



00591
ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE QUERÉTARO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Instituto de Biotecnología

**PAPEL DE LA TREHALOSA 6-FOSFATO SINTASA
EN LA PERCEPCIÓN DE AZÚCARES
EN PLANTAS**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:**

M. EN B. NELSON AVONCE VERGARA

Director de Tesis

Dr. GABRIEL ITURRIAGA DE LA FUENTE

CUERNAVACA MORELOS, JUNIO 2005.

m. 345666



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: NELSON AVONCE
VERDARA
FECHA: 13 DE JUNIO 2005

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue dirigida por el Dr. ~~Gabriel Iturriaga de la Fuente~~ y se desarrolló en el departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología-UNAM, en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM y en el Laboratory of Molecular Cell Biology de la Universidad Católica de Leuven, Bélgica.

Al comité tutorial:

Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente.

Dra. Patricia León Mejía.

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres.

Al comité revisor de tesis:

Dr. Mario Rocha Sosa.

Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente

Dr. David Romero Camarena

Dr. Omar H. Pantoja Ayala

Dr. Joseph Dubrovsky

Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Dra. Gladys Cassab López

Esta tesis fue apoyada por:

CONACyT, No. 84202

PADEP-UNAM, Proyecto No.202302

DGEP-UNAM, No. de Cuenta 9380833-4

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera han apoyado la realización de esta tesis.

Especialmente:

A Gabriel Iturriaga, por dirigir este trabajo y por todas sus enseñanzas, he tenido un buen maestro.

A mis padres, por ser el eje y enorme ejemplo de vida, y a mis hermanos por todo su apoyo.

A mis suegros, por todo su tiempo, consejos y apoyo incondicional. A Abril, Ricardo y Betty Calzada, por todos los momentos compartidos.

A mis amigos, Blanca, Edgar, Claudia, Renaud, Raúl, Alba, Lorenzo, Oscar, Magda, Agustín, Toño, Luis, Cinthia y Mario, por haber hecho mucho más fácil soportar el tedio del tiempo, y compartir los viajes, carcajadas, aventuras, juegos, etc. Han sido pieza fundamental durante estos años.

A Enrique Morett, por su amistad y por darme la oportunidad de colaborar con él.

A Johan, Patrick, Barbara, Joris, Hilde, Frank y a todos los del laboratorio en Leuven, por todo el apoyo recibido y hacer más cálidas las estancias en Leuven.

A Betty, por todo el amor, cariño y comprensión de cada día, contigo la vida es bella.

A los bigotes que me han acompañado en los últimos años.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a la memoria de mi madre, Martha Adelina Vergara Ruíz quien me puso enorme ejemplo de superación.

A mi padre, Omar Avonce Coria, cuando sea grande quiero ser como tu.

A la cofundadora de mi nueva familia, con todo mi respeto y cariño, mi esposa Betty.

| INDICE | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 3 |
| 1. Propiedades de la trehalosa | 3 |
| 2. Biosíntesis y degradación de trehalosa | 4 |
| 3. Estructura de los genes <i>TPS</i> y <i>TPP</i> | 7 |
| 4. Usos biológicos de la trehalosa | 8 |
| 5. Trehalosa en plantas | 9 |
| 6. Percepción de azúcares en levaduras | 11 |
| 7. Percepción de azúcares en plantas | 14 |
| 8. Señalización de azúcares vía hexocinasa | 16 |
| 9. Señalización de azúcares independiente de hexocinasa | 18 |
| 10. Mutantes con respuestas alteradas a azúcares | 19 |
| 11. Papel de la síntesis de trehalosa en los procesos de percepción y señalización de azúcares en plantas | 20 |
| HIPÓTESIS | 23 |
| OBJETIVOS | 23 |
| RESULTADOS: | 24 |
| 1. "The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling". Plant Physiology 2004. 136 (3):3649-59. | 25 |
| 2. "Trehalose metabolism and glucose sensing in plants". Biochemical Society Transactions 2005. 33 (1): 276-279. | 36 |

| | |
|--|----|
| 3. “Construcción y caracterización funcional de genes quiméricos con dominios TPS y TPP” | 40 |
| 3.1 Introducción | 40 |
| 3.2 Objetivos | 41 |
| 3.3 Resultados y discusión | 41 |
| 3.3.1 Construcción y evaluación de genes quiméricos | 41 |
| 3.3.2 La proteína quimérica ScTPS1/ScTPS2 es una proteína bifuncional | 48 |
| 3.4 Conclusiones | 51 |
| 3.5 Material y métodos | 51 |
| 3.5.1 Construcción de genes quiméricos | 51 |
| 3.5.2 Complementación de las mutantes <i>tps1Δ</i> , <i>tps 2Δ</i> y <i>tps 1Δ- tps 2Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> | 53 |
| 3.5.3 Determinación del contenido trehalosa | 54 |
| 3. 5.4 Determinación de la actividad enzimática de los dominios TPS | 55 |
| 4. “La trehalosa: Una molécula antigua con múltiples funciones” | 56 |
| 4.1 Introducción | 56 |
| 4.2 Objetivos | 57 |
| 4.3 Resultados y discusión | 57 |
| 4.3.1 Las proteínas de síntesis de trehalosa se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. | 57 |
| 4.3.2 Filogenia del dominio TPS | 63 |
| 4.3.3 El sitio activo de la proteína OTSA es altamente conservado | 70 |
| 4.3.4 Relación filogenética entre los dominios TPS y TPP | 72 |
| 4.3.5 Filogenia del dominio TPP | 75 |
| 4.3.6 Conservación de regiones características de proteínas fosfatasa en dominios TPP | 79 |
| 4.3.7 Relación filogenética entre dominios TPP y TPS | 81 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.8 Determinación de la tasa de substitución de mutaciones en proteínas | |
| TPS eucariontes | 83 |
| 4.3.9 Análisis de la expresión de genes <i>TPS</i> y <i>TRE1</i> en <i>A. thaliana</i> | 86 |
| 4.4 Conclusiones | 91 |
| 4.5 Material y métodos | 91 |
| DISCUSIÓN GENERAL | 93 |
| CONCLUSIONES | 102 |
| PERSPECTIVAS | 103 |
| LITERATURA CITADA | 105 |
| INDICE DE TABLAS | 116 |
| INDICE DE FIGURAS | 116 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 118 |

RESUMEN

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces $1\alpha-1\alpha$, se encuentra en muy diversos organismos como bacterias, hongos, nemátodos, insectos, plantas y mamíferos. Existen al menos cinco vías de biosíntesis de trehalosa. La más ampliamente estudiada consiste en dos pasos enzimáticos mediados por las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP). La primera cataliza la síntesis de trehalosa 6-fosfato (T6P), mientras que la enzima TPP defosforila la trehalosa 6-fosfato produciendo trehalosa y fósforo inorgánico. Se han descrito diversos usos de la trehalosa en la naturaleza, como soluto compatible, componente de reserva, componente estructural de paredes celulares, entre otros. En los últimos años ha sido descubierto que la trehalosa es producida en gran cantidad de organismos, entre ellos las plantas donde no sólo es utilizado como agente protector de estructuras celulares, sino que el metabolismo de trehalosa participa activamente en el desarrollo y percepción de azúcares. En éste trabajo se estudió el papel de la trehalosa 6-fosfato sintasa en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Así mismo, se caracterizó funcionalmente una enzima quimérica bifuncional generada por la fusión de dominios TPS y TPP, y se realizó la filogenia de las proteínas TPS y TPP. Los resultados muestran que la síntesis de trehalosa participa en los mecanismos de señalización de azúcares mediados por la vía de hexocinasa (*HXKI*), controlando la expresión de genes relacionados con fotosíntesis (*CABI*) y hormonas (*ABI4*) lo que confiere (al menos en parte) fenotipos de insensibilidad a glucosa y ABA y tolerancia a estrés por sequía. Por otro lado, la fusión artificial de los dominios TPS y TPP de *Saccharomyces cerevisiae* en una proteína bifuncional indica que ésta es capaz de complementar las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ*, *tps1Δ/tps2Δ* de *S. cerevisiae*, conservando sus actividades de trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa y por lo tanto capaz de sintetizar trehalosa. Se encontró que las proteínas TPS y TPP han mantenido una estrecha relación filogenética a lo largo de su evolución, fundiéndose en una sola proteína en la mayoría de las proteínas TPS eucariontes. Al parecer la mayoría de los miembros de la familia TPS en *Arabidopsis thaliana* no conservan la actividad de trehalosa sintasa, sin embargo están sujetas a presión selectiva y su expresión es regulada temporal y espacialmente, controlando los niveles de T6P en plantas.

ABSTRACT

Trehalose is a non-reducing disaccharide consisting of two glucose molecules linked by $1\alpha-1\alpha$, it is present in very different organisms such as bacteria, fungi, nematodes, insects, plants and mammals. Trehalose have at least five biosynthesis pathways, the best characterized consist of two steps mediated by trehalose 6-phosphate synthase (TPS) and trehalose 6-phosphate phosphatase (TPP) enzymes, the first catalyse the synthesis of trehalose 6-phosphate (T6P). The TPP dephosphorylates T6P to form trehalose and Pi. Several functions have been described for trehalose in nature, such as compatible solute, storage compound and structural part of cell walls. Recently, it has been discovered that trehalose is produced in many organisms, among them the plants where a new role for trehalose in development and sugar sensing has been described. In this work we analyzed the role of trehalose 6-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana*, also we present the characterization of a bifunctional construct generated by the fusion of TPS and TPP domains and a phylogenetic study of the TPS and TPP proteins. The results show that trehalose synthesis is involved in the signaling pathway mediated by hexokinase (*HXK1*) enzyme and is able to control the expression of photosynthesis (*CABI*)- and hormone related genes (*ABI4*)- which (at least in part) is responsible to confer glucose and ABA insensitivity and drought tolerance phenotypes. The bifunctional ScTPS/ScTPP was able to complement the *S. cerevisiae tps1*Δ, *tps2*Δ, *tps1*Δ/*tps2*Δ mutants, indicating that the protein conserved both enzymatic activities. This is the first bifunctional TPS/TPP enzyme made from eukaryotic domains. The TPS and TPP proteins have been phylogenetically close related in their evolution, forming a single protein in eukaryan. Apparently, the most of TPS proteins from Arabidopsis do not conserved trehalose synthase activity, however because they are under selection pressure and are also regulated in development and tissue-specific ways, we propose that these are a functional proteins that probably participates in regulation of T6P levels.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Propiedades de la trehalosa.

La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces $1\alpha-1\alpha$ (Fig. 1). Esta fue descrita por M. Berthelot en el siglo XIX al caracterizar un disacárido presente en los huevos del escarabajo del género *Larinus*, mismos que fueron utilizados en la medicina durante el imperio Otomano y conocidos entonces como “trehala” de ahí que Berthelot llamó al azúcar “trehalosa” (Singer and Lindquist 1988). La trehalosa se encuentra de forma natural en muchos de los alimentos consumidos en la dieta del ser humano, entre otros: hongos, pan, cerveza, vino, vinagre, miel y semillas (Roser 1991).

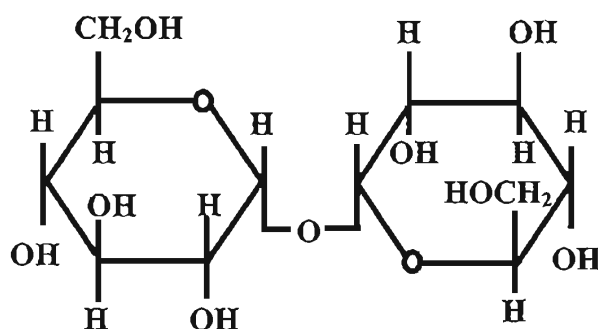


Figura 1. La trehalosa esta compuesta por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces $1\alpha-1\alpha$.

En un principio, la presencia de trehalosa fue asociada principalmente a organismos anhidrobiontes (Schiraldi *et al* 2002). Esta clase de organismos, donde se incluyen las “plantas de resurrección” (como *Selaginella lepidophylla*), crustáceos (*Artemia salina*), la levadura de pan (*Saccharomyces cerevisiae*), algunos nemátodos (*Ditylenchus dipsaci*) y tardígrados (*Adoribiotus coronifer*), tienen la increíble capacidad de sobrevivir durante años a niveles de deshidratación extrema (Gaff 1971, Weisburd 1988, Colaço *et al* 1992). Hoy en día sabemos que la trehalosa no sólo se encuentra en los organismos anhidrobiontes, sino que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, organismos

tan diversos como bacterias, hongos, nemátodos, insectos, plantas y mamíferos contienen genes funcionales que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de la trehalosa (Elbein *et al* 2003, Goddijn and van Dun 1999)

2. Biosíntesis y degradación de trehalosa.

La evolución ha generado varias vías de síntesis de trehalosa, las cuales se caracterizan por tener diferentes sustratos, intermediarios y enzimas. Hasta hace poco tiempo la literatura sobre el tema contemplaba sólo una vía de síntesis, sin embargo el metabolismo de trehalosa ha mostrado ser ampliamente requerido y variado en los organismos de tal manera que algunos de ellos presentan más de una forma de hacer trehalosa. La primera descrita y al mismo tiempo la más ampliamente distribuida en bacterias, hongos, insectos y plantas fue elucidada en levaduras (Cabib and Leloir 1958), ésta involucra dos pasos enzimáticos mediados por las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) y trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP). La enzima TPS cataliza la transferencia de glucosa de UDP-glucosa a glucosa 6-fosfato para formar trehalosa 6-fosfato (T6P) y UDP. La enzima TPP defosforila la trehalosa 6-fosfato produciendo de esta manera la trehalosa y fósforo inorgánico (Fig. 2a) (Elbein *et al* 2003, De Smet *et al* 2000).

En la segunda vía de síntesis, la enzima trehalosa sintasa (TS) convierte el enlace α 1-4 de la maltosa en α 1- α 1 de la trehalosa (Fig. 2b). La trehalosa sintasa fue reportada por primera vez en la bacteria *Pimelobacter sp*, ortólogos a esta proteína han sido reportados en bacterias, insectos, nemátodos y mamíferos (Higashiyama 2002, Elbein *et al* 2003, este trabajo).

La tercera vía de síntesis involucra la conversión de maltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón) en trehalosa. Esta vía de síntesis fue reportada por primera vez en archaeas termofílicas del género *Sulfolobus*. Estas sintetizan trehalosa mediante dos pasos enzimáticos mediados por las enzimas maltooligosil trehalosa sintasa (MTSasa) que cataliza la transglicosilación del residuo de glucosa en el extremo reductor

de maltodextrinas de α 1-4 a α 1- α 1 produciendo la maltooligosiltrehalosa, la cual contiene un residuo de trehalosa en el extremo de la cadena. Posteriormente la enzima maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (MTHasa) cataliza la hidrólisis de éste producto liberando la trehalosa (Fig. 2c) (Elbein *et al* 2003, Streeter and Bhagwat 1999).

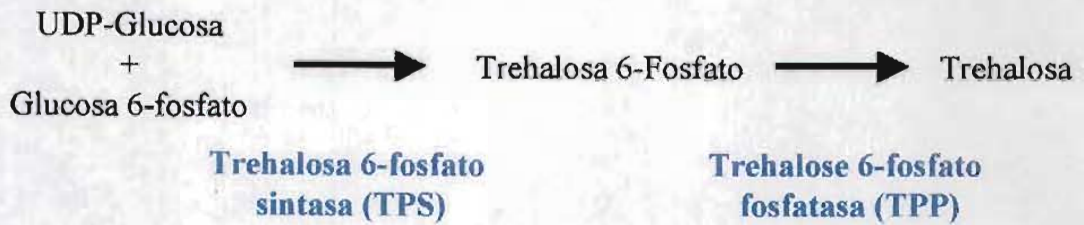
Existen reportes de al menos otras dos nuevas vías de síntesis de trehalosa. Una de ellas involucra la actividad de la enzima trehalosa fosforilasa que ha sido encontrada en hongos. Esta enzima cataliza la reacción reversible que hidroliza trehalosa en presencia de fosfato inorgánico, transfiere una molécula de glucosa al fosfato y genera de esta manera glucosa 1-fosfato y libera la otra molécula de glucosa (Fig. 2d). Existe polémica entre si la enzima trehalosa fosforilasa participa en la síntesis o en la degradación de la trehalosa, ya que la reacción de síntesis sólo se ha demostrado *in vitro* (Wannet *et al* 1998, Schiraldi *et al* 2002).

Recientemente se encontró en la archaea hipertermofílica *Thermococcus litoralis* una nueva vía de síntesis de trehalosa. La enzima trehalosa glicosiltransferasa sintasa (TreT) cataliza reversiblemente la formación de trehalosa a partir de ADP-glucosa y glucosa, también puede utilizar UDP-glucosa y GDP-glucosa, aunque es menos efectiva. La enzima transfiere la glucosa de la ADP-glucosa y lo une en la posición 1 de la otra molécula de glucosa para formar la trehalosa (Fig. 2e) (Qu *et al* 2004).

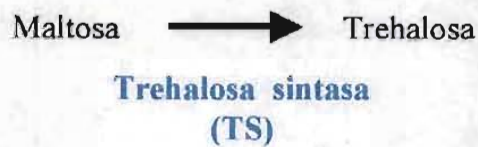
La degradación de trehalosa es realizada por una enzima altamente específica conocida como Trehalasa, la cual hidroliza la trehalosa dando como resultado dos moléculas de D-glucosa (Fig. 2f) (Elbein *et al* 2003). La trehalasa fue identificada por primera vez en *Aspergillus niger*, y ha sido aislada de decenas de otros organismos, usualmente de los mismos organismos capaces de sintetizar trehalosa. Resulta interesante que la trehalasa ha sido también aislada de organismos que aparentemente no sintetizan trehalosa o donde no ha sido posible detectarla. En el intestino delgado de varias especies de mamíferos (incluyendo al *Homo sapiens*) es posible encontrar la enzima trehalasa, esto se explica porque la trehalosa es consumida en la dieta y es degradada a D-glucosa para su asimilación. Sin embargo, actividad enzimática de trahalasa es detectada también en la

corteza renal, suero, orina, hígado, bilis y linfocitos humanos (Elbein 1974, Sasai-Takedatsu *et al* 1996, Richards *et al* 2002).

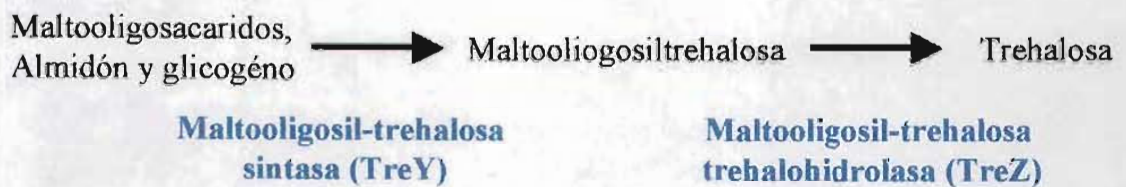
a)



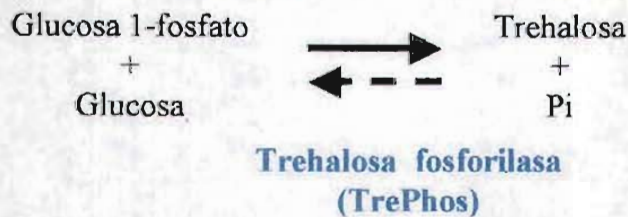
b)



c)



d)



e)



f)



Figura 2. Las cinco vías de síntesis y degradación de la trehalosa. Las enzimas son indicadas en azul.

3. Estructura de los genes *TPS* y *TPP*.

A la fecha existen múltiples reportes de genes *TPS* y *TPP* de diversos organismos como archaeas, eubacterias, hongos, insectos, nemátodos y plantas. En procariontes los genes *TPS* y *TPP* frecuentemente se encuentran cercanos uno del otro, probablemente formando parte de la misma unidad transcripcional. La proteína TPS de *E. coli* (también conocida como OTSA) consta de 474 aminoácidos y forma parte de una familia de dominios proteicos conocida como Pfam: Glyco_Transf_20 según el servidor SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Los dominios miembros de esta familia tienen un promedio cercano a los 475 aminoácidos y se caracterizan por su alta homología a la proteína OTSA, la cual es capaz de sintetizar trehalosa 6-fosfato + UDP utilizando UDP-Glucosa y Glucosa 6-fosfato. No todos los miembros de la familia son capaces de sintetizar T6P; por ejemplo en *S. cerevisiae* existen 4 proteínas que cuentan con el dominio, sin embargo sólo una de ellas (ScTPS1) sintetiza T6P, otras dos funcionan como elementos regulatorios del complejo de síntesis de trehalosa y la última es la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) que cuenta en su extremo amino terminal con un dominio inactivo de Glyco_Transf_20 (Bell *et al* 1998).

Las proteínas con dominios TPP se agrupan en la familia Pfam: Trehalose_PPase, estos son dominios de aproximadamente 260 aminoácidos y se caracterizan por su alta homología a la proteína TPP (también conocida como OTSB) de *E. coli*, la cual es capaz de defosforilar a la trehalosa 6-fosfato produciendo trehalosa y ortofosfato.

En organismos eucariontes, los dominios Glyco_Transf_20 y Trehalose_PPase se encuentran fusionados en una sola proteína. Aunque ambos dominios conservan su similitud a nivel de secuencia con los de su familia, parece que no conservan su actividad enzimática; en un estudio donde se disectaron los dominios TPS y TPP de la proteína SITPS1 de *Selaginella lepidophylla*, sólo el dominio TPS mostró actividad enzimática en las mutantes *tps1*Δ, *tps1*Δ-*tps2*Δ de *S. cerevisiae* (Zentella *et al* 1998).

Además de los dominios TPS y TPP fusionados en la misma proteína, algunas cuentan con secuencias accesorias que pueden tener funciones importantes; por ejemplo, se demostró en dos proteínas de plantas (AtTPS1 y SlTPS1) que una región de 100 aminoácidos presente en el extremo amino terminal de éstas proteínas es capaz de regular la actividad enzimática de la proteína al ser expresadas en *S. cerevisiae*. Cuando se removió esta región se observó un aumento de 10 y 40 veces más en la actividad enzimática y de 20 y 40 veces más en la acumulación de trehalosa con respecto a las proteínas completas, lo que sugiere que esta región de 100 aminoácidos es capaz de regular negativamente la actividad enzimática en ambas proteínas TPS (Van Dijck *et al* 2002).

