

03088

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Instituto de Biotecnología

CARACTERIZACION DEL GEN *SITPS1* DE *Selaginella
lepidophylla* POR COMPLEMENTACION FUNCIONAL
DE *Saccharomyces cerevisiae*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA

José Oscar Mascorro Gallardo

Esta tesis fue co-dirigida por

Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente

y

Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles

277924

Cuernavaca, Morelos a Abril del 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Roberto Gaxiola, sin cuyo apoyo difícilmente hubiera podido iniciar mis estudios de doctorado en el IBT, por haberme mostrado las maravillas de las levaduras y más que nada por su amistad.

A Alejandra Covarrubias, por haberme dado cabida en su grupo y por todo el apoyo que me brindó durante los casi 5 años que estuve en su laboratorio.

A Gabriel Iturriaga, por la confianza que me tuvo desde el principio y por permitirme colaborar en uno de sus proyectos de investigación más importantes e interesantes y desarrollarlo como mi trabajo de tesis doctoral.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dra. Alejandra A. Covarrubias, Dr. Jorge Nieto, Dr. Antonio Peña; y en diferentes etapas al Dr. Roberto Gaxiola y al Dr. Gabriel Iturriaga, por su inapreciable guía durante mis estudios de doctorado.

A los miembros del jurado, Dr. Gabriel Iturriaga, Dra. Alejandra Covarrubias, Dra. Alicia González, Dra. Rosana Sánchez, Dr. Mario Soberón, Dr. Guillermo Gosset y Dra. Patricia León, por su criticismo y las valiosas observaciones que han hecho posible mejorar este escrito de tesis.

A los compañeros del laboratorio con quienes tuve una fraterna y añorable convivencia: Blanca, Adriana, Chema, Pancho, Lizpapa, Magda, Claudia, Esperanza, Emmanuel, Jordi, Larissa, Luzma, Rosy, Sergio, Doña Chuy, Lupita, José Luis y en la última etapa Sonia, Abraham, Marina e Isadora.

A los maestros y autoridades de la Universidad Autónoma Chapingo, por el apoyo y el estímulo brindados para realizar este doctorado.

A mis compañeros de la Academia de Genética en Chapingo, Lupita, José Luis, Pat, Mago, Jesús, Edith, Benjamín, Abel y Ernestina, por su apoyo incondicional y por ser un grupo tan abierto al cambio y a la superación.

A Edith, por su amistad desinteresada, por esas charlas existenciales y por ayudarme a encontrarle gusto y sentido a esta aventura extraordinaria que es la vida.

A Paco por su honestidad intelectual y a Sergio por su sencillez y nobleza, con quienes compartí lo cotidiano en Cuernavaca y a quienes les agradezco su amistad.

A Lety, por ese amor que me entregas todos los días, por enseñarme a reír con más frecuencia y por ese don que tienes de siempre ver lo bueno y lo positivo de la vida.

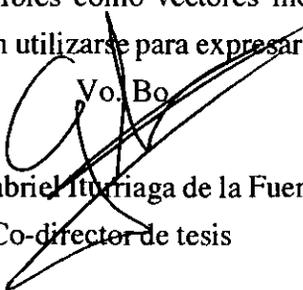
RESUMEN

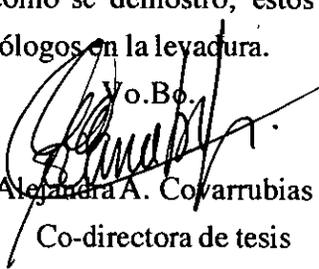
La acumulación del disacárido trehalosa en los organismos anhidrobióticos les permite sobrevivir al estrés ambiental severo. Previo a este trabajo, se aisló *SITPS1*, un cDNA que codifica para una proteína de 109 kD, de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* que acumula altos niveles de trehalosa. La comparación de secuencias de proteínas demostró que *SITPS1* comparte una alta similitud con los genes que codifican para la trehalosa-6-fosfato sintetasa de procariotes y eucariotes. Se demostró también que *SITPS1* se encuentra en una sola copia en el genoma de *Selaginella*, y que el gen se expresa de manera constitutiva en la planta.

Se comenzó la caracterización de *SITPS1* mediante transformación y complementación funcional de la mutante *tps1Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* que lleva deletado al gen *ScTPS1*. El gen *SITPS1* de *S. lepidophylla* restauró el crecimiento en azúcares fermentables y la síntesis de trehalosa a niveles altos. Más aún, el gen *SITPS1* introducido en la mutante *tps1Δ* fue capaz de complementar la sensibilidad a la temperatura subletal de 39 °C y la termotolerancia inducida a 50 °C. También el gen *SITPS1* rescató al fenotipo de osmosensibilidad de *tps1Δ*. Por lo tanto, se concluye que la proteína SITps1 es un homólogo funcional de plantas capaz de llevar a cabo la biosíntesis de trehalosa y podría jugar un papel importante en la resistencia al estrés en *S. lepidophylla*.

Se deletaron los extremos amino y carboxilo de 100 y 394 aminoácidos de SITps1, y se demostró que la región central de 500 aa fue suficiente para restaurar el crecimiento en glucosa de *tps1Δ*. En particular, la delección de la región amino terminal de 100 aa parece eliminar una regulación negativa sobre la actividad de SITps1, como se demostró mediante evidencia genética y bioquímica. Se observó lo mismo con *AtTPS1*, el gen de *Arabidopsis thaliana*.

Finalmente, se reporta la construcción y caracterización parcial de dos series de vectores de expresión de levadura, cuya función se basa en los promotores *CUP1* y *PMA1*. Estos vectores complementan las auxotrofías *leu*, *ura*, *his* y *trp*, y se encuentran disponibles como vectores monocopia o multicopia. Como se demostró, estos vectores pueden utilizarse para expresar genes homólogos o heterólogos en la levadura.


Vo. Bo.
Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente
Co-director de tesis


Vo. Bo.
Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles
Co-directora de tesis

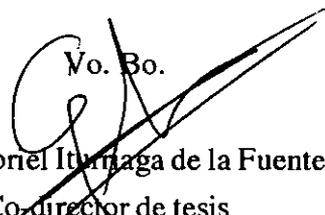
ABSTRACT

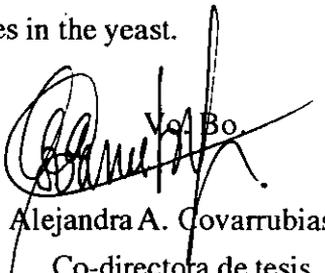
The accumulation of the disaccharide trehalose in anhydrobiotic organisms allow them to survive severe environmental stress. Previously to this work, a plant cDNA *SITPS1* encoding a 109-kD protein, was isolated from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla*, which accumulates high levels of trehalose. Protein-sequence comparison showed that SITps1 shares high similarity to trehalose-6-phosphate synthase genes from prokaryotes and eukaryotes. *SITPS1* mRNA was constitutively expressed in *S. lepidophylla*. A gel-blot analysis indicated that *SITPS1* was present as a single-copy gene.

We began to characterize *SITPS1* by transformation and functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae tps1Δ* mutant disrupted in the *ScTPS1* gene. *S. lepidophylla SITPS1* restored growth on fermentable sugars and the synthesis of trehalose at high levels. Moreover, the *SITPS1* gene introduced into the *tps1Δ* mutant was able to complement both deficiencies: sensitivity to sublethal heat treatment at 39 °C and induced thermotolerance at 50 °C. The osmosensitive phenotype of the yeast *tps1Δ* mutant grown in NaCl and sorbitol was also restored by the *SITPS1* gene. Thus, SITps1 protein is a functional plant homologue capable of sustaining trehalose biosynthesis and could play a major role in stress tolerance in *S. lepidophylla*.

The amino and carboxyl ends (100 and 394 aa) were deleted from the SITps1, and after transformation of the *tps1Δ* strain, the 500 aa-central region was sufficient to restore growth on glucose. Particularly, the deletion of 100 aa from the amino end, seems to overcome a negative regulation of the SITps1 activity as was demonstrated by genetic and biochemical evidence. Similar effect was observed on the *AtTPS1* gene and protein of *Arabidopsis thaliana*.

Finally, we also reported the construction and partial characterization of two series of yeast shuttle-expression vectors whose expression features are based on the *CUP1* and *PMA1* promoters. This vectors complement *leu*, *ura*, *his* or *trp* auxotrophies and are available as monocopy or multicopy vectors. It was also demonstrated that the vectors can be used to express homologous or heterologous genes in the yeast.


Vo. Bo.
Dr. Gabriel Iturraga de la Fuente
Co-director de tesis


Vo. Bo.
Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles
Co-directora de tesis

INDICE

INTRODUCCION

1.	LA TREHALOSA Y SU FUNCION EN LOS ORGANISMOS	1
1.1.	Biosíntesis de trehalosa	1
1.2.	Trehalosa y resistencia al estrés en levadura	2
1.3.	Papel protector de la trahalosa y su potencial en biotecnología ..	4
2.	REGULACION EN LA UTILIZACION DE AZUCARES EN LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.1	VIA PRINCIPAL DE REPRESION CATABOLICA POR CARBONO	7
	El sensado y el transporte de azúcares (glucosa)	8
	Función de las hexocinasas	10
	El complejo Snf1	11
	El complejo represor Mig1	12
2.2	LA VIA cAMP-PkA	13
	Transporte y sensado de glucosa	14
	Función de las proteínas Ras y G	16
	Síntesis y degradación de cAMP	17
	La proteína cinasa A (PkA)	18
	Por debajo de PkA	18
	Otras vías relacionadas con PkA	19
3.	ANALISIS DE LA FUNCION DE Ggs1/Tps1 EN LEVADURA	20
3.1	Función propuesta y evidencias	20
3.2	Alelos de <i>ggs1Δ/tps1Δ</i>	23
	<i>fdp1</i> (deficiente en la activación de la fructosa bifosfatsa)	23
	<i>byp1-3</i> (bypass of phosphofruktokinase reaction)	23
	<i>cif1</i> (catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase)	24
	<i>ggs1Δ/tps1Δ</i> (general glucose sensor/trehalose phosphate synthase)	24
	<i>glc6</i> (glycogen deficient)	25
3.3	Supresores de <i>ggs1Δ/tps1Δ</i>	25
	Mutación de <i>HXK2</i>	25
	Mutación de <i>QCR9</i>	26
	Sobre-expresión de <i>FPS1</i>	26

Sobre-expresión de <i>GPD1</i>	28
Mutante <i>DGT1-1</i>	28
Mutación en <i>CAT3(SNF4/SCI)</i>	29
Sobre-expresión de <i>MIG1</i>	29
4. ANALISIS DE GENES DE PLANTAS POR COMPLEMENTACION DE LEVADURA.	30
4.1 La levadura como un sistema de expresión heterólogo	30
4.2 Uso de <i>S. cerevisiae</i> para analizar genes de plantas involucrados en la regulación y metabolismo de azúcares	31
5. BIOSINTESIS DE TREHALOSA EN PLANTAS	32
5.1 La trehalosa en las plantas	32
5.2 Plantas transgénicas productoras de trehalosa	35
6. EL SENSADO Y LA SEÑALIZACION DE AZUCARES EN LAS PLANTAS	36
HIPOTESIS	41
OBJETIVOS	41
RESULTADOS	42
1. Una trehalosa-6-fosfato sintetasa de <i>Selaginella lepidophylla</i> complementa el crecimiento y los defectos en la tolerancia al estrés de una mutante <i>tps1</i> de levadura	42
2. Análisis de dominios de <i>SITPS1</i> mediante deleciones y complementación de las mutantes <i>tps1Δ</i> y <i>tps1Δ/tps2Δ</i> de levadura	53
2.1 La deleción del NH ₂ terminal de SITps1 permite la complementación de la mutante <i>tps1Δ</i>	58
2.2 ¿Posee SITps1 actividad fosfatasa de trehalosa (Tpp)?	58
2.3 Función del extremo carboxilo de SITps1	62
2.4 ¿Es el extremo amino un dominio de tránsito?	64
2.5 Caracterización del gen <i>AtTPS1</i>	64
DISCUSION	
1. El gen <i>SITPS1</i> codifica para trehalosa-6-fosfato sintetasa	73
2. SITps1 restaura la termotolerancia y la osmotolerancia de <i>tps1Δ</i>	76
3. Análisis de los dominios SITps1 mediante deleciones	77

4. <i>Arabidopsis</i> también posee genes <i>TPS</i>	81
5. ¿Que función tienen <i>Tps1</i> y la biosíntesis de trehalosa en las plantas?	81
CONCLUSIONES	83
PERSPECTIVAS	84
MATERIALES Y METODOS	
MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO	86
MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS	87
1. AISLAMIENTO DE DNA DE PLASMIDO DE LEVADURA	88
2. TRANSFORMACION DE LEVADURAS	89
3. DETERMINACION DE TREHALOSA EN LEVADURA	90
4. DETERMINACION DE β -GALACTOSIDASA EN LEVADURA	92
5. EXPERIMENTO DE CHOQUE TÉRMICO CON LEVADURAS	93
6. EXPERIMENTO DE CHOQUE OSMÓTICO CON LEVADURA	94
7. AISLAMIENTO DE cDNA DE <i>AtTPS1</i> POR RT-PCR	95
8. PRIMERS Y CONDICIONES DE PCR EMPLEADAS	96
9. TRANSFORMACION DE <i>E. coli</i> POR ELECTROPORACION	100
10. ANEXO DE CONSTRUCCIONES EMPLEADAS	101
BIBLIOGRAFIA	106
ANEXO	
CONSTRUCCION DE VECTORES DE EXPRESION PARA LEVADURA BASADOS EN LOS PROMOTORES <i>CUP1</i> Y <i>PMA1</i>	120
RESUMEN	121
INTRODUCCION	123
1. EL PROMOTOR <i>CUP1</i>	123
1.1 El gen <i>CUP1</i> de metalotioneína y su proteína	123
1.2 El promotor <i>CUP1</i> de levadura es finamente regulado por Cu	124
1.3 Inducción por choque térmico y estrés oxidativo	126

1.4 Control negativo de <i>CUP1</i> por glucosa	127
1.5 Vectores basados en el promotor <i>CUP1</i>	127
2. EL PROMOTOR <i>PMA1</i>	129
2.1 El gen <i>PMA1</i> y su proteína	129
2.2 Regulación transcripcional de <i>PMA1</i>	129
OBJETIVOS	131
RESULTADOS	132
1. Construcción de vectores pSAL	132
1.1 Construcción de pSAL1	132
1.2 Construcción de otros vectores pSAL	132
1.3 Ensayo funcional de pSAL1	140
1.4 Secuenciación del cassette <i>CUP1/PMA1</i>	140
2. Construcción de vectores pRS	144
2.1 Ensayo funcional de pRS6	144
DISCUSION	151
1. Construcción y caracterización de los vectores pSAL	151
2. Construcción y caracterización de vectores pRS	152
CONCLUSIONES	155
PERSPECTIVAS	156
BIBLIOGRAFIA	159

RESUMEN

En este trabajo se reporta la caracterización de *SITPS1* un cDNA de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* que codifica para una proteína de 994 aa con 50% de identidad y 61% de similitud con ScTps1 de *Saccharomyces cerevisiae*; ésto se hizo empleando herramientas de genética, fisiología, biología molecular y bioquímica para analizar la complementación funcional de mutantes *tps* de la levadura.

Se logró demostrar que el cDNA de *S. lepidophylla* al igual que el gen ScTps1 de levadura, codifica para la enzima trehalosa-6-fosfato sintetasa ya que se complementó en la mutante *tps1* Δ la capacidad de sintetizar trehalosa, de crecer en una fuente de carbono fermentable como glucosa o fructosa, la capacidad de desarrollar termorresistencia y tolerancia al choque térmico y la osmorresistencia a altas concentraciones de sorbitol y NaCl. El cDNA de *SITPS1* se expresó en levadura de manera moderada con el promotor *CUP1* del gen que codifica para la metalotioneína inducible por cobre; o fuertemente con el promotor del gen *PMA1* de la ATPasa plasmática de protones. Se encontró que para que *SITPS1* complemente a la mutante *tps1* Δ , se requiere un nivel de transcripción alto, como el proporcionado por el promotor *PMA1*.

Por otro lado, se generaron una serie de deleciones sobre el cDNA, reteniéndose la capacidad de complementar el crecimiento en glucosa con sólo el dominio central que codifica un péptido de 500 aa, no obstante haber deletado un extremo amino de 100 aa y uno carboxilo de 394 aa. Se comprobó que el carboxilo, a pesar de poseer cierta similitud con enzimas Tpp (trehalosa-6-fosfato fosfatasa), no posee esta función. También se comprobó que la remoción del extremo amino de SITps1 da lugar a un incremento considerable en la actividad enzimática con el consecuente aumento en la capacidad de sintetizar trehalosa; aún resta por aclarar si este efecto se debe a una estructura más eficiente de la proteína y/o a alguna interacción negativa de SITps1 con la subunidad Tps2 de la levadura. También se aisló por RT-PCR a *AtTPS1* de *Arabidopsis thaliana* con el cual se repitió la complementación de la mutante *tps1* Δ , que recuperó la habilidad para crecer en glucosa. También en este caso al eliminar 100 aa en el extremo amino se notó un incremento en la actividad de la enzima.

RELACION DE GENES Y PROTEINAS DE LEVADURA MENCIONADOS EN ESTE TRABAJO

GENES Y PROTEINAS INVOLUCRADOS EN LA VIA PRINCIPAL DE REPRESION CATABOLICA POR CARBONO EN LEVADURA

Genes involucrados en esta vía

<i>HXT1</i>	Transportador de glucosa de baja afinidad
<i>HXT2</i>	Transportador de glucosa de alta afinidad
<i>HXT1-20</i>	Transportadores de hexosas de alta y baja afinidad
<i>SNF3</i>	Sensor de glucosa de alta afinidad
<i>RGT2</i>	Sensor de glucosa de baja afinidad
<i>HXK1</i>	Hexocinasa 1
<i>HXK2</i>	Hexocinasa 2
<i>GLK1</i>	Glucocinasa
<i>REG1(HEX2)</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Glc7
<i>REG2</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Glc7
<i>GLC7(CID1)</i>	Subunidad catalítica de la cinasa 1 de serina/treonina
<i>SNF1(CAT1)</i>	Cinasa de serina/treonina para la des-represión catabólica por carbono
<i>SNF4(CAT3)</i>	Proteína regulatoria de la cinasa Snf1
<i>GAL83</i>	Proteína para la represión catabólica por glucosa
<i>SLP1</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Snf1
<i>SLP2</i>	Subunidad regulatroya de la cinasa Snf1
<i>TUP1</i>	Proteína que se asocia a Ssn6 y a Mig1 para reprimir genes
<i>SSN6(CYC8)</i>	Proteína asociada a Tup1 y al represor Mig1
<i>MIG1</i>	Represor activo defosforilado bajo crecimiento en glucosa.
<i>GRR1</i>	Proteína que podría reclutar al represor Rgt1 para ser ubiquitinado
<i>RGT1</i>	Represor de la transcripción para genes <i>HXT</i>
<i>SKP1</i>	Proteína participante en el complejo de ubiquitinación SCF
<i>CDC53</i>	Proteína participante en el complejo SCF
<i>CDC34 (UBC3)</i>	Enzima conjugada de ubiquitinación de SCF
<i>SCF</i>	Complejo de ubiquitinación constituido por las proteínas Skp1, Cdc53, Cdc34 y una proteína con una caja F

Genes que se reprimen a través de esta vía.

<i>SUC2</i>	Invertasa que se reprime en presencia de alta glucosa o de glicerol
<i>FBP1</i>	Enzima gluconeogénica cuya expresión es reprimida por glucosa
<i>ADH2</i>	Alcohol deshidrogenasa reprimida la expresión por glucosa
<i>CYC1</i>	Iso-1-citocromo c, cuyo gen es reprimido por glucosa
<i>GAL4</i>	Activador de genes <i>GAL</i> que es reprimido por Mig1 bajo glucosa

GENES Y PROTEINAS INVOLUCRADOS EN EL SENSADO, LA TRANSDUCCION Y LA RESPUESTA A GLUCOSA A TRAVES DE LA VIA cAMP-PkA

Genes involucrados directa o indirectamente en esta vía.

<i>GPR1</i>	Putativo receptor de glucosa
<i>GPA2</i>	Proteína G que une GTP
<i>RGS2</i>	Regulador negativo que activa la función GTPasa de Gpa2
<i>RAS1,2</i>	Proteína G que une GTP pero no se trimeriza
<i>IRA1,2</i>	Proteínas que activan la función GTPasa de Ras
<i>CDC25</i>	Intercambiador en Ras de GTP/GDP
<i>SDC25</i>	Intercambiador en Ras de GTP/GDP
<i>HXK1</i>	Hexocinasa 1
<i>HXK2</i>	Hexocinasa 2
<i>GLK1</i>	Glucocinasa 1
<i>HXT1-20</i>	Transportadores de hexosas de alta y baja afinidad
<i>CYR1</i>	Adenilato ciclasa
<i>CAP1(SRV2)</i>	Proteína asociada a la adenilato ciclasa Cyr1
<i>PDE1</i>	Fosfodiesterasa de alta afinidad de cAMP
<i>PDE2</i>	Fosfodiesterasa de baja afinidad de cAMP
<i>BCY1</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa PkA
<i>TPK1,2,3</i>	Subunidades catalíticas de la cinasa PkA
<i>SCH9</i>	Cinasa que inhibe la actividad de PkA
<i>YAK1</i>	Cinasa de serina/treonina involucrada en el ciclo celular
<i>SOK2</i>	Proteína regulatoria de la vía de PkA
<i>MSN2,4</i>	Factores de transcripción regulados por la vía HOG (+) y por PkA (-)
<i>RIM15</i>	Cinasa regulada negativamente por fosforilación de PkA

Genes que se reprimen por esta vía en presencia de glucosa, y que también se activan en fase estacionaria y por estrés abiótico.

<i>HSP12</i>	Proteína de choque térmico
<i>HSP26</i>	Proteína de choque térmico
<i>CTT1</i>	Catalasa T citosólica
<i>GLC3</i>	Enzima ramificadora de 1,4-glucano (síntesis de glicógeno)
<i>GAC1</i>	Subunidad regulatoria de la fosfatasa 1 de serina/treonina
<i>UB14</i>	Ubiquitina
<i>ADH2</i>	Alcohol deshidrogenasa II
<i>SSA3</i>	Proteína de choque térmico de 70 kD citosólica
<i>TPS1</i>	Trehalosa 6-fosfato sintetasa (subunidad de 56 kD)
<i>TPS2</i>	Trehalosa 6-fosfato fosfatasa (subunidad de 105 kD)
<i>TPS3</i>	Subunidad regulatoria del complejo Tps (115 kD)
<i>TSL1</i>	Subunidad regulatoria del complejo Tps (123 kD)
<i>HSP104</i>	Proteína de choque térmico

ALGUNOS DE LOS GENES QUE SE INDUCEN POR GLUCOSA

<i>NTH1</i>	Trehalasa neutra citoplásmica
<i>CLN3</i>	Ciclina específica para las fases G1/S de la división celular
<i>CYC7</i>	Isoforma 2 del citocromo c
<i>PDC1</i>	Subunidad α de la piruvato decarboxilasa
<i>ENO2</i>	Enolasa II (2-fosfoglicerato deshidratasa)
<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato cinasa
<i>ADHI</i>	Alcohol deshidrogenasa I
<i>PYK1</i>	Piruvato cinasa
<i>PFK2</i>	6-fosfofructo-2-cinasa
<i>HXT</i>	transportadores de hexosas

Para hacer este glosario se consultó principalmente la siguiente referencia:

Mewes, H.W., K. Albermann, M. Bahr, D. Frishmann, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S.G. Oliver, F. Pfeiffer and A. Zollner. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* 387: 7-65.

Información detallada sobre cada gen y proteína de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra en la siguiente dirección del Web:

<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

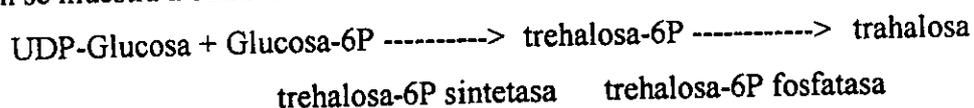
INTRODUCCION

1. LA TREHALOSA Y SU FUNCION EN LOS ORGANISMOS.

1.1 Biosíntesis de trehalosa.

La trehalosa fue identificada y designada por M. Berthelot en 1858, como el principal azúcar presente en trehala, el capullo de un escarabajo del género *Larinus* (Singer and Lindquist, 1998).

El azúcar se identificó mucho después como un disacárido no reductor, consistente de dos unidades de glucosa unidas mediante un enlace α -glicosídico que originan α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido (Elbein, 1974). La biosíntesis de trehalosa tal y como se efectúa en levaduras, bacterias, y posiblemente en plantas y animales, fue elucidada por primera vez por Leloir de sus estudios con levaduras, y comprende la formación de trehalosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, reacción catalizada por la enzima trehalosa-6-fosfato sintetasa (Tps1) (EC #2.4.1.15), compuesto que es luego defosforilado a trehalosa por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tpp, o Tps2 en levadura) (EC # 3.1.3.12) (Cabib and Leloir, 1958; Elbein, 1974; Muller *et al.*, 1999). La reacción se muestra a continuación:



En levadura también se ha determinado que la síntesis de la trehalosa se lleva a cabo a través de un complejo denominado Tps, constituido por las proteínas Tps1, Tps2, Tps3 y Tsl1. Tps1 tiene la actividad de sintetasa de trehalosa y Tps2 la de fosfatasa de trehalosa, mientras que Tps3 y Tsl1 regulan la actividad del complejo (Thevelein and Hohmann, 1995).

Recientemente se ha elucidado otra vía de biosíntesis de trehalosa en bacterias, en la cual al degradarse el glicógeno, los residuos de glucosa son transferidos por una glicosil transferasa a los residuos de glucosa terminal de malto-oligómeros creando un enlace α -1,1- α y una molécula de trehalosa que luego es liberada por una hidrolasa específica (Nakada *et al.*, 1995).

La degradación de la trehalosa es llevada a cabo por la trehalasa (EC # 3.2.1.28), que origina dos moléculas de glucosa. La trehalasa se encuentra en muchos organismos, incluyendo levaduras y plantas (Muller *et al.*, 1995). Alternativamente, la degradación y síntesis de trehalosa se puede lograr con la trehalosa fosforilasa, una enzima de acción reversible aislada de *Euglena* y algunos otros microorganismos (Maréchal *et al.*, 1971; Aisaka and Masuda, 1995; Muller *et al.*, 1999).

1.2 Trehalosa y resistencia al estrés en levadura.

En la levadura, el equilibrio entre la síntesis y la degradación de la trehalosa parece tener diversas implicaciones en el desarrollo y la respuesta a diversos tipos de estreses abióticos.

En experimentos en que se logró incrementar la concentración intracelular de trehalosa mediante la disrupción del gen que codifica a la trehalasa neutra (*NTH1*), no se observó una correlación entre el contenido de trehalosa y la termotolerancia (Nwaka *et al.*, 1994). Durante la fase exponencial, y después de que las células se recuperan de un choque térmico, la trehalosa que se sintetizó es degradada rápidamente. Esto se lleva a cabo con la intervención de dos trehalasas capaces de hidrolizar a la trehalosa: una trehalasa neutra (*Nth*) y la otra ácida (*Ath*). Mientras que la primera se encuentra en el citoplasma y es la de mayor actividad, la segunda se ubica en la vacuola, y su actividad es mayor a pH 4-5 (Thevelein, 1994; Kim, 1996).

Durante años ha intrigado que el incremento en la concentración intracelular de trehalosa a temperaturas tan altas como 40 °C va acompañado de un incremento en la actividad de *Tps1*, lo cual es lógico. Pero también la trehalasa experimenta un incremento en su actividad, lo cual es extraño, si se supone que la célula requiere de trehalosa para contender con las altas temperaturas (Hottiger *et al.*, 1987; Winkler *et al.*, 1991). En realidad la respuesta al estrés por calor involucra otros actores importantes además de la trehalosa. Uno de éstos actores es la proteína *Hsp104*, cuya función también es importante durante la termoinducción a temperaturas subletales cercanas a 40 °C, y el choque térmico a 50 °C. Se ha encontrado que, mientras que la trehalosa actúa como un termoprotectante, *Hsp104* se encarga de reparar a las proteínas desnaturalizadas, resolubilizando los

agregados insolubles de proteínas (De Virgilio *et al.*, 1991; Hottiger *et al.*, 1994; Elliot *et al.*, 1996).

La trehalosa protege a membranas y proteínas de la desnaturalización y daño durante la termoinducción y durante el choque térmico (Hottiger *et al.*, 1994; De Virgilio *et al.*, 1994). Sin embargo, si no se elimina después por la trehalasa, entonces interfiere en la actividad de renaturalización de chaperonas como la Hsp104, al estabilizar estados semi-desnaturalizados de las proteínas (Singer and Lindquist, 1998). Visito en conjunto, lo anterior provee de una convincente explicación que concilia los datos contradictorios mencionados anteriormente.

Sobre el estrés osmótico extremo, se han mostrado evidencias de que la trehalosa incrementa la resistencia a la desecación, estimada como la sobrevivencia celular. La ausencia de un transportador que controla la salida de trehalosa, afectó drásticamente la sobrevivencia de las levaduras. Esto ha llevado a proponer que la trehalosa se requiere tanto en el interior como en el exterior de la célula, protegiendo a la bicapa de la membrana plasmática por ambos lados (Eleutherio *et al.*, 1992). La disrupción del gen *ATH1*, que codifica a la trehalasa vacuolar, confirió mayor resistencia a la deshidratación y al congelamiento, debido a un incremento en la concentración intracelular de trehalosa. No se sabe como la trehalasa vacuolar contribuye a degradar a la trehalosa intracelular (Kim *et al.*, 1996). En otro reporte, la resistencia de una cepa de levadura al estrés osmótico durante el crecimiento, se explicó como debido a la presencia de trehalosa, que estaría actuando como un osmoprotectante (MacKenzie *et al.*, 1988).

En experimentos *in vitro*, se demostró que la actividad de la enzima Pfk (fosfofructo cinasa) fue preservada más eficientemente en condiciones de desecación moderada o severa por disacáridos como trehalosa, sacarosa y maltosa; mientras que el glicerol, la glucosa, la prolina y el TMAO (trimethylamine-N-oxide) fueron efectivos solamente bajo deshidratación moderada (Crowe *et al.*, 1990). Más recientemente, se determinó que la trehalosa posee una función protectora importante en levaduras *in vivo*, bajo estrés osmótico severo (Hounsa *et al.*, 1998).

Se ha obtenido una buena cantidad de evidencia sobre el papel de la trehalosa durante el estrés abiótico, principalmente altas temperaturas y estrés osmótico extremo o desecación. No es de sorprender entonces, que los genes *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* Y *TSL1*, que

codifican para el complejo Tps de levadura, son co-regulados como respuesta al estrés osmótico a través de elementos STRE (stress response element) en sus promotores. Como para el caso de otros genes con elementos similares, además del estrés osmótico también se inducen por calor y carencia nutricional y son negativamente regulados por la vía cAMP-PkA (Winderickx *et al.*, 1996).

También se ha reportado que genes como *HSP12*, *HSP104*, *CTT1*, *ENAI* y *ALD2*, cuya expresión tiene la particularidad de estar relacionada con diversos tipos de estrés abiótico, reducen enormemente su RNA mensajero en la mutante *tps1Δ*, en relación con la cepa silvestre, bajo estrés osmótico de 0.8 M de NaCl o 1.5 M de sorbitol (Hazell *et al.*, 1997). Esto muestra un gran efecto peliotrópico de *TPS1*, más aún cuando se involucra a un gen como *ENAI*, que hasta donde se sabe, se regula positivamente por la vía de calmodulina-calcineurina, y negativamente a través de cPka (Hirata *et al.*, 1995).

La biosíntesis de trehalosa en levadura también está regulada durante el desarrollo, ya que las enzimas que la sintetizan son fuertemente activas a partir de la etapa post-diaúxica y durante la fase estacionaria (Winkler *et al.*, 1991).

¿Que tienen en común el estrés abiótico y las etapas post-diaúxica y estacionaria?

La fase estacionaria es una etapa en la que las células se enfrentan a diversos tipos de estrés, ya que han agotado los azúcares fermentables y han originado un medio con etanol como única fuente de carbono. Carencia de azúcares fermentables, pH ácido y estrés oxidativo son algunos de los estreses presentes en esta etapa de desarrollo. En ese momento deben de pasar del metabolismo fermentativo al respiratorio, transición que se lleva a cabo de manera eficiente a través de las vías cAMP-PkA y de la Vía Principal de Represión Catabólica por Carbono (Werner-Washburne *et al.*, 1993; Thevelein *et al.*, 1995; Siderius and Mager, 1997). Posteriormente se abundará sobre estas importantes vías involucradas en la regulación de la utilización del carbono en las levaduras.

1.3 Papel protector de la trehalosa y su potencial en biotecnología.

Algunos tardígrados como *Echiniscus blumi*, la angiosperma *Myrothamum flabellifolius*, la planta vascular inferior *Selaginella lepidophylla*, otros organismos como *Artemia salina* y las levaduras, muestran la capacidad extrema de permanecer completamente deshidratados y recuperar sus funciones vitales tan pronto entran en

contacto con la humedad. A este tipo de dormancia se le conoce como anhidrobiosis (Crowe *et al.*, 1992). Bajo tal estado de desecación, se incrementa enormemente la resistencia a calor y fríos extremos, al vacío y a altas dosis de radiación ionizante. La clave para este tipo de latencia es la conservación de un nivel de integridad y organización celular y molecular que hace posible la resurrección. Aparentemente, esta conservación de la estructura está relacionada con la presencia de los disacáridos sacarosa y trehalosa, sobre todo este último (Roser and Colaço, 1993; Weisburd, 1988).

Se ha demostrado la capacidad de la trehalosa para preservar la integridad de las membranas bajo condiciones de alta temperatura o estrés osmótico, mediante un mecanismo que permite la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando así la separación de fases, la fusión y el rompimiento de las membranas (Crowe *et al.*, 1984)

Para explicar el mecanismo mediante el cual la trehalosa estabiliza las moléculas biológicas como las proteínas durante desecación, se han propuesto dos hipótesis:

a) La sustitución del agua; en la que se propone que la trehalosa establece enlaces de hidrógeno en vez del agua, contribuyendo a mantener y estabilizar la estructura terciaria de las proteínas (Clegg, 1985; Crowe *et al.*, 1990).

b) La teoría de la vitrificación; que establece que la trehalosa en solución tiende a vitrificar, resultando en la formación de una especie de cristal líquido, que adquiere las propiedades mecánicas de un sólido, estado bajo el cual la movilidad molecular, y por consecuencia las reacciones degradativas son insignificantes (Burke, 1985; Koster, 1991). En semillas secas de maíz, se ha establecido que el estado de vitrificación es el que preserva la viabilidad de la semilla (Koster and Leopold, 1988).

Mediante la reacción de Maillard se unen azúcares y proteínas durante los procesos de almacenamiento y conservación de alimentos, y éste es tal vez el principal factor del deterioro. Este se minimiza en gran parte cuando se utiliza a la trehalosa como un conservador, especialmente bajo condiciones de altas temperaturas (Colaço *et al.*, 1992).

La capacidad de la trehalosa para preservar la actividad enzimática y evitar la desnaturalización de proteínas sometidas a desecación que luego son rehidratadas podría explotarse para preservar productos biológicos como vacunas, enzimas, sangre artificial, etc. (Colaço *et al.*, 1992; Weisburd, 1988).

La fermentación alcohólica llevada a cabo por la levadura a partir de mostos de frutas como la uva, o la producción de pasta de levadura para su posterior uso en la panificación, conllevan condiciones altamente estresantes (bajas y altas temperaturas, oxidación, nutrición deficiente, hiperosmolaridad, desecación-rehidratación y congelación-descongelación) (Attfield, 1997). No obstante, la levadura es capaz de sobrevivir bajo estas condiciones y se piensa que gran parte de este comportamiento es debido a la trehalosa (Paiva and Panek, 1996).

En experimentos de desecación de fragmentos de plátanos, mangos, manzanas, cerezas y aguacates en presencia de trehalosa, éstos recuperan la mayoría de sus propiedades organolépticas después de ser rehidratados (Roser and Colaco, 1993).

Algunas empresas, principalmente Osmotica Foods (Davis, Ca.), un 'joint venture' entre Calgene (Davis, Ca.) y Quadrant Holdings (Cambridge, UK) tratan de desarrollar ingredientes y alimentos basados en trehalosa, y Zeneca-MOGEN International (Leiden, the Netherlands) y D.J. van der Have (Kappelle, the Netherlands), planean desarrollar plantas productoras de trehalosa. Por otra parte, en Zeneca-MOGEN planean utilizar los genes bacterianos para producir tomates transgénicos que acumulan trehalosa, y actualmente efectúan experimentos similares en otros cultivos, ya que se espera que esto permita nuevas formas de conservación de productos vegetales perecederos (Goddijn and Pen, 1995).

2. REGULACION EN LA UTILIZACION DE AZUCARES EN LA LEVADURA

Saccharomyces cerevisiae.

La levadura creciendo en una fuente no fermentable de carbono, como glicerol o etanol (estado desreprimido), responde a la adición de azúcares fermentables como glucosa, fructosa y manosa, con una amplia gama de efectos regulatorios que originan lo que se designa como el estado reprimido. Dentro de los efectos rápidos, a nivel post-traducciona, ocurre una estimulación de la vía cAMP-PkA, con un incremento transitorio en el cAMP intracelular y su descenso posterior a niveles ligeramente superiores al basal, recambio de fosfatidil-inositol, síntesis de fructosa-2,6-bifosfato, estimulación en el influjo y eflujo de Ca^{2+} con un incremento transitorio neto en el nivel de Ca^{2+} intracelular, activación de trehalasa y H^+ -ATPasa, inactivación de fructosa-1,6-bifosfatasa, malato deshidrogenasa citoplásmica, isocitrato liasa, fosfoenolpiruvato carboxi cinasa, inactivación de sistemas de

transporte de galactosa, maltosa y del transporte de alta afinidad de glucosa, activación del transporte de potasio (De Virgilio *et al.*, 1991; Van Aelst *et al.*, 1993).

Otro tipo de efectos más lentos, relacionados con la transcripción son: la represión por glucosa de la respiración mitocondrial, gluconeogénesis, transporte y catabolismo de azúcares alternos, así como la represión por glucosa de los genes *CTT1*, *UBI4*, *ADH2*, *SSA3* y *HSP12*. Otros genes que codifican enzimas glicolíticas (*PDC1*, *PYK1*, *ENO2*, *PGK1* y *ADHI*), RNAs ribosomales y proteínas, son inducidos por glucosa (Van Aelst *et al.*, 1993; Thevelein and Hohmann, 1995; de Winde *et al.*, 1997).

Varias vías de transducción se encuentran involucradas en la gran cantidad de fenómenos regulatorios inducidos por los azúcares fermentables, siendo las dos vías mejor caracterizadas: a) la vía principal de represión catabólica, responsable de inactivar a la respiración y la gluconeogénesis durante el crecimiento en un medio fermentativo, y b) la vía cAMP-PkA (hasta hace muy poco conocida como la vía de Ras-cAMP), involucrada en el sensado rápido de nutrientes y en la regulación del crecimiento (Thevelein, 1991; Ronne, 1995; Gancedo, 1998; Thevelein and de Winde, 1999). Estas dos vías comparten una necesidad común por el transporte y la fosforilación posterior del azúcar disponible. Como se ha determinado, su acción ocurre de manera independiente aunque paralela (Ronne, 1995; Gancedo, 1998).

2.1 VIA PRINCIPAL DE REPRESION CATABOLICA POR CARBONO .

La glucosa tiene dos efectos principales en la expresión de los genes de levadura: reprime la expresión de muchos genes, incluyendo a los que codifican a las enzimas de la vía respiratoria, así como las enzimas implicadas en la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa como galactosa y maltosa. Por otro lado, induce la expresión de genes que se requieren para la utilización de la glucosa, como los que codifican enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa (De Winde *et al.*, 1997; Johnston, 1999).

La represión por glucosa afecta la síntesis de muchas enzimas, mismas que pueden dividirse en tres grupos principales: el primer grupo contiene las enzimas específicas para la gluconeogénesis fructosa-1,6-bifosfatasa (Fbp) y la fosfoenolpiruvato carboxicinasasa (Pck1), junto con las enzimas del ciclo del glioxalato, como la isocitrato liasa (Icl1). La

síntesis de estas enzimas es muy sensible a la presencia de glucosa, lo cual evita la operación simultánea de la glicólisis y la gluconeogénesis (Yin *et al.*, 1996; Ronne, 1995). El segundo grupo está representado por las enzimas del ciclo de Krebs y la respiración en general, ya que casi no se requieren durante el crecimiento fermentativo (de Winde *et al.*, 1997). En tercer lugar, dejan de producirse las proteínas involucradas en el consumo y metabolización de fuentes de carbono alternas como galactosa y maltosa, una vez que la levadura establece su preferencia por la utilización de glucosa (Trumbly, 1992; de Winde *et al.*, 1997).

El sensado y transporte de azúcares (glucosa).

Aún no se tiene del todo claro como se sensa la glucosa en la vía principal de represión catabólica por carbono en la levadura.

En mamíferos hay una cinasa homóloga a Snf1, AMPk la que a su vez es activada por la cinasa AMPKk. Esta vía de transducción es muy sensible al cambio en la relación AMP:ATP. Diversos tipos de estreses ambientales, y al menos en las células β -pancreáticas, la presencia de glucosa depleta el ATP intracelular activando la vía (Hardie *et al.*, 1998). En levadura al contrario, es la privación de glucosa eleva la relación AMP:ATP activando a Snf1 (Wilson *et al.*, 1996). Por otra parte, dado que el AMP no activa alostéricamente a AMPK ó Snf1, permanece abierta la posibilidad de que el sensado se lleve a cabo arriba de Snf1, tal vez mediante la activación de otra cinasa (Halford *et al.*, 1999).

Otros grupos han propuesto que el sensor primario de glucosa sería la hexocinasa 2 en levadura y su contraparte en plantas (Jang and Sheen, 1997 y Smeekens, 1998). En plantas transgénicas con el gen *HXK* sobre-expresado o en antisentido, las plantas mostraron mayor o menor sensibilidad a glucosa (Jang *et al.*, 1997).

La otra línea de evidencia, consiste en que sólo un análogo fosforilable, como la 2-deoxiglucosa produce represión de genes involucrados en la fotosíntesis, no así un compuesto como 3-O-metilglucosa; deduciéndose que no se requiere otro metabolito después de la glucosa-6-fosfato para generar la señal (Jang and Sheen, 1994).

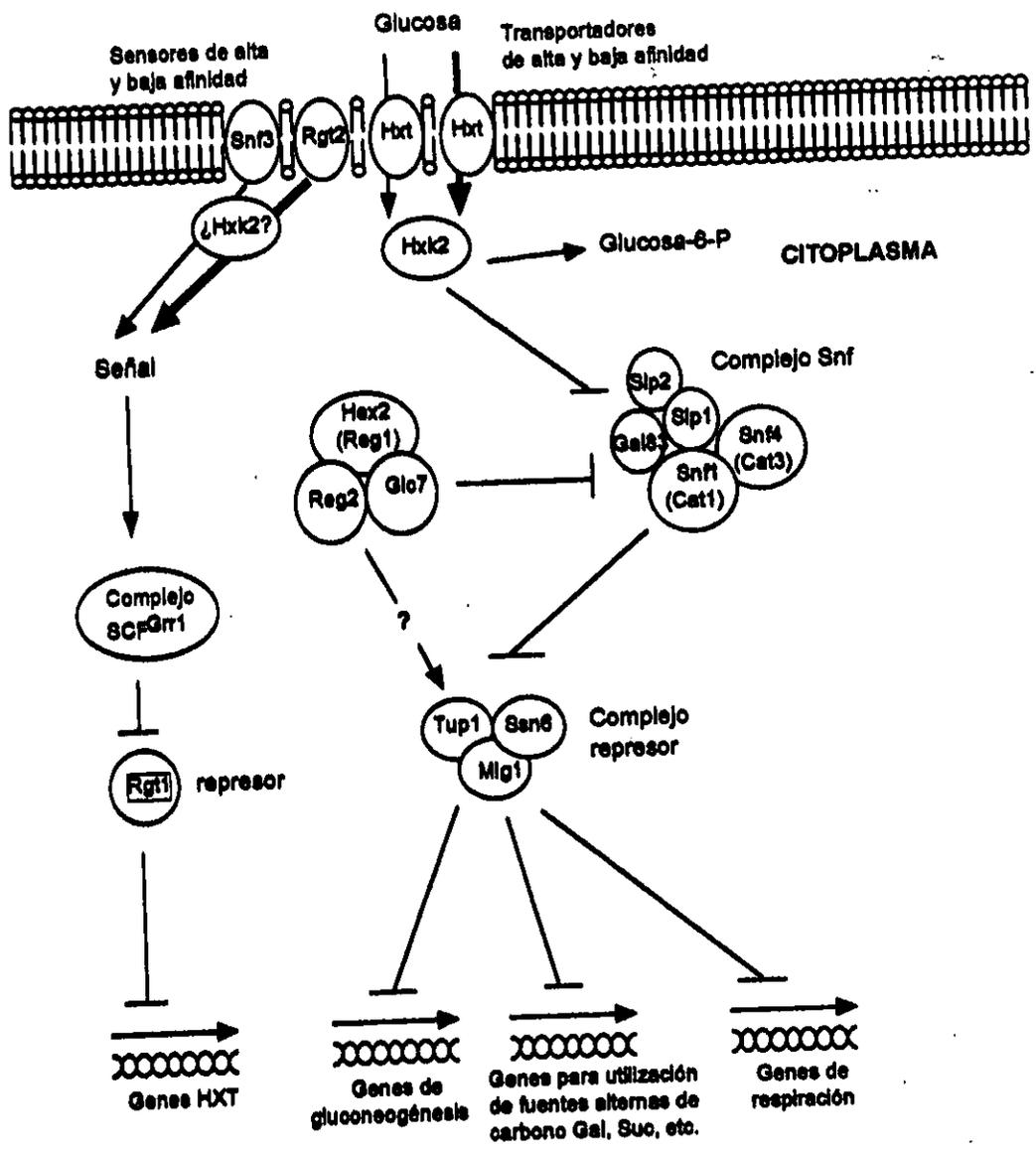


Figura 1. Via principal de represión catabólica por carbono en levadura (Adaptado de: de Winde et al., 1998; Johnston, 1999).

Paralelo a la vía principal de represión catabólica en levadura se han identificado dos sensores de glucosa cuyo efecto inmediato es la inducción transcripcional de los genes que codifican para transportadores de glucosa. Estos sensores son Snf3, un sensor de alta afinidad (activo bajo 0.1% de glucosa) y Rgt2, un sensor de baja afinidad (activo a 4% de glucosa). Ambos poseen una alta homología con los transportadores de hexosas Hxt, sin embargo, aunque están ubicados en la membrana plasmática no transportan glucosa (Ozcan and Johnston, 1995; Ozcan *et al.*, 1998).

En levadura se ha identificado al menos 20 genes que codifican putativos transportadores de hexosas de baja y alta afinidad (Bisson *et al.*, 1993). Utilizando como reporteros a los genes de *HXT1* y *HXT2* que codifican transportadores de baja y alta afinidad respectivamente, se determinó que a concentraciones altas de glucosa Rgt2 genera una señal para la inducción de *HXT1* y la represión de *HXT2*, mientras que Snf3 provoca la inducción transcripcional de *HXT1* cuando hay poca glucosa en el medio (Ozcan *et al.*, 1998). La inducción por glucosa de los genes *HXT* esta mediada por un mecanismo de represión que involucra al represor Rgt1: en ausencia de glucosa Rgt1 se une a los promotores de los genes *HXT* reprimiendo su inducción; la glucosa inactiva la función de Rgt1 mediante un mecanismo dependiente de Grr1, que es parte del complejo SCF^{Grr} el cual se piensa es un complejo de ubiquitinación, por la participación en el complejo de la enzima conjugada de ubiquitinación Cdc34. La denominación SCF es por sus componentes Skp1, Cdc53 y Cdc34, así como una proteína que posee una caja F (Ozcan and Johnston, 1995; Li and Johnston, 1997; Johnston, 1999) (Figura 1).

Función de las hexocinasas.

La levadura posee tres hexocinasas encargadas de fosforilar a los azúcares glucosa y fructosa. Mientras que la glucosa puede ser fosforilada por las tres, la fructosa sólo lo es por Hxk1 y la Hxk2 (Ma and Botstein, 1986). Las mutantes en la actividad hexocinasa fueron unas de las primeras en relacionarse con defectos en la represión catabólica, específicamente de la Hxk2 (Entian, 1977); llegándose a postular que esta enzima podría poseer tanto una función regulatoria como catalítica (Entian and Frohlich, 1984). Como ya

se mencionó antes, en plantas se ha postulado que la hexocinasa podría ser el sensor primario de hexosas (Jang and Sheen, 1994; Jang *et al.*, 1997).

Un análisis reciente del papel de las hexocinasas en el establecimiento de la represión catabólica, ha demostrado que, para que ésta ocurra, al menos en la vía principal de represión y en la cAMP-PkA, se requiere que los azúcares estén fosforilados (Gancedo, 1998). Por otra parte, se ha determinado que, mientras que las tres cinasas intervienen indistintamente en las etapas tempranas de la señalización (entre éstas la vía cAMP-PkA), la Hxk2 es indispensable para una represión de más largo plazo (la vía principal de represión por glucosa y la denominada como vía FGM) (de Winde *et al.*, 1996; Sanz *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que además de la regulación transcripcional que controla a las tres hexocinasas (Hxk1 y Glk1 se reprimen 10 a 15 minutos después de la adición de la fuente de carbono fermentable), las modificaciones post-traduccionales también ejercen control sobre la actividad de Hxk2, ya que ésta puede existir en dos estados, uno monomérico y fosforilado, y otro dimérico defosforilado, éste último predominante después de la adición de glucosa. Se piensa que la fosfatasa Cid1/Glc7, junto con la subunidad regulatoria Hex2/Reg1, sea la encargada de la defosforilación del monómero de Hxk2, mientras que la fosforilación podría darse mediante autofosforilación (Fernández *et al.*, 1988). Al menos en levadura, estos datos parecen mostrar que Hxk2 podría estar involucrada de manera importante en la transducción de la señal de la glucosa, más que en su sensado como ha sido propuesto por algunos grupos (Thevelein and Hohmann, 1995; Jang and Sheen 1997; Randez-Gil *et al.*, 1998).

El complejo Snf1.

Snf1 codifica una proteína cinasa de Ser/Thr completamente necesaria para la desrepresión de genes reprimidos por glucosa. En levadura, se le ha encontrado asociada a otras proteínas como Snf4, Sip1, Sip2 y Gal83 (Figura 1) (de Winde *et al.*, 1997; Gancedo, 1998). Se ha propuesto que las últimas tres proteínas podrían actuar como adaptadores que faciliten la interacción de Snf1 con Snf4 (Yang *et al.*, 1994; Jiang and Carlson, 1996).

Existe en mamíferos un homólogo de Snf1, que es la cinasa AMPk, activada por AMP mediante un mecanismo que podría involucrar la interacción alostérica de AMP con

la cinasa, lo cual ha llevado también a proponer que en levadura, la relación AMP:ATP podría ser la señal para activar la vía de Snf1 (Hardie *et al.*, 1998). Se ha propuesto el siguiente modo de acción de Snf1: en ausencia de glucosa, Snf1 es fosforilado, tal vez mediante autofosforilación y la unidad regulatoria se disocia dejando libre al dominio catalítico de la cinasa. En presencia de glucosa, se genera una señal que da como resultado la defosforilación de Snf1, tal vez por el complejo de la fosfatasa Glc7, lo cual requiere de Grr1p/Cat80 y de Hxk2. Esta defosforilación debilita la interacción entre Snf4 y el dominio regulatorio de Snf1, que al quedar libre bloquea el dominio catalítico y de esta forma se inactiva su capacidad de fosforilar al blanco (represor Mig1), el cual en su estado defosforilado actúa como represor activo unido al ADN e inhibiendo la transcripción (Jiang and Carlson, 1996; Ludin *et al.*, 1998). Esto es compatible con el hecho de que la mutante *snf4* origina una cinasa Snf1 permanentemente inactiva, y por lo tanto una mayor represión por parte de Mig1 (Blázquez and Gancedo, 1997; Gancedo, 1998). Las mutantes *snf1*Δ son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables, como glicerol.

Acentuando la homología en estructura y función de esta cinasa en levaduras y plantas, la mutante *snf1*Δ se ha logrado complementar por genes homólogos de plantas de diversas especies como arroz y tabaco permitiendo la des-represión de los genes que hacen posible el crecimiento en glicerol; aunque en la mutante *snf1*Δ complementada con el gen de planta, la expresión del gen *SUC2* de la invertasa no sólo se activa en presencia de azúcares no fermentables, sino que también en presencia de glucosa, cuando en la cepa silvestre este gen permanece reprimido (Alderson *et al.*, 1991; Muranaka *et al.*, 1994).

El complejo represor Mig1.

Mig1 es un represor del tipo dedos de zinc, capaz de unirse a una gran cantidad de promotores de genes reprimidos por glucosa. A esta proteína se le ha encontrado relacionada con Tup1 y Cyc8/Ssn6. Se piensa que Tup1-Ssn6 afectan la estructura de la cromatina, o interaccionan de alguna forma con el aparato basal de transcripción dando lugar a la represión de genes a un nivel general, ya que también se les ha encontrado asociadas con otro tipo de proteínas que se unen al DNA (Keleher *et al.*, 1992).

La activación-desactivación de Mig1 parece estar controlada por el estado de fosforilación-defosforilación. Cuando hay glucosa en el medio, Mig1 es un represor unido

al DNA, en un estado de defosforilación inducido por la fosfatasa Glc7/Reg1. Genes relacionados principalmente con respiración y gluconeogénesis, así como aquellos relacionados con la utilización de otras fuentes de carbono diferentes a la glucosa o fructosa están reprimidos (Figura 1). Cuando no hay glucosa, Snf1 está activo como cinasa que fosforila a Mig1, disociándose de las proteínas represoras Tup1-Ssn6. En el estado fosforilado a Mig1 se le localiza en el citoplasma, en su forma de represor inactivo (De Vit *et al.*, 1997).

2.2 LA VIA cAMP-PkA.

La función de la cinasa PkA es muy importante, ya que se le ha implicado en la coordinación de eventos celulares esenciales como el crecimiento celular, la entrada en la división celular y reprograma la transcripción durante el cambio de una fuente no fermentable de carbono a otra fermentable actuando como un fuerte represor de la transcripción de genes con elementos STRE. Se piensa que mediante ésta cinasa se relacionan el control positivo del crecimiento con el control negativo relacionado con la respuesta al estrés (Boy-Marcotte *et al.*, 1996; Ruis, 1997).

Para ésta vía se han identificado dos tipos de mutantes no letales, dependiendo si suprimen o incrementan la actividad de la cinasa PkA: una baja o nula actividad de cPka ocasiona que se interrumpa el crecimiento y que las células se paren en G1, a la vez que muestran cambios fisiológicos asociados normalmente con la privación de nutrientes, como son la acumulación de trehalosa y glicógeno, un aumento en la expresión de varios genes (como *SSA3*, *HSP12*, *HSP26*, *CTT1*, *UBI4* y *ADH2*), y un incremento en la resistencia al calor. En contraste, la hiperactividad de ésta vía o de cPka, ocasiona que las células sean incapaces de arrestarse en G1, muestran un bajo contenido de trehalosa y glicógeno, pérdida de viabilidad y las células se vuelven muy resistentes al calor bajo privación de nutrientes (Werner-Washburne *et al.*, 1993; Thevelein, 1994).

