	3	0	1	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4	5	4	0	0	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	1	0	5	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	0	4	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	0	5	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	0	4	0	0	0	0	1	4	1	0	0

4.5	4.5	4.5	0.5	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.5	0.5	0.5	0.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Attractor: 5

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	4	4	1	0	4	0	0	0	0	1	3	1	1	0

4.0	4.0	4.0	1.0	0.0	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.0	1.0	1.0	0.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Attractor: 6

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	4	5	1	0	4	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	0	4	0	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	0	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0

4.33	4.33	4.33	0.67	0.0	4.33	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.33	0.67	0.67	0.0
------	------	------	------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-----

Attractor: 7

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
4	5	5	0	0	4	0	0	0	0	1	3	1	0	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4	4	5	0	0	5	0	0	0	0	1	3	1	1	0
4	4	4	0	0	5	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	1	0	5	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	0	4	0	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	1	0	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0

4.5	4.5	4.5	0.5	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.5	0.5	0.5	0.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Attractor: 8

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	5	1	0	4	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	0	0	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	0	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	0	0	4	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	0	5	0	0	0	0	1	3	0	1	0
4	5	4	1	0	5	0	0	0	0	1	4	1	0	0

4.5	4.5	4.5	0.5	0.0	4.5	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.5	0.5	0.5	0.0
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Attractor: 9

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	4	0	0	4	0	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	1	0	5	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	0	4	0	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	0	0	5	0	0	0	0	1	3	0	1	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4	5	4	0	0	5	0	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	1	0	5	0	0	0	0	1	4	0	1	0

4.67	4.67	4.67	0.33	0.0	4.67	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.67	0.33	0.33	0.0
------	------	------	------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-----

Attractor: 10

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	0	0	4	0	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	0	0	5	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	0	5	0	0	0	0	1	4	1	0	0
5	4	5	0	0	5	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	0	0	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	1	0	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0

4.83	4.83	4.83	0.17	0.0	4.83	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	3.83	0.17	0.17	0.0
------	------	------	------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	-----

Attractor: 11

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	1	0	4	0	0	0	0	1	4	0	0	0
5	5	5	0	0	4	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	0	0	5	0	0	0	0	1	3	1	0	0
4	4	5	0	0	5	0	0	0	0	1	4	1	1	0
5	4	4	0	0	5	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	1	0	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational approaches.

4.67 4.67 4.67 0.33 0.0 4.67 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.67 0.33 0.33 0.0

Attractor: 12

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	4	5	0	0	4	0	0	0	0	1	4	0	1	0
5	5	4	0	0	5	0	0	0	0	1	3	0	0	0
4	5	5	1	0	5	0	0	0	0	1	4	1	0	0

4.67 4.67 4.67 0.33 0.0 4.67 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 3.67 0.33 0.33 0.0

Attractor: 13

Cdc25	Ras2	cAMP	Bcy1	Tpk1	Tpk2	Tpk3	Tpk1*	Tpk3*	RepX	Ssa1	Ssa2	Hsf1	HSE-lacZ	Heat
5	5	5	0	0	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0

5.0 5.0 5.0 0.0 0.0 5.0 0.0 0.0 0.0 0.0 1.0 4.0 0.0 0.0 0.0

Basins of Attraction

A:0 -> Basin: 605315 Percentage: 39.804186404968135% Weight: 0.39804186404968134 TotalConditions: 1520732.0

A:1 -> Basin: 13726 Percentage: 0.9025916466543743% Weight: 0.009025916466543743 TotalConditions: 1520732.0

A:2 -> Basin: 162063 Percentage: 10.656907331469318% Weight: 0.10656907331469319 TotalConditions: 1520732.0

A:3 -> Basin: 169603 Percentage: 11.152721189532409% Weight: 0.1115272118953241 TotalConditions: 1520732.0

A:4 -> Basin: 42307 Percentage: 2.7820155030603684% Weight: 0.027820155030603682 TotalConditions: 1520732.0

A:5 -> Basin: 333343 Percentage: 21.919904361846793% Weight: 0.21919904361846795 TotalConditions: 1520732.0

A:6 -> Basin: 80798 Percentage: 5.31309921800817% Weight: 0.053130992180081694 TotalConditions: 1520732.0

A:7 -> Basin: 43195 Percentage: 2.840408434885305% Weight: 0.028404084348853054 TotalConditions: 1520732.0

Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in Saccharomyces cerevisiae: experimental and computational approaches.

A:8 -> Basin: 41668 Percentage: 2.739996264956613% Weight: 0.02739996264956613 TotalConditions: 1520732.0

A:9 -> Basin: 10276 Percentage: 0.6757272155777613% Weight: 0.006757272155777612 TotalConditions: 1520732.0

A:10 -> Basin: 2482 Percentage: 0.1632108747629431% Weight: 0.0016321087476294312 TotalConditions: 1520732.0

A:11 -> Basin: 10713 Percentage: 0.7044633768474655% Weight: 0.007044633768474655 TotalConditions: 1520732.0

A:12 -> Basin: 5163 Percentage: 0.3395075529416097% Weight: 0.003395075529416097 TotalConditions: 1520732.0

A:13 -> Basin: 80 Percentage: 0.005260624488733058% Weight: 5.260624488733057E-5 TotalConditions: 1520732.0

Table S4. Relative β -galactosidase activity values for all strains used in this work. Temperature of the measurement is indicated by the number preceding the low hyphen (25_ is 25°C). Values are expressed as the quotient strain/WT at 25°C. In each case, WT strain refers to the corresponding isogenic WT strain for each mutant (shown in bold face). As can be seen, there is no significant difference if a different WT strain is used (values in parenthesis), indicating that mating type differences and tryptophan auxotrophy do not influence HSE-dependent geneexpression.

Strain	strain/W303-1a at 25°C	strain/W303-6B at 25°C
25_ <i>ssa1</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	0.148218908	(0.153621695)
25_ <i>tpk1</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	0.190072264	(0.197000664)
25_ <i>tpk2</i> Δ	0.216427741	(0.224316836)
25_ <i>bcy1</i> Δ	0.285724405	(0.296139460)
25_ <i>tpk2</i> Δ <i>tpk3</i> Δ	0.372915284	(0.386508568)
39_ <i>ssa1</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	0.44303819	(0.459187552)
39_ <i>tpk1</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	0.516215719	(0.535032505)
25_ <i>skn7</i> Δ	(0.537727301)	0.557328214
39_ <i>tpk2</i> Δ	0.579878082	(0.60101545)
25_ <i>ssa2</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	0.618805163	(0.641361477)
39_ <i>bcy1</i> Δ	0.653442030	(0.677260907)
25_ <i>tpk1</i> Δ <i>tpk3</i> Δ	0.691029832	(0.716218836)
25_ <i>tpk1</i> Δ	0.704670726	(0.730356961)
39_ <i>tpk2</i> Δ <i>tpk3</i> Δ	0.717740151	(0.743902784)
39_ <i>ssa2</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	0.79872881	(0.827843593)
25_ <i>skn7</i> Δ <i>cdc25</i> Δ	(0.841549497)	0.872225154
25_ <i>tpk2</i> Δ	0.866466575	(0.898050495)
25_ <i>hsf1</i> - Δ <i>CTA</i>	(0.92167627)	0.95527266
25_ W303-6B	(0.964830575)	1
25_ W3031-a	1	(1.0364514)
25_ <i>tpk3</i> Δ	1.08863227	(1.12831444)
25_ <i>ssa1</i> Δ <i>ssa2</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	1.381222022	(1.431569498)
39_ <i>tpk1</i> Δ	1.447581865	(1.500348251)
25_ <i>ssa1</i> Δ	1.464506249	(1.517889552)
39_ <i>ssa1</i> Δ <i>ssa2</i> Δ <i>tpk2</i> Δ	1.674806117	(1.735855145)
39_ <i>skn7</i> Δ <i>cdc25</i> Δ	(1.709385544)	1.771695041
39_ <i>tpk2</i> Δ	1.830157041	(1.896868828)
25_ <i>ras2</i> Δ	1.889514230	(1.958389669)
39_ <i>hsf1</i> - Δ <i>CTA</i>	(1.149084106)	1.19096983
39_ <i>skn7</i> Δ	(2.143106871)	2.221226116
39_ <i>tpk1</i> Δ <i>tpk3</i> Δ	2.152018292	(2.230462371)
39_ W303-6B	(2.262514898)	2.344986733
39_ <i>tpk3</i> Δ	2.427752985	(2.516247979)

39_ <i>ras2</i> Δ	2.518856004	(2.610671832)
39_W303-1a	2.595151109	(2.68974800)
25_ <i>hsf1</i> -Δ <i>CTA</i> <i>cdc25</i> Δ	(1.657430875)	1.71784665
39_ <i>ssa1</i> Δ	3.175697746	(3.291456374)
25_ <i>cdc25</i> Δ	(3.376074632)	3.2573400028
25_ <i>ssa2</i> Δ	3.802821451	(3.941439616)
39_ <i>cdc25</i> Δ	(3.494700391)	3.371793787
39_ <i>hsf1</i> -Δ <i>CTA</i> <i>cdc25</i> Δ	(1.947576697)	2.018568594
39_ <i>ssa2</i> Δ	7.563223772	(7.838913867)
25_ <i>ssa1</i> Δ <i>ssa2</i> Δ	9.824683073	(10.18280652)
39_ <i>ssa1</i> Δ <i>ssa2</i> Δ	12.01638101	(12.45439492)

Apéndice 7.

Fe de erratas

Dónde dice:

“Cdc25 **positively** regulates HSE-dependent gene expression”

1.- Debería decir:

“Cdc25 **negatively** regulates HSE-dependent gene expression”

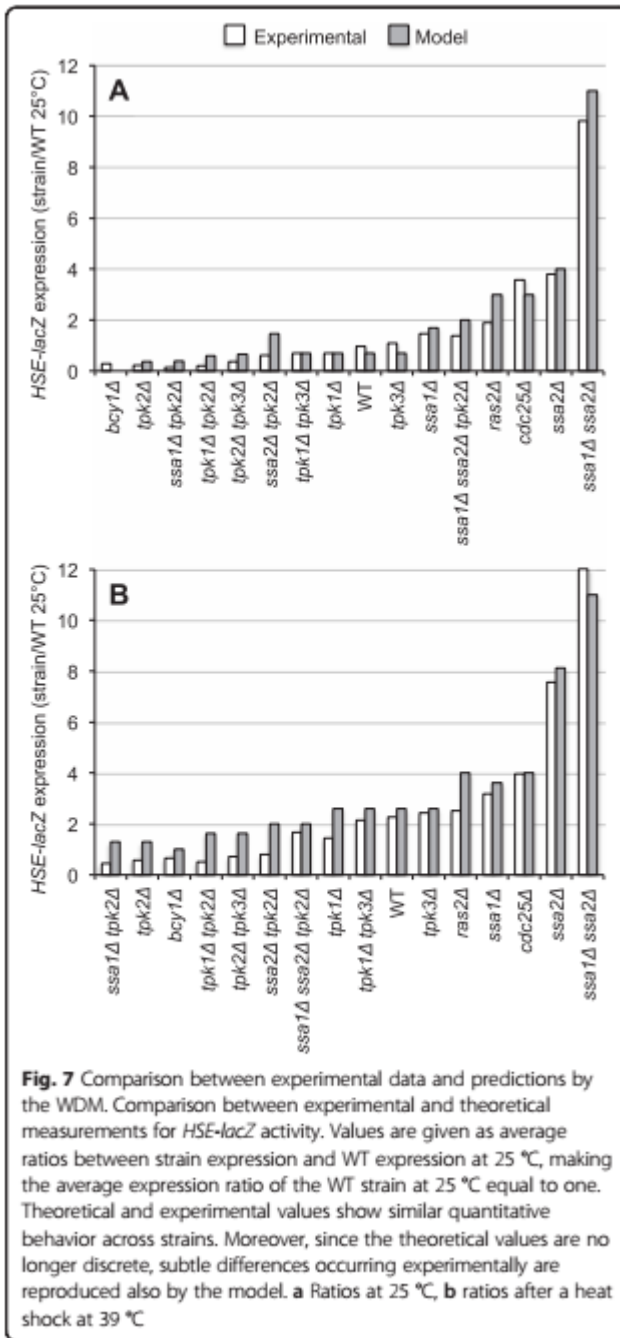
Dónde dice:

“On the contrary, cAMP-dependent PKA activity decreased in *tpk2Δ*, *tpk1Δ tpk2Δ*, and *tpk3Δ* mutants.”