4. Usos biológicos de la trehalosa.

Al ser la trehalosa un disacárido no reductor, se encuentra entre los azúcares menos reactivos químicamente; es también altamente termoestable y resistente a un amplio rango de pH (Higashiyama 2002, Schiraldi *et al* 2002). Estas características han hecho que sea un azúcar ampliamente utilizado en la naturaleza y cumpla con diferentes propósitos, los cuales dependen del sistema biológico analizado.

En procariontes, la trehalosa sintetizada *in vivo* es frecuentemente utilizada como un soluto compatible para contender con el estrés osmótico. También se ha reportado que puede ser utilizada como fuente externa de carbono, *E. coli* y *B. subtilis* por ejemplo son capaces de crecer en presencia de trehalosa como fuente única de carbono en el medio de cultivo (Strøm and Kaasen 1993, Horlacher and Boss 1997, Argüelles 2000). En bacterias de los generos *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*, la trehalosa forma parte de los glicolípidos de la pared celular (De Smet *et al* 2000, Argüelles 2000, Richards *et al* 2002).

En levaduras y hongos, la trehalosa ha sido propuesta como componente de reserva; llegando a almacenarse hasta en más del 20% del peso seco en algunas estructuras celulares (Elbein 1974, Thevelein 1984). La acumulación de trehalosa es un factor crucial en la respuesta adaptativa de las levaduras a diferentes tipos de estrés, como son el salino,

térmico, hidrico, osmótico y oxidativo (Hounsa *et al* 1998, De Virgilio *et al* 1994, Hottiger *et al* 1994, Singer and Lindquist 1988, Argüelles 2000). En algunos casos, se requiere la acumulación de trehalosa para que la infección de patógenos de plantas sea eficiente, tal es el caso de *Magnaporthe grisea* y *Plasmodiophora brassicae* (Brodmann *et al* 2002, Foster *et al* 2003). También ha sido demostrado que el intermediario en la síntesis de trehalosa, la trehalosa 6-fosfato, es un regulador metabólico del flujo de glucosa durante la glucólisis en levaduras (Thevelein and Hohmann 1995, Neves *et al* 1995, Hohmann *et al* 1996, Gancedo and Flores 2004).

En condiciones de deshidratación, la trehalosa es capaz de estabilizar y proteger estructuras celulares como membranas y proteínas, lo que permite a los organismos anhidrobiontes sobrevivir después de ciclos de deshidratación-rehidratación (Weisburd 1988, Colaço *et al* 1992). En los insectos, la trehalosa es utilizada como reserva de energía, siendo el azúcar más abundante en la hemolinfa (80-90%) y músculos del tórax, y esta es consumida durante el vuelo (Becker *et al* 1996, Richards *et al* 2002).

5. Trehalosa en plantas.

Hasta hace poco tiempo se creía que en las plantas la trehalosa era sólo sintetizada en las llamadas de resurrección, como *Selaginella lepidophylla* y *Myrothamnus flabellifolius*, donde es claro la importancia de la trehalosa en la protección contra el estrés, especialmente por sequía. Sin embargo, hace algunos años se reportaron datos que indican que la trehalosa podría encontrarse no sólo en las plantas altamente especializadas en tolerar la sequía, sino en otras no tolerantes y donde la trehalosa podría tener una función distinta. Hoy en día se postula que la síntesis de trehalosa es esencial y ubicua en el reino vegetal (Eastmond and Graham 2003, Eastmond *et al* 2003). Los primeros experimentos que mostraron que la trehalosa es sintetizada en otras plantas además de las de resurrección, fueron realizados con el objetivo de conferir tolerancia al estrés por deshidratación. Se obtuvieron plantas de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* sobreexpresando los genes de síntesis de trehalosa de *S. cerevisiae* y *E.coli* (Holmström *et al* 1996, Goddijn *et al* 1997). De manera sorpresiva cuando las plantas silvestres utilizadas como control, se

trataron con un inhibidor de la trehalasa (validamicina A), los niveles de trehalosa se incrementaron y desde luego también en las plantas transgénicas (Goddijn *et al* 1997). Así mismo, las plantas transformadas con estos genes *TPS* heterólogos mostraron fenotipos pleiotrópicos como el enanismo, hojas lanceoladas y baja producción de semillas, entre otros. Características similares fueron reportadas por otro grupo de investigación que sobreexpresó el gen *TPS* de *S. cerevisiae* en tabaco, donde además del fenotipo aberrante, se encontró tolerancia a la sequía en las plantas transgénicas (Romero *et al* 1997).

Los estudios previos con plantas transgénicas mostraron que los niveles de trehalosa alcanzados fueron siempre bajos. En tabaco, la introducción del gen *TPS1* de levadura bajo el control transcripcional del promotor de la subunidad menor de Rubisco, resultó en la acumulación de entre 0.08 y 0.32% del peso seco de la planta, tanto en la raíz como en las hojas de las plantas transgénicas (Holmström *et al* 1996). La sobreexpresión de *TPS1* de levadura en plantas de tabaco bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor reportó niveles sólo del 0.017% del peso seco de la planta (Romero *et al* 1997). Datos similares fueron encontrados al sobreexpresar en tabaco los genes de síntesis de trehalosa de *E. coli*, *TPS* y *TPP* bajo el control del promotor 35S donde se logró una acumulación del 0.02% de peso seco (Pilon-Smits *et al* 1998), y 0.0011% de peso fresco (Goddijn *et al* 1997). En plantas de papa (*Solanum tuberosum*) transformadas con esta misma construcción se reportó un incremento de hasta 3.3 veces la cantidad de trehalosa en las plantas transgénicas con respecto a las silvestres (Yeo *et al* 2000) y de 0.004 % cuando se utilizó validamicina A, un potente inhibidor de la trehalasa (Goddijn *et al* 1997).

Los bajos niveles de trehalosa generados en plantas transgénicas sugieren que la trehalosa no tiene un uso como osmoprotector (Gaff 1996) o agente estabilizador de estructuras celulares, especialmente si se comparan contra los niveles de trehalosa encontrados en las plantas de resurrección como *S. lepidophylla*, que alcanza 12% de peso seco durante la deshidratación, cantidad suficiente para proteger estructuras celulares (Goddijn and van Dun 1999).

Los fenotipos observados y la alta actividad de la trehalasa indicaban que el metabolismo de trehalosa en las plantas estudiadas debía ser muy cuidadosamente controlado, ya que pequeños cambios en su concentración provocaban cambios morfológicos drásticos, sugiriendo que el metabolismo de trehalosa tiene un papel importante en la regulación del desarrollo en las plantas (Goddijn and Smeeekens 1998, Goddijn and van Dun 1999), así como en la distribución de carbono en los tejidos fuente y poza, llevando a la propuesta de que algunos aspectos del metabolismo de la trehalosa podrían estar implicados en los procesos de señalización por azúcares (Eastmond and Graham 2003).

6. Percepción de azúcares en levaduras.

La glucosa es el monosacárido más abundante en la naturaleza, y también la elección primaria en la mayoría de los organismos para utilizarlo como fuente de energía; aunque dispongan de otros azúcares, consumen primero la glucosa disponible y posteriormente los alternativos (Johnston 1999, Rolland *et al* 2001). Un buen ejemplo es *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha desarrollado sofisticados mecanismos de regulación para contender con las cambiantes concentraciones de glucosa disponible en el medio, y aprovechar su condición de organismo fermentativo al asegurar que la mayor parte de la glucosa disponible sea fermentada (inhibiendo la respiración) con la subsiguiente producción de etanol y dióxido de carbono (Gancedo 1998, Carlson 1999, Johnston 1999).

Cuando se adiciona glucosa o fructosa a cultivos de *S. cerevisiae*, las células experimentan diferentes ajustes bioquímicos y moleculares, entre otros se presentan cambios en la actividad enzimática, decremento en la concentración y en la tasa de traducción de algunos RNAs mensajeros y sobre todo cambios sustanciales en la expresión genética. Este reordenamiento metabólico conduce a la célula a cambiar de un estado de respiración a un metabolismo fermentativo (Thevelein and Hohmann 1995, Carlson 1999). Para lograr este salto metabólico, la célula experimenta el fenómeno conocido como “represión catabólica” que ocurre en presencia de azúcares rápidamente fermentables (glucosa, fructosa) y consiste en expresar genes para el transporte y degradación de la

glucosa y en reprimir los genes utilizados durante la respiración y en el aprovechamiento de fuentes alternativas de carbono, como etanol, glicerol, galactosa, sacarosa y maltosa (Thevelein and Hohmann 1995, Gancedo 1998).

En levaduras, el mecanismo de percepción de glucosa que activa la vía principal de represión catabólica requiere de la fosforilación de glucosa, la cual se realiza por medio de tres enzimas: HXK1, HXK2 y GLK1. El proceso de represión catabólica puede ser dividido en dos mecanismos, el primero involucra una respuesta temprana a la presencia de glucosa y ésta es percibida por medio de las enzimas hexokinasa 1 (HXK1), hexokinasa 2 (HXK2) y glucokinasa (GLK1). El segundo mecanismo mantiene la represión catabólica a largo plazo e involucra específicamente a la HXK2 (de Winde *et al* 1996, Rolland *et al* 2001). La represión catabólica mediada por HXK2 interacciona directa o indirectamente con el complejo de la enzima cinasa SNF1, el cual en presencia de glucosa es inactivado (Woods *et al* 1994, Devit *et al* 1997, Johnston 1999), lo cual conduce a la defosforilación de la proteína MIG1 (Treitel and Carlson 1995, Gancedo 1998, Rolland *et al* 2001) y su posterior traslado del citoplasma al núcleo donde es capaz de reprimir la transcripción de genes involucrados en la respiración, gluconeogénesis y del catabolismo de fuentes alternas de carbono (Devit *et al* 1997, Johnston 1999). En ausencia de glucosa el complejo SNF1 es rápidamente activado, MIG1 es fosforilado y localizado fuera del núcleo lo que provoca la activación de los genes reprimidos por glucosa (Johnston 1999).

Se han aislado muchas mutantes de *S. cerevisiae* que muestran fenotipos relacionados con el metabolismo de azúcares; entre ellas algunas están afectadas en el gen de la trehalosa 6-fosfato sintasa (Hohmann *et al* 1992, Van Aelst *et al* 1993). Las mutantes de *TPS* (originalmente llamado *GG5/TPS1*) fueron aisladas por diferentes grupos de investigación, tales como *fdp1* (Van de Poll *et al* 1974), *cif1* (Navon *et al* 1979), *byp1* (Breiteubach-Schmitt *et al* 1984) y *glc6* (Cannon *et al* 1994); todas estas mutantes están afectadas (en grados diferentes) en la síntesis de trehalosa, en la utilización de azúcares rápidamente fermentables (como glucosa y fructosa) como fuente única de carbono, y bajo estas condiciones de crecimiento mostraron además otros fenotipos como la

hiperacumulación de azúcares fosfatados (particularmente fructosa 1,6 bifosfato) y la baja concentración de ATP.

Una estrategia para explicar los fenotipos de la mutante *tps1Δ*, fue la selección de mutantes supresoras extragénicas, encontrándose que algunas de éstas actuaban a nivel del transporte o fosforilación de glucosa por la hexocinasa; la supresión del gen de la *HXK2* o mutaciones que disminuyen parcialmente la actividad de la hexocinasa II, también restauran el crecimiento en glucosa de la mutante *tps1Δ* (Hohmann *et al* 1993, Blázquez and Gancedo 1994). Por otro lado, se demostró que la trehalosa 6-fosfato es capaz de inhibir a la *HXK2* en *S. cerevisiae* (Blázquez *et al* 1993, Hohmann *et al* 1996).

Se han planteado varias hipótesis para explicar la manera en la que la proteína TPS, la trehalosa o la trehalosa 6-fosfato podría interaccionar con la *HXK2* y de esta manera restringir el flujo de azúcares hacia la glucólisis (Thevelein and Hohmann 1995). Datos obtenidos al expresar la enzima fosfotrehalasa (que degrada la trehalosa 6-fosfato en glucosa 6-fosfato y glucosa) de *Bacillus subtilis* en mutantes *tps1Δ* y *tps2Δ* de *S. cerevisiae*, y en estudios utilizando una mutante “leaky” de *TPS1* sugieren un modelo en el cual la regulación del flujo de azúcares es mediada tanto por la proteína TPS como por la trehalosa 6-fosfato (Hohmann *et al* 1996, Van Vaeck *et al* 2001).

La primer secuencia reportada de un gen *TPS* de plantas fue de *Selaginella lepidophylla* (NCBI GI: 4100325); sin embargo el hallazgo de bajas concentraciones de trehalosa en *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* llevó a la búsqueda de genes *TPS* en otras especies de plantas. Esto condujo a la clonación de un gen *TPS* de *Arabidopsis thaliana* por complementación en la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae* (Blázquez *et al* 1998). Ambos genes, *SITPS1* y *AtTPS1* mostraron ser capaces de sintetizar trehalosa y complementar el crecimiento en glucosa de la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae* (Blázquez *et al* 1998, Zentella *et al* 1999). El gen *SITPS1* mostró además la capacidad de restaurar la termotolerancia y la osmosensibilidad en la mutante complementada. Estos datos indicaron que el gen *TPS* en plantas podría jugar un papel similar al que desarrolla en levaduras.

7. Percepción de azúcares en plantas.

Además del papel esencial que desempeñan los azúcares como fuente y almacén de energía, en el metabolismo intermediario y respiratorio, como sustrato en la formación de complejos polímeros como el almidón y la celulosa, los azúcares tienen un papel fundamental en los procesos de señalización celular que regulan el metabolismo, desarrollo y fisiología en las plantas. Los azúcares pueden señalar procesos celulares como la expresión genética de la misma manera que lo hacen las hormonas, pero mientras las hormonas son moléculas diseñadas exclusivamente para ese propósito, y funcionan a concentraciones micromolares, los azúcares forman parte del metabolismo intermediario y su concentración es en el rango de milimoles. La percepción de azúcares es definida como la interacción de azúcares con proteínas receptoras de tal manera que es generada una señal como consecuencia de esta interacción (Smeekens 2000). La señal inicia una cascada de transducción de señales que dará como consecuencia respuestas celulares a nivel de la expresión genética y actividad enzimática (Koch 1996, Sheen *et al* 1999, Rolland *et al* 2002, Price *et al* 2004). El conocimiento del papel central de la glucosa como molécula señalizadora es relativamente reciente y fue primero descrito en microorganismos tales como bacterias y levaduras, los cuales sirvieron como modelo para posteriormente demostrar que en plantas los azúcares tienen un profundo efecto en todo su ciclo de vida, desde la germinación y crecimiento vegetativo hasta las etapas de reproducción y formación de semillas (Smeekens 2000, Rolland *et al* 2002, Koch 2004).

En las plantas los azúcares como la sacarosa, la glucosa y la fructosa son el principal producto de la fotosíntesis, éstos son sintetizados principalmente en las hojas (tejidos fuente) y transportados en forma de sacarosa a tejidos no fotosintéticos como los de la raíz y los frutos (tejidos poza) donde son almacenados y/o utilizados. Este esquema de producción-almacenamiento de azúcares no es estático, durante todo su ciclo de vida las plantas experimentan cambios en los patrones de distribución de los azúcares. Para regular la distribución de azúcares entre los diferentes órganos, las plantas modulan la expresión y la actividad enzimática tanto en los tejidos fuente como en los tejidos poza. Esto asegura un estatus energético en el cual la síntesis y la utilización de azúcares permiten la adaptación

del metabolismo de carbono a cambios ambientales y a la disponibilidad de otros nutrientes (Roitsch 1999, Coruzzi and Zhou 2001, Rolland *et al* 2002). En general, cuando la planta experimenta bajos niveles de azúcares se promueve la fotosíntesis, la movilización y exportación de azúcares de reserva. Por el contrario, en un escenario donde los niveles de azúcares son abundantes la planta inhibe la fotosíntesis y promueve el crecimiento y el almacenamiento de los azúcares (Fig. 3), este fenómeno se conoce como inhibición por retroalimentación de la fotosíntesis (Koch 1996).

Actividad Tejidos Fuente



Actividad Tejidos Poza

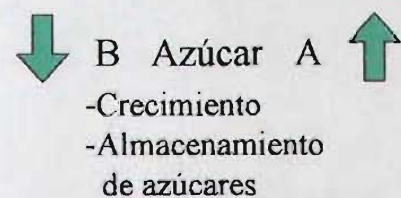


Figura 3. Los azúcares provocan diferentes efectos en la actividad de tejidos fuente y poza. Cuando los niveles de azúcares son bajos (B), aumenta la actividad en los tejidos fuente promoviendo la fotosíntesis y la movilización y exportación de azúcares. Por el contrario, altos niveles de azúcares (A) provocan disminución en tejidos fuente y un aumento en la actividad de tejidos poza, lo que lleva al almacenamiento de azúcares y al crecimiento.

Para estudiar los mecanismos de percepción y señalización de los azúcares en las plantas se han utilizado varias estrategias experimentales, estas han sido básicamente el empleo de análogos de azúcares no metabolizables o parcialmente metabolizables, el análisis de plantas transgénicas y la selección de mutantes (Krapp *et al* 1993, Jang and Sheen 1994, Martin *et al* 1997, Smeekens 2000, León and Sheen 2003). Estos abordajes metodológicos han permitido distinguir mecanismos de percepción y señalización independientes del catabolismo de glucosa, sustentando que en plantas existen al menos tres sistemas de percepción de hexosas y uno de sacarosa; además han mostrado la estrecha relación que guardan éstos mecanismos con otras vías de señalización como las de las hormonas ABA (ácido abscísico) y etileno (Sheen *et al* 1999, Xiao *et al* 2000, Rolland *et al* 2001, Rolland *et al* 2002, León and Sheen 2003).

8. Señalización de azúcares vía hexocinasa.

Tanto en levaduras como en animales, existe evidencia que sugiere que la hexocinasa, la primera enzima de la glucólisis, es también importante en los mecanismos de percepción de glucosa (Epstein *et al* 1992, Jang *et al* 1997, Johnston 1999, Smeekens 2000).

El papel regulatorio de la enzima hexocinasa en la percepción de azúcares en plantas ha sido sustentado en distintas especies de plantas. Por un lado, se utilizaron diferentes azúcares, análogos de glucosa y metabolitos intermediarios involucrados en la represión de genes de la fotosíntesis y del ciclo del glioxilato en *Chenopodium* (Krapp *et al* 1993), calabaza (Graham *et al* 1994), en protoplastos de maíz (Jang and Sheen 1994) y embriones de arroz (Unemura *et al* 1998). Azúcares como manosa y 2-deoxiglucosa, que son transportados al interior celular y que son fosforilados por la hexocinasa, pero no son metabolizados vía glucólisis, causan represión de genes fotosintéticos. La adición de manoheptulosa un inhibidor específico de la hexocinasa, causa el bloqueo de la represión (Jang and Sheen 1994, Pego *et al* 1999). Por otro lado, cuando se utilizaron otros análogos con características diferentes, L-glucosa (que no es transportada al interior celular), 6-

deoxiglucosa (6-dGlc) y 3-O-metilglucosa (3-O-mGlc) (que son transportadas pero no fosforiladas) y azúcares fosfatados (introducidas por electroporación a los protoplastos), éstos fueron incapaces de disparar el mismo efecto en la represión genética (Jang and Sheen 1994).

Experimentos con plantas transgénicas apoyan la hipótesis de que la hexocinasa es un receptor de azúcares en plantas. Los genes de la hexocinasa de *Arabidopsis* *AtHXK1* y *AtHXK2* fueron clonados y sobreexpresados en sentido y antisentido con el objetivo de estudiar *in vivo* el papel de la hexocinasa en la percepción de azúcares. Cuando se germinan plantas silvestres de *A. thaliana* en medio con glucosa al 6%, se inhibe la elongación del hipocotilo y el reverdecimiento de las primeras hojas, así como la expresión de genes fotosintéticos. Las plantas que expresan en antisentido el gen *AtHXK1* muestran un fenotipo de hiposensibilidad a glucosa, con una marcada disminución en el fenotipo observado en las plantas silvestres. Las plantas que sobreexpresan el gen *AtHXK1* tienen un fenotipo de hipersensibilidad a glucosa (Jang *et al* 1997). Cuando se analizaron los niveles de expresión de genes que son inducidos, como el de la nitrato reductasa (*NR*) o reprimidos por glucosa como el de la subunidad menor de Rubisco (*RBSC*) y el de la proteína de unión a clorofila a/b (*CABI*), se encontró que su expresión o represión depende de la presencia de la hexocinasa. En presencia de glucosa al 6%, en las plantas que sobreexpresan *AtHXK1* la expresión de *RBSC* y *CABI* prácticamente fue nula; mientras que en el control (planta silvestre) sólo se observó una pequeña disminución. En las plantas que sobreexpresan el antisentido de *AtHXK1*, no hubo represión de *RBSC* y *CABI* y se encontró que ambos genes fueron expresados a altos niveles aún en presencia de 6% de glucosa. El mismo efecto de desregulación se observó en la expresión del gen *NR* el cual fue mayormente expresado en las plantas sentido de *AtHXK1* y disminuyó drásticamente en las plantas antisentido (Jang *et al* 1997).

Por otro lado, la sobreexpresión del gen de hexocinasa de *S. cerevisiae* (*YHXKII*) en *Arabidopsis* mostró una reducción en la sensibilidad a glucosa similar a la observada en las plantas antisentido de *AtHXK1*. De igual forma, la sobreexpresión de *YHXKII* fue incapaz de alterar la expresión de *RBSC* y *CABI*. Estos datos sugieren que la *HXKII* de levadura es

capaz de mantener la función metabólica de su homóloga en plantas, pero es incapaz de sustituir la función regulatoria de *AtHXK1*. Una posible explicación es que al competir en el proceso de fosforilación de glucosa, la HXKII disminuye el efecto que tiene *AtHXK1* en la percepción de glucosa, lo que confiere un fenotipo similar al de las plantas antisentido, es decir de hiposensibilidad a glucosa (Jang *et al* 1997).

Estos datos indican que la hexocinasa tiene una doble función. Por un lado, al ser una enzima clave en la fosforilación de azúcares que serán degradados en la glicólisis, la hexocinasa cumple con una función metabólica. Además, como lo demuestran los experimentos con los análogos de glucosa y las plantas transgénicas, la hexocinasa tiene una función regulatoria en la percepción y respuesta a azúcares.