Esta vía ha sido conocida tradicionalmente como la vía Ras-cAMP, sin embargo, recientes investigaciones han cuestionado que la señalización por azúcares hacia la adenilato ciclasa implique a proteínas Ras, y en su lugar se ha propuesto una ruta que involucra a una proteína G (Gpa2), pero cuyo blanco es la proteína cinasa A, PkA (Colombo *et al.*, 1998; Thevelein and de Winde, 1999), por lo cual sería más conveniente

denominarla como vía Gpa-cAMP, o más general como vía cAMP-PkA ó cPKA, ya que PkA es la cinasa central de la vía que integra la señal proveniente de glucosa, acidificación intracelular o estrés por calor, osmótico o salino y cuya función principal parece ser la de adaptar el crecimiento a las condiciones ambientales.

Una de las principales evidencias de la activación de esta vía por las hexosas fermentables, ha sido un aumento transitorio en los niveles de cAMP unos minutos después de la adición de glucosa y la inmediata activación de la cinasa PkA. La concentración de cAMP se incrementa alrededor de cinco veces más en un tiempo de aproximadamente un minuto para luego descender de inmediato y abruptamente a un nivel igual o ligeramente superior al prevalente cuando no hay glucosa en el medio (Jiang *et al.*, 1998; Thevelein and de Winde, 1999). Dado este ligero incremento, se ha sugerido que los niveles de cAMP podrían estar jugando un papel aún no elucidado en el mantenimiento del estado de represión catabólica (Gancedo, 1998). Otra característica distintiva de esta vía, es que es activa sólo cuando hay una concentración de glucosa superior a 15 mM, lo cual permite una rápida transición hacia el metabolismo fermentativo sólo cuando hay suficientes azúcares disponibles para activar esta vía y en última instancia, para adaptar el crecimiento con la disponibilidad de nutrientes (Thevelein, 1994).

Los componentes de esta vía se muestran en la Figura 2. A continuación se describen las etapas y componentes más importantes.

Transporte y sensado de glucosa

Basado más que nada en el fenotipo de la mutante *tps1Δ*, que no puede crecer en glucosa, carece del incremento transitorio de cAMP, y muestra algunos defectos de señalización para establecer el estado reprimido en presencia de glucosa, Thevelein y su grupo, propusieron la existencia de un complejo sensor de glucosa constituido por un transportador (Hxt), la hexocinasa 2 (Hxk2) y Tps1 (Thevelein and Homann, 1993).

Recientemente, se ha identificado la interacción de Tps1 con la proteína Rim15, cinasa regulada negativamente por PkA, y el primer blanco debajo de PkA, es decir, abajo del hipotético sensor de glucosa constituido también por Tps1 (Reinders *et al.*, 1998). Este resultado parece contradecir la participación de Tps1 como sensor, ya que se esperaría que el receptor estuviese antes de PkA y no después.

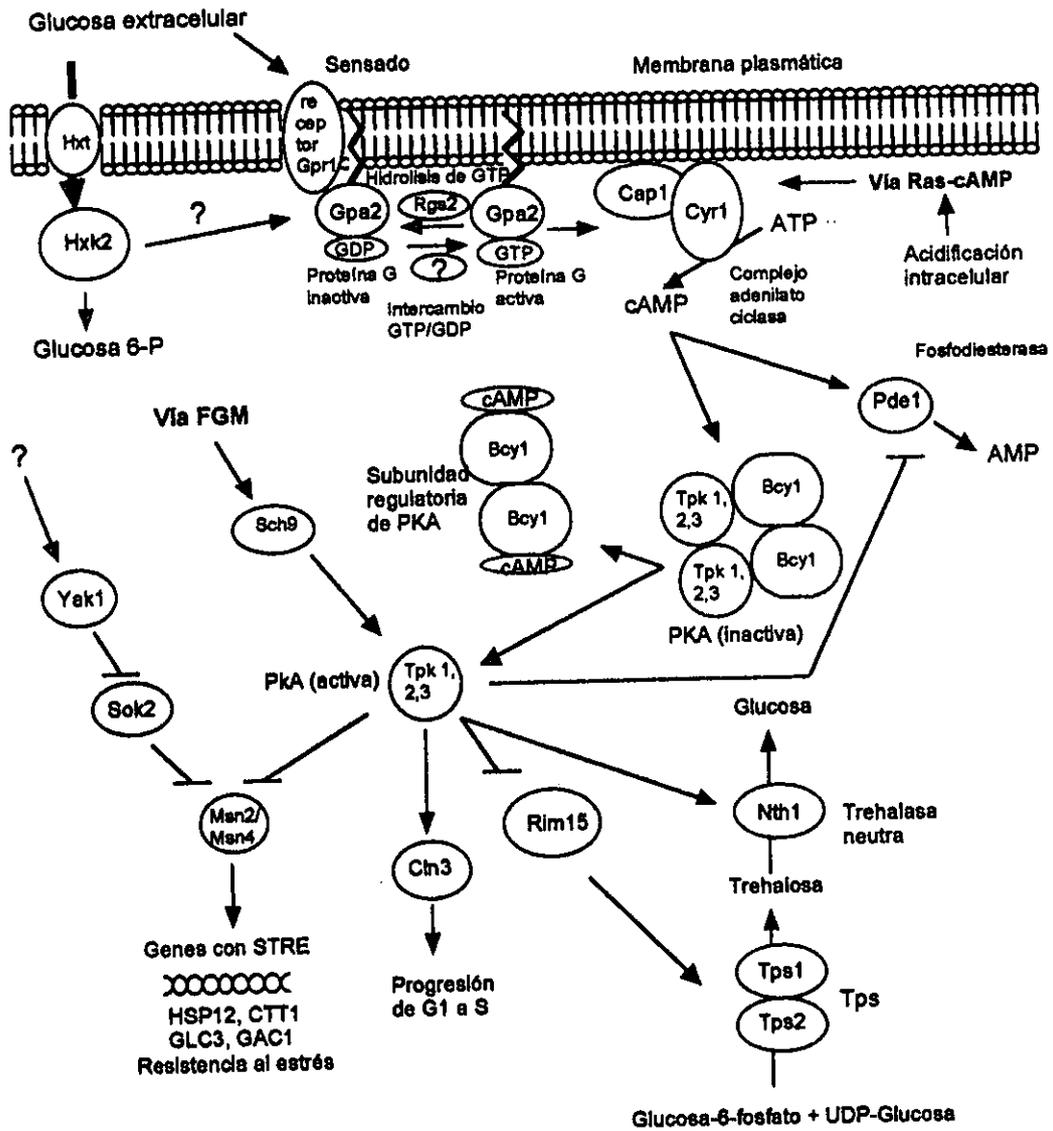


Figura 2. La vía de transducción cAMP-Pka y su relación con el sentido de glucosa en levadura (Modificado de: de Winde et al., 1997; Thevelein and de Winde, 1999)

Como se reportó la identificación de los sensores Snf3 y Rgt2 en la vía de activación de algunos genes que codifican para transportadores de hexosas, se probó si estos sensores pudieran también estar involucrados en el sensado para la vía cAMP-PkA y esto no fue así (Thevelein and de Winde, 1999).

Recientemente se ha identificado una proteína denominada como Gpr1 (G-protein coupled receptor), la cual interacciona con la proteína membranal Gpa1 (ver adelante) que es una proteína G, dando origen a un receptor extracelular de glucosa para la vía cPka.

Hasta ahora, no está claro la conexión entre el sistema Gpa2-Gpr1 adenilato ciclasa y de la fosforilación de la glucosa, por más que siempre se ha afirmado la necesidad de este evento de fosforilación para activar las dos vías principales de sensado de hexosas (Kraakman *et al.*, 1999; Thevelein and de Winde, 1999).

Función de las proteínas Ras y G.

Las proteínas Ras de levadura, igual que sus contrapartes de mamíferos, son proteínas que unen GTP, y en sistemas vertebrados estas proteínas modulan a la adenilato ciclasa (Kataoka *et al.*, 1985; Toda *et al.*, 1985). A diferencia de las proteínas G triméricas, las proteínas Ras son monoméricas, aunque ambas se consideran como GTPasas que se activan al unirse a GTP, y se inactivan al auto-hidrolizar este compuesto (Alberts *et al.*, 1994). En la levadura la mutación de los dos genes *RAS1* y *RAS2* es letal, pero puede ser suprimido por la mutante *bcy1* que codifica para la subunidad regulatoria de PkA; en la mutante *ras2*, más que en la *ras1*, se reduce drásticamente el nivel de cAMP (Toda *et al.*, 1985). Ras es activa cuando se encuentra unida a GTP (Ras-GTP) e inactiva cuando está unida a GDP (Ras-GDP). Los genes *CDC25* y el *SDC25* codifican al intercambiador de GDP por GTP, mientras que los productos de *IRA1* e *IRA2*, activan la función GTPasa intrínseca de Ras, por lo cual inactivan la vía. La proteína Ras-GTP activada estimula a la adenilato ciclasa (codificada por *CYR1/CDC35*) para que produzca cAMP (Thevelein, 1991; Thevelein and de Winde, 1999).

Desde hace mucho tiempo se sugirió que los elementos de Ras, son necesarios para que se de el sensado de la glucosa (Mbonyi *et al.*, 1990). Más recientemente se ha propuesto que la eficiente transición hacia el crecimiento en una fuente de carbono no fermentable a otra fermentable, requiere de la vía Ras-cAMP (Jiang *et al.*, 1998).

La relación GTP/GDP determinada a partir de proteínas Ras aisladas mediante inmuno-purificación, permite estimar el grado de activación de la vía de una manera más confiable y directa (Tanaka *et al.*, 1990). Mediante este análisis, Colombo *et al* (1999) determinaron que la acidificación intracelular induce la síntesis de cAMP a través de Ras y que la glucosa estaría produciendo el mismo efecto, pero, contrario a lo sostenido hasta entonces, a través de la proteína Gpa2 (una proteína G trimérica). Después de este hallazgo, se identificó a Rgs2, un regulador de Gpa2. Al deletarse o sobre-expresarse Rgs2, incrementa y reduce, respectivamente la acumulación de cAMP inducida por glucosa. Rgs2 es entonces un regulador negativo de la señalización por cAMP inducida por glucosa, que se llevaría a cabo a través de la activación ejercida por Rgs2, de la actividad GTPasa de la proteína Gpa2 (Versele *et al.*, 1999).

Síntesis y degradación de cAMP

La cantidad de cAMP presente intracelularmente es el resultado de la síntesis y degradación y este equilibrio es importante para el desarrollo de las levaduras y para adaptarse rápidamente al crecimiento en glucosa. La síntesis la lleva a cabo la adenilato ciclasa codificada por *CYR1/CDC35* y su proteína bifuncional asociada Cap/Srv2, cuyo extremo amino parece interaccionar con la proteínas Ras. Por otra parte, la degradación del cAMP es llevada a cabo por las fosfodiesterasas de baja y alta afinidad codificadas respectivamente por *PDE1* y *PDE2* (Thevelin, 1994). La deleción de *PDE1*, pero no de *PDE2*, causó un incremento de cAMP después de la adición de glucosa o bajo acidificación intracelular, siendo la fosfodiesterasa Pde1 activada rápidamente por fosforilación al adicionar glucosa a un cultivo de levaduras creciendo en glicerol. Además, la deleción de *PDE1* y no de *PDE2*, suprimió el incremento de cAMP inducido por glucosa o acidificación intracelular, lo cual ha llevado a concluir que Pde1 está específicamente involucrada en la señalización por estos agonistas (Ma *et al.*, 1999). Finalmente, se sabe que Tpk, la subunidad catalítica de Pka, ejerce una fuerte inhibición sobre la síntesis de cAMP, mediante un mecanismo apenas elucidado y que consiste en la activación específica por fosforilación de la fosfodiesterasa Pde1 por Tpk, la subunidad catalítica activa de Pka (Ma *et al.*, 1999).

La proteína cinasa A (Pka)

La cinasa Pka está constituida por una subunidad catalítica compuesta a su vez por tres subunidades codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. La subunidad regulatoria se encuentra constituida por dos subunidades idénticas codificadas por el gen *BCY1*. Cuando el cAMP se une a la subunidad Bcy1 se disocia de Tpk que constituye la subunidad catalítica activa. La subunidad catalítica fosforila proteínas blanco, de las cuales unas cuantas han sido identificadas (Thevelein, 1994).

Adicionalmente con la transducción durante el sensado de glucosa llevado a cabo por Pka, se ha propuesto que esta cinasa juega un papel más general, monitoreando e integrando las condiciones externas prevalecientes con el control del ciclo celular. Así, Pka también forma parte de una respuesta general al estrés, caracterizada por controlar genes como *HSP104*, *HSP26*, *HSP12*, *UB14*, *CTT1*, *DDR2*, *TPS2*, *GAC1* y *CYC7*, inducidos por condiciones tan diversas como alta osmolaridad, salinidad, calor, estrés oxidativo, metales pesados, acidez y condiciones adversas de nutrición (Ruis and Schuller, 1995; Siderius and Mager, 1997). Aunque la regulación ejercida por la vía cPka es negativa, ya que la falta de actividad de Pka (por ejemplo mediante mutación en los genes *TPK*), origina una expresión constitutiva de los genes antes señalados (Siderius and Mager, 1997).

Por debajo de Pka

Se han identificado varias proteínas que podrían ser fosforiladas por Pka, como la fructosa 1,6 bifosfatasa, el factor de transcripción Adr1, la cinasa Rim1, la fosfatidil serina sintetasa y tal vez la trehalasa y la fosfofructocinasa 2. También se debe mencionar al factor de transcripción constituido por Msn2 y Msn4 sobre el cual ejerce represión mediante fosforilación (Thevelein, 1994; Smith *et al.*, 1998).

Aunque no se ha demostrado que el blanco de fosforilación sean Msn2 y Msn4, si se ha elucidado que la localización en el núcleo de estos factores depende de la inducción por una variedad de estreses (Gorner *et al.*, 1998). Es interesante mencionar que estos factores también se han relacionado con la vía HOG, de inducción específica por estrés osmótico (Siderius and Mager, 1997). Se ha determinado que el elemento responsivo al que

se pegan estos factores (presentes en los promotores inducidos por estrés osmótico), es el llamado elemento STRE, con la secuencia AGGGG ó CCCCT (Schuller *et al.*, 1994; Marchler *et al.* 1997).

El arresto en el crecimiento bajo ayuno nutricional o inactivación de PkA está asociado con la pérdida en la síntesis de ciclinas. Existen algunas evidencias que sugieren que la ciclina Cln3 podría actuar como un mediador entre la nutrición y el control de la transición de Go/G1. Se ha propuesto que PkA regula la síntesis traduccional de Cln3, enlazando así la disponibilidad de nutrientes con el crecimiento (Hall *et al.*, 1998).

Finalmente debe mencionarse a la cinasa Rim15, que fue identificada durante un rastreo mediante el sistema de dos híbridos (que permite identificar interacciones proteína-proteína *in vivo*), en el cual mostró interacción con la proteína Tps1 utilizada como 'anzuelo'. Esta cinasa es fosforilada e inactivada por PkA. De esta manera, la delección de *RIM15* suprime la termosensibilidad de una mutante en la adenilato ciclasa, y origina células que no dependen de la actividad de PkA. La sobre-expresión de *RIM15* origina células que en fase exponencial se comportan parcialmente como si estuviesen bajo estrés de nutrientes, por lo que muestran mayor síntesis de trehalosa tanto en fase exponencial como estacionaria, una mayor inducción del gen *SSA3*, y una mayor termotolerancia (Reinders *et al.*, 1998). Una de las posibilidades más intrigantes es que, dada la interacción de Rim15 con Tps1, se debe probar si la activación de Tps1 es dependiente de la fosforilación por Rim15. Esto se vuelve particularmente imperativo, en vista de que a Tps1 se le ha involucrado, adicionalmente a su función en la biosíntesis de trehalosa, en la regulación de la entrada de la glucosa en la glicólisis y en la señalización de azúcares a través de la vía aquí descrita (Thevelein and Homann, 1995).

Otras vías relacionadas con PkA

La inactivación de PkA bloquea el crecimiento y las células se arrestan en la fase G1 del ciclo celular, igual a lo ocurrido bajo ayuno de nutrientes. Sin embargo, la delección de *MSN2MSN4* suprime el arresto debido a la inactivación de PkA, indicando que estos factores de transcripción median la expresión de proteínas que causan la inhibición del crecimiento (Smith *et al.*, 1998). Igualmente, la delección de *RIM15* suprime la letalidad causada por la inactividad de PkA (Reinders *et al.*, 1998). En la mutante *msn2msn4*, se

abate la expresión de *YAK1*, que codifica una proteína cinasa que inhibe el crecimiento. La supresión por la mutante *yak1* de la letalidad de una cepa con PkA inactiva, depende de la presencia de Sok1. De igual manera, la sobre-expresión de Sok1 también suprime la letalidad de una mutante en la actividad de PkA, por lo cual se supone que Sok2 pudiera ser un factor de regulación positivo, por debajo de Yak1 (Ward and Garrett, 1994). La ubicación de Yak1 y Sok2 como se muestra en la Figura 2 es hipotética, y aún podría haber cambios, en relación a su ubicación con respecto a Msn2Msn4 (Thevelein and de Winde, 1999).

Otra vía que converge en la cinasa PkA, es la llamada vía FGM (Fermentable Growth Medium-Induced Pathway). Las levaduras pueden entrar en una especie de fase estacionaria aún en presencia de glucosa, si hay deficiencias de nitrógeno, fosfato o sulfato.

En cuanto se añade el compuesto faltante, ocurre una rápida activación de la trehalasa para que la trehalosa sea removida rápidamente (de Winde *et al.*, 1997). Hasta ahora se han establecido varios hechos respecto a ésta vía: 1) no depende de cAMP, y sin embargo se activa PkA, por lo cual se supone que esta cinasa posee otro mecanismo de activación independiente de cAMP (Hirimburegama *et al.*, 1992); 2) al suplirse la deficiencia nutricional, también ocurre una activación en la transcripción de genes para proteínas ribosomales, a la vez que los genes con elementos STRE decrece rápidamente (Winderickx *et al.*, 1996); 3) la activación de la vía FGM no requiere de la fosforilación de los azúcares fermentables (Pernambuco *et al.*, 1996), y 4) se ha identificado a la cinasa Sch9, la cual de alguna manera actúa como inhibidor de PkA, y su delección origina una mayor actividad de PkA, aunque no se han identificado más elementos por arriba de esta cinasa (Crauwels *et al.*, 1997; Thevelein and de Winde, 1999).

3. ANALISIS DE LA FUNCION DE Ggs1/Tps1 EN LEVADURA.

3.1 Función propuesta y evidencias.

Para elucidar el papel de Ggs/Tps1 en la regulación y el metabolismo de azúcares en levaduras, se ha estudiado con detalle al fenotipo de la mutante *tps1*Δ: es incapaz de crecer

abate la expresión de *YAK1*, que codifica una proteína cinasa que inhibe el crecimiento. La supresión por la mutante *yak1* de la letalidad de una cepa con PkA inactiva, depende de la presencia de Sok1. De igual manera, la sobre-expresión de Sok1 también suprime la letalidad de una mutante en la actividad de PkA, por lo cual se supone que Sok2 pudiera ser un factor de regulación positivo, por debajo de Yak1 (Ward and Garrett, 1994). La ubicación de Yak1 y Sok2 como se muestra en la Figura 2 es hipotética, y aún podría haber cambios, en relación a su ubicación con respecto a Msn2Msn4 (Thevelein and de Winde, 1999).

Otra vía que converge en la cinasa PkA, es la llamada vía FGM (Fermentable Growth Medium-Induced Pathway). Las levaduras pueden entrar en una especie de fase estacionaria aún en presencia de glucosa, si hay deficiencias de nitrógeno, fosfato o sulfato.

En cuanto se añade el compuesto faltante, ocurre una rápida activación de la trehalasa para que la trehalosa sea removida rápidamente (de Winde *et al.*, 1997). Hasta ahora se han establecido varios hechos respecto a ésta vía: 1) no depende de cAMP, y sin embargo se activa PkA, por lo cual se supone que esta cinasa posee otro mecanismo de activación independiente de cAMP (Hirimburegama *et al.*, 1992); 2) al suplirse la deficiencia nutricional, también ocurre una activación en la transcripción de genes para proteínas ribosomales, a la vez que los genes con elementos STRE decrece rápidamente (Winderickx *et al.*, 1996); 3) la activación de la vía FGM no requiere de la fosforilación de los azúcares fermentables (Pernambuco *et al.*, 1996), y 4) se ha identificado a la cinasa Sch9, la cual de alguna manera actúa como inhibidor de PkA, y su delección origina una mayor actividad de PkA, aunque no se han identificado más elementos por arriba de esta cinasa (Crauwels *et al.*, 1997; Thevelein and de Winde, 1999).

3. ANALISIS DE LA FUNCION DE Ggs1/Tps1 EN LEVADURA.

3.1 Función propuesta y evidencias.

Para elucidar el papel de Ggs/Tps1 en la regulación y el metabolismo de azúcares en levaduras, se ha estudiado con detalle al fenotipo de la mutante *tps1*Δ: es incapaz de crecer

en una fuente de carbono fermentable como glucosa o fructosa, carece de activación de la vía cPka dependiente de cAMP, al estar ausente un pico de activación transitorio que muestra la cepa silvestre inmediatamente después de la adición de glucosa; la enzima fructosa 1, 6-bifosfatasa no se inactiva y hay una inducción deficiente de piruvato descarboxilasa; no produce trehalosa y como consecuencia la mutante es termosensible y osmosensible; en cuanto a los metabolitos lo más sobresaliente en la mutante es un incremento en glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa-1,6-bifosfato y dihidroxiacetona fosfato; el fosfato intracelular y el ATP se agotan rápidamente, mientras que intermediarios de glicólisis como piruvato y 1, 3-bifosfoglicerato no se forman en la mutante, lo cual evidencia un cuello de botella antes de la síntesis de 1,3-bifosfoglicerato y piruvato; también se reduce más de 100 veces la frecuencia de esporulación (Van Aelst *et al.*, 1993; Thevelein and Hohmann, 1995).

Alelos de *tps1Δ* como *fdp1*, *bypl*, *cif1* y *glc6* han sido clonados y caracterizados. Además, estos son complementados por *GGS1*, indicando que se trata de alelos del mismo gen. *GGS1* fue también clonado por dos grupos bajo la denominación de *TPS1* y *TSS1*, dado que encontraron que codificaba la subunidad pequeña del complejo de la trehalosa sintetasa involucrada en la síntesis de trehalosa (Bell *et al.*, 1992; Vuorio *et al.*, 1993). Se demostró además que el gen de levadura complementaba la síntesis de trehalosa en la mutante *otsA* de *Escherichia coli* defectiva en la trehalosa-6-fosfato sintetasa.

Se ha demostrado que la síntesis de trehalosa se lleva a cabo realmente en un complejo u holoenzima compuesto de varias subunidades: la trehalosa-6-fosfato sintetasa y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa. El complejo lo integran tres subunidades y *GGS1/TPS1* codifica la subunidad más pequeña (56 kDa) que se supone es la subunidad catalítica de la actividad sintetasa. El gen *TPS2* codifica la subunidad fosfatasa (102 kDa), mientras que *TPS3* y *TSL1* codifican redundantemente la subunidad regulatoria (de 115 y 123 kDa respectivamente). Tpl1 muestra una gran homología con las otras tres proteínas, lo que ha hecho suponer que la región de homología podría estar implicada en la oligomerización de las subunidades en el complejo (Reinders *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1998).

El hallazgo de que *GGS1/TPS1* codificaba la subunidad de la trehalosa sintetasa dio una explicación lógica al bajo nivel de trehalosa observado originalmente en la mutante *fdp1*. En ese momento se pensó que podría deberse a un defecto regulatorio. Sin embargo, una pregunta completamente nueva emergió, referente a porqué un defecto en la síntesis de trehalosa es capaz de producir un fenotipo tan pleiotrópico en las mutantes *ggs1Δ/tps1Δ*, en especial la inhabilidad para crecer con glucosa o fructosa como fuente de carbono y la falta de activación de la vía cAMP-PkA.

Mediciones hechas e la mutante *tps1Δ* inmediatamente después de añadir glucosa, han mostrado un influjo desmedido de glucosa en glicólisis, resultando en una rápida desregulación, misma que se manifiesta como una acumulación excesiva de fructosa 2,6-bifosfato y una deficiencia de polifosfato que ocasiona que la glicólisis se interrumpa durante la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Van Aelst *et al.*, 1993). Cabe señalar que esta mutante puede rescatarse creciéndola en un medio con una fuente de carbono no fermentable como etanol y glicerol, o semi-fermentable como galactosa.

Hasta ahora es universalmente aceptado el papel del complejo Tps en la biosíntesis de trehalosa. Más difícil de explicar es como éste podría estar involucrado en la regulación de la entrada de hexosas en la glicólisis, y tal vez también en la señalización de los azúcares en las células. Actualmente hay tres hipótesis: 1) se ha propuesto que las células de levadura poseen un complejo sensor de glucosa (GGS o General Glucose Sensor), compuesto al menos de, un transportador de azúcar de baja afinidad, la hexocinasa 2, y Tps1. El complejo o al menos la interacción funcional entre estas proteínas tendría al menos dos efectos principales: i) el control en el influjo de glucosa en glicólisis, y ii) la activación de varias vías de señalización, responsables de la amplia gama de efectos regulatorios producidos por la glucosa (Van Aelst *et al.*, 1993; Thevelein and Hohmann, 1995); 2) La biosíntesis de trehalosa sirve como un amortiguador metabólico cuando la glicólisis se sobreactiva y disminuye el fosfato inorgánico, el cual después se requiere como sustrato de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Hohmann *et al.*, 1993;); 3) Tps1 es requerido para controlar la entrada de glucosa en glicólisis, mediante la producción de trehalosa-6-fosfato, sustrato que inhibe la actividad de la hexocinasa, regulando de ésta manera una entrada desbordada de hexosas en glicólisis (Blázquez *et al.*, 1993; Teusink *et al.*, 1998).

3.2 Alelos de *ggs1Δ/tps1Δ*

El fenotipo de *ggs1Δ/tps1Δ* es bastante complejo, y para facilitar su análisis se puede dividir en tres diferentes aspectos que se ven afectados: 1) La mutante es incapaz de crecer utilizando azúcares rápidamente fermentables, como glucosa o fructosa, 2) es deficiente en la activación de PkA a través de un incremento transitorio de cAMP, y 3) tiene un bajo o nulo contenido de trehalosa y glicógeno (Hohmann *et al.*, 1993; Thevelein and Hohmann, 1995).

Mutantes puntuales que originan alelos como *fdp1*, *byp1-3*, *cif1*, *glc6* y la delección *ggs1Δtps1Δ* se denominan de forma sugerente, ya que se enfatiza el principal defecto fenotípico que permitió su identificación y caracterización.

***fdp1* (deficiente en la activación de la fructosa bifosfatasa).**

Esta mutante fue aislada por Van de Poll *et al* (1974), y al secuenciar al gen mutado, se encontró que tiene una mutación puntual que cambia glutamina por glicina en el aminoácido 64 de la proteína (Van Aelst *et al.*, 1993). Es incapaz de crecer en glucosa, pero las enzimas de glicólisis no se inactivan. No sintetiza trehalosa. Carece de la activación de Pka mediante cAMP, pero al crecer en una fuente de carbono no-fermentable, Pka presenta una alta actividad; la enzima fructosa 1,6-bifosfato no se inactiva rápidamente en presencia de glucosa; presenta ayuno de ATP y muestra una hiperacumulación de azúcares fosforilados (Van Aelst *et al.*, 1991).

***byp1-3* (bypass of phosphofructokinase reaction).**

Este alelo es una mutación ámbar sin sentido a la altura del aminoácido 317 (de 495 de la proteína completa) que puede suprimirse parcialmente con la sobre-expresión del tRNA^{GLN} (CAG) o del mismo alelo mutado. Se considera una mutación débil, ya que un poco del tRNA^{GLN} puede aparearse el codón de terminación, más aún cuando el gen que codifica a éste tRNA se sobre-expresa; no crece en presencia de glucosa o lo hace con una fase lag muy prolongada; es deficiente en la señalización por cAMP; puede llegar a

sintetizar trehalosa en ciertos fondos genéticos, pero no en la cepa W303-1A; después de añadir glucosa, la inactivación de la fructosa 1,6-bifosfatasa y la estimulación de la síntesis de fructosa 2,6-fosafato se retardan mucho en comparación con la cepa silvestre, pero la activación de trehalasa inducida por glucosa es normal (Breitenbach-Schmitt *et al.*, 1984; Hohmann *et al.*, 1992; Hohmann *et al.*, 1994).

***cif1* (catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase).**

Esta mutante fue aislada por Navon *et al.* (1979). Al secuenciar este alelo, se encontró que una mutación en el codón 182 (triptófano), origina un codón sin sentido, originando una proteína no funcional (Van Aelst *et al.*, 1993). Es incapaz de crecer en azúcares fermentables, no inactiva a la fructosa 1,6-difosfatasa en presencia de glucosa, no responde a la glucosa con un incremento en cAMP; no acumula trehalosa y es muy similar a la mutante *fdp1* (Bell *et al.*, 1992; Blázquez and Gancedo, 1994).

Sería interesante probar si, al igual que como ocurre con *byp1-3*, la sobre-expresión de tRNA^{GLN} pudiera suprimir al menos parcialmente esta mutante sin sentido, ya que en ambos casos, se ha mutado un codón TGG que codifica para triptófano, aunque en el caso de *cif1*, la proteína truncada es mucho más pequeña, y tal vez por esto, la mutación es más drástica.

***ggs1Δ/tps1Δ* (general glucose sensor/trehalose phosphate synthase).**

La designación de Tps1 se adoptó cuando se relacionó al gen *TPS1* con la trehalosa 6-fosfato sintetasa (Bell *et al.*, 1992). De hecho, también se le designó como *TSSI* (trehalose synthase short chain), para diferenciarlo de *TSL1*, ó *TPS2* que codifica para la función de fosfatasa de trehalosa (Vuorio *et al.*, 1993). Inmediatamente se cayó en la cuenta que la mutante *tps1Δ* era alélica a *fdp1*, *cif1* y *byp1-3*.

Otro grupo que analizaba la activación de la vía de Ras-cAMP (ahora denominada como cAMP-PkA) por glucosa, le designó como *ggs1Δ*, por su supuesto involucramiento en la señalización mediante esta vía (Van Aelst *et al.*, 1993). Esta mutante posee juntos todos los defectos de los alelos antes mencionados: no crece ni en glucosa ni en fructosa, no

produce trehalosa, no hay activación de la síntesis de cAMP inducida por glucosa, las enzimas fructosa 1, 6 bifosfatasa no se reprime en presencia de glucosa, se agota el ATP y el fosfato inorgánico lo que ocasiona que no se produzcan los primeros productos de la glicólisis, como el 1,3-fosfoglicerato y el piruvato (Van Aelst *et al.*, 1993; Thevelein and Hohmann, 1995).

***glc6* (glycogen-deficient).**

Este alelo se aisló en un rastreo para buscar mutantes defectivas en la síntesis de glicógeno. El alelo *glc6* posee un codón para histidina (CAT) en el residuo 223, mientras que el gen silvestre codifica para tirosina. Sintetiza solo un 70% de glicógeno en comparación con la cepa silvestre, y lo más notable, es que produce alrededor de 120% de trehalosa en comparación con la cepa silvestre y crece muy lentamente en glucosa (Cannon *et al.*, 1994)

3.3 Supresores de *ggs1Δ/tps1Δ* y sus alelos.

Un cuadro sintético de las mutantes supresoras, y los supresores por sobre-expresión se presentan en la Figura 3, y a continuación se enlistan éstas, detallando el efecto que provocan.

Mutación de *HXK2*.

La delección de *HXK2*, corrige algunos defectos de *ggs1Δ/tps1Δ*, como el crecimiento en glucosa, la inducción por glucosa de piruvato decarboxilasa, de la vía de señalización mediante cAMP, la inactivación de la fructosa-1,6-bifosfatasa y la activación del sistema de transporte de potasio (Hohmann *et al.*, 1993)

Como se mencionó antes, la mutación de *TPS1* tiene como uno de sus principales efectos el producir un exceso de azúcares fosforilados, un excesivo flujo inicial de estos en glicólisis y el agotamiento de ATP. Esto finalmente bloquea la glicólisis debido a la falta de fosfato libre para que la glicólisis proceda más allá de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Van Aelst *et al.*, 1993). Por esto, parece congruente que al disminuir la fosforilación de hexosas a través de disminuir la actividad hexokinasa, se alivie uno de los

problemas ocasionados por la mutación *tps1Δ*, al menos en lo que se refiere al flujo de hexosas en la glicólisis. Se ha postulado que la síntesis de trehalosa podría funcionar como un amortiguador de la poza de fosfato inorgánico libre, el cual se requiere para la reacción de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, regulándose de esta manera el influjo de azúcares en glicólisis (Hohmann *et al.*, 1993).

Mutación de *QCR9*.

QCR9 codifica una subunidad del complejo bc1 del citocromo, y su disrupción restaura el crecimiento en glucosa de la mutante *tps1Δ*. Se piensa que esta supresión se debe a que la inhibición provocada sobre la cadena respiratoria y por lo tanto sobre la respiración tiene como efecto un incremento en los niveles de NADH, forzando por lo tanto la producción de glicerol por la glicerofosfato deshidrogenasa y la glicerofosfatasa (Blázquez and Gancedo, 1995). Esta idea es consistente con el hecho de que también la sobre-expresión de *GPD1*, que codifica la glicerofosfato deshidrogenasa, permite el crecimiento de la mutante *tps1Δ* en glucosa (Luyten *et al.*, 1995). Acorde con este posible efecto de *qcr9*, algunos bloqueadores de la cadena respiratoria, como la antimicina A, restauran igualmente el crecimiento de *tps1Δ* en glucosa (Blázquez and Gancedo, 1995).

Sobre-expresión de *FPS1*.

El gen *FPS1* fue aislado como un supresor de *fdp1*, durante los intentos por complementar con el gen silvestre a esta mutante con una genoteca hecha en un vector de copia única (Van Aelst *et al.*, 1991). Se ha postulado que este gen codifica una proteína de la familia de los MIPs ('membrane-intrinsic proteins'), probablemente un canal que facilita la difusión de glicerol, el cual permanece cerrado bajo condiciones de estrés hiperosmótico, cuando la sobrevivencia depende de la acumulación interna de glicerol, y se abre cuando desaparece el estrés osmótico. De manera interesante, *FPS1* sólo restauró la capacidad de la mutante *fdp1* para crecer en azúcar fermentable, pero no los defectos de señalización inducidos por glucosa a través de la vía cAMP-PkA, ni los cambios rápidos inducidos por glucosa sobre algunas enzimas, como la inactivación de fructosa-1,6-bifosfatasa ni la

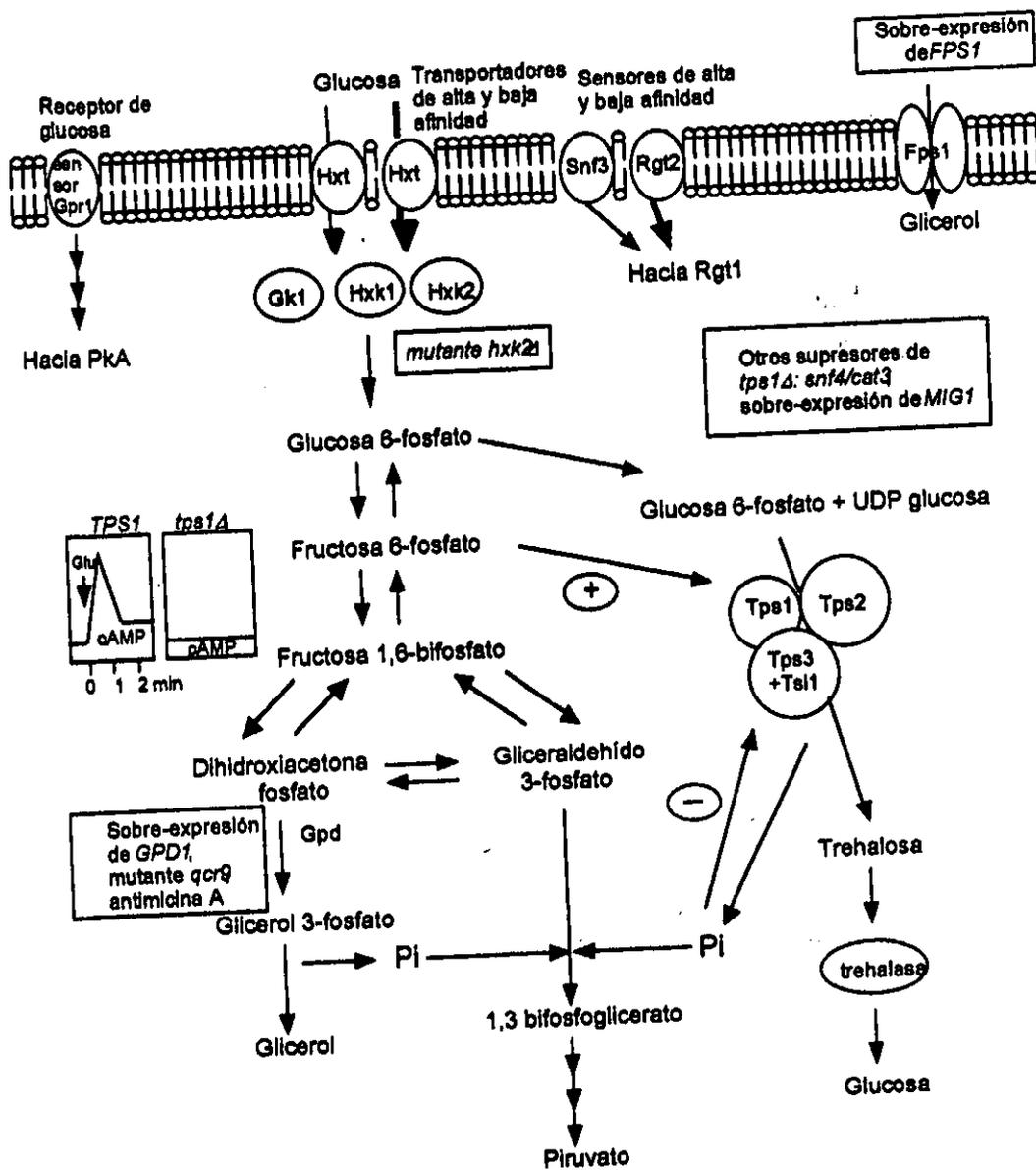


Figura 3. Función que se le asigna a Tps1 en la regulación del metabolismo del carbono y mutantes que suprimen a la mutante *tps1Δ*

activación de trehalasa (Van Aelst *et al.*, 1991). Posteriormente, se demostró que la sobre-expresión de *FPS1* incrementa la producción de glicerol. Como es de esperarse, la disrupción de *FPS1* produce la acumulación de glicerol intracelular (Luyen *et al.*, 1995).

Sobre-expresión de *GPD1*.

GPD1 codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD, que cataliza el primer paso en la producción de glicerol al reducir la dehidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato, que luego se convierte a glicerol por la glicerol-3-fosfatasa.

La sobre-expresión de *GPD1* suprime la inhabilidad de la mutante *ggs1Δ/tps1Δ* para crecer en glucosa o fructosa. Dado que la síntesis de glicerol libera Pi, esto se ha tomado como una prueba más de que el principal problema de la mutante *tps1Δ* que le impide crecer en glucosa, es la rápida caída en los niveles de Pi, situación que es aliviada por la sobre-expresión de *GPD1* (Luyten *et al.*, 1995).

La síntesis de trehalosa se asemeja a la de glicerol en varios aspectos: a) ambos compuestos se sintetizan bajo condiciones de estrés, la trehalosa bajo condiciones de choque térmico y desecación, y el glicerol bajo estrés osmótico; b) los precursores de ambos compuestos se derivan de la parte inicial de la glicólisis, y c) la síntesis de trehalosa y glicerol libera Pi, el cual limita el flujo en glicólisis en la mutante *tps1Δ*.

Mutante *DGT1-1* (Decreasing Glucose Transport)

La mutante *DGT1-1*, es una mutación dominante con efectos pleiotrópicos sobre el metabolismo de glucosa, pero como su nombre lo dice, lo más relevante es que disminuye el transporte de azúcares. En ésta mutante se incrementa la transcripción de *Snf3* (un sensor de alta afinidad), y se reprime la transcripción de los transportadores de alta afinidad *Hxt1* y *Hxt3*. Se piensa que la supresión de la mutante *tps1* por ésta mutante se debe a que corrige el problema del sobreflujo de hexosas hacia glicólisis (Gamo *et al.*, 1994; Blázquez and Gancedo, 1995).

Mutación en *CAT3* (*SNF4/SCI*)

CAT3 es un alelo de *SNF4* y *SCI* (Blázquez y Gancedo, 1995; de Winde *et al.*, 1997), el cual forma parte del complejo Snf1 (Cat1), que ejerce su efecto a través del represor de la transcripción Mig1. Inicialmente *sci1* se aisló como un supresor de *cif1*, permitiéndole recuperar la habilidad para crecer en glucosa. Adicionalmente, se determinó que la delección *sci1* también era incapaz de crecer en glucosa (Blázquez and Gancedo; 1994). Uno de los efectos visibles en esta mutante, es la reducción del transporte de glucosa, lo cual a su vez ocasiona una reducción en la glicólisis de hasta el 33 por ciento, lo cual podría tener un efecto amortiguador sobre el desbalance metabólico que experimenta la mutante *tps1Δ*, debido a la excesiva entrada de azúcares en glicólisis (Blázquez and Gancedo, 1995).

Sobre-expresión de *MIG1*

Mig1 es un represor de la transcripción con estructura de dedos de zinc que posee un papel central en el mecanismo de represión por glucosa. Actúa concertadamente con los factores Tup1 y Ssn6 (De Winde *et al.*, 1997; Gancedo, 1998). Suprime el defecto de *byp1-3* para crecer en glucosa cuando se sobre-expresa, incluso en un vector centromérico, aunque el efecto es más claro cuando está en multicopia. Esta supresión es parcial, ya que sólo se corrige el defecto al inicio del crecimiento en glucosa (el cual para este alelo se manifiesta con una fase lag muy pronunciada), pero no el resto de las anomalías regulatorias de la mutante (Hohmann *et al.*, 1992).

La interpretación de esta supresión es que, al igual que la mutación en *CAT3/SNF4*, la sobre-expresión de *MIG1*, conlleva una mayor represión de los genes controlados por esta vía, entre éstos los transportadores de hexosas, con lo cual se logra un flujo de azúcares hacia la glicólisis más lento, evitándose la sobre-producción de azúcares fosforilados y el consiguiente déficit de fosfato que muestra la mutante *bcy1-3* (Blázquez and Gancedo, 1995).

4. ANALISIS DE GENES DE PLANTAS POR COMPLEMENTACION DE LEVADURA.

4.1 La levadura como un sistema de expresión heterólogo.

El análisis de la función de los genes es de central importancia para la comprensión de los procesos fisiológicos. Desde hace unos 15 años, se logró la primera complementación funcional heteróloga por un gen de plantas al identificarse la clona correspondiente capaz de rescatar la mutante *glnA* para glutamino sintetasa de *E. coli* (DasSarma *et al.*, 1986). Sin embargo, la utilidad de este sistema de expresión es limitada para los organismos eucariotes, debido a grandes diferencias en la estructura y el procesamiento de la información genética. Por lo mismo, ha sido un gran acierto el desarrollar las herramientas necesarias para utilizar a la levadura como un sistema de expresión heterólogo, que ha rendido buenos frutos en el análisis funcional de los genes de animales y plantas. El primer gen de un eucariote superior aislado por complementación de levadura, fue el *CDC2* de humanos, implicado en la división celular (Lee and Nurse, 1987). Desde entonces, la expresión en levadura se ha utilizado como una herramienta muy útil para aislar genes por complementación o para probar su función.

Los primeros ejemplos de genes de plantas expresados exitosamente en levadura, fueron una cinasa de arroz que complementó la mutante *snf1*, cuyo gen silvestre está implicado en la represión catabólica por glucosa (Alderson *et al.*, 1991), y la enzima formadora de etileno (Efe) de jitomate (Hamilton *et al.*, 1991). Más tarde, se construyó una genoteca de expresión de cDNA de *Arabidopsis thaliana* en el vector pFL61 de levadura con el promotor *PGK1* (del gen de fosfoglicerol cinasa). Además de haber complementado las auxotrofias más usuales de levadura (*ura3*, *adel*, *leu2*, *his3*, *trp1*) con los correspondientes cDNAs de *Arabidopsis*, de esta genoteca se han aislado por complementación una gran cantidad de genes de plantas (Minet *et al.*, 1992).

En particular, el sistema heterólogo de levadura ha sido de gran utilidad para aislar genes que codifican proteínas de transporte de membranas, (difíciles de purificar para hacer anticuerpos que luego se puedan utilizar para efectuar rastreos de genotecas de expresión) por la facilidad para establecer sistemas de selección adecuados basados en mutantes.

No se ha reportado la existencia de una fructocinasa en levadura, donde la fosforilación de fructosa es llevada a cabo por la Hxk1 y Hxk2, y adicionalmente existe una glucocinasa (Glk) que sólo fosforila glucosa. Sin embargo, se pudo utilizar la misma doble mutante *hvk1Δ/hvk2Δ*, para caracterizar dos genes codificantes de fructocinasas de tomate (*FRK1* y *FRK2*), que también fueron capaces de rescatar el crecimiento de la mutante en un medio con fructosa como fuente de carbono (Kanayama *et al.*, 1998).

Finalmente, se debe consignar que la levadura ha sido útil para rebatir la idea hasta hace poco prevaleciente de que plantas angiospermas no poseían la habilidad para sintetizar trehalosa (con la excepción de la planta de resurrección *Myrothamnus flabellifolia*), ya que al igual que en levadura, se determinó que *Arabidopsis* posee genes codificantes de trehalosa-6-fosfato sintetasa y de trehalosa-6-fosfato fosfatasa. El gen *AtTPS1* de *Arabidopsis* pudo rescatar la mutante *tps1Δ* incapaz de crecer en una fuente de carbono fermentable como glucosa (Blázquez *et al.*, 1998), y ambos genes *AtTPPA* y *AtTPPB* restauraron la termotolerancia para crecer a 38.6 °C que pierde la mutante *tps2Δ* de levadura, presumiblemente debido a la acumulación excesiva del intermediario trehalosa-6-fosfato (Vogel *et al.*, 1998).

5. BIOSINTESIS DE TREHALOSA EN PLANTAS

5.1 La trehalosa en las plantas

Hasta hace pocos años era idea generalizada que la trehalosa sólo se encontraba en algunas plantas como *Selaginella lephidophylla*, y en *Myrothamnus flabellifolia* como caso único en angiospermas. Al mismo tiempo, era intrigante el haber encontrado actividad de trehalasa en cultivos *in vitro* de especies, como maíz, trigo, soya, *Arabidopsis* y muchas más, pero sin detectar su sustrato, es decir a la trehalosa (Muller *et al.*, 1995).

Una primera pista para explicar éstos datos tan contradictorios, se tuvo cuando se pudo detectar un incremento notable de trehalosa en plantas de tabaco y papa transformadas con los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli*, bajo la aplicación de validamicina A, un potente inhibidor de la trehalasa (Goddijn *et al.*, 1997). Aparentemente la trehalosa puede ser rápidamente degradada por la trehalasa, y ambas están presentes en tal vez todas las especies vasculares y no sólo en las primitivas como *Selaginella*.

No se ha reportado la existencia de una fructocinasa en levadura, donde la fosforilación de fructosa es llevada a cabo por la Hxk1 y Hxk2, y adicionalmente existe una glucocinasa (Glc) que sólo fosforila glucosa. Sin embargo, se pudo utilizar la misma doble mutante *hvk1Δ/hvk2Δ*, para caracterizar dos genes codificantes de fructocinasas de tomate (*FRK1* y *FRK2*), que también fueron capaces de rescatar el crecimiento de la mutante en un medio con fructosa como fuente de carbono (Kanayama *et al.*, 1998).

Finalmente, se debe consignar que la levadura ha sido útil para rebatir la idea hasta hace poco prevaleciente de que plantas angiospermas no poseían la habilidad para sintetizar trehalosa (con la excepción de la planta de resurrección *Myrothamnus flabellifolia*), ya que al igual que en levadura, se determinó que *Arabidopsis* posee genes codificantes de trehalosa-6-fosfato sintetasa y de trehalosa-6-fosfato fosfatasa. El gen *AtTPS1* de *Arabidopsis* pudo rescatar la mutante *tps1Δ* incapaz de crecer en una fuente de carbono fermentable como glucosa (Blázquez *et al.*, 1998), y ambos genes *AtTPPA* y *AtTPPB* restauraron la termotolerancia para crecer a 38.6 °C que pierde la mutante *tps2Δ* de levadura, presumiblemente debido a la acumulación excesiva del intermediario trehalosa-6-fosfato (Vogel *et al.*, 1998).

5. BIOSINTESIS DE TREHALOSA EN PLANTAS

5.1 La trehalosa en las plantas

Hasta hace pocos años era idea generalizada que la trehalosa sólo se encontraba en algunas plantas como *Selaginella lephidophylla*, y en *Myrothamnus flabellifolia* como caso único en angiospermas. Al mismo tiempo, era intrigante el haber encontrado actividad de trehalasa en cultivos *in vitro* de especies, como maíz, trigo, soya, *Arabidopsis* y muchas más, pero sin detectar su substrato, es decir a la trehalosa (Muller *et al.*, 1995).

Una primera pista para explicar éstos datos tan contradictorios, se tuvo cuando se pudo detectar un incremento notable de trehalosa en plantas de tabaco y papa transformadas con los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli*, bajo la aplicación de validamicina A, un potente inhibidor de la trehalasa (Goddijn *et al.*, 1997). Aparentemente la trehalosa puede ser rápidamente degradada por la trehalasa, y ambas están presentes en tal vez todas las especies vasculares y no sólo en las primitivas como *Selaginella*.

Tabla 1. Genes representativos de plantas relacionados con la regulación y metabolismo del carbono que se han expresado en levaduras.

cDNA	Proteína y especie	Fenotipo complementado *	Referencia
<i>cRKIN</i>	Snf1, cinasa de arroz	Capacidad para crecer en glicerol de <i>snf1Δ</i>	Alderson <i>et al.</i> , 1991
<i>SoSUC</i>	Suc, transportador de sacarosa de espinaca	Capacidad para crecer en sacarosa de <i>suc2Δ</i>	Riesmeier <i>et al.</i> , 1992
<i>SUC1</i> y <i>SUC2</i>	Suc, transportador de sacarosa de <i>Arabidopsis</i>	Internalización de sacarosa de cepa silvestre creciendo en glucosa	Sauer and Stoltz, 1994
<i>cSBP</i>	Sbp, proteína de unión a sacarosa de soya	Restaura el transporte de sacarosa en <i>suc2Δ</i>	Overvoorde <i>et al.</i> , 1996
<i>AtHXK1</i> y <i>AtHXK2</i>	Hxk1 y 2, hexo-cinasas de <i>Arabidopsis</i>	Restaura el crecimiento en fructosa de la mutante <i>hxk1Δhxk2Δ</i>	Jang <i>et al.</i> , 1997
<i>FRK1</i> y <i>FRK2</i>	Frk1 y 2, fructo-cinasas de tomate	Restaura crecimiento en fructosa de la mutante <i>hxk1Δhxk2Δglk1Δ</i>	Kanayama <i>et al.</i> , 1998
<i>AtTPS1</i>	Tps1, sintasa de trehalosa de <i>Arabidopsis</i>	Restaura el crecimiento en glucosa de la mutante <i>tps1Δ</i>	Blázquez <i>et al.</i> , 1998
<i>AtTPPA</i> y <i>AtTPPB</i>	Tps2, fosfatasa de trehalosa de <i>Arabidopsis</i>	Restaura el crecimiento a 38.6 °C de la mutante <i>tps2Δ</i>	Vogel <i>et al.</i> , 1998
<i>SITPS1</i>	Tps1, sintasa de trehalosa de <i>S. lepidophylla</i>	Restaura el crecimiento en glucosa de la mutante <i>tps1Δ</i>	Zentella <i>et al.</i> , 1999
<i>AKIN10</i> y <i>AKIN11</i>	Snf1, cinasa de <i>Arabidopsis</i>	Capacidad para crecer en glicerol de <i>snf10</i> y <i>snf4</i>	Bhalerao <i>et al.</i> , 1999

* Sólo se indica el fenotipo rescatado más significativo.

La corroboración de esto, se dio contundentemente, cuando se reportaron a los homólogos de *ScTPS1* y *ScTPS2* de *Arabidopsis*, y más aún, estos homólogos fueron capaces de corregir los defectos causados en la levadura por la disrupción de estos genes de manera separada (Blázquez *et al.*, 1998; Voguel *et al.*, 1998).

La secuencia del primer cDNA codificante para *Tps1* de plantas se reportó hace algunos años (Zentella e Iturriaga, 1996), y posteriormente se reportó el aislamiento y la caracterización molecular de *SITPS1*, de *Selaginella lepidophylla*, el cual, al igual que el gen de *Arabidopsis*, corrigió la inhabilidad de la mutante *tps1Δ* para crecer en glucosa, además de la sensibilidad de la mutante al estrés osmótico y térmico (Zentella *et al.*, 1999).

Recientemente, se hizo una búsqueda de homólogos de *Tps1* y *Tps2* en las bases de datos del GenBank y el EMBL, de *Arabidopsis* y demás especies de plantas, y sorpresivamente se encontraron 4 secuencias más relacionadas, adicionalmente a las ya reportadas de *AtTPS1*, *AtTPPA* y *AtTPPB* (Goddijn and Van Dun, 1999). De este análisis de comparación con *TPS1* y *TPS2* de levadura, y *TPS* y *TPP* de plantas se valida la idea, consistente en que el dominio carboxilo de *Tps1* posee una cierta homología con *Tps2*, por lo cual podría tener también una función de fosfatasa *Tpp* (Zentella e Iturriaga, 1996; Zentella *et al.*, 1999). De las comparaciones que se hacen, se encuentra que, aunque todas las *Tps1* de levadura poseen ese dominio carboxilo, sólo tres poseen en este un dominio de fosfohidrolasa presentes también en las fosfatasas *Tps2* y en *OtsB* de *E. coli*, y dos de éstas (*AtTps1* y *SITps1*), no lo poseen, por lo cual se propone la existencia de *Tps(s)* clase I y clase II. Mientras que en el primer grupo poseen sólo la función sintetasa, las de clase II, además de la función *Tps1* de sintetasa podrían tener también la función *Tpp* de la fosfatasa (Goddijn and van Dun, 1999).

Es predecible que en los próximos años se avance en la caracterización de estas proteínas. Recientemente en un rastreo hecho con una columna de afinidad con la proteína 14-3-3, (conocidas por unirse y regular a algunas fosfohidrolasas fosforiladas implicadas en el metabolismo de N y C), se identificaron proteínas *Tps* (tal vez bipartitas, con dominio *Tpp* de fosfatasa de trehalosa) de coliflor (Moorhead *et al.*, 1999).

Sólo la investigación que se haga directamente en plantas podrá contestar hasta donde se da la similitud entre las *Tps* de levadura y las de plantas, ya que hasta ahora sólo se ha determinado que tanto *AtTPS1* de *Arabidopsis* como *SITPS1* de *Selaginella* corrigen

el defecto en la síntesis de trehalosa de la mutante *tps1*Δ, faltando por averiguar si también son restaurados los defectos regulatorios (Blázquez *et al.*, 1998; Zentella *et al.*, 1999).