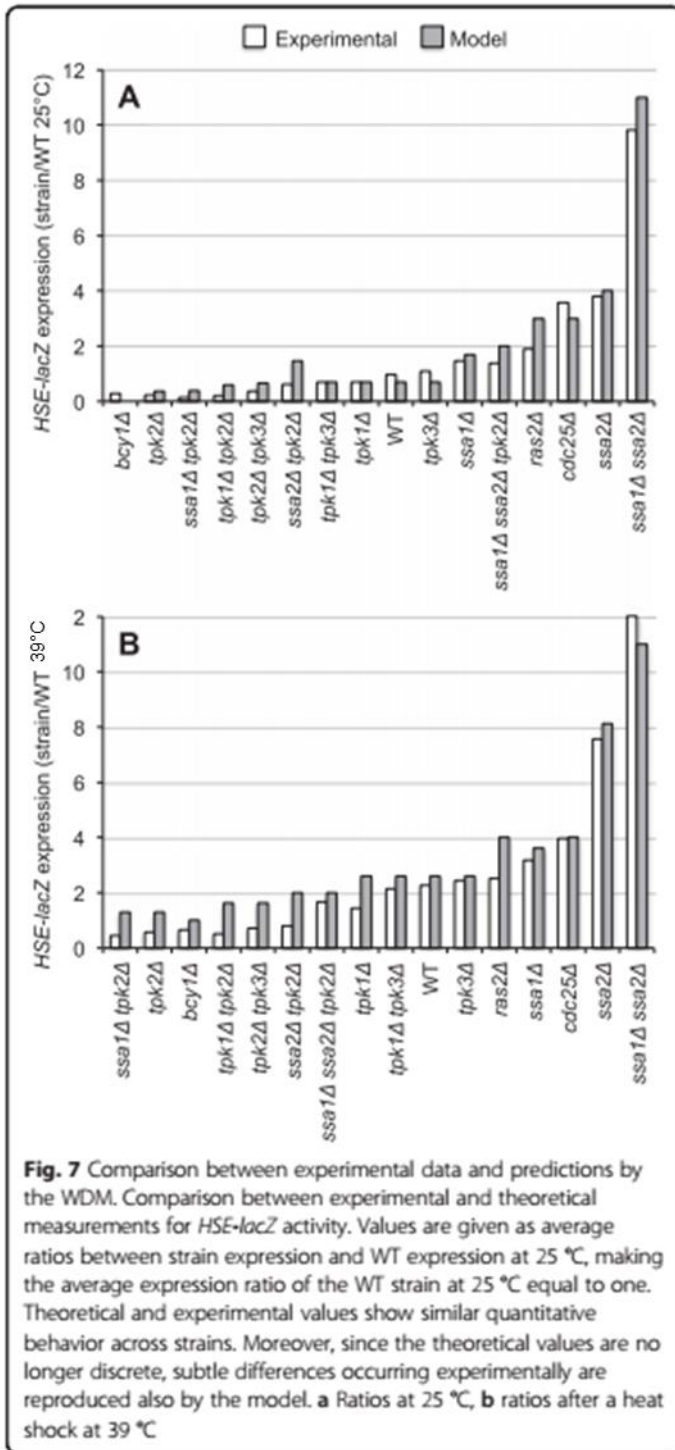
2.- Debería decir:

“On the contrary, cAMP-dependent PKA activity decreased in *tpk2Δ*, *tpk1Δ tpk2Δ*, and *tpk2Δ tpk3Δ* mutants.”

3.- Dónde dice:



Debería decir:



RESEARCH ARTICLE

Open Access



Complex regulation of Hsf1-Skn7 activities by the catalytic subunits of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*: experimental and computational evidences

Sergio Pérez-Landero^{1†}, Santiago Sandoval-Motta^{2†}, Claudia Martínez-Anaya³, Runying Yang⁴, Jorge Luis Folch-Mallof⁵, Luz María Martínez³, Larissa Ventura⁶, Karina Guillén-Navarro⁷, Maximino Aldana-González² and Jorge Nieto-Sotelo^{1*}

Abstract

Background: The cAMP-dependent protein kinase regulatory network (PKA-RN) regulates metabolism, memory, learning, development, and response to stress. Previous models of this network considered the catalytic subunits (CS) as a single entity, overlooking their functional individualities. Furthermore, PKA-RN dynamics are often measured through cAMP levels in nutrient-depleted cells shortly after being fed with glucose, dismissing downstream physiological processes.

Results: Here we show that temperature stress, along with deletion of PKA-RN genes, significantly affected HSE-dependent gene expression and the dynamics of the PKA-RN in cells growing in exponential phase. Our genetic analysis revealed complex regulatory interactions between the CS that influenced the inhibition of Hsf1/Skn7 transcription factors. Accordingly, we found new roles in growth control and stress response for Hsf1/Skn7 when PKA activity was low (*cdc25Δ* cells). Experimental results were used to propose an interaction scheme for the PKA-RN and to build an extension of a classic synchronous discrete modeling framework. Our computational model reproduced the experimental data and predicted complex interactions between the CS and the existence of a repressor of Hsf1/Skn7 that is activated by the CS. Additional genetic analysis identified Ssa1 and Ssa2 chaperones as such repressors. Further modeling of the new data foresaw a third repressor of Hsf1/Skn7, active only in the absence of Tpk2. By averaging the network state over all its attractors, a good quantitative agreement between computational and experimental results was obtained, as the averages reflected more accurately the population measurements.

Conclusions: The assumption of PKA being one molecular entity has hindered the study of a wide range of behaviors. Additionally, the dynamics of HSE-dependent gene expression cannot be simulated accurately by considering the activity of single PKA-RN components (i.e., cAMP, individual CS, Bcy1, etc.). We show that the differential roles of the CS are essential to understand the dynamics of the PKA-RN and its targets. Our systems level approach, which combined experimental results with theoretical modeling, unveils the relevance of the interaction scheme for the CS and offers quantitative predictions for several scenarios (WT vs. mutants in PKA-RN genes and growth at optimal temperature vs. heat shock).

Keywords: Yeast, Signal transduction, Hsf1 function, Skn7 function, Windowed discrete model

* Correspondence: jorge.nieto@ib.unam.mx

†Equal contributors

¹Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase (PKA) regulatory network (PKA-RN) is found in protozoa, animals, algae, and fungi. It plays a central role in the control of different inter- and intra-cellular processes such as metabolism, cell proliferation, stress response, and development [57, 84]. In yeast, the PKA-RN is also involved in the control of growth in response to nutrient conditions, which in turn are known to influence the stress response [84].

In *S. cerevisiae*, the PKA holoenzyme forms an inactive tetramer composed of two regulatory subunits (2 x Bcy1) [85] and two out of three CS (Tpk1, Tpk2, or Tpk3) [86]. When intracellular concentrations of cAMP increase, Bcy1 binds cAMP, promoting the activation by release of the CS. Two proteins, Gpa2 and Ras2, regulate adenylate cyclase, which catalyzes the synthesis of cAMP [14, 43, 84]. Formation of a Ras2-GTP complex [22], the active state of Ras2, requires the GDP-GTP exchange activity of Cdc25 [6]. Moreover, the intracellular concentrations of cAMP are also controlled by the phosphodiesterases Pde1 and Pde2 [84]. The low affinity phosphodiesterase Pde1 reduces cAMP levels in nutrient depleted cells soon after glucose addition [55], whereas the high affinity phosphodiesterase Pde2 lowers cAMP levels during the exponential and stationary phases of growth [62]. It is thought that the activity of the pathway increases at high levels of glucose (or other rapidly fermentable sugars) and declines when the cells deplete the sugars, or when entering stationary phase [84]. Therefore, the PKA activity is influenced by the amount of fermentable sugars and by the growth phase of the culture.

The growth phase of yeast liquid cultures impacts their level of thermotolerance. For instance, during the exponential phase cells are stress sensitive, whereas during the stationary phase they develop stress resistance [67, 91]. This behavior has been studied using genetic analysis. Stress resistance is explained through a reduced activity of the Ras-cAMP branch of the pathway (such as in *cdc25Δ*, *cyr1* or *ras1 ras2^{ts}* strains). These mutants grow slowly and show elevated basal thermotolerance during exponential phase [23, 25, 42, 64, 83]. In contrast, mutants with high PKA activity, such as *ira2*, *pde2*, *bcy1* or *RAS2^{val19}*, are very sensitive to temperature stress [19, 55, 62, 84, 87]. In exponential phase, basal thermotolerance is negatively regulated by the Rim15 protein kinase [67]. However, acclimation to high temperatures during the exponential phase requires the concerted action of Hsf1 and Msn2/Msn4 transcription factors, and chromatin remodeling complexes such as SWI/SNF [3, 18]. These factors allow the rapid transcription of genes encoding stress proteins involved in prevention and repair of damages caused by stress [3, 19, 33].

Hsf1 transcription factor is encoded by a single gene [76] and shows high affinity for the heat shock elements (HSE), found in the promoters of the heat shock genes

[21]. The essentiality of Hsf1 indicates that — besides being important for the response to carbon starvation as well as heat, osmotic, and oxidative stress — it also plays important functions in normal growth [3, 4, 76, 81]. The widespread functions regulated by Hsf1 explain its binding to a large number of promoters (about 3 % of the genes in the yeast genome). Among the functions of its targets are: protein folding, degradation, trafficking, cell integrity maintenance, transport, signaling, and transcription [33]. Hsf1 contains DNA binding and trimerization domains and is hyper-phosphorylated in serine and threonine residues in response to heat and oxidative stress [39, 76], modifications that activate its transcriptional activity [39, 76]. The PKA constitutively represses the activity of Hsf1, thereby inhibiting the expression of small heat shock protein genes [20]. It is documented that, in this regulation, the CS of PKA do not interact directly with Hsf1 [20]. Moreover, when the activity of the PKA is low, such as during glucose starvation, Hsf1 is phosphorylated and activated by Yak1 and Rim15 kinases [50, 51]. However, the factors that mediate the regulation of Hsf1 by the PKA in glucose-rich media, and in response to heat shock, are still unknown. In addition to Hsf1, Skn7 also recognizes HSE elements [66] and is part of a two-component system required for the signaling of the hypo-osmotic stress and the oxidative stress pathways [49, 82]. Previous reports have shown that the activity of Skn7 during the oxidative stress response is negatively-regulated by the PKA-RN [10].

Recently, it has become evident that results based only in experimental approaches, and the static models derived from them, are not sufficient to fully understand the complex dynamics of a cellular system. Rather, the integration of experimental data with dynamical modeling has expanded our current knowledge of the cell by enabling the prediction of hidden cellular behaviors. Thus, computational modeling is becoming an indispensable tool to comprehend the organization of biological systems [48, 80] and the analysis of the dynamics of the PKA-RN is no exception. Some studies of the PKA-RN considered only its core components and focused on the feed-back regulation of cAMP levels that nutrient-depleted cells display during the short-term response (i.e., seconds) to a pulse of glucose [8, 63, 93]. More recently, PKA-RN models simulate long-term growth (i.e., hours) in glucose [28] and evaluate targets downstream of the PKA [24, 29]. However, in all these models the activity of the three CS (Tpk1, Tpk2, and Tpk3) is considered as a single entity, assumption that might be correct in certain scenarios. Nonetheless, in most situations, this assumption could be misleading, as it is known that each CS has unique target specificities [65]. Furthermore, the CS regulate certain physiological processes in an antagonistic fashion [61, 68, 69],

complicating even more the prediction of the dynamics of the PKA-RN.

In this work, we performed a genetic analysis of the Cdc25-Ras2 branch and some downstream components of the PKA-RN (Fig. 1). We then incorporated these results into a dynamic computational model, to further understand the mechanistic nature of the network. HSE-dependent gene expression was chosen as the end product of the PKA-RN and the performance of cells growing exponentially in glucose-rich media, both at optimal temperature and in response to heat shock, was evaluated. We tested how the different PKA subunits (regulatory and each CS) interacted with each other. Novel

interactions, in addition to those already known, are described. Computational modeling of the PKA-RN was performed by extending the well-established “discrete dynamics modeling framework” [1, 38, 71, 90] in order to take into account the fact that gene expression measurements of batch cultures average out individual expression patterns. We named this extension, the Windowed Discrete Model (WDM) because it averages over a given time window the discrete values of the network elements in a given attractor, and weighs this average by the size of the corresponding basin of attraction. This process incorporates the whole set of steady states of the network and captures the inherent averages in