9. Señalización de azúcares independiente de hexocinasa.

El hallazgo de que moléculas análogas de glucosa, que son transportadas al interior celular pero no son fosforiladas, son capaces de inducir cambios en la expresión genética, ha sido generalmente interpretado como otra vía de percepción de azúcares que es independiente de la hexocinasa y probablemente regulada por proteínas transportadoras de azúcares (Smeekens 2000, Rolland 2001). En cultivos de *Chenopodium rubrum* la adición de glucosa o 6-dGlc induce la expresión de la invertasa extracelular y de la sacarosa sintasa (Roitsch *et al* 1995, Godt *et al* 1995). Un efecto similar es observado en el alga *Chorella kessleri*, tanto la glucosa como la 6-dGlc inducen la expresión de varios genes, incluyendo a los de transportadores de azúcares (Hilgarth *et al* 1991). En *A. thaliana*, el promotor de la patatina clase I (B33) es inducido en presencia de 6-dGlc y 3-O-mGlc (Martin *et al* 1997, Ehness *et al* 1997).

En un estudio donde se analizó la expresión de varios genes que responden a glucosa, se encontró que algunos son inducidos por un mecanismo que es dependiente de la actividad catalítica de la hexocinasa e independiente de su actividad de señalización. Previamente se había demostrado que la *YHXKII* es incapaz de sustituir a la *AtHXK1* en la

regulación de la expresión de genes como *RBSC* y *CAB1*, los cuales dependen de la actividad de señalización de la hexocinasa (Jang *et al* 1997); sin embargo, se encontró que *AtHXKII* es capaz de inducir la expresión de los genes relacionados con la patogénesis en *Arabidopsis* (Xiao *et al* 2000).

10. Mutantes con repuestas alteradas a azúcares.

La selección de mutantes con respuestas alteradas a azúcares ha sido una de las estrategias que han permitido localizar proteínas clave en los procesos de percepción de azúcares, así como establecer la estrecha relación que guardan las vías de señalización de azúcares con los procesos de síntesis y respuesta a hormonas (Arenas-Huertero *et al* 2000, Smeekens 2000, Finkelstein and Gibson 2001, León and Sheen 2003). La búsqueda de fenotipos fácilmente distinguibles como la inhibición de la germinación ó del desarrollo posgerminación, así como el empleo de plantas transgénicas con genes reporteros bajo el control de promotores inducidos por azúcares, han permitido la selección de mutantes con fenotipos insensibles o sensibles a azúcares (León and Sheen 2003). Muchas de estas mutantes habían sido previamente identificadas como mutaciones en las vías de síntesis o señalización de hormonas como ABA y etileno (Rolland *et al* 2002). Las mutantes han sido nombradas de acuerdo con su respuesta a azúcares, de tal manera que existen las mutantes *gin* (glucose insensitive); *glo* (glucose oversensitive); *cai* (carbohydrate insensitive), entre otras. La selección de mutantes alélicas ha sido un hallazgo común, por ejemplo la mutante *gin1* tiene 11 alelos y *gin6* tiene 6 (Rolland *et al* 2002, León and Sheen 2003).

La relación que guardan las vías de señalización de azúcares y hormonas en los distintos procesos de desarrollo de las plantas han mostrado ser antagónicas, sinérgicas o aditivas, dependiendo del proceso afectado y de la concentración y forma del azúcar ensayado (Finkelstein and Gibson 2001). Además de la relación entre los mecanismos de señalización con hormonas, la percepción y señalización de azúcares ha sido relacionado con mecanismos de señalización mediados por nutrientes y luz (Moore *et al* 2003, Price *et al* 2004).

11. Papel de la síntesis de trehalosa en los procesos de percepción y señalización de azúcares en plantas.

Contrario a la antigua hipótesis que establecía que la trehalosa es sintetizada sólo en organismos tolerantes a condiciones extremas de estrés (Crowe *et al* 1992), la síntesis de trehalosa es un evento común en plantas (Paul *et al* 2001). Con los proyectos de secuenciación de genomas se han reportado secuencias de genes *TPS* en *Arabidopsis*, arroz, caña de azúcar, maíz, trigo, manzana, tomate, papa, sorgo, soya, algodón, entre otros. Estas plantas acumulan trehalosa únicamente a niveles muy bajos, sin embargo expresan genes *TPS*. Esta observación, junto con los fenotipos aberrantes observados al sobreexpresar en plantas genes *TPS*, la presencia de la enzima trehalasa en diversos organismos, y los experimentos que muestran que los genes *TPS* de plantas son capaces de restaurar el fenotipo de la mutante *tps1Δ* de levadura, sugieren que la síntesis de trehalosa juega un papel importante en los procesos de percepción y señalización de azúcares en plantas (Goddijn and Smeekens 1998, Goddijn and van Dun 1999) y llevaron a otros estudios que se describen a continuación.

De manera sorprendente se encontró que *A. thaliana*, una planta que acumula cantidades mínimas de trehalosa (Müller *et al* 1999) contiene 11 genes *TPS* (Leyman *et al* 2001). Estos han sido divididos en dos clases de acuerdo con su parecido con los genes *TPS* y *TPP* de *S. cerevisiae* (Leyman *et al* 2001). La clase I consiste de 4 genes (*AtTPS1* a *AtTPS4*), que entre ellos comparten una identidad entre 63 y 80% a nivel de secuencia de nucleótidos. El gen *AtTPS1* que complementa la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae* (Blázquez *et al* 1998) pertenece a esta clase; se desconoce la función de los otros tres genes, dos de éstos no mostraron actividad de trehalosa sintasa o fosfatasa cuando fueron clonados y expresados en las mutantes de levadura (Vogel *et al* 2001). La clase II consiste de 7 genes (*AtTPS5* a *AtTPS11*) muy parecidos unos con otros (conservan una identidad a nivel de secuencia de nucleótidos del 54 y 83%) y se propone que codifican para fosfatasa específicas de la trehalosa 6-fosfato (Leyman *et al* 2001), ya que contienen en su extremo carboxilo terminal secuencias características de estas enzimas (Thaller *et al* 1998). Existen otras proteínas que han sido también propuestas como trehalosa 6-fosfato fosfatasa en

Arabidopsis, las llamadas clase III son miembros de una familia de 10 proteínas de las cuales 2 son capaces de complementar a la mutante *tps2Δ* de *S. cerevisiae* (Vogel *et al* 1998).

En un estudio donde se analizó la mutante por inserción en el gen *AtTPS1* conocida como *tps1-1*, se demostró que el gen es indispensable para la planta, ya que la mutación por inserción provoca un fenotipo de embrión letal (Eastmond *et al* 2002). Un análisis detallado del desarrollo del embrión permitió establecer que la mutante detiene su desarrollo en la etapa conocida como “torpedo”. Tanto en Arabidopsis como en muchas otras plantas, el desarrollo del embrión puede ser dividido conceptualmente en tres fases: la primera es caracterizada por la división y diferenciación celular que establece el patrón del embrión. En la segunda fase las células crecen y acumulan reservas energéticas. Durante la última etapa, el embrión sufre desecación y entra en un periodo de arresto en el desarrollo. La etapa de “torpedo” marca la transición entre la primera y la segunda fase, y se presenta un cambio en el contenido de azúcares: La cantidad de sacarosa se incrementa varias veces respecto a la de glucosa y fructosa. El fenotipo de la mutante no revierte con la adición de trehalosa o trehalosa 6-fosfato exógena; sin embargo, cuando los niveles de sacarosa fueron disminuidos *in vitro*, la mutante mostró una recuperación parcial.

Esta mutante de Arabidopsis guarda ciertas similitudes con el fenotipo observado en la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae*, el cual es detectado cuando la levadura se expone a glucosa o fructosa y puede ser revertido al restringir el flujo de azúcares a la glucólisis (Thevelein and Hohmann 1995). En la levadura se postula que el papel de la síntesis de trehalosa en la regulación del flujo de azúcares es mediante la inhibición de la hexocinasa por la trehalosa 6-fosfato (Blázquez *et al* 1993, Thevelein and Hohmann 1995). En contraste, ensayos *in vitro* mostraron que la trehalosa 6-fosfato es incapaz de inhibir la actividad hexocinasa de plantas. Además, cuando se cruzó la mutante *tps1-1* con una planta que tiene disminuida la actividad de la hexocinasa, se encontró que el fenotipo de la mutante no fue rescatado. Las mismas observaciones fueron hechas al adicionar un inhibidor específico de la hexocinasa (Eastmond *et al* 2002). Todos estos datos demuestran

que en plantas la hexocinasa no es inhibida por la trehalosa 6-fosfato, como sucede en levaduras.

En un estudio donde se probó el efecto de la sobreexpresión de los genes *OTSA* (trehalosa 6-fosfato sintasa), *OTSB* (trehalosa 6-fosfato fosfatasa), *TREC* (trehalosa 6-fosfato hidrolasa) y *TREH* (trehalasa) de *E.coli* en *A. thaliana*, se demuestra que los cambios en la concentración de trehalosa 6-fosfato tienen un efecto directo en la utilización de carbohidratos y en el crecimiento de la planta. Además, la expresión del gen *TPS* de *E. coli* bajo el control del promotor del gen *AtTPS1* es capaz de restaurar el fenotipo observado en la mutante *tps1-1*. Todos estos datos sugieren que la trehalosa 6-fosfato es un componente indispensable en plantas con un papel en la señalización del metabolismo de azúcares y que por lo tanto el fenotipo letal en el estado embrionario de la mutante *tps1-1* puede ser explicado por sus reducidos niveles de trehalosa 6-fosfato y una aparente inhabilidad de utilizar azúcares (Schluepmann *et al* 2003).

Por otro lado, la adición de trehalosa exógena tiene efectos en el metabolismo y en la regulación de la expresión genética en plantas. Cuando se analizaron plántulas germinadas en 100 mM de trehalosa, éstas no desarrollaron hojas primarias, los cotiledones cambiaron a verde oscuro con el borde rojo y el crecimiento de la raíz fue inhibido. Posteriormente las plantas mostraron acumulación de almidón y se detectó la sobreexpresión del gen de la *APL3*, que codifica para una de las subunidades mayores de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) (Wingler *et al* 2000). En un estudio posterior se mostró que la adición de trehalosa exógena rescata el fenotipo de la mutante *adg2-1* de *A. thaliana*. Esta mutante está afectada en el gen *APL1* que codifica para otra subunidad mayor de la enzima AGPasa, responsable de la síntesis de ADP-glucosa, misma que es utilizada para la síntesis de almidón (Fritzius *et al* 2001). Estos datos sugieren que la trehalosa podría intervenir en la distribución de azúcares en la planta forzando la síntesis de almidón en tejidos fuente y provocando insuficiencia de fuentes de carbono en tejidos poza, lo que lleva a la inhibición del crecimiento de la raíz (Wingler *et al* 2000).

HIPÓTESIS

La trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) participa en los procesos de señalización mediada por azúcares durante el desarrollo vegetativo en plantas.

OBJETIVOS

General:

Determinar el papel de la trehalosa 6-fosfato sintasa (*TPS*) en los procesos de señalización por glucosa en plantas.

Particulares:

Determinar si la síntesis de trehalosa en plantas regula cambios en la expresión de genes relacionados con vías de señalización mediadas por glucosa.

Construcción y caracterización funcional de genes quiméricos con los dominios *TPS* y *TPP*.

Establecer la relación filogenética de los dominios *TPS* y *TPP* en distintas proteínas de eucariontes y procariontes.

RESULTADOS:

La primera sección de resultados se presenta en dos artículos, de los cuales se anexa copia:

1. Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., and Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase *AtTPSI* Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology*. **136**(3):3649-59.
2. Avonce, N., Leyman, B., Thevelein, J.M. and Iturriaga, G. (2005). Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochemical Society Transactions*. **33** (1): 276-279.

La segunda y tercera sección de resultados se presenta en 3 y 4.

The Arabidopsis Trehalose-6-P Synthase *AtTPS1* Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling¹

Nelson Avonce, Barbara Leyman, José O. Mascorro-Gallardo², Patrick Van Dijck, Johan M. Thevelein, and Gabriel Iturriaga*

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Mexico (N.A); Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Mexico (G.I.); and Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven and Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie (VIB), B-3001 Leuven-Heverlee, Flanders, Belgium (B.L., P.V.D., J.M.T.)

In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), trehalose is present at almost undetectable levels, excluding its role as an osmoprotectant. Here, we report that overexpression of *AtTPS1* in *Arabidopsis* using the 35S promoter led to a small increase in trehalose and trehalose-6-P levels. In spite of this, transgenic plants displayed a dehydration tolerance phenotype without any visible morphological alterations, except for delayed flowering. Moreover, seedlings overexpressing *AtTPS1* exhibited glucose (Glc)- and abscisic acid (ABA)-insensitive phenotypes. Transgenic seedlings germinated on Glc were visibly larger with green well-expanded cotyledonary leaves and fully developed roots, in contrast with wild-type seedlings showing growth retardation and absence of photosynthetic tissue. An ABA dose-response experiment revealed a higher germination rate for transgenic plants overexpressing *AtTPS1* showing insensitive germination kinetics at 2.5 μ M ABA. Interestingly, germination in the presence of Glc did not trigger an increase in ABA content in plants overexpressing *AtTPS1*. Expression analysis by quantitative reverse transcription-PCR in transgenic plants showed up-regulation of the *ABI4* and *CAB1* genes. In the presence of Glc, *CAB1* expression remained high, whereas *ABI4*, *HXK1*, and *ApL3* levels were down-regulated in the *AtTPS1*-overexpressing lines. Analysis of *AtTPS1* expression in *HXK1*-antisense or *HXK1*-sense transgenic lines suggests the possible involvement of *AtTPS1* in the hexokinase-dependent Glc-signaling pathway. These data strongly suggest that *AtTPS1* has a pivotal role in the regulation of Glc and ABA signaling during vegetative development.

Trehalose is a nonreducing disaccharide (α -D-glucopyranosyl-1, 1- α -D-glucopyranoside) that accumulates in a wide variety of organisms that withstand drought, salt, heat, or freeze stress. It is present in some "resurrection plants" such as *Selaginella lepidophylla*, where it works as osmoprotectant during desiccation stress (Adams et al., 1990), and in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), where it can serve as stress protectant and storage carbohydrate (Thevelein, 1984; Wiemken, 1990). There are at least three different pathways for trehalose biosynthesis. The most widely distributed and present in many bacteria, yeasts, and plants is

a two-step process in which trehalose-6-P (T6P) synthase (TPS) synthesizes T6P from UDP-Glc and Glc-6-P, followed by dephosphorylation to trehalose by T6P phosphatase (TPP). Trehalase (TH) converts trehalose to two molecules of Glc (Elbein et al., 2003). Genetic analysis of bacteria and yeast led to the isolation and functional characterization of *TPS1* genes in *Escherichia coli*, yeast, and other microorganisms (Bell, et al., 1992; Luyten et al., 1993; Kaasen et al., 1994). Deletion mutants of the *TPS1* gene in yeast are not only unable to synthesize trehalose but also lack the ability to grow on rapidly fermentable sugars such as Glc, due to a deregulation of glycolysis leading to hyperaccumulation of sugar phosphates and depletion of ATP and inorganic phosphate (Thevelein and Hohmann, 1995). These data have supported the idea that *TPS1* and/or T6P have an important role in controlling sugar metabolism through glycolysis regulation, for instance, at the level of hexokinase activity (Blázquez et al., 1993; Hohmann et al., 1993; Bonini et al., 2003).

The *SITPS1* gene from *S. lepidophylla* encodes a functional enzyme as shown by complementation of the yeast *tps1 Δ* mutant, which restored its ability to grow on Glc and to accumulate trehalose (Zentella et al., 1999). In higher plants, trehalose rarely occurs, although an *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) *AtTPS1*

¹ This work was supported by the European Union International Cooperation (grant no. CA4-CT-2000-30041 to G.I.), the Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), and the Fund for Scientific Research-Flanders and the Fund of the Katholieke Universiteit Leuven (Concerted Research Actions). B.L. is a postdoctoral fellow of the Fund for Scientific Research (Flanders, FWO). N.A. was supported by a CONACyT Ph.D. fellowship, Mexico.

² Present address: Departamento de Fitotécnica, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México Texcoco Km 38.5, Chapingo, Edo.Mex. CP 56230, Mexico.

* Corresponding author; e-mail iturri@cib.uaem.mx; fax 52-777-3297030.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.052084.

homolog was also able to support limited trehalose synthesis upon expression in yeast *tps1Δ* mutant (Blázquez et al., 1998). The capacity to synthesize trehalose by higher plants was first revealed by using the TH inhibitor validamycin A, leading to trehalose accumulation in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and potato (*Solanum tuberosum*) plants, albeit at low levels (Goddijn et al., 1997). N-terminal deletion of the *S. lepidophylla* and Arabidopsis *TPS1* gene product results in a dramatic increase in TPS activity (Van Dijck et al., 2002). This indicates a high potential trehalose synthesis capacity in plants in spite of the near universal absence of trehalose. In the past few years, it has been found that most plants, including non-stress tolerant species, encode *TPS1* transcripts, after analysis of many expressed sequence tag collections. Thus, besides its role in trehalose synthesis, *TPS1* has other possible roles in plants. It has been reported that an Arabidopsis transposon-insertion mutant in the *AtTPS1* gene was deficient in embryo maturation and growth, and the role of this gene is essential for vegetative growth and flowering (Eastmond et al., 2002; van Dijken et al., 2004).

Overexpression of *TPS1* genes in plants has been attempted to improve stress tolerance. So far, this strategy has been reported only with bacterial and yeast *TPS1* genes. When the *E. coli TPS1 (otsA)* gene was overexpressed in tobacco and potato, trehalose accumulated at low levels in tobacco and was undetectable in potato (Goddijn et al., 1997). These tobacco plants, however, also showed a stress tolerance phenotype as well as striking morphological changes (Goddijn et al., 1997; Pilon-Smits et al., 1998). Expression in rice (*Oryza sativa*) of a bifunctional gene fusion of *otsA* and *otsB* (encoding TPP) driven by a stress-regulated promoter confers resistance to abiotic stress without causing morphological changes (Garg et al., 2002). On the other hand, overexpression of the yeast *TPS1* gene in tobacco led to moderate trehalose accumulation and dehydration tolerance (Holmström et al., 1996). Here, we report that the overexpression of Arabidopsis *AtTPS1* gene in Arabidopsis conferred drought tolerance without causing morphological changes and that seedlings displayed Glc- and abscisic acid (ABA)-insensitive phenotypes. Expression analysis of several genes involved in Glc sensing and ABA signaling displayed an altered gene expression pattern.

RESULTS

Overexpression of *AtTPS1* Confers Dehydration Tolerance

Sixteen independent Arabidopsis transgenic lines (35S::*AtTPS1*) were obtained after transformation with *Agrobacterium tumefaciens* harboring the p35S-*AtTPS1*-NOS plasmid. Homozygous plants were selected from each of these transgenic lines containing

a single gene insertion (1.1, 2.4, 3.2, 3.4, 4.4, 5.4, 6.2, 7.5, 10.6, and line 12.3), after genetic analysis using kanamycin to score a 3:1 segregation ratio. To assay for gene expression of *AtTPS1* in transgenic plants, we used reverse transcription (RT)-PCR since it has been reported that this gene is expressed at very low levels in wild-type Arabidopsis (Blázquez et al., 1998). All 10 transgenic lines overexpressed *AtTPS1* at moderately higher levels than the wild type (Fig. 1). The adenine ribosyl phosphotransferase 1 gene (*APT1*) was used as a constitutive control (Fig. 1). To analyze the expression of *AtTPS1* protein, western blotting was conducted using 6-d-old seedlings. *AtTPS1* protein was almost undetectable in wild-type plants and the line 1.1, whereas it could be seen in all other transgenic

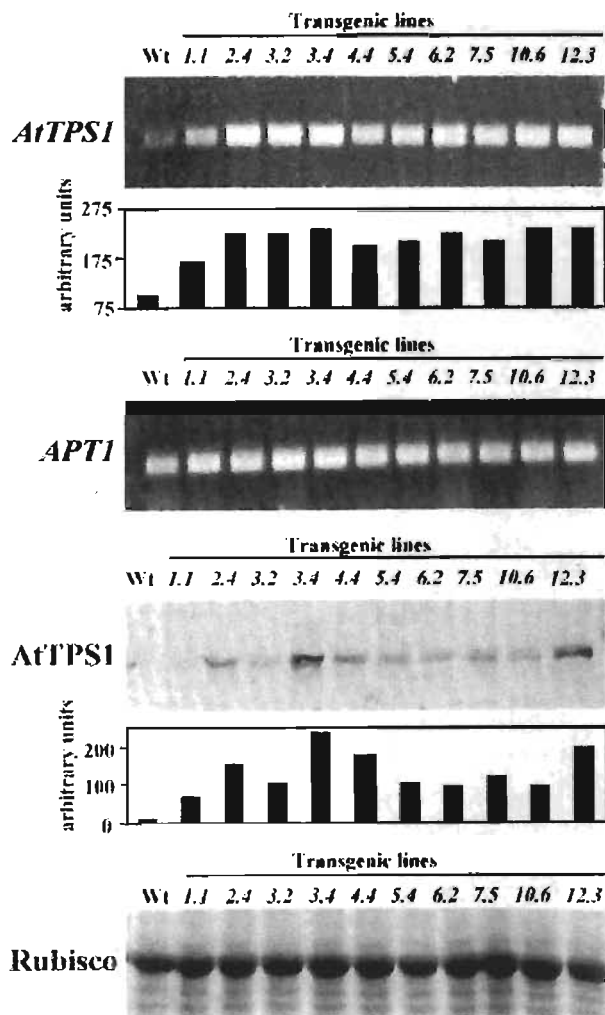


Figure 1. Semiquantitative RT-PCR analysis of *AtTPS1* expression. *AtTPS1* transcript accumulation in wild-type and 10 independent transgenic lines. *APT1* was used as a constitutive control. Western-blot analysis of *AtTPS1* protein accumulation in wild-type and transgenic lines. SDS-PAGE showing Rubisco protein as a constitutive control. Graphics represent the quantification of the shown bands normalized according to the corresponding controls (*APT1* and Rubisco).

lines but especially at higher levels in lines 3.4 and 12.3, corresponding to approximately 10 times higher than wild type (Fig. 1). Staining of Rubisco in an SDS-PAGE gel showed that equal amounts of protein were used for the western blot (Fig. 1).