5.2 Plantas transgénicas productoras de trehalosa.

Las primeras plantas transgénicas utilizando genes *TPS* heterólogos se obtuvieron hace unos pocos años. Holmstrom *et al* (1996) y después Romero *et al* (1997), sobre-expresaron en tabaco al gen *TPS1* de levadura, y observaron una mayor resistencia a la desecación estimada en plantas enteras, o en la capacidad de retención de la humedad en hojas separadas de la planta y sometidas a desecación de las plantas transgénicas en comparación con el control. Siendo *Tps1* la primera enzima de una vía biosintética que requiere también a la fosfatasa *Tpp* (en levadura *Tps2*), no se encontró al intermediario trehalosa-6-fosfato, asumiéndose entonces que una fosfatasa endógena específica o inespecífica transforma a este intermediario en trehalosa (Holmstrom *et al.*, 1996).

Posteriormente se identificó en *Arabidopsis* a las fosfatasas *AtTppA* y *AtTppB* encargadas de realizar la segunda parte de la reacción (Voguel *et al.*, 1998), por lo cual es seguro que homólogos de estas enzimas se encuentran presentes en tabaco.

Es importante mencionar la observación de que el gen *TPS1* de levadura sobre-expresado realmente ejerce un efecto pleiotrópico en las plantas transgénicas, que muestran algunas malformaciones, como reducción en el crecimiento, hojas lanceoladas y reducido contenido de sacarosa (Romero *et al.*, 1997), por lo cual se ha especulado sobre la posibilidad de que en las plantas, estas proteínas pudiesen estar jugando un doble papel catalítico y regulatorio, ya sea de las proteínas, o bien del intermediario trehalosa-6-fosfato que podría como en levadura, inhibir la actividad de la hexocinasa (Romero *et al.*, 1997; Goddijn and Smeekens, 1998).

El grupo de la compañía Zeneca-MOGEN de Holanda también ha producido plantas transgénicas sobre-expresando a los genes *otsA* y *otsB* de *Escherichia coli*. También pudieron lograr un incremento en la resistencia a la desecación en las plantas transgénicas de tabaco, observando también algunos defectos morfológicos, aunque bajo sequía, las transgénicas desarrollaron entre un 25 y 33 % más de superficie foliar y una mayor eficiencia fotosintética estimada por análisis de fluorescencia de la clorofila (Pilon-Smits *et al.*, 1998).

El mismo grupo había demostrado previamente que para que la biosíntesis de trehalosa en las plantas transgénicas de tabaco pudiese ser más evidente, se requería de inhibir a la actividad de la trehalasa con el antibiótico validamicina A; bajo estas condiciones también detectaron trehalosa en las plantas no transformadas, demostrando que en angiospermas como el tabaco también podría existir esta vía, contrario a la creencia de que sólo las plantas de resurrección podrían sintetizar trehalosa (Goddijn *et al.*, 1997).

En el futuro se harán plantas transgénicas empleando los genes de plantas *TPSI*, como *SITPSI* u otros de *Arabiopsis* del tipo *TPSI/P* bipartitas recientemente identificados pero aún no probados (Goddijn and Van Dun, 1999). Será prioritario el incrementar la síntesis de trehalosa en las plantas, pero reduciendo al máximo los efectos pleiotrópicos colaterales, como deformación morfológica o menor crecimiento.

Otra vía para lograr un incremento en la biosíntesis de trehalosa, podrá ser el de contrarrestar a las ubicuas trehalasas mediante el uso de RNA antisentido. Al menos en soya ya se aisló el gen que codifica una de éstas enzimas y pronto las habrá disponibles para otras especies de plantas volviendo entonces factible esta estrategia (Aeschbacher *et al.*, 1999).

6. EL SENSADO Y LA SEÑALIZACION DE AZUCARES EN LAS PLANTAS

La respuesta de las plantas al estatus cambiante de los carbohidratos puede variar de manera pronunciada. Algunos genes se reprimen y otros se activan. Como en los microorganismos, el sensado de azúcares es parte de un antiguo sistema de ajuste celular a la disponibilidad de nutrientes. En las plantas, sin embargo, la expresión regulada por azúcares provee de un mecanismo para la distribución de nutrientes entre tejidos y órganos (Koch, 1996). Para el caso de la glucosa, se ha postulado también que juega un papel importante en el desarrollo de las plantas al actuar como una molécula señalizadora (Sheen *et al.*, 1999).

En las plantas, la luz enciende genes de fotosíntesis y fijación del carbono en azúcares, dando lugar a la movilización y exportación de estos últimos. Al mismo tiempo, algunos de los genes que están relacionados con el almacenamiento y utilización de azúcares son reprimidos (Koch, 1996; Smeekens and Rook, 1997).

El mismo grupo había demostrado previamente que para que la biosíntesis de trehalosa en las plantas transgénicas de tabaco pudiese ser más evidente, se requería de inhibir a la actividad de la trehalasa con el antibiótico validamicina A; bajo estas condiciones también detectaron trehalosa en las plantas no transformadas, demostrando que en angiospermas como el tabaco también podría existir esta vía, contrario a la creencia de que sólo las plantas de resurrección podrían sintetizar trehalosa (Goddijn *et al.*, 1997).

En el futuro se harán plantas transgénicas empleando los genes de plantas *TPSI*, como *SITPSI* u otros de *Arabiopsis* del tipo *TPSI/P* bipartitas recientemente identificados pero aún no probados (Goddijn and Van Dun, 1999). Será prioritario el incrementar la síntesis de trehalosa en las plantas, pero reduciendo al máximo los efectos pleiotrópicos colaterales, como deformación morfológica o menor crecimiento.

Otra vía para lograr un incremento en la biosíntesis de trehalosa, podrá ser el de contrarrestar a las ubicuas trehalasas mediante el uso de RNA antisentido. Al menos en soya ya se aisló el gen que codifica una de éstas enzimas y pronto las habrá disponibles para otras especies de plantas volviendo entonces factible esta estrategia (Aeschbacher *et al.*, 1999).

6. EL SENSADO Y LA SEÑALIZACION DE AZUCARES EN LAS PLANTAS

La respuesta de las plantas al estatus cambiante de los carbohidratos puede variar de manera pronunciada. Algunos genes se reprimen y otros se activan. Como en los microorganismos, el sensado de azúcares es parte de un antiguo sistema de ajuste celular a la disponibilidad de nutrientes. En las plantas, sin embargo, la expresión regulada por azúcares provee de un mecanismo para la distribución de nutrientes entre tejidos y órganos (Koch, 1996). Para el caso de la glucosa, se ha postulado también que juega un papel importante en el desarrollo de las plantas al actuar como una molécula señalizadora (Sheen *et al.*, 1999).

En las plantas, la luz enciende genes de fotosíntesis y fijación del carbono en azúcares, dando lugar a la movilización y exportación de estos últimos. Al mismo tiempo, algunos de los genes que están relacionados con el almacenamiento y utilización de azúcares son reprimidos (Koch, 1996; Smeekens and Rook, 1997).

A juzgar por algunos resultados reportados en plantas, es casi seguro que en éstas coexistan diferentes vías de transducción para azúcares.

Para analizar la represión metabólica y el sensado de azúcares en las plantas, se ha utilizado un sistema de expresión transitoria para demostrar la represión que azúcares como glucosa y sacarosa (y además el acetato), ejercen sobre la transcripción de algunos genes de maíz cuyos productos están involucrados en la fotosíntesis, como el de la C4 fosfoenolpiruvato carboxilasa (*C4PepCZm1*), la enzima málica (*C4MeZm1*), la proteína a/b de unión a clorofila (*CabZm1* y *CabZm5*) y de la subunidad pequeña de la Rubisco (*RbcSZm1* y *RbcSZm3*) (Sheen, 1990). Al investigar esto, surge la pregunta de en donde son sensados primero la glucosa y la sacarosa en la célula. ¿Son los azúcares sensados por algún sensor transmembranal, o existe un sensor intracelular?. Para contestar éstas preguntas, y utilizando el mismo sistema de expresión transitoria, se demostró que la señal parece ser primero captada por la hexocinasa (aunque no se sabe como la señal es transducida), y posteriormente se pudieron aislar los genes *AtHKK1* y *AtHKK2* de *Arabidopsis*. Con los genes, se construyeron plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan ambos genes, así como las construcciones en antisentido para bloquear la expresión de la hexocinasa. La sobre-expresión de cualquiera de los dos genes volvió a las plantas transgénicas hipersensibles a la glucosa, y al contrario, el bloqueo de la transcripción y el bloqueo de *AtHKK1* ó *AtHKK2* volvió a las plantas hiposensibles a la glucosa, lo cual se manifestó en la desrepresión de algunos genes de fotosíntesis (Jang and Sheen, 1994; Jang and Sheen, 1997; Jang *et al.*, 1997). Como confirmación a éstos resultados, otro grupo aisló y sobre-expresó *AtHXT1* en jitomate, encontrando que esto tuvo el efecto de reducir la fotosíntesis, y acelerar la senescencia (Dai *et al.*, 1995; Dai *et al.*, 1999)

Por otra parte hay algunos datos que contradicen el papel de la hexocinasa como sensor. Se sabe que la invertasa (que hidroliza sacarosa en fructosa y glucosa) se encuentra en citosol, en la pared celular o en apoplasto y en la vacuola. La sobre-expresión del gen de la invertasa de levadura y su direccionamiento al citoplasma, no mostró el efecto de inhibir a genes como *CAB* en tabaco, como podría esperarse ya que las hexosas estarían inmediatamente disponibles para su fosforilación. Por otra parte, al enviar a la invertasa a la vacuola o al apoplasto, los resultados mostraron que podría ocurrir el sensado de hexosas

en la vía de secreción, posiblemente en el retículo endoplasmático o en el aparato de Golgi (Herbers *et al.*, 1996).

Otro grupo sostiene que al igual que en células animales, la cinasa de plantas parecida a Snf1, o SnRK podría ser un importante elemento en la vía de señalización y sensado de la glucosa. Proponen que tal vez ésta al igual que en células animales pudiera estar regulada por la relación de AMP:ATP (Halford and Hardie *et al.*, 1998; Halford *et al.*, 1999). Al hacer plantas transgénicas de papa con el antisentido del gen que codifica SnRK, se demostró que ésta se necesita para la activación del gen de la sintetasa de sacarosa cuando hay niveles altos de azúcares y de ATP y niveles bajos de AMP (Purcell *et al.*, 1999).

Un dato importante sobre la importancia de SnRK, es el aislamiento y parcial caracterización del locus *PRL1* (Pleiotropic Regulatory Locus) que codifica a Prl1, una proteína que interactúa con AKin10 y AKin11, los homólogos de Snf1 de *Arabidopsis*. La mutante *prl1* entre una amplia gama de fenotipos, muestra hipersensibilidad a sacarosa, y se ha demostrado que Prl1 inhibe a AKin10 y AKin11, por lo cual parece ser un regulador negativo de esas cinasas. La interacción entre ambas proteínas se ha demostrado también mediante el sistema del doble híbrido en levadura (Bahlerao *et al.*, 1999).

En levaduras se ha demostrado que el gen proveniente de arroz y de tabaco es capaz de restituir la capacidad de crecimiento en glicerol de la mutante *snf1Δ* (Alderson *et al.*, 1991; Muranaka *et al.*, 1994; Halford and Hardie, 1998)

Reforzando la idea que en plantas deben haber varias vías de transducción para azúcares, Ehness *et al* (1997) reportan haber encontrado vías diversas de MAP cinasas que podrían estar involucradas en vías convergentes de señalización por glucosa, heridas y elicitores de respuesta a hongos en un cultivo en suspensión de *Chenopodium rubrum*.

Si existen varias vías para azúcares en plantas, entonces debe haber más de un solo sensor. En levadura se tienen bien caracterizados a los sensores de glucosa de alta y baja afinidad Snf3 y Rgt2 y que paralelamente a la vía de represión por carbono, activan los genes de los transportadores de hexosas. Recientemente se identificaron tres proteínas parecidas a estos sensores en *Arabidopsis* (Lalond *et al.*, 1999; Sheen *et al.*, 1999).

En el intento de elucidar el sensado y la regulación de la expresión por azúcares en plantas, se ha recurrido a establecer una analogía entre lo que ocurre en levadura y plantas, lo cual ha conducido a identificar a algunos actores de la vía principal de represión catabólica (Jang *et al.*, 1997; Smeekens and Rook, 1997). En la Tabla 1 se resumen los genes y proteínas de plantas más relacionados con el tema, la mayoría de los cuales han podido restaurar a los fenotipos mutantes de la levadura, teniéndose con esto una herramienta para aislar y caracterizar algunos genes de plantas. Desde que comenzó a utilizarse a la levadura como un modelo para plantas, se logró aislar el homólogo de *SNF1*, que codifica la cinasa principal de la vía de represión catabólica en levadura (Alderson *et al.*, 1991). Otra pieza importante ha sido el aislar a los cDNAs *AtHXX1* y *AtHXX2*, codificantes de dos hexocinasas de *Arabidopsis* que fueron clonados al complementar la función catalítica de la mutante *hxx1Δhxx2Δ* (Jang *et al.*, 1997).

Por otra parte, la comparación entre levaduras y plantas es limitada, ya que en plantas la sacarosa es el azúcar mayormente transportado, y se ha propuesto que al igual que la glucosa, podría también ser un efector en plantas mediante una o varias vías independientes del sensado de glucosa (Purcell *et al.*, 1998).

Puede predecirse que los próximos años serán fructíferos el área de la regulación y el sensado de azúcares, un tema que según se ha visto en levadura y comienza a establecerse en plantas, es bastante complejo. Ya se ha identificado el entrecruzamiento de las vías de transducción, como la utilización de la misma vía por efectores como glucosa, heridas y elicitors de hongos (Ehness *et al.*, 1997). Recientemente se ha reportado también un entrecruzamiento de vías de transducción entre glucosa y etileno (Zhou *et al.*, 1998).

Varios grupos están recurriendo al rastreo e identificación de mutantes obtenidos al azar o por inserciones con T-DNA para lograr aislar más candidatos que participen en la transducción de señales y la regulación de la utilización de los azúcares.

Actualmente se cuenta con varias mutantes afectadas en su desarrollo en presencia de glucosa y otros azúcares: las mutantes *gin* (glucose insensitive), las *glo* (glucose oversensitive), las *cai* (carbohydrate insensitive), las *sis* (sucrose insensitive) y las *mig* (mannose insensitive germination) (Sheen *et al.*, 1999; Smeekens and Rook, 1997; Pego *et al.*, 1999).

Al analizar las mutantes *gin* y *glo* se encontró que otras mutantes relacionadas con la vía de transducción del etileno como *eto* (ethilene overproduction) y *ctrl* (constitutive triple response) se comportaban como las mutantes *gin*. Otras mutantes como *etr1* y *ein2* (ethylene insensitive) resultaron ser también con fenotipo *glo*. El análisis genético permitió elucidar que las vías de transducción de glucosa y etileno se entrecruzan (Zhou *et al.*, 1998; Sheen *et al.*, 1999).

Es sorprendente que las proteínas Tps estén también presentes en plantas que no acumulan trehalosa como *Arabidopsis* (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998; Goddijn and Van Dun, 1999). No se sabe si Tps podría intervenir en alguna función regulatoria adicionalmente a su función catalítica en plantas, pero sería interesante llevar a cabo rastreos por el sistema del doble híbrido para ver con que proteínas interacciones la proteína Tps1 en plantas. En levaduras un rastreo de este tipo permitió identificar a la cinasa Rim15 que es fosforilada e inactivada por la cinasa PkA (Reinders *et al.*, 1998). Además sería interesante averiguar si al igual que en levaduras, el intermediario trehalosa-6-fosfato es capaz de inhibir a la hexocinasa tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que de ocurrir se estaría confirmando otra similitud con las levaduras (Goddijn and Smeeckens, 1998). Las mutantes de pérdida de función obtenidas por disrupción con T-DNA del gen *AtTPS1* de *Arabidopsis*, o mediante el uso de RNA antisentido podrá esclarecer algunas de las funciones de esta interesante pero hasta hace poco ignorada vía biosintética.

El proyecto de secuenciación sistemática del genoma de *Arabidopsis* ya está permitiendo el identificar otros genes y proteínas, lo cual está llevando a la identificación *in-silico* de los otros actores que podrían participar en la regulación del metabolismo de azúcares y su sensado y transducción, como la familia de toda una familia de genes y proteínas Tps en *Arabidopsis*, curiosamente algunas con función de sintetasa de trehalosa, otras con la función de fosfatasa de trehalosa, y otras hasta ahora no analizadas *in vivo* e *in vitro* que podrían ser proteínas bipartitas con la función de sintetasa y fosfatasa de trehalosa a la vez (Goddijn and Van Dun, 1999). Otro ejemplo de identificación de genes empleando las bases de información genética como el GenBank, son los posibles homólogos de Snf3 y Rgt2 que recientemente se han identificado de las secuencias disponibles de *Arabidopsis* (Lalonde *et al.*, 1999).

HIPOTESIS

SITPS1, un cDNA aislado de la planta de resurrección *S. lepidophylla* codifica para una proteína que muestra una alta similitud con la enzima trehalosa-6-fosfato sintetasa por lo que se espera que sea capaz de corregir los defectos de la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

1. Caracterizar al cDNA *SITPS1* de *S. lepidophylla* mediante complementación funcional de la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae*.
2. Demostrar que adicionalmente a la capacidad de sintetizar trehalosa y de crecer en glucosa, la mutante *tps1Δ* complementada con *SITPS1* recupera la resistencia al estrés osmótico y la capacidad de desarrollar termotolerancia.
3. Comprobar si *SITPS1*, adicionalmente a la actividad de sintetasa codifica también para la actividad de fosfatasa de trehalosa..

HIPOTESIS

SITPS1, un cDNA aislado de la planta de resurrección *S. lepidophylla* codifica para una proteína que muestra una alta similitud con la enzima trehalosa-6-fosfato sintetasa por lo que se espera que sea capaz de corregir los defectos de la mutante *tps1* Δ de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

1. Caracterizar al cDNA *SITPS1* de *S. lepidophylla* mediante complementación funcional de la mutante *tps1* Δ de *S. cerevisiae*.
2. Demostrar que adicionalmente a la capacidad de sintetizar trehalosa y de crecer en glucosa, la mutante *tps1* Δ complementada con *SITPS1* recupera la resistencia al estrés osmótico y la capacidad de desarrollar termotolerancia.
3. Comprobar si *SITPS1*, adicionalmente a la actividad de sintetasa codifica también para la actividad de fosfatasa de trehalosa..

RESULTADOS

1. Una trehalosa-6-fosfato sintetasa de *Selaginella lepidophylla* complementa el crecimiento y los defectos en la tolerancia al estrés de una mutante *tps1* de levadura.

Título en inglés:

A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant.

Se anexa artículo publicado en Plant Physiology (1999) Vol. 119: 1473-82

A *Selaginella lepidophylla* Trehalose-6-Phosphate Synthase Complements Growth and Stress-Tolerance Defects in a Yeast *tps1* Mutant¹

Rodolfo Zentella², José O. Mascorro-Gallardo², Patrick Van Dijck, Jorge Folch-Mallol, Beatriz Bonini, Christophe Van Vaeck, Roberto Gaxiola, Alejandra A. Covarrubias, Jorge Nieto-Sotelo, Johan M. Thevelein, and Gabriel Iturriaga*

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología-Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, 62210 Cuernavaca Morelos, Mexico (R.Z., J.O.M.-G., J.F.-M., R.G., A.A.C., J.N.-S., G.I.); and Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie and Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, Katholieke Universiteit Leuven, Kardinaal Mercierlaan 92, B-3001 Leuven-Heverlee, Flanders, Belgium (P.V.D., B.B., C.V.V., J.M.T.)

The accumulation of the disaccharide trehalose in anhydrobiotic organisms allows them to survive severe environmental stress. A plant cDNA, *SITPS1*, encoding a 109-kD protein, was isolated from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla*, which accumulates high levels of trehalose. Protein-sequence comparison showed that *SITPS1* shares high similarity to trehalose-6-phosphate synthase genes from prokaryotes and eukaryotes. *SITPS1* mRNA was constitutively expressed in *S. lepidophylla*. DNA gel-blot analysis indicated that *SITPS1* is present as a single-copy gene. Transformation of a *Saccharomyces cerevisiae tps1Δ* mutant disrupted in the *ScTPS1* gene with *S. lepidophylla SITPS1* restored growth on fermentable sugars and the synthesis of trehalose at high levels. Moreover, the *SITPS1* gene introduced into the *tps1Δ* mutant was able to complement both deficiencies: sensitivity to sublethal heat treatment at 39°C and induced thermotolerance at 50°C. The osmosensitive phenotype of the yeast *tps1Δ* mutant grown in NaCl and sorbitol was also restored by the *SITPS1* gene. Thus, *SITPS1* protein is a functional plant homolog capable of sustaining trehalose biosynthesis and could play a major role in stress tolerance in *S. lepidophylla*.

An amazing adaptation that allows survival under complete dehydration is present in yeast cells, fungal spores, certain invertebrate species, and resurrection plants that resume their vital functions as soon as they resume contact with water (Clegg, 1965; Gaff, 1971; Thevelein, 1984). These anhydrobiotic organisms also withstand strong vacuum, high doses of ionizing radiation, and extreme temperatures without suffering damage. In addition, many of these or-

ganisms accumulate the nonreducing disaccharide trehalose (Weisburd, 1988; Crowe et al., 1992).

Among several well-characterized osmoprotectors (Yancey et al., 1982), trehalose seems to be one of the most efficient at maintaining lipids in a fluid phase in the absence of water, thus avoiding phase separation, leakage, and membrane fusion (Crowe et al., 1984, 1987). Trehalose (α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranoside), like other polyols, plays a key role in the structural and functional stabilization of membranes and proteins in the anhydrous state, apparently by means of water replacement of osmolyte molecules (Clegg, 1985) or formation of a glassy state (Burke, 1985).

The biosynthesis of trehalose consists of two enzymatic steps catalyzed by the oligomeric subunits TPS, which synthesizes trehalose-6-P from Glc-6-P and UDP-Glc, and TPP, which forms trehalose (Cabib and Leloir, 1958; Vandercammen et al., 1989; Londesborough and Vuorio, 1993). The genes encoding both enzymes from bacteria and yeast have already been isolated and sequenced (Luyten et al., 1993; Kaasen et al., 1994). Deletion mutants in the trehalose pathway in these microorganisms cause a reduction in osmotolerance (Giaever et al., 1988; Mackenzie et al., 1988) and thermotolerance (Hengge-Aronis et al., 1991; De Virgilio et al., 1994).

The yeast *tps1Δ* mutant and its alleles are unable to grow in Glc as the sole carbon source. There is strong evidence to suggest that this defect is attributable to the additional role of the TPS1 subunit in regulating the flow of Glc into the cell (Van Aelst et al., 1993; Neves et al., 1995; Thevelein and Hohmann, 1995; Hohmann et al., 1996).

Here we report the isolation and molecular characterization of a full-length cDNA encoding the enzyme TPS (*SITPS1*) from the resurrection plant *Selaginella lepidophylla*, which is one of the organisms that accumulates trehalose at higher levels (Adams et al., 1990; Müller et al., 1995). We show that *SITPS1* cDNA encodes a functional TPS able to

¹ This work was supported by grant no. IN202795 to G.I. and J.N.-S. from Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico; by grants to J.M.T. from the Fund for Scientific Research-Flanders and the Research Fund of the Katholieke Universiteit Leuven, Concerted Research Actions, Belgium; and by grant no. 938032MX to R.G. from the European Economic Community, Belgium.

² These authors contributed equally to the paper.

* Corresponding author; e-mail iturri@ibt.unam.mx; fax 52-73-172388.

Abbreviations: TPP, trehalose-6-P phosphatase; TPS, trehalose-6-P synthase.

restore growth in fermentable sugars of a yeast *tps1Δ* mutant. Furthermore, *SITPS1* synthesizes high levels of trehalose and complements osmotolerance and thermotolerance deficiencies in a *tps1Δ* mutant.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Selaginella lepidophylla (Hook. & Grev. Spring.) plants were collected from arid regions of Morelos state in Mexico. Plants were rehydrated and maintained in controlled conditions (24°C and 16 h of light with an average of 50% humidity) in growth chambers (Conviron, Asheville, NC). Subsequently, *S. lepidophylla* microphyll fronds were air dried at the indicated times by placing them on 3MM filter paper (Whatman).

Strains

The cDNA bank was plated in the *Escherichia coli* strain XL-1-Blue MRF', and the strain SOLR was used to excise the pBluescript from the λ phage, following the manufacturer's instructions (Stratagene). The *E. coli* DH5 α strain was used to subclone and make constructs. The yeast strains were wild type, W303-1A (*Mat a leu2-3, 112 ura3-1, trp1-1, his3-11, 15 ade2-1, can1-100, GAL, SUC2*) (Thomas and Rothstein, 1989); *tps1Δ*, YSH290 (W303-1A, *ggs1/tps1Δ::TRP1*) (Hohmann et al., 1993); *tps2Δ*, YSH450 (W303-1A, *tps2Δ::LEU2*) (Neves et al., 1995); and *tps1Δtps2Δ*, YSH652 (W303-1A, *ggs1/tps1Δ::TRP1, tps2Δ::LEU2*) (Neves et al., 1995).

Construction of the cDNA Bank of *S. lepidophylla*

An expression bank was prepared with mRNA isolated from *S. lepidophylla* microphylls dehydrated for 2.5 h using the ZAP cDNA synthesis kit, the Uni-ZAP XR vector, and the Gigapack II Gold packaging extracts following the manufacturer's instructions (Stratagene). The initial titer of the bank was 2×10^6 plaques of bacteriophage/mL and 1.5×10^{11} plaques of bacteriophage/mL after bank amplification. After 4×10^5 recombinant bacteriophages from the amplified cDNA bank of *S. lepidophylla* were plated, 13 plaques were obtained that hybridized with a mixture of the five oligonucleotides TPS5'-1, TPS5'-2, TPS5'-3, TPS3'-1, and TPS3'-2 (see Fig. 1A). In a second screening round, only 6 of the initial 13 plaques hybridized with a mixture of the oligonucleotides TPS5'-1 and TPS5'-2. In a third step, pIBT6 was the only clone that hybridized with the oligonucleotide TPS5'-1, corresponding to the most 5' end of the selected region for isolation of the cDNA. Plaques were converted into plasmid by in vivo excision according to the manufacturer's instructions (Stratagene). Plasmid DNA was digested with *EcoRI* and *XhoI* to excise the corresponding insert, transferred to a Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham), and hybridized to oligonucleotides ³²P labeled with T4 polynucleotide kinase.

The following degenerated oligonucleotides were synthesized for screening of the cDNA bank: TPS5'-1, 5'-YTNTGGCCNBCNTTYCAYTAY-3'; TPS5'-2, 5'-GGNTK-BTTYTNCAYAYNCCNTTYCC-3'; TPS5'-3, 5'-MGNY-TNGAYTAYWBNAARGGNBTNCC-3'; TPS3'-1, 5'-SWN-ACNARRTTCATNCCRTCNCCK-3'; and TPS3'-2, 5'-CCRW-ANTKNCCRTTDTNCKNCC-3' (single-letter abbreviations for wobble nucleotides are B, C, G, or T; K, G or T; M, A or C; N, A or C or G or T; R, A or G; S, C or G; W, A or T; D, A, G, or T; and Y, C or T). These oligonucleotides were designed based on conserved domains of *TPS* sequences (depicted in Fig. 1A) using the following accession numbers: *E. coli*, X69160; *Schizosaccharomyces pombe*, Z29971; *Aspergillus niger*, U07184; *Saccharomyces cerevisiae*, X68214; and *Cluyveromyces lactis*, X72499.

Hybridization of Nucleic Acids

To screen the cDNA bank, the bacteriophage plaques were transferred to a nylon membrane and the filter was hybridized with oligonucleotides and labeled with the ³²P isotope by means of T4 polynucleotide kinase using 6× SSC (1× SSC = 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate) at 37°C. The filter was washed three times at the same temperature for 10 min each under the following conditions: 6× SSC, 4× SSC, and 2× SSC.

Southern- and northern-blot techniques were used according to standard protocols (Sambrook et al., 1989) with the following modifications. For the genomic Southern-blot analysis, the DNA was fractionated on a 0.8% agarose gel in TBE (0.09 M Tris-borate and 0.002 M EDTA) buffer and transferred to a nylon membrane. The filter was hybridized using *SITPS1* cDNA labeled with ³²P isotope as a probe, using 2× SSC at 65°C. The filter was washed three times at the same temperature for 20 min each time under the following conditions: 2× SSC, 1× SSC, and 0.5× SSC. For the northern-blot analysis, a 1.2% agarose gel was used in a Mops-formaldehyde buffer and a Hybond N⁺ nylon membrane was also used for the transfer. Hybridization conditions were in 50% formamide and 2× SSC at 42°C. The three successive filter washings were performed with 2× SSC, 2× SSC, and 1× SSC at 55°C.

DNA Sequencing

Nested deletions of the insert were created with the enzymes exonuclease III and nuclease S1 from the selected clone to subsequently determine the nucleotide sequence of both strands using Sequenase version 2.0 (United States Biochemical). Protein sequence alignments were analyzed using the CLUSTAL W software program (Thompson et al., 1994).

DNA Manipulation and Constructs

Recombinant DNA techniques such as bacterial transformation, isolation of DNA from plasmid, λ bacteriophage, and labeling of radioactive fragments were carried out according to standard procedures (Sambrook et al., 1989). For expression in yeast, two new shuttle-expression vectors

named pSAL4 and pRS6 were constructed. pSAL4 is similar to pSAL1 (Mascorro-Gallardo et al., 1996), but it has the pRS426 backbone (Christianson et al., 1992) with the 2 μ origin of replication and the *URA3* marker. The pRS6 vector was constructed using the *PMA1* gene promoter from the pRS699 vector (Serrano and Villalba, 1995), a polylinker, and the *CYC1* terminator. This cassette was cloned in the pRS423 backbone (Christianson et al., 1992) with the 2 μ origin of replication and the *HIS3* marker.

Two out-of-frame ATG triplets in *SITPS1* cDNA leader (see Fig. 1D) were removed by digesting the pIBT6 clone with *NcoI* and treatment with nuclease S1. The intact leader precludes expression of *SITPS1* in yeast (data not shown). The 3.2-kb *SITPS1* cDNA was subcloned into pSAL4 or pRS6, and the resulting constructions were designated pSTS1 and pRTS1, respectively. The *ScTPS1* and *ScTPS2* yeast genes were isolated from genomic yeast DNA by PCR using primers *ScTPS1-5'* (5'-CCGCTCGAGGGTACTCATAACAGAC-3'), *ScTPS1-3'* (5'-ATAGTTTTGCGCCG-CATCGGGTTCATCAG-3'), *ScTPS2-5'* (5'-CCGCTCGAGCACTATTCTGTGCCG-3'), and *ScTPS2-3'* (5'-CGGGGTACCATGGTGGGTTGAGAC-3'). Amplified fragments were cloned into pSAL4 to give plasmids pSTS2 and pSTS3 or into pRS6 to give plasmids pRTS2 and pRTS3. A truncated *SITPS1* (*SITPS1* Δ C) was constructed by deleting the DNA sequence coding for the 431-amino acid C terminus. The *SITPS1* region coding for the resting 563-amino acid N terminus was amplified by PCR with primers SIDC400-5' (5'-CATGCCATGGCTATGCCTCAGCCTTACC-3') and SIDC400-3' (5'-CGGGGTACCTCACTTTGACTCCGAGTACTTTGC-3') with TAG termination codon. A deletion of *SITPS1* (*SITPS1* Δ N) comprising the 396-amino acid C terminus was constructed by PCR with primer SIDN600-5' (5'-CCGCTCGAGCCATGGTGCATATCCGCCTCAATTGCC-3') and universal primer (5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'). Both *SITPS1* Δ C and *SITPS1* Δ N were amplified using pIBT6 as a template. The PCR products were subcloned into pSAL4 vector to give plasmid pSTS4 or into pRS6 vector to give plasmid pRTS4. PCR was conducted using the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim), and reaction conditions were 1 cycle at 94°C for 3 min; 30 cycles at 94°C for 1 min, at 55°C for 1 min, and at 72°C for 2 min; and 1 cycle at 72°C for 10 min.

Transformation, Complementation, and Stress Assays in Yeast

Yeast was grown at 30°C in minimal medium (0.7% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, pH 6.0, supplemented with 0.002% adenine, 0.002% His, 0.003% Leu, 0.003% Trp, and 0.002% uracil) plus 2% Gal. Transformation was performed as described previously (Eible, 1992), and transformants were selected in medium without uracil for pSAL4 or in medium without His for pRS6. For each construct, at least three independent transformants were chosen to test their ability to restore the growth defect on minimal medium plus 2% Glc. The candidates were streaked on agar plates with minimal medium with 2% Gal, Glc, or Fru. As a control, the same strains were transformed

with the pSAL4 or the pRS6 vector alone. After 3 d, growth was visible in positive control and complemented mutants.

For the thermotolerance assays, liquid cultures were grown at 25°C in minimal medium plus 2% Gal up to the mid-log phase (4×10^6 colony-forming units/mL, corresponding to 0.4 A_{600}), then shifted to 39°C for 1 h for thermoinduction, and further incubated at 50°C for different times to evaluate induced thermotolerance. Decimal dilutions were plated in solid YPGal (2% Bacto-peptone, 1% yeast extract, 2% Gal, and 2% agar) and grown at 25°C for 3 d before colony counting. The level of thermotolerance was expressed as the ratio (percentage) of viability after the 50°C treatment and immediately before the 50°C treatment.

For the osmotolerance assays, exponential cultures were first diluted until A_{600} was 0.1 and then serially diluted 5-fold at each step. Spots were made with 4 μ L of each dilution and plated in solid YPGal supplemented with 0.9 M NaCl or 1.6 M sorbitol. Growth was recorded after 3 d for the control plates and after 4 d for the osmotic stress treatments.

Trehalose Determination

Essentially, yeast cells (25–50 mg fresh weight) were collected by vacuum filtration through 0.22- to 0.45- μ m membranes (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) and washed several times with ice-cold water to remove external Glc. Yeast cells were scraped from the filter membrane before being frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C or immediately transferred to a screw-capped tube containing 1 mL of 0.25 M Na_2CO_3 and boiled in a water bath for 20 min. After cooling, samples were centrifuged in a microfuge and 0.2 mL of supernatant was mixed with 0.1 mL of 1 M acetic acid to neutralize before the addition of 0.1 mL of buffer T (0.3 M sodium acetate plus 0.03 M CaCl_2 , pH 5.5). For trehalose quantification, 0.05 mL of samples or trehalose standards and 0.05 mL of *Hemicola grisea* trehalase (or water to determine Glc not derived from trehalose) were incubated for 45 min at 40°C. One milliliter of Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 100 units each of Glc oxidase and peroxidase (Sigma) plus 0.1 mg of *o*-dianisidine (Sigma) was added. Incubation was for 1 h at 30°C, and the reaction was stopped with 0.5 mL of 56% (v/v) sulfuric acid. The A_{546} was determined before 1 h. *H. grisea* trehalase was purified according to the method of Neves et al. (1994).

RESULTS

Cloning and Sequence Analysis of *S. lepidophylla* *SITPS1*

To isolate a gene involved in trehalose synthesis, a comparison of the deduced amino acid sequences of TPS was made from the reported nucleotide sequences from bacteria and yeast (see "Materials and Methods"). Highly conserved regions were selected to synthesize degenerated oligonucleotides (Fig. 1A), which were used to screen a cDNA library from *S. lepidophylla* (see "Materials and Methods"). The largest clone isolated, pIBT6 (3.2 kb), contains a 110-nucleotide 5' leader sequence, a 96-nucleotide

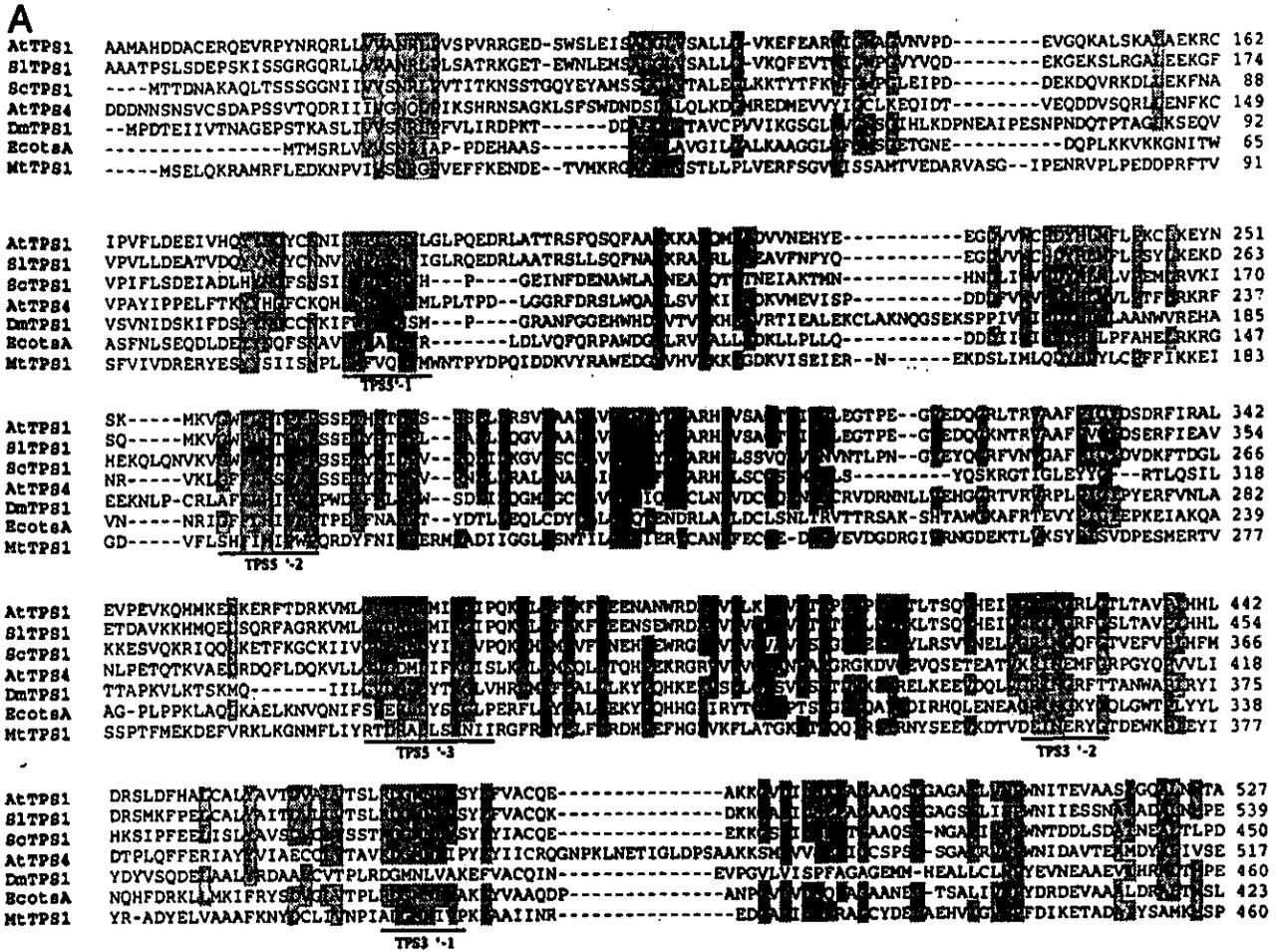


Figure 1. Comparison of *S. lepidophylla* SITPS1 with other TPS protein sequences. **A**, Alignment of an internal region of plant TPS amino acid sequences with bacteria, yeast, and animal sequences. Gaps that were introduced to optimize the alignment are indicated by dashes; identical residues are shaded. **B**, Dendrogram of TPS sequences. Amino acid sequences of TPS from (top to bottom) *M. thermoautotrophicum* (MtTPS1; accession no. AE000931); *E. coli* (EcOtSA; accession no. X69160); *D. melanogaster* (DmTPS1; accession no. AC004373); *A. thaliana* (AtTPS1; accession no. Y08568); *S. lepidophylla* (SITPS1; accession no. U96736); *S. cerevisiae* (ScTPS1; accession no. X68214); and *A. thaliana* (AtTPS4; accession no. Z97344). DmTPS1 and AtTPS4 expressed sequence tags were found in databases from the respective systematic genome-sequencing programs. **C**, Diagram of TPS and TPP protein sequences. A comparison of protein size and structure is shown based on sequence-alignment data presented in **A** and compared with *E. coli* (EcotSB) and *S. cerevisiae* (ScTPS2) sequences. Protein size is shown in amino acid (aa) length. **D**, The 5' leader sequence of the *SITPS1* gene is shown. Three ATG triplets are present (boldface), but only the one close to the 3' end is in frame with the open reading frame sequence; thus, it is considered to be the putative initiation codon. The *Nco*I restriction site is underlined.

3'-untranslated sequence, and an open reading frame coding for a protein of 994 amino acids with a calculated molecular mass of 109 kD; it was designated SITPS1. The alignment of deduced amino acid sequences of TPS from bacteria, yeast, plants, and animals showed several regions of homology (Fig. 1A). Only the most conserved region in all of the compared TPS sequences is shown. These deduced amino acid sequences were plotted in a dendrogram (Fig. 1B). The most distant sequence from SITPS1 was the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Mt-TPS1, which is only 27% identical to *S. lepidophylla* SITPS1. The *E. coli* EcOtsA and the *Drosophila melanogaster* DmTPS1 sequences shared 35% and 40% identity to SITPS1, respectively. Plant and yeast TPS sequences were found closely related to each other. SITPS1 is the most related to the recently reported AtTPS1 sequence from Arabidopsis (Blázquez et al., 1998), and both sequences share an identity of 67%, whereas the *S. cerevisiae* ScTPS1 is 50% identical to both SITPS1 and AtTPS1. It is interesting that another Arabidopsis TPS homolog, AtTPS4, is more closely related to ScTPS1 (41% identity) than to SITPS1 and AtTPS1 (37% identity). AtTPS4 may represent a divergent TPS gene that probably arose by duplication of the ScTPS1 ancestor gene.

An additional feature of plant TPS sequences is the presence of two putative domains (Fig. 1C). Only the N-terminal sequence of SITPS1, which contains 563 amino acids, has similarity to TPS sequences (Fig. 1, A and B), whereas the remaining 431-amino acid sequence of SITPS1, which constitutes its C-terminal region, is also present in AtTPS1 and AtTPS4 but is absent in yeast and *E. coli* TPS sequences (Fig. 1C). This C-terminal region of SITPS1 shows a certain degree of identity to sequences encoding TPP: 29% to the yeast ScTPS2 subunit and 22% to the *E. coli* EcOtsB enzyme.

Expression Pattern and Copy Number of SITPS1

RNA-blot analysis was performed to investigate the expression pattern of the SITPS1 gene. Poly(A⁺) RNA was isolated from *S. lepidophylla* microphylls (lycophyte leaves) that were fully turgid or desiccated for different lengths of time. SITPS1 mRNA is expressed as a single band corresponding to a 3.2-kb transcript present in fully hydrated and dehydrated *S. lepidophylla* microphylls at similar levels (Fig. 2). This constitutive expression of the SITPS1 gene is in agreement with the comparable levels of trehalose in

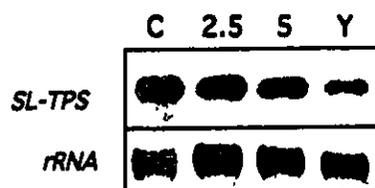


Figure 2. Expression of SITPS1 mRNA in *S. lepidophylla*. Poly(A⁺) RNA (2 μ g) was extracted from fully hydrated (lane C) *S. lepidophylla* microphylls or dehydrated for 2.5 h (lane 2.5), 5 h (lane 5), or 1 year (lane Y). The RNA blot was hybridized with ³²P-labeled SITPS1 cDNA (top row). An rRNA gene fragment was hybridized to the same filter as a loading control (bottom row).

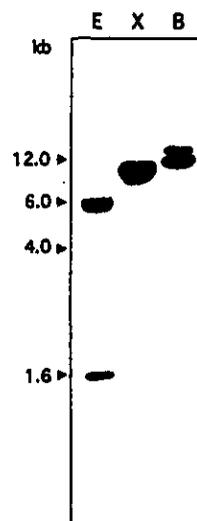


Figure 3. DNA gel-blot analysis of the SITPS1 gene. Genomic DNA (20 μ g) of *S. lepidophylla* was digested with *Eco*RI (lane E), *Xba*I (lane X), or *Bam*HI (lane B). The filter was probed with ³²P-labeled SITPS1 cDNA. The positions of the DNA markers are indicated on the left.

both nonstressed and desiccated *S. lepidophylla* plants (Adams et al., 1990).

The copy number of the SITPS1 gene was determined by DNA gel-blot analysis. *S. lepidophylla* genomic DNA was digested with *Eco*RI, which cuts internally, and *Bam*HI and *Xba*I, which do not cut the cDNA. After probing with the full-length SITPS1 insert, two expected bands were obtained with *Eco*RI (Fig. 3). Digestion with *Xba*I corresponded to a single band, but two bands were obtained using *Bam*HI, suggesting either that there are two SITPS1 genes or that the *Bam*HI site is present in an intron. To test this latter possibility, we used specific oligonucleotides matching the coding 5' and 3' ends of SITPS1 to amplify genomic homologs by PCR. A single fragment was obtained that led to two bands after digestion with *Bam*HI, thus suggesting the possibility of a *Bam*HI site in an intron. Partial nucleotide sequence of these PCR fragments matched exactly the cDNA sequence (data not shown). Therefore, according to these data, SITPS1 seems to be a single-copy gene.

Functional Analysis of SITPS1 in Yeast

To determine whether the SITPS1 gene can complement the physiological defects of mutant yeast cells devoid of trehalose biosynthesis genes, the corresponding 3.2-kb cDNA was subcloned into the yeast pSAL4 vector behind a *CUP1* promoter that is inducible by copper ions (Mascorro-Gallardo et al., 1996). The resulting plasmid pSTS1 was used to transform the yeast *tps1* Δ and *tps1* Δ *tps2* Δ mutants. These mutants are unable to grow with Glc or Fru as the carbon source, apparently because of the role of TPS1 in regulating the flow of Glc in glycolysis (Van Aelst et al., 1993; Thevelein and Hohmann, 1995). After transformation with pSTS1 containing the SITPS1 gene, the *tps1* Δ *tps2* Δ mutant was able to grow in Glc in the presence of copper

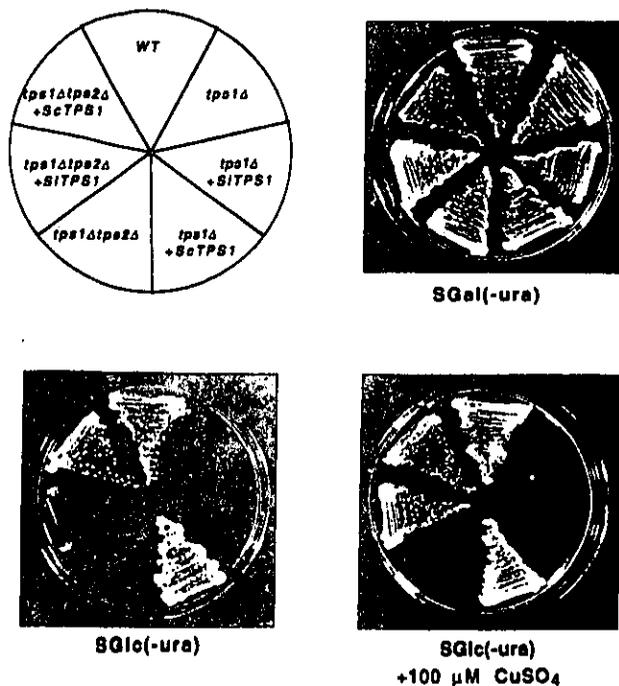


Figure 4. Complementation of the *tps1Δtps2Δ* mutant by *SITPS1* under the control of the *CUP1* promoter. Yeast mutants lacking the TPS1 protein (*tps1Δ*) or both TPS1 and TPS2 (*tps1Δtps2Δ*) were transformed with pSTS1 (pSAL4 containing *SITPS1*), pSTS2 (pSAL4 containing *ScTPS1*), or pSAL4 vector alone and spread on 2% agar plates in minimal medium without uracil (-ura) supplemented with 2% Gal (SGal), 2% Glc (SGlc), or 2% Glc with copper sulfate (SGlc + 100 μM CuSO_4). The wild-type control strain W303-1A (WT) was also transformed with pSAL4.

ions (Fig. 4), whereas no growth was observed for the *tps1Δ* mutant. All strains grew well in Gal, as expected. Transformation of the *tps1Δ* mutant with plasmid pSTS2, which harbors the homologous *ScTPS1* gene, restored growth for both the *tps1Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants (Fig. 4). Trehalose levels were measured in the *tps1Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants transformed with pSTS1 plasmid (containing *SITPS1*) grown in different carbon sources (Table I). Neither the *tps1Δ* nor the *tps1Δtps2Δ* mutant transformed with *SITPS1* accumulated trehalose above the level detected for the same mutants transformed with the pSAL4 vector alone. We decided to express *SITPS1* cDNA under the control of a stronger promoter to observe a possible accumulation of trehalose. Thus, the promoter of the *PMA1* gene that encodes the H^+ -ATPase (Serrano and Villalba, 1995) was subcloned in a multicopy vector to give plasmid pRS6 (see "Materials and Methods"). After *SITPS1* was subcloned under the control of the *PMA1* promoter (plasmid pRTS1), this construction was used to transform the yeast *tps1Δ* mutant. It was observed that the *tps1Δ* mutant transformed with pRTS1 plasmid was able to grow in Glc (Fig. 5).

The trehalose content was determined for *tps1Δ* mutant strains transformed with the pRTS1 (containing *SITPS1*) and pRTS2 (harboring *ScTPS1*) plasmids. Trehalose was detected in the *tps1Δ* mutant complemented with *SITPS1* grown in different carbon sources (Table II). The trehalose

levels were higher when the *tps1Δ* mutant was complemented with the *S. cerevisiae ScTPS1* gene than when *SITPS1* was used. These results indicate that heterologous *S. lepidophylla SITPS1* is not completely fulfilling the function of the yeast *ScTPS1* protein, considering the sequence divergence and the fact that the *SITPS1* polypeptide is larger than *ScTPS1*. Therefore, we constructed a deletion mutant of *SITPS1*, named *SITPS1ΔC*, to remove the sequence encoding its C-terminal domain of 431 amino acids, which lacks similarity to *ScTPS1* or *EcOtsA* (Fig. 1C). Plasmid pRTS4 containing *SITPS1ΔC* was used to transform the *tps1Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants. Growth in Glc was complemented in both mutants by the C-terminal deletion of *SITPS1*. When *SITPS1ΔC* was cloned under control of the *CUP1* promoter (plasmid pSTS4), only partial complementation was observed in the *tps1Δtps2Δ* mutant: Growth in Glc was slow compared with that in the same mutant transformed with the full-length *SITPS1* gene in pSAL4 (data not shown). Trehalose levels in the *tps1Δ* mutant transformed with pRTS4 were 2.5 times lower than the levels with the full-length *SITPS1* gene but significantly higher than in the *tps1Δ* mutant transformed with vector alone (Table II). These results show that the C-terminal region of *SITPS1* is required for full activity.

Given that the C-terminal region of *SITPS1* shares relative similarity to TPPs (Fig. 1C), we tested the ability of full-length *SITPS1* and its C-terminal domain (*SITPS1ΔN*) to complement the defect to grow at 37.5°C associated with the yeast *tps2Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants. pRTS1 (containing *SITPS1*) and pRTS5 (harboring *SITPS1ΔN*) were used to transform these mutants. It is known that the *tps2Δ* mutant

Table I. Trehalose content of the transformed *tps1Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants with pSAL4-derived vectors

Three independent transformants of wild-type yeast, the *tps1Δ* mutant, or the *tps1Δtps2Δ* mutant transformed with pSAL4 vector alone or harboring the *SITPS1*, *SITPS1ΔC*, or *ScTPS1* genes were grown in minimal medium with the indicated carbon source plus 100 μM CuSO_4 . Trehalose content was determined in the stationary phase (7.0 A_{600}). Values are means \pm sd.

Carbon Source	Strain	Trehalose	Trehalose Content
		$\mu\text{mol g}^{-1}$ yeast wet wt	%
Gal	Wild type (pSAL4)	71.70 \pm 25.18	100
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (pSAL4)	5.25 \pm 6.77	7
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	6.32 \pm 6.23	9
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>SITPS1ΔC</i>)	2.13 \pm 0.52	3
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	19.27 \pm 14.93	27
	<i>tps1Δ</i> (pSAL4)	4.80 \pm 4.90	7
Glc	<i>tps1Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	2.83 \pm 1.65	4
	<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	48.43 \pm 21.16	67
	Wild type (pSAL4)	50.90 \pm 9.02	100
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	5.42 \pm 4.58	11
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	18.50 \pm 12.93	36
	<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	36.48 \pm 10.69	72
Fru	Wild type (pSAL4)	81.77 \pm 31.03	100
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	6.95 \pm 5.01	7
	<i>tps1Δtps2Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	21.13 \pm 13.04	26
	<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	54.40 \pm 24.92	66

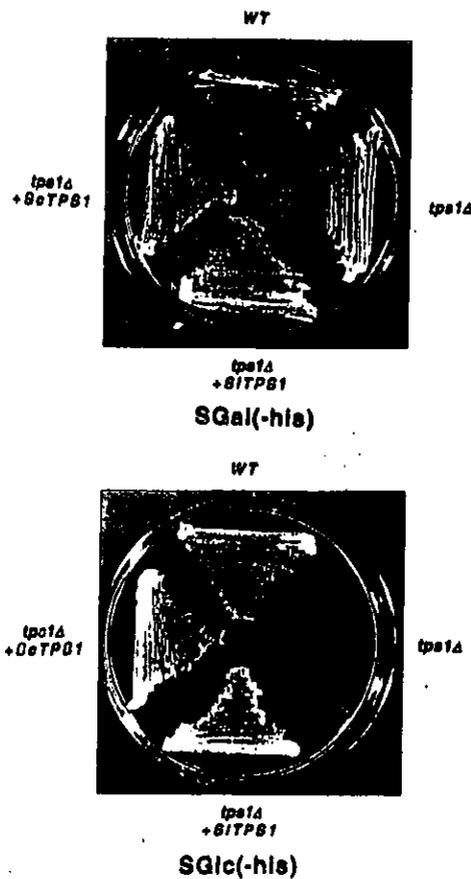


Figure 5. Complementation of the *tps1Δ* mutant by *SITPS1* under the control of the *PMA1* promoter. The yeast mutant lacking TPS1 protein (*tps1Δ*) was transformed with pRTS1 (pRS6 containing *SITPS1*), pRTS2 (pRS6 containing *ScTPS1*), or pRS6 vector alone and spread on 2% agar plates in minimal medium without His (-his) supplemented with 2% Gal (SGal) or 2% Glc (SGlc). The wild-type control strain W303-1A (WT) was also transformed with pRS6.

grows normally in Glc but is unable to grow continuously at 37.5°C (De Virgilio et al., 1993). The *tps1Δtps2Δ* mutant has both growth defects. *SITPS1* was not able to restore the growth of the *tps2Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants at 37.5°C. Transformation with pRTS3, which harbors the homologous *ScTPS2* gene, complemented both mutants (data not shown).

Trehalose is required for the acquisition of thermotolerance in yeast and *E. coli* (Hengge-Aronis et al., 1991; De Virgilio et al., 1994). The yeast *tps1Δ*, *tps2Δ*, and *tps1Δtps2Δ* deletion mutants are deficient in both induced and noninduced thermotolerance. The phenotypes are restored by complementation with the corresponding homologous gene. To determine whether the *SITPS1* gene can also complement these deficient stress responses, the yeast *tps1Δ* mutant was transformed with plasmid pRTS1 (harboring *SITPS1*) or pRTS2 (containing *ScTPS1*). We assayed the ability to survive both a sublethal heat shock of 39°C for 1 h (thermoinduction) and a lethal heat shock of 50°C for 20 min after an acclimation treatment of 39°C for 1 h (induced thermotolerance). The viability of the *tps1Δ* mutant after

Table II. Trehalose content of the transformed *tps1Δ* mutant with pRS6-derived vectors

Three independent transformants of wild-type yeast or the *tps1Δ* mutant transformed with pRS6 vector alone or harboring the *SITPS1*, *SITPS1ΔC*, or *ScTPS1* genes were grown in minimal medium with the indicated carbon source.