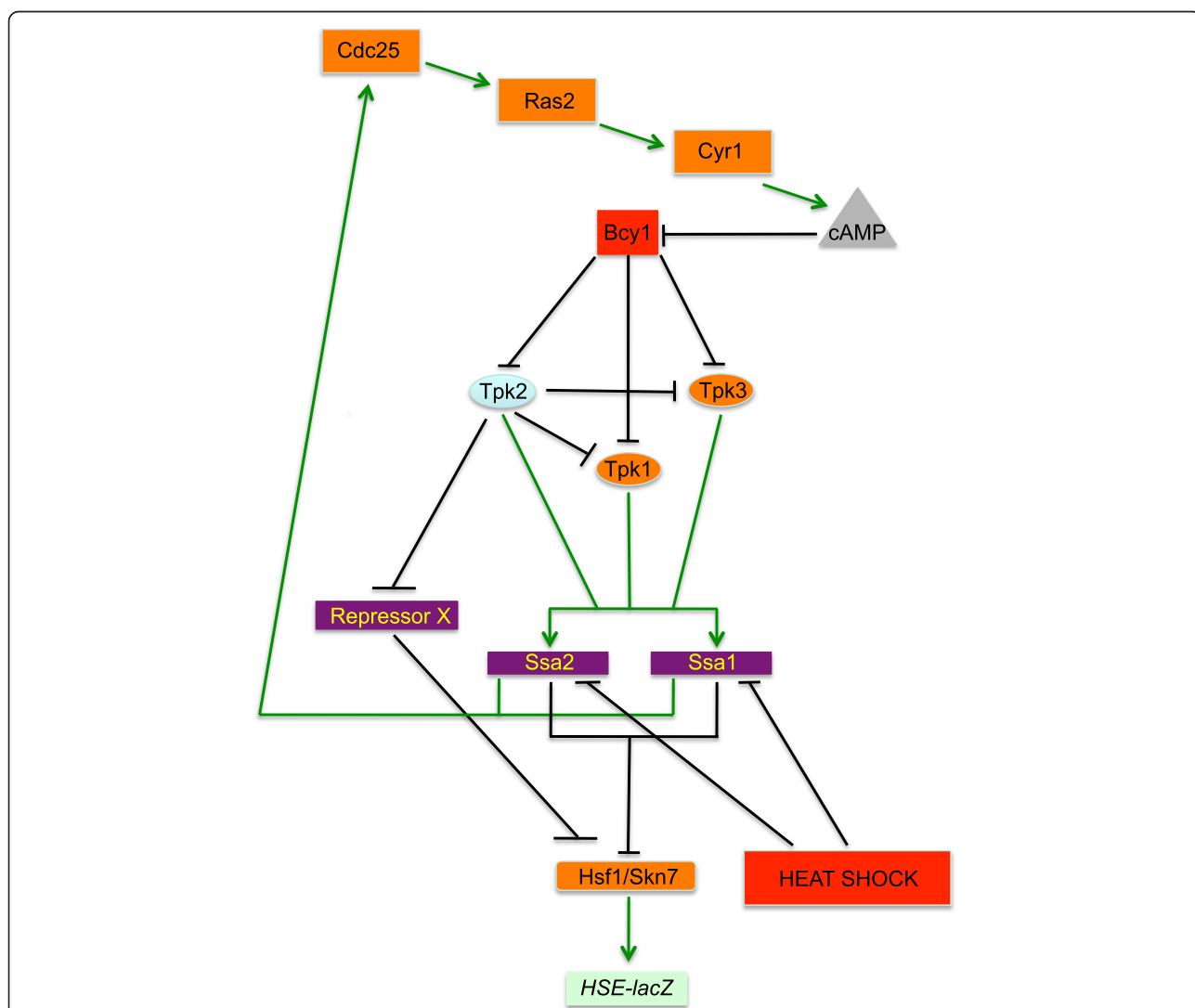


Fig. 1 Scheme for the development of a dynamic computational model for the simulation of the regulation of HSE-dependent gene expression by the PKA-RN. A PKA-RN composed of 15 elements was simulated in a dynamic computational model (see Additional file 3: Supplementary Information). In this scheme Cdc25, Ras2, Cyr1, Tpk1, Tpk3, Hsf1, and Skn7 act as positive regulators. Bcy1, an unidentified repressor of Hsf1/Skn7 (Repressor X), cAMP, and heat shock act as repressors. Interestingly, in this scheme Ssa1, Ssa2, and Tpk2 interactions are complex acting both as activators and as repressors. The experimental evidence that accounts for the activities and interactions of the components is described in the Background and Results and discussion sections

population measurements. Although discrete dynamic models are intended to describe expression patterns at the single-cell level, our approach allowed us to make quantitative predictions of gene expression patterns taken at the population level for both WT and mutant strains. Furthermore, we showed that when the population average inherent to batch cultures was implemented in the WDM, the results were similar regardless of the use of synchronous or asynchronous updating of the network elements.

Our genetic analysis showed that the PKA-RN controls HSE-dependent gene expression via Hsf1/Skn7 transcription factors. Modeling the control of Hsf1-Skn7 by the PKA-RN predicted the existence of a repressor connecting the CS with Hsf1-Skn7 and encouraged new genetic analyses that proved that Ssa1 and Ssa2 chaperones repress Hsf1/Skn7 when activated by the CS of PKA. Additionally, novel functions of Skn7 and of the C-terminal domain of Hsf1, such as growth control, thermotolerance, and resistance to H₂O₂, were revealed whenever the activity of PKA was low. Our model also predicted the existence of a still unidentified third repressor of Hsf1/Skn7, active only in the absence of Tpk2. The WDM explained and predicted HSE-dependent gene expression in WT and mutant strains with and without high temperature stress. We believe that our WDM of the PKA-RN can be useful to simulate other biological processes where the CS of PKA show similar antagonistic interactions, such as in the control of pseudohyphal growth or iron uptake [61, 68, 69].

Without further adaptations, the WDM is, to our knowledge, the first suitable tool based on discrete dynamics that can be used to simulate data obtained from population level measurements (batch cultures), despite of their known heterogeneity at the physiological and gene expression levels [23, 40, 53].

Results and discussion

Analysis of gene expression and dynamical modeling of the PKA-RN was performed during exponential growth. Measurements were taken under optimal temperature and after a heat shock at 39 °C (see Methods). The regulation of stress gene expression depends on complex transcriptional mechanisms. For example, in *S. cerevisiae* Msn2, Msn4, Hsf1, Yap1, and eight additional transcription factors contribute to the transcription of heat shock genes [95]. The PKA-RN also controls stress gene expression by inhibiting the activity of Msn2, Msn4, Hsf1, Yap1, and Skn7 [10, 20, 37, 75]. Because of this complexity, we decided to focus on the transcription factors Hsf1 and Skn7 in WT and PKA-RN deletion mutants by measuring the activity of an *HSE-CYC1-lacZ* reporter gene construct to test their *in vivo* activity (see Methods), as reported before [4, 47, 50, 58]. In our

hands, this reporter showed no activity in the absence of the HSE and its activity did not correlate with the plasmid copy number in the different strains analyzed (see Methods). Because the effect on HSE-dependent expression by deletions in PKA-RN genes is dependent on the genetic background ([17, 56], and our unpublished data), all mutants used in this work were derivatives of the same laboratory strain (W303). Previous studies have shown that in W303, the expression of several stress genes such as *HSP104*, *TPS1*, *CTT1*, *GPD1*, *HSP12*, and *HSP26* are inhibited by PKA [20, 23] and, in the case of *HSP12* and *HSP26*, their inhibition by PKA is mediated through Hsf1 [20].

Cdc25 positively regulates HSE-dependent gene expression

CDC25 deletion caused strong alterations in two well-known PKA-regulated processes: growth rate (decreased) and basal thermotolerance (increased) (Additional file 1: Table S1). HSE-driven β -galactosidase activity at 25 °C was 3.7-fold higher in *cdc25Δ* cells than in the WT strain (Fig. 2b). After heat shock, the WT strain increased the reporter activity 2.3-fold relative to the 25 °C condition. In *cdc25Δ* cells, β -galactosidase activity remained unchanged at both temperatures; noteworthy these levels were significantly higher than in the WT at 39 °C. These results indicate that *CDC25* down-regulates HSE-dependent gene expression in WT cells and they are consistent with previous findings showing that PKA inhibits Hsf1 activity [20].

Hsf1 and Skn7 mediate the high basal thermotolerance and constitutive HSE-dependent gene expression in *cdc25Δ* cells

Both Hsf1 and Skn7 transcription factors recognize HSEs [66, 76]. Therefore, we separately evaluated their contributions to the constitutively-elevated HSE-dependent expression in *cdc25Δ* cells. An Hsf1 lacking 250 residues at the C-terminal domain (*hsf1-ΔCTA*) was used instead of a full deletion of the ORE, because the function of *HSF1* is essential [60, 76]. At 25 °C the β -galactosidase activity in the *hsf1-ΔCTA* strain equated that of the WT but, unlike the WT, after a heat shock at 39 °C its β -galactosidase activity did not increase (Fig. 2a). This confirms that the C-terminal activation domain is required to elevate Hsf1 transcriptional activity in response to heat shock [60]. Furthermore, β -galactosidase levels in the double mutant *hsf1-ΔCTA cdc25Δ* decreased significantly compared to the single *cdc25Δ* mutant, both at 25 °C and after heat shock, supporting the idea that Cdc25 regulates Hsf1 (Fig. 2a). Accordingly, the basal thermotolerance (15 %) of *hsf1-ΔCTA cdc25Δ* cells decreased relative to the *cdc25Δ* single mutant (70 %) (Additional file 1: Table S2). Although

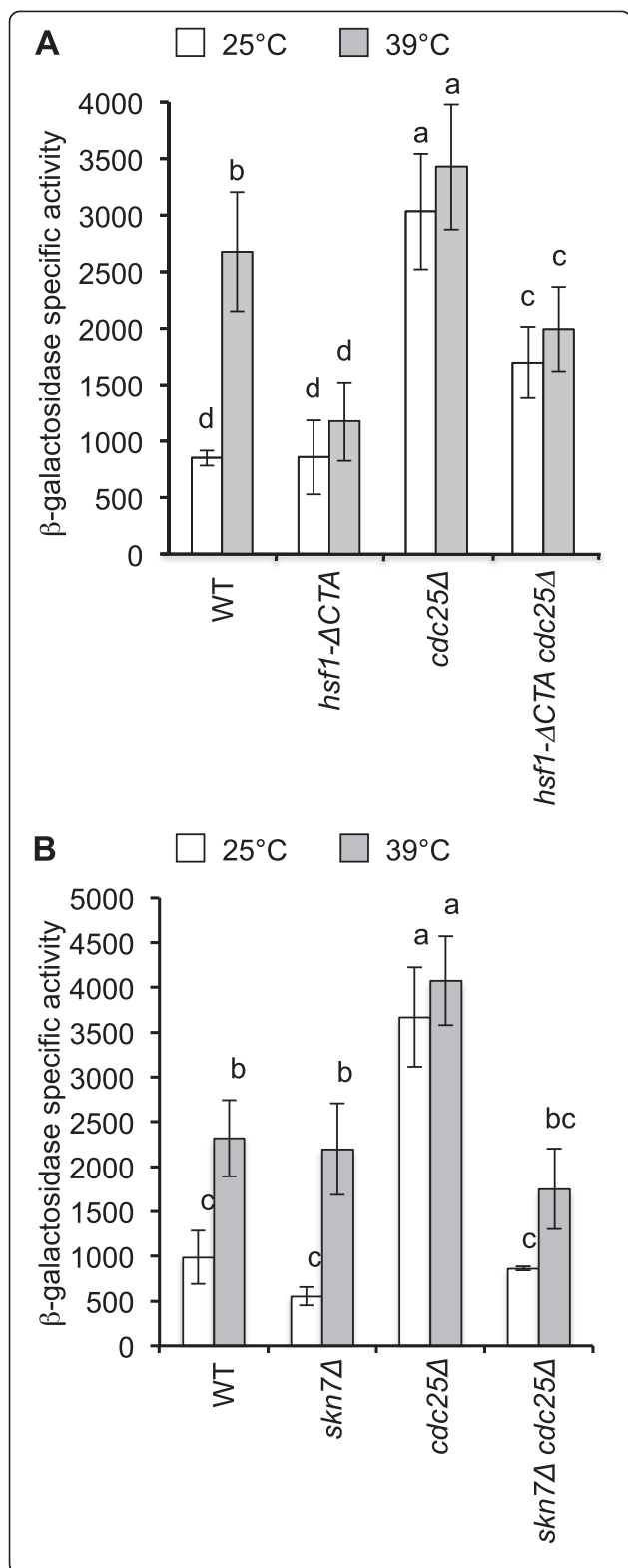


Fig. 2 De-repression of HSE-dependent gene expression in *cdc25Δ* cells is dependent on both Hsf1 and Skn7 activities. Strains transformed with reporter plasmid pRY016 (2 μ) were grown in SD medium at 25 °C until mid-exponential phase and treated at different temperatures as described in Methods section. Values are reported as β-galactosidase specific activity (nmol of hydrolyzed ONPG min⁻¹ mg⁻¹ protein) and are the average and standard deviation of at least three independent experiments. Bars that do not share at least a common letter differ significantly (*P* < 0.05). Strains assayed were: **a** WT (W303-6B), *hsf1-ΔCTA* (LM020), *cdc25Δ* (SL5001), and *hsf1-ΔCTA cdc25Δ* (SL6001). **b** WT (W303-6B), *skn7Δ* (SE1000), *cdc25Δ* (SL5001), and *cdc25Δ skn7Δ* (SL4001)

basal thermotolerance of *hsf1-ΔCTA* mutant was similar to the WT strain, its duplication time at 25 °C increased slightly (Additional file 1: Table S2). We also found that deletion of the C-terminal domain of Hsf1 suppressed the lack of growth of *cdc25Δ* cells in acetate or galactose at 25 °C. We suggest that the C-terminal domain of Hsf1 plays a negative role in the control of growth in non-fermentable media under conditions of low PKA activity. In yeast, humans and in Arabidopsis, Hsp70 interacts with the C-terminal activation domain of Hsf1 inhibiting its transcriptional activity [4, 45, 73]. We predict that the transcriptional activity and the growth-promoting potential of the full-length Hsf1, when the cell is under low PKA conditions, could be re-established by deletion of genes encoding Hsp70.

In WT cells, HSE-dependent expression increased at the beginning of the post-diauxic phase (Fig. 3). This observation agrees with the decline of PKA activity at this stage [84]. A similar pattern was observed in *cdc25Δ* cells, although their initial activity was already very high. Interestingly, the β-galactosidase activity in the double mutant *hsf1-ΔCTA cdc25Δ* was smaller than the activity in *cdc25Δ* cells, remaining constant during the exponential and post-diauxic phases. This indicates that the CTA domain of Hsf1 is required for maximal activity in low PKA cells. Unexpectedly, β-galactosidase levels in the *hsf1-ΔCTA* strain declined steadily as the culture advanced from exponential to the post-diauxic phase (Fig. 3). These observations reinforce the idea that Hsf1 activity is essential to enter the post-diauxic phase at optimal temperatures. Thus, the C-terminal domain of Hsf1 plays four novel functional roles at 25 °C when PKA activity is low: i) increases basal thermotolerance (Additional file 1: Table S3), ii) increases HSE-dependent gene expression (Figs. 2a and 3), iii) causes growth arrest in acetate, iv) causes growth arrest in galactose. These functions of the C-terminal domain of Hsf1 were not previously described [60, 76].