The trehalose concentration was determined in 35S::*AtTPS1* lines and wild-type plants since endogenous TPP or unspecific phosphatases can convert T6P to trehalose. A small increase of trehalose in the different transgenic lines was found, with the highest levels in lines 4.4 and 12.3, being around 2.5 times more than in wild-type plants (Table I). The use of the TH inhibitor validamycin A caused higher trehalose accumulation in all transgenic and wild-type plants, with the line 12.3 displaying again the highest levels. T6P, the product of *AtTPS1* enzyme activity, was also measured in the different transgenic lines and wild-type plants. As shown in Table I, there is an increase in T6P concentration in plants overexpressing the *AtTPS1* gene, which correlates with the corresponding trehalose levels for each independent line. For the transgenic lines 4.4 and 12.3, there is a 4-fold increase in T6P in comparison to wild-type plants.

A detailed analysis of possible changes in organ shape or size and plant growth habit was monitored in the 10 homozygous 35S::*AtTPS1* lines during their whole life cycle. No morphological changes in individual organs or at the whole-plant level were observed in any of the lines overexpressing *AtTPS1*, except for a delayed flowering time (1–2 weeks) in all of them. To assess the role of the *AtTPS1* gene in stress tolerance, drought tolerance tests with adult plants grown in soil were performed. Ten individuals from each of the 10 selected 35S::*AtTPS1* lines and wild-type plants were grown for 4 weeks under fully watered conditions, followed by 2 weeks of water deprivation. Most transgenic lines (3.2, 3.4, 4.4, 5.4, 6.2, 7.5, 10.6, and 12.3) recovered from water deprivation after rewatering for 1 d. In Figure 2, the line 12.3 is shown recovering its full shape after rewatering (Fig. 2, A and B), whereas wild-type plants did not survive

the same dehydration treatment (Fig. 2, C and D). After rewatering, transgenic plants continued their normal growth and set viable seeds. The relative water content (RWC) of the plants and soil gravimetric water content (SGWC) were determined during the experimental time. There was a higher RWC in the transgenic line 12.3 compared to the line 5.4 and wild-type plants up to 12 d after water deprivation, and thereafter the RWC of all plants declined sharply, reaching around 10% after 14 d of dehydration (Fig. 2E). The SGWC also dropped to less than 3% after 14 d without watering (Fig. 2E, inset). These results strongly suggest that overexpression of the *AtTPS1* gene in Arabidopsis confers drought tolerance.

Glc- and ABA-Insensitive Phenotypes in 35S::*AtTPS1* Plants

Sugars regulate gene expression in many organisms (Rolland et al., 2001). In plants, genes involved in photosynthesis and mobilization of stored reserves are repressed upon increase in sugar concentrations, whereas genes required for catabolism of carbon metabolites are induced (Pego et al., 2000). Sugar-mediated regulation of gene expression in Arabidopsis has been shown to be dependent on the hexokinase (*HXK1*) protein, representing a primary sensor of this pathway (Jang et al., 1997; Moore et al., 2003). The antisense expression or gene knock out of *HXK1* in Arabidopsis leads to a sugar-insensitive phenotype when plants are germinated on 6% Glc, whereas overexpression of *HXK1* promotes a Glc-hypersensitive response. In yeast, it has been suggested that the TPS1 protein might be involved in sugar sensing through interaction with hexokinase (Thevelein and Hohmann, 1995). Therefore, we decided to test whether the overexpression of *AtTPS1* in Arabidopsis would lead to a sugar-response phenotype. Different transgenic lines expressing *AtTPS1* at low (lines 3.2, 3.4, and 5.4) or at relatively high (lines 4.4 and 12.3) levels and wild-type seeds were germinated on Murashige and Skoog (MS)

Table I. Trehalose and T6P concentration in 7-d-old plantlets

Trehalose and T6P content was determined for wild type and 10 independent 35S::*AtTPS1* transgenic lines grown on MS and MS supplemented with 1 mM validamycin A. Concentration is expressed in $\mu\text{g/g}$ of fresh weight.

| Transgenic Lines | Trehalose | | T6P |
|------------------|----------------|--------------------|-----------------|
| | MS | MS + Validamycin A | MS |
| 1.1 | 9.9 \pm 3.8 | 19.26 \pm 2.1 | 0.75 \pm 0.26 |
| 2.4 | 6.5 \pm 4.0 | 30.21 \pm 2.7 | 0.69 \pm 0.17 |
| 3.2 | 16.4 \pm 1.3 | 24.12 \pm 1.6 | 1.67 \pm 0.57 |
| 3.4 | 16.8 \pm 1.5 | 20.47 \pm 1.8 | 1.75 \pm 0.46 |
| 4.4 | 26.1 \pm 2.0 | 32.24 \pm 3.8 | 3.12 \pm 0.92 |
| 5.4 | 15.0 \pm 1.0 | 21.89 \pm 2.1 | 1.50 \pm 0.38 |
| 6.2 | 23.1 \pm 2.1 | 30.21 \pm 3.6 | 2.51 \pm 0.72 |
| 7.5 | 21.9 \pm 1.3 | 35.88 \pm 3.2 | 2.33 \pm 0.76 |
| 10.6 | 19.2 \pm 2.1 | 17.84 \pm 3.5 | 2.28 \pm 0.83 |
| 12.3 | 25.3 \pm 1.5 | 35.88 \pm 3.0 | 3.06 \pm 0.88 |
| Wild type | 10.1 \pm 1.3 | 22.22 \pm 2.4 | 0.74 \pm 0.25 |

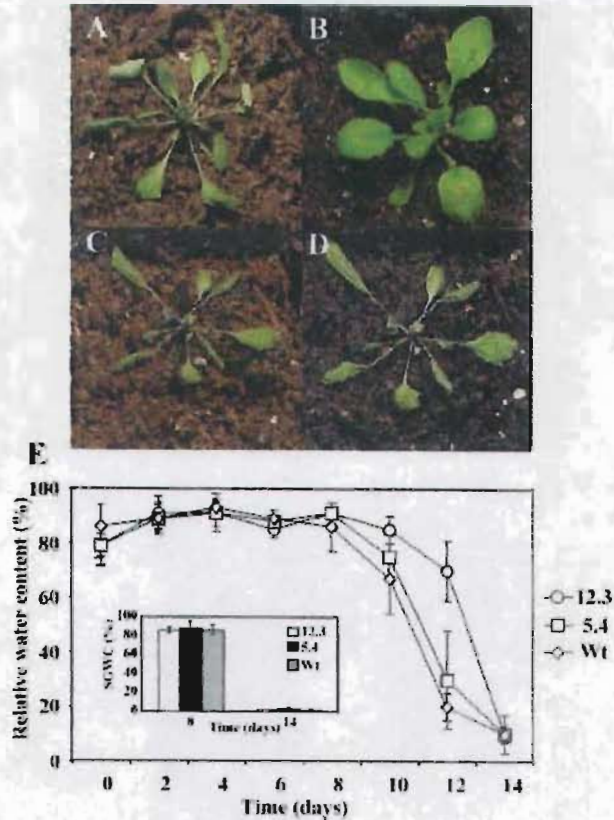


Figure 2. Stress-tolerance analysis of *AtTPS1*-overexpressing plants. Four-week-old 12.3 transgenic line (A and B) and wild-type plants (C and D) were water deprived until desiccation (A and C) and then rehydrated for 24 h (B and D). Kinetics of RWC of 10 individuals of 12.3 (○), 5.4 (□), and wild-type (◇) plants (E). The SGWC of 5 individuals of transgenic lines 12.3 (white bars), 5.4 (black bars), and wild type (gray bars) was determined at the beginning and end of the experiment (E, inset).

media containing 6% Glc. Possible phenotypic changes were scored daily up to 7 d after germination, when the most obvious changes were visible. Transgenic lines expressing higher levels of *AtTPS1* germinated well and developed at a normal rate with green well-expanded leaves (Fig. 3B), in contrast with wild-type seedlings that developed at a smaller size, showing absence of greening, well-expanded leaves, and root elongation (Fig. 3A). The other transgenic lines with a lower *AtTPS1* expression level showed an intermediate phenotype with some growth retardation and smaller leaves, but they grew better than wild-type plants. These results show that overexpression of *AtTPS1* in *Arabidopsis* confers a Glc-insensitive phenotype. Transgenic 35S::*AtTPS1* lines 5.4 and 12.3 were chosen for further experiments as representative lines.

To further characterize the effect of Glc on plant development, the germination rate was determined. The *abi4* mutant was used as a positive control since it is Glc insensitive (Arenas-Huertero et al., 2000). In MS

media, the *abi4* mutant and the line 12.3 germinated at a higher rate than the line 5.4 and wild-type plants; a clear difference was observed 2 d after sowing (Fig. 3C). In the presence of 6% Glc, the *abi4* mutant germinated at a higher rate compared with the rest of the lines, followed closely by the line 12.3, which reached a similar germination percentage 4 d after sowing. By contrast, the line 5.4 and wild-type seedlings germinated 15% and 30% less, respectively, than *abi4* mutant and line 12.3 (Fig. 3D). These results suggest that *AtTPS1* promotes germination in contrast with *ABI4* gene, which is known to inhibit this process (Arenas-Huertero et al., 2000).

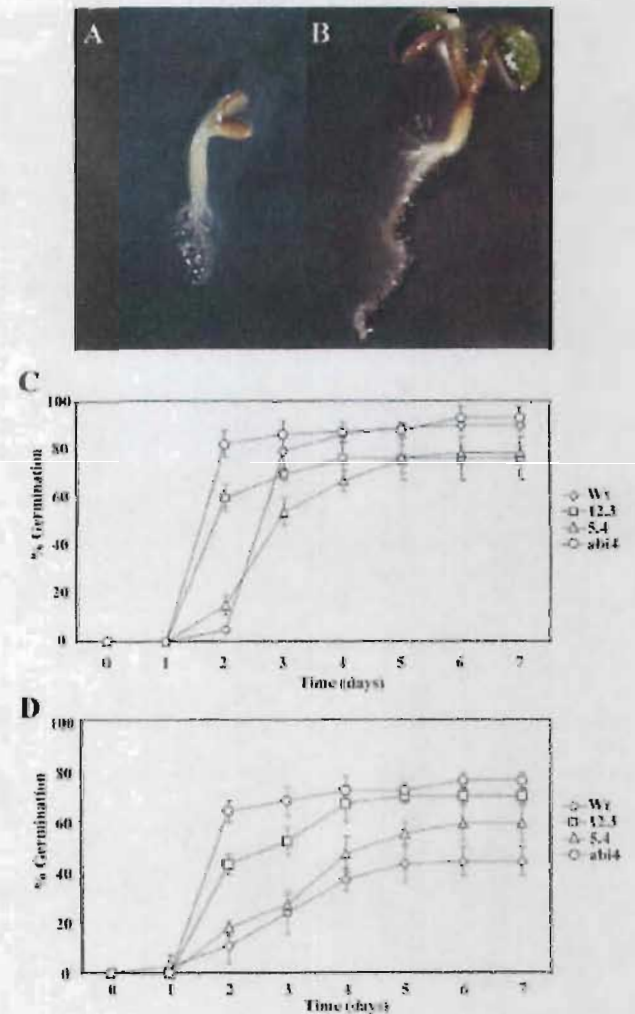


Figure 3. Glc sensitivity of 35S::*AtTPS1* plants. Phenotype of 7-d-old wild-type (A) and 12.3 transgenic-line (B) seedlings growing on MS supplemented with 6% Glc. Germination kinetics of transgenic lines overexpressing *AtTPS1* in comparison to wild type and *abi4* mutant growing on MS media alone (C) or on MS supplemented with 6% Glc (D). Germination was defined as complete protrusion of the radicle. The data are the mean of 3 independent experiments evaluating 100 seeds per data point. Error bar represents sd. □, Line 12.3; △, line 5.4; ◇, wild-type seedlings; and ○, *abi4* mutant.

Several reports have shown a cross-talk between Glc sensing and ABA signaling in germination and seedling growth (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000). To ascertain whether Arabidopsis seeds overexpressing the *AtTPS1* gene display an ABA-insensitive response, their germination was assayed in the presence of different concentrations of ABA. Seeds of the line 12.3 and *abi4* mutant were able to germinate in the presence of higher ABA concentrations than wild-type and 5.4 line seedlings, with the

Table II. Determination of endogenous ABA concentration in the transgenic 12.3 line

The ABA concentration was determined in 7-d-old plantlets grown on MS or MS supplemented with 6% Glc. ABA is expressed in ng ABA/g of fresh weight. The data are the mean of three biologically independent experiments.

| | MS | MS + 6% Glc |
|-------------|-----------|-------------|
| Wild type | 25.79 ± 2 | 41.98 ± 5 |
| 35S::AtTPS1 | 23.68 ± 1 | 26.00 ± 3 |

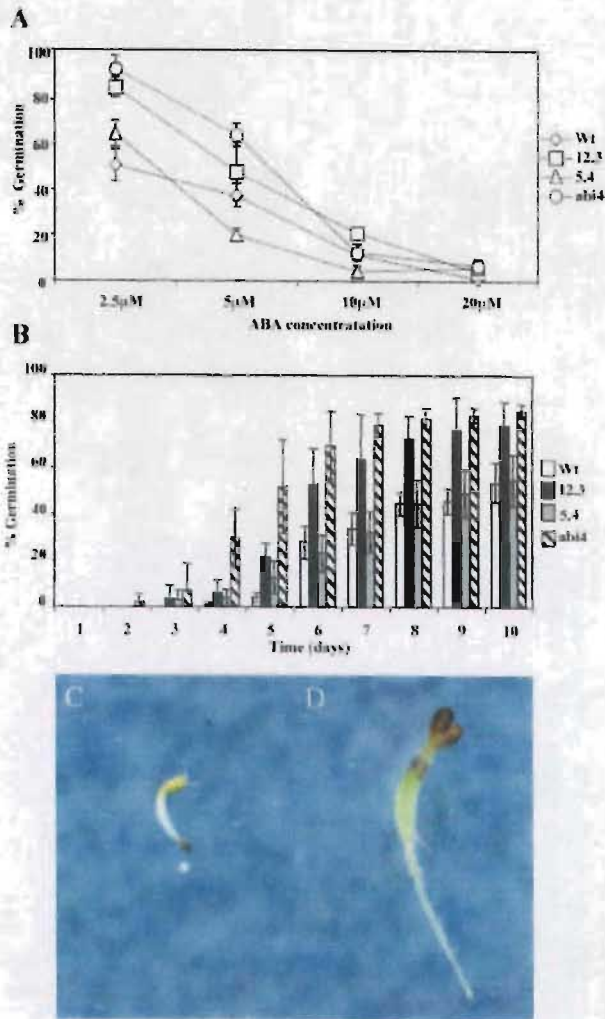


Figure 4. ABA sensitivity of 35S::AtTPS1 plants. A, Germination dose response after 10 d on MS media supplemented with 2.5, 5, 10, or 20 μM ABA. Representative lines 12.3 (\square) and 5.4 (Δ) are shown in comparison to wild-type seedlings (\diamond), and *abi4* mutant (\circ). B, Germination kinetics of plants growing on MS media containing 2.5 μM ABA. Lines 12.3 (black bars) and 5.4 (gray bars) are shown in comparison to wild-type seedlings (white bars) and *abi4* mutant (dashed bars). Germination was defined as complete protrusion of the radicle. The data are the mean of 3 independent experiments evaluating 100 seeds per data point. Error bar represents sd. Phenotype of 7-d-old wild-type (C) and 12.3 transgenic-line seedlings (D) growing on MS supplemented with 2.5 μM ABA.

largest difference observed at 2.5 μM ABA (Fig. 4A). At this ABA concentration, a germination kinetics experiment was conducted, which showed about 20% higher germination for the *abi4* and line 12.3 than the line 5.4 and wild-type seedlings (Fig. 4B). The ABA-insensitive phenotype of seedlings overexpressing *AtTPS1* (Fig. 4D) can be clearly distinguished from the sensitive phenotype of wild-type plants (Fig. 4C). These results raised the question whether the phenotypic differences on Glc of transgenic plants overexpressing the *AtTPS1* gene could be due to an altered ABA content. To test this possibility, the endogenous levels of ABA were measured in 7-d-old line 12.3 and wild-type seedlings (Table II). The ABA content of the wild type and transgenic line 12.3 was not significantly different when seeds were germinated in MS media. However, when external Glc was added, the ABA concentration in wild-type plants increased, as has been reported before (Arenas-Huertero et al., 2000), whereas in 12.3 plants the ABA levels remained constant. This result strongly suggests an interaction between *AtTPS1* gene and ABA metabolism.

Altered Transcription of Glc- and ABA-Regulated Genes in 35S::AtTPS1 Plants

Glc and ABA regulate the transcription of genes involved in a wide variety of cellular processes, such as embryo maturation, stress adaptation, ABA-response, Glc metabolism, and photosynthesis (Koch, 1996; Merlot and Giraudat, 1997; Sheen et al., 1999; Finkelstein et al., 2002; León and Sheen, 2003). In this study, it has been shown that *AtTPS1* participates in the Glc and ABA-signaling pathways controlling germination and vegetative development. Therefore, it was decided to analyze the expression pattern of genes regulated by ABA or Glc in 35S::AtTPS1 plants. For this purpose, transgenic lines 12.3, 5.4, and 4.4 and wild-type 7-d-old seedlings, grown for 7 d in MS media, were treated with 7% Glc or mannitol for 6 h, and RNA was extracted for analysis by quantitative RT-PCR. We monitored the relative expression levels of signaling components of sugar (*HXX1*) and ABA signal transduction (*ABI4*) and of specific genes that are markers for photosynthesis (*CAB1*) and starch production (*APL3*). In a first experiment, we measured the expression level of *AtTPS1* itself, which increased

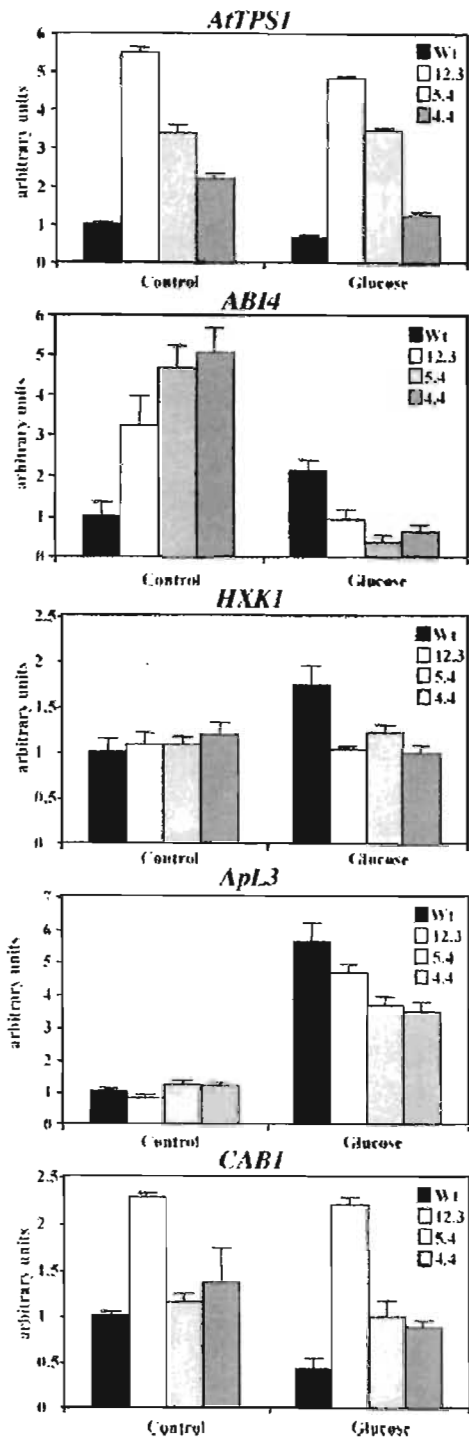


Figure 5. Quantitative PCR analysis of selected genes expressed in 35S::AtTPS1 plants. Relative expression levels measured by QPCR in response to 6 h of treatment with 7% Glc or mannitol (Control) of transgenic lines 12.3, 5.4, and 4.4 and wild-type seedlings. The data were obtained from three biologically independent experiments. Detector probes: *AtTPS1*, *ABI4*, *HXK1*, *Apl3*, and *CAB1*.

3- to 5-fold in the transgenic 35S::AtTPS1 lines and slightly decreased in all the different lines when plants were incubated with Glc (Fig. 5). In response to high levels of external Glc, development of the photosynthetic apparatus was inhibited in wild-type plants as shown before (Fig. 3A), which coincided with a reduction in *CAB1* expression (Fig. 5). However, overexpression of *AtTPS1* reduced the sensitivity of Arabidopsis significantly to external Glc. In line with this observation, the expression of *CAB1* remained as high as when Glc was replaced by the nonsignaling osmotic control mannitol (Fig. 5). A higher expression of *CAB1* is consistent with previous observations that plants overexpressing *E. coli* *TPS1* have dark-green leaves and higher photosynthesis rates (Paul et al., 2001). Starch synthesis and *Apl3* transcript expression are induced when high concentrations of trehalose are fed to Arabidopsis wild-type plants (Wingler et al., 2000). In the 35S::AtTPS1 lines, the expression of *Apl3* is comparable to wild-type seedlings without Glc in the medium (Fig. 5). This could be a consequence of the small increase in trehalose content in those transgenic plants. In wild-type plants, *Apl3* is highly induced by Glc; however, the 35S::AtTPS1 seedlings showed a reduced induction in *Apl3* transcript levels compared to wild type (Fig. 5). Therefore, the lower response of *Apl3* to Glc in plants overexpressing *AtTPS1* is in agreement with a Glc-insensitive phenotype.

HXK1 encodes a central sugar-sensing and -signaling protein, and *ABI4* is indispensable for ABA signaling (Moore et al., 2003). *HXK1* is not significantly induced upon overexpression of *AtTPS1* in the absence of Glc. The induction of *HXK1* by Glc is about 2-fold, whereas in *AtTPS1* overexpressors, *HXK1* levels do not respond to Glc (Fig. 5). Additionally, the overexpression of *AtTPS1* provoked a 3- to 5-fold increase in *ABI4* steady-state mRNA levels (Fig. 5). In a similar manner to the effect on *HXK1*, *ABI4* expression in 35S::AtTPS1 plants dropped significantly when Glc was present (Fig. 5). *ABI4* was clearly repressed by the synergistic effect of Glc and *AtTPS1*, which could explain the Glc insensitivity of those plants.