Carbon Source	Strain	Trehalose ^a	Trehalose Content
		$\mu\text{mol g}^{-1}$ yeast wet wt	%
Gal	Wild type (pRS6)	16.45 ± 4.59	100
	<i>tps1Δ</i> (pRS6)	1.45 ± 0.07	9
	<i>tps1Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	16.55 ± 0.35	100
	<i>tps1Δ</i> (<i>SITPS1ΔC</i>)	6.59 ± 0.72	40
Glc	<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	26.20 ± 2.97	159
	Wild type (pRS6)	29.45 ± 0.64	100
	<i>tps1Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	18.95 ± 5.87	64
	<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	27.85 ± 7.42	95
Fru	Wild type (pRS6)	29.00 ± 7.07	100
	<i>tps1Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	20.40 ± 3.39	70
	<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	34.05 ± 4.59	117

^a Trehalose content was determined in the stationary phase (7.0 A_{600}). Values are means ± SD.

thermoinduction decreased to 30%, but almost complete viability was recovered after transformation with the *SITPS1* or the *ScTPS1* gene (Table III). After lethal heat shock, *S. lepidophylla SITPS1* restored the induced thermotolerance as effectively as yeast *ScTPS1* in *tps1Δ* mutant cells compared with the level in the wild-type cells (Fig. 6). Both *SITPS1*- and *ScTPS1*-transformed cells displayed a 10-fold higher induced thermotolerance than the *tps1Δ* mutant cells transformed with the pRS6 vector alone after 20 min at 50°C.

Finally, it has been shown that the *tps1Δ* mutant is osmosensitive (Hounsa et al., 1998). To determine whether *SITPS1* could restore the osmotolerance defect of the *tps1Δ* mutant, this strain was transformed with the plasmids pRTS1 and pRTS2 and growth was evaluated under osmotic stress conditions. The *tps1Δ* mutant transformed either with the *SITPS1* or the *ScTPS1* gene was able to grow in medium containing 1.6 M sorbitol or 0.9 M NaCl (Fig. 7). As a positive control, we used the wild-type strain, which also grew normally. In contrast, the *tps1Δ* mutant transformed with the vector alone was unable to grow in high-osmoticum conditions. All of these results suggest that the

Table III. Viability of *tps1Δ* mutant cells transformed with *SITPS1* gene after thermoinduction

Thermoinduction was performed by incubating yeast cells in liquid SGal (-His) medium up to approximately 0.4 A_{600} at 25°C, and then shifted for 1 h at 39°C. Aliquots for colony counting were taken just before and after thermoinduction. Data represent the mean of three independent transformants and their SD.

Strain	Surviving Cells
	%
Wild type (pRS6)	127.00 ± 19.52
<i>tps1Δ</i> (pRS6)	29.67 ± 6.66
<i>tps1Δ</i> (<i>SITPS1</i>)	80.00 ± 21.16
<i>tps1Δ</i> (<i>ScTPS1</i>)	96.00 ± 2.65

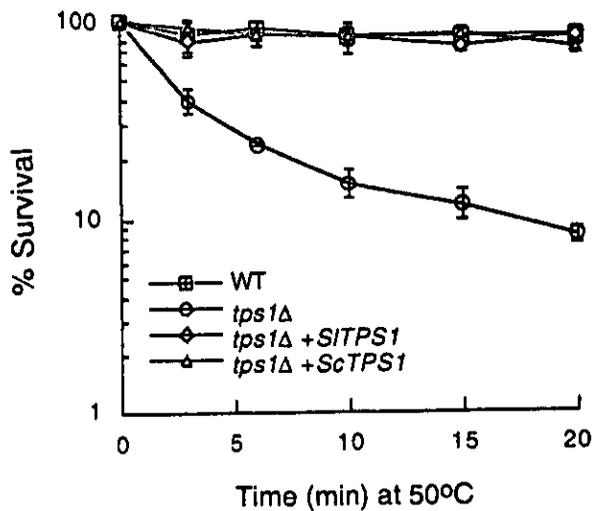


Figure 6. Complementation of thermotolerance deficiency of the *tps1Δ* deletion mutant transformed with the *SITPS1* gene. Transformed strains were grown in liquid culture and assayed for induced thermotolerance (see "Materials and Methods"). Values shown for each construct are the averages of three independent transformants. WT, Wild-type cells transformed with the pRS6 vector alone; *tps1Δ*, mutant transformed with the pRS6 vector alone; *tps1Δ* + *SITPS1*, mutant transformed with plasmid pRTS1; *tps1Δ* + *ScTPS1*, mutant transformed with plasmid pRTS2. Error bars denote \pm SD.

levels of trehalose accumulated in the *tps1Δ* mutant transformed with *SITPS1* are sufficient to restore growth under osmotic and heat stress.

DISCUSSION

Trehalose is one of the most efficient osmoprotectors and thermoprotectors in nature (Colaço et al., 1992; Crowe et al., 1992). Although much experimental work concerning trehalose has been done in bacteria and yeast, little information has been reported from animals or plants. Here we report the molecular and functional characterization of a full-length cDNA encoding a novel TPS (*SITPS1*) from the resurrection plant *S. lepidophylla*. This plant is known to accumulate trehalose at levels comparable to yeast and other fungi and at levels much higher than those found in other plants (Adams et al., 1990; Müller et al., 1995). It is likely that a major factor determining the anhydrobiotic ability of resurrection plants is their capacity to accumulate high levels of osmoprotectors such as trehalose. Until a few years ago, it was thought that only resurrection plants had the capacity to synthesize trehalose (Müller et al., 1995). Recently, the presence of trehalose was reported in tobacco, potato (Goddijn et al., 1997), and rice (Garcia et al., 1997), but at levels about 3000-fold less than in *S. lepidophylla* (Adams et al., 1990). Although the actual level of trehalose in *Arabidopsis* has not yet been reported, presumably it is not significant because *AtTPS1* mRNA is expressed at very low levels (Blázquez et al., 1998). Additionally, it is possible that the low levels of trehalose in most higher plants could be the result of very active trehalase. Nevertheless, when Goddijn et al. (1997) incubated tobacco and potato

plants in the presence of the trehalase inhibitor validamycin A, trehalose did not reach concentrations comparable to those in a resurrection plant.

Another possibility is that substitutions in the amino acid sequence that occurred during evolution in different plant TPS have an important influence on trehalose synthesis among plant species.

In this work, we present evidence that the expression of the *SITPS1* gene in the yeast *tps1Δ* mutant under control of the strong *PMA1* promoter leads to an accumulation of trehalose in the stationary phase equivalent to 64% to 100% of the levels reached by wild-type yeast, depending on the carbon source. Similarly, Blázquez et al. (1998) used the *PGK1* promoter to express *AtTPS1*, which resulted in 25% of the trehalose found in the wild-type yeast grown in Gal. These results might be attributable to either a difference between *PGK1* and *PMA1* promoter strength or an increased capacity of *SITPS1* to synthesize trehalose. Therefore, it remains to be shown if the difference in the treha-

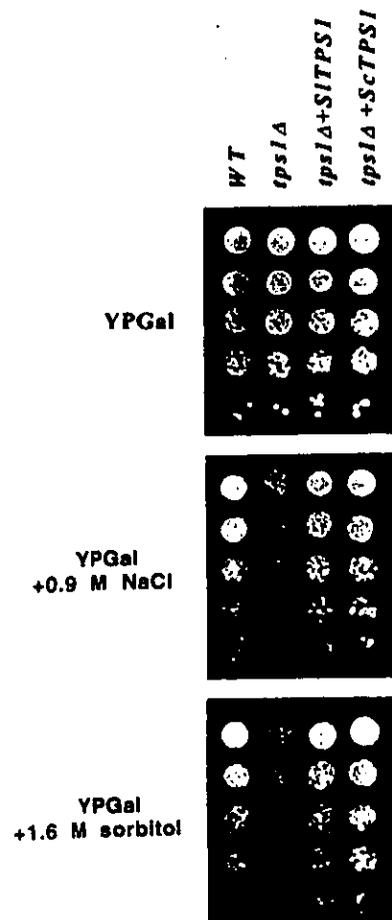


Figure 7. *SITPS1* restores the osmotolerance defect of a yeast *tps1Δ* deletion mutant. Osmotolerance assay of a *tps1Δ* deletion mutant transformed with the *SITPS1* gene. Yeast mutants lacking the protein TPS1 (*tps1Δ*) were transformed with pRTS1 (containing *SITPS1*), pRTS2 (containing *ScTPS1*), or pRS6 vector alone and spotted on 2% agar plates in rich YPGal medium supplemented with 0.9 M NaCl or 1.6 M sorbitol. The wild-type control strain W303-1A (WT) was also transformed with pRS6.

lose content between *S. lepidophylla* and nonresurrection plants is the result of transcriptional control and/or balance between trehalase and TPS enzyme activities.

Transformation of the yeast *tps1Δ* mutant with the *SITPS1* gene under the control of a moderate promoter such as *CUP1* did not restore the ability of the wild-type phenotype to grow in Glc, whereas the growth of the *tps1Δtps2Δ* mutant was complemented. Nevertheless, trehalose levels in both the *tps1Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants transformed with *SITPS1* were negligible, thus suggesting that restoration of growth in Glc of the *tps1Δtps2Δ* mutant by *SITPS1* is independent of the presence of trehalose. This observation is interesting because *SITPS1* expressed in a moderate promoter, such as *CUP1*, allows separate analyses of both TPS functions, i.e. trehalose synthesis capacity and regulation of Glc influx in glycolysis (Van Aelst et al., 1993; Thevelein and Hohmann, 1995).

Moreover, the fact that *tps1Δ* was not complemented by the *SITPS1* gene expressed under the control of the *CUP1* promoter led us to suggest that maybe *SITPS1* was somehow inhibited by *ScTPS2*. One possible explanation for these results is a negative interaction or sequestration of *SITPS1* by *ScTPS2*. In yeast, *ScTPS1*, *ScTPS2*, *ScTPS3*, and *ScTSL1* interact with each other to form the holoenzyme complex (Reinders et al., 1997). Thus, given the sequence similarity between yeast and plant *TPS1*, *ScTPS2* and *SITPS1* may interact with each other, resulting in a structural constraint of *SITPS1* enzyme activity.

The *SITPS1* cDNA encodes a 109-kD protein that shares strong similarity to TPS sequences and has a C-terminal extension with some similarity to TPP. We tested whether *SITPS1* had TPP activity by transforming the yeast *tps2Δ* and *tps1Δtps2Δ* mutants with the full-length *SITPS1* gene or just its C-terminal region under the control of the strong *PMA1* promoter. However, the lack of complementation for growth at 37.5°C suggested that *SITPS1* does not have TPP activity. It has been shown that all TPP enzymes from bacteria to plants have two short and well-conserved regions of homology (Vogel et al., 1998). These sequences are absent in *SITPS1* and *AtTPS1*, providing further evidence for the absence of TPP activity in *SITPS1*.

In yeast, it is well established that trehalose is involved in acquired thermotolerance and tolerance to continuous growth at sublethal temperatures (De Virgilio et al., 1994; Elliot et al., 1996). It has been shown that the *tps1Δ* mutant is deficient in induced thermotolerance, and this phenotype can be restored after complementation with the homologous *ScTPS1* gene (De Virgilio et al., 1994). Here we show that *SITPS1* is able to restore the yeast capacity for both thermoinduction and induced thermotolerance. Another aspect of *SITPS1* that we addressed was its capacity to confer osmotolerance. A recent work (Hounsa et al., 1998) analyzed the osmosensitive phenotype *tps1Δ* mutant under moderate and severe osmotic stress, revealing the strong correlation between the presence of trehalose in yeast and survival under osmotic stress conditions. In the present study, we showed that both *SITPS1* and *ScTPS1* are able to complement and restore growth of yeast cells under osmotic stress. These data suggest that trehalose may play a similar role in *S. lepidophylla* as a stress protectant.

A few TPS homologs have been cloned from bacteria, fungi, and higher eukaryotes (Fig. 1). It is possible that *TPS1* is present in most organisms, although not necessarily involved in the synthesis of significant amounts of trehalose. That plant or animal TPS might have a role similar to that of yeast *ScTPS1* as a controller of the influx of sugar into glycolysis is an intriguing possibility. The fact that both *SITPS1* and *AtTPS1* are able to complement the growth defect on fermentable sugars of the yeast *tps1Δ* mutant suggests this possibility and opens a new perspective on the regulation of glycolysis in plants and animals that should be explored.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Paul Gaytán and Eugenio López for oligonucleotide synthesis and Mario Trejo, Elena Arriaga, Guadalupe Ochoa, Martine De Jonge, and Willy Verheyden for technical assistance. We acknowledge Dr. G.J. Ruijter (Wageningen Agricultural University, The Netherlands) for providing purified *A. niger* hexokinase. J.O.M.-G. thanks Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, and B.B. thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil, for Ph.D. fellowships.

Received August 21, 1998; accepted December 21, 1998.

LITERATURE CITED

- Adams RP, Kendall E, Kartha KK (1990) Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochem Syst Ecol* 18: 107-110
- Blázquez MA, Santos E, Flores C-L, Martínez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C (1998) Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J* 13: 685-689
- Burke MJ (1985) The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In AC Leopold, ed, *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp 358-363
- Cabib E, Leloir LF (1958) The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem* 231: 259-275
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P (1992) Multifunctional yeast high-copy number shuttle vectors. *Gene* 110: 119-122
- Clegg JS (1965) The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted embryos of *Artemia salina*. *Comp Biochem Physiol* 14: 135-143
- Clegg JS (1985) The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water contents: "the water replacement hypothesis." In AC Leopold, ed, *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp 169-187
- Colaço C, Sen S, Thangavelu M, Pinder S, Roser B (1992) Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology* 10: 1007-1011
- Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistrom C (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 242: 1-10
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223: 701-703
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54: 579-599
- De Virgilio C, Bürckert N, Bell W, Jenö P, Boller T, Weimken A (1993) Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa sub-

- unit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur J Biochem* 212: 315-323
- De Virgilio C, Hottiger T, Domínguez J, Boller T, Wiemken A (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem* 219: 179-186
- Elble R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* 13: 18-20
- Elliot B, Haltiwanger RS, Futcher B (1996) Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 923-933
- Gaff DF (1971) Desiccation-tolerant flowering plants in southern Africa. *Science* 174: 1033-1034
- García AB, de Almeida Engler J, Iyer S, Gerats T, Van Montagu M, Caplan AB (1997) Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol* 115: 159-169
- Giaever HM, Styrvoid OB, Kaasen I, Strom AR (1988) Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170: 2841-2849
- Goddijn OJM, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RWHH, de Graaf PTHM, Poels J, van Dun K, Ponstein AS, Damm B, Pen J (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113: 181-190
- Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmel M, Boos W (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173: 7918-7924
- Hohmann S, Bell W, Neves MJ, Valckx D, Thevelein JM (1996) Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Mol Microbiol* 20: 981-991
- Hohmann S, Neves MJ, de Koning W, Alijo R, Ramos J, Thevelein JM (1993) The growth and signalling defects of the *ggs1* (*fdp1/byp1*) deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. *Curr Genet* 23: 281-289
- Hounsa C-G, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S, Prior BA (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144: 671-680
- Kaasen I, McDougall J, Strom AR (1994) Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the *OtsA* and *OtsB* proteins to the test trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* 145: 9-15
- Londesborough J, Vuorio OE (1993) Purification of trehalose synthase from baker's yeast: its temperature-dependent activation by fructose 6-phosphate and inhibition by phosphate. *Eur J Biochem* 216: 841-848
- Luyten K, de Koning W, Tesseur I, Ruiz MC, Ramos J, Cobbaert P, Thevelein JM, Hohmann S (1993) Disruption of the *Kluyveromyces* GGS1 gene causes inability to grow on glucose and fructose and is suppressed by mutations that reduce sugar uptake. *Eur J Biochem* 217: 701-713
- Mackenzie KF, Singh KK, Brown AD (1988) Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 134: 1661-1666
- Mascorro-Gallardo JO, Covarrubias AA, Gaxiola R (1996) Construction of a *CLP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172: 169-170
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1995) Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci* 112: 1-9
- Neves MJ, Hohmann S, Bell W, Dumortier F, Luyten K, Ramos J, Cobbaert P, de Koning W, Kaneva Z, Thevelein JM (1995) Control of glucose influx into glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Curr Genet* 27: 110-122
- Neves MJ, Terenzi HF, Leone FA, Jorge JA (1994) Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World J Microbiol Biotechnol* 10: 17-19
- Reinders A, Bürckert N, Hohmann S, Thevelein JM, Boller T, Wiemken A, De Virgilio C (1997) Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. *Mol Microbiol* 24: 687-695
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Serrano R, Villalba JM (1995) Expression and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*. *Methods Cell Biol* 50: 481-496
- Thevelein JM (1984) Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev* 48: 42-59
- Thevelein JM, Hohmann S (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci* 20: 3-10
- Thomas BJ, Rothstein RJ (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56: 619-630
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Van Aelst L, Hohmann S, Bulaya B, de Koning W, Sierkstra L, Neves MJ, Luyten K, Alijo R, Ramos J, Coccetti P, and others (1993) Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 8: 927-943
- Vandercammen A, François J, Hers H-G (1989) Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 182: 613-620
- Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A (1998) Trehalose-6-phosphate phosphatase from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *lps2* mutant. *Plant J* 13: 673-683
- Weisburd S (1988) Death-defying dehydration. *Sci News* 133: 107-110
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222

2. Análisis de dominios de *SITPS1* mediante deleciones y complementación de las mutantes *tps1Δ* y *tps1Δ/tps2Δ* de levadura.

La comparación de las proteínas SITps1 de levadura, con SITps1 de *Selaginella* indica un porcentaje de similitud del 61%, y un 50% de identidad; sin embargo, hay una región central de unos 500 aminoácidos (aa) en la que se acentúa la identidad.

A partir de esta comparación, nos planteamos la pregunta de que partes de *SITPS1* podrían ser deletadas sin que SITps1 pierda la función Tps1 y la habilidad de complementar la capacidad para crecer en glucosa de la mutante *tps1Δ* de levadura, así como la capacidad catalítica de biosíntesis de trehalosa. La comparación entre proteínas se presenta en la Figura 4, donde se señala la existencia de una región amino terminal de unos 100 aa así como una región carboxilo terminal de unos 400 aa. que no guardan homología con ScTps1.

Se produjeron una serie de deleciones mediante amplificación por PCR de alta fidelidad, añadiendo sitios de restricción en los extremos para facilitar la ligación posterior en el vector. La clonación se efectuó en los vectores de expresión pSAL4 y pRS6, que contienen los promotores *CUP1* y *PMA1*, respectivamente (ver en Materiales y Métodos).

En la Figura 5 se resumen los resultados de la complementación de las mutantes *tps1Δ* y *tps1Δ/tps2Δ* con las diferentes construcciones, incluyendo el gen completo, clonadas en el vector pSAL4 que provee de una expresión moderada, inducida por cobre y relativamente independiente de la fuente de carbono y del desarrollo.

Las fotos con las mutantes *tps1Δ* y *tps1Δ/tps2Δ* complementadas en la habilidad para crecer en glucosa se presentan en las Figuras 6 y 7. Puede verse, que la clona completa de *SITPS1* sólo es capaz de complementar a la doble mutante, y no a la mutante sencilla *tps1Δ*.

La deleción del dominio carboxilo con cierta homología con ScTps2 (deleción *SITPS1ΔC*), reduce la función del gen a casi una actividad nula, como puede verse en la complementación en presencia de cobre de la doble mutante *tps1Δ/tps2Δ* (Zentella *et al.*, 1999).

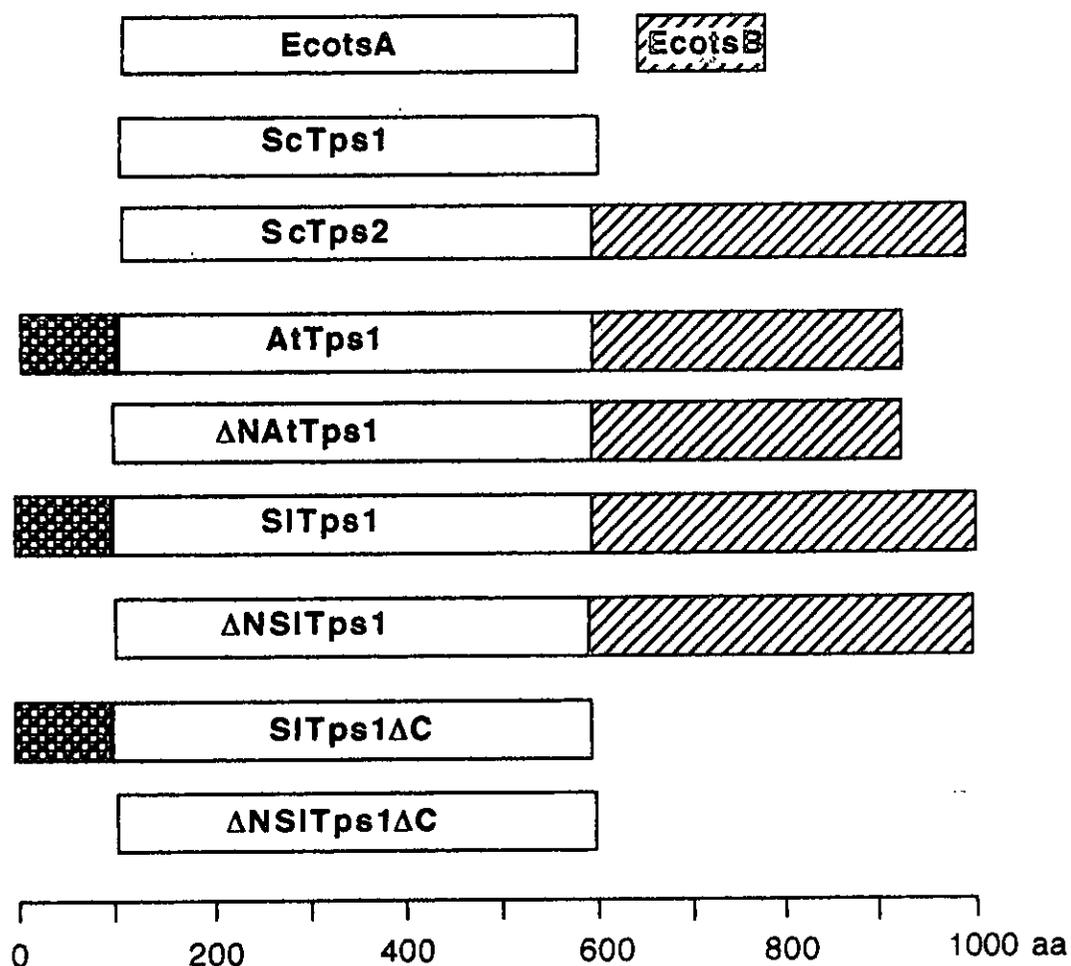


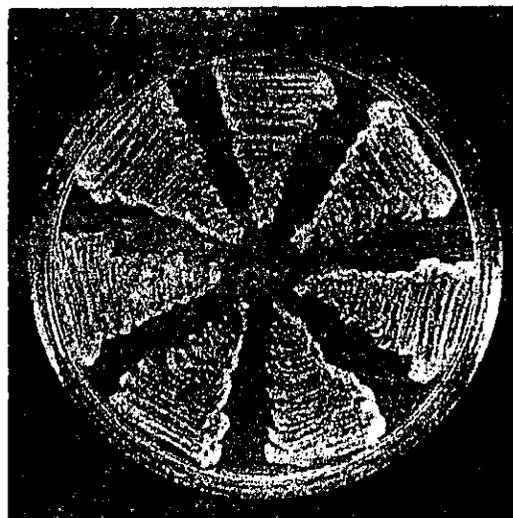
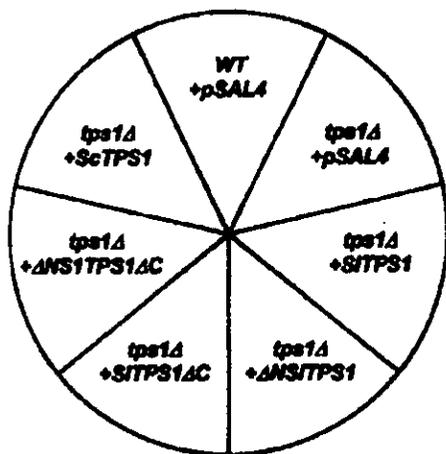
Figura 4. Comparación gráfica de homólogos de las enzimas Tps (sintetasa de trehalosa), y de Tpp (fosfatasa de trehalosa), donde se resaltan las similitudes de las proteínas; EcotsA (*E. coli*), ScTps1 (*S. cerevisiae*), AtTps1 (*A. thaliana*) y SITps1 (*S. lepidophylla*) son sintetetasas de trehalosa, mientras que EcotsB (*E. coli*) y ScTps2 (*S. cerevisiae*) son fosfatasas de trehalosa. El porcentaje de identidad (similitud) de SITps1, con AtTps1 es de 69(75), con ScTps1 es de 50(61), con OtsA de 34(45), con ScTps2 de 32(44) y con OtsB de 48(60). Se ilustran también las versiones truncadas de SITps1 que se produjeron para definir el tamaño mínimo con función de sintetasa de trehalosa.

CLONA	SITps1 COMPLETA O DELETADA	COMPLEMENTACION	
		<i>tps1Δ</i>	<i>tps1Δ/tps2Δ</i>
<i>SITPS1</i>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 100 500 aa 394 aa </div>	-	+
Δ <i>NSITPS1</i>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 500 aa 394 aa </div>	++	++
<i>SITPS1ΔC</i>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 100 500 aa </div>	-	±
Δ <i>NSITPS1ΔC</i>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 500 aa </div>	++	++

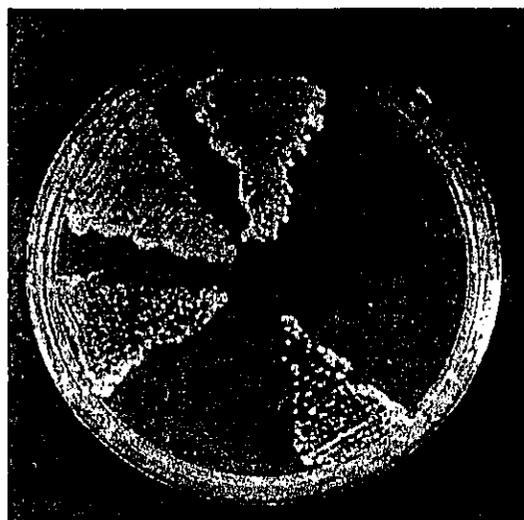
COMPLEMENTACION: -) no crece aún añadiendo cobre, ±) crece poco, aún añadiendo cobre, +) crece bajo adición de cobre (100 μM), ++) crece igual de bien con o sin cobre. La complementación se llevó a cabo en medio mínimo con glucosa. El crecimiento se evaluó después de 3 días de incubación a 30 °C.

La clona *SITPS1* entera codifica 994 aa, a las clonas Δ *NSITPS1* y Δ *NSITPS1Δ* se les añadió un ATG para inicio de traducción, y a las clonas *SITPS1ΔC* y Δ *NSITPS1ΔC* se les añadió un codón de terminación TGA.

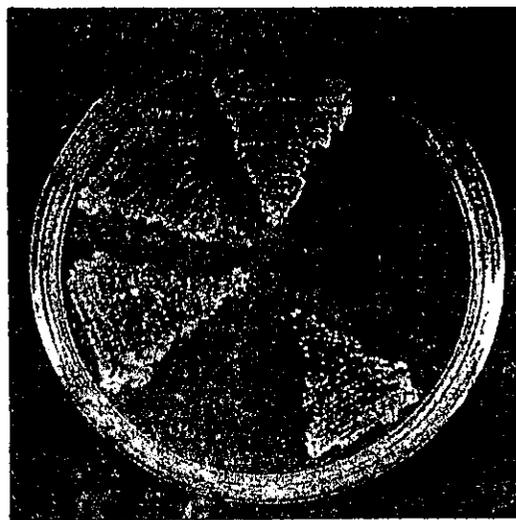
Figura 5. Análisis de deleciones de la proteína SITps1 y su clona *SITPS1* bajo la expresión del promotor *CUP1* y su efecto sobre la complementación para crecer en glucosa de mutantes *tps* de levadura



SGal(-ura)



SGlc(-ura)



SGlc(-ura)
+100 μ M CuSO₄

Figura 6. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tps1*Δ de levadura, con versiones deletadas de *SITPS1* clonadas en pSAL4.

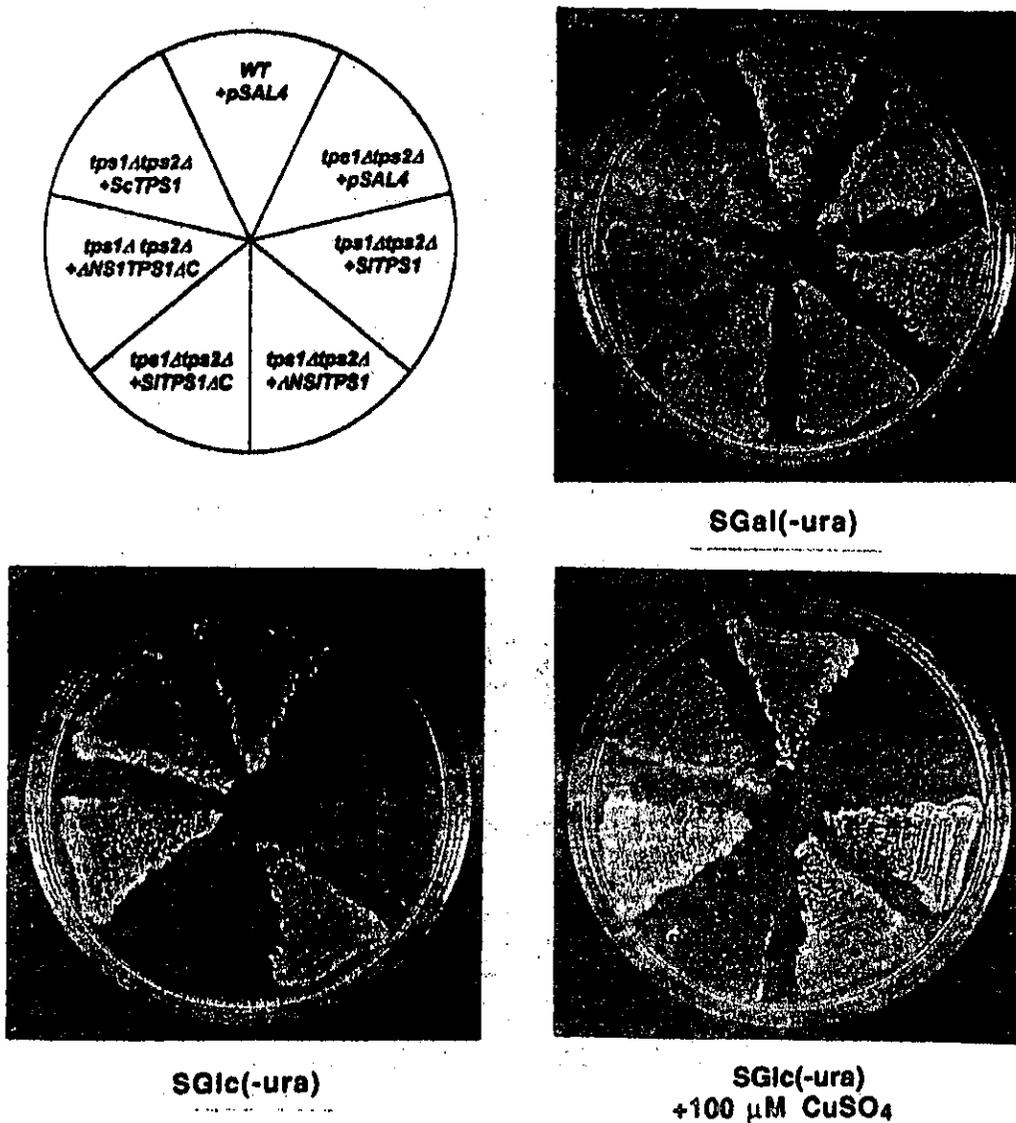


Figura 7. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tps1Δ/tps2Δ* de levadura, con versiones deletadas de *SITP1* clonadas en pSAL4.

2.1 La delección del NH₂ terminal de *SITPS1*, permite la complementación de la mutante *tps1Δ*.

La delección de 100 aminoácidos en el extremo amino incrementó significativamente la actividad de la proteína ya que bajo estas condiciones fue capaz de complementar a la mutante *tps1Δ* aún sin la adición de cobre. Incluso la delección *ΔNSITPS1ΔC* en la cual se ha deletado la mitad de la proteína (se quitaron 100 aa en el extremo amino y 394 aa en el carboxilo), sigue siendo capaz de complementar a la mutante *tps1Δ* aún sin la adición de cobre.

Según las estimaciones del contenido de trehalosa, en la cepa *tps1Δ* (pSAL4::*ΔNSITPS1*) pasa de ser indetectable, a niveles equivalentes a los de la cepa silvestre. La actividad enzimática también alcanza niveles similares a la cepa silvestre cuando *tps1Δ* se complementa con pSAL4::*ΔNSITPS1* y al medio se le adiciona cobre para aumentar el transcrito (Van Dijck *et al.*, 2000; en preparación).

Es interesante comparar estos resultados con los obtenidos cuando las mismas construcciones se sobre-expresan en un vector con el promotor fuerte *PMA1*. En este caso, todas las versiones de *SITPS1* probadas, fueron capaces de complementar no sólo a la mutante *tps1Δtps2Δ*, sino también a la *tps1Δ* (Figuras 8, 9 y 10).

2.2 ¿Posee *SITPS1* actividad fosfatasa de trehalosa Tpp?

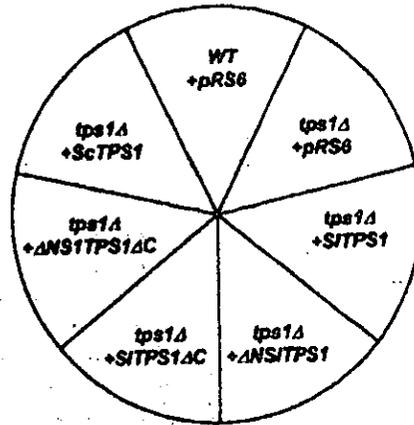
Dada la relativamente alta homología del extremo carboxilo de *SITps1* con *Tps2* y con *EcotsB* (44 y 60% de similitud respectivamente), que codifican para la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Tpp) en levadura y en *E. coli* respectivamente, se consideró importante demostrar si *SITPS1* codificaba una enzima bifuncional con actividad sintetasa y fosfatasa como se había propuesto hace algún tiempo. (Zentella and Iturriaga, 1996). La mutante *tps2Δ* es capaz de crecer en glucosa, sin embargo posee un fenotipo que permite probar su complementación de manera directa. La mutante es termosensible ya que es incapaz de crecer de manera continua a cerca de 37° C. Además, este fenotipo es más claro en la

CLONA	SITps1 COMPLETA O DELETADA	COMPLEMENTACION					
		<i>tps1Δ</i>	<i>tps1Δ/tps2Δ</i>	<i>tps2Δ</i>			
SITPS1	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding: 2px;">100</td> <td style="padding: 2px;">500 aa</td> <td style="padding: 2px;">394 aa</td> </tr> </table>	100	500 aa	394 aa	+	+	-
100	500 aa	394 aa					
ΔNSITPS1	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding: 2px;">500 aa</td> <td style="padding: 2px;">394 aa</td> </tr> </table>	500 aa	394 aa	+	+	-	
500 aa	394 aa						
SITPS1ΔC	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding: 2px;">100</td> <td style="padding: 2px;">500 aa</td> </tr> </table>	100	500 aa	+	+	-	
100	500 aa						
ΔNSITPS1ΔC	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding: 2px;">500 aa</td> </tr> </table>	500 aa	+	+	-		
500 aa							
ΔNΔTPS1	<table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td style="padding: 2px;">394 aa</td> </tr> </table>	394 aa	-	-	-		
394 aa							

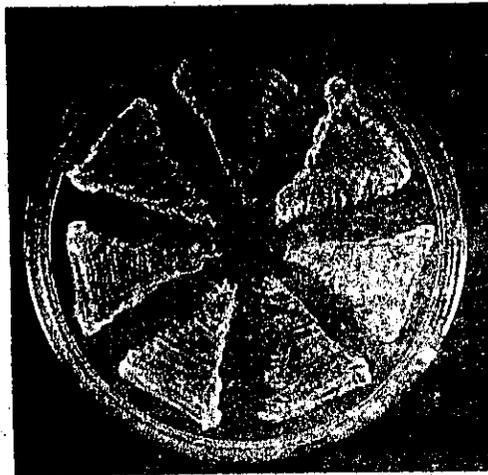
COMPLEMENTACION: --) no complementa, +) si complementa

- 1) La complementación de *tps1Δ* y *tps1Δ/tps2Δ* se probó en medio mínimo con glucosa. El crecimiento se evaluó después de 3 días a 30 °C.
- 2) La cepa *tps2Δ* complementada con las diferentes deleciones se probó en medio YPG, bajo crecimiento continuo a 37.5 °C.
- 3) La clona *SITPS1* codifica 994 aa más 2 aa que se añadieron en 5'; a las clones *ΔNSITPS1*, *ΔNSITPS1ΔC* y *ΔNΔTPS1* se les añadió un codón ATG al inicio, mientras que a las clones *SITPS1ΔC* y *ΔNSITPS1ΔC* se les añadió un codón TAG de terminación.

Figura 8. Análisis de deleciones de la proteína SITps1 y su clona SITPS1 bajo la expresión del promotor PMA1 y su efecto sobre la complementación para crecer en glucosa de mutantes *tps* de levadura



SGal(-his)



SGlc(-his)

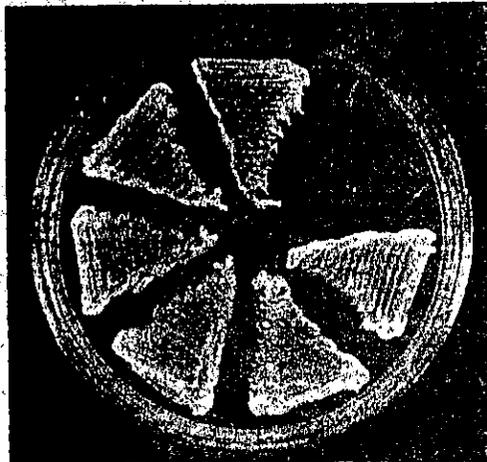
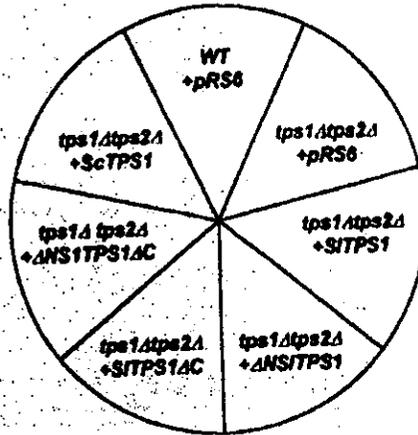
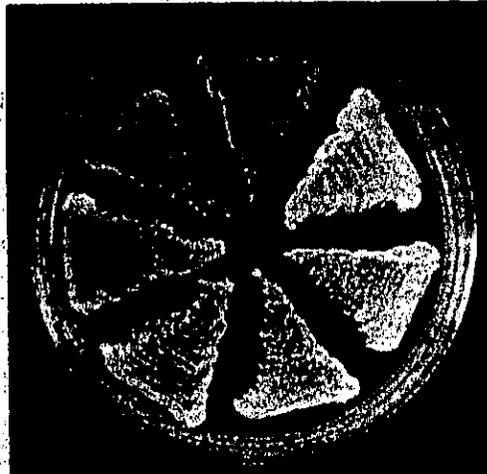


Figura 9. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tps1Δ* de levadura, con versiones deletadas de *SITP1* clonadas en pRS6.



SGal(-his)



SGlc(-his)

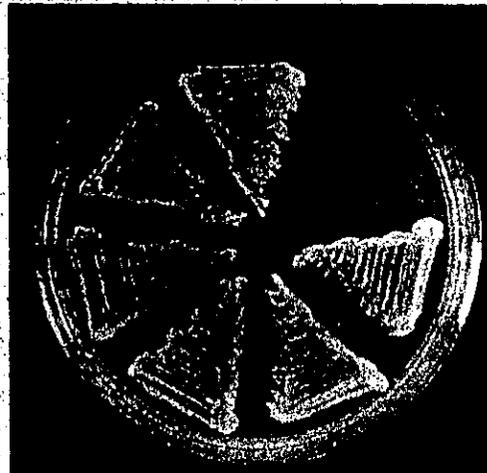


Figura 10. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tps1Δ/tps2Δ* de levadura, con versiones deletadas de *SITPS1* clonadas en pRS6.

mutante *tps2Δ* que en la doble mutante *tps1Δ/tps2Δ* presumiblemente porque bajo estas condiciones la acumulación de trehalosa-6-fosfato es más dañina que la ausencia de trehalosa (Elliot *et al.*, 1996; Voguel *et al.*, 1998). Se probó si *SITPS1* podía complementar a *tps2Δ* bajo esas condiciones selectivas y esto fue negativo para *SITPS1* y para *ΔNSITPS1*. Más aún, se clonó en pRS6 al fragmento 3' codificante del putativo dominio Tpp con actividad fosfatasa, pero tampoco éste pudo complementar a la mutante. Se comprobó por lo tanto que pesar de que *SITps1* posee un carboxilo con cierta homología con las fosfatasas de trehalosa Tpp, la proteína no es bifuncional o bipartita. Como se mencionará en la discusión, recientemente se han identificado algunas proteínas Tps de *Arabidopsis* que parece que sí poseen ambas funciones (Goddijn and van Dun, 1999)

2.3 Función del extremo carboxilo de SITps1.

Como se reportó anteriormente (Zentella *et al.*, 1999), la delección del extremo carboxilo de SITps1, afecta negativamente su actividad y la capacidad de sintetizar trehalosa. Tanto *SITPS1* como *SITPS1ΔC* clonados en pSAL4 se utilizaron para transformar a la doble mutante *tps1Δhvk2Δ*, que es capaz de crecer en glucosa (esta es la doble mutante de hexocinasa 2, que suprime parcialmente el fenotipo de la mutante *tps1Δ*, según Hohmann *et al.*, 1993). El resultado es mostrado en la Figura 11, donde puede verse que la cepa *tps1Δhvk2Δ* complementada con *SITPS1* no es capaz de crecer en glucosa (ni en galactosa), a diferencia de la mutante transformada con el vector pSAL4. Sin embargo, al transformar con la *SITPS1ΔC*, se ve que ahora la doble mutante es capaz de crecer un poco, sobre todo cuando el gen no está siendo transcrito (sin cobre), y claramente se observa una cierta inhibición del crecimiento al añadir cobre.

Como se discutirá posteriormente, este resultado es parcialmente explicable si se considera que la mutante *tps1Δ* de levadura muestra una excesiva entrada de azúcares fosforilados en glicólisis, y un déficit en fosfato inorgánico, lo cual es contrarrestado al reducir la fosforilación (mutando el gen de la hexocinasa *HVK2*). Sin embargo, esta mutante complementada con *SITPS1ΔC* no fue capaz tampoco de crecer en galactosa ni como se esperaría en un medio parcialmente no fermentativo.

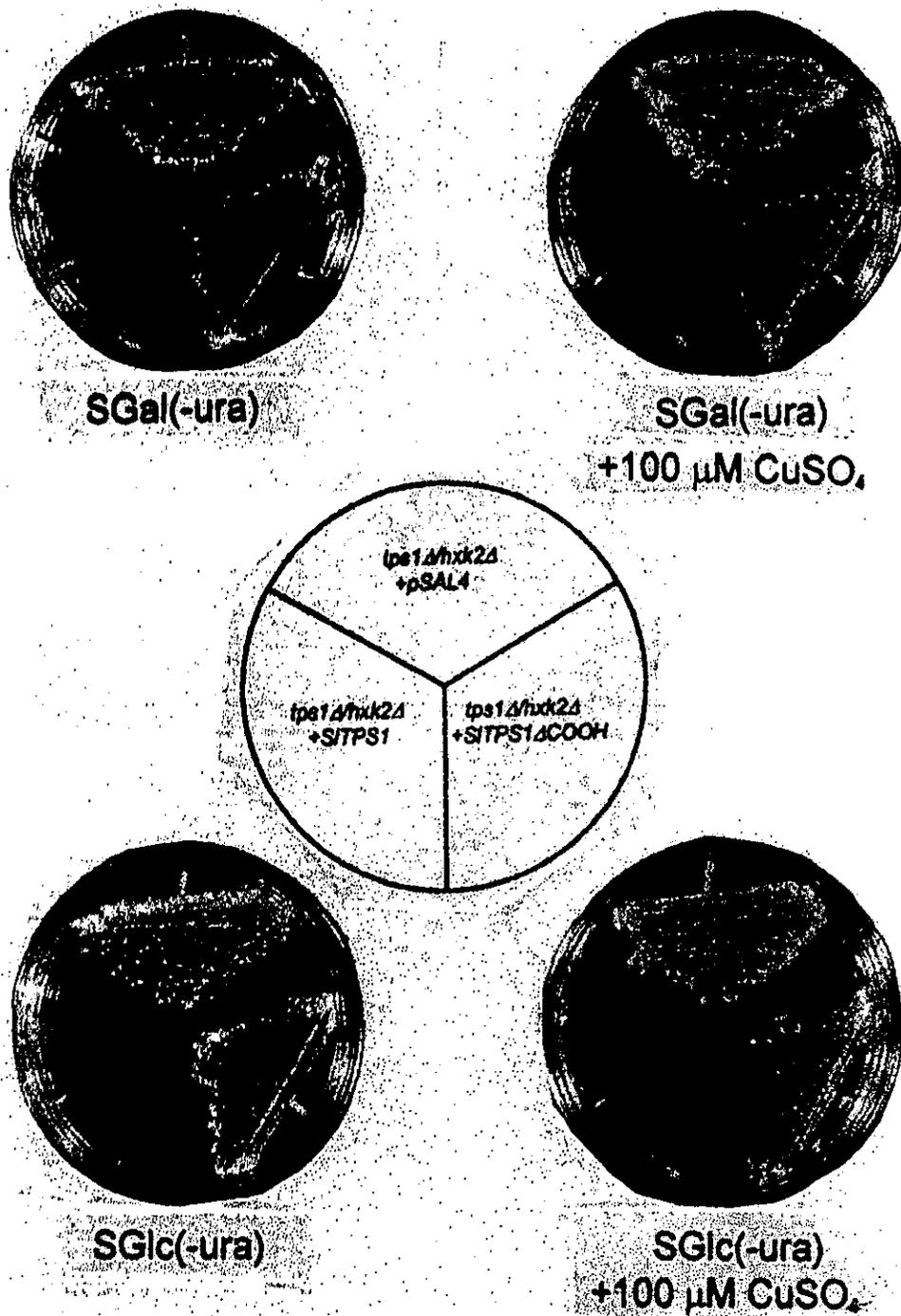


Figura 11. Expresión de *SITPS1* y *SITPS1ΔCOOH* en la doble mutante *tps1Δ/hxk2Δ* bajo el control de *CUP1*.

2.4 ¿Es el extremo amino un dominio de tránsito?

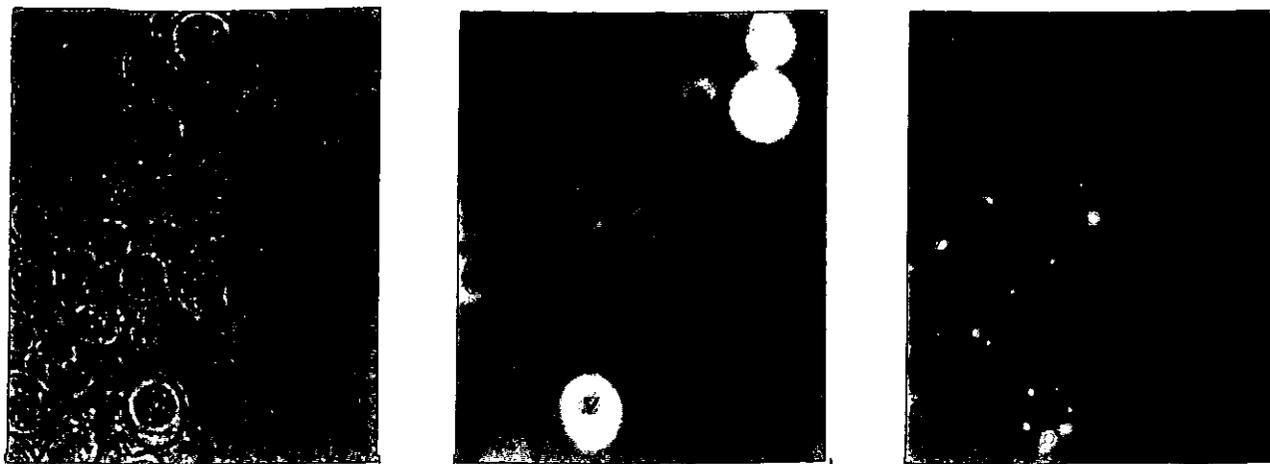
El resultado obtenido con ambas clonas de plantas en las cuales la eliminación del extremo amino produce una des-represión de la actividad, nos ha llevado a formular la pregunta de cual es el significado funcional de el fragmento amino terminal de 100 aa de *SITps1* y *AtTps1*. Podría también ocurrir que hubiera en levadura resultados artefactuales, ya que se está expresando un gen de planta en un ambiente heterólogo. El análisis de los primeros 100 aminoácidos con el programa PSORT, (nakai@imcb.osaka-u.ac.jp) indicó alguna posibilidad de localización en cloroplasto, más específicamente en el estroma. Con una menor probabilidad, se predice la localización de *SITps1* en citoplasma. En levadura se sabe que el complejo *Tps* se encuentra en citoplasma.

Se ha reportado que la subunidad pequeña de la Rubisco, que se dirige al cloroplasto en células vegetales, al expresarse en el sistema heterólogo de levadura se ubicó en las mitocondrias (Hurt *et al.*, 1986).

Por lo antes expuesto, se decidió comprobar experimentalmente si este pequeño dominio pudiese estar enviando a la proteína *Tps1* de plantas a algún compartimento intracelular de la levadura. Para esto se hizo una fusión traduccional de los 100 aa del extremo amino de *SITps1*, con el gen reportero *GFP*, que codifica a la proteína verde fluorescente. En este caso, el control negativo fue la proteína verde fluorescente expresada en el mismo vector utilizado (el pRS6, con el promotor *PMA1*). Los 100 aa de *SITps1* se fusionaron en fase traduccional con *Gfp*, lo cual fue corroborado al observar la fluorescencia de ambas construcciones en levadura (Figura 12). Sin embargo, no se detectó que la proteína *Gfp* se estuviese dirigiendo a algún compartimento intracelular, a juzgar por la distribución uniforme de la fluorescencia en el citoplasma: la cepa silvestre transformada con pRS6::*NSI-GFP* básicamente mostró el mismo patrón de distribución que el control pRS6::*GFP* al crecer en glucosa (Figura 12).

3. Caracterización del gen *AtTPS1*.

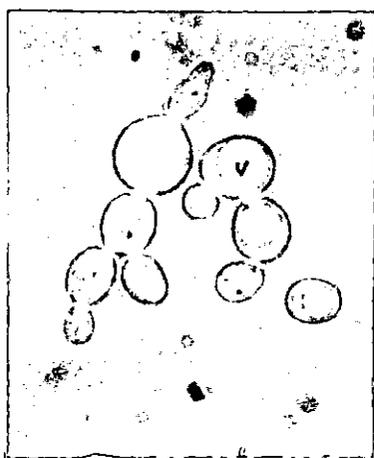
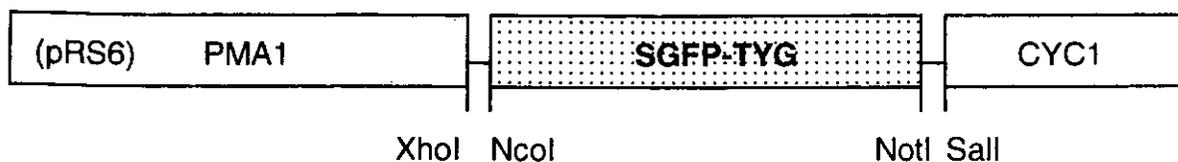
Blázquez *et al* (1998), reportaron el aislamiento del cDNA de *AtTPS1*, homólogo a *SITPS1*. Según reportan, aislaron esta clona en un rastreo con una genoteca de expresión en el que se buscó complementar el crecimiento en glucosa de la mutante *tps1Δ*.



a

b

c



d



e



f

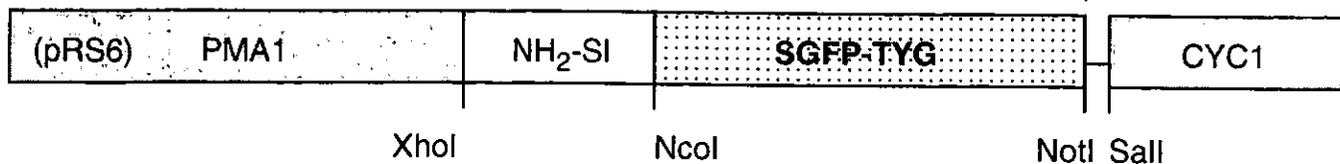


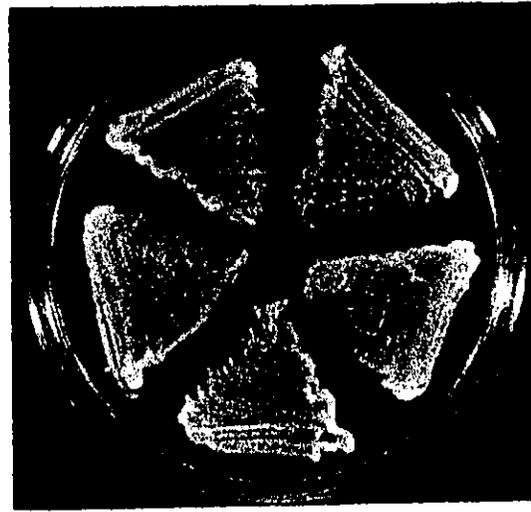
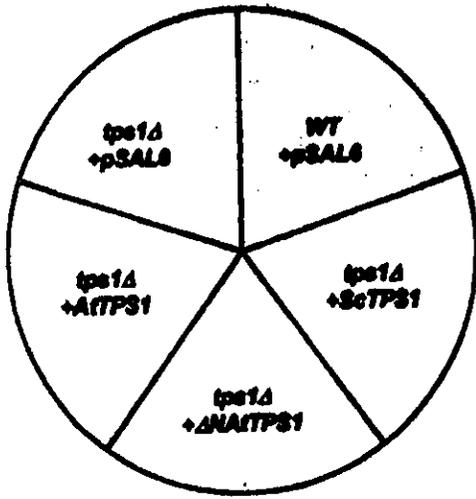
Figura 12. Expresión de la fusión traduccional *NH2SI::SGFP-TYG* en la levadura W303-1A. a) y d), luz visible; b) y e), proteína verde fluorescente (Gfp); c) y f), control DAPI. (v=vacuola; m=mitocondrias). Se presenta una ampliación 100X de levaduras en medio SD(-his).