To analyze the contribution of Skn7, the double mutant *skn7Δ cdc25Δ* was also transformed with reporter plasmid pRY016. The β-galactosidase activity in *skn7Δ cdc25Δ* cells at 25 °C or after heat shock was lower than that of *cdc25Δ* cells (Fig. 2b). In contrast to *cdc25Δ hsf1-*

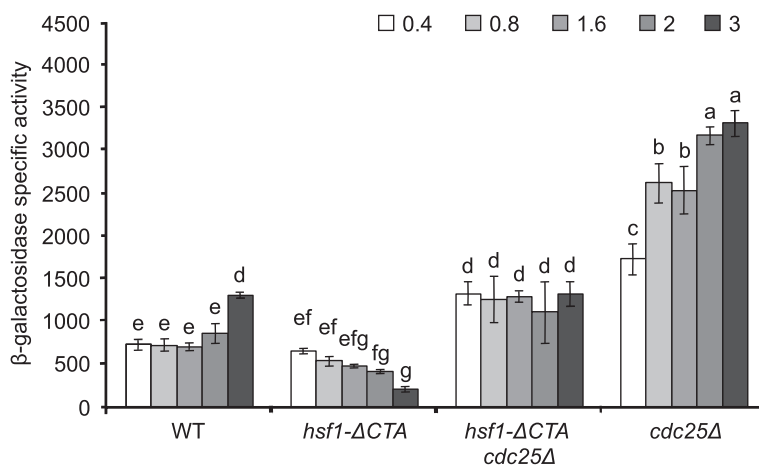


Fig. 3 Increase of HSE-dependent gene expression, during the post-diauxic phase of liquid cultures at 25 °C, requires Hsf1 activity. Strains containing plasmid pRY016 were grown in SD medium at 25 °C and aliquots were taken at the indicated culture densities (OD₆₀₀). Data shown represent the average and standard deviation of at least three independent experiments. β-galactosidase specific activities are reported as in Fig. 2. Bars that do not share at least a common letter differ significantly (*P* < 0.05). Strains assayed were: WT (W303-6B), *hsf1-ΔCTA* (LM020), *hsf1-ΔCTA cdc25Δ* (SL6001), and *cdc25Δ* (SL5001)

ΔCTA cells, β-galactosidase activity increased upon heat shock at 39 °C. However, this increase was not statistically significant (Fig. 2b). This indicates that, in the *cdc25Δ* strain, HSE-dependent expression is reliant on Skn7 for optimal temperature growth to a greater extent than after a heat shock. Furthermore, the basal thermotolerance and the duplication time of *cdc25Δ skn7Δ* cells decreased relative to *cdc25Δ* cells (Additional file 1: Table S2), while the inhibition of growth at 36 °C and in acetate or galactose as sole carbon sources at 25 °C were suppressed by *SKN7* deletion. In agreement with the involvement of Skn7 in the oxidative stress response [49], we observed that resistance of *cdc25Δ* cells to H₂O₂ decreased by deletion of *SKN7* (data not shown). The activity of the reporter gene in the single *skn7Δ* mutant was similar to the WT at 25 °C and after a heat shock at 39 °C (Fig. 2b). Together, these results indicate that, in cells growing at optimal temperature or when their PKA activity is low, Skn7 is required to achieve maximal basal thermotolerance and HSE-dependent gene expression. The contribution of Skn7 to the elevated HSE-dependent gene expression in response to heat shock was only marginal (Fig. 2b). Thus, heat induction of HSE-dependent gene expression in cells with low or high PKA activity depends mostly on Hsf1. However, we found that Skn7 plays new roles in other cellular processes at low PKA activity: i) inhibits growth at 25 °C, ii) It is required for H₂O₂ resistance, iii) causes growth arrest in glucose at 36 °C, iv) causes growth arrest in acetate at 25 °C, v) causes growth arrest in galactose at 25 °C.

Ras2 also regulates HSE-dependent gene expression

Ras2 is a positive regulator of the PKA-RN acting downstream of Cdc25. In a *RAS2* deletion mutant, basal

thermotolerance was 120-fold higher than in the WT strain [*P* = 0.002] (Additional file 1: Table S1). This difference was consistent with a constitutively elevated HSE-dependent gene expression at 25 °C (Fig. 4). Growth rate of the *RAS2* mutant was similar to the WT strain (Additional file 1: Table S1). The increased thermotolerance of *CDC25* and *RAS2* single mutants (Additional file 1: Table S1) confirmed that their PKA activity decreased.

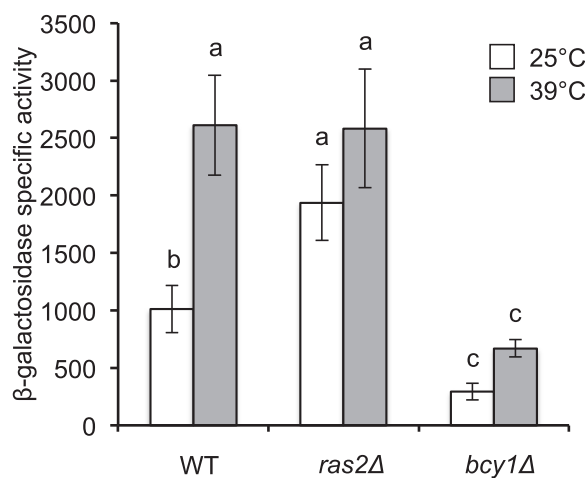


Fig. 4 Effect of *RAS2*, and *BCY1* deletions on HSE-dependent gene expression. Strains were transformed with plasmid pRY016 (2 μ) containing an *HSE-CYC1-lacZ* reporter gene. Growth and temperature treatments were performed as described in Methods section. Data shown represent the average and standard deviation of at least three independent experiments. β-galactosidase specific activities are reported as in Fig. 2. Bars that do not share at least a common letter differ significantly (*P* < 0.05). Strains assayed were: WT (W303-1a), *ras2Δ* (Wras2Δ) and *bcy1Δ* (CM0095)

However, the growth rate diminished only in the *CDC25*, but not in the *RAS2* mutant. This finding indicates that the control of basal thermotolerance is more sensitive to a low PKA cellular activity than duplication time is.

Deletion of *BCY1* represses the HSE-dependent gene expression

To evaluate whether cells with high PKA activity altered HSE-dependent gene expression in the opposite way to mutants with low PKA activity, such as *cdc25Δ* and *ras2Δ*, a deletion mutant of *BCY1* was studied. Indeed, HSE-dependent expression was repressed in *bcy1Δ* cells relative to the WT strain at 25 °C and after heat shock at 39 °C (Fig. 4). Consistent with these results, duplication time decreased in the *bcy1Δ* mutant, while basal thermotolerance remained the same as in the WT strain (Additional file 1: Table S1). Induced thermotolerance decreased dramatically in *bcy1Δ* cells (0.22 ± 0.4 % in the mutant vs. 72 ± 12 % in the WT with a $P < 0.001$). Moreover, cell viability in *bcy1Δ* cells was very poor, in agreement with previous results [85].

Tpk1 and Tpk3 inhibit HSE-dependent gene expression in the absence of Tpk2

To explore the possible differences between the CS of PKA, we first analyzed HSE-dependent expression in single *TPK* gene deletion mutants. In *tpk1Δ* cells HSE-dependent expression was slightly reduced at 39 °C but not at 25 °C when compared to the WT (Fig. 5). In

tpk3Δ cells HSE-dependent expression was not affected. Interestingly, HSE-dependent expression in the *tpk2Δ* mutant was highly repressed both at 25 °C and 39 °C. The basal thermotolerance of the three single mutants was similar to the WT strain (Additional file 1: Table S3). Duplication times of *tpk2Δ* or *tpk3Δ* mutants were similar to the WT strain. However, the *tpk1Δ* mutant showed a slower growth rate (Additional file 1: Table S3). Induced thermotolerance was reduced relative to WT in *tpk1Δ* and *tpk2Δ* mutants, but not in *tpk3Δ*. These results suggested that each CS plays a different role in the control of HSE-dependent gene expression, growth, and in basal- and induced-thermotolerance. In order to analyze the role of individual Tpk's, double *TPK* deletion mutants were studied. The β -galactosidase activities of *tpk1Δ tpk3Δ* cells growing at 25 °C or after heat shock at 39 °C were similar to their isogenic WT strain (Fig. 5). However, its basal thermotolerance and duplication time increased relative to the WT strain (Additional file 1: Table S3). In contrast, the β -galactosidase activities at 25 and 39 °C in cells containing only Tpk1 (*tpk2Δ tpk3Δ*) or Tpk3 (*tpk1Δ tpk2Δ*) were very low (Fig. 5), whereas their basal thermotolerance and duplication time were similar to the WT. However, the level of induced thermotolerance of *tpk1Δ tpk2Δ* was lower [$P = 0.05$] than in WT cells (Additional file 1: Table S3). In *tpk2Δ tpk3Δ* and *tpk1Δ tpk3Δ* cells, the induced thermotolerance levels were similar to the WT cells, supporting the idea that Tpk3 and Tpk1 hyper-repress the HSE-dependent gene expression when

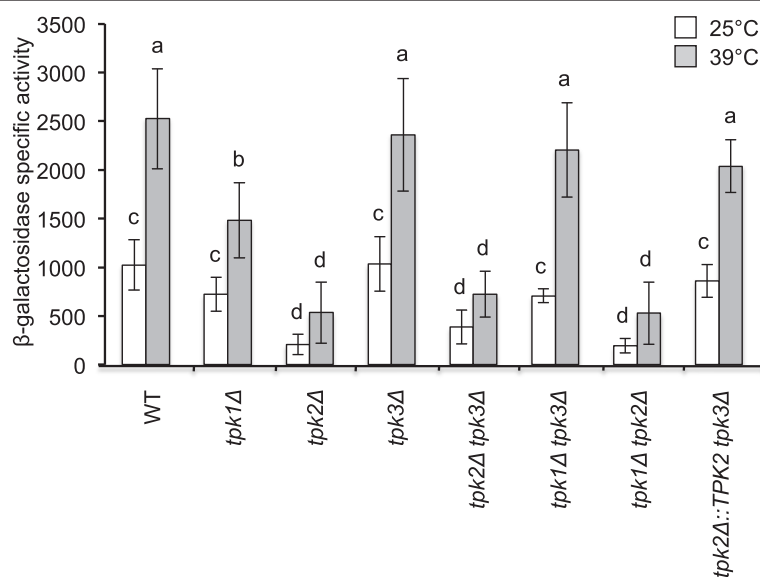


Fig. 5 Effect of *TPK* gene deletions on HSE-dependent gene expression. Strains were transformed with plasmid pRY016 (2 μ) containing an *HSE-CYC1-lacZ* reporter gene. Growth and temperature treatments were performed as described in Methods section. Values are reported as β -galactosidase specific activity (nmol of hydrolyzed ONPG $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) and are the average and standard deviation of at least three independent experiments. Bars that do not share at least a common letter differ significantly ($P < 0.05$). Strains assayed were: WT (W303-1a), *tpk1Δ* (KG712), *tpk2Δ* (KG604), *tpk3Δ* (KS580), *tpk2Δ tpk3Δ* (KS590), *tpk1Δ tpk3Δ* (KS700), *tpk1Δ tpk2Δ* (KS710), *tpk2Δ::TPK2 tpk3Δ* (KS590-URA3-TPK2)

acting as the sole PKA CS, and that Tpk3 represses the induced thermotolerance if acting as sole PKA CS. These results confirm the hypothesis that the activities of the CS are not redundant for the control of HSE-dependent gene expression, growth, basal or induced thermotolerance. Also, these findings imply that Tpk2 activity antagonizes Tpk1 and Tpk3 action, as has been suggested by other studies on the control of iron uptake and pseudohyphal growth [61, 68, 69].

Heat shock gene transcript levels are reduced when Tpk3 is the only CS

To learn more about the strong repressing activity of Tpk3 upon Hsf1, when Tpk1 and Tpk2 are absent, we studied the levels of several stress genes within the context of their natural promoters. As shown in Additional file 2: Figure S1, expression of the heat shock genes *HSP104*, *HSP82*, *SSA3*, *HSP26*, and *HSP12* at 25 °C was reduced in the *tpk1Δ tpk2Δ* mutant relative to the WT strain. This result is consistent with the low level of induced thermotolerance displayed by the *tpk1Δ tpk2Δ* mutant (Additional file 1: Table S3). Transformation of *tpk1Δ tpk2Δ* cells with *TPK2* in a CEN plasmid did not complement fully the HSE-dependent gene expression at WT levels (data not shown), most likely because *TPK2* gene copy number per cell was not 1, but 2.8 copies/cell. Transformation of the *tpk1Δ tpk2Δ* cells with *TPK2* in a 2 μ plasmid was toxic to the cell, explaining the surprisingly low copy number in the surviving cells (1.7 copies/cell).

Tpk2 antagonizes the activity of Tpk1

To further test the hypothesis that the loss of *TPK2* in the *tpk2Δ tpk3Δ* double mutant causes repression of HSE-dependent gene expression, the *TPK2* gene was returned to the *tpk2Δ tpk3Δ* double mutant using the *delitto perfetto* technique (see Methods) [30, 79], restoring the native copy number of the gene. This modification (*tpk2Δ::TPK2 tpk3Δ*) returned HSE-dependent expression to WT levels (Fig. 5), supporting the idea that Tpk2 antagonizes the activity of Tpk1 on HSE-dependent expression.