Involvement of *AtTPS1* in Glc-Signaling Pathway

To substantiate the involvement of *AtTPS1* in Glc signaling, a gene expression analysis by semiquantitative RT-PCR was conducted in Arabidopsis ecotype Landsberg *erecta* in which *HXK1* expression was reduced (*HXK1*-antisense), resulting in a Glc-insensitive phenotype, and in plants overexpressing *HXK1* (*HXK1*-sense), which have Glc hypersensitivity (Jang et al., 1997). The *APT1* gene was used as a constitutive control (Fig. 6). Expression of *AtTPS1* was absent in *HXK1*-antisense plants, suggesting the dependence of *AtTPS1* expression on the presence of *HXK1* (Fig. 6). By contrast, there is a dramatic increase in *AtTPS1* transcript levels in *HXK1*-antisense plants grown in 6% Glc, whereas in wild-type and *HXK1*-sense seed-

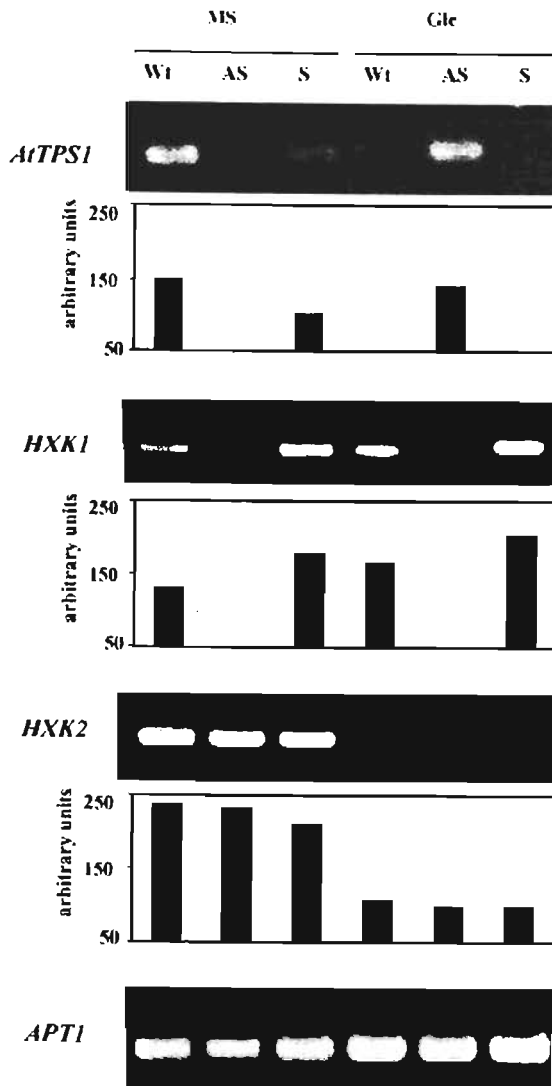


Figure 6. *AtTPS1* expression analysis in *HXX1*-sense or -antisense plants. Semiquantitative RT-PCR analysis in 7-d-old wild-type (Wt), antisense (AS) or sense (S) *HXX1* transgenic lines grown on MS alone or supplemented with 6% Glc. Graphics represent the quantification of the shown bands normalized according to *APT1* expression.

lings, *AtTPS1* expression is silent in the presence of Glc (Fig. 6). This result suggests a Glc control of *AtTPS1* in the absence of *HXX1*. The expression of *HXX1* and *HXX2* was also analyzed in these *HXX1*-sense and *HXX1*-antisense lines. As expected, *HXX1* was absent in antisense plants and up-modulated in sense transgenics. In the case of *HXX2*, no differences in gene expression levels were observed in the *HXX1*-sense and *HXX1*-antisense plants after comparison with the wild-type, except that *HXX2* expression decreased in the presence of Glc (Fig. 6). These results suggest that *AtTPS1* might participate in the HXX-dependent signaling pathway.

DISCUSSION

In plants, light and sugars have a profound influence on growth and development. Light is essential for the synthesis of carbon skeletons in photosynthesis and is also a signal for photomorphogenesis (Pego et al., 2000). For many years, sugars have been regarded as the cell fuel and location of carbon storage. Sugars also control growth via metabolic effects on enzyme activity and sink-source allocation (Koch, 1996). In bacteria, yeast, and animals, sugar signaling has been shown to control gene expression in evolutionary conserved pathways involving secondary messengers, protein kinases, and phosphatases and in particular hexokinases (Hunter, 2000; Rolland et al., 2001). In recent years, it has been established that sugars, such as Glc, signal plant development and growth during germination by modulating the overall carbon status in a complex and still unexplained cross-talk with plant hormones such as ethylene and ABA (Rolland et al., 2002). There is strong evidence that hexokinase (*HXX1*) is a hexose sensor that leads to gene activation or repression by an unknown pathway (Jang et al., 1997; Moore et al., 2003). In addition, HXX-independent sugar signaling has also been described (Sheen et al., 1999).

Initially regarded as a rare sugar involved in desiccation tolerance, trehalose seems to occur in most plants, although at almost undetectable levels. The presence of *TPS1* genes has been found in a wide variety of non-stress tolerant plant species (Goddijn and van Dun, 1999). Although Arabidopsis has 11 *TPS* genes (Leyman et al., 2001), 3 of them closely related to *AtTPS1*, which encodes an active enzyme involved in trehalose biosynthesis (Blázquez et al., 1998), it does not accumulate significant amounts of this disaccharide (Vogel et al., 2001).

In this study, we overexpressed in Arabidopsis the *AtTPS1* gene to test for possible effects on stress tolerance and development. We showed that although Arabidopsis overexpressing *AtTPS1* accumulated trehalose only at low levels, transgenic plants have acquired desiccation tolerance. This is similar to previously reported work in tobacco where bacterial or yeast *TPS1* genes were successfully used to engineer stress tolerance in spite of the absence of significant levels of trehalose accumulation (Holmström et al., 1996; Pilon-Smits et al., 1998). In addition, these previous studies showed that transgenic plants overexpressing bacterial or yeast *TPS1* exhibited unexpected phenotypical changes, such as dark-green and lanceolate leaves, and a growth retardation habit that we did not observe in Arabidopsis expressing *AtTPS1*, except for a delayed flowering time. The low concentration of trehalose accumulated in transgenic plants, as documented in this and other reports, is unlikely to be sufficient for its action as an osmoprotectant (Gaff, 1996). In fact, we found that T6P accumulates at a higher concentration than trehalose in plants overexpressing *AtTPS1*. The overexpression of a chimeric fusion of *E. coli* TPS and TPP encoding genes in rice led

to trehalose accumulation and abiotic stress-tolerant plants, but no morphological abnormalities were observed probably due to the absence of T6P accumulation (Garg et al., 2002). Therefore, all these results could be explained as a consequence of an alternative role of T6P as a signal molecule involved in control of carbon metabolism in connection with growth and development. A *tps1* mutant in Arabidopsis has been characterized as embryo lethal, strongly suggesting a role for T6P in plant development (Eastmond et al., 2002). It has been shown that T6P has a regulatory role in carbohydrate utilization during plant growth and development (Eastmond et al., 2002; Schluempmann et al., 2003, 2004; van Dijken et al., 2004). Therefore, we tested whether the overexpression of *AtTPS1* in Arabidopsis would lead to a sugar-response phenotype. Our results showed that Arabidopsis plants overexpressing *AtTPS1* display Glc- and ABA-insensitive phenotypes allowing them to normally grow and develop in high Glc or ABA concentrations. Similar phenotypes are displayed by the allelic *gin6/sis5/sun6* mutants, all impaired in the *ABI4* transcriptional activator gene, which has a central role in mediating Glc sensitivity by ABA (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000). Thus, besides being involved in the synthesis of trehalose, the *AtTPS1* enzyme also has a role in sugar and ABA signaling during vegetative development. We also showed that *AtTPS1* promotes germination in contrast with the *ABI4* gene, which is known to inhibit this process (Arenas-Huertero et al., 2000). An important point is that ABA levels remained almost unchanged when plants overexpressing *AtTPS1* were grown in the presence of Glc, in contrast with the wild type and *gin6* mutant, which show a substantial increase in ABA content under this condition (Arenas-Huertero et al., 2000; León and Sheen, 2003).

Recently, the overexpression of trehalose metabolism genes from *E. coli* in Arabidopsis has been reported (Schluempmann et al., 2003). Plants expressing the *otsA* (encoding TPS) gene accumulate T6P, whereas those expressing *otsB* (encoding TPP) contain almost undetectable levels of T6P. Seedlings expressing *otsA* grew better than *otsB* or *treF* (encoding TH) expressors in 100 mM Glc, Fru, or Suc. However, when germination was assayed in the presence of 7% (389 mM) Glc, seedlings of wild-type or *otsA* (TPS)-expressing plants were similarly sensitive to high sugar concentration, with no greening or cotyledonary leaf expansion. Growth of *otsB* (TPP)-expressing plants was completely arrested at an earlier developmental stage (Schluempmann et al., 2003). These results contrast with those obtained in this work, where overexpression of *AtTPS1* in Arabidopsis confers insensitivity to 6% Glc. The T6P levels in Arabidopsis determined in this study were comparable to those reported in plants overexpressing the *E. coli otsA* gene (Schluempmann et al., 2003). A likely explanation for this discrepancy is that the N-terminal and/or C-terminal protein extensions of *AtTPS1*, which are absent in the correspond-

ing proteins from *E. coli* and yeast (Blázquez et al., 1998; Goddijn and van Dun, 1999; Zentella et al., 1999), play a role in the sugar-signaling response. In this respect, it is interesting to mention that we have shown previously that deletion of the N-terminal part of *AtTPS1* results in a dramatic increase in intrinsic TPS catalytic activity (Van Dijk et al., 2002). Additionally, when this N-terminal deleted *AtTPS1* was expressed in Arabidopsis, the plants were Glc sensitive, strongly suggesting that the N-terminal region of *AtTPS1* somehow takes part in the Glc-signaling process (N. Avonce and G. Iturriaga, unpublished data).

A relevant aspect of this study is that 35S::*AtTPS1* plants displaying a Glc-insensitive phenotype showed a down-regulation of *ABI4*, *HXX1*, and *ApL3* genes when seedlings were germinated in Glc. This is consistent with the phenotype of *gin2* and *gin6* mutants abrogated in *HXX1* or *ABI4* genes, respectively, also displaying Glc insensitivity (Arenas-Huertero et al., 2000; Moore et al., 2003). However, the expression of *AtTPS1* in the *abi4* mutant was at similar levels to wild-type plants, suggesting that *AtTPS1* is probably not regulated by *ABI4* (N. Avonce and G. Iturriaga, unpublished data). The contribution of other genes not analyzed in this study to explain the phenotypes of 35S::*AtTPS1* plants cannot be excluded.

The analysis of *AtTPS1* in *HXX1*-antisense or *HXX1*-sense transgenic lines is indicative of its possible involvement in the HXK-dependent Glc-signaling pathway. Absence of *AtTPS1* expression was observed in *HXX1*-antisense plants germinated in media without Glc, indicating the dependence of *AtTPS1* expression on the presence of *HXX1*. These results suggest that *AtTPS1* participates downstream of *HXX1*. Glc controls ABA-signaling genes like the *ABI4* transcription factor known to act in a signaling network downstream of *HXX1* Glc sensor (Arenas-Huertero et al., 2000; León and Sheen, 2003). We have shown that *AtTPS1* up-regulates *ABI4* or down-regulates it if Glc is present. Therefore, we suggest that *AtTPS1* is regulating *ABI4* transcription factor in a signaling cascade to control germination, shoot development, and cotyledon greening and expansion. It remains to be shown whether the gene regulation effect caused by *AtTPS1* is at transcriptional level alone and/or whether mRNA stability, changes of protein levels, or protein modifications could also be important.

CONCLUSION

This work reveals that plants overexpressing *AtTPS1* show Glc- and ABA-insensitive phenotypes and that these are due at least in part to an altered regulation of genes involved in Glc and ABA signaling during seedling vegetative growth. It is likely that in the signaling process T6P and possibly the *AtTPS1* protein are involved. In addition, since trehalose does not accumulate at significant levels in plants overexpressing *AtTPS1*, their increased drought tolerance

seems a consequence of the same signaling process. *AtTPS1* is probably part of the HXK1-dependent Glc-signaling pathway and could be modulating the *ABI4* gene expression in concert with Glc. Thus, *AtTPS1* has a pivotal role in gene regulation to integrate environmental and metabolic cues during vegetative development.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) Col-0 ecotype was used for overexpressing the *AtTPS1* gene. *HXK1*-sense or *HXK1*-antisense plants (Jang et al., 1997) are in the Landsberg *erecta* ecotype. Plants were routinely grown on Metro-Mix 200 (Grace Sierra, Milpitas, CA) soil at 24/20°C with 16-h-light/8-h-dark cycle. Surface-sterilized seeds were germinated on MS media: 1× MS basal salt mixture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 1% (w/v) Suc, 85 vitamins, 0.05% MES (w/v), and 0.8% (w/v) phytoagar. To break dormancy, seeds were incubated at 4°C for 4 d with cool-white illumination (20 μE m⁻² s⁻¹). Arabidopsis seeds were germinated in different ABA concentrations of (±) *cis-trans* isomer (Sigma, St. Louis) or in 6% (w/v) Glc. For dehydration tolerance tests (Gaxiola et al., 2001), 4-week-old Arabidopsis plants grown on 1:1:1 vermiculite:perlite:peat moss were used. Watering was held for 2 weeks, and then plants were rewatered and let 1 d to recover before being photographed. For quantitative PCR (QPCR) experiments, wild-type Arabidopsis seeds and seeds overexpressing 35S::*AtTPS1* were germinated on top of Whatman 3MM filter paper (Clifton, NJ) on MS medium supplemented with 1% Suc. Ten days after sowing, the seedlings were moved with the filter paper to a new MS plate containing 7% Glc, 7% mannitol, or 1% Suc, and 6 h later seedlings were collected for RNA extraction.

Gene Constructs and Plant Transformation

For overexpression of *AtTPS1* in transgenic plants, total RNA was extracted from 2-week-old Arabidopsis plants using TRIZOL reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Five micrograms of total RNA was reverse transcribed with Superscript II (Invitrogen) using oligo(dT) primer and amplified by PCR using Expand High Fidelity PCR system (Roche, Indianapolis) with *AthTPS5*' (5'-CATGCCATGGCTGGAAATAAGTACAACCTGTC-3') and *AthTPS3*' (5'-ATAGTTTTGCGCCGCTTAAGGTGAGGAAGTGCTGT-CAG-3') primers derived from the reported sequence (Blázquez et al., 1998). The PCR program consisted of 40 cycles of amplification (94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 2 min). The resulting 2.8-kb *NcoI*/*NotI* DNA fragment was ligated into the pSAL6 vector and checked for complementation and trehalose synthesis capacity in the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) *tps1Δ* mutant (Van Dijk et al., 2002). Insert was excised from pSAL6 clone and ligated to its 57-bp 5'-leader deduced from the reported sequence (Blázquez et al., 1998), which was synthesized using oligonucleotides NA4 (5'-CTAGAGCGGCCG-CAGTGTGAGTAATTTAGTTTGGTTCTGTTTGGTGTGACCGTC-3') containing a *XbaI* site and NA5 (5'-CATGGACGCTCACACAAAACAGAAC-CAAAATAAATACTACACTGGCGCCGCT-3') with a *NcoI* site, and cloned in *XbaI* and *NotI* sites of pBluescript SK⁻ (Stratagene, La Jolla, CA) before determining its DNA sequence. This plasmid containing *AtTPS1* (pSK*AtTPS1*) was digested with *XbaI* and *KpnI* to release the insert and cloned in pBin19 vector (Bevan, 1984) containing the 0.8-kb 35S-promoter and 0.3-kb NOS polyadenylation site, resulting in plasmid pBin35S/*AtTPS1*/NOS. The construct was introduced by electroporation in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain containing the pGV2260 plasmid. The resulting bacteria were used to transform Arabidopsis by in planta vacuum infiltration (Bechtold et al., 1993). Transgenic seedlings were selected on MS media containing 50 μg mL⁻¹ kanamycin (Sigma). One-week-old seedlings were transferred to pots under the indicated conditions until plants formed seeds. Homozygous lines from the T₃ generation were used in this work.

RT-PCR Analysis

RT-PCR experiments were performed using 5 μg of total RNA extracted as described before from Arabidopsis tissues and used for first-strand cDNA synthesis with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT).

PCR was conducted at linearity phase of the exponential reaction for each gene after comparison of the PCR products at different cycles. The gene-specific primers derived from database entries to amplify the corresponding gene fragment from transgenic lines or wild-type Arabidopsis plants, the corresponding size products and the GenBank accession numbers were as follows: *AtTPS1*, 5'-GCAGATATCGAATTCGGG-3' and 5'-TTAAGGTGAG-GAAGTGGTGTGTCAG-3', 662 bp, Y08568; *HXK1*, 5'-CAGACTTCTGTCTCTCGG-3' and 5'-AGTAGAGAGACTGAGAAGC-3', 934 bp, U2814; *HXK2*, 5'-GAAGATGGCTGAAGAAGTCC-3' and 5'-CAGAGTCATCTTCAAGT-TCCG-3', 502 bp, U28215; and *APT1*, 5'-TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC-3' and 5'-CCTTCCCTTAAGCTCTG-3', 478 bp, BT000370. Each RT-PCR result was confirmed in at least three independent experiments. RT-PCR products were resolved in 1× Tris-acetate EDTA, 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The bands shown represent the negative of the fluorescent images, and a densitometric quantification using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA) of the RT-PCR reaction was performed and normalized for each gene band using the *APT1* gene as a control.

QPCR

Total RNA was extracted from Arabidopsis seedlings, and after DNase I treatment (Roche), cDNA was synthesized using AMV reverse transcriptase system (Promega, Madison, WI). QPCR was carried out using an ABI-Prism 7700 Sequence Detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) as described by the manufacturer. The *UBQ4* detector was used as a housekeeping reference. The following primers (melting temperature 59°C) and probes (melting temperature 69°C) were used: *AtTPS1*, 5'-GAGCTTAGAGAGAA-GAGGAAGAGCAA-3' and 5'-TTCTAAACGCAAGTCATCTCAGAGT-3', 5'-CGTAATCCTAATGACGTTGC-3' probe; *CABI*, 5'-GCCAAAGGCCCAT-CAG-3' and 5'-TCGGTGTATCCAGAGAA-3', 5'-TGACCGTGTCAAG-TACT-3' probe; *APL3*, 5'-TCAGCACCATGTGATAGTAAAGC-3' and 5'-CAGTTGGTTTCTCAGAGAAATGGA-3', 5'-TCTTTCGTGCGCGCCG-3' probe; *HXK1*, 5'-GGTAGCAAACCTCAAGATGCTTATCAG-3' and 5'-CCC-TAGGTCCAATGCATAAAAGAG-3', 5'-CGTGTATAATCTTCTCCG-3' probe; *ABI4*, 5'-CGTGGTTCGAGTCTATCAA-3' and 5'-ACCCATAGAA-CATACCCGGATCAA-3', 5'-CATCCACCGCCGTTG-3' probe; *UBQ4*, 5'-GCT-TCTGAGCTTTTGTGATGTGAT-3' and 5'-GAAACCAAACCGTGAAG-GATCTC-3', 5'-TGTTCGAGTCTCATGAC-3' probe. Probes were labeled with FAM (6-carboxyfluorescein) reporter fluorochrome at the 5' end and with TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rodamine) quencher fluorochrome at the 3' end.

Western Blot

Protein extracts were prepared by homogenization of 100 mg of plant tissue in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.0. Protein concentration was assayed using the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA). Ten micrograms of protein per lane were separated in a 7.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose Hybond-C membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked with PBST buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 120 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween 20) containing 5% fat-free milk powder, incubated overnight at 4°C with *AtTPS1* rabbit antiserum diluted 1:1,000, washed two times with PBST at 25°C, and incubated with a secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase diluted 1:5,000 (Zymed, San Francisco, CA). Immune complexes were detected by a color assay using nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase (Sigma).

Trehalose Determination

Plant extracts were prepared by adding 1 mL of milliQ water to 100 mg (fresh weight) of frozen plant tissue and boiled for 10 min. After centrifugation (10 min at 10,000g), the samples were filtered through a 1-mL column containing Dowex ion-exchange resins (1:1 [v/v]) 50WX8 100-200 and 1X8 100-200 (Dow Chemical, Midland, MI). The eluate pH was adjusted to 7.0 with 1 M NaOH and analyzed by HPLC using a Carbopac PA-100 column (Dionex, Sunnyvale, CA) eluted with 90 mM NaOH. Trehalose, Glc, Fru, and Suc standards were used to determine the concentrations. To confirm the identity of trehalose in plant extracts, samples were incubated with TH (*Hemicola grisea*) and analyzed as described before.

Trehalose-6-P Determination

T6P was extracted from 100 mg of frozen plant tissue by adding 500 μ L of 80% ethanol and boiled for 20 min as described by Schluempmann et al. (2003). After centrifugation (10 min at 10,000g), the samples were vacuum desiccated. The dry samples were extracted with 1.2 mL of boiling 0.1 M NaOH for 1 h and centrifuged as described before. The obtained supernatant was neutralized with 1.2 mL of 200 mM triethanolamine, pH 7.6. The sample pH was adjusted to 4 with 10 mM H₂SO₄ and analyzed at 65°C by HPLC on an Aminex HP-87H column (Bio-Rad, Richmond, CA) that was run isocratic with 5 mM H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL/min. A T6P (Sigma) standard was used to determine the concentrations.

ABA Determination

To determine the ABA content in wild-type and transgenic plants, 7-d-old seedlings were homogenized in ABA extraction buffer (10 mM HCl, 1% polyvinylpyrrolidone in methanol) and incubated overnight at 4°C. After centrifugation, supernatant was neutralized with 1 M NaOH and ABA quantified by ELISA with a Phytodetek-ABA kit (Agdia, Elkhart, IN).

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Drs. J.-C. Jang for his kind gift of transgenic *Arabidopsis* seeds expressing the sense or antisense *HXK1* gene and Patricia León for Col-0 and *abi4-1* mutant. We also thank Drs. Rudy Vergauwen and Lorena Pedraza for their assistance with trehalose and T6P determinations, Juan Estevez for his technical advice on *Arabidopsis* transformation and ABA determination, Katrien Royackers for AtTPS1 antiserum, and Paul Gaytán and Eugenio López for oligonucleotide synthesis.

Received August 19, 2004; returned for revision August 31, 2004; accepted September 3, 2004.