Utilizando la secuencia reportada en el GenBank (Acceso Y08568), se decidió aislar a este cDNA mediante la técnica de RT-PCR. Se diseñaron 3 iniciadores (ver en Materiales y Métodos), con los cuales se aisló la clona completa y la clona sin el extremo amino. Esto último, porque al igual que *SITPS1*, la clona *AtTPS1* de *Arabidopsis* posee básicamente la misma estructura que *SITPS1* (el porcentaje de identidad entre las dos proteínas de plantas es de 69%, y de un 50% de ambas clonas contra la *ScTPS1* de levadura), así que una de las motivaciones principales para tener este cDNA fue la de contrastar lo obtenido con *SITPS1* con *AtTPS1*, sobre todo antes de que se hiciera pública la caracterización de este cDNA (Blázquez *et al.*, 1998).

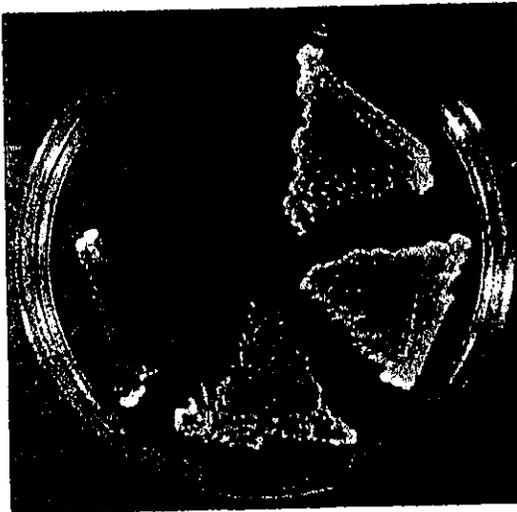
La clona *AtTPS1* se aisló mediante RT-PCR, utilizando RNA poly (A)⁺ de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en un medio líquido con 100 mM de NaCl. $\Delta NAtTPS1$ se pudo aislar mediante la misma técnica de RT-PCR, pero también mediante PCR, utilizando como templado al mismo banco de cDNA de Minet *et al* (1992). En todas las amplificaciones que se hicieron se añadieron sitios de restricción en los extremos para facilitar la posterior ligación de los cDNAs en los vectores de levadura.

Tanto la clona completa *AtTPS1* como la $\Delta NAtTPS1$ fueron clonadas en el vector pSAL6 con el promotor *CUP1* y en vector pRS6, con el promotor *PMA1*. Con estas construcciones se llevaron a cabo los ensayos de complementación de la mutante *tps1* Δ y de la doble mutante *tps1* Δ *tps2* Δ .

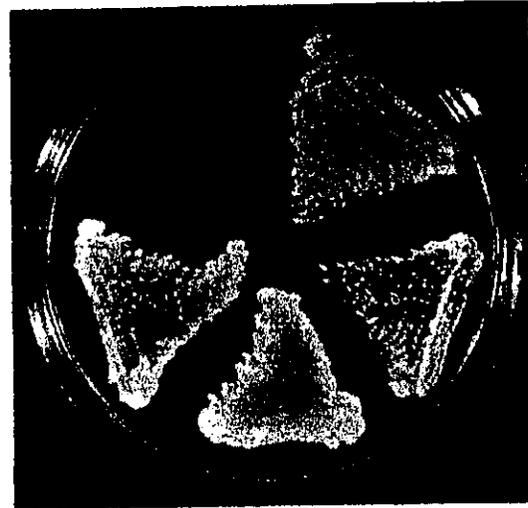
Con la clona completa pSAL6::*AtTPS1* se pudo complementar a la mutante *tps1* Δ bajo adición de cobre y a la doble mutante *tps1* Δ *tps2* Δ aún sin la adición de cobre (Figuras 13 y 14). Por otra parte, al eliminar el extremo amino, la clona pSAL6:: $\Delta NAtTPS1$ fue capaz de complementar a la mutante *tps1* Δ , aún si la adición de cobre (Figuras 13 y 14). Estos datos demostraron que: a) la clona *AtTPS1* a diferencia de la clona *SITPS1* es capaz de complementar a la mutante *tps1* Δ cuando el transcrito se expresa a un nivel moderado, bajo la expresión del promotor *CUP1*; y b) que la delección del extremo amino al igual que con *SITps1* de *Selaginella* parece incrementar la actividad de la proteína, ya que $\Delta NAtTPS1$, al igual que $\Delta NSITPS1$ es capaz de complementar a la mutante *tps1* Δ aún sin la adición de cobre para incrementar la transcripción (ver anexo sobre vectores



SGal(-his)

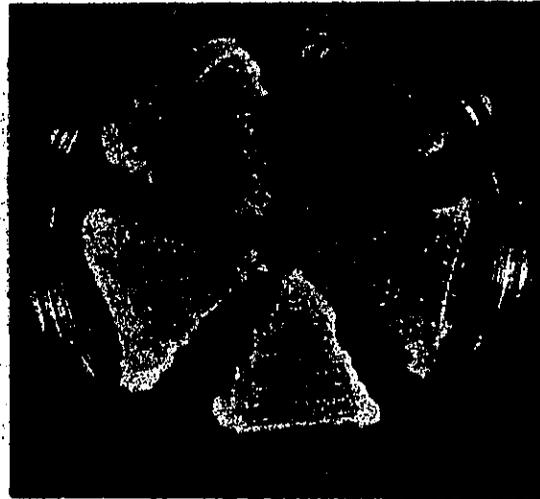
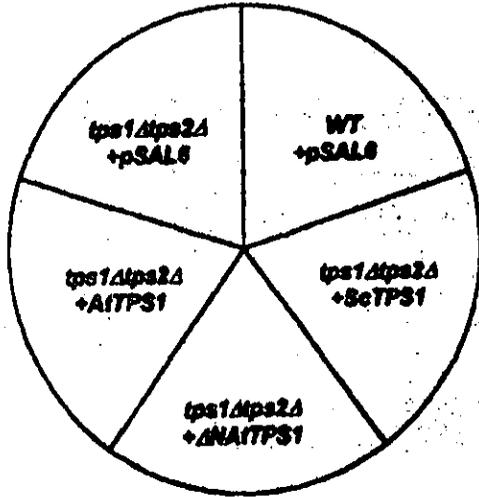


SGlc(-his)

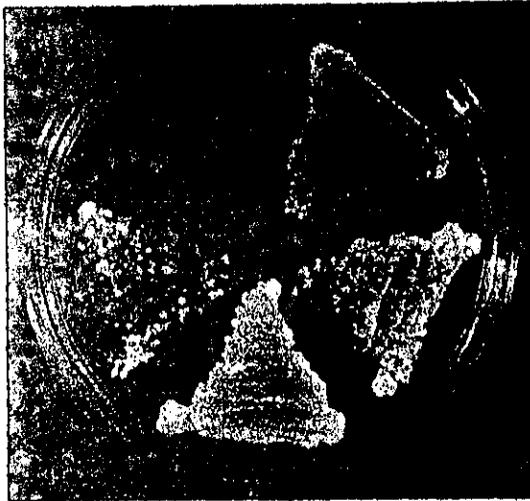


**SGlc(-his)
+100 μM CuSO₄**

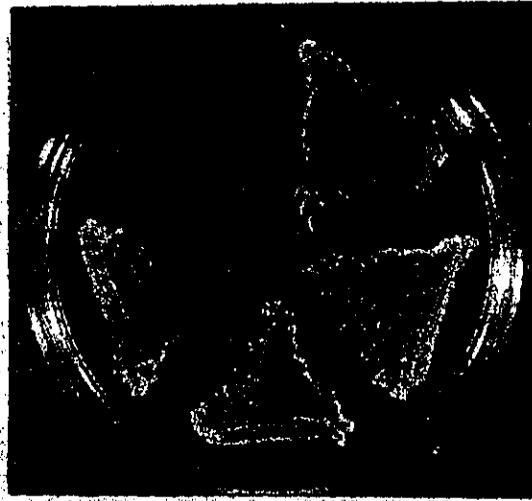
Figura 13. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tpo1Δ* de levadura, con *AtTPS1* clonado en pSAL6.



SGal(-his)



SGlc(-his)



SGlc(-his)
+100 μM CuSO₄

Figura 14. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tps1Δ/tps2Δ* de levadura, con *AtTPS1* de *Arabidopsis* clonado en pSAL6.

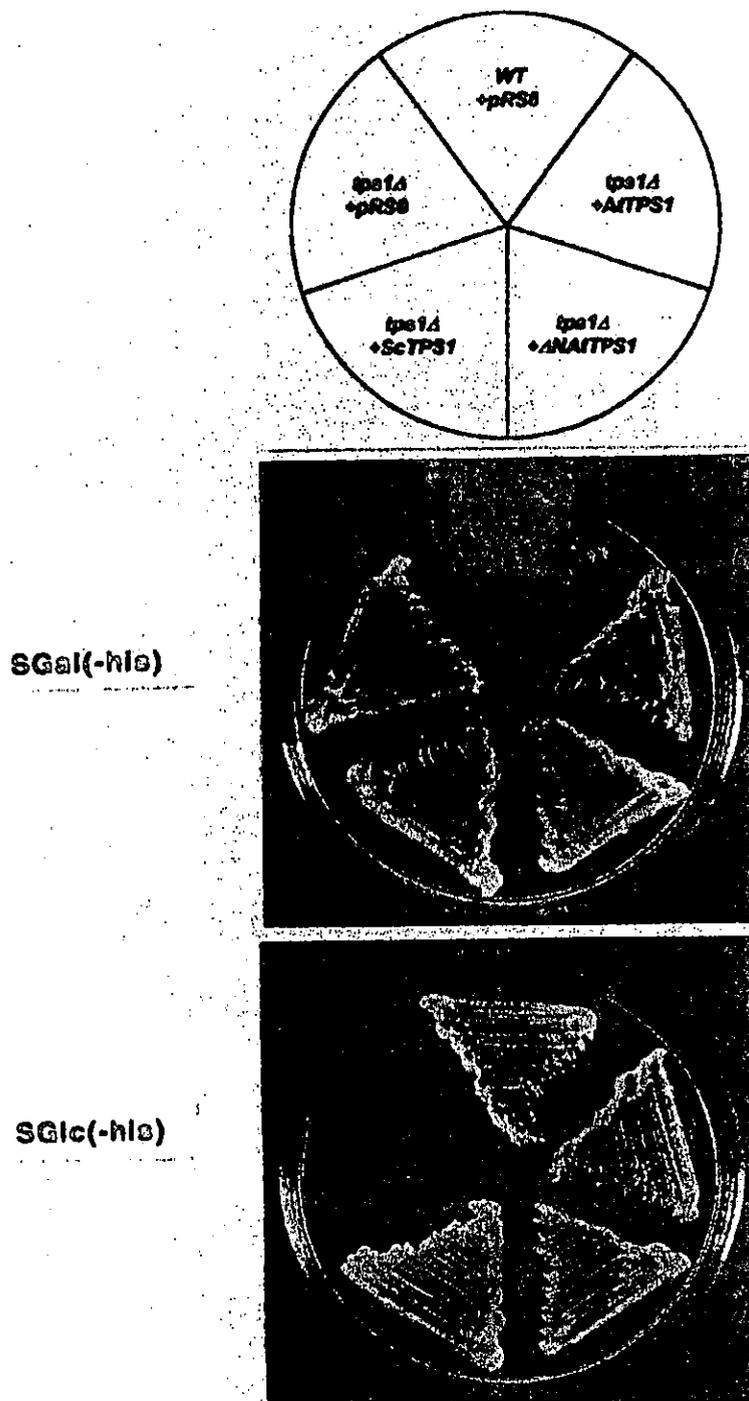


Figura 15. Complementación para crecer en glucosa de la mutante *tps1Δ* de levadura, con *AtTPS1* de *Arabidopsis* clonado en pRS6.

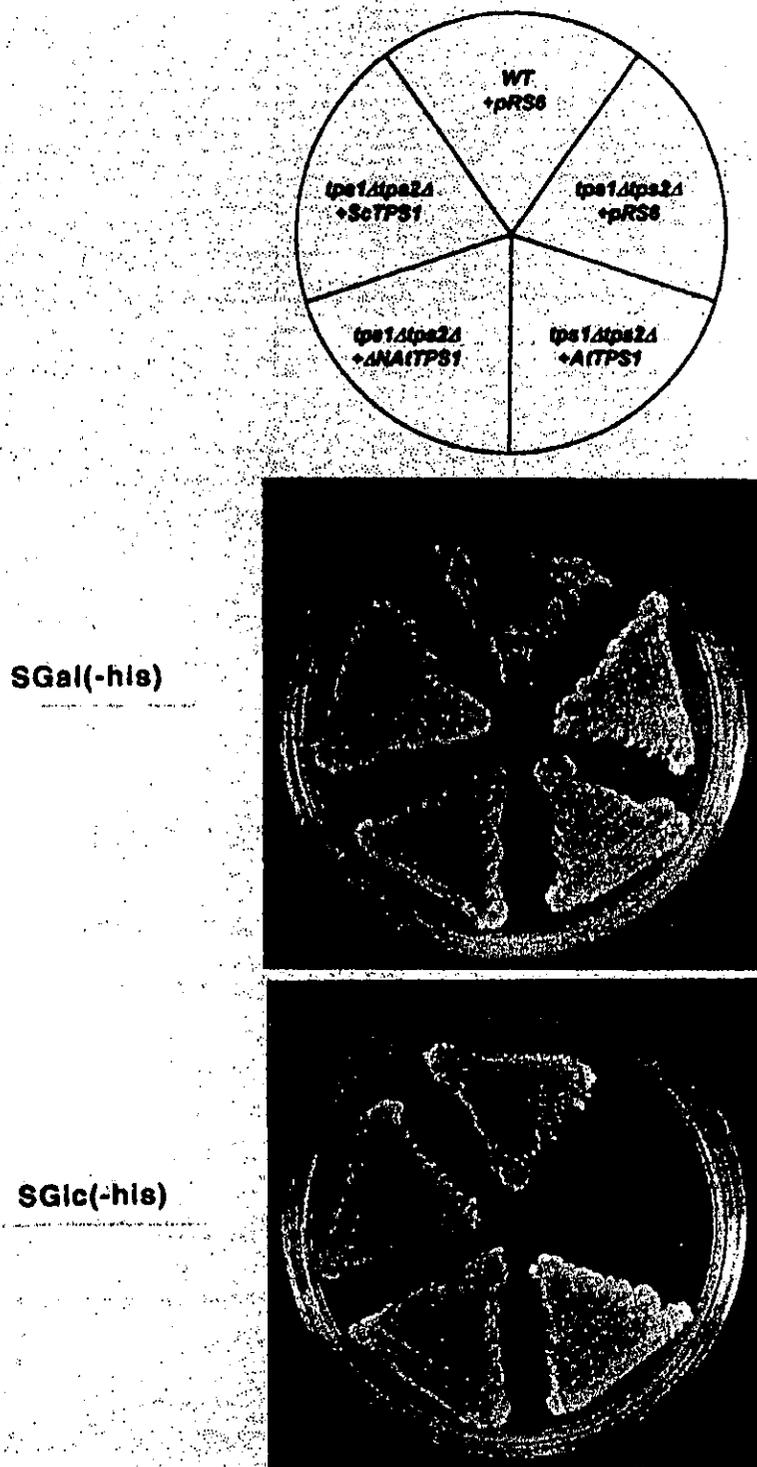


Figura 16. Complementación para crecer. en glucosa de la mutante *tps1Δ/tpsΔ* de levadura, con *AtTPS1* de *Arabidopsis* clonado en pRS6.

pSAL). Según datos bioquímicos preliminares, también ocurre un incremento en la biosíntesis de trehalosa en *tps1Δ* complementada con la clona de *ΔNAiTPS1*, en comparación con la complementación con la clona completa. Cabe mencionar que la cepa *tps1Δ(ΔNSiTPS1)* produjo el doble de trehalosa en fase estacionaria (58 μmol/g) en comparación con la cepa *tps1Δ(ΔNAiTPS1)* (Van Dijck *et al.*, 2000; en preparación).

Al igual que *SITPS1*, la clona *AtTPS1* complementó fácilmente tanto a la mutante *tps1Δ* como *tps1Δtps2Δ* cuando se clonó en el vector pRS6, con el promotor *PMA1* y lo mismo ocurrió al complementar con pRS6::*ΔNAiTPS1* (Figuras 15 y 16).

En la Figura 17 se presenta un resumen de las complementaciones hechas con las clonas de *Arabidopsis* cuando se clonaron en el vector pSAL6 (con el promotor *CUPI*) ó en el vector pRS6 (con el promotor *PMA1*).

PRO-MO-TOR	CLONA	AtTps1 COMPLETA O DELETADA	COMPLEMENTACION				
			<i>tps1Δ</i>	<i>tps1Δ/tps2Δ</i>			
CUP1	AtTPS1	<table border="1"> <tr> <td>100</td> <td>500 aa</td> <td>342 aa</td> </tr> </table>	100	500 aa	342 aa	+	++
	100	500 aa	342 aa				
ΔNAiTPS1	<table border="1"> <tr> <td>500 aa</td> <td>342 aa</td> </tr> </table>	500 aa	342 aa	++	++		
500 aa	342 aa						
PMA1	AtTPS1	<table border="1"> <tr> <td>100</td> <td>500 aa</td> <td>342 aa</td> </tr> </table>	100	500 aa	342 aa	++	++
	100	500 aa	342 aa				
ΔNAiTPS1	<table border="1"> <tr> <td>500 aa</td> <td>342 aa</td> </tr> </table>	500 aa	342 aa	++	++		
500 aa	342 aa						

COMPLEMENTACION CON pSAL6 (promotor *CUP1*):

-) no crece aún añadiendo cobre, ±) crece poco, aún añadiendo cobre,
 +) crece bajo adición de cobre (100 μM), ++) crece igual de bien con o sin cobre. La complementación se llevó a cabo en medio mínimo con glucosa. El crecimiento se evaluó después de 3 días de incubación a 30 °C.

COMPLEMENTACION CON pRS6 (promotor *PMA1*):

++) Crece muy bien en glucosa

El crecimiento se evaluó después de 3 días de incubación a 30 °C

Figura 17. Análisis de complementaciones del crecimiento en glucosa de mutantes *tps*, con AtTps1 y ΔNAiTps1 bajo su expresión con los promotores *CUP1* ó *PMA1*.

DISCUSION

1. El gen *SITPS1* codifica para trehalosa-6-fosafato sintetasa.

En este trabajo, se reporta la caracterización del gen *SITPS1* de *Selaginella lepidophylla*, mediante su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.

Desde que se aisló este cDNA, la comparación de la secuencia de aminoácidos que codifica, con otras secuencias relacionadas de levadura y *E. coli* entre otras, sugirió fuertemente que se trataba de un putativo gen *TPS* que codifica para una sintetasa de trehalosa (Zentella e Iturriaga, 1996; Zentella *et al* 1999). Sin embargo, a pesar de poseer una identidad del 50% y una similitud del 61% con la proteína ScTps1 de levadura, su estructura posee notables diferencias como el de ser el doble de grande, con un extremo carboxilo con cierto grado de homología con ScTps2 de levadura con la cual la proteína entera de SITps1 conserva un 32% de identidad y un 44% de similitud. Más aún, SITps1 tiene un 48% de identidad y un 60% de similitud con OtsB, la fosfatasa de trehalosa de *E. coli* (Zentella *et al.*, 1999). Adicionalmente, SITps1 posee un extremo amino de unos 100 aa que no se encuentra en la proteína ScTps1 de levadura.

De las comparaciones hechas antes, emergieron nuestros dos primeros objetivos que fueron los de demostrar: a) si SITps1 poseía la función de sintetasa de trehalosa y, b) si adicionalmente poseía la función de fosfatasa de trehalosa.

Para cubrir estos dos objetivos, se utilizó como modelo experimental a la levadura, aprovechando la versatilidad que este organismo tiene para llevar a cabo de manera combinada el análisis genético, fisiológico y bioquímico.

Primero se clonó *SITPS1* en el vector pSAL4, el cual posee un promotor de expresión moderada y con la clona pSAL4::*SITPS1* (que también podríamos representar como *CUP1*::*SITPS1*, por el promotor de la metalotioneína) sólo se pudo restaurar el crecimiento en glucosa de la doble mutante *tps1Δtps2Δ*, si y solo si se adicionaba cobre para incrementar la expresión (ver resumen en la Figura 5). La falta de complementación de la mutante sencilla *tps1Δ* se interpretó a la luz de lo que se sabe del complejo Tps en levadura, donde adicionalmente a las proteínas ScTps1 y ScTps2, hay otras dos regulatorias, o ScTps1 y ScTps3, interactuando los cuatro polipéptidos para formar un

complejo oligomérico Tps que se encarga de sintetizar trehalosa (Bell *et al.*, 1992; Vuorio *et al.*, 1993; Bell *et al.*, 1998). El modelo de interacción que se propone para este caso entre SITps1 y ScTps2, se presenta en la Figura 18. Para explicar la falta de complementación en la mutante *tps1Δ*, suponemos que pudiera estar ocurriendo una interacción negativa entre SITps1 y ScTps2, que de alguna manera interfiere en la actividad catalítica (y tal vez regulatoria también) de SITps1, al ser secuestrada por ScTps2 (Zentella *et al.*, 1999). Se ha determinado que ScTps1 se puede encontrar como monómero, adicionalmente a su participación en el complejo Tps (Bell *et al.*, 1998). No se tiene claro cual es la función del monómero, aunque se ha sugerido su posible participación en un complejo encargado del sensado de la glucosa que estaría constituido por la proteína Tps1, la hexocinasa 2 y un transportador de baja afinidad (Thevelein and Hohmann, 1995).

Decidimos probar si un incremento en la transcripción de *SITPS1*, podría superar esta inhibición. Para lograr esto, se clonó a *SITPS1* en un vector con el promotor *PMA1*, el cual es mucho más fuerte que *CUP1*. Se esperaba que incrementando la transcripción se pudiera aumentar la cantidad de proteína SITps1 en las células (lo cual no se pudo cuantificar por no contar con un anticuerpo específico contra esta proteína). Con la construcción pRS6::*SITPS1* (6 *PMA1*::*SITPS1*) se volvieron a transformar las mutantes *tps1Δ* y *tps1Δtps2Δ*. Como se esperaba, ahora si se pudo complementar a la mutante *tps1Δ* y también de nueva cuenta a la doble mutante (ver resumen en la Figura 8).

Además de restaurar el crecimiento en glucosa, se esperaba obtener y detectar actividad de la sintetasa de trehalosa, y a la trehalosa misma. Con la construcción *CUP1*::*SITPS1* no pudo detectarse trehalosa en la cepa *tps1Δ/tps2Δ* (*SITPS1*), lo cual podría parecer normal, ya que la trehalosa-6-fosfato, no podría convertirse a trehalosa por falta de la fosfatasa de trehalosa específica, a menos que se pudiera sintetizar un poco de trehalosa por la acción de las fosfatasas endógenas inespecíficas (Bell *et al.*, 1998). Lo último parece que ocurre, ya que la cepa *tps1Δtps2Δ* (*ScTPS1*), mostró entre 26 y 36% de trehalosa al compararla con la cepa silvestre (Zentella *et al.*, 1999).

Se debe señalar que el fenotipo de la mutante *tps1Δ* involucra tres aspectos importantes: i) la inhabilidad para crecer en una fuente de carbono fermentable debido a un imbalance metabólico que deja sin fósforo inorgánico a las primeras etapas de la glicólisis;

cDNA con que se complementa	<i>SITPS1</i>		Δ <i>NSITPS1</i>	
cepa de levadura	<i>tps1</i> Δ	<i>tps1</i> Δ / <i>tps2</i> Δ	<i>tps1</i> Δ	<i>tps1</i> Δ / <i>tps2</i> Δ
modelo de regulacion (Promotor <i>CUP1</i>)(**) (+)				
crecimiento en glucosa	-	+	++	++
contenido trehalosa (*)	0 X	0 X	1.0 X	0.25 X
modelo de regulacion (promotor <i>PMA1</i>) (+++)				
crecimiento en glucosa	+	+	+	+
contenido trehalosa (*)	1.0 X	n.d	n.d	n.d

* La determinación de trehalosa se hizo en fase estacionaria

** Al complementar con las clonas en el promotor *CUP1*: (-) no crece aún añadiendo cobre; (+) crece al añadir cobre; (++) crece sin añadir cobre
 1.0X = igual a la cantidad de trehalosa de la cepa silvestre
 n.d.= no determinado

Figura 18. Modelo propuesto para explicar la complementación de mutantes *tps* con *SITPS1*, en el cual se supone que hay una interacción entre la proteína *SITps1* de *S. lepidophylla* y *ScTps2* de *S. cerevisiae*.

ii) una serie de defectos en la señalización por glucosa mediada por la vía cAMP-PKA, y
iii) la falta de síntesis de trehalosa, que trae aparejada la pérdida de resistencia al estrés por calor y osmótico (Van Aelst *et al.*, 1993; Thevelein and Hohmann, 1995;); las tres categorías de efectos se ilustran en la Figura 3.

Es interesante notar como en la doble mutante se pudo restaurar el crecimiento en glucosa con *CUP1::SITPS1*, aún sin que hubiera síntesis neta aparente de trehalosa. ¿Se corrigen algunos efectos de la señalización? Para poder contestar esta pregunta, tendrían que hacerse otro tipo de mediciones en las cepa *tps1Δtps2Δ(CUP::SITPS1)*, como los perfiles de Pi, de cAMP y de la actividad de Fbp1,6, y estimar la actividad transcripcional de genes que se sabe son blancos de la vía cAMP-PKA, como *CTT1*, *HSP12* y *SSA3* (Van Aelst *et al.*, 1993; Kraakman *et al.*, 1999).

La transformación de la mutante *tps1Δ* con *SITPS1* sobre-expresado mediante el promotor *PMA1* no sólo restauró el crecimiento en glucosa, sino que se obtuvo un incremento notable en la biosíntesis de trehalosa, mismo que fluctuó entre 64 a 100% en comparación con la cepa silvestre transformada sólo con el vector pRS6 (Zentella *et al.*, 1999). Este resultado, comparado con la nula complementación lograda con el mismo gen bajo el control transcripcional de un promotor débil como *CUP1*, parecieran indicar que la complementación en este caso depende de un incremento en la transcripción, y tal vez también en la traducción de *SITPS1*. Se debe señalar que Blázquez *et al* (1998) también utilizaron un promotor fuerte como *PGK1* para complementar a la mutante *tps1Δ* con la clona *AtTPS1* de *Arabidopsis*, aunque sólo detectaron un 25% de trehalosa al comparar a la mutante complementada con la cepa silvestre. Este resultado podría deberse a las diferencias debidas a la fuerza y patrón de expresión transcripcional de los promotores *PGK1* y *PMA1*, o bien a una mayor actividad específica de SITps1 para sintetizar trehalosa (Zentella *et al.*, 1999)

2. SITps1 restaura la termotolerancia y la osmotolerancia de *tps1Δ*.

Otro de los objetivos de este trabajo fue el de corroborar si SITps1 y su capacidad de biosintetizar trehalosa se relaciona con la resistencia al estrés osmótico y por choque térmico en levadura (Winkler *et al.*, 1991; Hounsa *et al.*, 1998). Esto debido a que la actividad de SITps1 puede ensayarse *in vivo* en levadura, y que su función sería análoga en

plantas. En el caso particular de *Selaginella*, se ha propuesto que sus propiedades anhidrobióticas se deben en gran medida al alto contenido de trehalosa presente tanto en los tejidos frescos como en los completamente desecados (Adams *et al.*, 1990; Muller *et al.*, 1995). También en levadura, se ha propuesto que su enorme capacidad para soportar la deshidratación sin perder por completo su viabilidad se debe a la presencia de la trehalosa (Kim *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha documentado ampliamente el papel que la trehalosa juega en el desarrollo de la termotolerancia y la resistencia al choque térmico (Winkler *et al.*, 1991; De Virgilio *et al.*, 1994).

Se pudo demostrar, utilizando la cepa *tps1Δ(PMA1::SITPS1)*, que la presencia de *SITPS1* confiere a las células complementadas la capacidad de desarrollar termotolerancia a 42 °C con pérdida de poca viabilidad (80% de la cepa mencionada, y 127 % para WT, es decir, aparentemente las temperaturas moderadamente altas en la cepa WT aceleran la tasa de división celular sin pérdida de viabilidad) y que la resistencia al choque térmico a 50 °C permanece a los mismos niveles tanto en la cepa complementada como la cepa silvestre cuando son termoinducidas (Zentella *et al.*, 1999).

También la osmotolerancia fue restaurada en la cepa *tps1Δ(PMA1::SITPS1)*, cuando se probó en medio rico YPGal con 1.6 M de sorbitol ó 0.9 M de NaCl. Dado que ambas molaridades son equivalentes, se podría concluir que lo que se alivia es el estrés osmótico, y que *tps1Δ* es una cepa osmosensible y no halosensible. Es importante señalar que en levadura el osmolito principal es el glicerol, sin embargo también se requiere a la trehalosa para contender con el estrés osmótico: mientras que el glicerol es efectivo bajo estrés moderado, la trehalosa se requiere para resistir al estrés osmótico severo. Dado que este compuesto es efectivo a concentraciones moderadas de 5 a 10 mM, más que como un osmolito, funciona como un osmoprotectante de moléculas y estructuras celulares (Holmstrom *et al.*, 1996; Hounsa *et al.*, 1998).

3. Análisis de los dominios de SITps1 mediante deleciones.

En la búsqueda por encontrar a la actividad fosfatasa de trehalosa en SITps1, se efectuó una deleción en el extremo carboxilo COOH, el cual comprende a 394 aa. También se clonó al fragmento COOH, adicionándole a la clona un ATG para probar si se podía complementar a la mutante *tps2Δ*. Se efectuaron una serie de deleciones, incluyendo una en

la cual se eliminó al extremo amino de 100 aa, y otra en la cual se deletó tanto el extremo amino como el carboxilo dejando sólo la parte central de 500 aa. Estas deleciones fueron ensayadas en su capacidad para complementar las mutantes *tps* en los vectores pSAL4 y pRS6.

Como ya se mencionó, no se pudo detectar la actividad fosfatasa de trehalosa Tpp en S1Tps1, a pesar de buscar evidencias bioquímicas y mediante ensayos genético-fisiológicos de complementación (Zentella *et al.*, 1999). La evidencia bioquímica buscada fue la acumulación o desaparición de trehalosa-6-fosfato, según fuera el caso; esta parte la llevó a cabo el grupo del Dr. Thevelein (Leuven, Bélgica), mientras que en nuestro grupo, se trató de complementar a la incapacidad de la mutante *tps2Δ* para crecer a una temperatura continua de 37.5 °C, fenotipo debido a la acumulación y efecto tóxico de la trehalosa-6-fosfato (Elliot *et al.*, 1996). Ni con la clona completa, ni con el solo dominio putativo Tpp clonados en pSAL4 y después en pRS6 se pudo complementar este fenotipo, lo cual demostró que efectivamente no había evidencias de actividad de trehalosa-6-fosfato fosfatasa.

La clona pSAL4::*SITPS1ΔC*, mostró una disminución de actividad en la mutante *tps1Δ/tps2Δ*, ya que sólo se notó un débil crecimiento en donde antes había crecimiento pleno. Sin embargo, de nuevo un incremento en la transcripción obtenido con pRS6::*SITPS1ΔC* superó esta limitación del crecimiento (Figura 9).

El reporte del gen *AtTPS1* de *Arabidopsis* (Blázquez *et al.*, 1998) codificante de la trehalosa-6-fosfato sintetasa, y de los genes *TPPA* y *TPPB* de *Arabidopsis* codificantes de la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (Vogel *et al.*, 1998), aportó una evidencia más a favor de que en plantas existe la fosfatasa de trehalosa de manera separada. Aunque una evidencia definitiva es que en las fosfatasas existe un dominio de fosfohidrolasa que está presente sólo en Tps2 de levadura y en las proteínas TppA y TppB de *Arabidopsis* (Vogel *et al.*, 1998). Recientemente Goddijn y Van Dun (1999) efectuaron una búsqueda en las bases públicas de genes, y pudieron identificar tres secuencias de *Arabidopsis* muy parecidas a *AtTps1*, pero en este caso, con el dominio de fosfohidrolasa en el carboxilo, lo cual los ha llevado a proponer que existen Tps(s) clase 1 (sólo Tps) y las de clase 2 (función Tps/Tpp), lo cual será fácil de demostrar utilizando complementación de la doble mutante de

levadura. Adicionalmente identificaron otra Tps de *Arabidopsis* y una proteína Tps/Tpp de *Solanum tuberosum* (papa). Por este resultado inesperado, es posible que también en *Selaginella* se encuentren genes y proteínas bipartitas, como se había propuesto antes para SITps1 (Zentella e Iturriaga, 1996)

Siguiendo con el análisis de deleciones, se obtuvo un resultado muy interesante al deletar los 100 aa del extremo amino. El gen y la proteína truncada resultante mostró una actividad acrecentada, lo cual fue más claro cuando se clonó en el vector pSAL4, y a diferencia del gen completo, fue capaz de complementar a la mutante *tps1Δ* aún en ausencia de cobre. Más aún, bajo estas circunstancias, ahora se pudo detectar la actividad enzimática de Tps1, a niveles muy cercanos a los mostrados por la cepa silvestre (Iturriaga *et al.*, 1998; Van Dijck *et al.*, 2000; en preparación).

La prevalencia de este incremento en la actividad cuando se deleta el extremo amino quedó de manifiesto una vez más cuando se deletó el extremo carboxilo y el amino a la vez, reduciendo a la mitad el tamaño de la proteína. Bajo estas condiciones, y en pSAL4 fue capaz de complementar a *tps1Δ* (Figura 6). Hasta ahora no se han hecho estimaciones de actividad enzimática y concentración de trehalosa, pero se espera que en las cepas *tps1Δ* y *tps1Δtps2Δ*, presenten una reducción gradual en el orden siguiente: $ANSITPS1 > ANSLTPS1AC > SITPS1 > SLTPS1AC$, a juzgar por los resultados de las complementaciones en medio mínimo con glucosa. Estas deleciones también se han probado con el promotor *PMA1* del vector pRS6, y para este caso, incluso la deleción *SITPS1AC* complementa a *tps1Δ*, por lo cual se deberán hacer las estimaciones bioquímicas para determinar si la actividad de *PMA1::ANSITPS1* y de *PMA1::ANSITPS1AC*, es mayor que para sus contrapartes clonadas bajo el control de *CUP1*. No ha sido desventajoso haber puesto las mismas clonas en pSAL4, ya que este promotor aunque débil presenta la ventaja de ser inducible y poco afectado por la fuente de carbono y el ciclo de desarrollo. La cepa *tps1Δ* (*ANSITPS1*) produjo tanta o más trehalosa que la cepa silvestre y la actividad enzimática llegó a valores de cercanos a los obtenidos en la cepa silvestre (Van Dijck *et al.*, 2000; en preparación).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La falta de complementación de *tps1*Δ por SITps1 pudo superarse al utilizar un promotor más fuerte como *PMA1*, por lo cual parecería que se requiere una mayor cantidad de proteína, lo cual puede lograrse: incrementando la transcripción, aumentando la estabilidad del transcrito y su vida media, volviendo más eficiente la traducción incrementando así la cantidad de proteína, o mediante alguna modificación en la proteína que produce un efecto positivo. Pareciera que la última posibilidad es la más viable, ya que ante la falta de un anticuerpo específico contra SITps1 se hizo una fusión en el carboxilo con el epítoto HA de la hemaglutinina y contra la cual hay disponibles anticuerpos comerciales. En un análisis Western no se notaron diferencias significativas en la cantidad de proteína para SITps1::HA y ΔNSITps1::HA aislada de la mutante *tps1*Δ complementada (Van Dijck *et al.*, 2000; en preparación).

Sin embargo, no se quiso dejar de probar si los 100 aa del extremo amino pudieran constituir un dominio de tránsito hacia algún compartimento intracelular, lo cual en levadura podría inactivar parcialmente a la enzima. El análisis de los 100 aa del extremo amino, con el programa PSORT, reveló un posible 'targeting' hacia el cloroplasto, con una probabilidad un poco más alta que su posible presencia en el citoplasma. En levaduras, no es raro que las proteínas de cloroplasto se dirijan a la mitocondria, así que teóricamente pude obtenerse información sobre el 'targeting' con este tipo de experimentos de expresión heteróloga (Hurt *et al.*, 1986)

Se construyó la fusión traduccional pRS6::NH₂::GFP, para monitorear *in vivo* la ubicación de la proteína verde fluorescente. Como se aprecia en la Figura 12, no hay diferencias notables entre el control pRS6::GFP y pRS6::NH₂::GFP al expresar estas clonas en la cepa silvestre, ya que la fluorescencia se distribuyó en el citoplasma sin un patrón evidente de compartimentalización intracelular.

¿Es la ganancia de función de ΔNSITps1 sólo un artefacto al complementar a la levadura o el incremento en la actividad también se manifiesta en las plantas?. La segunda opción sería más interesante, ya que se habría producido *in vitro* una versión mejorada, o más activa de SITps1. Esto será demostrado hasta que se produzcan plantas transgénicas con este gen modificado.

En *A. thaliana*, adicionalmente a AtTps1 se han identificado en las bases de información genética, entre otras proteínas homólogas, a una putativa proteína Tps de 795

aa que carece del extremo amino (Acceso EMBL E1392090); ésta podría ser una buena herramienta para analizar comparativamente la función de los distintos dominios de los miembros de la familia de proteínas Tps de esta planta (Goddijn and Van Dun, 1999).

4. *Arabidopsis* también posee genes *TPS*.

Aunque nadie hasta ahora ha logrado detectar trehalosa en *Arabidopsis*, ha sido una sorpresa el que se haya aislado e identificado al gen *AtTPS1*, que codifica para la trehalosa-6-fosfato sintetasa y los genes *ATTPA* y *ATTPB* que codifican para la fosfatasa específica de trehalosa. La función de estos genes ha sido también elucidada a través de complementación de las respectivas mutantes de levadura (Blázquez *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998). Más sorprendente ha sido el hallazgo reportado recientemente de la existencia de toda una familia de Tps(s), en las cuales las hay con función sintetasa, con función fosfatasa o con ambas (Goddijn and Van Dun, 1999).

Utilizando la secuencia reportada de *AtTPS1* disponible en el GenBank desde 1997, se aisló su cDNA por RT-PCR con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con *SITPS1*. Ambos cDNAs *AtTPS1* y $\Delta NAiTPS1$ fueron clonados en los vectores pSAL6 de moderada actividad, y en pRS6 para obtener una mayor transcripción. La clona completa *AtTPS1* en pSAL6 fue capaz de complementar a *tps1* Δ en glucosa bajo adición de cobre; de manera interesante también al deletar el extremo amino, se observó una mayor actividad de $\Delta NAiTPS1$, a juzgar porque ahora la clona pSAL6: $\Delta NAiTPS1$ complementó a *tps1* Δ aún sin la adición de cobre. Resultados preliminares indican que también para la clona de *Arabidopsis*, como para *Selaginella*, la delección del extremo amino incrementa la actividad de biosíntesis de trehalosa al ser expresada en levadura (Iturriaga *et al.*, 1998; Van Dijck *et al.*, 2000; en preparación).

Una comparación de *SITps1* y *AtTps1*, muestra que existe una gran similitud entre ambas proteínas, que poseen un porcentaje de identidad de 69% y 75% de similitud. También existe una gran semejanza cuando se comparan los perfiles hidropáticos de ambas proteínas, notándose que la región de los primeros 100 aa es bastante hidrofílica (Figura 23; página 105a).

5. ¿Que función tienen *Tps1* y la biosíntesis de trehalosa en las plantas?

La presencia genes que intervienen en la biosíntesis de trehalosa en plantas como *S. lepidophylla*, que producen grandes cantidades de este disacárido no es del todo

sorprendente ya que sus propiedades anhidrobióticas se deben precisamente a azúcares como la trehalosa (Crowe *et al.*, 1992). Al igual que en las levaduras, la trehalosa es muy efectiva en *Selaginella* para contender con el estrés osmótico o por calor (Hounsa *et al.*, 1998; Singer and Lindquist, 1998; Zentella *et al.*, 1999).

Sin embargo, en *Arabidopsis* y en muchas angiospermas no hay trehalosa con una función aparente pero tiene a las enzimas para su biosíntesis. Además, tanto en *Selaginella* como en *Arabidopsis* los transcritos de los genes aquí analizados son constitutivos bajo las condiciones evaluadas (Blázquez *et al.*, 1998; Zentella *et al.*, 1999). Es probable que en plantas Tps1 se regule mediante un mecanismo post-traducciona (fosforilación o defosforilación), de hecho, recientemente se ha determinado mediante Far-Western con extractos de proteínas de coliflor, la unión de las proteínas 14-3-3 a algunas Tps fosforiladas que poseen el dominio de fosfohidrolasa, mismo que también está presente en la Tps2 de levadura; esto sugiere un patrón complejo de regulación post-traducciona (Moorhead *et al.*, 1998; Thaller *et al.*, 1998).

El haber descubierto que la trehalosa que se sintetiza en plantas angiospermas puede ser mayoritariamente degradada por la trehalasa, además de explicar en primera instancia la ausencia de este azúcar. Este hallazgo también ha sugerido un método para lograr un incremento en el contenido de trehalosa en las plantas con fines biotecnológicos.

Recientemente se caracterizó a una trehalasa de soya (Aeschbacher *et al.*, 1999), y también se ha reportado la secuencia proveniente de papa (acceso EMBL R98600). Desde hace algunos años, de manera indirecta se había identificado la actividad trehalasa mediante el uso de validamicina A, que inhibe específicamente a esta enzima (Goddijn *et al.*, 1997). Al tener estos genes, será posible el emplear la estrategia del RNA antisentido para inactivar la traducción de la trehalasa, como una estrategia para incrementar el contenido de trehalosa en plantas.

Más intrigante es el elucidar el papel de Tps en el metabolismo de azúcares y su posible participación en la regulación y/o el sensado y la señalización de estas moléculas (Goddijn and Smeeckens, 1998; Muller *et al.*, 1999). En plantas tal vez sea más complicado que en levaduras, pues de entrada, en la angiosperma *Arabidopsis*, se ha identificado una familia multigénica de Tps(s) y sus enzimas relacionados Tpp(s) cuyo papel apenas ha comenzado a esclarecerse (Blázquez *et al.*, 1998; Goddijn and van Dun, 1999).

La producción de plantas transgénicas ha aportado algunos datos al sobre-expresar el gen de levadura en plantas, pero ha quedado evidente que aunado al incremento de la trehalosa, ocurren una serie de efectos pleiotrópicos indeseables que se manifiestan en la morfología de las plantas (Holmstrom *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998).

Una serie de preguntas que habrá que contestar es si Tps1 posee algún papel regulatorio adicionalmente a su función catalítica, o si los efectos negativos en el desarrollo de las plantas transgénicas que sobre expresan este gen, se deben a una acumulación tóxica de la trehalosa-6-fosfato. Este intermediario posee en la levadura un papel regulatorio al inhibir a la hexocinasa 2, lo cual se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Blázquez *et al.*, 1993; Hohmann *et al.*, 1996). Una de las tareas inmediatas es el determinar que tanta semejanza existe en el papel de la trehalosa y las proteínas Tps entre levaduras y plantas (Goddijn and Smeekeens, 1998; Muller *et al.*, 1999). Las comparaciones entre ambos grupos de organismos ha guiado parte de la investigación hasta ahora realizada en plantas en lo referente a los mecanismos de regulación por carbono y la transducción de señales en respuesta a los azúcares (Jang and Sheen, 1997; Smeekeens and Rook, 1997; Halford and Hardie, 1998; Goddijn and van Dun, 1999; Lalonde *et al.*, 1999; Sheen *et al.*, 1999); aunque es lógico esperar que en plantas estos fenómenos sean mucho más complejos

CONCLUSIONES

- 1) Se demostró por complementación del crecimiento en glucosa de la mutante *tps1*Δ de levadura, que el gen *SITPS1* de *Selaginella* es un homólogo de *ScTPS1* que codifica para la trehalosa-6-fosfato sintetasa.
- 2) Se demostró, en colaboración con el grupo del Dr. Thevelein, la actividad enzimática de SITps1, así como su capacidad para biosintetizar trehalosa.
- 3) Con la restauración de la biosíntesis de trehalosa que hace *SITPS1* sobre la mutante *tps1*Δ, se restauran la termotolerancia y la osmotolerancia de la mutante.

La producción de plantas transgénicas ha aportado algunos datos al sobre-expresar el gen de levadura en plantas, pero ha quedado evidente que aunado al incremento de la trehalosa, ocurren una serie de efectos pleiotrópicos indeseables que se manifiestan en la morfología de las plantas (Holmstrom *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998).

Una serie de preguntas que habrá que contestar es si Tps1 posee algún papel regulatorio adicionalmente a su función catalítica, o si los efectos negativos en el desarrollo de las plantas transgénicas que sobre expresan este gen, se deben a una acumulación tóxica de la trehalosa-6-fosfato. Este intermediario posee en la levadura un papel regulatorio al inhibir a la hexocinasa 2, lo cual se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Blázquez *et al.*, 1993; Hohmann *et al.*, 1996). Una de las tareas inmediatas es el determinar que tanta semejanza existe en el papel de la trehalosa y las proteínas Tps entre levaduras y plantas (Goddijn and Smeeckens, 1998; Muller *et al.*, 1999). Las comparaciones entre ambos grupos de organismos ha guiado parte de la investigación hasta ahora realizada en plantas en lo referente a los mecanismos de regulación por carbono y la transducción de señales en respuesta a los azúcares (Jang and Sheen, 1997; Smeeckens and Rook, 1997; Halford and Hardie, 1998; Goddijn and van Dun, 1999; Lalonde *et al.*, 1999; Sheen *et al.*, 1999); aunque es lógico esperar que en plantas estos fenómenos sean mucho más complejos

CONCLUSIONES

- 1) Se demostró por complementación del crecimiento en glucosa de la mutante *tps1*Δ de levadura, que el gen *SITPS1* de *Selaginella* es un homólogo de *ScTPS1* que codifica para la trehalosa-6-fosfato sintetasa.
- 2) Se demostró, en colaboración con el grupo del Dr. Thevelein, la actividad enzimática de SITps1, así como su capacidad para biosintetizar trehalosa.
- 3) Con la restauración de la biosíntesis de trehalosa que hace *SITPS1* sobre la mutante *tps1*Δ, se restauran la termotolerancia y la osmotolerancia de la mutante.

4) Se encontró que la delección de 100 aa en el extremo amino incrementa la actividad enzimática de SITps1.

5) Se demostró que puede reducirse el tamaño de SITps1 a la mitad (500 aa), al eliminar 100 aa en el extremo amino y 394 en el carboxilo, sin que se pierda la capacidad para complementar a la mutante *tps1*Δ.

PERSPECTIVAS

En este trabajo, se contestaron algunas interrogantes, pero otras cuestiones quedaron pendientes, por lo cual se señalan algunas que pudieran considerarse en el futuro.

1) Profundizar el conocimiento sobre la complementación de *tps1*Δ por *SITPS1*, analizando los perfiles de Pi, cAMP y enzimas como Fbp1,6asa, para determinar si también se complementan los problemas de señalización de esta mutante.

2) Elucidar el papel de *SITPS1* en *Selaginella* y de *AtTPS1* en *Arabidopsis*, ¿interviene sólo en la biosíntesis de trehalosa bajo condiciones de estrés?, ¿posee algún papel regulatorio en el metabolismo de azúcares o en su señalización?

3) Determinar si hay interacción de AtTps1 con otras proteínas, mediante rastreos por el sistema del doble híbrido, para avanzar en la caracterización molecular de éstas proteínas en plantas.

4) Obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el gen *AtTPS1* sobre expresado para ver si hay cambios fenotípicos adversos como con los homólogos de levadura y de *E. coli*. expresados en plantas, y en antisentido para estudiar la pérdida de función.

5) Producir anticuerpos contra SITps1 y AtTps1 para efectuar ensayos Western y poder detectar a la proteína en los diferentes órganos, etapas de desarrollo y en las plantas transgénicas; para efectuar inmuno-localización *in situ* y para realizar una detección de

4) Se encontró que la delección de 100 aa en el extremo amino incrementa la actividad enzimática de SITps1.

5) Se demostró que puede reducirse el tamaño de SITps1 a la mitad (500 aa), al eliminar 100 aa en el extremo amino y 394 en el carboxilo, sin que se pierda la capacidad para complementar a la mutante *tps1* Δ .

PERSPECTIVAS

En este trabajo, se contestaron algunas interrogantes, pero otras cuestiones quedaron pendientes, por lo cual se señalan algunas que pudieran considerarse en el futuro.

1) Profundizar el conocimiento sobre la complementación de *tps1* Δ por *SITPS1*, analizando los perfiles de Pi, cAMP y enzimas como Fbpl,6asa, para determinar si también se complementan los problemas de señalización de esta mutante.

2) Elucidar el papel de *SITPS1* en *Selaginella* y de *AtTPS1* en *Arabidopsis*, ¿interviene sólo en la biosíntesis de trehalosa bajo condiciones de estrés?, ¿posee algún papel regulatorio en el metabolismo de azúcares o en su señalización?

3) Determinar si hay interacción de AtTps1 con otras proteínas, mediante rastreos por el sistema del doble híbrido, para avanzar en la caracterización molecular de éstas proteínas en plantas.

4) Obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* con el gen *AtTPS1* sobre expresado para ver si hay cambios fenotípicos adversos como con los homólogos de levadura y de *E. coli* expresados en plantas, y en antisentido para estudiar la pérdida de función.

5) Producir anticuerpos contra SITps1 y AtTps1 para efectuar ensayos Western y poder detectar a la proteína en los diferentes órganos, etapas de desarrollo y en las plantas transgénicas; para efectuar inmuno-localización *in situ* y para realizar una detección de

proteínas Tps relacionadas inmunológicamente en otras especies vegetales.

6) El reporte reciente de una serie de genes de *Arabidopsis* que codifican para sintetisas de trehalosa, fosfatasas de trehalosa, y aparentemente enzimas bipartitas Tps/Tpp (Goddijn and van Dun, 1999), abre enormes interrogantes sobre la función y significado evolutivo de estos genes y proteínas en las plantas. Algunas cuestiones podrán contestarse utilizando el sistema de levadura, pero otras deberán de resolverse en la planta de manera directa.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO EMPLEADO

Cepas de *Sacharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo

W303-1A

Cepa silvestre

(MAT a *leu2-3,112 ura3-1, trp1-1, his3-11, 15 ade2-1, can1-100, GAL, SUC2*)

Thomas and Rothstein, 1989

YSH290 (*tps1Δ*)

No crece en glucosa, crece en galactosa
es termosensible y osmosensible

(W303-1A *ggs1/tps1Δ::TRP1*)

Hohmann *et al.*, 1993

YSH450 (*tps2Δ*)

Crece en glucosa, es termosensible a 37 °C

(W303-1A *tps2Δ::LEU2*)

Neves *et al.*, 1995

YSH652 (*tps1Δ/tps2Δ*)

No crece en glucosa, crece en galactosa

(W303-1A *ggs1/tps1Δ::TRP1/tps2Δ::LEU2*)

Neves *et al.*, 1995

YSH312 (*tps1Δ/hxk2Δ*)

Si crece en glucosa

(W303-1A *ggs1/tps1Δ::TRP1/hxk2Δ::LEU2*)

Hohmann *et al.*, 1993

Especies de plantas utilizadas

Selaginella lepidophylla (Planta de resurrección, Rosa de Jericó, Doradilla)

Arabidopsis thaliana cv. Columbia

MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS

Medio Rico YPD

Extracto de levadura	1 %	10 g/l
Bacto Peptona	2 %	20 g/l
Dextrosa o glucosa (*)	2 %	20 g/l
Agar (sólido)	2 %	20 g/l

Aforar a 1 litro con agua destilada

(*) Para el medio YPG, sustituir a la dextrosa por 2 % de galactosa.

Si la cepa es auxótrofa de adenina, añadir 10 ml/l de un stock 100X de 3 mg/ml para evitar que el cultivo adquiriera un color muy rojo.

Esterilizar a 110 °C por 20 minutos.

Medio Mínimo SD

Yeast Nitrogen Base (w/o aminoacids)	0.7%	7 g/l
Dextrosa 2% (*)		20 g/l
MES 10X (**)		100 ml/l
Leucina (stock 100X, 10 mg/ml)		10 ml/l
Uracilo (stock 100X, 3 mg/ml)		10 ml/l
Histidina (stock 100X, 3 mg/ml)		10 ml/l
Triptófano (stock 100X, 3 mg/ml)		10 ml/l
Adenina (stock 100X, 3 mg/ml)		10 ml/l
Agar (sólido)		20 g/l

Aforar a 1 litro con agua destilada y esterilizar a 110 °C por 20 minutos.

(*) O galactosa al 2% para algunas mutantes como *tps1Δ*.

(**) MES= 2-(N-morpholino) ethane-sulphonic acid, PM=195.2). Buffer

Se prepara 0.5 M, con 97.6 g/l, se disuelve y con Tris base se ajusta el pH a 6.0.
se esteriliza a 110 °C por 20 minutos.

Para la cepa silvestre W303-1A (*MAT a, leu2-3, 112 ura3-1, trp1-1, his3-11, 15 ade2-1, can1-100, GAL. SUC2*), ésta debe crecerse en medio rico, o en medio mínimo con la adición de los 5 aminoácidos para los cuales es auxótrofa. Si se transforma por ejemplo con pSAL4, como lleva el marcador *URA3*, entonces omitir el uracilo para que se seleccionen los transformantes. Una vez con el vector, crecerla en medio mínimo sin uracilo para evitar la pérdida del mismo. Puede crecer con glucosa o galactosa, pero crece mejor con glucosa.

METODO 1

AISLAMIENTO DE DNA DE PLASMIDO DE LEVADURA

(Método del laboratorio del Dr. Gerald Fink de Whitehead Institute, MIT)

1. Crecer overnight 2 ml de células en medio 2X SD ó 2X SG, pero emplear medio mínimo que mantenga la selección del vector.
2. Centrifugar en eppendorf y decantar el medio de cultivo usado,
3. Resuspender el pellet con vórtex en 1ml de H₂O.
4. Centrifugar de nuevo.
5. Resuspender en 1ml de 50 mM Tris pH7.5, 10 mM EDTA, 0.3% β-mercaptoetanol
6. Centrifugar y decantar el sobrenadante de manera que queden unos 100 µl y resuspender en el buffer residual.
7. Agregar 25 µl de una solución de 5 mg/ml Zymoliasa (Sigma, de 100,000 U) (preparar un stock y cuando no se use se puede guardar a -20 oC).
8. Incubar a 37 °C por por lo menos 1 hora (hasta 2 horas). La incubación se debe hacer con agitación suave para que no se precipiten los protoplastos que se están formando.
9. Agregar 25 µl de 10% SDS.
10. Mezclar con vórtex o con la mano y dejar reposar por 1 minuto.
11. Agregar 100 µl de Acetato de amonio 7.5 M y mezclar suavemente.
12. Incubar a -70 °C por 15 minutos para precipitar rápido el DNA.
13. Centrifugar en eppendorf por 5 minutos.
14. Transferir sobrenadante unos 100 µl a tubos nuevos y agregar 70 µl de isopropanol.
15. Mezclar y centrifugar por 5 minutos.
16. Lavar con EtOH 70%.
17. Secar y resuspender en 100 µl de TE.
18. Usar 1 µl para transformar *E. coli* electrocompetentes, pues el plásmido no puede amplificarse en las levaduras por su bajo rendimiento.

METODO 2

TRANSFORMACION DE LEVADURAS.