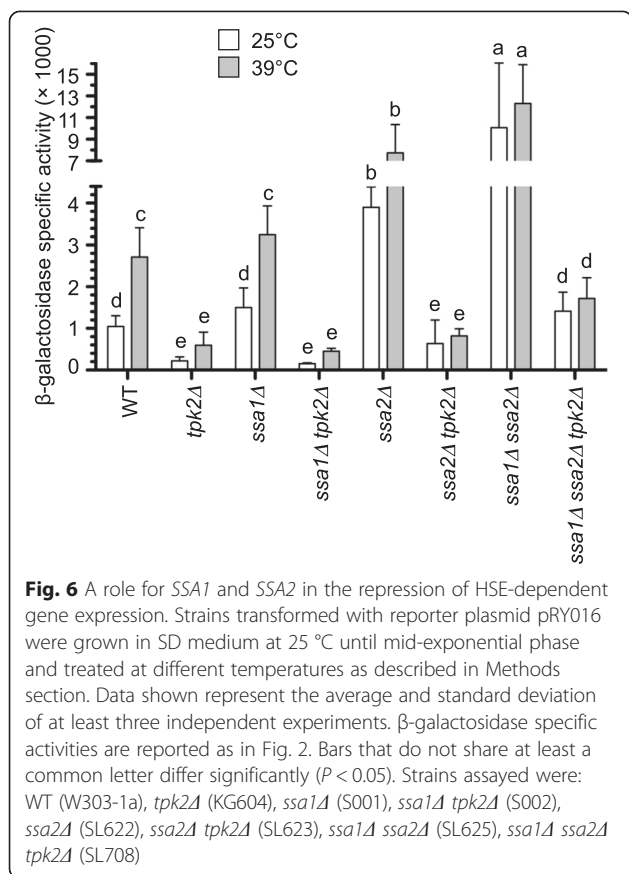
Catalytic activity of PKA in extracts from *TPK* mutants

We hypothesized that antagonism between Tpk2 and the other CS (Tpk1 and Tpk3) was due to drastic changes in the total PKA activity of the cell. Accordingly, we could expect that the total PKA activity in *TPK2* mutants (*tpk2Δ*, *tpk1Δ tpk2Δ*, and *tpk2Δ tpk3Δ*) would be high, whereas in the WT, *tpk1Δ*, *tpk3Δ*, and *tpk1Δ tpk3Δ* mutants the PKA activity would be low. After addition of cAMP, PKA activity in extracts from mutants *tpk1Δ*, *tpk3Δ*, and *tpk1Δ tpk3Δ* was similar to the WT (Additional file 2: Figure S2). On the contrary,

cAMP-dependent PKA activity decreased in *tpk2Δ*, *tpk1Δ tpk2Δ*, and *tpk3Δ* mutants. These results indicate that HSE-dependent expression is not a simple reflection of the overall PKA activity within the cell. Alternatively, one could also propose that deletion of a given *TPK* gene reduced the PKA activity in the cell in a proportional manner to its abundance in the WT. It is established that during exponential growth in liquid cultures yeasts contain a large proportion of Tpk1, followed by Tpk2, and Tpk3 being the one with the lowest abundance [88]. Thus, elimination of *TPK1* and/or *TPK2* should diminish dramatically the PKA activity in the cell. This was the case for *TPK2* deletions but not for *TPK1* deletions (Additional file 2: Figure S2), indicating again that deletion of a given *TPK* gene does not influence arithmetically the overall PKA activity in the cell. Therefore, dynamic mechanisms seem to define the final PKA activity in the WT and in a given *TPK* mutant (interactions between CS, compartmentalization, stability, etc.).

Ssa1 and Ssa2 mediate the inhibition of HSE-dependent gene expression

Our initial computational model assumed that the regulation of Hsf1/Skn7 by the CS was direct. However, under this design, predicted and experimental HSE-activities for several PKA-RN mutants gave contrasting results. Complete agreement between experimental and computational data was not achieved until a negative regulator was placed as an intermediary between the CS and Hsf1/Skn7 (see Fig. 1 and the following subsection). This idea was in accordance with previous findings demonstrating that the CS's do not interact directly with Hsf1 [20]. Therefore, we considered Hsp70 chaperones as putative intermediate inhibitors, because they are well-known negative regulators of Hsf1. Yeast mutants with decreased Hsp70 levels increase the expression of Hsps, enhance thermotolerance, and grow slowly. Additionally, these phenotypes are suppressed by a mutation in *HSF1* that decreases its DNA binding affinity [13, 34, 92]. These observations and others from both mammals and yeast reinforce a model that includes an autoregulatory loop in which Hsp70 represses Hsf1 activity [4, 12, 94]. Moreover, Ssa1 positively controls the PKA-RN by stabilizing Cdc25 at optimal temperatures [26] and, under stress, the Cdc25-Hsp70 complex dissociates leading to a loss of Cdc25 levels and a decrease in the activity of the PKA pathway [26]. Our experiments revealed that deletion of *SSA2* increased HSE-dependent gene expression (Fig. 6). Deletion of *SSA1* did not affect HSE-dependent gene expression significantly, indicating that *SSA2* suffices for maintaining WT activity. Deletion of both *SSA1* and *SSA2* largely increased the reporter activity, uncovering the contribution of both Hsp70 genes as repressors of HSE-dependent gene expression in WT



cells. Interestingly, deletion of *SSA1* or *SSA2* in a *tpk2Δ* background did not suppress the strong repression of HSE-dependent gene expression characteristic of the *tpk2Δ* single mutant (Fig. 6). However, the phenotype of the *tpk2Δ* mutant was suppressed in the triple mutant *ssa1Δ ssa2Δ tpk2Δ*, as its HSE-dependent expression was higher than in *tpk2Δ* cells (at 25 °C and 39 °C), similar to that of the *ssa1Δ* and the WT at 25 °C, and lower compared to *ssa1Δ* and the WT at 39 °C. These results implicated Ssa1 and Ssa2 not only as mediators of the strong repression of HSE-dependent gene expression, but also suggest the existence of an additional repressor of Hsf1/Skn7, active in the absence of Tpk2.

The dynamical model of the PKA-RN revealed an additional negative regulator of Hsf1

To thoroughly understand the implications of our observations we constructed a discrete dynamical model of the PKA-RN based both on our results and in the literature [4, 10, 19, 20, 23, 26, 60, 61, 66, 68, 69, 76, 78, 84, 89, 94]. As described in the Methods section, we have used an extension of a synchronous discrete modeling framework, as this type of modeling is known to accurately predict the behavior of several biological networks. One of the advantages of the discrete framework is that

it only requires knowledge about the regulatory nature of the interactions involved, contrary to reaction-kinetic differential equations that require the precise values for all the kinetic parameters and cooperativity exponents of the network elements. For a detailed review of the advantages and disadvantages of discrete and Boolean models compared to other frameworks consult [1, 38, 71, 90].

Briefly, our model consists on N elements $\{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_N\}$ whose dynamical states take integer values ranging from 0 to m_i , where m_i is the maximum level of activity (or level of expression) for element σ_i . Usually only two levels of activity are implemented: either the node is active ($\sigma_i = 1$) or it is inactive ($\sigma_i = 0$). However, often the functionality of a given node depends on whether it has a low, mild or high level of activity [9] and the binary description is not enough. This is the case here, as our experiments indicate that some nodes of the TPK-RN require distinction of up to six levels of activity (see Additional file 3: Sections 3 and 4 in the Supplementary Information). Additionally, as currently there is no information about the time scales implicated in the dynamics of the PKA-RN elements, for graphing we used a synchronous updating scheme (see Methods).

For each network (we will consider WT, *tpk1Δ*, etc., as different networks) we sampled about 10 % of the complete set of initial conditions (which consists of more than 4 billion points) looking for steady states of expression (attractors) (see Additional file 4: Text S1). As several initial conditions may fall into the same attractor, we define the size of the basin of attraction B_k as the number of initial conditions that fall into attractor K . Our extension of this traditional modeling framework consists in two simple modifications. First we averaged the level of expression for each element over a time window whose length equaled the attractor period. This gave us a single continuous value A_{ik} for each element σ_i in the k^{th} attractor. Then, to better represent the experimental measurements from liquid batch cultures where a single average expression level is obtained, we averaged the quantities A_{ik} over all the attractors of the network, weighted by the size of the corresponding basin of attraction (see Methods). Thus, contrary to other studies [9, 46, 52], we avoided discarding any attractor reached by the network deeming it as “non-biologically relevant”.

From now on, we will refer to this extension as the Windowed Discrete Model (WDM). This statistical treatment of data is supported by experimental studies showing that individual yeast cells in batch cultures exhibit different cell cycle phases, physiological states, and gene expression patterns that result in a heterogeneous population [23, 40, 53]. With this procedure, we were able to make a direct and semi-quantitative comparison between the model predictions and the experimental

measurements. The WT interaction network considered is shown in Fig. 1 and the logic rules governing the dynamics of the system are presented on the Supplementary Information (see Additional file 3: Section 3).

The modeled PKA-RN starts with the Cdc25-Ras branch. Cdc25 abundance and function are dependant on the activity of the Hsp70 chaperones (Ssa1 and Ssa2) [26]. Under optimal temperature and nutrients conditions, Cdc25 acts as the positive regulator of Ras2 activity [6, 22], which in turn activates Cyr1 (adenylate cyclase) [43]. The product of Cyr1, cAMP, negatively regulates the inhibition imposed by Bcy1 upon the CS Tpk1, Tpk2, and Tpk3 [84]. The CS were modeled as a module showing antagonism, as our results (Figs. 1 and 5) and those from others have suggested [61, 68, 69]. We propose that Tpk2 activity inhibits the activation of Ssa1 and Ssa2 by the Tpk1 and Tpk3 subunits. The implication for this interaction is that, in a WT background where the three CS are active, only the activity of Tpk2 is effective in activating Ssa1 and Ssa2 chaperones. The mechanistic basis for this antagonism remains to be studied. A systematic study of yeast kinases, made *in vitro*, showed that some CS have as substrates other CS. In particular, Tpk1 phosphorylates Tpk2 and Tpk3; Tpk3 phosphorylates Tpk2; and Tpk2 phosphorylates Tpk3 [65]. It remains to be seen whether the antagonism between the CS is caused by their mutual phosphorylation or whether it occurs via other indirect mechanisms.

As mentioned above (Fig. 6), the inhibition of the HSE-dependent expression by the PKA-RN requires the activation, by the TPKs, of an inhibitor of Hsf1 and Skn7. Ssa1 and Ssa2 (Hsp70 proteins) were introduced into the model as repressors of the HSE-dependent expression [4, 78] (Fig. 6). Moreover, based on the expression levels of the triple mutant *ssa1Δ ssa2Δ tpk2Δ* (Fig. 6), we included a third repressor of Hsf1/Skn7 that gets activated exclusively when Tpk1 and Tpk3 become the only CS (i.e., when Tpk2 is absent or at minimum levels). We believe that a very plausible candidate for such a repressor could be Hsp90, given that Hsp90 binds to Hsf1 [59, 96] and its deletion increases HSE-dependent expression [16]. Moreover, Tpk1 and Tpk3 phosphorylate Hsp82 (Hsp90) *in vitro* [65]; although the functional significance of this phosphorylation is unknown. It is plausible that the binding of Hsp90 to Hsf1 could be enhanced upon phosphorylation by Tpk1 or Tpk3, but this needs to be addressed experimentally. Similarly, Tpk1 and Tpk3 could enhance the repression of Hsf1 by other members of the Hsp70 family, such as Ssb1 or Ssb2, as it is known that Ssb1 and Ssb2 form complexes with Hsf1 and deletion of their genes also increases HSE-dependent expression [4]. However, more work is needed to identify the third repressor that is unleashed in the absence of Tpk2. In any case, it is important to stress that only by including the three repressors (Ssa1, Ssa2, and the

putative third repressor), the experimental measurements could be reproduced by the model.

Quantitative comparison between theoretical and experimental results corroborates the proposed regulatory interactions

To validate the simulations of our model, we compared the HSE-dependent expression results obtained computationally and those obtained experimentally in a number of mutant strains. Population measurements were reported as the ratio (strain expression level)/(WT expression level) and are presented in Additional file 1: Table S4. Figure 7 shows that the results obtained with the WDM closely resembled the experimental results obtained for all strains. The great concordance between theory and experiment suggests that the novel interactions proposed here for the PKA-RN are very likely true. Additionally, we also implemented several asynchronous updating schemes and the results that we obtained for the population expression level were almost identical regardless of the synchronicity or asynchronicity of the updating scheme (Additional file 2: Figure S3). This feature is quite relevant because, for a particular network (single-cell level) the use of asynchronous updating can significantly change the dynamical attractors of the network [15, 36] to the point that random asynchronous updating has been called inadequate in some scenarios [15]. We present the structure of the attractor landscape for the 25 °C WT network using synchronous updating (Additional file 2: Figures S5 and S6). As this example shows, different basins of attraction varying in size can be visualized. The WDM takes this fact into account to simulate subgroups of cells that might correspond to the different basins of attraction.