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
- Arenas-Huetero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of *Arabidopsis* Glc insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* 14: 2085–2096
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) *In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris* 316: 1194–1199
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12: 8711–8721
- Bell W, Klaassen P, Ohnacker M, Boller T, Herweijer M, Schoppink P, Van der Zee P, Wiemken A (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 CIP1, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur J Biochem* 209: 951–959
- Blázquez MA, Lagunas R, Gancedo C, Gancedo JM (1993) Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* 329: 51–54
- Blázquez MA, Santos E, Flores CL, 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
- Bonini BM, Van Dijck P, Thevelein JM (2003) Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae* Tps1 mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* 1606: 83–93
- Eastmond PJ, van Dijken AJH, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JDC, Smeekens SC, Graham IA (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J* 29: 225–235
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R–27R
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14(Suppl): S15–S45
- Gaff D (1996) Tobacco-plant desiccation tolerance. *Nature* 382: 502
- Garg AK, Kim J-K, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu R (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15898–15903
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001) Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11444–11449
- Goddijn OJM, van Dun K (1999) Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci* 4: 315–319
- 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 the trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol* 113: 181–190
- 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
- Holmström KO, Mäntylä E, Wellin B, Mandal A, Palva ET, Tunnela OE, Londesborough J (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683–684
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S (2000) The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLE-6 gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* 23: 577–585
- Hunter T (2000) Signaling—2000 and beyond. *Cell* 100: 113–127
- Jang JC, León P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9: 5–19
- 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
- Koch KE (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509–540
- Laby RJ, Kincald MS, Kim D, Gibson SI (2000) The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* 23: 587–596
- León P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* 8: 110–116
- Leyman B, Van Dijck P, Thevelein JM (2001) An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci* 6: 510–513
- 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 Glc and fructose and is suppressed by mutations that reduce sugar uptake. *Eur J Biochem* 217: 701–713
- Merlot S, Giraudat J (1997) Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiol* 114: 751–757
- Moore B, Zhou L, Rolland E, Hall Q, Cheng W-A, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332–336
- Paul M, Pellny T, Goddijn O (2001) Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 6: 197–200
- Pego JV, Kortstee AJ, Huijser C, Smeekens SC (2000) Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 51: 407–416
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, van Dun K, Voogd E, Verwoerd TC, Krutwagen RWHH, et al (1998) Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J Plant Physiol* 152: 525–532
- Rolland E, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14(Suppl): S185–S205
- Rolland E, Winderickx J, Thevelein JM (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26: 310–317
- Schluempmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Matthew P (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6849–6854
- Schluempmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Wobbes B, Paul M, Smeekens S (2004) Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 135: 879–890

- Sheen J, Zhou L, Jang JC (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2: 410–418
- 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
- Van Dijk P, Mascorro-Gallardo JO, De Bus M, Royackers K, Iturriaga G, Thevelein JM (2002) Truncation of Arabidopsis thaliana and Selaginella lepidophylla trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochem J* 366: 63–71
- van Dijken AJ, Schluepmann H, Smeekens SC (2004) Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* 135: 969–977
- Vogel G, Fiehn O, Bressel LJRD, Boller T, Wiemken A, Aeschbacher RA, Winkler A (2001) Trehalose metabolism in Arabidopsis: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *J Exp Bot* 52: 1817–1826
- Wiemken A (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* 58: 209–217
- Winkler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher A (2000) Trehalose induces the ADP-Glc pyrophosphorylase gene, *Apl3*, and starch synthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* 124: 105–114
- Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijk P, Folch-Mallol J, Bonini B, Van Vaeck C, Gaxiola R, Covarrubias AA, Nieto-Sotelo J, Thevelein JM, et al (1999) A Selaginella lepidophylla trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol* 119: 1473–1482

Trehalose metabolism and glucose sensing in plants

N. Avonce*, B. Leyman†, J. Thevelein† and G. Iturriaga*¹

*Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, Mexico, and †Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit Leuven and Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie (VIB), Kasteelpark Arenberg 31, B-3001 Leuven-Heverlee, Flanders, Belgium

Abstract

Plants sense and respond to changes in carbon and nitrogen metabolites during development and growth according to the internal needs of their metabolism. Sugar-sensing allows plants to switch off photosynthesis when carbohydrates are abundant. These processes involve regulation of gene and protein activity to allow plants the efficient use of energy storage. Besides being a key element in carbon metabolism, glucose (Glc) has unravelled as a primary messenger in signal transduction. It has been proved that hexokinase (HXK) is a Glc sensor. An unusual disaccharide named trehalose is present in very low levels in most plants except for the desiccation-tolerant plants known as 'resurrection' plants where trehalose functions as an osmoprotectant. We have shown that overexpression of the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase gene (*AtTPS1*) in *Arabidopsis* promotes trehalose and trehalose-6-phosphate (T6P) accumulation. Seedlings expressing *AtTPS1* displayed a Glc-insensitive phenotype. Transgenic lines germinated normally on Glc, in contrast to wild-type seedlings showing growth retardation and absence of chlorophyll and root elongation. Gene-expression analysis in transgenic plants showed up-regulation of several genes involved in sugar signalling and metabolism. These data suggest that *AtTPS1* and accordingly T6P and trehalose play an important role in the regulation of Glc sensing and signalling genes during plant development.

Introduction

Trehalose (α -D-glucopyranosyl-1, 1- α -D-glucopyranoside) is a non-reducing disaccharide present in bacteria, yeast cells, fungal spores, certain invertebrate species and 'resurrection' plants [1]. This sugar accumulates to adapt cells against dehydration, salinity, freezing and heat stress, and it may also serve as a source of energy and carbon [2]. In higher plants and animals the presence of trehalose is rare, although the presence of trehalose biosynthetic genes has been documented in most sequenced genomes by database analysis. There are at least three different pathways for trehalose biosynthesis [3]. The most characterized and common pathway among different organisms involves the formation of T6P (trehalose 6-phosphate) from UDP-Glc and glucose-6-phosphate by trehalose-6-phosphate synthase (TPS), and in a second step the synthesis of trehalose by trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) [4]. In yeast, TPS and TPP form a multimeric enzymatic complex where two other polypeptide chains named Tsl1 (TPS complex large subunit) and Tps3 play a regulatory role [5]. The yeast *tps1* Δ mutant is 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 [6]. Also, a correlation has been shown between the inhibition of HxkII by T6P and the control of sugar influx in glycolysis [7].

There is extensive research and patented technology on the use of trehalose as a natural preservative of biological membranes, macromolecules, foods, blood, vaccines and several enzymes, that can be stored and dried at room temperature without loss of structure and bioactivity after rehydration [8]. This observation, and the fact that trehalose accumulates in several organisms to resist extreme stress conditions, led several research groups and companies to select trehalose as a target molecule for genetic engineering of plants. In recent years the overexpression of yeast or bacterial *TPS1* genes in plants has been reported to improve stress tolerance in crops. For instance, tobacco, potato and rice plants have an increased drought tolerance after engineering trehalose biosynthesis [9–12]. Nevertheless, transgenic plants expressing a *TPS1* gene from *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* with a constitutive promoter display severe morphological alterations such as lance-shaped leaves, stunted growth, aberrant root development and fewer seeds or sterility. This is likely due to an increased concentration of T6P in the cytosol. To overcome this problem, two molecular genetic improvements have been devised. Firstly, the construction of a translational gene fusion of TPS and TPP coding regions to avoid the unnecessary accumulation of T6P in the cell; and secondly, the use of a stress-inducible promoter

Key words: abscisic acid, *Arabidopsis*, carbohydrates, glucose sensing, hexokinase, stress tolerance, trehalose.

Abbreviations used: ABA, abscisic acid; *ABI4*, ABA-insensitive4 gene; *APT1*, adenine phosphoribosyltransferase1 gene; *AtTPS1*, *Arabidopsis thaliana* TPS1 gene; *CAB7*, chlorophyll A/B binding-protein1 gene; *gin2*, glucose-insensitive2 mutant; Glc, glucose; HXK, hexokinase; RT, reverse transcriptase; *SITPS1*, *Selaginella lepidophylla* TPS1 gene; *35S::AtTPS1*, *Arabidopsis* transgenic lines overexpressing *AtTPS1* under the 35S promoter; T6P, trehalose-6-phosphate; TPP, trehalose-6-phosphate phosphatase; TPS, trehalose-6-phosphate synthase; Tsl1, TPS complex large subunit.

¹To whom correspondence should be addressed (email iturri@cib.uaem.mx).

to prevent trehalose sinking during plant growth and development when stress is absent. Accordingly, rice plants have been obtained that show tolerance to different abiotic stresses and without any morphological change, which could compromise plant growth and yield [12]. However, the low levels of trehalose generated in all these transgenic plants suggest that it is unlikely working as an osmoprotectant or membrane stabilizer. Therefore, it is possible that the observed stress tolerance is the product of pleiotropic effects caused by an alteration of trehalose metabolism, and thus this pathway might play a regulatory role.

There are 11 *TPS* genes in *Arabidopsis thaliana* and paradoxically trehalose is almost undetectable in this plant [13,14]. The mutation of *AtTPS1* (*Arabidopsis thaliana* *TPS1* gene) by insertional mutagenesis in *Arabidopsis* provokes an embryo lethal phenotype and suggests that T6P is indispensable for plant growth, development and flowering [15,16]. In addition, it has been shown that T6P regulates carbohydrate utilization and growth via control of glycolysis in a similar manner to yeast [17,18].

The *TPS1* homologue genes from *Arabidopsis* and the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* are able to complement the *tps1* yeast mutant [19,20]. Moreover, expression in yeast of *SITPS1* (*Selaginella lepidophylla* *TPS1* gene) complements yeast although trehalose is almost undetectable, suggesting that the *Tps1* protein *per se* is also important to restore cell growth in Glc [20]. Plant *TPS1* genes encode large polypeptides compared to their microbial homologues and have N-terminal and C-terminal amino acid extensions absent in bacterial and yeast *TPS* sequences, which possibly have a regulatory role. We have shown that the deletion of the N-terminal region of *Arabidopsis* and *Selaginella* *TPS1* genes substantially increased enzyme activity and trehalose accumulation when expressed in yeast and plants [21]. To gain further understanding of the role of trehalose in stress tolerance and regulation of carbohydrate metabolism, we studied the effect of overexpressing the *AtTPS1* gene in *Arabidopsis*.

Material and methods

Plant material

Arabidopsis thaliana Col-0 ecotype was used for overexpressing the *AtTPS1* gene. Plants were routinely grown on synthetic soil at 24/20°C with 16-h light/8-h dark cycle. Surface-sterilized seeds were germinated on Murashige and Skoog basal salt mixture medium supplemented with 1% sucrose, B5 vitamins and 0.8% phytoagar. To break dormancy seeds were incubated at 4°C for 4 days with cool-white illumination ($20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). *Arabidopsis* seeds were germinated in 6% Glc and 7-day-old seedlings were collected for RNA extraction.

Plant transformation

The *AtTPS1* cDNA was obtained from *Arabidopsis* total RNA reverse transcribed with Superscript II (Invitrogen) using oligo(dT) primer and amplified by PCR using

ExpandTM High Fidelity PCR System (Roche) with specific primers derived from sequence in databases. The cDNA insert was cloned in pBluescript SK⁻ (Stratagene) and its DNA sequence was checked, before subcloning in pBin19 vector, containing the 0.8 kb 35S promoter and 0.3 kb nopaline synthase polyadenylation site. The construct was introduced by electroporation in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain containing the pGV2260 plasmid. The resulting bacteria were used to transform *Arabidopsis* by *in planta* vacuum infiltration [22]. Transgenic seedlings were selected on MS media containing $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ kanamycin (Sigma). One-week-old seedlings were transferred to pots under the indicated conditions until plants formed seeds. Homozygous lines from the T₃ generation were used in the present work.

Reverse transcriptase-PCR

Reverse transcriptase (RT)-PCR experiments were performed using 5 μg of total RNA extracted as described before from *Arabidopsis* tissues and used for first strand cDNA synthesis with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT). PCR was conducted at the linear phase of the exponential reaction for each gene after comparison of the PCR products at different cycles. Gene-specific primers derived from database entries to amplify the corresponding gene fragment from Col-0 ecotype for both wild-type or transgenic *Arabidopsis* were used. RT-PCR products were resolved in 1× TAE, 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The bands shown represent the negative of the fluorescent images and a densitometric quantification using Quantity One software (BioRad) of the RT-PCR reaction was performed and normalized for each gene band using the *APT1* gene as a control.

Results and discussion

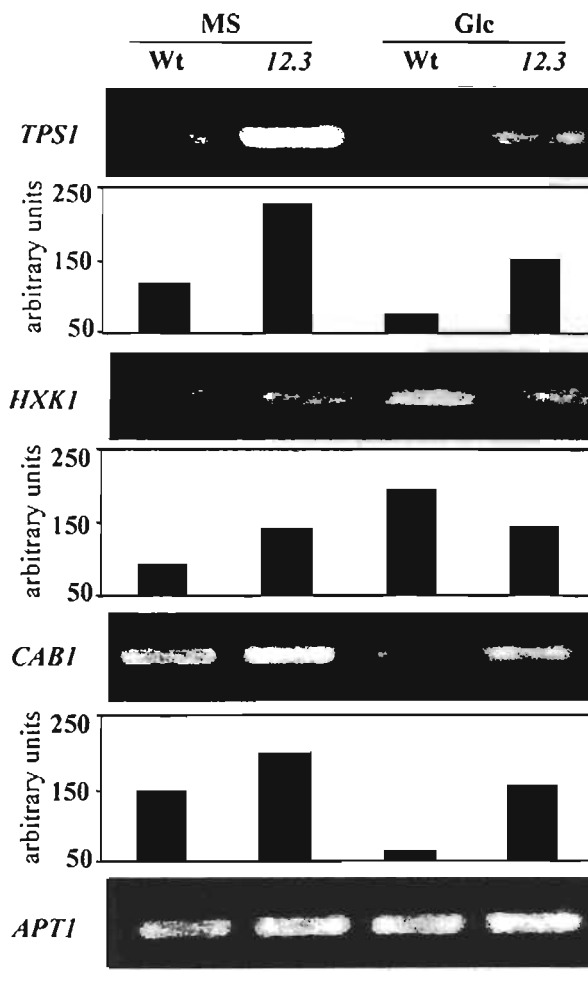
The overexpression of *AtTPS1* gene in *Arabidopsis* was conducted to test for possible effects on stress, development and gene regulation. Therefore, *Arabidopsis* was transformed with *AtTPS1* cDNA and several independent 35S::*AtTPS1* (*Arabidopsis* transgenic lines overexpressing *AtTPS1* under the 35S promoter) plants were obtained after transformation with the *Agrobacterium tumefaciens* system. Homozygous plants were selected from each transgenic line containing a single gene insertion after genetic analysis using kanamycin to score a 3:1 segregation ratio. The expression of *AtTPS1* gene was checked by RT-PCR. The trehalose and T6P concentration was determined in 35S::*AtTPS1* lines and wild-type seedlings, showing a low increase in both disaccharides in the different transgenic lines. A detailed analysis of possible changes in organ shape or size and plant growth habit was monitored in all the different transgenic lines during their whole life cycle. No morphological changes in individual organs or at the whole plant level were observed in any of the transgenic lines, except for delayed flowering time (1 to 2 weeks) in all of them. Nevertheless, the germination rate was higher in plants overexpressing *AtTPS1* compared to wild-type seedlings and similar to *abi4* (abscisic acid-insensitive)

mutant. Further characterization of transgenics involved stress tolerance tests in each of the *35S::AtTPS1* lines and wild-type plants. Four-week-old plants were left for 2 weeks without watering. Most transgenic lines recovered from water deprivation after rewatering for 1 day, and recovered full shape whereas wild-type plants did not survive this treatment. These results are similar to other reports where overexpression of *TPS1* genes in plants of micro-organisms has been carried out to improve their drought tolerance and suggest that the low concentration of trehalose detected in transgenic plants is probably working more as a signal for stress tolerance rather than as an osmoprotectant [9–11].

Recently, it has been shown that T6P is a signal molecule involved in the control of carbon metabolism in connection with growth and development [17]. Therefore, we tested whether the overexpression of *AtTPS1* in *Arabidopsis* would lead to a sugar response phenotype. Our results showed that *Arabidopsis* seedlings overexpressing *AtTPS1* display a Glc-insensitive phenotype allowing them to normally germinate and develop in a media containing 6% Glc. A similar phenotype was observed in *Arabidopsis* plants with antisense expression of *HXK1* gene and in the *Arabidopsis gin2* (Glc-insensitive) mutant of the same gene [23,24]. In recent years, it has been established that sugars, such as Glc, signal to plant development and growth during germination by modulating the overall carbon status in a complex and still unexplained cross-talk with plant hormones such as ethylene and ABA (abscisic acid) [25]. There is clear evidence that *HXK1* is a Glc sensor [23,24]. Thus, our results suggest that the *AtTPS1* gene has also a role in sugar signalling during vegetative development. Given the observed Glc-insensitive phenotype, we decided to analyse the expression pattern in *35S::AtTPS1* plants of genes involved in Glc signalling and photosynthesis, namely *HXK1* and *CAB1* (chlorophyll A/B binding protein1) genes. Firstly, as expected, an increase in the *AtTPS1* transcript in plants overexpressing this gene was observed (Figure 1). The *APT1* (adenine phosphoribosyltransferase1 gene) was used as a constitutive control because it is expressed at similar levels in plants grown with or without Glc, and no altered gene expression is observed in transgenic lines compared to wild-type plants. An induction of *HXK1* and *CAB1* genes was observed in transgenic plants grown in media without Glc (Figure 1). When seedlings were germinated in the presence of Glc, *CAB1* expression was not repressed in *35S::AtTPS1* plants in comparison with wild-type plants, which showed a significant decrease in *CAB1* transcription. In contrast, *HXK1* transcript was repressed in plants overexpressing *AtTPS1* versus wild-type grown in the presence of Glc (Figure 1). We have also showed that overexpression of *AtTPS1* provoked an increase in *ABI4* (ABA-insensitive4 gene) transcription in plants germinated without Glc. In a similar manner to the effect on *HXK1*, *ABI4* expression in *35S::AtTPS1* plants drops significantly when Glc was present (results not shown). These results suggest that trehalose is a synergistic modulator of sugar-mediated gene expression and it is consistent with the observed Glc-insensitive phenotype of *35S::AtTPS1* plants.

Figure 1 | Altered gene expression in *35S::AtTPS1* plants

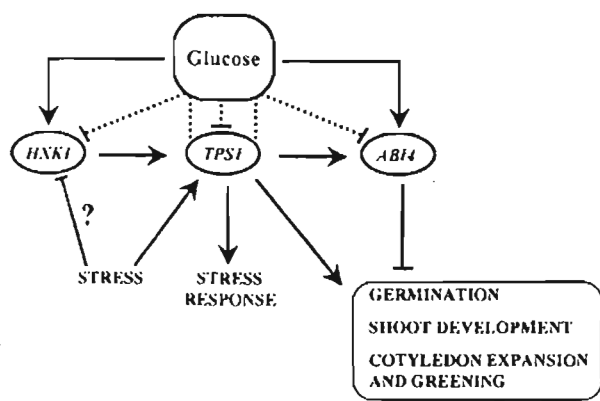
Semi-quantitative RT-PCR analysis of 7-day-old wild-type (Wt) or the representative *AtTPS1* 12.3 line (12.3) seedlings grown on MS alone or supplemented with 6% Glc. Graphics represent the quantification of the bands shown above, normalized according to *APT1* expression. *TPS1* (trehalose-6-phosphate synthase), *HXK1* (hexokinase), *CAB1* (chlorophyll A/B binding protein) and *APT1* (adenine phosphoribosyltransferase).



It has been reported that *Arabidopsis HXK1* antisense plants have a delayed senescence and increased stress resistance [26]. We have observed an absence of *AtTPS1* expression in *HXK1*-antisense plants, thus suggesting the dependence of *AtTPS1* expression on the presence of *HXK1*. These results suggest that *AtTPS1* might participate in *HXK1*-dependent pathway in a complex regulatory network.

A higher expression of *CAB1* in *35S::AtTPS1* seedlings is consistent with previous observations that plants overexpressing *TPS1* have dark-green leaves and higher photosynthetic rates [27]. However, it has been reported that overexpression of the *E. coli TPS1* gene leads to a Glc-sensitive phenotype [17]. As already mentioned an important difference between microbial and plant *TPS1* gene products is the presence of an N-terminal extension of about 80 amino acids in length. Thus, it is probable that besides T6P, the

Figure 2 | Proposed model of regulatory interactions among Glc, stress, *HXK1*, *TPS1* and *ABI4*. Solid arrows represent cross-regulation and dotted lines cross-regulation in the presence of Glc.



N-terminal region of *AtTPS1* is also part of the signalling process. In addition, since trehalose did not accumulate at significant levels, the drought tolerance phenotype in plants overexpressing *AtTPS1* could be a consequence of an altered regulation of the Glc signalling process.

A model of the possible mechanism of *AtTPS1* in Glc signalling is shown in Figure 2. Glc is a central key to several signalling and regulatory pathways and integrates external cues to adapt cells to abiotic stress, growth and development. *AtTPS1* is part of the *HXK1* signalling pathway and in turn controls *ABI4*, although in the presence of Glc *AtTPS1* is a negative modulator of both *HXK1* and *ABI4*. *ABI4* and *AtTPS1* have opposite effects on germination, shoot development, cotyledon expansion and greening. There is evidence supporting the notion that abiotic stress induces *AtTPS1* expression [28], whereas it is possible that *HXK1* gene might be repressed by stress as can be inferred from current data [26]. *AtTps1* and/or T6P and/or trehalose might influence gene regulation at different molecular levels including transcription, mRNA stability, translation and/or protein modifications. Another molecular actors in this network might be the 14-3-3 proteins, which are known to interact with phosphoserine in diverse proteins including TPS [29]. After signalling, TPP would convert T6P into trehalose, which would rapidly be degraded to Glc by trehalase. The turnover of T6P to yield Glc via trehalose would avoid unnecessary sinking of this disaccharide. Therefore, an important role of the trehalose biosynthesis pathway in higher plants would be the synthesis of small amounts of the signalling molecules T6P and trehalose rather than accumulation of trehalose as an osmoprotective compound. This could explain

why trehalose generally does not accumulate in significant quantities in higher plants, although the capacity for its biosynthesis has been retained during evolution.