1. Tomar 1 ml de cultivo líquido en fase exponencial o estacionaria (1-5 días de crecimiento), y colocarlo en un tubo eppendorf. Trabajar junto al mechero o en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación bacteriana o de otros hongos.
2. Centrifugar en microfuga a unas 5 K para colectar las células y decantar el sobrenadante.
3. Con el poco medio que haya quedado, resuspender las células y luego añadir 5 µl de DNA de esperma de salmón (5-10 µg/µl).
4. Añadir 1 mg de DNA transformante.
5. Añadir 500 µl de PLATE (Mezcla de 9 ml de PEG 3450 al 50% y 1 ml de Acetato de litio 1M, pH 7.5 (10X)) el cual se prepara en TE 10X (0.1M Tris-HCl, 0.01 mM EDTA, pH 7.5). Ambas soluciones deben esterilizarse en autoclave.
6. Dejar incubando overnight, o hasta dos o tres días a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 5 K para colectar las células, y retirar el sobrenadante con micropipeta.
8. Añadir 100-200 µl de medio mínimo y platear en medio mínimo selectivo (si el vector es +URA, no poner uracilo en el medio, para seleccionar transformantes antes de probar el *feNot Ipo* de los transformantes en otro medio de selección (pe. con glucosa si se está complementando *tps1Δ*).
9. Las colonias aparecen unos 3 días después cuando se incuba a 25-30 °C. Seleccionar al menos 3 colonias para probarlas posteriormente. La caja Petri con los transformantes puede mantenerse a 4 °C por varias semanas.

De: Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* 13: 18-20.

Este método no es muy eficiente pero es fácil de llevar a cabo en los ratos libres. Para mayor eficiencia hay que utilizar otros procedimientos que generalmente implican el uso de células en fase exponencial, mayor volumen de células, más DNA carrier y transformante y un choque de temperatura a 42 °C.

METODO 3

DETERMINACION DE TREHALOSA EN MUESTRAS DE LEVADURA.

(Estandarizado en el laboratorio del Dr. J. Thevelein de la U. Católica de Leuven).

1. Se prepara un cultivo en suspensión de levaduras en fase estacionaria en unos 50 ml de medio mínimo con la fuente de carbono que se esté ensayando, en matraces Erlenmeyer (5 días de crecimiento).
2. Unos 5-10 ml de cultivo se pasan por un sistema de filtración conectado a una bomba de vacío, utilizando filtros pre-enfriados de 0.22-0.45 mm, de 47 mm de diámetro. Se colectan unos 25-50 mg de células, mismos que se remueven con una espátula del filtro, se vacían en tubos eppendorf y se enfrían de inmediato en nitrógeno líquido. Las células pueden almacenarse a -80 °C.
3. Tomar las muestras de células y pasarlos a tubos de ensayo pequeños, y por cada 50 mg de células, añadir 1 ml de Na₂CO₃ 0.25 M.
4. Colocar un tapón en el tubo y colocarlo en agua hirviendo por 20 minutos. Dejar enfriar.
5. Centrifugar; la trehalosa y demás azúcares están en el sobrenadante. Transferir 200 µl en otro tubo. Preparar también algunos tubos con un blanco y un estándar de trehalosa.
6. Añadir 100 µl de ácido acético 1 M para neutralizar (también a los blancos y estándar de trehalosa). El pH debe quedar entre 5.0-5.5; de ser necesario, ajustar con Na₂CO₃ o ácido acético.
7. Añadir 100 µl de buffer T a los extractos neutralizados y a los estándares.
8. La misma cantidad de muestra o estándar de trehalosa y de trehalasa de Humícola (50 µl de c/u), se juntan en un eppendorf.
9. Para conocer la cantidad de glucosa no derivada de trehalosa, se juntan igual cantidad de muestra y agua.
10. Los tubos se agitan por 45 minutos en un baño a 40 °C. Durante este tiempo, la trehalosa se degrada en glucosa. Centrifugar si es necesario.
11. Tomar 30 µl del sobrenadante para la determinación de glucosa.
12. Preparar una serie de estándares de glucosa de un stock 4 mM (p.e. 1,2,3 y 4 mM).
13. Añadir 1 ml de solución de glucosa oxidasa/peroxidasa, conteniendo O-dianisidina (0.1 mg/ml), a las muestras y estándares.

14. Incubar la reacción a 30 °C por 1 hora.
15. Parar la reacción con 0.5 ml de ácido sulfúrico al 56%.
16. Medir la absorbencia a 546 nm dentro de un lapso no mayor de 1 hora.

MATERIAL EMPLEADO.

0.25 M Na₂CO₃ (Se requiere 1 ml por muestra).

Acido acético 1 M (100 µl por muestra)

Baño de agua

Estándar de D-glucosa

Estándar de trehalosa (stock de 10 mM en 0.25 M de Na₂CO₃).

Buffer T: 300 mM Acetato de Na + 30 mM CaCl₂, pH 5.5.

Solución de glucosa oxidasa/peroxidasa: por litro, 42 mg de peroxidasa (100 000 U/419 mg) + 16 mg de glucosa oxidasa (100 000 U/491 mg) en buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.0.

Orthodianisidina: Se prepara en stocks de 5 ml a concentración de 10 mg/ml porque se degrada fácilmente. Se almacena a -20 °C. Se añade en dilución 1/100 justo antes de iniciar la reacción con glucosa oxidasa/peroxidasa

Acido sulfúrico al 56%.

La trehalasa de *Humicola* se puede almacenar más de un año a -20 °C, y sólo 1 semana a temperatura ambiente.

Sistema de filtración Millipore o Gelman conectado a bomba de vacío.

Basado en: Neves, M.J., H.F. Terenzi, F.A. Leone and J.A. Jorge. 1994. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 17-19.

METODO 4

DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA EN LEVADURA.

(Del lab. del Dr. Ramón Serrano de la Universidad Politécnica de Valencia)

1. Dependiendo de la actividad del promotor utilizado, se utiliza de 1-3 ml de cultivo, el cual se crece hasta la absorbencia de 0.4-0.5 (fase exponencial) para trabajar con el promotor *CUPI*. Registrar la absorbencia A_{660} al momento de muestrear los cultivos.
2. Centrifugar las células en un tubo eppendorf por 30 segundos, y resuspender al pellet en 100 μ l del buffer GTED20. El factor de concentración del cultivo original será entre 10 y 30 y habrá que tenerlo en cuenta para el calculo de las unidades de actividad. En éste momento se pueden guardar las células en el congelador para procesarlas posteriormente, sobre todo si se están colectando muestras a diferentes tiempos.
3. Añadir 6 μ l de TET y agitar enérgicamente en el vortex durante 3 minutos para permeabilizar las células. Es importante hacerlo siempre igual, ya que las diferencias en la permeabilización podrían generar discrepancias en las estimaciones.
4. Valorar la actividad por duplicado, añadiendo en un eppendorf: 20 μ l de células permeabilizadas, 0.58 ml de buffer Z y 0.12 ml de ONPG (concentración final de 2.2 mM, la K_m es de 0.4 mM).
5. Desarrollar la reacción a 30 °C durante un lapso de 5 a 60 minutos, hasta que la reacción adquiera un color amarillo no muy intenso, y entonces parar la reacción con 0.3 ml de carbonato.
6. Centrifugar las células por 30 segundos y leer la absorbencia del sobrenadante a 420 nm en una cubeta de 1 cm.
7. Para calcular la actividad en unidades internacionales, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = (1000 \times A_{420}) / (t \times V_c \times A_{660})$$

Donde t = tiempo en minutos de la reacción.

V_c = volumen del cultivo sin diluir y en ml utilizado en la reacción.

METODO 5.

EXPERIMENTO DE CHOQUE TERMICO CON LEVADURAS

(Metodología del Dr. Jordi Folch-Mallol del IBT, UNAM)

Día 1 y 2

Preparar inoculo con tubos con 4 ml de medio mínimo (en este caso SG-his), una colonia por tubo, e incubar por 48 horas a 25 °C en el tambor giratorio.

1. Inocular overnight (como de 8 a 10 pm), matraces de 50 ml, llevando la absorbencia inicial (A600) a 0.05. Incubar a 25 °C, en agitador orbital (200 rpm).

Día 3

2. Empezar a termoinducir cuando la absorbencia este entre 0.3 y 0.5, lo cual puede alcanzarse a media mañana, después de unas 14 horas de incubación . Poner los matraces por una hora a 39 °C, en un baño con buen control de temperatura.
3. Después de termoinducir, tomar muestras alícuotas de 4 ml para aplicar el choque térmico.
4. Como tiempo 0, tomar 100 µl del primer tubo de 4 ml, y hacer tres diluciones decimales (Las diluciones se hacen en 900 µl de agua en los que se ponen 100 µl de cultivo después de aplicar vortex. Platear por duplicado 50 ml de la última dilución.
5. El choque térmico se aplica por 3, 6, 10, 15 y 20 minutos (más el control 0 después de termoinducir). A 50 °C, controlando muy bien el tiempo y la temperatura.
6. Colectar los tubos y ponerlos en hielo, después del tratamiento antes de platear todos los tratamientos.
7. Se toman 100 µl de cada tratamiento, se hacen diluciones decimales. Tratamientos resistentes, como el control silvestre, requieren de 3 diluciones decimales, pero para el control termosensible, con dos diluciones basta.
8. Platear 50 µl en medio sólido (YPGAde), por duplicado, e incubar a 25 °C por 3 o 4 días, hasta que las colonias se puedan contar.

Día 6 ó 7

9. Para cada repetición, hacer el conteo de sobrevivencia antes y después del choque térmico, sacar desviaciones estándar y graficar (Abscisa: porciento de sobrevivencia (0-1); ordenada: Tiempos de choque térmico a 50 °C: 0, 3, 6, 10, 15 y 20 minutos de choque.

Si el experimento esta bien hecho, usando la cepa W3031-A como control silvestre, debe de sobrevivir entre un 50 y un 100 porciento de las células después de 20 minutos de choque térmico. La sobrevivencia en las termosensibles depende de la mutante con que se este trabajando (*tps1*Δ, *hsp104*Δ, etc.)

METODO 6.

EXPERIMENTO DE CHOQUE OSMOTICO CON LEVADURA

1. Se inoculó un cultivo de levadura de 2 ml de medio mínimo SG(-his) con 20 μl de un cultivo saturado de 2 días , y se pone a crecer a 25 °C y agitación rotativa hasta que alcanza la absorbencia promedio de $A_{600}=0.4-0.6$, es decir en fase exponencial.
2. Se mide la absorbencia, y en una placa para ELISA estéril, con pocillos de 200 μl, se lleva la absorbencia $A_{600} =0.1$, en el primer pocillo, añadiendo medio mínimo para diluir.
3. Hacer 5 diluciones, colocando 80 μl de medio SG(-his) en los pocillos de cada hilera, y luego, añadir 20 μl del primer pocillo (absorbencia 0.1), mezclar con la micropipeta, tomar 20 μl y pasarlos al siguiente y así sucesivamente. Así, se hacen diluciones 1:5, y en la última habrá menos de 10 colonias que podrán contarse.
4. Con la pipeta de 20 μl, tomar 4 μl de cada pocillo, y colocar las gotas cuidadosamente sobre el medio sólido de prueba (en éste caso YPG+ NaCl ó YPG+ Sorbitol) bajo la cual se coloca una plantilla cuadrículada para conservar la línea para cada tratamiento. Se debe trabajar en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación.
5. Dejar que las gotas se absorban, y poner a incubar a 25 °C por 3-4 días, hasta que se aprecie claramente el crecimiento, y las diferencias entre tratamientos. Tomar foto o tomar una imagen de la caja con el escáner
6. Para cada mutante, e incluso para cada cepa silvestre, hay que encontrar el nivel de estrés que se va a probar , de tal forma que puedan apreciarse claramente las diferencias entre las mutantes y las silvestres. En nuestro caso, se encontró que las diferencias se apreciaban más claramente con 1.6 M de sorbitol ó 0.9 M de NaCl , en medio YPG.

METODO 7.

AISLAMIENTO DE cDNA de *AiTPS1* de *Arabidopsis thaliana* por RT-PCR.

Se utilizaron 5 µg de RNA total aislado de plántulas de *A. thaliana* cv. Columbia creciendo durante 2 semanas bajo agitación en medio líquido suplementado con NaCl 100 mM. Con los 5 µg se hizo una reacción de transcripción inversa empleando la transcriptasa reversa Superscript II de Gibco-BRL, siguiendo las instrucciones acompañadas con la enzima, empleando como iniciador a un oligo dT de Amersham (dT 25 primer). Después, y antes de hacer la reacción de PCR, se eliminó el RNA templado con Ribonucleasa H. De los 20 ml resultantes de la reacción de síntesis del cDNA de cadena sencilla, se tomaron 2 µl para la reacción de PCR.

La reacción de PCR se hizo utilizando los primers Ath/TPS-5', Ath/TPS-3' y Ath/TPS-AN5' (ver lista de iniciadores anexa). Este último para obtener al cDNA sin las primeras 300 pares de bases y así deletar el extremo amino de la proteína.

La reacción de amplificación se hizo con las temperaturas de 94 °C, 1 min./50 °C, 1 min./72 °C, 2 min.; por 40 ciclos. Al inicio se dio un ciclo de 94 °C, 3 min. y al final, 72 °C por 10 min. La amplificación se hizo con DNA polimerasa Expand de Boehringer, para asegurar alta fidelidad.

Parte de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 0.7 % y la banda resultante del tamaño deseado, se eluyó y se reamplificó de nuevo por PCR para contar con suficiente DNA para hacer las clonaciones posteriores y para eliminar bandas inespecíficas amplificadas en la primera ocasión.

METODO 8.

PRIMERS Y CONDICIONES DE PCR EMPLEADAS.

A continuación se describen las condiciones de PCR. A las condiciones de PCR señaladas, se le añadieron 3 minutos a 94 °C de entrada para asegurar una eficiente desnaturalización inicial del DNA, y 10 minutos a 72 °C de salida o extensión adicional, para terminar la amplificación de posibles productos incompletos.

SITPS1 (Producto amplificado)

Forward (5' TPS-SI/pBIN): 5'-CATGCCATGGCTATGCCTCAGCCTTACC -3'

Reverse (Universal): 5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3'

Templado: 100 ng de la clona pSK::*SITPS1*.

Amplificación: Para clonar el gen completo y no alterar el sitio ATG original, se añadió un sitio *Nco I*, en fase con el verdadero ATG. Por lo tanto, se añadieron los aminoácidos met y ala en 5'. Entonces, a diferencia del *SITPS1* que codifica 994 aa (2982 bp), en este caso serían 996 aa (2988 bp).

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 47 °C, 1 min.; 72 °C, 2 min. 35 ciclos.

Δ NH2-SITPS1 (o Δ NSITPS1)

Forward (SLTPS-100): 5'-CATGCCATGGGTCGAGGCCAGCGGTTGC -3'

Reverse (Universal): 5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3'

Templado: 10 ng de pSK::*SITPS1*.

Amplificación: 2685 bp ó 895 aa

Δ COOH-SITPS1 (o SITPS1 Δ C)

Con un sitio *BamH I* o *Nco I* en el forward y *Kpn I* o *Not I* en el reverse.

Para clonar en pSAL4 con *BamH I*-*Kpn I* (*CUP1*+*SITPS1* Δ C):

Forward (CUPTPS5'): CGCGGATCCCATTACCGACATTTGG -3'

Reverse (TPS600-3'): 5'-CGGGGTACCTCACTTTGACTCCGAGTACTTTGC -3'

Para clonar en pRS6 (con *Nco* I-*Not* I):

Forward (5' TPS-SI/pBIN): 5'-CATGCCATGGCTATGCCTCAGCCTTACC -3'

Reverse (TPSSI(3DCOOH)):

5'-ATAGTTTTGCGGCCGCTCACTTTGACTCCGAGTACTTTGCGAC -3'

Templado: 20 ng de pSAL4::*SITPS1*.

Amplificación: 602 aa ó 1806 bp.

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 50 °C, 1 min.; 72 °C, 2 min. 30 ciclos.

Δ NH2-SITPS1- Δ COOH (o Δ NSITPS1 Δ C)

Con un sitio *Nco* I en forward y *Kpn* I o *Not* I en reverse

Forward (SLTPS-100): 5'-CATGCCATGGGTCGAGGCCAGCGGTTGC -3'

Reverse (TPS600-3'): 5'-CGGGGTACCTCACTTTGACTCCGAGTACTTTGC -3'

Reverse (TPSSI)3DCOOH):

5'-ATAGTTTTGCGGCCGCTCACTTTGACTCCGAGTACTTTGCGAC -3'

Templado: 20 ng. de pSAL4::*SITPS1*

Amplificación: 501 aa ó 1503 bp.

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 55 °C, 1 min.; 72 °C. 35 ciclos.

SITPP (Δ NH2- Δ TPS1 ó extremo carboxilo)

Con sitios *Xho* I y *Nco* I en el forward

Forward (SITPP-5'): 5'-CCGCTCGAGCCATGGTGCATATTCCGCCTCAATTGCC -3'

Reverse (Universal): 5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3'

Templado: 10 ng de pSK::*SITPS1*

Amplificación: 396 aa ó 1188 bp.

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 50 °C, 1 min.; 72 °C, 2 min. 30 ciclos.

SI-NH2 (extremo amino)

Con sitios *Xho* I y *Bam*H I en el forward y *Nco* I en el reverse.

Forward (TPSSI-5N(XB)): 5'-CCGCTCGAGGATCCTATGCCTCAGCCTTACCC -3'

Reverse (TPSSI-3N(N)): 5'-GCATGCCATGGAAATCTTGGACGGCTC -3'

Templado: 100 ng de pRS6::*SITPS1*

Amplificación: 100 aa ó 300 bp.

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 48 °C, 1 min.; 72 °C, 2 min. 40 ciclos.

ScTPS1

Con sitios *Xho* I en el forward y *Kpn* I o *Not* I en los reverse

Forward (TPS1-5'): 5'-CCGCTCGAGGGTACTCACATACAGAC -3'

Reverse (TPS1-3'): 5'-CGGGGTACCGCATCGGGTTCATCAG -3'

Reverse (TPS1-3Sc): 5'-ATAGTTTTGCGGCCGCATCGGGTTCATCAG -3'

Templado: 100 ng. banco genómico de levadura en el vector YCp50.

Programa: 94 °C, 1 min/ 48 °C, 1 min/ 72 °C, 2 min., 35 ciclos.

ScTPS2

Con sitios *Xho* I en el forward y *Kpn* I en el reverse

Forward (TPS2-5'): 5'-CCGCTCGAGCACTATTTCTGTGCCG -3'

Reverse (TPS2-3'): 5'-CGGGGTACCATGGTGGGTTGAGAC -3'

Templado: 100 ng banco genómico de levadura en el vector YCp50.

Programa: 94 °C, 1 min/ 48 °C, 1 min/ 72 °C, 2 min., 35 ciclos.

AtTPS1

Con los sitios *Nco* I en forward y *Not* I en reverse

Forward (Ath/TPS-5'): 5'-CATGCCATGGCTGGAAATAAGTACAACACTGC -3'

Reverse (Ath/TPS-3'):

5'-ATAGTTTTGCGGCCGCTTAAGGTGAGGAAGTGGTGTCAG-3'

Templado: 1/10 de la reacción de síntesis de ss cDNA (2 μ l), a partir de RNA total de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, y después se eluyó la banda y se reamplificó de nuevo.

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 48 °C, 1 min.; 72 °C, 2 min. 40 ciclos.

Δ NAAtTPS1

Con lo sitios *Nco* I en forward y *Not* I en reverse

Forward (Ath/TPS-AN5'):

5'-CATGCCATGGCTTATAATAGGCAACGACTACTTGTAGTG -3'

Reverse (Ath/TPS-3'):

5'-ATAGTTTTGCGGCCGCTTAAGGTGAGGAAGTGGTGTCAG-3'

Templado: 1/10 de la reacción de síntesis de ss cDNA (2 μ l), a partir de RNA total, y después se eluyó la banda y se reamplificó de nuevo.

Condiciones de PCR: 94 °C, 1 min.; 50 °C, 1 min.; 72 °C, 2 min. 40 ciclos.

METODO 9.

TRANSFORMACION DE *E. coli* MEDIANTE ELECTROPORACION

1. Por la mañana inocular 100 ml de medio LB en un matraz de 100 ml con un 1 ml de un cultivo overnight de *E. coli* (cepa DH5 α).
2. Incubar a 37 °C con agitación vigorosa, hasta que el cultivo alcance una densidad A₆₀₀ de 0.6.
3. Enfriar con hielo al cultivo, por 30 minutos. A partir de aquí es crítico el mantener las células frías, bajo 4 °C.
4. Colectar las células mediante centrifugación a 4000 g por 15 minutos, a 4 °C y luego decantar el sobrenadante.
5. Lavar 2 veces con 50 ml de glicerol al 10%, pre-enfriado en hielo.
6. El pellet resultante después de dos lavados, resuspenderlo en 0.2 ml de GYT (glicerol 10%, extracto de levadura, 0.125% y bacto triptona, 0.25%) pre-enfriado en hielo o en el refrigerador.
7. Preparar muestras alícuotas de 40 μ l en tubos eppendorf pre-enfriados, y las células ahora competentes pueden emplearse de inmediato, o bien pueden congelarse en hielo seco, o metiéndolas al ultracongelador para su uso posterior.
8. Para electroporar, se añade el DNA a las células (1-2 μ l, de 1-100 ng), se mezcla con la punta de la pipeta y luego se transfiere a una cubeta pre-enfriada de electroporación de 0.1 ó 0.2 cm de ancho. Mantener la celda en el hielo hasta que se electropore.
9. La electroporación se lleva a cabo aplicando los siguientes parámetros: 25 μ F, 200 ohms y 2.5 Kv (para celdas de 0.2 cm) ó 1.8 Kv para celdas de 0.1 cm.
10. Después, se añade a la cubeta 1 ml de medio SOC (bacto triptona, 2%; extracto de levadura, 0.5%; NaCl, 10 mM; MgSO₄, 10 mM y MgCl₂, 10 mM), y se recuperan las células con una micropipeta azul, pasándolas a un tubo de ensayo chico.
11. Incubar a 37 °C por una hora para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina.
12. Tomar alícuotas para platear en cajas petri con medio LB selectivo (con ampicilina, 50 μ g/ml; o carbenicilina, 100 μ g/ml), e incubar overnight a 37 °C, después de lo cual se podrán apreciar las colonias transformadas resistentes a ampicilina.

La electroporación es el método a elegir cuando se desea maximizar la eficiencia de transformación (10^8 - 10^{10} transformantes por μg de DNA) al hacer genotecas en plásmidos, o cuando se desean recuperar clonas resultantes de ligaciones de baja eficiencia, como cuando se clona un fragmento de PCR con extremos romos.

Basado en:

Tung, W.L., and K.-C. Chow. 1995. A modified medium for efficient eletrotransformation of *E. coli*. TIG 11: 128-129.

METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR DE RUTINA

Estos se efectuaron basándonos fundamentalmente en alguno de los manuales siguientes:

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Stuhl. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, NY.

Kaiser, Ch., S. Michaelis and A. Mitchell. 1994. Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sambrock, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Serrano, R. 1993. Métodos de Bioquímica y Biología Molecular. Mimeógrafo del Departamento de Biotecnología de la Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia, España.

ANEXO DE CONSTRUCCIONES EMPLEADAS.

A continuación se anexan las figuras (19,20, 21 y 22) de la estrategia para clonar *SITPS1* en pSAL4, así como las clonas que se utilizaron para los experimentos reportados en éste trabajo.

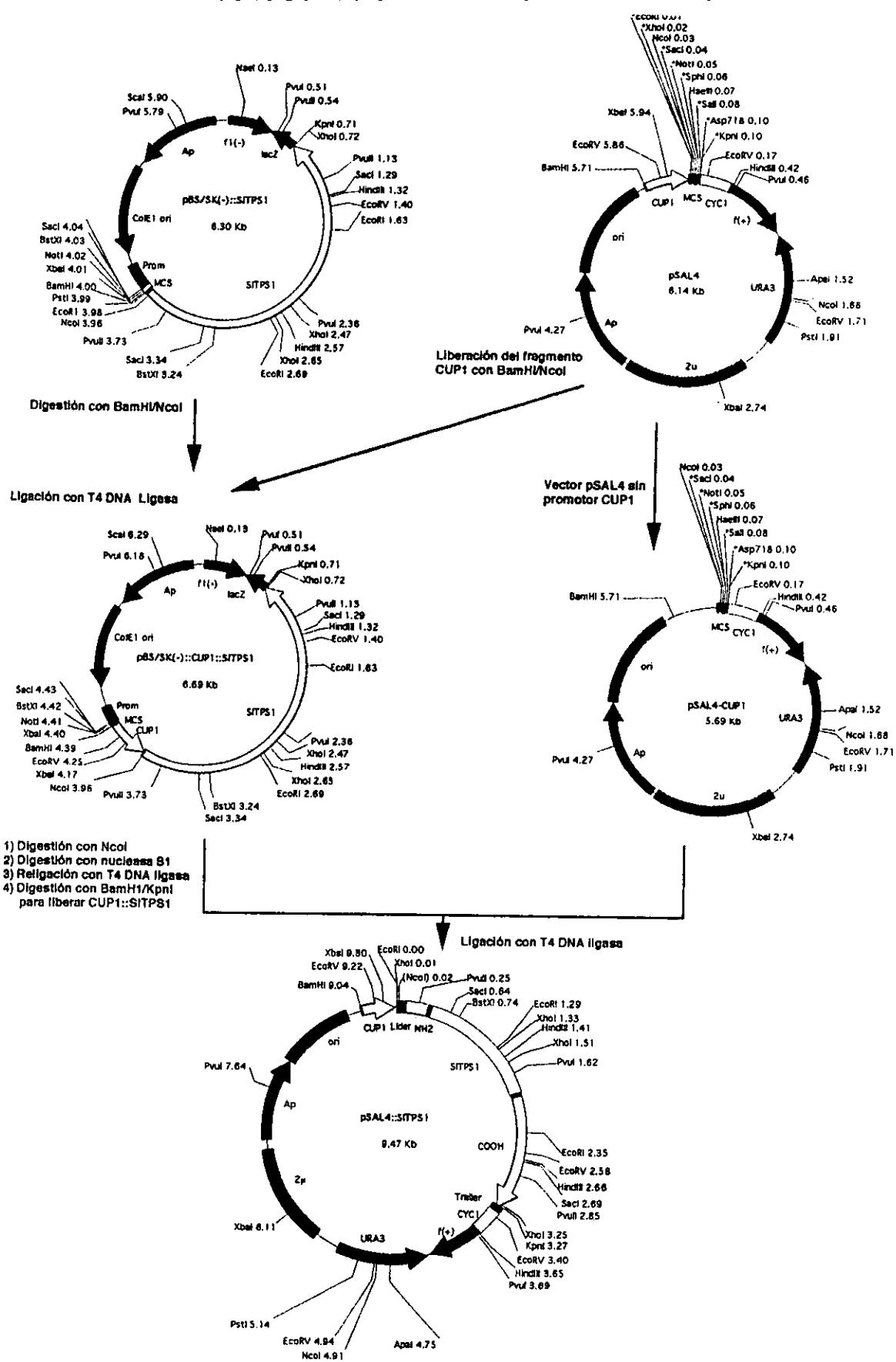


Figura 19. Estrategia de clonación de *SITPS1* en pSAL4

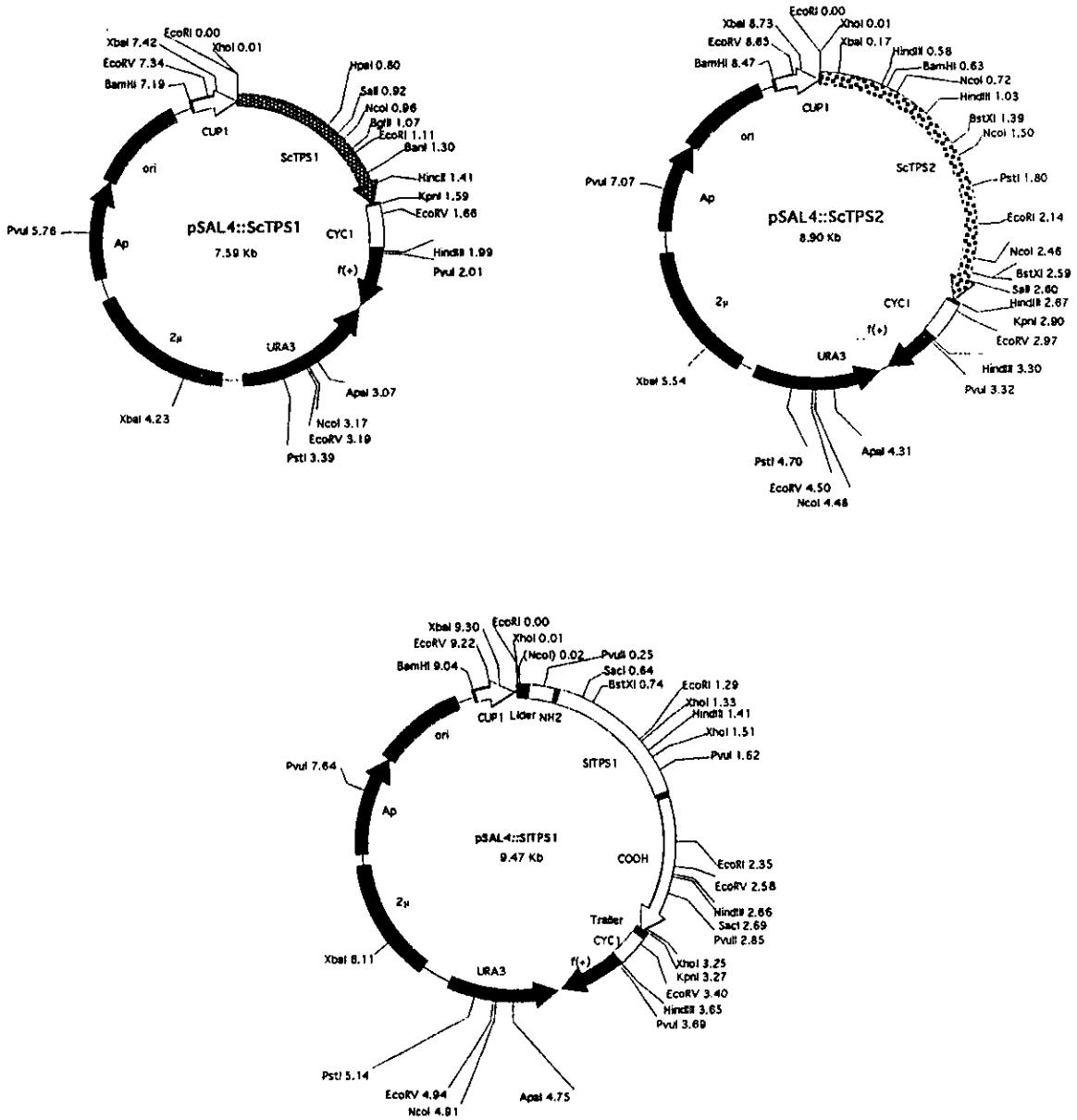


Figura 20. Clonas de levadura y *Selaginella* en el vector pSAL4

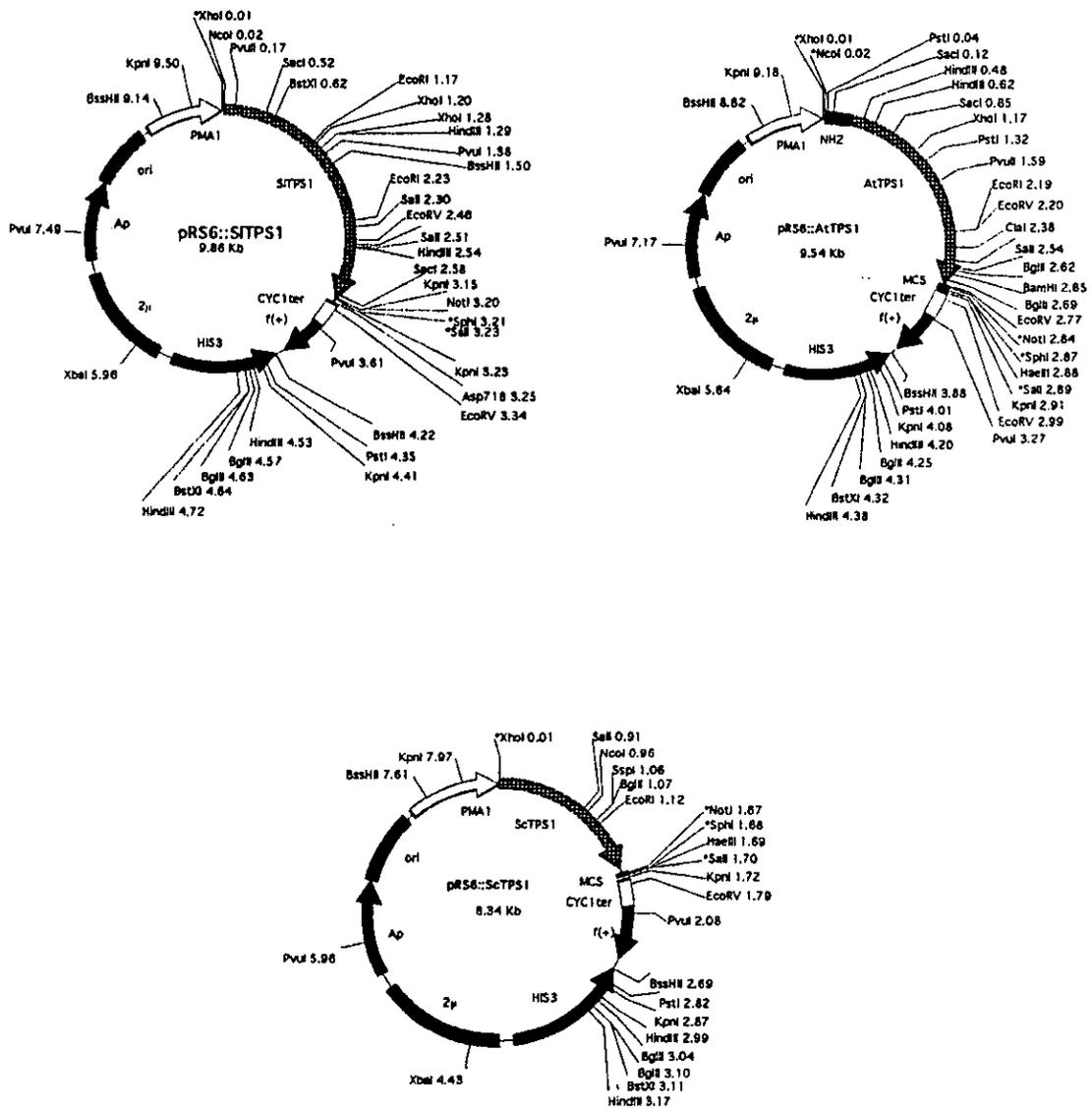


Figura 21. Clonas TPS en el vector pRS6

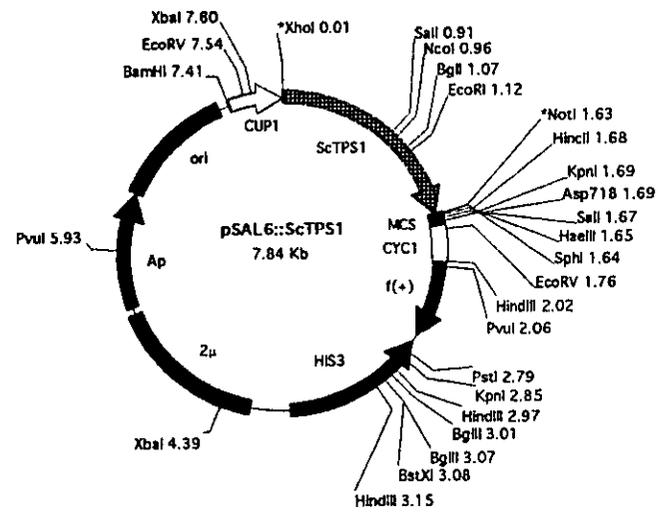
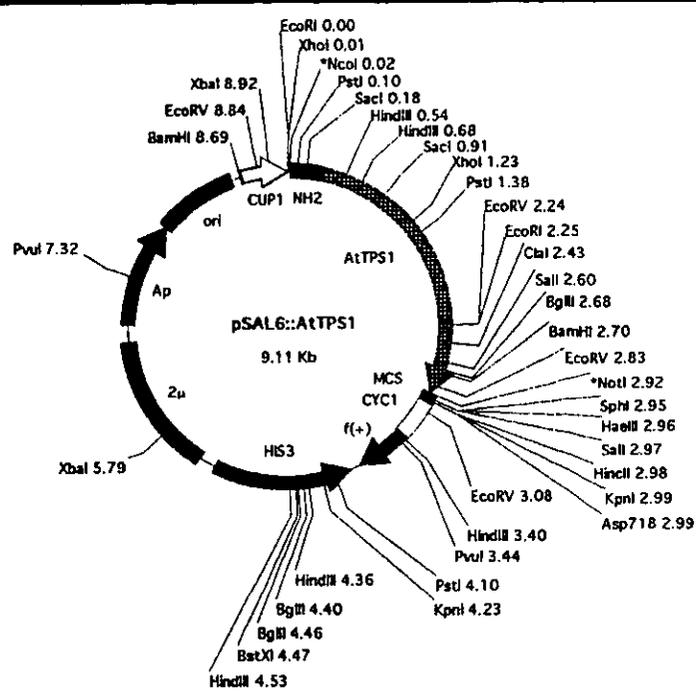


Figura 22. Clonas *TPS* en el vector pSAL6

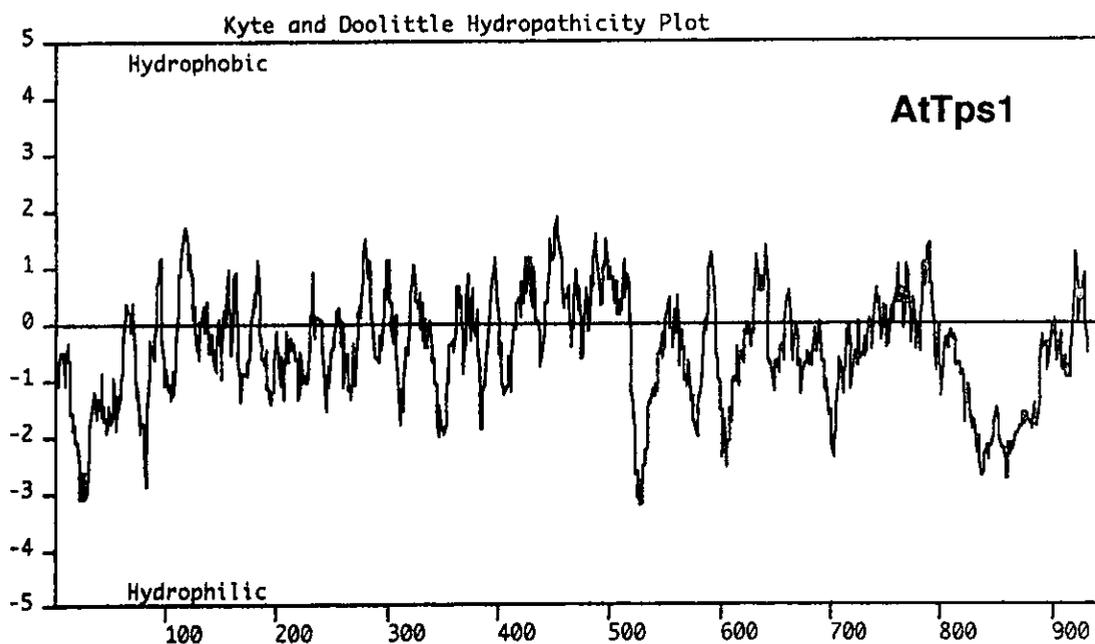
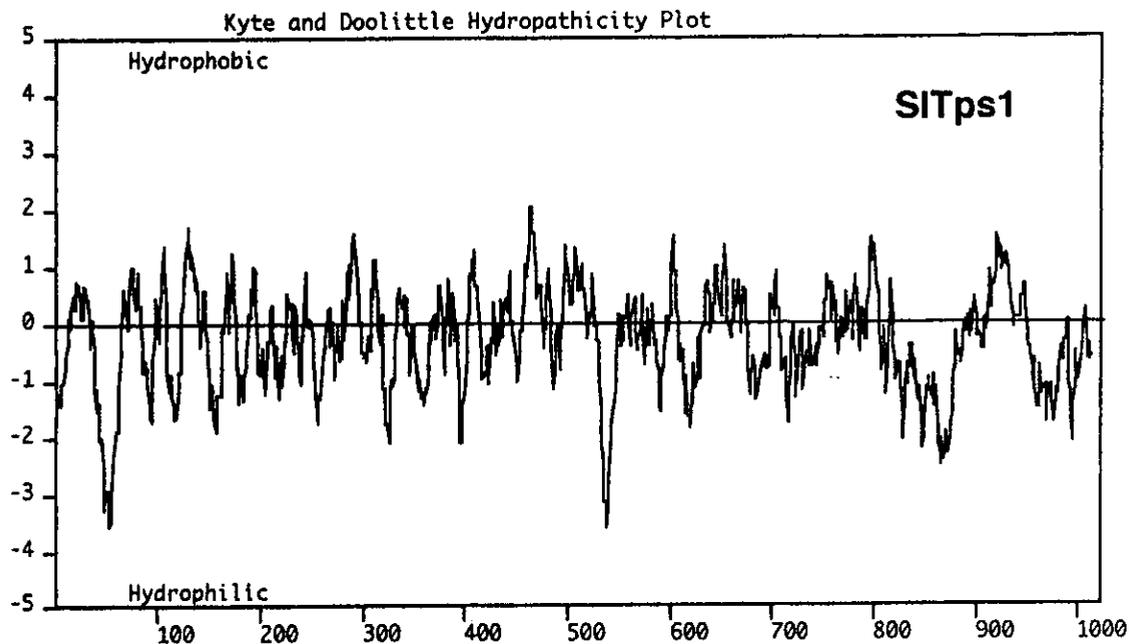


Figura 23. Perfiles hidropáticos de SITps1 y AtTps1. Los perfiles se hicieron promediando 12 aa por punto.

BIBLIOGRAFIA

- Aeschbacher, R.A., J. Muller, T. Boller and A. Wiemken. 1999. Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. GMTRE1 is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiol.* 119: 489-495.
- Aisaka, K. and T. Masuda. 1995. Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea*. *FEMS Lett.* 131: 47-51.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Third edition. Garland Publishing, Inc., New York and London.
- Alderson, A., P.A. Sabelli, J.R. Dickinson, D. Cole and M. Richardson. 1991. Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon catabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3736-3740.
- Anderson, J.A., S.S. Huprikar, L.V. Kochian, W.J. Lucas and R.F. Gaber. 1992. Functional expression of a probable *A. thaliana* potassium channel in *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3736-3740.
- Arguelles, J.C., K. Mbonyi, L. Van Aelst, M. Vanhalewin, A.W.H. Jans and J.M. Thevelein. 1990. Absence of glucose-induced cAMP signaling in the *Saccharomyces cerevisiae* mutants *cat1* and *cat3* which are deficient in derepression of glucose-repressible proteins. *Arch. Microbiol.* 154: 199-205.
- Attfield, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotech.* 15: 1351-1357.
- Bell, W., P. Klaassen, M. Ohnacker, T. Boller, M. Herweijer, P. Schoppink, P. Van der Zee and A. Wiemken. 1992. Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.* 209: 951-959.
- Bell, W., W. Sun, S. Hohmann, S. Wera, A. Reinders, C. de Virgilio, A. Wiemken and J.M. Thevelein. 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol Chem.* 273: 33311-33319.
- Beullens, M., K. Mbonyi, L. Geerts, D. Gladines, K. Detremmerie, A.W.H. Jans and J.M. Thevelein. 1988. Studies on the mechanism of the glucose-induced cAMP signal in glycolysis and glucose repression mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 172: 227-231.
- Bhalerao, R., K. Salchert, L. Bakó, L. Okresz, L. Szabados, T. Muranaka, Y. Machida, J. Schell and C. Koncz. 1999. Regulatory interactions of PRL1 WD protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5322-5327.

- Blázquez, M.A. and C. Gancedo. 1995. Mode of action of the *qcr9* and *cat3* mutations in restoring the ability of *Saccharomyces cerevisiae tps1* mutants to grow on glucose. *Mol Gen. Genet.* 249: 655-664.
- Blázquez, M.A., E. Santos, C.L. Flores, J.M. Martínez-Zapater, J. Salinas and C. Gancedo. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* 13: 685-689.
- Blázquez, M.A. and C. Gancedo. 1994. Identification of extragenic suppressors of the *cif1* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 25: 89-94.
- Boy-Marcotte, E., D. Tadi, M. Perrot, H. Bochourie and M. Jacquet. 1996. High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 142: 459-467.
- Breitenbach-Schmitt, I., H.D. Schmitt, J. Heinisch and F.K. Zimmermann. 1984. Genetic and physiological evidence for the existence of a second glycolytic pathway in yeast parallel to the phosphofructokinase-aldolase reaction sequence. *Mol. Gen. Genet.* 195: 536-540.
- Burke, M.J. 1985. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. pp. 358-363. In: *Membranes, metabolism and dry organisms*. Leopold, A.C. (Ed.). Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y.
- Cabib, E. and F. Leloir. 1958. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* 231: 259-275.
- Cannon, J.F., J.R. Pringle, A. Fiechter and M. Khalil. 1994. Characterization of glycogen-deficient *glc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136: 485-503.
- Clegg, J.S. 1985. The physical properties and metallic status of *Artemia* cysts at low water content: The 'water replacement hypothesis. pp. 169-187. In: *Membranes, metabolism and dry organisms*. Leopold A.C. (Ed.). Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y.
- Colaço, C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder and B. Roser. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology* 10: 1007-1011.
- Colombo, S., P. Ma, L. Cawenberg, J. Winderickx, M. Crauwels, A. Teunissen, D. Nauwelaers, J.H. de Winde, M.F. Gorwa, D. Colavizza and J.M. Thevelein. 1998. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 3326-3341.
- Crawels, M., M.C.V. Donaton, M.B. Pernambuco, J. Winderickx, J.H. de Winde and J.M. Thevelein. 1997. The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* 143: 2627-2637.

- Crowe, J.H., F.A. Hoekstra and L.M. Crowe. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- Crowe, J.H., J.F. Carpenter, L.M. Crowe and T.J. Anchordoguy. 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors?. A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiol.* 27: 219-231.
- Crowe, J.H., L.M. Crowe and D. Chapman. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223: 701-703.
- Dai, N., A.S. Schaffer, M. Petreikov and D. Granot. 1995. *Arabidopsis thaliana* hexokinase cDNA isolated by complementation of yeast cells. *Plant Physiol.* 108: 879-880.
- Dai, N., A. Schaffer, M. Petreikov, Y. Shahak, Y. Giller, K. Ratner, A. Levine and D. Granot. 1999. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- DasSarma, S., E. Tischer and H.M. Goodman. 1986. Plant glutamine synthetase complements a *glnA* mutation in *E. coli*. *Science* 232: 1242-1244.
- De Virgilio, C., N. Burckert, T. Boller and A. Wiemken. 1991. Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp104 and in the absence of protein synthesis. *FEBS Lett.* 288: 86-90.
- De Virgilio, C., P. Piper, W. Bell, P. Jenö, T. Boller and A. Wiemken. 1993. Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of the trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.* 272: 315-323.
- De Virgilio, C., T. Hottiger, J. Domínguez, T. Boller and A. Wiemken. 1994. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 219: 179-186.
- DeVit, M.J., J.A. Wadle and M. Johnston. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.* 8: 1603-1618.
- De Winde J.H., J.M. Thevelein and J. Winderickx. 1997. From feast to famine: adaptation to nutrient depletion in yeast. (Chapter 1). pp. 7-52. S. Hohmann and W.H. Mager (eds). *Yeast stress responses*. Landes Bioscience. USA.
- De Winde, J.H., M. Crawels, S. Hohmann, J.M. Thevelein and J. Winderickx. 1996. Differential requirements of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem.* 241: 633-643.

- Ehness, R., M. Ecker, D.E. Godt and T. Roitsch. 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825-1841.
- Elbein, A.D. 1974. The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30: 227-256.
- Eleutherio, E.C.A., P.S. de Araujo and A.D. Panek. 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 263-266.
- Elliot, B., R.S. Haltiwanger and B. Futcher. 1996. Synergy between trehalose and Hsp104 for thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 923-933.
- Entian, K.-D. 1977. Lack of carbon catabolite inactivation in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with reduced hexokinase activity. *Mol. Gen. Genet.* 158: 201-210.
- Fernández, R., P. Herrero, E. Fernández, M.T. Fernández, Y.S. López-Boado, and F. Moreno. 1988. Autophosphorylation of yeast hexokinase PII. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2493-2498.
- Fu, H.-H., and S. Luan. 1998. AtKUP1: A dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 63-73.
- Gamo, F.-J., M.J. Lafuente and C. Gancedo. 1994. The mutation *DGT1-1* decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176: 7423-7429.
- Gancedo, C. and R. Serrano. 1989. Energy-yielding metabolism. *The Yeast*. vol. 3. 2nd. edition. pp. 205-259. Academic Press.
- Gancedo, J.M. 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 206: 297-313.
- Gancedo, J.M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Rev.* 62: 334-361.
- Goddijn, O.J.M., and J. Pen. 1995. Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol.* 13: 379-387.
- Goddijn, O. and S. Smeekens. 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14: 143-146.
- Goddijn, O.J., T. C. Verwoerd, E. Voogd, R.W.H.H. Krutwagen, P.T.H.M. de Graaf, J. Poels, K. van Dun, A.S. Ponstein, B. Damm and J. Pen. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 113: 181-190.
- Goddijn, O.J.M. and K. van Dun. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Pl. Sci.* 4: 315-319.

Gorner, W., E. Durschschlag, M.T. Martínez-Pastor, F. Estruch, G. Ammerer, B. Hamilton, H. Ruis and Ch. Schuller. 1998. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2 is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12: 586-597.

Halford, N.G. and D.G. Hardie. 1998. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37: 735-748.

Halford, N.G., C. P. Purcell and D.G. Hardie. 1999. Is hexokinase really a sugar sensor in plants?. *Trends Plant Sci.* 4: 117-120.

Hall, D.D., D.D. Markwardt, F. Parviz and W. Heideman. 1998. Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 4370-4378.

Hamilton, A.J., M. Bouzayen and D. Grierson. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7434-7437.

Hardie, D.G., D. Carling and M. Carlson. 1998. The AMP-activated/Snf1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 821-855.

Hazell, B.W., H. Nevalainen and P.V. Attfeld. 1995. Evidence that the *Saccharomyces cerevisiae* *CIF1* (*GGS1/TPS1*) gene modulates heat shock response positively. *FEBS Lett.* 377: 457-460.

Hazell, B.W., S. Kletsas, H. Nevalainen and P.V. Attfeld. 1997. Involvement of *CIF1*(*GGS1/TPS1*) in osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 414: 353-358.

Herbers, K., P. Meuwly, W.B. Frommer, J.P. Métraux and U. Sonnewald. 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell* 8: 793-803.

Hirata, D., S. Harada, H. Namba and T. Miykawa. 1995. Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet.* 249: 257-264.

Hirimburegama, K., P. Durnez, J Keleman, E. Oris, R. Vergauwen and H. Mergelsberg and J.M. Thevelein. 1992. Nutrient-induced activation of trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not involved as second messenger. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2035-2043.

Hohmann, S., K. Huse, E. Valentin, K. Mbonyi, J.M. Thevelein and F. K. Zimmermann. 1992. Glucose-induced regulatory defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *byr1* growth initiation mutant and identification of *MIG1* as a partial suppressor. *J. Bacteriol.* 174: 4183-4188.

- Hohmann, S., M.J. Neves, W. de Koning, R. Alijo, J. Ramos and J.M. Thevelein. 1993. The growth and signaling defects of the *ggs1 (fdp1/byp1)* deletion mutant on glucose are suppressed by a deletion of the gene encoding hexokinase PII. *Curr. Genet.* 23: 281-289.
- Hohmann, S., P. Van Dijck, K. Luyten and J.M. Thevelein. 1994. The *byp1-3* allele of the *Saccharomyces cerevisiae* *GGSI/TPS1* gene and its multi-copy suppressor tRNA GLN (CAG): Ggs1/Tps1 protein levels restraining growth on fermentable sugars and trehalose accumulation. *Curr. Genet.* 26: 295-301.
- Hohmann, S., P. Van Dijck, K. Luyten and J.M. Thevelein. 1994. The *byp1-3* allele of the *Saccharomyces cerevisiae* *GGSI/TPS1* gene and its multi-copy suppressor tRNAGLN(CAG): Ggs1/Tps1 protein levels restraining growth on fermentable sugars and trehalose accumulation. *Curr. Genet.* 26: 295-301.
- Hohmann, S., W. Bell, M.J. Neves, D. Valckx and J.M. Thevelein. 1996. Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and-independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Mol. Microbiol.* 20: 981-991.
- Holmstrom, K.-O., E. Mantyla, B. welin, A. Mandal, E.T. Palva, O.E. Tunnela and J. Londesborough. 1996. Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683-684.
- Hottiger, T., P. Schmutz and A. Wiemken. 1987. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169: 5518-5522.
- Hounsa, Ch-G., E.V. Brandt, J. Thevelein, S. Hohmann and B.A. Prior. 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.* 144: 671-680.
- Iturriaga, G., J.M. Thevelein, P. Van Dijck, J.O. Mascorro-Gallardo and Ch. Van Vaeck. 1998. Specific genetic modification of the activity of trehalose-6-phosphate synthase and expression in a homologous and heterologous environment. Pat. no. 98203469.6-2106. The Hage, Netherlands.
- Jang, J.-Ch. and J. Sheen. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 2: 208-214.
- Jang, J.-Ch. and J. Sheen. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665-1679.
- Jang, J.-Ch., P. León, L. Zhou and J. Sheen. 1997. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9: 5-19.
- Jiang, Y., C. Davis and J.R. Broach. 1998. Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. *EMBO J.* 17: 6942-6951.

Jiang, Y. and M. Carlson. 1996. Glucose regulates protein interactions within the yeast Snf1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10: 3105-3115.

Johnston, M. 1999. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends in Genet.* 15: 29-33.

Kaasen, I., J. McDougall and A.R. Strom. 1994. Analysis of the *otsBA* operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the *OtsA* and *OtsB* proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene* 145: 9-15.

Kanayama, Y., D. Granot, N. Dai, M. Petreikov, A. Schaffer, A. Powell and A.B. Bennett. 1998. Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation. *Plant Physiol.* 117: 85-90.

Kataoka, T., S. Powers, S. Cameron, O. Fasano, M. Goldfarb, J. Broach and M. Wigler. 1985. Functional homology of mammalian and yeast *RAS* genes. *Cell* 40: 19-26.

Keleher, C.A., M.J. Reed, J. Schultz, M. Carlson and A.D. Johnston. 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68 68: 708-719.

Kim, J., P. Alizadeh, T. Harding, A. Hefner-Gravink and D.L. Klionsky. 1996. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1563-1569.

Kim, E.J., J.M. Kwak, N. Uozumi and J.I. Schroeder. 1998. *AtKUP1*: An *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell* 10: 51-62.

Ko, C., H. Liang and R.F. Gaber. 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 638-648.

Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-40.

Koster, K.L. and A.C. Leopold. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88: 829-832.

Kraakman, L., K. Lemaire, P. Ma, A.W. Teunissen, M.C. Donaton, P. Van Dijck, J. Winderickx, J.H. de Winde and J.M. Thevelein. 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32: 1002-1012.

Lee, MG. and P. Nurse. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327: 31-35.

Li, F.N. and M. Johnston. 1999. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupled glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* 16: 5629-5638.

Londesborough, J. and O.E. Vuorio. 1993. Purification of trehalose synthase from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.* 2: 841-848.

Ludin, K., R. Jiang and M. Carlson. 1998. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6245-6250.

Luyten, K., J. Albertyn, W.F. Skibbe, B.A. Prior, J. Ramos, J.M. Thevelein and S. Hohmann. 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 14: 1360-1371.

Ma, H., L.M. Bloom, Ch.T. Walsh and D. Botstein. 1989. The residual enzymatic phosphorylation activity of hexokinase II mutants is correlated with glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5643-5649.