In addition to the population measurements, we present simulations for the temporal dynamics of Bcy1, cAMP, *HSE-lacZ*, and Tpk3 that, presumably, could be valid for single-cell measurements (Fig. 8). Each curve represents a simulation corresponding to a different strain (WT, *ssa1Δ ssa2Δ, tpk2Δ*, and *tpk1Δ tpk3Δ*) starting from a random initial condition. At time t_0 , an increase in the temperature was simulated by turning on the heat shock node. In the absence of Ssa1 and Ssa2 (Fig. 8, red lines), the levels of *HSE-lacZ* activity and Bcy1 increased dramatically, while the levels of cAMP and Tpk3 were very low. In the absence of Ssa1 and Ssa2, the dynamics of Tpk1 and Tpk2 were identical to Tpk3 (data not shown). The particular temporal dynamics observed in these simulations (oscillatory behavior, spikes, etc.) remain to be experimentally confirmed through the use of single-cell measurements. Nonetheless the predictions reported in Fig. 8 fit well the experimental data showing that *ssa1Δ ssa2Δ* mutants are constitutively resistant to high temperature and display elevated production of Hsp's and slow growth rates [34]. Deletion of *TPK2*

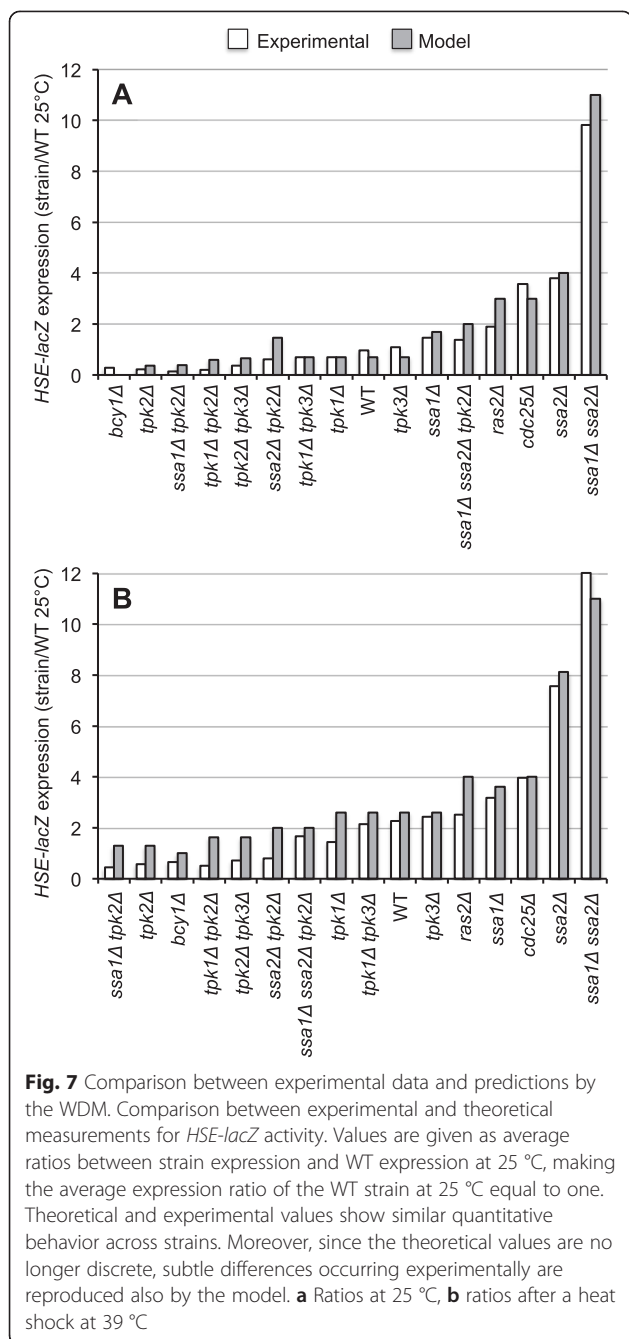


Fig. 7 Comparison between experimental data and predictions by the WDM. Comparison between experimental and theoretical measurements for *HSE-lacZ* activity. Values are given as average ratios between strain expression and WT expression at 25 °C, making the average expression ratio of the WT strain at 25 °C equal to one. Theoretical and experimental values show similar quantitative behavior across strains. Moreover, since the theoretical values are no longer discrete, subtle differences occurring experimentally are reproduced also by the model. **a** Ratios at 25 °C, **b** ratios after a heat shock at 39 °C

also decreased the expression of *HSE-lacZ* with respect to the WT, but more conspicuously at 39 °C than at 25 °C, consistent with the lower induced thermotolerance level in this mutant (Additional file 1: Table S3).

Conclusions

Our results clarified the control of Hsf1 and Skn7 by the PKA-RN, demonstrating that in the W303 strain, PKA represses Hsf1 and also Skn7 via Ssa1, Ssa2 and a third unidentified repressor. No single component of the PKA-RN could be used to predict accurately the

experimental levels of downstream targets (i.e., HSE-dependent gene expression) in all the situations studied. Instead, modeling of the PKA-RN showed that the observed experimental dynamics arose from the complex interactions of the network making it necessary to analyze the system as a whole. It remains to be unveiled the exact molecular mechanisms by which the PKA CS inhibit Hsf1 and Skn7 activities. Our results indicate that such mechanism must exist and it depends on Ssa1, Ssa2, and at least a third unidentified repressor. During PKA-RN controlled processes, such as pseudohyphal growth and iron uptake, the PKA CS display similar antagonistic relationships to those observed during the control of HSE-dependent gene expression. Tpk2, but not Tpk1 or Tpk3, is required for the induction of pseudohyphal growth and for the inhibition of genes involved in iron uptake [61, 68, 69]. Additionally, the fact that various updating and averaging schemes produced essentially the same results is quite interesting (Additional file 2: Figure S3), as this means that the WDM really captured the population average in batch cultures regardless of the specific updating scheme. To our knowledge, this is the first model with this property. Thus, with simple modifications, it can pave the way for the analysis of many other cellular responses at the population level apart from the PKA-RN.

Methods

Media and growth conditions

Yeast cells were grown at 25 °C in media prepared as previously described in [23], unless otherwise indicated. Duplication times of the strains were also calculated as described in [23].

Strains and plasmids

All strains employed are described in Additional file 1: Table S5. Strains with identical auxotrophies and other genetic markers were used in all experiments to avoid phenotypic differences due to marker effects. Integrative gene-disruption cassette *kanMX6* [31, 54] was used to generate strains with full disruptions in *CDC25*, *RAS2*, *BCY1*, *SKN7*, *TPK1*, *TPK2*, *TPK3*, *SSA1*, *SSA2*, or in the C-terminal transcriptional activation domain of Hsf1 (*hsf1-ΔCTA*) in strains W303-1a, W303-6B, JF3100 or JF3000. Transformants were selected on YPDA medium plus 300 μg ml⁻¹ of geneticin. The correct insertion of the cassette on each mutant was verified by PCR.

Reporter plasmid pRY016 (*HSE-CYC1-lacZ*) was generated by annealing oligonucleotides, HSEA and HSEB (Additional file 1: Table S6). Self-ligation products were separated by electrophoresis in agarose gels and the band corresponding to the dimer was eluted from the gel. The protruding ends were filled-in using the Klenow enzyme and ligated to *BgIII* adapters for cloning into the

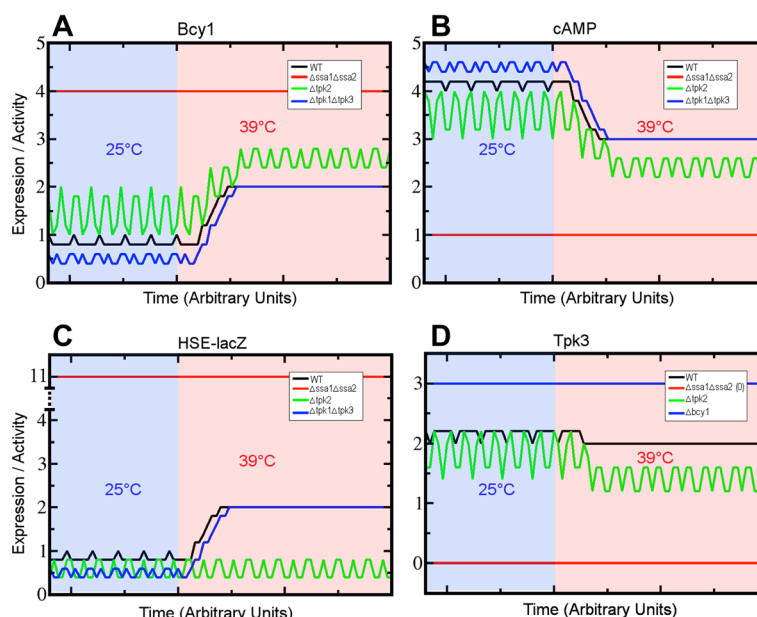


Fig. 8 Single-cell predictions of the temporal dynamics for Bcy1, cAMP, *HSE-lacZ* and Tpk3 in WT and three mutants. Temporal dynamics for four selected nodes: Bcy1 (a), cAMP (b), *HSE-lacZ* (c), and Tpk3 (d). Line colors correspond to different strains. Simulations were made starting from a random initial condition for each strain. Expression and time are given in arbitrary units. Background color represents the temperature of the culture: 25 °C (blue) and 39 °C (pink)

*Bgl*III site of plasmid pLGΔBS. Plasmid pLGΔBS is a high copy number 2 μ vector with a *CYC1-lacZ* fusion, lacking *UAS* and derived from the pLG669Z [35]. The resulting plasmid, pRY016, contained nine 5 bp units of the HSE consensus sequence nGAAn [21] arranged in both, sense and anti-sense orientations. To assess the dependency of β-galactosidase activity on the HSEs present in pRY016, the W303 WT strain and several PKA-RN mutants, we transformed them with a pRY016-derivative plasmid expressing the same *CYC1-lacZ* gene fusion but lacking HSEs. The β-galactosidase activity at 25 °C or after a heat shock at 39 °C in all strains was negligible (10 to 30 units) indicating that enzyme expression using pRY016 is indeed HSE-dependent. To investigate whether the levels of β-galactosidase activity in the strains used in this work were influenced by differences in the copy number of the reporter plasmid, pRY016 copy number was measured in all strains. The correlation coefficient of pRY016 plasmid copy number and β-galactosidase activity (Pearson's $r = 0.35341449$) was not significant ($P = 0.0765$) (Additional file 2: Figure S4). Therefore, the activity of the pRY016 reporter seems to be a reflection of actual changes in HSE-dependent gene expression influenced by the mutations and not by plasmid copy number.

Stress tolerance assays

Basal thermotolerance was measured as described [23]. To determine induced-thermotolerance, cultures were

exposed at 39 °C for 60 min prior to a 50 °C heat shock for 20 min. For both basal and induced thermotolerance, aliquots of each culture were taken before and immediately after the 50 °C treatment, and dilutions were plated on solid YPD to measure cell viability by colony counting. Thermotolerance levels are expressed as the percentage of the number of colonies after a heat shock divided by the number of colonies in the control sample.

Biochemical analysis

β-galactosidase assays were performed from exponentially grown cultures (OD_{600} between 0.4-0.6) in SD media as described [70]. β-galactosidase specific activity is expressed as nmol of hydrolyzed ONPG $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. To measure the response to a heat shock, cells were treated at 39 °C for 1 or 2 h as described [60, 77].

Genetic techniques and nucleic acid manipulations

DNA manipulations and genetic techniques were performed according to Sambrook, Fritsch & Maniatis [72] and Guthrie & Fink [32], respectively. DNA sequencing was performed at the Unit for DNA Synthesis and Sequencing of the *Instituto de Biotecnología*. Yeast transformation was performed following the method presented in [27].

RNA isolation and northern blot analyses

Total RNA was isolated from exponentially-growing cells in SD medium at 25 °C by the method of Collart and

Oliviero [11]. Aliquots (10 μ g) of total RNA were separated by electrophoresis on 1.2 % (w/v) agarose gels containing formaldehyde, transferred to IMMOBILON-NY+ membranes (Millipore) and hybridized as described by the manufacturer. The 3.0 kbp *Bam*HI fragment of clone pYS-Gal104 (courtesy of Dr. Susan Lindquist) was used as DNA probe to detect *HSP104* transcripts. Gene-specific DNA probes for *HSP82*, *SSA3*, *HSP26*, *HSP12*, and *ACT1* were amplified by PCR. Primer pairs used during PCR were: FSHSP82 and RSHSP82 for *HSP82*; fc-ssa3 and rc-ssa3 for *SSA3*; HSP26-F and HSP26-R for *HSP26*; HSP12-F and HSP12-R for *HSP12*; ACT1-1 and ACT1-2 for *ACT1* (Additional file 1: Table S5). Estimation of band intensities of autoradiograms was performed by image analysis with NIH Image 1.62 software. Data was normalized to account for differences between samples in actual total-RNA loading.

Estimation of plasmid copy number in yeast strains

Strains were grown under similar conditions to those of β -galactosidase assays. Southern blots of total genomic DNA were digested with *Pst*I and hybridized to the 340 bp *Pst*I–*Sca*I fragment of plasmid pRS3 encoding the N-terminus of *Ura3*. Copy number of pRY016 was estimated as the ratio of plasmid/genome *URA3* signal. Band intensities of autoradiograms were measured with NIH Image 1.62 software.