References

- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 579-599
- Müller, J., Wiemken, A. and Aeschbacher, R. (1999) *Plant Sci.* **147**, 37-45
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003) *Glycobiology* **13**, 17R-27R
- Cabib, E. and Leloir, L.F. (1958) *J. Biol. Chem.* **231**, 259-275
- Reinders, A., Bürckert, N., Hohmann, S., Thevelein, J.M., Boller, T., Wiemken, A. and De Virgilio, C. (1997) *Mol. Microbiol.* **24**, 687-695
- Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 3-10
- Blázquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C. and Gancedo, J.M. (1993) *FEBS Lett.* **329**, 51-54
- Paiva, C.L.A. and Panek, A.D. (1996) *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**, 293-314
- Holmström, K.O., Mäntylä, E., Welin, B., Mandal, A. and Paiva, E.T. (1996) *Nature (London)* **379**, 683-684
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S., van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T.C., Krutwagen, R.W.H.H. et al. (1998) *J. Plant Physiol.* **152**, S25-S32
- Yeo, E.T., Kwon, H.B., Han, S.E., Lee, J.I., Ryu, J.C. and Byun, M.O. (2000) *Mol. Cells* **10**, 263-268
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, I.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. and Wu, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15898-15903
- Leyman, B., Van Dijk, P. and Thevelein, J.M. (2001) *Trends Plant Sci.* **6**, 510-513
- Vogel, G., Fiehn, O., Bressel, L.J.R.D., Boller, T., Wiemken, A., Aeschbacher, R.A. and Wingler, A. (2001) *J. Exp. Bot.* **52**, 1817-1826
- Eastmond, P.J., van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C. and Graham, I.A. (2002) *Plant J.* **29**, 225-235
- van Dijken, A.J., Schlupepmann, H. and Smeekens, S.C. (2004) *Plant Physiol.* **135**, 969-977
- Schlupepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S. and Matthew, P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6849-6854
- Schlupepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004) *Plant Physiol.* **135**, 879-890
- Blázquez, M.A., Santos, E., Flores, C.L., Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J. and Gancedo, C. (1998) *Plant J.* **13**, 685-689
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Oijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., Gaxiola, R., Covarrubias, A.A., Nieto-Sotelo, J., Thevelein, J.M. et al. (1999) *Plant Physiol.* **119**, 1473-1482
- Van Dijk, P., Mascorro-Gallardo, J.O., De Bus, M., Royackers, K., Ilurriaga, G. and Thevelein, J.M. (2002) *Biochem. J.* **366**, 63-71
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) *C.R. Acad. Sci. Paris* **316**, 1194-1199
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L. and Sheen, J. (1997) *Plant Cell* **9**, 5-19
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.A., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J. (2003) *Science* **300**, 332-336
- Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J.M. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 310-317
- Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J.C. (2000) *Plant Mol. Biol.* **44**, 451-461
- Paul, M., Pellny, T. and Goddijn, O. (2001) *Trends Plant Sci.* **6**, 197-200
- Lee, J.H., Lee, K.H., Kim, J.J., Yang, J.Y., Jun, S.S. and Hong, Y.N. (2003) *Plant Biol.* **2003**, Abstract 1069
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotellet, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. and Mackintosh, C. (1999) *Plant J.* **18**, 1-12

Received 17 September 2004

3. Construcción y caracterización funcional de genes quiméricos con dominios *TPS* y *TPP*.

3.1 Introducción.

El estrés ambiental es uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura en el mundo, se estima que más de la mitad de las tierras cultivables están sometidas constantemente a estrés hídrico, salino o térmico. México no escapa a esta realidad y se calcula que tres cuartas partes del territorio nacional se encuentra bajo condiciones de estrés. Estas condiciones ambientales adversas restringen la productividad y el rango de habitats disponibles para las plantas (Cushman and Bohnert 2000).

Una de las estrategias que utilizan las plantas (y otros organismos) para contender con el estrés osmótico es la acumulación de osmoprotectantes (o solutos compatibles). Estos compuestos son pequeños, eléctricamente neutros, no tóxicos a concentraciones molares y logran estabilizar proteínas y membranas contra los efectos de las altas concentraciones de sales, entre ellos se encuentran la glicina betaina, sulfato de colina, prolina, ectoína y la trehalosa (Rontein *et al* 2002).

Entre los esfuerzos para combatir el problema de la sequía, se ha planteado la generación de plantas tolerantes a condiciones de estrés utilizando técnicas de ingeniería genética (Cushman and Bohnert 2000). La ingeniería de plantas transgénicas con los genes involucrados en la síntesis de trehalosa parece una opción ideal para generar plantas resistentes a estrés. Sin embargo, los trabajos realizados anteriormente muestran que la sobreexpresión de genes *TPS* de *E. coli* y *S. cerevisiae* en plantas de tabaco y papa tuvo un éxito parcial, ya que pese a que se observó mayor tolerancia al estrés, las plantas transgénicas mostraron fenotipos aberrantes como hojas lanceoladas, enanismo, esterilidad y alteración del metabolismo en condiciones normales de crecimiento. Datos posteriormente publicados apuntan a que es la inusual acumulación de trehalosa 6-fosfato la responsable de éstos fenotipos aberrantes, ya que ha sido demostrado que éste intermediario

en la síntesis de trehalosa juega un papel importante en el desarrollo de la planta (Schluepmann *et al* 2003, Schluepmann *et al* 2004).

La hipótesis para esta parte del trabajo, fue que es posible generar proteínas quiméricas con actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa, y que la expresión de éstas producirá trehalosa y generará cantidades mínimas del intermediario trehalosa 6-fosfato libre en el citosol.

3.2 Objetivos.

General:

-Construcción y caracterización funcional de genes quiméricos con los dominios *TPS* y *TPP* de plantas y levaduras.

Particulares:

-Evaluar la funcionalidad *in vivo* de los genes quiméricos mediante la complementación de las mutantes *tps1*Δ, *tps2*Δ y *tps1*Δ-*tps2*Δ de *S. cerevisiae*.

-Determinar la actividad *in vitro* de trehalosa 6-fosfato sintasa de las construcciones quiméricas, así como determinar concentraciones de trehalosa producida por cada construcción en diferentes fondos genéticos y fuentes de carbono.

3.3 Resultados y discusión.

3.3.1 Construcción y evaluación de genes quiméricos.

En este trabajo se delimitaron y se amplificaron por PCR fragmentos de los genes *ScTPS1* y *AtTPS1* correspondientes al dominio *TPS*; y de los genes *ScTPS2* y *AtTPPB* los correspondientes a los dominios *TPP* (Fig. 4). Se introdujeron sitios de restricción en los

oligonucleótidos para facilitar su posterior clonación en un vector de expresión en levadura. Se seleccionó el plásmido pSal 4 para expresar las proteínas de fusión, ya que éste plásmido cuenta con un promotor inducible (por iones de Cu^{++}) y ha sido eficaz en la regulación de la expresión de genes heterólogos en levadura (Van Dijck *et al* 2002). De esta manera se generaron tres plásmidos recombinantes que expresan proteínas de fusión constituidas por dominios TPS y TPP (Fig. 5).

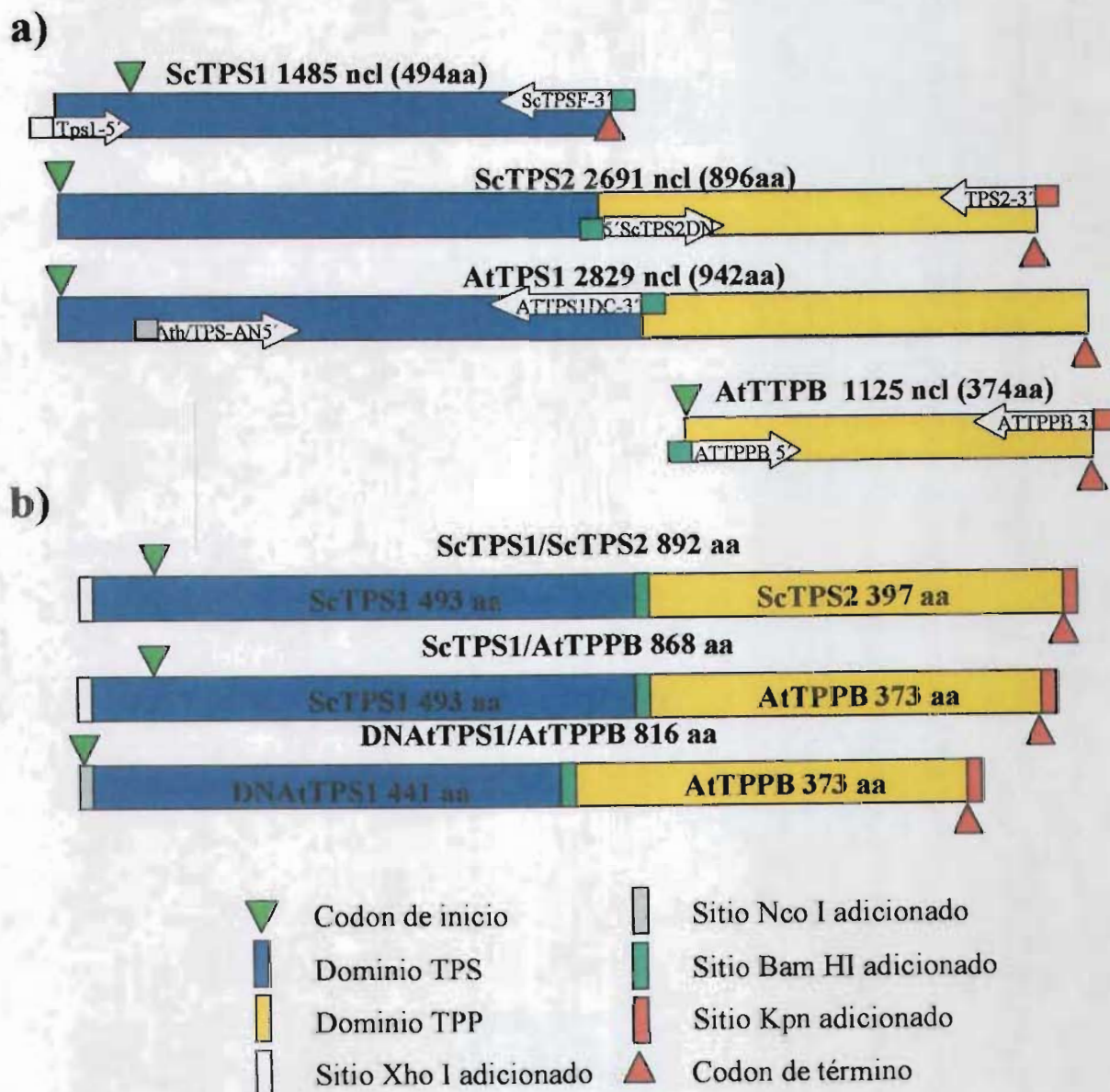


Figura 4. Diseño de las fusiones quiméricas TPS/TPP. a) Representación gráfica de las regiones amplificadas por PCR, las flechas indican los iniciadores b) Esquema de las fusiones de dominios TPS y TPP.

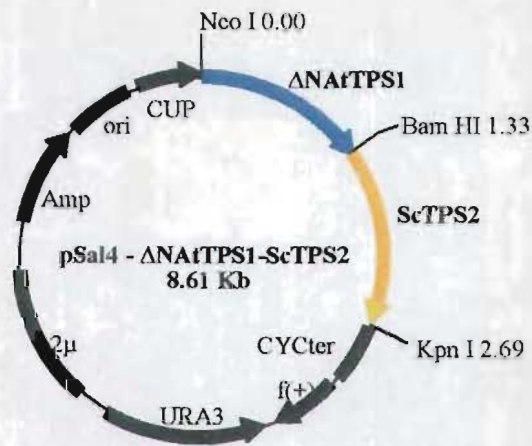
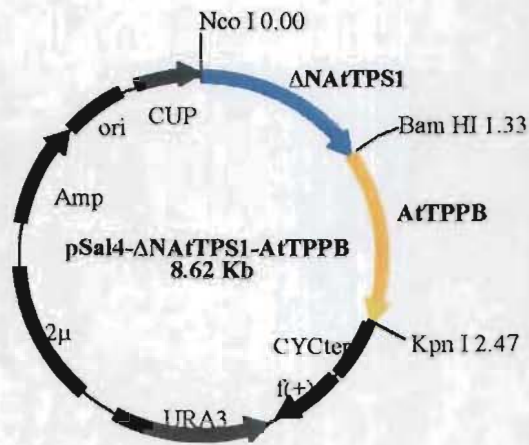
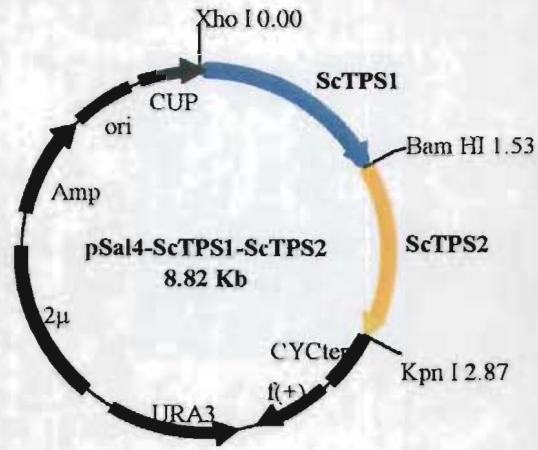


Figura 5. Construcciones quiméricas en el vector pSal4.

Con el objetivo de evaluar la actividad *in vivo* de las proteínas de fusión, se examinó su capacidad de complementar a las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *S. cerevisiae*. Se analizaron tres colonias independientes de cada construcción, y en la Tabla I se resumen los datos obtenidos después de tres días de crecimiento en las condiciones descritas en “Material y métodos”.

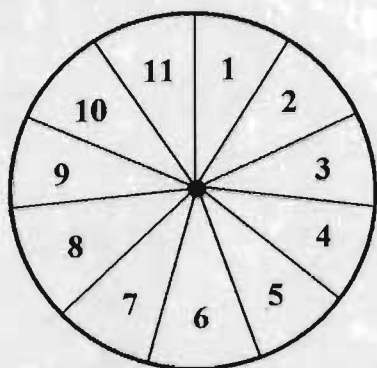
Tabla I. Complementación de las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* con tres construcciones quiméricas.

| CONSTRUCCIONES | MUTANTES (Fenotipo) | | |
|------------------------|--|---|---|
| | <i>tps1Δ</i> (Selección en glucosa) | <i>tps2Δ</i> (Termosensible a 38.5 °C) | <i>tps1Δ-tps2Δ</i> (Selección en glucosa, termosensibilidad a 38.5 °C) |
| pSal4::ScTPS1/ScTPS2 | SI | SI | SI |
| pSal4::ΔNAfTPS1/AtTPPB | NO | SI | NO |
| pSal4::ΔNAfTPS1/ScTPS2 | NO | SI | NO |

El análisis de complementación de mutantes indica que la única proteína que tiene las actividades de trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa es la generada con los dominios *TPS* y *TPP* de *S. cerevisiae*. Las otras dos proteínas sólo conservaron la actividad de trehalosa 6-fosfato fosfatasa. Una posible explicación para estos datos fue que en el proceso de amplificación por PCR pudo haberse generado alguna mutación que impidiera la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa. Para explorar esta posibilidad, las tres construcciones fueron secuenciadas y se compararon con las secuencia reportadas para cada dominio, sin embargo no se encontró ningún cambio en la secuencia nucleotídica en las construcciones. Estos datos sugirieron que el dominio ΔNAfTPS1 perdió su actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa al ser fusionado traduccionalmente con el dominio AtTPPB ó con el dominio carboxi-terminal de la proteína ScTPS2 que es una TPP, ya que ésta región por si sola contiene la actividad enzimática (Vogel *et al* 1998). Esta incompatibilidad con la fusión pudo ser provocada por cambios estructurales ocurridos en el dominio ΔNAfTPS1

al ser fusionado con el dominio TPP. Otra posible explicación de la falta de funcionalidad en el dominio Δ NA Δ TPS1, es que las proteínas quiméricas que lo contienen son incapaces de interactuar correctamente con las proteínas regulatorias ScTPS3 y ScTSL1 que forman parte del complejo de trehalosa sintasa en levadura (Bell *et al* 1998).

La capacidad de la proteína ScTPS1/ScTPS2 para complementar las mutantes *tps1* Δ , *tps2* Δ y *tps1* Δ -*tps2* Δ de *S. cerevisiae* sugiere que es una proteína bifuncional verdadera. En las Figuras 6 y 7 se muestra la complementación de las tres mutantes, como controles se utilizó la cepa silvestre y las tres mutantes transformadas con el vector sin inserto o con los genes *ScTPS1* y *ScTPS2* completos y por separado. La enzima ScTPS1/ScTPS2 mostró ser capaz de complementar las mutantes aún en ausencia del inductor del promotor CUP (100 μ M CuSO₄), lo que sugiere que al fusionar los dominios TPS y TPP se conserva actividad suficiente para complementar los defectos de crecimiento en glucosa y/o a 38.5 °C. En otros trabajos se ha reportado que el promotor CUP muestra niveles basales de inducción suficientes para que la mutante *tps1* Δ sea complementada por el gen *ScTPS1* pero no por otros genes *TPS* como *AtTPS1* y *SITPS1* (Zentella *et al* 1999; Van Dijck *et al* 2002). En estos mismos trabajos se encontró que los genes *AtTPS1* y *SITPS1* muestran un incremento significativo en su actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa al ser eliminada la región codificante que corresponde aproximadamente a 100 aminoácidos del extremo amino terminal, logrando para ambos genes la complementación de la mutante *tps1* Δ aún sin inducir el promotor. Este efecto se conserva para la proteína SITPS1 al eliminar también la región correspondiente al dominio TPP (Δ NSITPS Δ C), pero no fue el caso cuando se eliminó el dominio TPP únicamente (SITPS Δ C) (Van Dijck *et al* 2002). Este es el primer reporte donde se demuestra la funcionalidad *in vivo* de una proteína quimérica diseñada a partir de dominios TPS y TPP provenientes de proteínas que están constituidas naturalmente por ambos dominios, y donde uno de ellos fue substituido por un homólogo funcional. La complementación de las mutantes sugiere que la proteína ScTPS1/ScTPS2 es capaz de sintetizar trehalosa y probablemente de interactuar correctamente con las proteínas regulatorias ScTPS3 y ScTSL1 dentro del complejo de síntesis de trehalosa.



1. Wt pSal4
2. TPS1 Δ pSal4
3. TPS2 Δ pSal4
4. TPS1 Δ TPS2 Δ pSal4
5. TPS1 Δ pSal4::ScTPS1
6. TPS2 Δ pSal4::ScTPS2
7. TPS1 Δ TPS2 Δ pSal4::ScTPS1
8. TPS1 Δ TPS2 Δ pSal4::ScTPS2
9. TPS1 Δ pSal4:: TPS1/TPS2
10. TPS2 Δ pSal4:: TPS1/TPS2
11. TPS1 Δ TPS2 Δ pSal4::TPS1/TPS2

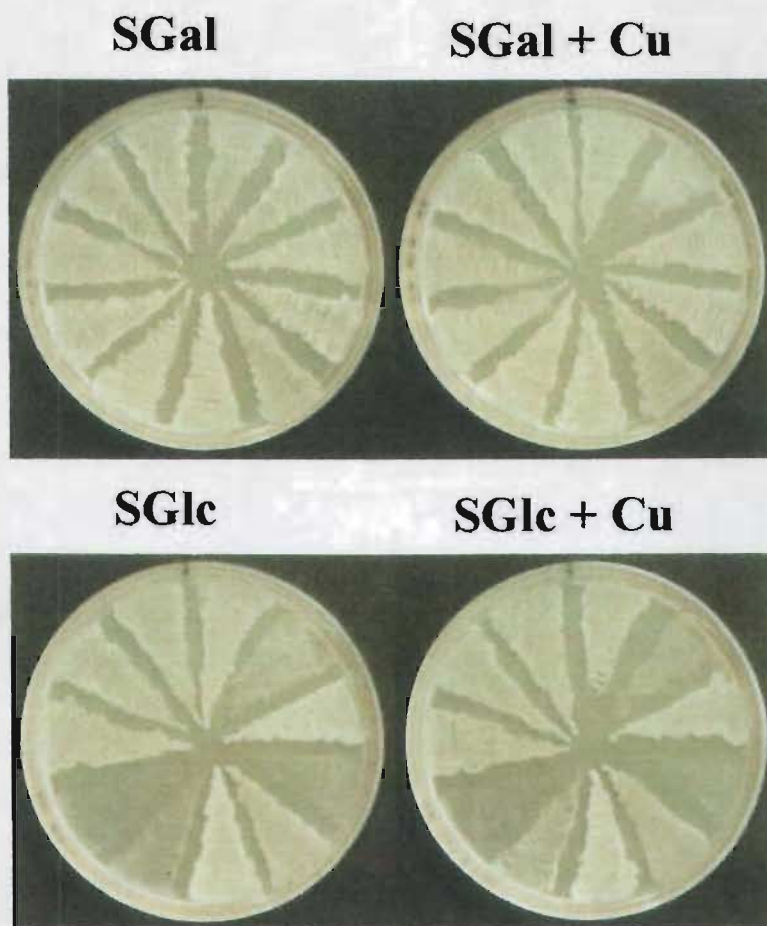
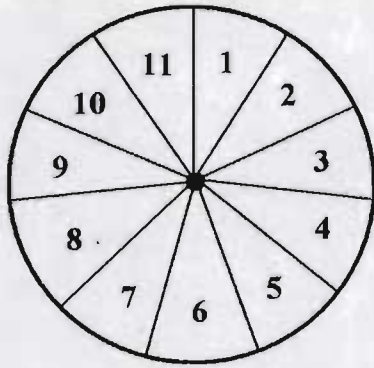


Figura 6. Complementación para crecer en glucosa de las mutantes *tps1 Δ* , *tps2 Δ* y *tps1 Δ -tps2 Δ* de *S. cerevisiae*. Las mutantes fueron transformadas con el plásmido pSal4::ScTPS1/ScTPS2 o con los controles indicados en la parte superior. SGal: Medio mínimo con galactosa como fuente de carbono (control); SGlc: Medio mínimo con glucosa como fuente de carbono; + Cu: Suplementado con 100 μ M CuSO₄.