Ma, H. and D. Botstein. 1986. Effects of null mutations in the hexokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae* on catabolite repression. *Mol. Cell. Biol.* 6: 4046-4052.

Ma, P., S. Wera, P. Van Dijck and J.M. Thevelein. 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.

Mackenzie, K.F., K.K. Singh and A.D. Brown. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeast: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1661-1666.

Marchler, G., C. Schuller, G. Adam and H. Ruis. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12: 1997-2003.

Maréchal, L. and E. Belcopitow. 1971. Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*: I. partial purification and some properties of trehalose phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 247: 3223-3228.

Maruta, K., K. Hattori, T. Nakada, M. Kubota, T. Sugimoto, M. Kurimoto. 1996. Cloning and sequencing of trehalose synthase biosynthesis genes from *Arthobacter sp* Q36. *Biochim. Biophys. Acta* 1289: 10-13.

Mbonyi, K., L. Van Aelst, J.C. Arguelles, A.W.H. Jans and J.M. Thevelein. 1990. Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4518-4523.

McDougall, J., I. Kaasen and A.R. Strom. 1993. A yeast gene for trehalose-6-phosphate synthase and its complementation of an *Escherichia coli* otsA mutant. FEMS Microbiol. Letters 107: 25-30.

Mewes, H.W., K. Albermann, M. Bahr, D. Frishman, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S.G. Oliver, F. Pfeiffer and . Zollner. 1997. Overview of the yeast genome. Nature 387: 7-65.

Minet, M., M.E. Dufour and F. Lacroute. 1992. Complementation of *S. cerevisiae* auxotrophic mutants by *A. thaliana* cDNAs. Plant J. 2: 417-422.

Moorhead, G., P. Douglas, V. Cotelle, J. Harthill, N. Morrice, S. Meek, U. Deiting, M. Stitt, M. Scarabel, A. Aitken and C. MacKintosh. 1999. Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. Plant J. 18: 1-12.

Muller, J., A. Wiemken and R. Aeschbacher. 1999. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. Plant Sci. 147: 37-47.

Muller, J., T. Boller and A. Wiemken. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. Plant Sci. 112: 1-9.

Muranaka, T., H. Banno and Y. Machida. 1994. Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible *SUC2* gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 14: 2958-2965.

Nakada, T., K. Maruta, K. Tsusaki, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto and Y. Tsujisaka. 1995. Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthrobacter sp.* Q36. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 2210-2214.

Neves, M.J., H.F. Terenzi, F.A. Leone and J.A. Jorge. 1994. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. thermoidea. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 17-19.

Nwaka, S., M. Kopp, M. Burgert, I. Deuchler, I. Kienle and H. Holzer. 1994. Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation?. FEBS Lett. 344: 225-228.

Ozcan, S. and M. Johnston. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. Mol. Cell. Biol. 15: 1564-1572.

Ozcan, S., J. Dover and M. Johnston. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 17: 2566-2573.

Ozcan, S., J. Dover, A.G. Rosenwald, S. Wolfl and M. Johnston. 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 12428-12432.

Paiva, C.L.A. and A.D. Panek. 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotech. Annu. Rev.* 2: 293-314.

Panek, A.C., P.S. de Araujo, V. Moura Neto and A.D. Panek. 1987. Regulation of the trehalose-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces*. I. Interconversion of forms by phosphorylation. *Curr. Genet.* 11: 459-465.

Pego, J.V., P.J. Weisbeek and S.C.M. Smeeckens. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via hexokinase-mediated step. *Plant Physiol.* 119: 1017-1023.

Pernambuco, M.B., J. Winderickx, M. Crauwels, G. Griffioen, W.H. Mager and J.M. Thevelein. 1996. Glucose-triggered signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: different requirements for sugar phosphorylation between cells grown on glucose and those grown on non-fermentable carbon sources. *Microbiol.* 142: 1775-1782.

Pilon-Smits, E.A.H., N. Terry, T. Sears, H. Kim, A. Zayed, S. Hwang, K. van Dun, E. Voogd, T.C. Verwoerd, R.W.H.H. Krutwagen and O.J.M. Goddijn. 1998. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol.* 152: 525-532.

Randez-Gil, F., P. Sanz, K.D. Entian and J.A. Prieto. 1998. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2940-2948.

Reifenberger, E., K. Freidel and M. Ciriacy. 1995. Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* 16: 157-167.

Reinders, A., N. Burckert, S. Hohmann, J.M. Thevelein, T. Boller, A. Wiemken and C. de Virgilio. 1997. Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. *Mol. Microbiol.* 24: 687-695.

Reinders, A., N. Burckert, T. Boller, A. Wiemken and C. de Virgilio. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes and Dev.* 12: 2943-2955.

Riesmeier J.W., L. Willmitzer and W.B. Frommer. 1992. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11: 4705-4713.

Romero, C., J.M. Bellés, J.L. Vayá, R. Serrano and F.A. Culiáñez-Macià. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201: 293-297.

- Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11: 12-17.
- Roser B. and C. Colaco. 1993. A sweeter way to fresher food. *New Sci.* 138: 26-28.
- Ruis, H. and C. Schuller. 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays* 17: 959-965.
- Ruis, H. 1997. Yeast stress responses: achievements, goals and a look beyond yeast. In *Yeast stress responses* (ed. S. Hohmann and W.H. Mager) pp. 231-247. Landes, Austin, TX.
- Sanz, P., A. Nieto and J.A. Prieto. 1996. Glucose repression may involve processes with different sugar kinases requirements. *J. Bacteriol.* 178: 4721-4723.
- Sauer, N. and J. Stolz. 1994. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*; expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. *Plant J.* 6: 67-77.
- Sauer, N. and R. Stadler. 1993. A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum*: cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J.* 4: 601-610.
- Schachtman, D.P. and J.I. Schroeder. 1994. Cloning, transport mechanism and localization of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370: 655-658.
- Schuller, C., J.L. Brewster, M.R. Alexander, M.C. Gustin and H. Ruis. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J.* 13: 4382-4389.
- Sentenac, H. N. Bonneaud, M. Minet, F. Lacroute, J.M. Salmon, F. Gaymard and C. Grignon. 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256: 663-665.
- Serrano, R. and J.M. Villalba. 1995. Expression and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*. *Methods Cell Biol.* 50: 481-495.
- Sheen, J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038.
- Sheen, J., L. Zhou and J.-C. Jang. 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr. Op. Plant Biol.* 2: 410-418.
- Siderius, M., and W.H. Mager. 1997. General stress responses. In search of a common denominator. In: *Yeast stress responses*. (Ed.) S. Hohmann and W.H. Mager). pp. 213-230. Landes Bioscience, Austin, Tx.
- Singer, M.A. and S. Lindquist. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *TIBTECH* 16: 460-468.

- Smeeckens, S. and F. Rook. 1997. Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol.* 115: 7-13.
- Smith, A., M.P. Ward and S. Garrett. 1998. Yeast PkA represses Msn2/Msn4-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17: 3556-3564.
- Stambuk, B.U., P.S. de Araujo, A. Panek and R. Serrano. 1996. Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 237: 876-881.
- Tanaka, K. M. Nakafuku, F. Tamanoi, Y. Kaziro, K. Matsumoto and A. Toh-e. 1990. *IRA2*, a second gene in *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian Ras-GTP-ase activating protein. *Mol Cell. Biol.* 10: 4303-4313.
- Trumbly, R.J. 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 15-21.
- Teusink, B., M.C. Walsh, K. van Dam and H.V. Westerhoff. 1998. The danger of metabolic pathways with turbo design. *TIBS*: 162-169.
- Thaller, M.C., S. Schippa and G.M. Rossolini. 1998. Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic, and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. *Prot. Sci.* 7: 1647-1652.
- Thevelein, J.M. and J.H. de Winde. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33: 904-918.
- Thevelein, J and S. Hohmann, 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *TIBS* 20: 3-10.
- Thevelein, J.M. 1991. fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signaling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol. Microbiol.* 5: 1301-1307.
- Thevelein, J.M. 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.
- Toda, T., I. Uno, T. Ishikawa, S. Powers, T. Kataoka D. Broeck, S. Cameron, J. Broach, K. Matsumoto and M. Wiegler. 1985. In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40: 27-36.
- Van Aelst L., S. Hohmann, F.K. Zimmermann, A.W.H. Jans and J.M. Thevelein. 1991. A yeast homologue of the bovine lens fiber MIP gene family complements the growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not its defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signaling. *EMBO J.* 10: 2095-2104.

ANEXO

CONSTRUCCION DE VECTORES DE EXPRESION PARA LEVADURA BASADOS EN LOS PROMOTORES *CUP1 Y PMA1*

RESUMEN

Con el objetivo de generar un grupo de vectores de expresión con diferentes características que ofrecieran opciones acordes con las necesidades del sistema experimental requerido, se construyeron y caracterizaron parcialmente dos series de vectores de expresión para *S. cerevisiae*.

Para ello, se aprovechó la disponibilidad de los vectores de clonación mono y multicopia con los marcadores de selección para *URA3*, *LEU2*, *HIS3* y *TRP1* previamente construidos (Sikorski and Hieter, 1989; Christianson *et al.*, 1992).

El primer grupo de vectores (pSAL1 a pSAL8) está basado en el promotor *CUP1* el cual fue elegido por ser un promotor modulable en el cual puede inducirse la transcripción del gen de interés a través del uso de diferentes concentraciones de cobre como CuSO_4 ; es además un promotor poco afectado por el desarrollo y por la composición del medio de cultivo. Para construir estos vectores, se diseñó un cassette de expresión *CUP1/CYC1* constituido por el promotor *CUP1* del gen de la metalotioneína y por el terminador de la transcripción *CYC1*. A este cassette se le mejoró el lugar de clonación múltiple o 'polylinker' que quedó constituido por los sitios *Eco* RI, *Xho* I, *Nco* I, *Sac* I, *Not* I, *Sph* I, *Sal* I y *Kpn* I. Se probó el funcionamiento correcto de estos vectores mediante la clonación del gen reportero *lacZ* en el vector pSAL1 (monocopia con el marcador *LEU2*), demostrándose que la transcripción puede modularse mediante la adición de cantidades no tóxicas de 5 a 100 μM de sulfato de cobre.

El segundo grupo de vectores fue diseñado en base al promotor fuerte *PMA1* proveniente del gen que codifica para la ATPasa de protones de la membrana plasmática de la levadura. Estos vectores se hicieron para contar con la opción de expresar genes a un nivel alto y constitutivo. Estos vectores que denominamos pRS1 a pRS8, se construyeron substituyendo el promotor *CUP1* por el promotor *PMA1* para obtener el cassette de expresión *PMA1/CYC1*. El funcionamiento de estos vectores se probó cualitativamente clonando en uno de ellos (pRS6, multicopia, *HIS3*) al gen reportero *SGFP-TYG*, que codifica para la proteína verde fluorescente.

Los vectores pSAL4 (multicopia, *URA3*), pSAL6 (multicopia, *HIS3*) y pRS6 (multicopia, *HIS3*) también fueron empleados para expresar en levadura genes homólogos y heterólogos de la misma levadura o de plantas que codifican genes *TPS* y que intervienen en la biosíntesis de trehalosa.

INTRODUCCION

1. EL PROMOTOR *CUP1*.

1.1 El gen *CUP1* de metalotioneína y su proteína.

Según Butt y Ecker (1987), las secuencias de DNA reguladas por metales constituyen de los elementos más interesantes para la expresión heteróloga en levaduras.

Sin embargo, para poder utilizar estos elementos, primero ha sido necesario comprender al nivel molecular, la regulación de los genes que codifican las metalotioneínas, una familia de proteínas especializadas en la detoxificación de metales pesados como cobre, cadmio y zinc. Uno de los primeros genes clonados, que codifica una de estas proteínas fue el *CUP1* de *Saccharomyces cerevisiae*, también denominado como Cu-MT (Fogel and Welch, 1982; Butt *et al.*, 1984); el cual constituye uno de los pocos genes repetidos en levadura, y el número de copias, con un arreglo en tándem en el cromosoma VIII, está relacionado con el nivel de resistencia a la toxicidad por Cu. Las cepas más resistentes, generalmente de origen industrial, son capaces de crecer bajo una concentración de hasta 2 mM, y estas cepas normalmente tienen 10 o más copias de *CUP1*, mientras que las cepas susceptibles sin ningún gen *CUP1* funcional no pueden crecer a más de 100 μ M de Cuy (Welch *et al.*, 1983). El fenómeno que propicia el incremento en el número de copias, ha sido la amplificación génica, resultante de la recombinación no recíproca o la conversión genética, bajo la presión selectiva del cobre. Debido al uso de contenedores de cobre para fabricar vinos y cerveza, así como al uso del caldo bordelés que contiene altas concentraciones de sulfato de cobre (muy empleado para el control de enfermedades fungosas en las vides), las levaduras han estado en contacto con este metal durante miles de años (Fogel *et al.*, 1983; Hamer *et al.*, 1985).

En la levadura, *CUP1* codifica una pequeña proteína de sólo 61 aminoácidos capaz de unir hasta 8 átomos de cobre de manera cooperativa, a través de 12 residuos de cisteína (Winge *et al.*, 1985). La metalotioneína es capaz de acomplejar *in vitro* al zinc, plata y cadmio; aunque *in vivo*, sólo se ha comprobado que protege de la toxicidad de cobre y

cadmio. Por otra parte, el gen es sólo inducido por cobre y plata (Ecker et al., 1986; Hamer, 1986; Furst et al., 1988). Homólogos de este gen se pueden encontrar prácticamente en todos los organismos eucariotes, aunque en organismos superiores constituyen familias multigénicas complejas que codifican proteínas con propiedades para unir una amplia variedad de metales pesados (Hamer, 1986).

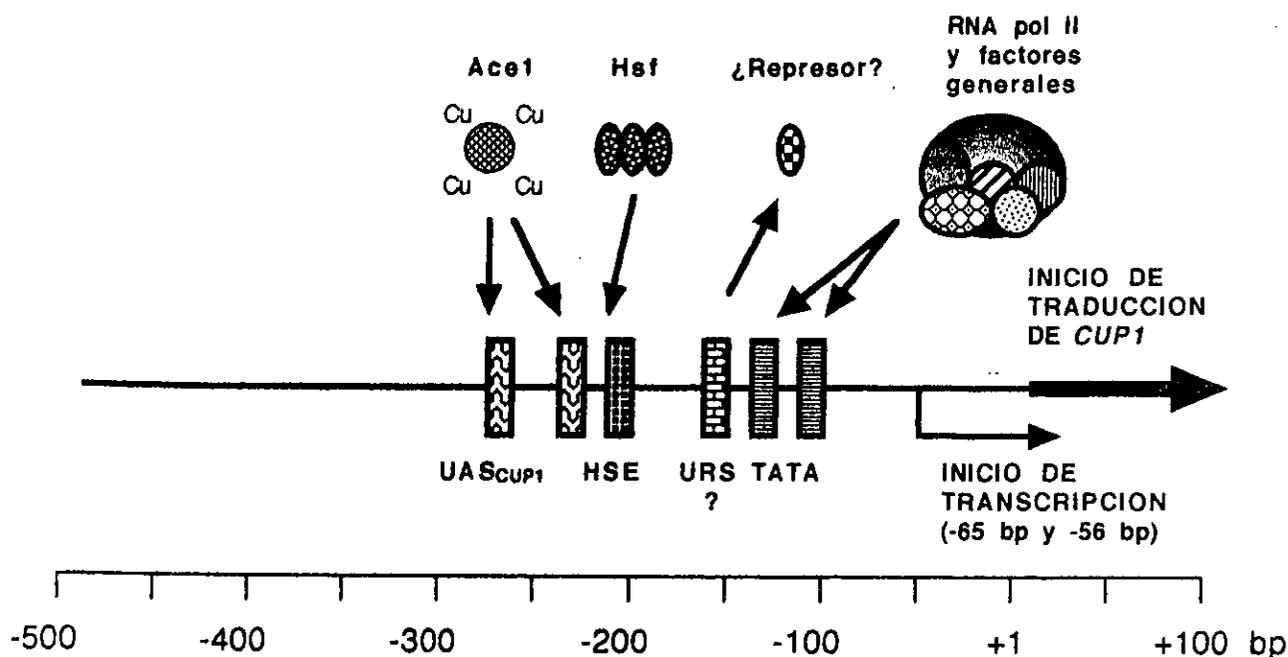
En *Arabidopsis* se han identificado dos genes *MT* homólogos de *CUP1* y codificantes de metalotioneína homólogos, que además fueron capaces de complementar funcionalmente a la mutante *cup1Δ* de levadura, incrementando además su resistencia a la toxicidad por cobre y cadmio. Similar al gen de levadura, *MT1* y *MT2* son inducidos por cobre, por lo que se supone que estos genes estarían involucrados en la detoxificación por metales pesados en plantas (Zhou and Goldsbrough, 1994).

1.2 El promotor *CUP1* de levadura es finamente regulado por Cu.

El promotor *CUP1* posee ciertas propiedades que lo han vuelto atractivo para ser empleado tanto en investigación como en biotecnología industrial debido fundamentalmente a las siguientes ventajas: 1) es un promotor inducible por cobre, lo cual permite el mantenerlo activo o inactivo según sea conveniente. Por adición de cantidades micromolares de cobre, puede inducirse hasta 25 veces en relación con su actividad basal (Butt et al., 1984); 2) la actividad basal puede ser controlable, seleccionando la cepa hospedante adecuada, en la que el número de copias de *CUP1* y la presencia de activadores y represores afectará el nivel de expresión (Hamer et al., 1986); 3) La fuerza o eficiencia del promotor (el número de veces que la RNA polimerasa transcribe el gen en un período de tiempo determinado) es moderada (Butt y Ecker, 1987).

A la fecha, se ha hecho una caracterización más o menos exhaustiva de los elementos *cis* y *trans* que afectan el nivel de transcripción basal y la propiedad de este promotor de ser inducido gradualmente en función de la adición de cantidades micromolares, no tóxicas de cobre. Un resumen de lo reportado hasta ahora se presenta en las Figuras 1 y 9.

Inicialmente se determinó que el fragmento *BamH I-Rsa I* de 431 bp, en la región 5' inmediata al gen *CUP1*, podía retener las principales propiedades de control transcripcional



Elementos cis en el promotor *CUP1*

-  UAS_{CUP1} (TTTTGCTG) (-273 a -266 y -244 a -237)
-  UAS_{HSE} (TTCTAGAA) (-227 a -220)
-  URS? (-194 a -143) (ELEMENTO REPRESIBLE POR GLUCOSA, PARCIALMENTE FUNCIONAL EN PRESENCIA DE COBRE)
-  CAJA TATA (TATAAAA) (-142 a -136)
(TATAATA) (-92 a -98)

Figura 1. Elementos *cis* y *trans* involucrados en el control transcripcional del promotor *CUP1*

mostradas por el gen *CUP1* (Butt *et al.*, 1984; Hamer *et al.*, 1985; Thiele and Hamer). Análisis posteriores se centraron en tratar de identificar los elementos de control presentes en ésta región. El promotor *CUP1* posee dos cajas TATA putativas, ubicadas a -98 y -142 bp arriba del primer ATG de *CUP1*, y coincidentemente, se han identificado dos sitios de inicio de la transcripción, a -65 y -56 bp arriba del inicio de traducción (Karin *et al.*, 1984). Dentro de los elementos cis de control positivo, se han caracterizado las secuencias MT-UAS ó UAS_{CUP1} (TTTTGCTG y TTTTCCGCTG) (región -274 a -193 arriba del inicio de la traducción) presentes en tándem en el promotor *CUP1*.

Mediante experimentos de “footprinting”, se ha demostrado que estas secuencias constituyen el sitio de unión del factor de transcripción Ace1, responsable de sensar la concentración de cobre en el medio después de lo cual, de manera proporcional, activa al gen *MT* (Thiele and Hamer, 1986; Thiele, 1988; Huijbregtse *et al.*, 1989; Szczypka and Thiele, 1989). Esta regulación tan sensible y fina es posible porque la proteína Ace1, como la metalotioneína misma, es capaz de unir cooperativamente a los átomos de Cu(I) y experimentar un cambio conformacional que incrementa su afinidad por la secuencia UASCUP1, lo cual tiene como efecto un aumento en la tasa de transcripción de *CUP1* (Furst *et al.*, 1988; Furst and Hamer, 1989).

1.3 Inducción por choque térmico y estrés oxidativo

En levadura, la respuesta transcripcional al choque termico (HS) se lleva a cabo a través de elementos *cis* (HSE) y un factor de transcripción (Hsf) que se activa en respuesta al choque térmico, mediante su fosforilación y trimerización. Los elementos *cis* presentes en los genes responsivos al calor presentan tres o más repetidos de la secuencia GAAnnTTCnnGAA ó TTCnnGAAnnTTC (Sorgor and Nelson, 1989).

El promotor *CUP1* presenta una secuencia TTCTAGAA (-229 a -222) que podría poseer afinidad por Hsf, y por lo tanto una capacidad de respuesta al choque térmico. Se demostró que esto es así, aunque de manera indirecta, cuando se aisló una mutante supresora de *ace1* (hipersensible a cobre), que resultó ser el factor Hsf que al ser mutado incrementó su afinidad por el HSE presente en el promotor de *CUP1*. La proteína Hsf silvestre muestra sólo una ligera afinidad por el HSE de *CUP1*, que sin embargo es detectable *in-vitro* mediante experimentos de unión a DNA y de retardo en geles de

poliacrilamida, e *in-vivo* al seguir la activación de la fusión del promotor *CUP1* a *lacZ* (*CUP1-lacZ*) en respuesta al choque térmico (Silar *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1991).

Se ha reportado que la metalotioneína de levadura es capaz de suprimir varios de los defectos al estrés oxidativo mostrados por la mutante *sod1Δ* (Tamai *et al.*, 1993). En concordancia con esto, se determinó que el gen *CUP1* es activado transcripcionalmente por estrés oxidativo, y que esta respuesta está mediada por la unión de Hsf a HSE. Un dato interesante es que el patrón de activación por fosforilación de Hsf es diferente al patrón típico inducido por choque térmico (Liu and Thiele, 1996).

1.4 Control negativo de *CUP1* por glucosa.

La regulación por fuente de carbono ha sido demostrada sólo circunstancialmente, ya que una deleción entre el sitio UASCUP1 más cercano al inicio de transcripción y la primera caja TATA del promotor *CUP1* (en otras palabras, a unas 105 bp del primer inicio de transcripción), incrementó en 10 veces el nivel de expresión basal. Dado que los experimentos se hicieron suministrando glucosa como fuente de carbono, se asume que en esa región podría encontrarse un elemento URS de regulación negativa por glucosa (Thiele and Hamer, 1986). La gran mayoría de los estudios de regulación de *CUP1* se han hecho empleando glucosa como fuente de carbono, así que es evidente que la posible represión del promotor ejercida por este azúcar, es superada por la activación del mismo cuando se adiciona cobre (Butt and Ecker, 1987).

1.5 Vectores basados en el promotor *CUP1*

Aunque el promotor *CUP1* es un promotor débil comparado con otros como el *PGK* y el *GALI* (Piper, 1994), puede dar resultados similares bajo un manejo adecuado si se trata de producir proteínas recombinantes, con la ventaja adicional de que su expresión es independiente del desarrollo y su expresión puede inducirse dentro de un amplio rango. Se ha reportado que el rendimiento de suero de albúmina humana en levadura recombinante fue tan alto bajo el control del promotor *CUP1*, como el obtenido utilizando el promotor *PGKI* (Etcheverry *et al.*, 1986). Un cultivo de levadura puede dejarse crecer hasta, por ejemplo la parte final de la fase exponencial para incrementar la biomasa y luego inducir la producción de proteína recombinante simplemente mediante la adición de cantidades no

tóxicas de cobre, lo cual en algunos casos da un mejor resultado que empezar el cultivo bajo una expresión constitutiva alta.

La mayoría de los promotores utilizados en los vectores de expresión se derivan de genes de expresión constitutiva, regulados o inducibles por fuentes de carbono, como los *PGK*, *GAL1* y *ADH*, a diferencia del *CUPI* cuya regulación es mayoritariamente ejercida por el cobre. Aunque se ha reportado que hay elementos de regulación negativa por glucosa en el promotor *CUPI*, también se sabe que la adición de cobre supera parcialmente esta represión. Cuando se elimina esta secuencia del promotor, se incrementa la expresión basal, y se duplica el nivel máximo de expresión inducible por cobre en vectores monocopia (Thiele and Hamer, 1986).

Por otra parte no siempre es conveniente el obtener una expresión fuerte. Hay genes cuya sobre-expresión puede resultar en efectos tóxicos para la levadura, por lo cual en ese caso lo mejor es una expresión baja (Chen *et al.*, 1990).

Además, es posible incrementar la fuerza del promotor *CUPI* mediante varias vías, como utilizar un vector con origen de replicación multicopia en vez del monocopia, con lo cual se incrementa el número de unidades de transcripción activas (Macreadie *et al.*, 1991); o bien sobre-expresando *ACE1*, el factor de transcripción responsivo a Cu (Thorvaldsen *et al.*, 1993).

En plantas también se desarrolló un sistema versátil de expresión, al construir un promotor quimérico formado por los elementos *UASCUPI* de levadura, de 90 bp de CaMV 35S para proveer del promotor mínimo. Este promotor fue fusionado a *GUS*, y, adicionalmente, el sistema incluye la cotransformación de plantas de tabaco con el gen que codifica el factor de transcripción de levadura *ACE1* sobre-expresado. Bajo estas condiciones, se obtuvieron plantas en las que fue posible mantener un nivel bajo de expresión basal, e inducir la transcripción de *GUS* hasta 50 veces al añadir 50 μM de CuSO_4 en la solución de riego, ó asperjando 0.5 μM a las hojas para evitar los efectos tóxicos del cobre. Se demostró que la transcripción podía interrumpirse simplemente al retirar el cobre (Mett *et al.*, 1993).

2. EL PROMOTOR *PMA1*.

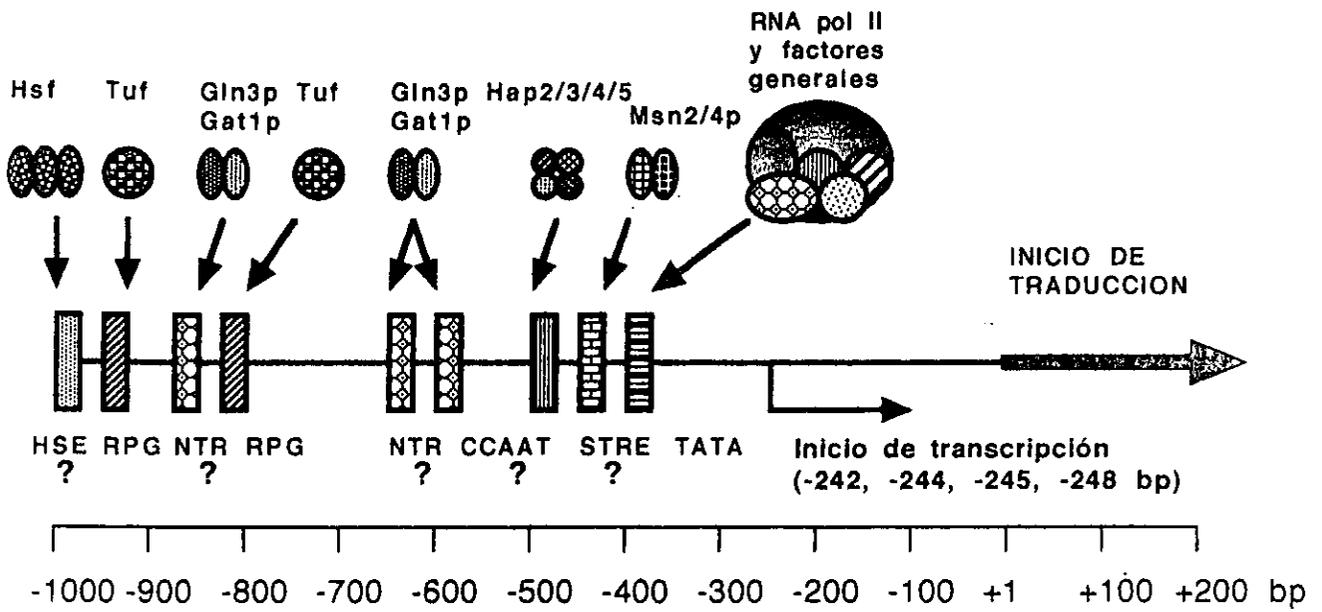
2.1 El gen *PMA1* y su proteína.

La ATPasa de protones (H^+ -ATPasa) codificada en levadura por *PMA1* es un polipéptido abundantemente expresado, ya que puede constituir entre un 7-10% de la proteína de la membrana plasmática. Tiene como principal función el bombear protones hacia el exterior de la célula para generar un gradiente electroquímico que luego es utilizado para introducir iones, azúcares y aminoácidos a través de los sistemas de transporte secundarios (Serrano, 1988). Adicionalmente, el bombeo de protones contribuye a regular el pH intracelular (Eraso and Gancedo, 1987). *PMA1* es un gen esencial en levadura, ya que su disrupción produce una mutante inviable (Serrano *et al.*, 1986).

Dado lo esencial de esta proteína, su disponibilidad debe de estar cuidadosamente regulada. Las primeras evidencias demostraron que estaba sujeta a regulación post-traducciona en respuesta a la presencia de glucosa, ya que su actividad se ve incrementada después de la adición de este azúcar, que induce la fosforilación de Ser/Thr en uno de los sitios del polipéptido de 100 kD (Chang and Slayman, 1991).

2.2 Regulación transcripcional de *PMA1*.

Contra la idea que este gen se expresa de manera constitutiva, originada más que nada por la larga vida media de la proteína (20 horas) (Serrano, 1988; Benito *et al.*, 1991), se ha encontrado que también está sujeto a una evidente regulación transcripcional, mediado por el factor Tuf1/Rap1 el cual responde a la adición de azúcares fermentables (Capieaux *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1993, ver Figuras 2 y 10). La transcripción cuantificada mediante una fusión del promotor *PMA1* con el gen reportero *lacZ*, muestra una reducción de cerca del 60% en la actividad específica de β -galactosidasa, cuando la fuente de carbono es galactosa en vez de glucosa, (García-Arranz *et al.*, 1994). A pesar de estar influido por la fuente de carbono, el nivel de expresión no se ve tan abatido como es el caso del promotor *GALI*, donde la transcripción se incrementa hasta 1000 veces al emplear galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono (Serrano and Villalba, 1995). En las Figuras 2 y 10, se indican otros consensos cis identificados analizando la



Elementos Cis en el promotor de *PMA1*

-  UAS_{HSE} (TTCCTGAA) (-932 a -925)
-  UAS_{RPG} (ACCCATACA) (-892 a -884 y -788 a -780)
-  UAS_{NTR} (GATAA y TTATC) (-815 a -811, -643 a -639 y -581 a -577)
-  UAS_{CCAAT} (CCAAT) (-407 a --402)
-  UAS_{STRE} (CCCCT) (-356 a --352)
-  CAJA TATA (TATAAAA) (-336 a --330)

* DE LOS ELEMENTOS CIS IDENTIFICADOS AQUI, SOLO SE HA DEMOSTRADO LA FUNCION DE LOS SITIOS UAS_{RPG}.

Figura 2. Elementos *cis* y *trans* involucrados en el control transcripcional del promotor *PMA1*

secuencia del promotor *PMA1*. Según nuestro conocimiento, no se ha explorado si estos consensos son realmente funcionales en regular la transcripción de este gen, aunque, dada la importancia de la ATPasa de protones en levaduras, se esperaría que estuviese sujeta a una cuidadosa regulación, por lo que no sería extraño que otros elementos cis diferentes a los RPG también estén involucrados en el control transcripcional de *PMA1*.

El promotor *PMA1* se considera un promotor fuerte, similar al promotor *GAL1*, por lo cual se le ha utilizado para expresar genes heterólogos de plantas en los cuales se espera que el fenotipo responda proporcionalmente a un incremento en la cantidad de proteína.

Rubio *et al* (1995) expresaron en levadura al gen *HKT1* que codifica un putativo cotransportador K^+/Na^+ de trigo, y más recientemente, Zentella *et al* (1999), lograron complementar a la mutante *tps1* Δ con el gen homólogo de *S. lephidophylla* clonado en un vector de expresión con el promotor *PMA1*.

OBJETIVOS

- 1) Construir una serie de vectores de expresión basados en el promotor *CUP1* inducible por cobre y en el promotor constitutivo *PMA1* con un origen de replicación monocopia o multicopia, con los genes marcadores más usuales.
- 2) Probar el funcionamiento de los vectores mediante la clonación de un gen reportero, como *lacZ* o *GFP* de la proteína verde fluorescente.

secuencia del promotor *PMA1*. Según nuestro conocimiento, no se ha explorado si estos consensos son realmente funcionales en regular la transcripción de este gen, aunque, dada la importancia de la ATPasa de protones en levaduras, se esperaría que estuviese sujeta a una cuidadosa regulación, por lo que no sería extraño que otros elementos cis diferentes a los RPG también estén involucrados en el control transcripcional de *PMA1*.

El promotor *PMA1* se considera un promotor fuerte, similar al promotor *GAL1*, por lo cual se le ha utilizado para expresar genes heterólogos de plantas en los cuales se espera que el fenotipo responda proporcionalmente a un incremento en la cantidad de proteína.

Rubio *et al* (1995) expresaron en levadura al gen *HKT1* que codifica un putativo cotransportador K^+/Na^+ de trigo, y más recientemente, Zentella *et al* (1999), lograron complementar a la mutante *tps1* Δ con el gen homólogo de *S. lephidophylla* clonado en un vector de expresión con el promotor *PMA1*.

OBJETIVOS

- 1) Construir una serie de vectores de expresión basados en el promotor *CUP1* inducible por cobre y en el promotor constitutivo *PMA1* con un origen de replicación monocopia o multicopia, con los genes marcadores más usuales.
- 2) Probar el funcionamiento de los vectores mediante la clonación de un gen reportero, como *lacZ* o *GFP* de la proteína verde fluorescente.

RESULTADOS

1. Construcción de vectores pSAL

Se construyeron una serie de 8 vectores utilizando el mismo cassette de expresión *CUP1/CYC1* y aprovechando los vectores de clonación monocopia y multicopia construidos por Sikorski y Hieter (1989) y por Christianson *et al* (1992).

1.1 Construcción de pSAL1

La construcción del primer vector de esta serie se muestra gráficamente en la Figura 3, y se describe en la publicación anexa (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996).

1.2 Construcción de otros vectores pSAL

Una vez que se decidió construir toda la serie de vectores enlistados en la Tabla 1, se consideró que era más conveniente primero preparar un cassette *CUP1/CYC1* que sirviera para llevar a cabo las 7 clonaciones restantes de la manera más sencilla. La estrategia para la construcción se ilustra para pSAL4 en la Figura 4, proceso que se repitió para el resto de los vectores. Se partió del vector pCUP1 en el cual se sustituyó el terminador *CYC1* por el terminador *CYC1* modificado de pSAL1, en el cual se cuenta con un 'polylinker'. Para esto, el terminador *CYC1* de pSAL1 se escindió digiriendo con *Nco* I-*Hind* III, y en el resto de pSAL1 se clonó el terminador *CYC1* con el 'polylinker' integrado; al vector resultante se le llamó pCUP2. Este paso adicional se hizo debido a dos consideraciones: 1) integrar el 'polylinker' previamente sintetizado al construir pSAL1, y 2) conservar los sitios *Bam*H I-*Cla* I que permitirían obtener el cassette completo, que luego de ser rellenado con enzima Klenow podría emplearse para hacer el resto de los vectores pSAL.

Una vez que se tuvo al vector pCUP2, se purificó suficiente DNA del cassette *CUP1/CYC1* digerido con *Bam*H I-*Cla* I, el cual se rasuró con la enzima Klenow. Por otro lado, el armazón o esqueleto de los vectores se obtuvo simplemente digiriendo con *Pvu* II, que origina extremos romos, a los vectores monocopia pRS313, pRS314, pRS316 y a los multicopia pRS423, pRS424, pRS425 y pRS426; después, el fragmento mayor se ligó con el cassette de expresión. Esto nos permitió principalmente el eliminar el 'polylinker' y un

GENE 09657

Construction of a *CUP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* *

(Yeast shuttle-expression vector; centromeric plasmid; recombinant DNA)

J.O Mascorro-Gallardo, A.A. Covarrubias and R. Gaxiola

Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

Received by F. Bolivar: 26 September 1995; Revised/Accepted: 15 November/23 November 1995; Received at publishers: 29 January 1996

SUMMARY

We report the construction and characterization of a yeast shuttle-expression vector that can be used to express genes in yeast in a modulated form. This vector is centromeric, with a polylinker that optionally can provide an ATG start of translation. Expression features are based on the *CUP1* yeast metallothionein gene promoter, which can be tightly modulated by copper.

Heterologous genes can be expressed in yeast and this property has been exploited to identify genes by screening cDNA libraries by complementation (Elledge et al., 1991). Although in many examples overproduction of a protein has allowed to rescue yeast mutations, in other cases a phenotype shown by moderate gene expression can be masked by its overexpression (Chen et al., 1990). These limitations could be overcome by using an expression system susceptible of being modulated.

In order to develop an alternative expression vector for yeast, we used the yeast *CUP1* promoter (Butt et al., 1984) to construct a new centromeric, shuttle-expression vector named pSAL1 (Fig. 1). To test the main advantages of this vector, we directionally inserted the *lacZ* reporter gene in the *NcoI-NotI* orientation (Fig. 2). After previous amplification in *E. coli* strain DH5 α , we trans-

formed the yeast strain RS-58 (*MATa, ade1-100, ura3-52, leu2-3-112, his4-419*; R. Serrano, personal communication) with pSAL1::*lacZ*. To test the *lacZ* expression under control of the *CUP1* promoter, the transformed yeast were assayed for β Gal activity (Gaxiola et al., 1992). Cu^{2+} caused a tight regulation of the *CUP1* promoter as follows: a basal activity of 18 units of β Gal (Miller, 1972) was detected without addition of Cu^{2+} ; it increased to 58, 298, 373 and 476 units after addition of 1, 10, 50 and 100 μM Cu^{2+} , respectively. These results are in agreement with previous reports on *CUP1* behavior (Butt et al., 1984). The effectiveness of the *CUP1* promoter to regulate gene expression in this vector will be very useful when the level of expression of a gene is critical to show up a phenotype.

Correspondence to: Dr. R. Gaxiola, Depto. de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. Tel. (52-73) 291643, Fax (52-73) 172388;

e-mail: gaxiola@ibt.unam.mx

* On request, the authors will supply detailed experimental evidence for the conclusions reached in this Brief Note. The plasmids are available upon request.

Abbreviations: aa, amino acid(s); Ap, ampicillin; β Gal,

β -galactosidase; bp, base pair(s); *CEN6/ARSH4*, yeast centromere sequence and autonomous replication sequence; *CUP1*, yeast metallothionein-encoding gene; *CYC1*, yeast iso-1-cytochrome-encoding gene; ds, double stranded; f1(+), phage origin of DNA replication for the in vivo production of single-stranded DNA; kb, kilobase(s) or 1000 bp; *LEU2*, leucine auxotrophic marker gene; MCS, multiple cloning site; nt, nucleotide(s); oligo, oligodeoxyribonucleotide; *ori*, pBLUESCRIPT origin of DNA replication; Pollk, Klenow (large) fragment of *E. coli* DNA polymerase I; ^R, resistance/resistant; RBS, ribosome-binding site(s);:::, novel joint (fusion or insertion).

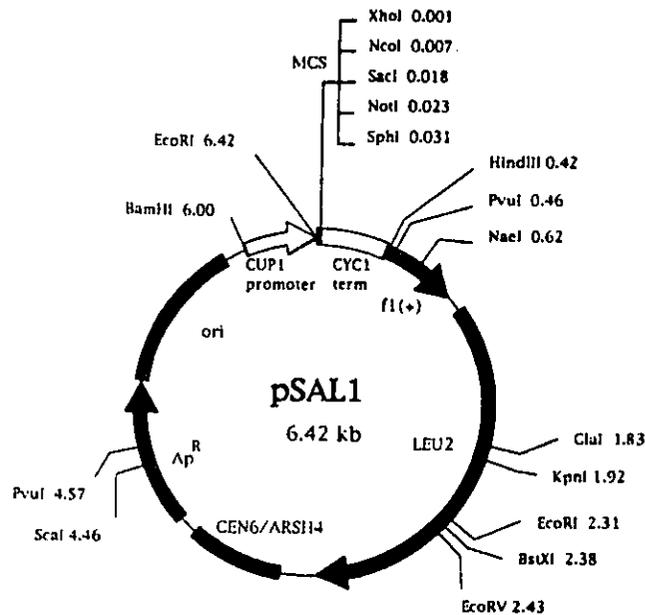


Fig. 1. Map of pSAL1. We used the pRS315 backbone to design a centromeric yeast vector with a *LEU2* auxothrophic marker (Sikorski and Hieter, 1989). pRS315 was digested with *PvuII* and the 5.54-kb fragment was retained. The *CUP1-CYC1* cassette was excised from the pCUP1 plasmid (R. Coria, personal communication) as a 0.82-kb *BamHI*-*Clal* fragment. After fill-in with *Pollk*, the cassette was ligated to the pRS315 fragment. During the cloning, the *BamHI* site was regenerated, while the *Clal* and *PvuII* sites were destroyed. MCS was synthesized in two complementary 29-mer oligos (5'-CATGGT-GAGCTCTGCGGCCGCTGCATGCT and 5'-CATGAGCATGC-AGCGGCCGAGAGCTCAC), where the *NcoI* site distal to the *CUP1* promoter was destroyed by G→T transversion. The dephosphorylated ds oligo was inserted into the *NcoI* site of the *CUP1-CYC1* cassette.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roberto Coria and Mario Zurita for kind advice. We also thank Paul Gaytán from the Unit of Chemical Synthesis of Macromolecules (IBT-UNAM) for synthesizing the oligos. This project was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (3460-N9310), and by the Organization of European Communities to R.G. (CII*CT94-0082).

REFERENCES

Brosius, J.: Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA* 8 (1989) 759-777.

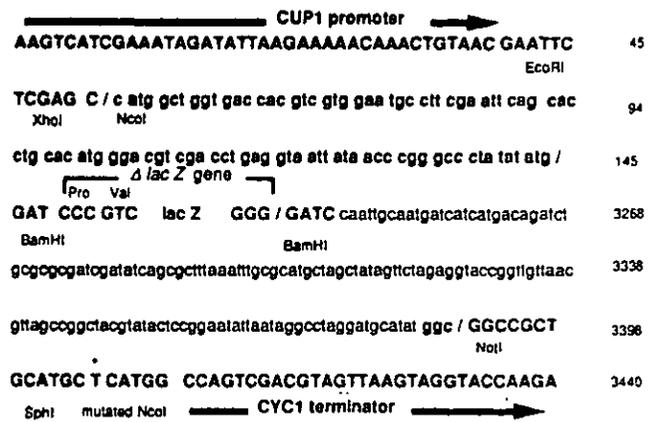


Fig. 2. Cloning and sequence of *ΔlacZ* in pSAL1. To obtain pSAL1::lacZ, we used the promoterless *ΔlacZ* gene from vector pMC1871, which lacks the RBS and the first eight non-essential N-terminal aa codons (Casabadan et al., 1983). Since the *ΔlacZ* cartridge was excised as a *BamHI* fragment (3.12 kb), we did an intermediate cloning of *ΔlacZ* in the *BamHI* site of the pSL301 vector (Brosius, 1989). Thereafter, the *lacZ* cartridge was obtained from pSL301::lacZ by *NcoI*+*NotI* digestion, and directionally cloned into pSAL1 digested with *NcoI*+*NotI*, thus generating pSAL1::lacZ. From this construction, *lacZ* can be excised with a large number of restriction enzymes to make other transcriptional or translational fusions. Capital letters in the ends represent the pSAL1 sequence (*CUP1* promoter and *CYC1* terminator) and lower-case letters are part of the pSL301 MCS. The correct in-frame fusion was determined by nt sequencing (Sequenase 2.0, US Biochemical, Cleveland, OH, USA) and it is represented in bold letters. The remaining sequence of the pSL301 MCS was taken from Brosius (1989). The mutated nt in the *NcoI* site is indicated with an asterisk.

- Butt, T.R., Sternberg, E.J., Gorman, J.A., Clark, P., Hamer, D., Rosenberg, M. and Crooke, S.T.: Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76 (1984) 3332-3336.
- Casadaban, M.J., Martinez-Arias, A., Shapira, S.K. and Chou, J.: β -galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol.* 100 (1983) 293-303.
- Chen, J.B., Sun, J. and Jazwinski, S.M.: Prolongation of the yeast life span by the *v-Ha-RAS* oncogene. *Mol. Microbiol.* 4 (1990) 2081-2086.
- Elledge, S.J., Mulligan, J.T., Ramer, S.W., Spottswood, M. and Davis, R.W.: λ YES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88 (1991) 1731-1735.
- Gaxiola, R., Larrinoa, I.F., Villalba, J.M. and Serrano, R.: A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11 (1992) 3157-3164.
- Miller, J.H.: *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P.: A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122 (1989) 19-27.

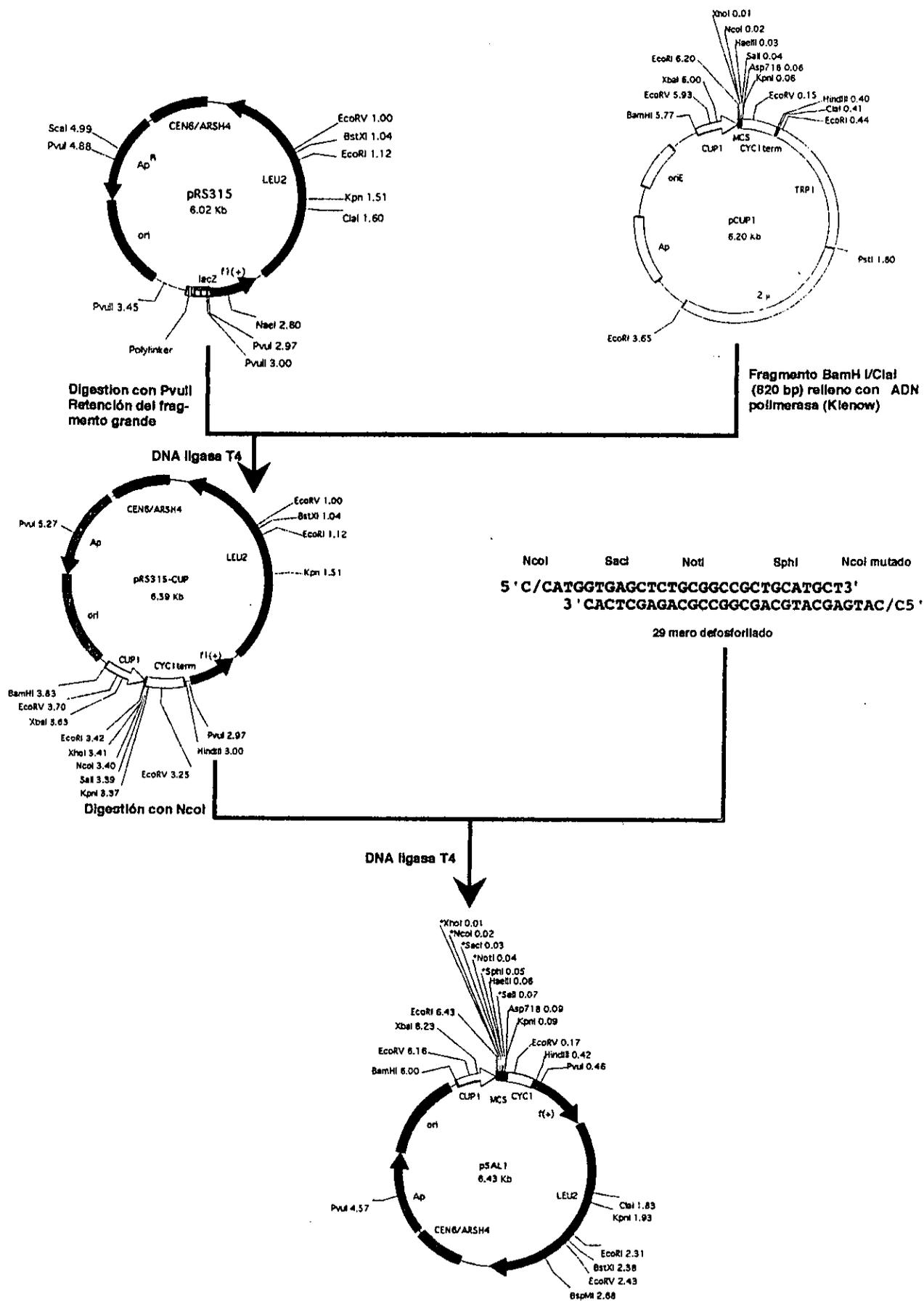


Figura 3. Construcción de pSAL1

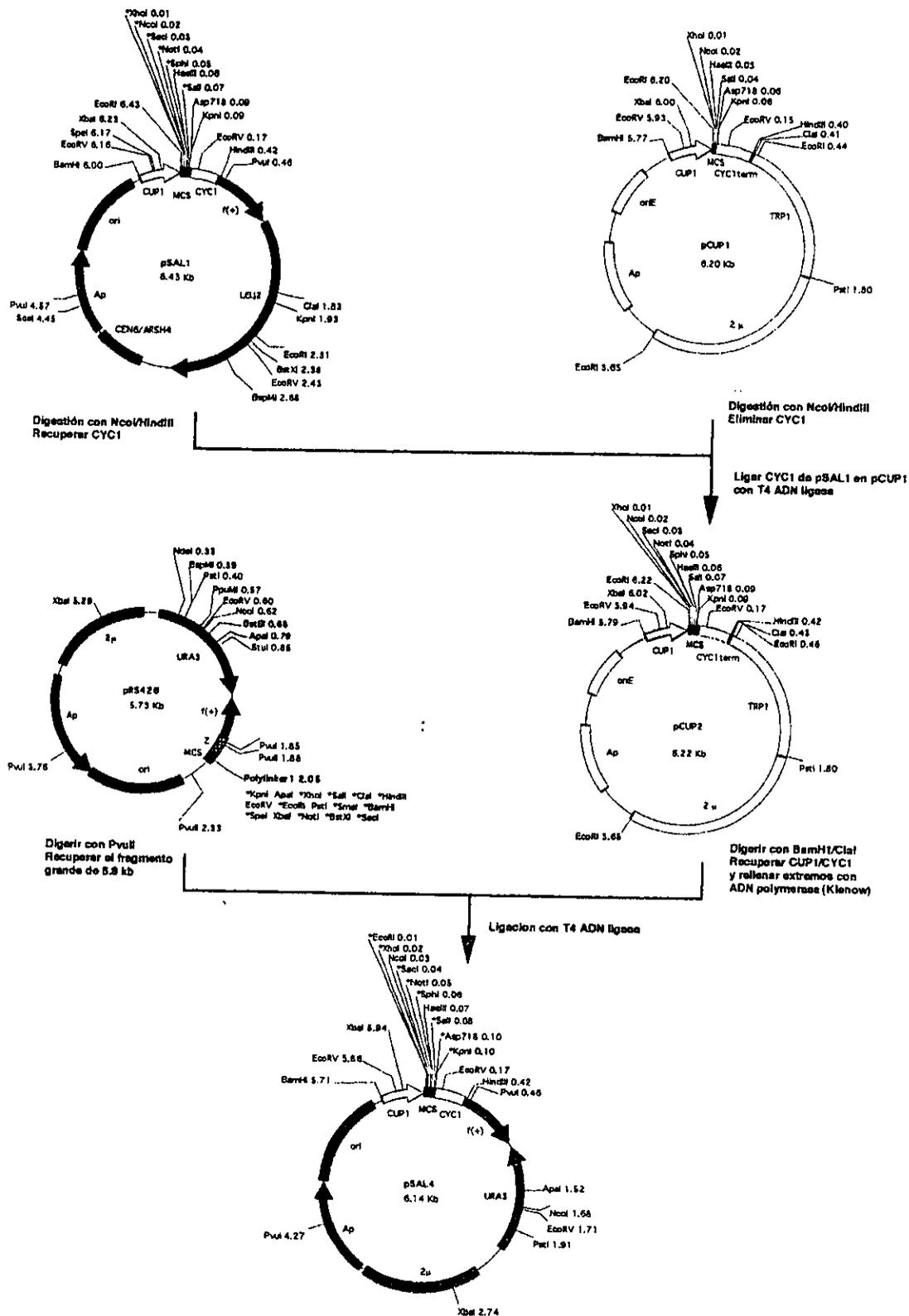


Figura 4. Construcción del vector pSAL4

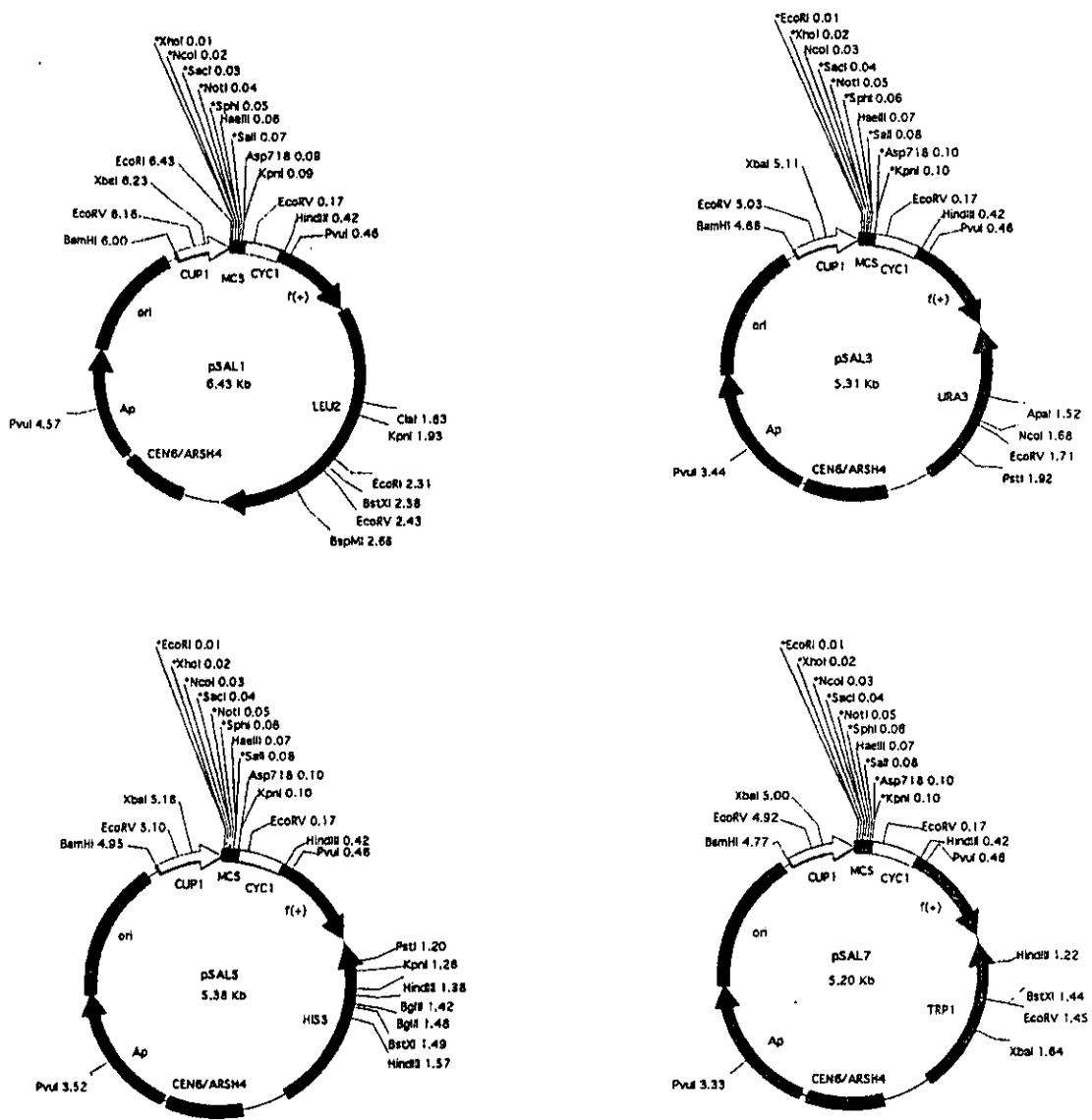


Figura 5. Vectores pSAL monocopia

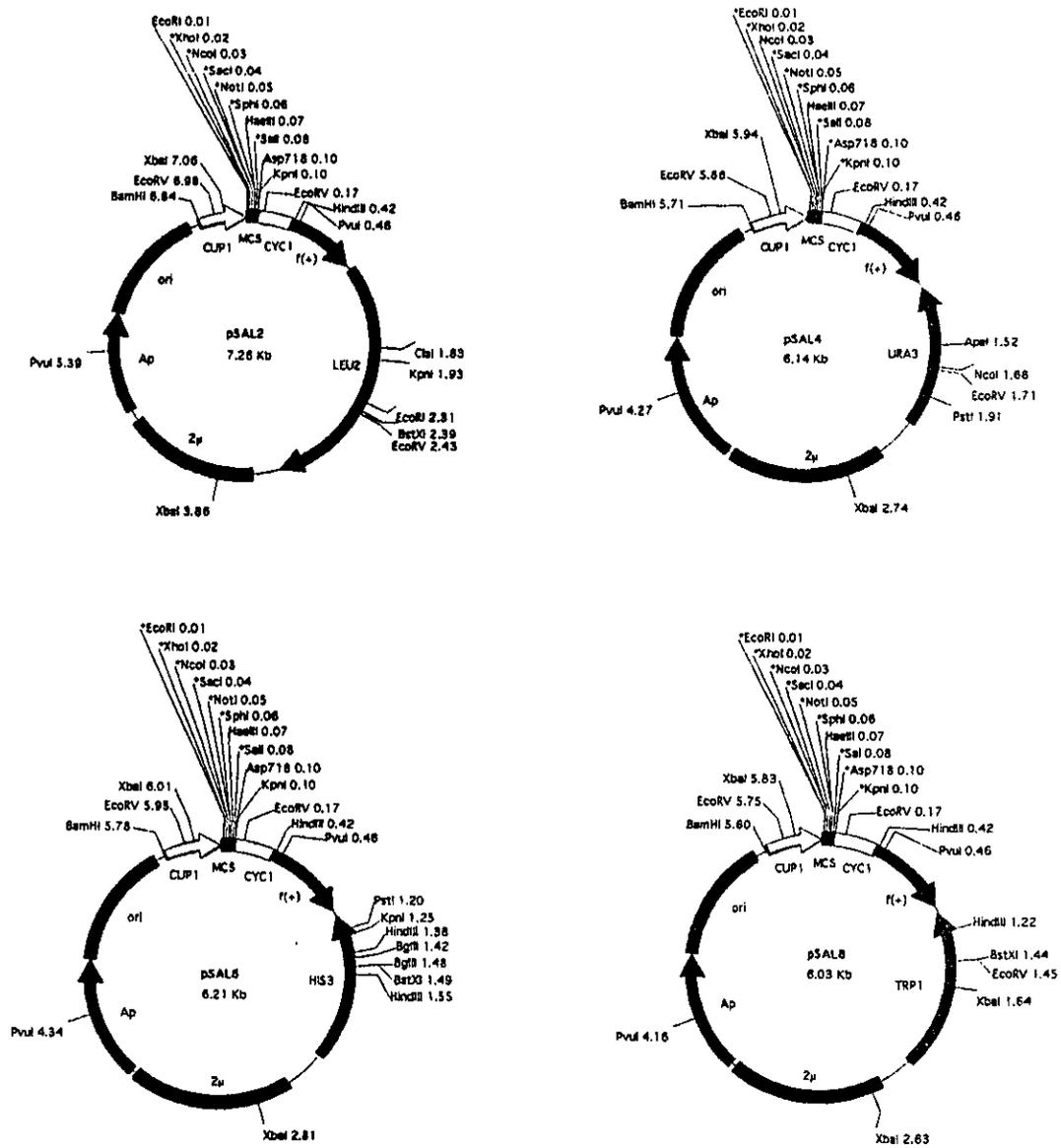


Figura 6. Vectores pSAL multicopia

**Tabla 1. VECTORES DE EXPRESION DE LEVADURA
BASADOS EN EL PROMOTOR *CUP1***

```
*****
```

VECTOR	NO. COPIAS	GEN SELECTOR	VECTOR BASE	POLYLINKER* (5' a 3')
pSAL1	monocopia	LEU2	pRS315	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , KpnI.
pSAL2	multicopia	LEU2	pRS425	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , KpnI.

pSAL3	monocopia	URA3	pRS316	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , <u>KpnI</u> .
pSAL4	multicopia	URA3	pRS426	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , <u>KpnI</u> .

pSAL5	monocopia	HIS3	pRS313	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , KpnI.
pSAL6	multicopia	HIS3	pRS423	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , KpnI.

pSAL7	monocopia	TRP1	pRS314	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , KpnI.
pSAL8	multicopia	TRP1	pRS424	<u>EcoRI</u> , <u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>SalI</u> , KpnI.