Complementation of strain *tpk2 Δ tpk3 Δ* by reintroduction of *TPK2* gene

Complementation of strain KS590 (*tpk2 Δ ::loxP tpk3 Δ ::loxP*), was carried by a protocol based on the *delitto perfetto* technique [30, 79]. First, the *URA3* gene was amplified by PCR using plasmid pRS306 [74] as template. Oligonucleotides FTPK2-URA3 and RTPK2URA3 contained 40 bp of sequence flanking each side of the *tpk2 Δ ::loxP* chromosomal deletion followed by *URA3* flanking sequences. The PCR product obtained was transformed by homologous recombination into strain KS590 to get strain KS590-URA3 (*tpk2 Δ ::URA3 tpk3 Δ ::loxP*). Finally, *URA3* gene in strain KS590-URA3 was evicted by interchanging *TPK2* using the product of a PCR reaction that amplified *TPK2* with TPK2-Ucl and TPK2-Lcl oligonucleotides. The resulting strain, KS590-URA3-TPK2 (*tpk2 Δ ::TPK2 tpk3 Δ ::loxP*), was selected by resistance to FOA at 1 mg/ml [7]. *TPK2* gene was re-amplified by PCR from KS590-URA3-TPK2 to select candidates with the correct DNA sequence.

Measurement of cAMP-dependent PKA activity

Cells were cultured in 50 ml of SD medium at an OD₆₀₀ of 0.4. After centrifugation, the pellet was washed in cold milliQ water and centrifuged once more. The washed pellet was frozen in liquid N₂. Cells were broken with a mortar and pestle under liquid N₂ and resuspended in extraction buffer (50 mM Tris pH 7.4, 20 mM β -mercaptoetanol,

0.5 mM PMSE, and 4 mg/ml COMPLETE™, a mixture of protease inhibitors [Roche, cat. no. 11697498001]). The total protein extract was centrifuged twice and the final supernatant was saved. Total protein was estimated by the Bradford method [5]. Finally, aliquots containing 4 mg of protein were assayed for PKA activity according to the Pep Tag® protocol (PROMEGA, cat. no. V5340). Activity was assayed in the presence or absence of 1 μ M cAMP. Only extracts from a *bcy1 Δ* mutant, used as a control, showed PKA activity in the absence of exogenous cAMP. WT and *TPK* mutants showed total dependency on cAMP for PKA activity.

Statistical analysis

All experiments were conducted at least three times. Comparisons between given pairs were analyzed using the two-tailed T Student test. Pairs of data were considered significantly different only when $P < 0.05$. For multiple comparisons, data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and differences between the means were compared by Tukey (one-way) or Bonferroni (two-way) post-tests. Treatments were considered as statistically different to the control when $P \leq 0.05$. Prism 5.0 software package was used.

The Windowed Discrete Model

The dynamic model consists of a network of 15 nodes representing the regulatory interactions of the PKA-RN shown in Fig. 1. Each node acquires a set of discrete values that represent the level of expression of the corresponding network element. Like many other discrete models available [2, 9, 52], ours focuses on the functional state of expression (or activation) of the network components, rather than on their exact concentrations. These functional states of expression are modeled through discrete variables that take a finite number of values. To capture the various levels of expression observed experimentally for the *HSE-CYC1-lacZ* reporter, the number of functional states for each node was determined by the maximum number of statistically-significant different groups of β -galactosidase activity displayed experimentally by the whole panel of WT and PKA-RN mutant strains during exponential phase (Figs. 2, 4, 5, and 6). Our final model consisted on two binary nodes, one ternary, four four-valued, one five-valued and seven six-valued elements. This gives a total of $\Omega = 4,299,816,960$ possible dynamical states for the network.

As in the standard Kauffman model [44], the network dynamics is given by the simultaneous updating of all the network elements according to the equation 1:

$$\sigma_n(t+1) = F_n(\sigma_n^1(t), \sigma_n^2(t), \dots, \sigma_n^{k_n}(t))$$

where $\sigma_n(t)$ represents the state of the n^{th} element of the network at time t , $\{\sigma_n^1, \sigma_n^2, \dots, \sigma_n^{k_n}\}$ are the k_n

regulators of σ_n and $F_n(\cdot)$ is a discrete function (also known as a logical rule) that determines the state of σ_n in terms of the states of its regulators. This function $F_n(\cdot)$ is constructed according to experimental evidence regarding the regulatory interactions (activator or inhibitor) for each node. All the functions $F_n(\cdot)$ for the PKA-RN are listed in the Supplementary Information (see Additional file 3: Section 3).

Since each variable acquires a finite number of states, there are also a finite number of possible dynamical configurations for the entire network, ranging from the configuration in which all the nodes are inactive, to the configuration in which all the nodes have reached their maximum values of activation. Once the dynamics from any of these possible configurations starts, successive iterations of Eq. (1) will make the network traverse through a series of states until a periodic pattern of activity is reached. This periodic activity is known as an attractor, and for each network several attractors might exist. Which attractor the network falls into depends on the initial condition the network starts from. The set of all the initial conditions that eventually fall into the same attractor is known as the *basin of attraction*. It has been previously shown that attractors represent the stable patterns of activity of the real biological system, and the basins of attraction correspond to the different ways to reach these stable states [41]. Nonetheless, a direct comparison of an attractor to HSE-dependent expression levels might not be so straightforward, as attractors may be often composed by several states (cyclic attractors) and experimental gene expression is often presented as a single value (e.g. β -galactosidase activity). Moreover, experimental measures of gene expression are commonly taken from a population of cells, which makes the final measurement an average. For this reason we have developed the WDM, where the state of each element of the network is represented by its average expression over a time window. In our model, the length of the window (L) for each realization corresponds to the length of the attractor reached. Although other sizes can be used with similar results, sizes bigger than the length of the attractor are not convenient as they tend to flatten the dynamics.

Additionally, since a network can have more than one attractor, we have calculated a weighted average using the entire set of attractors (N) for each network. Thus, we define the average expression level of σ_n as:

$$\sigma_n = \sum_{a=1}^N \omega_a \left(\frac{\sum_{\tau=1}^{L_a} \sigma_n(t_0 + \tau)}{L_a} \right)_a$$

where N is the number of different attractors and the external sum is carried out over all the attractors. The parameter ω_a is the fractional size of the basin of attraction of the a^{th} attractor ($\sum_{a=1}^N \omega_a = 1$). The internal sum is

carried out over the L_a states of the a^{th} attractor, and t_0 is a transient time long enough as to guarantee that the system has reached the attractor.

This simple modification, apart from allowing an easier comparison between the model and experimental data, resembles the way in which experimental data is gathered for gene expression in batch cultures, where traditionally measurements of the level of expression represent the population average, as cells in the population are at different stages of a stable pattern of gene expression (unless synchronization is enforced).

To simulate deletions in our numerical experiments, we just kept the value of the deleted node equal to zero throughout the dynamics, which represents the complete absence of that node.

Elevated temperatures increase the number of targets of the Hsp70s, reducing their positive interaction over Cdc25 [26] and the inhibition of Hsf1 [4, 89]. Therefore, heat shock (HS) was introduced into the model as a node of the PKA-RN that affects the functional state of Ssa1 and Ssa2. Its logical function corresponds to a positive auto regulation (see Additional file 3: Supplementary Information, Section 3). This means that whenever this node is active (which corresponds to the 39 °C condition), it remained active all the time. By contrast, the 25 °C condition is represented by inactivating the HS node and keeping it inactivated throughout the simulation time.

Availability of supporting data

All supporting data are included as additional files.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Growth and thermotolerance of WT yeast strains and mutants deleted in *CDC25*, *RAS2* or *BCY1*. **Table S2.**

Contribution of Hsf1 and Skn7 to the elevated thermotolerance and slow growth rate of the *cdc25Δ* mutant. **Table S3.** Growth and thermotolerance of WT or mutant yeast strains deleted in *TPK1*, *TPK2* or *TPK3*. **Table S4.** Relative β -galactosidase activity values for all strains used in this work. **Table S5.** Strains used in this study.

Additional file 2: Figure S1. Correlation analysis between pRY016 plasmid copy number and HSE-dependent gene expression. **Figure S2.** Levels of *HSP* transcripts in WT and *tpk2Δ tpk3Δ* mutant. **Figure S3.** Comparison of different updating schemes. **Figure S4.** cAMP-dependent PKA activity in extracts of WT and *TPK* deletion mutants. **Figure S5.** Reduced network used to compute the structure of the attractor landscape. **Figure S6.** Structure of the attractor landscape displayed by the WT reduced network shown in Figure S5C.

Additional file 3: Section 1. Synchronous and Asynchronous Updating Schemes. **Section 2.** Basins of attraction. **Section 3.** Assumptions and logical functions for the Windowed Discrete Model. **Section 4.** Logic Tables and discrete regulatory functions in the WT at 25 °C.

Additional file 4: Text S1. The attractors for several simulated strains are presented here.

Abbreviations

PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKA-RN: cAMP-dependent protein kinase regulatory network; CS: Catalytic subunits of PKA.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

SP-L, CM-A, RY, JLF-M, LMM, LV, and KG carried all the experimental work. SS and MA developed the computational model after discussions of the experimental work with SP-L and JN-S. JN-S conceived, designed, and coordinated the project. SP-L, SS, MA, and JN-S wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Sergio Pérez-Landero, Runying Yang, Jorge Luis Folch-Mallol, Larissa Ventura, Karina Guillén-Navarro and Jorge Nieto-Sotelo: This work initiated when these authors formerly worked at Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM (IN209599 and IN226506-3) and CONACYT-México (3461-N9310, 25303-N, 129471 and C01-39935) to J.N.-S. We thank A. Brands, F. R. Cross, F. Estruch, R. Gaxiola, T.-H. D. Ho, H. Nierlich, D.J. Stillman, and J. Thevelein for kindly providing plasmids or yeast strains. P. Gaytán and E. López assisted on oligonucleotide synthesis. J. Yañez helped on DNA sequencing and A. Martínez, J. M. Hurtado, and A. Ocadiz on computer support. J. L. Gama, M. de Jesús Sánchez, M. Ortiz and B. L. Arroyo-Flores provided technical help. C. Martínez-Anaya, R. Yang, and K. Guillén-Navarro thank Consejo Técnico de la Investigación Científica de la UNAM for postdoctoral fellowships. S. Pérez-Landero and L. Ventura received graduate student fellowships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – México (CONACYT-México) and were students of the Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM. M. Aldana thanks Fundación Marcos Moshinsky for a fellowship. SSM acknowledges the PDCB-UNAM, CCG-UNAM and CONACYT-Mexico for support through a PhD fellowship (269040/220732). We thank Gladys Cassab, Alicia González, and Brandon Gout for critically reading this manuscript.

Author details

¹Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico. ²Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico. ³Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico. ⁴Present Address: Department of Anesthesiology, Pharmacology & Therapeutics, The University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z4, BC, Canada. ⁵Present Address: Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62209 Cuernavaca, Mor., Mexico. ⁶Present Address: Grupo La Florida México, Tlalnepantla 54170, Edo. de Méx., Mexico. ⁷Present Address: El Colegio de la Frontera Sur, 30700 Tapachula, Chis., Mexico.

Received: 30 October 2014 Accepted: 30 June 2015

Published online: 27 July 2015

References

- Albert R. Boolean modeling of genetic regulatory networks. *Complex Networks Lecture Notes in Physics*. 2004;650:459–81.
- Albert R, Othmer HG. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the *Drosophila* segment polarity genes. *J Theor Biol*. 2003;223:1–18.
- Amoros M, Estruch F. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol*. 2001;39:1523–32.
- Bonner JJ, Carlson T, Fackenthal DL, Paddock D, Storey K, Lea K. Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. *Mol Biol Cell*. 2000;11:1739–51.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
- Broek D, Toda T, Michaeli T, Levin L, Birchmeier C, Zoller M, et al. The *S. cerevisiae* *CDC25* gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell*. 1987;48:789–99.
- Burke D, Dawson D, Stearns T. *Methods in Yeast Genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory Manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000.
- Cazzaniga P, Pescini D, Besozi D, Mauri G, Colombo S, Martegani E. Modeling and stochastic simulation of the Ras/cAMP/PKA pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* evidences a key regulatory function for intracellular guanine nucleotides pools. *J Biotechnol*. 2008;133:377–85.
- Chaos A, Aldana M, Espinosa-Soto C, García Ponce de León B, Garay Arroyo A, Alvarez-Buylla ER. From Genes to Flower Pattern and Evolution: Dynamic Models of Gene Regulatory Networks. *J Plant Growth Regul*. 2006;25:278–89.
- Charizanis C, Juhnke H, Krems B, Entian KD. The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 1999;261:740–52.
- Collart MA, Oliviero S: Preparation of yeast RNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Edited by Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. New York, NY; Wiley; 1993:pp. 13.12. Vol. 2.
- Craig EA, Gross CA. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci*. 1991;16:135–40.
- Craig EA, Jacobsen K. Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. *Cell*. 1984;38:841–9.
- Dhar R, Nieto A, Koller R, Defeo-Jones D, Scolnick EM. Nucleotide sequence of two rasH related-genes isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 1984;12:3611–8.
- Di Paolo EA. Rhythmic and non-rhythmic attractors in asynchronous random Boolean networks. *BioSystems*. 2001;59:185–95.
- Duina AA, Kalton HM, Gaber RF. Requirement for Hsp90 and a Cyp40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. *J Biol Chem*. 1998;273:18974–8.
- Engelberg D, Zandi E, Parker CS, Karin M. The yeast and mammalian Ras pathways control transcription of heat shock genes independently of heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1994;14:4929–37.
- Erkina TY, Tschetter PA, Erkin AM. Different requirements of the SWI/SNF complex for robust nucleosome displacement at promoters of heat shock factor and Msn2- and Msn4-regulated heat shock genes. *Mol Cell Biol*. 2008;28:1207–12217.
- Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. 2000;24:469–86.
- Ferguson SB, Anderson ES, Harshaw RB, Thate T, Craig NL, Nelson HCM. Protein kinase A regulates constitutive expression of small heat-shock genes in an Msn2/4p-independent and Hsf1p-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2005;169:1203–14.
- Fernandes M, Xiao H, Lis JT. Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:167–73.
- Field J, Broek D, Kataoka T, Wigler M. Guanine nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1987;7:2128–33.
- Folch-Mallol JL, Martínez LM, Casas SJ, Yang R, Martínez-Anaya C, López L, et al. New roles for *CDC25* in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2004;150:2865–79.
- Garmendia-Torres C, Goldbeter A, Jacquet M. Nucleocytoplasmic oscillations of the transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation. *Curr Biol*. 2007;17:1044–9.
- Garrett S, Broach J. Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, *YAK1*, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev*. 1989;3:1336–48.
- Geymonat M, Wang L, Garreau H, Jacquet M. Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 1998;30:855–64.
- Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*. 2002;350:87–96.
- Gonzalez K, Kayikçi Ö, Schaeffer DG, Magwene PM. Modeling mutant phenotypes and oscillatory dynamics in the *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-PKA pathway. *BMC Systems Biology*. 2013;7:40. doi:10.1186/1752-0509-7-40.
- Gonze D, Jacquet M, Goldbeter A. Stochastic modelling of nucleocytoplasmic oscillations of the transcription factor Msn2 in yeast. *J R Soc Interface*. 2008;5:S95–S109.