* Los sitios únicos en el polylinker aparecen subrayados. Aunque están también presentes en el mismo, no se indican los sitios *Hae* III, *Hinc* II y *Asp* 718, ya que el primero no es útil por ser de 4 pares de bases. *Hinc* II es isoesquizómero de *Sal* I y *Asp* 718 de *Kpn* I.

pequeño fragmento de 400 bp de los vectores originales. Después de analizar las clonas resultantes de la ligación, se retuvieron aquellas que poseían las orientaciones mostradas en los mapas que se anexan (Figuras 5 y 6). En la Tabla 1 se resumen los ocho vectores construidos y sus propiedades distintivas.

1.3 Ensayo funcional de pSAL1

En el artículo anexo (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996) se señala que se llevó a cabo la clonación del gen *lacZ* en pSAL1 para probar el nivel de expresión y el control de la inducción por cobre. En la Figura 7 se muestra la manera como se preparó una delección de *lacZ* para ser clonado en la fase adecuada en pSAL1. En la Figura 2 del artículo anexo (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996) se muestra la secuencia donde puede verse que se hizo una fusión traduccional de 31 aminoácidos que empieza desde el sitio *Nco* I, y abarca parte del polylinker de pSL301, hasta el sitio *BamH* I del gen *ΔlacZ* original, proveniente del vector pMC1871 y que carece de los primeros 8 aminoácidos.

Se ensayó la construcción pSAL1::*lacZ* en la cepa RS58 de levadura, añadiendo diferentes cantidades de cobre en la fase exponencial del cultivo. El resultado se muestra gráficamente en la Figura 8, en la que puede verse que para pSAL1::*lacZ*, la máxima inducción se logra al adicionar 100 μM de CuSO_4 . Esta concentración de cobre está muy por debajo del nivel de toxicidad para la cepa RS58, ya que previamente se determinó que hasta 500 μM de sulfato de cobre no afectaba significativamente el crecimiento. Sólo hasta que se usó 1000 μM , se produjo inhibición del crecimiento, ya que 24 horas después, el cultivo bajo estas condiciones mostró aproximadamente la mitad de densidad óptica, respecto a los otros cultivos con un rango de 0 a 500 μM sulfato de cobre.

1.4 Secuenciación del cassette *CUPI/CYC1*

Con el objetivo de corroborar la secuencia del promotor *CUPI* y del terminador *CYC1*, ambos se clonaron por separado en el vector pKS⁺ y fueron secuenciados utilizando el kit de Sequenasa de Amersham. La secuencia tal como se determinó se anexa en la Figura 9, en la cual se indican los elementos cis ilustrados previamente en la Figura 1. Se debe señalar que si bien la secuencia de *CUPI* coincidió con lo reportado previamente por Butt *et al* (1984), para el caso de *CYC1* se encontraron algunas discrepancias con lo

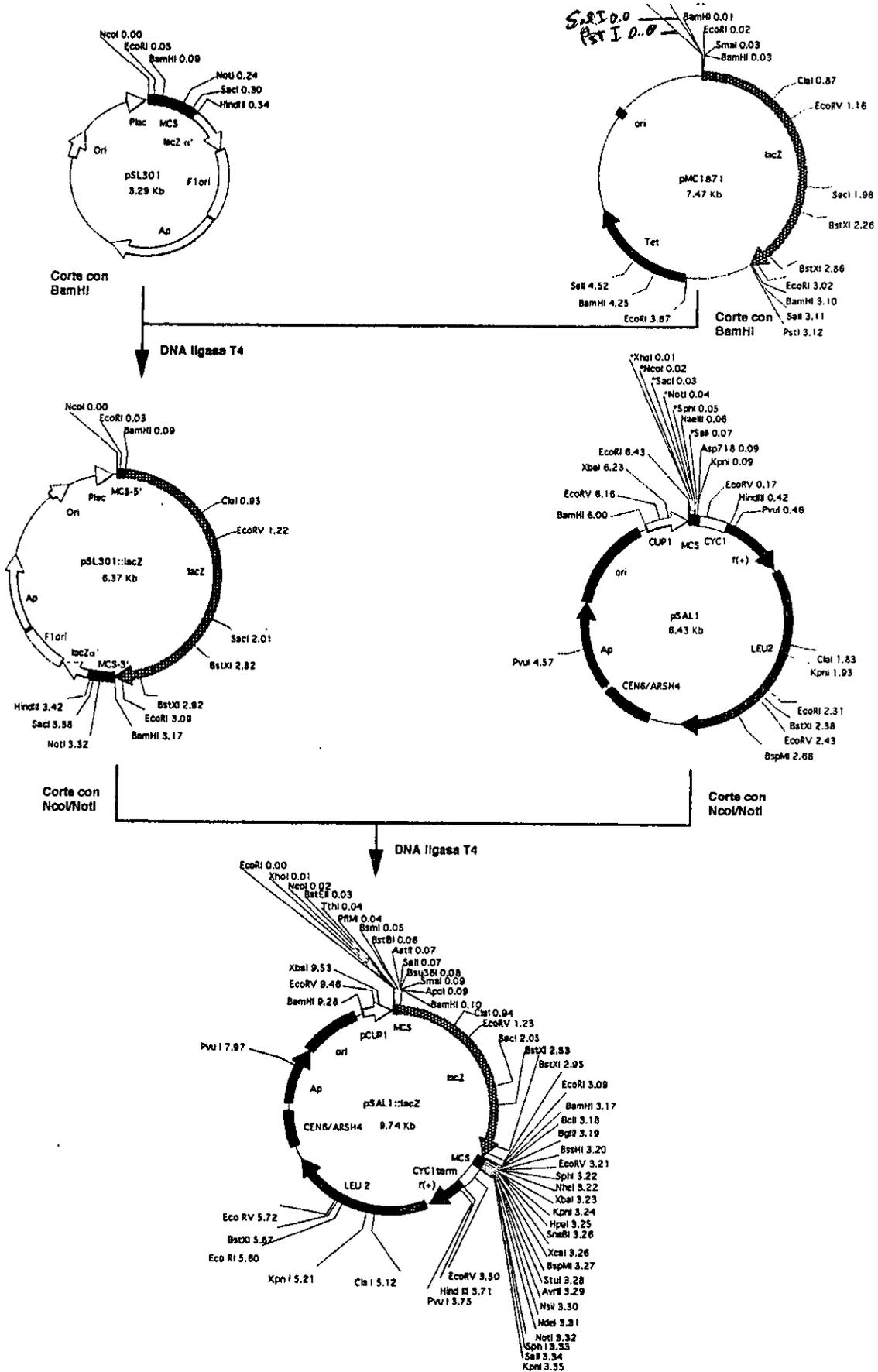


Figura 7. Construcción de pSAL1::lacZ

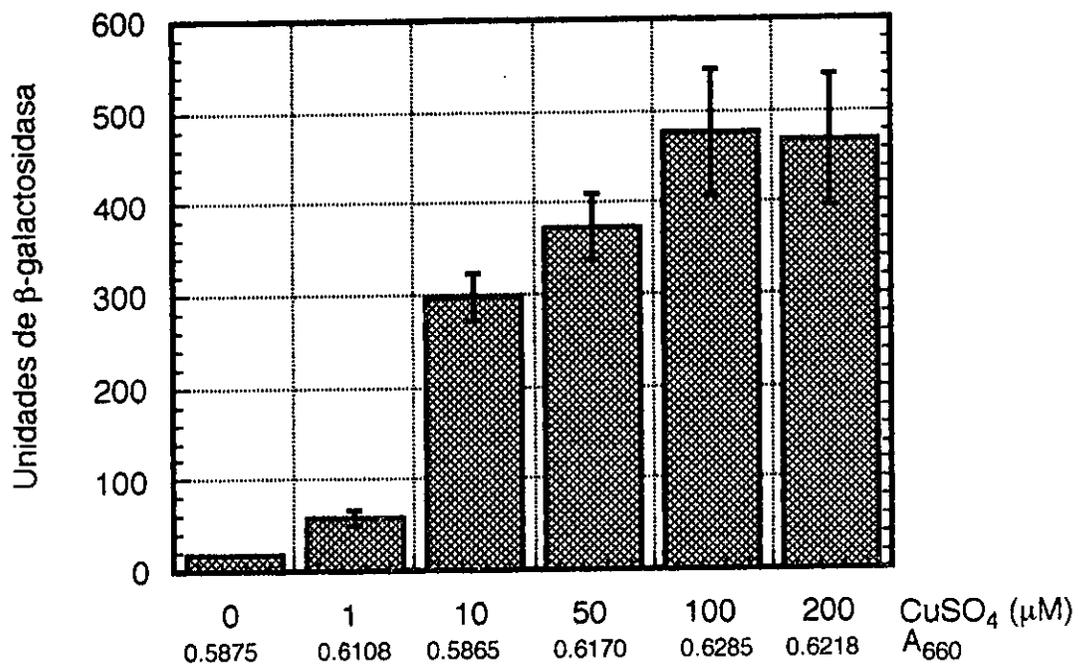


Figura 8. Inducción por cobre de *lacZ* en la construcción pSAL1::*lacZ*

GATCCATTACCGACATTTGGGCGCTATACGTGCATATGTTTCATGTATGTATCT -392
 BamHI
 GTATTTAAAACACTTTTGTATTATTTTCTCATATATGTGTATAGGTTTATACGG -336
 ATGATTTAATTACTTACCACCCTTTATTTTCAGGCTGATATCTTAGCCTTGTT -280
 EcoRV
 ACTAGTTAGAAAAGACATTTTGCTGTCAGTCACTGTCAAGAGATTCTTTTGCT -224
 UAS-CUPI
GGCATTCTTCTAGAAGC AAAAAGAGCGATGCGTCTTTTCCGCTGAACCGTTCC -169
 HSE XbaI
 AGCAAAAAGACTACCAACGCAATATGGATTGTCAGAATCATATAAAAGAGAAG -115
 CAJA TATA
 CAAATAACTCCTTGTCTTGTATCAATTGCATTATAATATCTTCTTGTAGTGAAT -62
 CAJA TATA
 ATCATATAGAAGTCATCGAAATAGATATTAAGAAAAACAACTGTAACGAATTC -8
 EcoRI
 → →
TCGAGCCATGGTGAGCTCTGCGGCCGCTGCATGCTCATGGCCAGTCGACGTAG +46
 XhoI NcoI SacI NotI SphI HaeIII Sall
 TTAAGTAGGTACCAAGATGGCCTTTGGTGGGTGAAGAAGGAAAAAGACAGAA +99
 KpnI
 ACGACTTAATTACCTATTGAAAAAGCCTGTGAGTAAACNGGCCCTTTTCCTTT +154
 GTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACNCTTACATTCACNCCCTCCCCCACAT +209
 EcoRV
 CCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTT +263
 EE
ATTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTCTTT +320
 EE PE poly(A)
 TTTTCTGTACAGACNGTGTAGGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGA +374
 GAAGGTTTGGGANGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTATCG +418
 HindIII ClaI

Figura 9. Secuencia del cassette *CUPI/CYCI* utilizada para construir los vectores pSAL.

Se subrayan los sitios de restricción, los elementos *cis* identificados en *CUPI*, y el polylinker. Además, se indican los dos sitios de inicio de transcripción (→). La numeración de los nucleótidos se inicia hacia atrás y hacia adelante, tomando la A del ATG del sitio *Nco* I como +1. Al clonar en *Nco* I, este ATG funciona como el sitio de inicio de la traducción. La secuencia arriba del polylinker es del promotor *CUPI*, y hacia 3' es del terminador *CYCI*. En *CYCI* se indican los tres sitios EE y PE críticos para una terminación de la transcripción eficiente. El sitio *Cla*I se destruye al clonar en *Pvu* II, pero el sitio *Bam* HI se regenera.

AGCTTCCTGA AACGGAGAAA CATAAACAGG CATTGCTGGG ATCACCCATA CATCACTCTG -884
 Hind III UAS-HSE UAS-RPG
TTTTGCCTGA CCTTTTCCGG TAATTTGAAA ACAAACCCGG TCTCGAAGCG GAGATCCGGC -824
GATAATTACC GCAGAAATAA ACCCATAACAC GAGACGTAGA ACCAGCCGCA CATGGCCGGA -764
 UAS-NTR UAS-RPG
GAAACTCCTG CGAGAATTC GTAAACTCGC GCGCATTGCA TCTGTATTTT CTAATGCGGC -704
ACTTCCAGGC CTCGAGACCT CTGACATGCT TTTGACAGGA ATAGACATTT TCAGAATGTT -644
 (Xho I) UAS
ATCCATATGC CTTTCGGGTT TTTTTCCTTC CTTTTCATC ATGAAAATC TCTCGAGACC -584
 -NTR (Xho I)
GTTTATCCAT TGCTTTTTTG TTGTCTTTTT CCCTCGTTCA CAGAAAGTCT GAAGAAGCTA -524
 UAS-NTR
TAGTAGAACT ATGAGCTTTT TTTGTTTCTG TTTTCCTTTT TTTTTTTTTT ACCTCTGTGG -464
AAATTGTTAC TCTCACACTC TTTAGTTCGT TTGTTTGTGTT TGTTTATTC AATTATGACC -404
 UAS-CCAAT
GGTGACGAAA CGTGGTCGAT GGTGGGTACC GCTTATGCTC CCCTCCATTA GTTTCGATTA -344
 Kpn I UAS-STRE
TATAAAAAGG CCAAATATTG TATTATTTTC AAATGTCCTA TCATTATCGT CTAACATCTA -284
 CAJA TATA
ATTTCTCTTA AATTTTTTCT CTTTCTTTCC TATAACACCA ATAGTGAAAA TCTTTTTTTC -224
 Inicios transcripcion-> ->-> ->
TTCTATATCT ACAAAAACCT TTTTTTCTA TCAACCTCGT TGATAAATTT TTTCTTTAAC -164
AATCGTTAAT AATTAATTAA TTGGAAAATA ACCATTTTTT CTCTCTTTTA TACACACATT -104
CAAAGAAAAG AAAAAAATA TACCCAGCT AGTTAAAGAA AATCATTGAA AAGAATAAGA -44
AGATAAGAAA GATTTAATTA TCAAACAATA TCAATCTCGA GCCATG GTGA GCTCTGCGGC +17
 Xho I Nco I SacI Not I
CGCTGCATGC TCATGGCCAG TCGACGTAGT TAAGTAGGTA CCAAGATGGC CTTTGGTGGG +77
 Sph I Sal I Kpn I
TTGAAGAAGG AAAAAGACAG AAACGACTTA ATTACCTATT GAAAAAGCC TGTGAGTAAA +137
CNGGCCCTT TTCCTTGTC GATATCATGT AATTAGTTAT GTCACNCTTA CATTACNCC +197
 Eco RV
CTCCCCCAC ATCCGCTCTA ACCGAAAAGG AAGGAGTTAG ACAACCTGAA GTCTAGGTCC +257
CTATTTATTT TTTTATAGTT ATGTTAGTAT TAAGAAGTAT ATTTATATTT CAAATTTTTTC +317
 EE EE PE poly (A)
TTTTTTTTTCT GTACAGACNG TGTAGGCATG TAACATTATA CTGAAAACCT TGCTTGAGAA +377
GGTTTTGGGA NGCTCGAAGG CTTTAATTTG CAAGCT +413
 Hind III

Figura 10. Secuencia del cassette *PMA1/CYC1* utilizada para construir los vectores pRS.

La numeración empieza a partir de la A del ATG. Se indican los sitios de inicio de transcripción (->), los elementos cis en el promotor *PMA1*, y en el terminador *CYC1* los tres sitios críticos para una terminación eficiente de la transcripción.

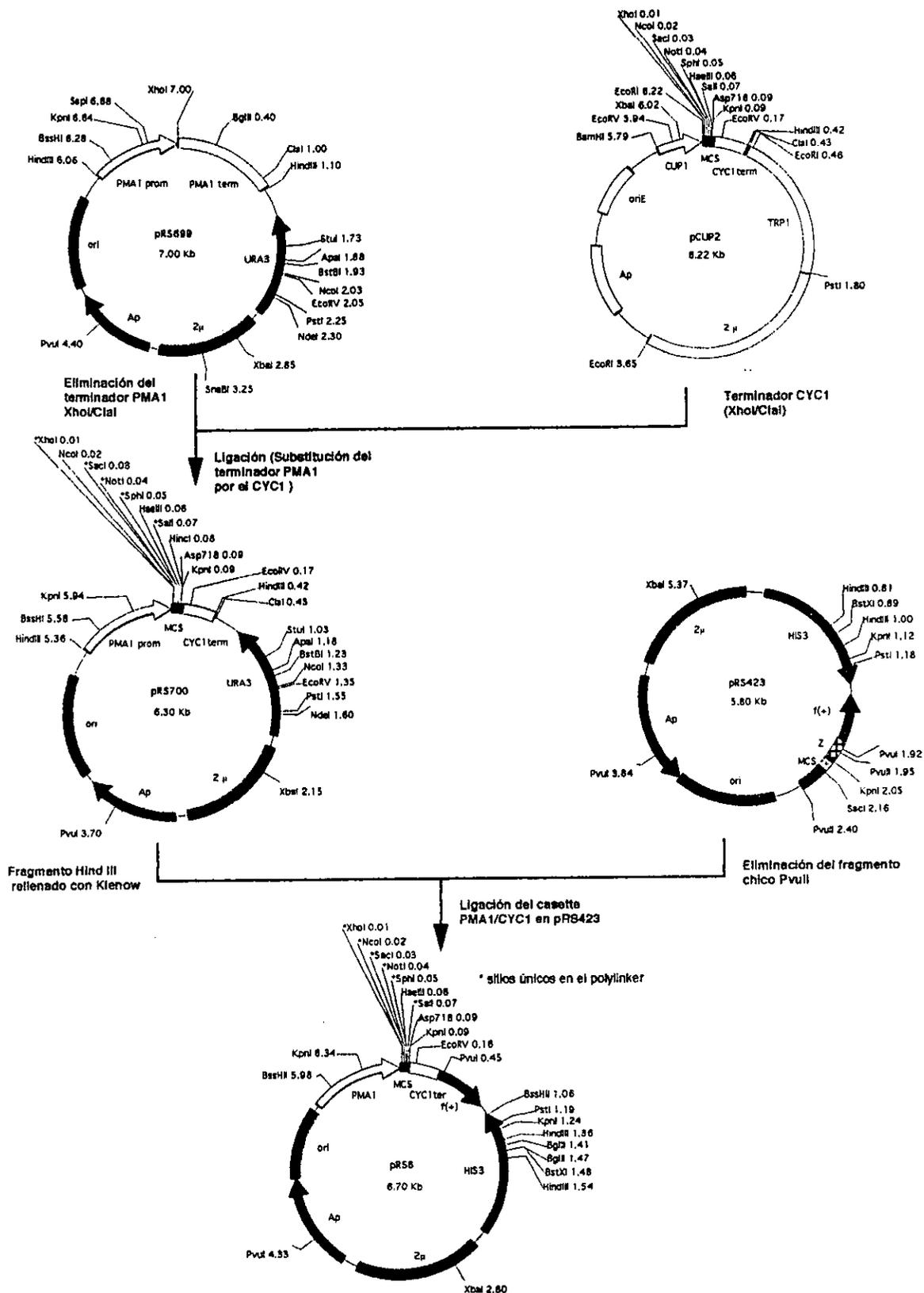


Figura 11. Construcción del vector de expresión pRS6

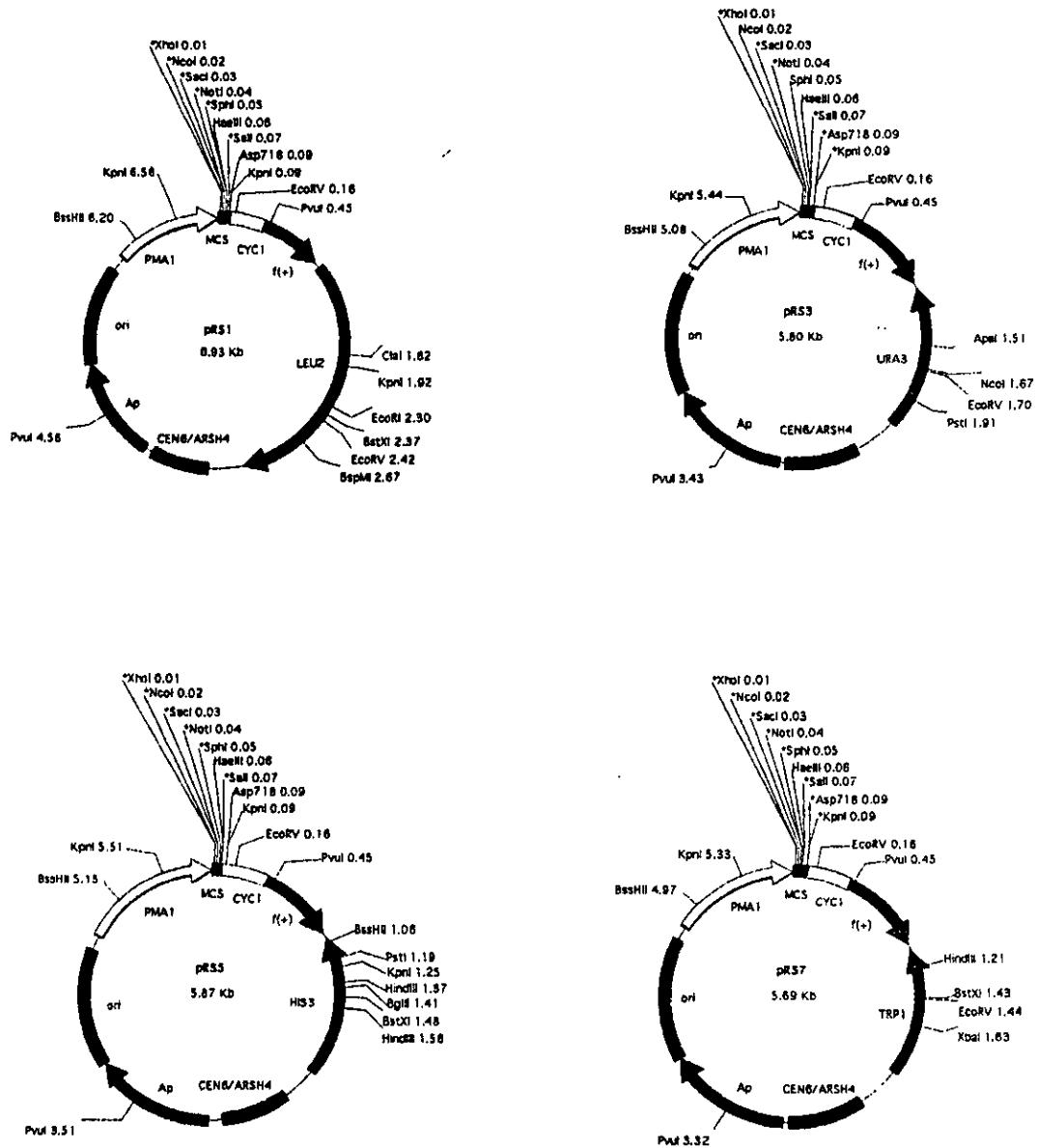


Figura 12. Vectores pRS monocopia

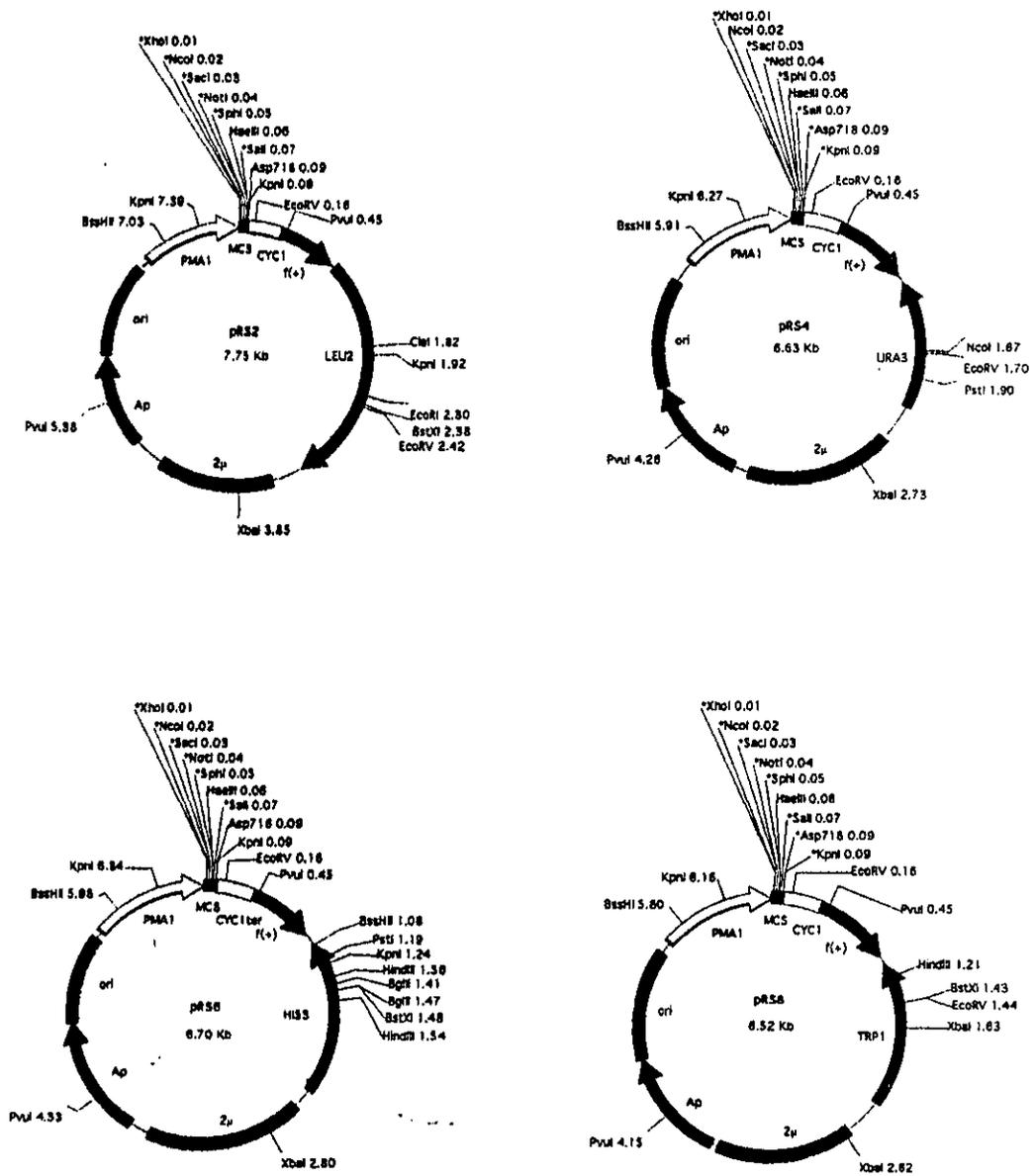


Figura 13. Vectores pRS multicopia

**Tabla 2. VECTORES DE EXPRESION DE LEVADURA
BASADOS EN EL PROMOTOR PMA1**

VECTOR	NO. COPIAS	GEN SELECTOR	VECTOR BASE	POLYLINKER (5'-3')*
--------	------------	-----------------	----------------	------------------------

pRS1	monocopia	LEU2	pRS315	<u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	-----------	------	--------	--

pRS2	multicopia	LEU2	pRS425	<u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	------------	------	--------	--

pRS3	monocopia	URA3	pRS316	<u>XhoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NcoI</u> <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	-----------	------	--------	--

pRS4	multicopia	URA3	pRS426	<u>XhoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NcoI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	------------	------	--------	--

pRS5	monocopia	HIS3	pRS313	<u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	-----------	------	--------	--

pRS6	multicopia	HIS3	pRS423	<u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	------------	------	--------	--

pRS7	monocopia	TRP1	pRS314	<u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	-----------	------	--------	--

pRS8	multicopia	TRP1	pRS424	<u>XhoI</u> , <u>NcoI</u> , <u>SacI</u> , <u>NotI</u> , <u>SphI</u> , <u>Sall</u> .
------	------------	------	--------	--

* Sitios únicos ()

en este trabajo a este tema y también han sido reportados recientemente (Zentella *et al.*, 1999).

Como una caracterización adicional, se hizo una fusión de una versión modificada de la proteína verde fluorescente (SGfp-TYG) (Chalfie *et al.*, 1994 y Chiu *et al.*, 1996); clonando su gen codificante en pRS6, y se observó la expresión en las levaduras utilizando un microscopio de fluorescencia. Las fotografías se muestran en la Figura 12 de la primera parte de este trabajo.

DISCUSION

1. Construcción y caracterización de los vectores pSAL

En esta sección se reporta la construcción de 8 vectores de expresión para levadura basados en el cassette de expresión *CUP1/CYCI*.

La disponibilidad de vectores monocopia y multicopia permite el regular la transcripción al seleccionar uno u otro; y la disponibilidad de vectores con diferentes genes para corregir las auxotrofias más comunes de las cepas experimentales de levadura, permite el tener mayor versatilidad en el uso de estos vectores.

La construcción de toda la serie de vectores fue posible también debido a la disponibilidad de los vectores de clonación previamente construidos y de los cuales se cuenta con las versiones monocopia y multicopia, con los marcadores de auxotrofia más utilizados para la selección de transformantes (Sikorski and Hieter, 1989; Christianson *et al.*, 1992).

La estrategia seguida para construir el vector pSAL1 se ilustra en la Figura 3, y la del resto de los vectores pSAL en la Figura 4. Al pegar el cassette de expresión por extremos romos, se retuvo sólo la orientación que se muestra en los mapas anexos de los vectores (Figuras 5 y 6). En la Tabla 1 se resumen las características de esta serie de vectores.

En el polylinker, en especial son de utilidad los sitios *Nco* I y *Not* I. El primero porque es un sitio que efectivamente es útil para el inicio de traducción en levadura (Amann and Brosius, 1985; Kozak, 1983), y el segundo porque es un sitio de 8 pares de nucleótidos que raramente se encuentra en cDNAs y genes, lo cual lo hace muy útil para clonar fragmentos sin necesidad de añadir adaptadores cuando existe un sitio interno en el inserto (Minet *et al.*, 1992).

Por otra parte, arriba del sitio *Nco* I, están los sitios *Eco* RI y *Xho* I que pueden usarse para hacer fusiones transcripcionales al promotor *CUP1*, si es que se clona un gen con su propio ATG. Debe señalarse que si desea clonar en *Nco* I, o abajo de *Nco* I, hay que procurar que el ATG quede en fase con el resto de la secuencia que se va a traducir, de otra forma el mensaje podría desfasarse y abortar la correcta traducción del mismo.

Para probar la utilidad de los vectores construidos, se clonó el gen *lacZ*

en el vector pSAL1, monocopia con marcador *LEU2*. Como se señala en el artículo anexo (Mascorro-Gallardo *et al.*, 1996), se demostró que la inducción por cobre ocurre en pSAL1::*lacZ* según lo reportado previamente por otros autores, es decir, con una sensitiva respuesta a la adición de cantidades micromolares de cobre, alcanzando un máximo de expresión al añadir 100 μ M de CuSO₄ (Figura 8) (Butt *et al.*, 1984; Thiele and Hamer, 1986).

No se estimó el efecto de otros factores diferentes al cobre sobre la actividad del promotor *CUPI*. En nuestro caso, hubiera sido interesante medir el efecto de la fuente de carbono, puesto que uno de los vectores (pSAL4) fue utilizado para hacer una complementación heteróloga de la mutante *tps1 Δtps2 Δ* con el gen *SITPS1* de *Selaginella*, y uno de los fenotipos complementados fue el de crecimiento en glucosa, condición en la cual se supone ocurriría algo de represión (Thiele and Hamer, 1986; Butt and Ecker, 1987). Tal vez el hecho de haber empleado un vector multicopia haya también contrarrestado esta inhibición.

2. Construcción y caracterización de vectores pRS.

Con el objetivo de contar con un sistema de expresión fuerte para levadura se construyeron una serie de 8 vectores basados en el cassette de expresión *PMA1/CYCI*. La construcción de estos vectores se facilitó porque previamente habíamos elaborado una serie de 8 vectores de expresión basados en el cassette *CUPI/CYCI*, inducible por cobre, del cual se aprovechó el terminador *CYCI* y el polylinker. Ya sea para vectores de clonación o de expresión, la presencia de una gama de sitios de restricción en el polylinker facilita su uso y la clonación de genes o cDNAs para ser correctamente expresados.

Dado que la motivación inicial fue la de hacer un vector de expresión fuerte para expresar en la mutante *tps1 Δ* al gen *SITPS1* de *Selaginella*, nos inclinamos por utilizar el promotor *PMA1*, el cual en general es considerado un vector tan fuerte como el *GALI*, con la ventaja que en presencia de glucosa no se reprime como éste; al contrario, se induce más en presencia de este azúcar (Rao *et al.*, 1993 y García-Arranz *et al.*, 1994), lo cual se encontraba en concordancia con nuestro objetivo de complementar el crecimiento en glucosa de la mutante.

Aunque se ha demostrado que el promotor *PMA1* es fuerte y constitutivamente activo, la fuerza del mismo es modulada por la fuente de carbono. Específicamente, es activado por glucosa a través del factor de transcripción denominado Tuf/Rap1/Grf1, el cual se une a las dos regiones UAS-RPG presentes en el promotor (Capieaux *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1993). El factor Tuf es extremadamente importante en la regulación de genes por glucosa, dado que al menos 45 genes son coordinadamente activados en respuesta a la presencia de glucosa, y estos están involucrados en funciones vitales para el crecimiento celular, como son la traducción, transcripción, glicólisis, transporte y diferenciación celular (Diffey, 1992). Rao *et al.* (1993) determinaron que bajo adición de 2% de glucosa (el contenido estándar en un medio de cultivo) se detecta un incremento evidente en el mRNA de *PMA1* a los 20 minutos, alcanzando este un máximo a los 60 minutos.

García-Arranz *et al.* (1994), compararon el nivel de transcripción del promotor *PMA1* fusionado a *lacZ*, y encontraron que la actividad estimada en fase exponencial fue máxima bajo crecimiento en glucosa (1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína), mientras que bajo crecimiento en galactosa no se abatió del todo, pues mantuvo un nivel de unos 0.45 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, lo cual confirma lo antes expuesto de que el promotor *PMA1* si bien es constitutivo, se encuentra modulado por la fuente de carbono.

En las Figuras 2 y 10, se indican otros elementos que se identificaron al analizar la secuencia del promotor *PMA1*. El hecho que se hayan identificado no significa que sean funcionales, por lo cual se señalan (?) como hipotéticos. Por ejemplo, hay tres secuencias NTR que intervienen en la represión catabólica por nitrógeno. En presencia de una fuente de nitrógeno como amonio los genes con estas secuencias se reprimen y al menos se requieren dos de éstas en tándem para ser activas. Fuentes de nitrógeno menos preferidas por la levadura como la arginina activan a los genes con estos elementos en sus promotores (Smart *et al.*, 1996).

Para caracterizar al menos parcialmente a los vectores pRS, se clonó el gen modificado de la proteína verde fluorescente Gfp, designado como *SGFP-TYG*, mismo que fue alterado por el grupo de Jen Sheen para incrementar la fluorescencia en protoplastos de plantas (Chiu *et al.*, 1996). No se hicieron mediciones cuantitativas de la

fluorescencia. En la Figura 12 de la primera parte de este trabajo, se muestran campos de levaduras en fase exponencial, en medio con glucosa, en que puede apreciarse que, i) la proteína se expresa y es visible su fluorescencia de color verde, y que ii) no todas las células están expresando la proteína verde, al menos al nivel que sea captado por la resolución del microscopio y la cámara fotográfica. Tal vez este nivel de expresión diferencial se deba a variaciones en el ciclo de desarrollo de las levaduras visibles en el campo microscópico. Las fotografías obtenidas con DAPI parecen indicar que las células están en división celular activa, ya que no se aprecia la estructura del núcleo, siendo el ADN de mitocondrias las estructuras brillantes que se aprecian en forma de gránulos (ver la Figura 12 de la primera parte). Al vector pRS6 también se le usó para expresar a los genes *SITPS1*, *AtTPS1* y *ScTPS1* en la mutante *tps1Δ* de levadura (Zentella *et al.*, 1999), lo cual se expone y discute en la primera parte de este trabajo, pudiéndose corroborar con otros genes que los vectores funcionaron correctamente.

Con el fin de determinar si el número de copias del plásmido influye en el nivel de expresión en los vectores pRSs, sería interesante el cuantificar la actividad de *PMA1*, aprovechando uno de los vectores monocopia, como pRS5, ya sea clonando *lacZ*, o con el gen de Gfp.

CONCLUSIONES

Conclusiones sobre los vectores pSAL

- 1) Se construyeron 8 vectores de expresión para levadura que abarcan las variantes monocopia y multicopia y para cada uno, los marcadores de auxotrofia *LEU2*, *URA3*, *HIS3* y *TRP1*.
- 2) Para regular la expresión, se utilizó el cassette *CUP1/CYC1*, con el promotor *CUP1* titulable por cobre, y el terminador *CYC1*.
- 3) Se añadieron más sitios de corte por enzimas de restricción al polylinker, quedando éste constituido por los sitios: *Xho* I, *Eco* RI, *Nco* I, *Sac* I, *Not* I, *Sph* I, *Sal* I y *Kpn* I.
- 4) La presencia del sitio *Nco* I provee de un consenso funcional para el inicio de la traducción, por lo cual en éstos vectores se pueden hacer fusiones transcripcionales o traduccionales.
- 5) Se probó la función del vector pSAL1 (monocopia, *LEU2*) al clonar en fase el gen reportero *lacZ*, y se determinó que se podía controlar el nivel de transcripción añadiendo cantidades micromolares de CuSO_4 en un rango muy por debajo del nivel de toxicidad por cobre para la cepa empleada en los ensayos.
- 6) El máximo nivel de inducción se logró con 100 μM de CuSO_4 y la expresión se incrementó de 20-25 veces en relación a la expresión basal que se logra detectar con el ensayo de la actividad de la enzima β -galactosidasa.
- 7) Estos vectores serán de utilidad para expresar en levadura genes cuyo nivel de expresión sea crítico para el fenotipo de interés, o cuando la sobre-expresión sea tóxica a las células y por lo tanto sea necesario modularla.

8) En caso de requerirse, será posible incrementar el nivel de expresión simplemente utilizando la versión multicopia de estos vectores.

Conclusiones sobre los vectores pRS

- 1) Se construyeron 8 vectores de expresión para levadura basados en el cassette de expresión *PMA1/CYC1*.
- 2) Los vectores construidos, poseen los marcadores de *LEU2*, *HIS3*, *TRP1* y *URA3* para seleccionar por complementación de auxotrofias, cada uno de éstos en versiones monocopia y multicopia.
- 3) Todos los vectores llevan el 'polylinker' con los sitios *Xho I*, *EcoR I*, *Nco I*, *Sac I*, *Not I*, *Sph I* y *Sal I*.
- 4) La presencia del sitio *Nco I*, provee de un ATG funcional para el inicio de la traducción, por lo cual en éstos vectores se pueden hacer fusiones transcripcionales o traduccionales.
- 5) Se probó la eficiencia de estos vehículos llevando a cabo la complementación de la mutante *tps1Δ* de levadura con el gen *SITPS1* de *Selaginella*, con el *AtTPS1* de *A. thaliana* y con el homólogo *ScTPS1* de *S. cerevisiae*.
- 6) Al monitorear la expresión fluorescente de Gfp controlado por el promotor *PMA1*, se observó que la misma no fue uniforme en un cultivo celular en fase exponencial.

PERSPECTIVAS

Perspectivas sobre los vectores pSAL

Con la finalidad de mejorar la caracterización de los vectores pSAL construidos, se podrían hacer los siguientes análisis:

8) En caso de requerirse, será posible incrementar el nivel de expresión simplemente utilizando la versión multicopia de estos vectores.

Conclusiones sobre los vectores pRS

1) Se construyeron 8 vectores de expresión para levadura basados en el cassette de expresión *PMA1/CYC1*.

2) Los vectores construidos, poseen los marcadores de *LEU2*, *HIS3*, *TRP1* y *URA3* para seleccionar por complementación de auxotrofias, cada uno de éstos en versiones monocopia y multicopia.

3) Todos los vectores llevan el 'polylinker' con los sitios *Xho I*, *EcoR I*, *Nco I*, *Sac I*, *Not I*, *Sph I* y *Sal I*.

4) La presencia del sitio *Nco I*, provee de un ATG funcional para el inicio de la traducción, por lo cual en éstos vectores se pueden hacer fusiones transcripcionales o traduccionales.

5) Se probó la eficiencia de estos vehículos llevando a cabo la complementación de la mutante *tps1Δ* de levadura con el gen *SITPS1* de *Selaginella*, con el *AtTPS1* de *A. thaliana* y con el homólogo *ScTPS1* de *S. cerevisiae*.

6) Al monitorear la expresión fluorescente de Gfp controlado por el promotor *PMA1*, se observó que la misma no fue uniforme en un cultivo celular en fase exponencial.

PERSPECTIVAS

Perspectivas sobre los vectores pSAL

Con la finalidad de mejorar la caracterización de los vectores pSAL construidos, se podrían hacer los siguientes análisis:

- 1) Comparar el nivel de expresión en vectores monocopia vs multicopia, mediante medición de actividad de β -galactosidasa.
- 2) Estimar el efecto de la fuente de carbono sobre el nivel de expresión del promotor *CUP1*, probando azúcares como glucosa, galactosa, fructosa y glicerol, ya que se ha propuesto que azúcares como glucosa podrían ejercer una regulación negativa sobre *CUP1*.
- 3) Determinar si realmente β -galactosidasa constituye una buena estimación de la actividad transcripcional de *CUP1*, comparando ésta con los niveles del ARNm de *lacZ* cuantificado por 'northern blot'.
- 4) Complementar la información anterior con 'western blot' utilizando un anticuerpo anti β -galactosidasa, lo cual permitiría correlacionar el nivel de transcripción con los niveles de traducción.

Perspectivas sobre los vectores pRS

Con la finalidad de redondear la caracterización de los vectores pRS construidos, se podrían hacer los siguientes análisis:

- 1) Comparar el nivel de expresión en vectores monocopia vs multicopia, mediante medición de actividad de β -galactosidasa.
- 2) Determinar si realmente β -galactosidasa provee de una buena estimación de la actividad transcripcional de *PMAl*, comparando esta con el ARNm cuantificado por northern, empleando una sonda de *lacZ*.
- 3) Complementar la información anterior con western-blot utilizando un anticuerpo anti β -galactosidasa, lo cual permitiría correlacionar el nivel de transcripción con la traducción del mensajero.

4) Lo que se haga con β -galactosidasa podría llevarse a cabo alternativamente con el reportero que codifica la proteína verde fluorescente (Gfp), pero en este caso, la fluorescencia deberá cuantificarse con un fluorómetro.

5) Adicionalmente, con Gfp podría analizarse *in vivo* la regulación de *PMA1* a través del ciclo de desarrollo, así como el efecto de estímulos externos (fuentes de carbono, de nitrógeno, estímulos ambientales, etc.) sobre la inducción de este promotor.

6) Se identificaron algunos elementos cis en el promotor, como CCAAT, NTR, HSE y STRE que según nuestra información no se han analizado, lo cual dada la importancia del gen *PMA1* y su producto, valdría la pena llevar a cabo mediante análisis de deleciones del promotor fusionado a un gen reportero en un vector monocopia.

BIBLIOGRAFIA

- Amann, E. and J. Brosius. 1985. 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40: 183-190.
- Benito, B., E. Moreno and R. Lagunas. 1991. Half-life of the plasma membrane ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1063: 265-268.
- Butt, T. and D.J. Ecker. 1987. Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiol. Rev.* 51(3): 351-364.
- Butt, T.R., E.J. Sternberg, J.A. Gorman, P. Clark, D. Hamer, M. Rosenberg and S.T. Crooke. 1984. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 3332-3336.
- Capieaux, E., M.-L. Vignais, A. Sentenac and A. Goffeau. 1989. The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* 264: 7437-7446.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward and D.C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- Chang, A. and C.W. Salyman. 1991. Maturation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* 115: 289-295.
- Chen, J.B., J. Sun and S.M. Jazwinski. 1990. Prolongation of the yeast life span by the *v-Ha-RAS* oncogene. *Mol. Microbiol.* 4: 2081-2086.
- Chiu, W.-l., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi and J. Sheen. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6: 325-330.
- Christianson, T.W., R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero and P. Hieter. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119-122.
- Cubitt, A.B., R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross and R.Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS* 20: 448-455.
- Diffley, J.F.X. 1992. Global regulators of chromosome function in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 62: 25-33.
- Ecker, D.J., T. R. Butt, E. J. Sternberg, M. P. Neeper, Ch. Debouck, J.A. Goan and S.T. Crooke. 1986. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* 261: 16895-16900.

- Elledge, S.J., J.T. Mulligan, S.W. Ramer, M. Spottswood and R.W. Davis. 1991. λ YES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1731-1735.
- Eraso, P. and C. Gancedo. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. FEBS Lett. 224: 187-192.
- Etcheverry, T., W. Forrester and R. Hitzeman. 1986. Regulation of the chelatin promoter during the expression of human serum albumin or yeast phosphoglycerate kinase in yeast. Biotechnology 4: 726-730.
- Foguel, S. and J.W. Welch. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5342-5346.
- Foguel, S. W. Welch and M. Karin. 1983. Gene amplification in yeast: *CUP1* copy number regulates copper resistance. Curr. Genet. 7: 1-9.
- Furst, P. and D. Hamer. 1989. Cooperative activation of a eukaryotic transcription factor: interaction between Cu(I) and yeast ACE1 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5267-5271.
- Furst, P., S. Hu, R. Hackett and D. Hamer. 1988. Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. Cell 55: 705-717.
- García-Arranz, M., A.M. Maldonado, M.J. Mazón and F. Portillo. 1994. Transcriptional control of yeast plasma membrane H⁺-ATPase by glucose. J. Biol. Chem. 269: 18076-18082.
- Hamer, D.H., D.J. Thiele and J.E. Lemontt. 1985. Function and autoregulation of yeast copperthionein. Science 228: 685-690.
- Hamer, H.H. Metallothionein. 1986. Ann. Rev. Biochem. 55: 913-951.
- Huibregtse, J.M., D.R. Engelke and D.J. Thiele. 1989. Copper-induced binding of cellular factors to yeast metallothionein upstream activation sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 65-69.
- Karin, M., R. Najarian, A. Haslinger, P. Valenzuela, J. Welch and S. Fogel. 1984. Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUP1* locus of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 337-341.
- Kozak, M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles. Microbiol. Rev. 47: 1-45.

- Liu, X.-d. and D.J. Thiele. 1996. Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes and Dev.* 10: 592-603.
- Macreadie, I.G., M.N. Jagadish, A.A. Azad and P.R. Vaughan. 1989. Versatile cassettes designed for the copper inducible expression of proteins in yeast. *Plasmid* 21: 147-150.
- Macreadie, I.G., O. Horaitis, A.J. Verkuylen and K.W. Savin. 1991. Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu^{2+} mediated expression of foreign genes in yeast. *Gene* 104: 107-111.
- Mascorro-Gallardo, J.O., A.A. Covarrubias and R. Gaxiola. 1996. Construction of a *CUP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172: 169-170.
- Mett, V.L., L.P. Lochhead and P.H.S. Reynolds. 1993. Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4567-4571
- Minet, M., M.-E. Dufour and F. Lacroute. 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 2: 417-422.
- Piper, P.W. 1994. Measurement of transcription. In: *Molecular Genetics of Yeast.* pp. 135-146. J.R. Johnston (ed). IRL Press. 275 pp.
- Rao, R., D. Drummond-Barbosa and C.W. Slayman. 1993. Transcriptional regulation by glucose of the yeast *PMA1* gene encoding the plasma membrane H^+ -ATPase. *Yeast* 9: 1075-1084.
- Rubio, F., W. Gassmann and J.I. Schroeder. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter Hkt1 and mutations conferring salt tolerance. *Science* 270: 1660-1663.
- Seguin, C. and D.H. Hamer. 1987. Regulation *in vitro* of metallothionein gene binding factors. *Science* 235: 1383-1387.
- Serrano, R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 1-28.
- Serrano, R. and J.M. Villalba. 1995. Expression and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*. *Methods Cell Biol.* 50: 481-496.
- Serrano, R., M.C. Kielland-Brandt and G.R. Fink. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, K^+ and Ca^{2+} -ATPases. *Nature* 319: 689-693.

- Sikorski, R.S. and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.
- Silar, P., G. Butler and D.J. Thiele. 1991. Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1232-1238.
- Smart, W.C., J.A. Coffman and T.G. Cooper. 1996. Combinatorial regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* CAR1 (arginase) promoter in response to multiple environmental signals. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5876-5887.
- Sorger, P.K. and H.C.M. Nelson. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59: 807-813.
- Szczyпка, M.S. and D.J. Thiele. 1989. A cysteine-rich nuclear protein activates yeast metallothionein gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 9: 421-429.
- Tamai, K.T., E.B. Gralla, L.M. Ellerby, J.S. Valentine and D.J. Thiele. 1993. Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8013-8017.
- Thiele, D.J. 1988. ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2745-2752.
- Thiele, D.J. and D.H. Hamer. 1986. Tandemly duplicated upstream control sequences mediate copper-induced transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 1158-1163.
- Thorvaldsen, J., A.K. Sewell, Ch.L. McCowen and D.R. Winge. 1993. Regulation of metallothionein genes by the ACE1 and AMT1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 268: 12512-12518.
- Welch, J.W., S. Foguel, G. Cathala and M. Karin. 1983. Industrial yeasts display tandem gene iteration at the *CUP1* region. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1353-1361.
- Winge, D.R., K.B. Nielson, W.R. Gray. and D.H. Hamer. 1985. Yeast metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260: 14464-14470.
- Wright, C.F., D.H. Hamer and K. McKenney. 1988. Autoregulation of the yeast copper metallothionein gene depends on metal binding. *J. Biol. Chem.* 263: 1570-1574.
- Yang, W., W. Gahl and D. Hamer. 1991. Role of heat shock factor in yeast metallothionein gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3676-3681.

Zentella, R., J.O. Mascorro-Gallardo, P. Vand Dijck, J. Folch-Mallol, B. Bonini, Ch. Van Vaeck, R. Gaxiola, A.A. Covarrubias, J. Nieto-Sotelo, J.M. Thevelein and G. Iturriaga. 1999. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol.* 119: 1473-1482.

Zhou, J. and P.B. Goldsbrough. 1994. Functional homologues of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 875-884.