30. Gray M, Piccirillo S, Honigberg SM. Two-step method for constructing unmarked insertions, deletions and allele substitutions in the yeast genome. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;248:31–6.
31. Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:2519–24.
32. Guthrie C, Fink GR. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology.* New York: Academic Press; 1991.
33. Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5249–56.
34. Halladay JT, Craig EA. A heat shock transcription factor with reduced activity suppresses a yeast *HSP70* mutant. *Mol Cell Biol.* 1995;15:4890–7.
35. Harshman KD, Moye-Rowley WS, Parker CS. Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from *GCN4*. *Cell.* 1988;53:321–30.
36. Harvey I, Bossomaier T. Time out of joint: attractors in asynchronous random Boolean networks. In *Proceedings of the Fourth European Conference on Artificial Life.* Edited by Husbands P, Harvey I. Cambridge, MA: MIT Press; 1997: pp. 67–75.
37. Hasan R, Leroy C, Isnard AD, Labarre J, Boy-Marcotte E, Toledano MB. The control of the yeast H₂O₂ response by the *Msn2/4* transcription factors. *Mol Microbiol.* 2002;45:233–41.
38. Helikar T, Kochi N, Konvalina J, Rogers JA. Boolean modeling of biochemical networks. *The Open Bioinformatics Journal.* 2011;5:16–25.
39. Høj A, Jakobsen BK. A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J.* 1994;13:2617–24.
40. Holland SL, Reader T, Dyer PS, Avery SV. Phenotypic heterogeneity is a selected trait in natural yeast populations subject to environmental stress. *Environ Microbiol.* 2014;16:1729–40.
41. Huang S, Eichler G, Bar-Yam Y, Ingber DE. Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys Rev Lett.* 2005;94:128701–4.
42. Iida H. Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene. *Mol Cell Biol.* 1988;8:5555–60.
43. Kataoka T, Broek D, Wigler M. DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell.* 1985;43:493–505.
44. Kauffman S. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J Theoret Biol.* 1969;22:437–67.
45. Kim B-H, Schöffl F. Interaction between *Arabidopsis* heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *J Experiment Bot.* 2002;53:371–5.
46. Kim J, Vandamme D, Kim J-R, Garcia Munoz A, Cho K-H. Robustness and Evolvability of the Human Signaling Network. *PLoS Comput Biol.* 2014;10(7), e1003763. doi:10.1371/journal.pcbi.1003763.
47. Kirk N, Piper PW. The determinants of heat-shock element-directed *lacZ* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1991;7:539–46.
48. Klipp E, Liebermeister W, Wierling C, Kowald A, Lehrach H, Herwig R. *Systems Biology: A Textbook.* Wiley-VCH; 2009.
49. Kremes B, Charizanis C, Entian KD. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet.* 1996;29:327–34.
50. Lee P, Cho B-R, Joo H-S, Hahn J-S. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol.* 2008;70:882–95.
51. Lee P, Kim MS, Paik S-M, Choi S-H, Cho B-R, Hahn J-S. Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters.* 2013;587:3648–55.
52. Li F, Long T, Lu Y, Ouyang Q, Tang C. The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:4781–6.
53. Lidstrom ME, Konopka MC. The role of physiological heterogeneity in microbial population behavior. *Nat Chem Biol.* 2010;6:705–12.
54. Longtine MS, Mckenzie III A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, et al. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998;14:953–61.
55. Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM. The *PDE1*-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell.* 1999;10:91–104.
56. Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 1993;12:1997–2003.
57. Milenkovic L, Scott MP. Not lost in space: trafficking in the Hedgehog signalling pathway. *Sci Signal* 2010, 3 p. pe14 doi:10.1126/scisignal.3117pe14.
58. Mollapour M, Tsutsumi S, Donnelly AC, Beebe K, Tokita MJ, Lee MJ, et al. Swe1^{Wee1}-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function. *Mol Cell.* 2010;37:333–43.
59. Nadeau K, Das A, Walsh CT. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J Biol Chem.* 1993;268:1479–87.
60. Nieto-Sotelo J, Wiederrecht G, Okuda A, Parker CS. The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell.* 1990;62:807–17.
61. Pan X, Heitman J. Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3981–93.
62. Park JI, Grant CM, Dawes IW. The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327:311–9.
63. Pescini D, Cazzaniga P, Besozzi D, Mauri G, Amigoni L, Colombo S, et al. Simulations of the Ras/cAMP/PKA pathway in budding yeast highlights the establishment of stable oscillatory states. *Biotechnol Adv.* 2012;30:99–107.
64. Pringle JR, Hartwell LH: *The Saccharomyces cerevisiae cell cycle.* In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces.* Edited by Strathern J, Jones E, Broach J. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982:97–142. vol. Life cycle and inheritance.
65. Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, et al. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature.* 2005;438:679–84.
66. Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, et al. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 2000;11:2335–47.
67. Reinders A, Burckert N, Boller T, Wiemken AT, De Virgilio C. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev.* 1998;12:2943–55.
68. Robertson LS, Causton HC, Young RA, Fink GR. The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:5984–8.
69. Robertson LS, Fink GR. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:13783–7.
70. Rose M, Botstein D. Construction and use of gene fusions to *lacZ* (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* 1983;101:167–80.
71. Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. *Methods.* 2013;62:3–12.
72. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2nd edition; 1989.
73. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 1998;12:654–66.
74. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1989;122:19–27.
75. Smith A, Ward MP, Garrett S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 1998;17:3556–64.
76. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell.* 1991;65:363–6.
77. Sorger PK, Pelham HR. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J.* 1987;6:3035–41.
78. Stone DE, Craig EA. Self regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1990;10:1622–32.
79. Storic F, Lewis LK, Resnick MA. *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2001;19:773–6.
80. Szallasi Z, Stelling J, Periwál V. *System Modeling in Cellular Biology: From Concepts to Nuts and Bolts.* The MIT Press; 2006.
81. Tamai KT, Liu X, Silar P, Sosinowski T, Thiele DJ. Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol Cell Biol.* 1994;14:8155–65.
82. Tao W, Deschenes RJ, Fassler JS. Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. *J Biol Chem.* 1999;274:360–7.

83. Tatchell K. *RAS* genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1986;166:364–7.
84. Thevelein JM, De Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 1999;33:904–18.
85. Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, et al. Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987;7:1371–7.
86. Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell.* 1987;50:277–87.
87. Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, et al. In yeast, *RAS* proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell.* 1985;40:27–36.
88. Tudisca V, Recouvreux V, Moreno S, Boy-Marcotte E, Jacquet M, Portela P. Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *Eur J Cell Biol.* 2010;89:339–48.
89. Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU. Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:a004390.
90. Wang R-S, Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Phys Biol.* 2012;9:055001.
91. Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC, Singer RA. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 1993;57:383–401.
92. Werner-Washburne M, Stone DE, Craig EA. Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987;7:2568–77.
93. Williamson T, Schwartz JM, Kell DB, Stateva L. Deterministic mathematical models of the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Systems Biology.* 2009;3:70. doi:10.1186/1752-0509-3-70.
94. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:441–69.
95. Wu WS, Li WH. Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast. *BMC Genomics.* 2008;9:439. doi:10.1186/1471-2164-9-439.
96. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell.* 1998;94:471–80.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



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

Sergio Pérez-Landero y Jorge Nieto-Sotelo

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

RESUMEN

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

PALABRAS

CLAVE:

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

ABSTRACT

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

KEY WORDS:

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

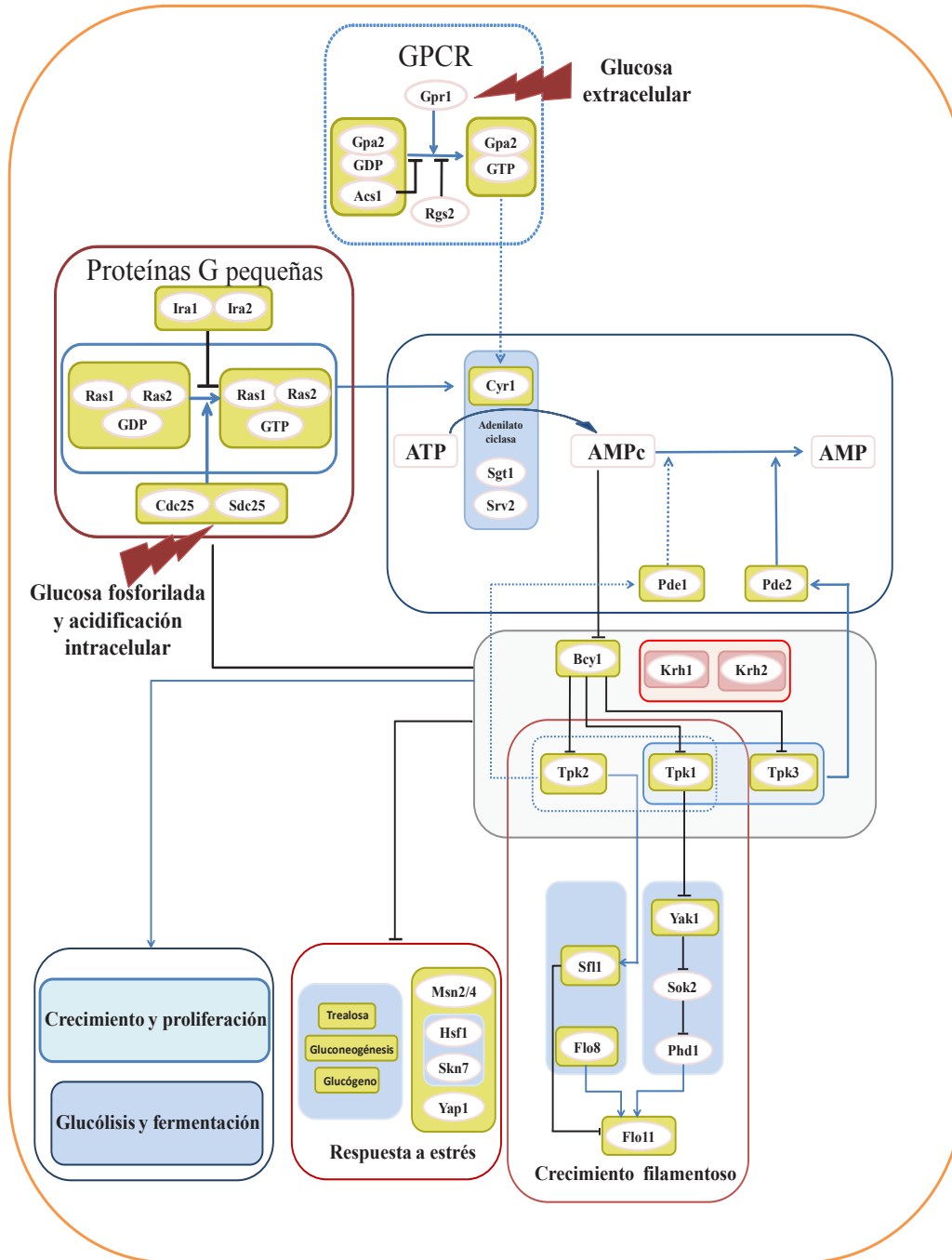


Figura 1. Esquema de la ruta de transducción de señales de la PKA en *S. cerevisiae*. Los cuadros representan a componentes de la vía que actúan de manera más íntima permitiendo apreciar claramente las interacciones entre los distintos módulos que la componen. La ubicación espacial intracelular y la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

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

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

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

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

LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS Y REGULATORIAS DE LA PKA

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

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

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

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

LA COMPARTAMENTALIZACIÓN Y LA RETRO-REGULACIÓN DE LA PKA

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

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

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

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

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

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

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

LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA AL ESTRÉS

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

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

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

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

LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO FILAMENTOSO

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

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

LA INTEGRACIÓN DE LAS INTERACCIONES

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

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

CONCLUSIONES

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

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

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



TABLA I

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

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

REFERENCIAS

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

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