1. Wt pSal4
2. TPS1Δ pSal4
3. TPS2Δ pSal4
4. TPS1Δ TPS2Δ pSal4
5. TPS1Δ pSal4::ScTPS1
6. TPS2Δ pSal4::ScTPS2
7. TPS1Δ TPS2Δ pSal4::ScTPS1
8. TPS1Δ TPS2Δ pSal4::ScTPS2
9. TPS1Δ pSal4:: TPS1/TPS2
10. TPS2Δ pSal4:: TPS1/TPS2
11. TPS1Δ TPS2Δ pSal4::TPS1/TPS2

YPGal

YPGal + Cu



YPGlc

YPGlc + Cu

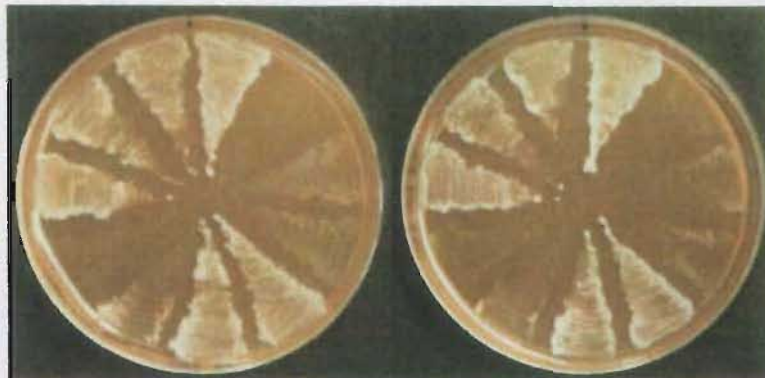


Figura 7. Complementación para crecer a 38.5°C de las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *S. cerevisiae*. Las mutantes fueron transformadas con el plásmido pSal4::ScTPS1/ScTPS2 o con los controles indicados en la parte superior. YPGal: Medio rico con galactosa como fuente de carbono (control); YPGlc: Medio rico con glucosa como fuente de carbono; + Cu: Suplementado con 100 μM CuSO₄.

3.3.2 La proteína quimérica ScTPS1/ScTPS2 es una proteína bifuncional.

Para determinar la cantidad de trehalosa producida por la enzima ScTPS1/ScTPS2, así como su actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa, se crecieron las mutantes complementadas y los controles mencionados anteriormente en medios con galactosa o glucosa como fuente de carbono adicionando CuSO_4 para inducir al promotor CUP. En la tabla II se muestran las cantidades de trehalosa determinadas en dos experimentos independientes (media aritmética). También se indican las diferencias porcentuales tomando como el 100% el promedio calculado para la cepa silvestre transformada con el vector solo, como controles se utilizó la cepa silvestre y las tres mutantes transformadas con el vector sin inserto o con los genes *ScTPS1* y *ScTPS2* completos y por separado.

Los niveles de trehalosa detectados en las mutantes complementadas con el plásmido pSal4::ScTPS1/ScTPS2 indican que la enzima es capaz de sintetizar trehalosa, alcanzando entre el 74 y el 94 % de la trehalosa sintetizada por la cepa silvestre cuando ésta crece en galactosa como fuente de carbono (Tabla II). Quizás el dato más significativo fue encontrado en la doble mutante (*TPS1 Δ TPS2 Δ*), ya que al carecer de ambos genes depende exclusivamente de la síntesis de trehalosa por la enzima bifuncional. La cantidad de trehalosa acumulada en esta mutante (77 %) es equivalente al encontrado al complementar las mutantes *TPS1 Δ* o *TPS2 Δ* con *ScTPS1* o *ScTPS2* respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos cuando se midió el contenido de trehalosa en las mutantes complementadas con el plásmido pSal4::ScTPS1/ScTPS2 crecidas con glucosa como fuente de carbono, la enzima bifuncional produce un poco más trehalosa en las mutantes *TPS1 Δ* y *TPS2 Δ* que cuando éstas son complementadas solamente con *ScTPS1* o *ScTPS2* respectivamente.

Tabla II. Contenido de trehalosa en las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* y controles transformados con pSAL4::ScTPS1/ScTPS.

| CEPA | Contenido de trehalosa en medio con galactosa (μmol/g peso fresco) | Porcentaje en medio con galactosa (%) | Contenido de trehalosa en medio con glucosa μmol/g peso fresco | Porcentaje en medio con glucosa (%) |
|-----------------------------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------------------|
| WT+ pSAL4 | 59.88 ± 26.3 | 100 | 54.36 ± 7.42 | 100 |
| TPS1Δ + pSAL4 | 4.99 ± 0.8 | 8 | NC | 0 |
| TPS2Δ + pSAL4 | 6.99 ± 4.3 | 12 | 3.6 ± 1.70 | 6 |
| TPS1ΔTPS2Δ + pSAL4 | 5.98 ± 4.1 | 10 | NC | 0 |
| TPS1Δ + pSAL4::ScTPS1 | 44.07 ± 4.6 | 74 | 48.45 ± 8.13 | 87 |
| TPS2Δ + pSAL4::ScTPS2 | 47.35 ± 21.6 | 79 | 38.75 ± 15.06 | 70 |
| TPS1ΔTPS2Δ + pSAL4::ScTPS1 | 4.43 ± 1.9 | 7 | 22.3 ± 0.57 | 40 |
| TPS1ΔTPS2Δ + pSAL4::ScTPS2 | 6.44 ± 2.5 | 10 | NC | 0 |
| TPS1Δ + pSAL4::ScTPS1/ScTPS2 | 44.27 ± 6.8 | 74 | 54.2 ± 4.10 | 98 |
| TPS2Δ + pSAL4::ScTPS1/ScTPS2 | 56.13 ± 16.5 | 94 | 48.9 ± 0.85 | 88 |
| TPS1ΔTPS2Δ + pSAL4::ScTPS1/ScTPS2 | 45.93 ± 4.8 | 77 | 25.6 ± 9.05 | 46 |

NC: No creció.

Los datos de actividad enzimática de trehalosa 6-fosfato sintasa detectada en las mutantes complementadas con el plásmido pSal4::ScTPS1/ScTPS2 confirman lo observado en los contenidos de trehalosa, la enzima bifuncional tiene actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa. Los niveles detectados indican que la actividad TPS de la bifuncional es mayor que en la cepa silvestre, pero menores a los detectados al sobreexpresar el *ScTPS1* solo (Tabla III). Probablemente la proteína quimérica no sea regulada de la misma manera que la enzima endógena, siendo el mismo caso para *ScTPS1* expresada solo. Sin embargo, la actividad enzimática de la proteína bifuncional es cercana al 50 % de la detectada en la *ScTPS1* sola, al complementar las mutantes *TPS1Δ* y *TPS1ΔTPS2Δ* en galactosa o glucosa (Tabla III). Esto podría ser explicado por el efecto de la fusión *per se*; ya que el dominio TPS de la proteína *ScTPS1* que se fusionó al TPP de *ScTPS2*, en la naturaleza actúa solo. Otras levaduras como *Schizosaccharomyces pombe*, y *Eremothecium gossypii* conservan genes *TPS* que no tienen fusionado el dominio *TPP*, estos genes son más parecidos en secuencia entre ellos que entre aquellos que son naturalmente fusionados con dominios

TPP. Probablemente aunque se conserve la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa, esta sea menor por efecto de la fusión con el dominio TPP.

Tabla III. Actividad enzimática determinada en las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* y controles transformados con pSAL4::ScTPS1/ScTPS.

| CEPA | Actividad TPS en medio con galactosa $\mu\text{Kat/g}$ proteína | Porcentaje TPS en medio con galactosa | Actividad TPS en medio con glucosa $\mu\text{Kat/g}$ proteína | Porcentaje TPS en medio con glucosa |
|--|---|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| WT+ pSAL4 | 0.91 ± 0.21 | 100 | 1.1 ± 0.10 | 100 |
| TPS1 Δ + pSAL4 | 0 | 0 | NC | 0 |
| TPS2 Δ + pSAL4 | 0 | 0 | 0.09 ± 0.13 | 9 |
| TPS1 Δ TPS2 Δ + pSAL4 | 0 | 0 | NC | 0 |
| TPS1 Δ + pSAL4::ScTPS1 | 2.72 ± 0.16 | 299 | 2.4 ± 0.27 | 218 |
| TPS2 Δ + pSAL4::ScTPS2 | 0.51 ± 0.19 | 28 | 0.51 ± 0.18 | 46 |
| TPS1 Δ TPS2 Δ + pSAL4::ScTPS1 | 0.21 ± 0.15 | 12 | 1.34 ± 0.05 | 122 |
| TPS1 Δ TPS2 Δ + pSAL4::ScTPS2 | 0 | 0 | NC | 0 |
| TPS1 Δ + pSAL4::ScTPS1/ScTPS2 | 1.35 ± 0.40 | 152 | 1.43 ± 0.57 | 130 |
| TPS2 Δ + pSAL4::ScTPS1/ScTPS2 | 1.3 ± 0.15 | 143 | 0.82 ± 0.30 | 75 |
| TPS1 Δ TPS2 Δ + pSAL4::ScTPS1/ScTPS2 | 1.46 ± 0.33 | 160 | 0.86 ± 0.52 | 78 |

No se puede descartar la posibilidad que la proteína de fusión presente menos actividad que ScTPS1 debido a efectos de tamaño del transcrito producido o de la proteína a traducir. Por último, el efecto podría también ser explicado a nivel de la formación del complejo de trehalosa sintasa con las proteínas reguladoras ScTPS3 y ScTSL1, las cuales podrían no acomplejarse correctamente con la proteína bifuncional.

3.4 Conclusiones

En esta parte de la tesis se describe la caracterización funcional de una construcción quimérica entre los dominios TPS y TPP de *Saccharomyces cerevisiae*. Encontramos que ésta fue capaz de complementar a las mutantes *TPS1Δ*, *TPS2Δ* y *TPS1ΔTPS2Δ* de *S. cerevisiae*, en donde se detectó trehalosa y actividad enzimática de trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa, lo que permite concluir que se trata de una proteína con ambas actividades. Esta es la primera proteína bifuncional diseñada a partir de dominios TPS y TPP de proteínas eucariontes.

3.5 Material y métodos

3.5.1 Construcción de genes quiméricos.

Trabajos previos han mostrado que los dominios TPS de las proteínas ScTPS1 (GI: 6319602) y AtTPS1 (GI: 15218422) son capaces de complementar la mutante *tps1Δ* de *S. cerevisiae* (Zentella *et al* 1999; Van Dijck *et al* 2002). De igual manera se ha demostrado que los dominios TPP de las proteínas ScTPS2 (GI: 6320279) y AtTPPB (GI: 15218205) complementan la mutante *tps2Δ* de *S. cerevisiae* (Vogel *et al* 1998; Van Dijck *et al* 2002). Los dominios TPS y TPP fueron identificados y delimitados mediante alineamientos utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para realizar los alineamientos se utilizó la proteína TPS de *E. coli* (GI: 16129848).

La región codificante del gen *ScTPS1* está constituida por 1485 nucleótidos (nc) y codifica para una proteína de 494 aminoácidos (aa), se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región de 1520 nc que incluyen toda la región codificante y una secuencia líder de 41 nc. El codon de término fue eliminado y en su lugar se colocó en fase la secuencia del sitio Bam HI (que codifica para los aminoácidos Glicina y Serina) (Fig. 4a).

El gen *ScTPS2* tiene una región codificante de 2691 nc, produce una proteína de 896 aa que tiene los dominios *TPS* y *TPP*, aunque el *TPS* no es funcional. Para delimitar el dominio *TPP* se hicieron alineamientos con la proteína *TPP* de *E.coli* y se seleccionó la región comprendida entre los nucleótidos 1500 y 2691. Esta región de 1191 nc (397 aa) fue amplificada por PCR, insertándosele en fase un sitio *Bam*HI en el extremo 5' y un sitio *Kpn* I después del codon de término (Fig. 4a).

La proteína *AtTPS1* está también constituida por los dominios *TPS* y *TPP*, de ellos sólo el *TPS* es funcional. Previamente se había demostrado que al eliminar la región amino terminal de la proteína *AtTPS1* su actividad aumenta significativamente (Van Dijck *et al* 2002), así que se decidió amplificar el dominio *TPS* de *AtTPS1* sin esta región. Se seleccionaron 1317 de los 2829 nc que constituyen el total de la región codificante, ésta región comprende del aminoácido 89 al 528 (439 aa totales). Además se colocó un sitio *Nco* I en el oligonucleótido que empalma en la región 5' (el sitio *Nco* I confiere un codón de inicio) y un sitio *Bam* HI en el oligonucleótido que empalma en la región 3' (Fig. 4a).

La proteína *AtTPPB* tiene un tamaño de 374 aa (1125 nc) y constituye un dominio *TPP*. Se amplificó por PCR la región codificante para los aminoácidos 2 al 374, se eliminó el codon de inicio y se introdujo en su lugar el sitio de restricción para *Bam* HI; así mismo se introdujo un sitio para *Kpn* I después del codón de término (Fig. 4a).

En la figura 4b se describen los tamaños de las proteínas de fusión, el tamaño de cada dominio y los sitios de restricción introducidos a cada una de ellas. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar cada dominio fueron, para *ScTPS1*: (*Tps1* 5' 5'CCG CTC GAG GGT ACT CAC ATA CAG AC^{3'} y *ScTPS1F-3'* 5'CGG GAT CCG GTG GCA GAG GAG CTT GTT GAG C^{3'}); para *ScTPS2*: (5'*ScTPS2DN* 5'CGG GAT CCG CTA AAT CTA TTA ACA TGG^{3'} y *TPS2-3'* 5'CGG GGT ACC ATG GTG GGT TGA GAC^{3'}); para *ΔNAiTPS1*(*Ath/TPS-AN*5' 5'CAT GCC ATG GCT TAT AAT AGG CAA CGA CTA CTT GTA GTG^{3'} y *ATTPS1DC-3'* 5'CGG GAT CCA GCT GTC ATG TTT AGG GCT TGT CC^{3'}); para *AtTPPB* (*ATTPPB-5'* 5'CGG GAT CCA CTA ACC AGA ATG TCA TCG^{3'} y *ATTPPB-3'* 5'GGG GTA CCT CAC TCT TCT CCC ACT GTC TTC

C^{3'}); la secuencia subrayada corresponde al sitio de restricción introducido en cada oligonucleótido. Las reacciones de PCR fueron hechas con la enzima Expand DNA polimerasa (Roche) utilizando el siguiente programa de ciclaje: 94 °C, 3 min, 1 ciclo; 94 °C, 1 min, 30 ciclos; 55 °C, 1 min, 30 ciclos; 72 °C, 1.5 min, 30 ciclos.

Los productos amplificados fueron analizados en gel y las bandas correspondientes a los productos fueron purificadas mediante el kit GeneClean. Se realizaron digestiones con las enzimas de restricción correspondientes a los sitios de reconocimiento diseñados en los extremos de cada dominio: *ScTPS1* (5' Xho I – 3' Bam HI), *ScTPS2* (5' Bam HI – 3' Kpn I), *ΔNAiTPS1* (5' Nco I – 3' Bam HI) y *AtTPPB* (5' Bam HI – 3' Kpn I).

Las fusiones fueron hechas en el vector de expresión en levaduras pSal4 (Mascorro-Gallardo *et al* 1996) que tiene un promotor regulado por Cu⁺⁺ y el marcador de selección URA3. Los plásmidos generados fueron: pSal4::*ScTPS1/ScTPS2*, pSal4::*ScTPS1/AtTPPB*, pSal4::*AtTPS1/AtTPPB*, pSal4::*AtTPS1/ScTPS2* (Fig. 5).

3.5.2 Complementación de las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *S. cerevisiae*.

Para probar la actividad *in vivo* de las construcciones se transformaron las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *S. cerevisiae*. Las cepas mutantes fueron crecidas en medio mínimo (0.7% de Bacto-yeast nitrogen base sin aminoácidos, pH 6.0, suplementado con 0.002% de adenina, 0.002% de histidina, 0.003% de leucina, 0.003% de triptofano, 0.002% de uracilo y 2% de galactosa). Las cepas fueron transformadas de acuerdo al método descrito en Elble 1992, y se seleccionaron en medio mínimo sin uracilo y con galactosa como fuente de carbono. Se corroboró la presencia del plásmido así como su efecto en la complementación del crecimiento en ausencia de uracilo en cada construcción mediante la purificación de plásmido de 5 colonias independientes y su retransformación en las mutantes.

Para determinar la complementación fenotípica de las mutantes, tres colonias independientes de cada una de las cepas transformadas fueron expuestas a diferentes condiciones de selección, para la mutante *tps1Δ* las cepas fueron sembradas en medio mínimo con glucosa (SGlc) como fuente de carbono y se crecieron a 30° C. Para la selección en la mutante *tps2Δ* se sembraron las cepas en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono y se crecieron a 38.5° C. El medio de selección para la doble mutante *tps1Δ-tps2Δ* fue medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y se crecieron a 38.5 °C. Como controles de transformación se utilizó la cepa silvestre (W303 1A y las mismas mutantes transformadas con el vector pSal sin inserto o con los genes *ScTPS1* y *ScTPS2*.

3.5.3 Determinación del contenido trehalosa.

Para determinar el contenido de trehalosa, se utilizó el método reportado en Neves *et al* 1994, en el cual la trehalosa es primero hidrolizada a glucosa con la enzima trehalasa y posteriormente se determina la cantidad de glucosa por el método de glucosa oxidasa/peroxidasa. Brevemente, las células (de 25 a 50 mg) se colectaron mediante filtración al vacío en filtros de 0.22μ y se lavaron varias veces con agua fría estéril para eliminar la glucosa externa. Posteriormente se adicionó a la muestra 1 ml de Na₂CO₃ 0.25 M y se hirvió durante 20 min. Una vez enfriada la muestra, ésta fue centrifugada (5 min a 5,000 rpm), se transfirieron 200 μl de la muestra a otro tubo y se le adicionó 100 μl de ácido acético 1 M y 100 μl de la solución T (acetato de sodio 3 M, CaCl₂ 0.3 M, pH 5.5). La misma cantidad de muestra o estándar de trehalosa y de trehalasa del hongo *Humicola grisea* (50 μl de cada uno), se mezclaron en tubos nuevos. Para conocer la cantidad de glucosa no derivada de la trehalosa, la muestra fue mezclada solo con agua. Los tubos se agitaron por 45 min. en un baño a 40 °C, durante este tiempo la trehalosa es degradada a glucosa. Para evaluar la cantidad de glucosa, se tomaron 30 μl de la muestra y se prepararon una serie de estándares con concentraciones crecientes de glucosa (1 mM - 4 mM). A cada muestra y estándar, se añadió 1 ml de solución oxidasa/peroxidasa, que contenía O-dianisidina 0.1 mg/ml. Las reacciones fueron incubadas a 30 °C durante 1 hr. Para parar la reacción se adicionaron 500 μl de ácido sulfúrico al 56 %, posteriormente se midió la absorbancia a 546 nm.

3. 5.4 Determinación de la actividad enzimática de los dominios TPS.

La actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa fue determinada de acuerdo a Hottiger *et al* 1987. Brevemente, las células (de 25 a 50 mg) se colectaron mediante filtración al vacío en filtros de 0.22 μ y se lavaron varias veces con agua fría estéril y resuspendidas en 600 μ l de tricina (K^+) 50 mM, pH 7.0. Se adicionaron 900 mg de perlas de vidrio de (0.5 mm de diámetro) y se agitó fuerte durante toda la noche. El homogenizado celular fue desalinizado en una columna de Sephadex G-25. Las mezclas de reacción fueron preparadas con tricina (K^+) 50 mM, pH 7.0; glucosa 6-fosfato (10 mM); UDP-glucosa (5mM); cloruro de magnesio (12.5 mM), homogenizado celular y agua en un volumen final 400 μ l, en los controles la glucosa 6-fosfato fue omitida. La mezclas fueron incubadas a 35 °C durante 30 min, posteriormente se adicionó 200 μ l de ácido perclórico 1N frío. Se adicionaron 200 μ l de hidróxido de potasio 1N, y se incubó durante 10 min en hielo para posteriormente centrifugar a 2500 rpm. Para determinar el contenido de UDP en el sobrenadante, se preparó una nueva mezcla de reacción con tricina (K^+) 140 mM, pH 7.6; fosfoenolpiruvato 2mM, NADH 0.31 mM, deshidrogenasa láctica (10 μ l, \approx 20 U) y muestra del sobrenadante en un volumen final de 1.96 ml. Se adicionaron 10 μ l (20 U) de la enzima piruvato kinasa, la concentración de UDP fue medida a 340 nm.

4. “La trehalosa: Una molécula antigua con múltiples funciones”

4.1 Introducción

Uno de los retos fundamentales para la sobrevivencia de las células de vida libre o formando tejidos es mantener el turgor en respuesta a los cambios del medio, tales como temperaturas extremas, salinidad, o deshidratación. Este problema tuvo que ser resuelto desde que se formaron las primeras células que habitaban los mares primitivos (Cavalier-Smith 2001). A lo largo de la evolución, los organismos han desarrollado dos estrategias distintas para contender con el estrés abiótico. En ciertos organismos que habitan ambientes extremos, tales como los termófilos o halófilos estrictos, se modificó la maquinaria biosintética de tal manera que la actividad óptima de sus enzimas fuera en condiciones de alta temperatura o concentración de sal, respectivamente (Madigan and Oren 1999; McMullan *et al* 2004). Otro camino distinto evolucionó en muchos otros organismos que se ven expuestos temporalmente a condiciones desfavorables, en los que se crearon rutas de síntesis de compuestos osmóticamente activos que son compatibles con el metabolismo, y que permiten contender con el estrés ambiental. Entre estos compuestos se encuentran ciertos polioles como el manitol y sorbitol, algunos aminoácidos como la prolina y el ácido glutámico, sales cuaternarias de amonio como la glicina betaína y disacáridos tales como la sacarosa y trehalosa (Yancey *et al* 1982). Esta última es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces $1\alpha-1\alpha$ que está presente en diversos organismos y en alimentos tales como el pan, cerveza, vinagre y miel (Elbein *et al* 2003).

La amplia distribución de trehalosa y su síntesis por distintas vías, sugiere el papel clave que este disacárido ha jugado a lo largo de la evolución. Es muy posible que desde el origen mismo de la vida, los organismos se vieron enfrentados al estrés osmótico y térmico en el océano y ambientes primitivos que eran inestables y extremos (Cavalier-Smith 2001). Ante esto, un metabolito común como la glucosa en forma dimerizada y no reductora, altamente resistente a la hidrólisis por calor y con una estructura flexible, se seleccionó como el mejor medio para resolver el constante daño que sufrían las células primigenias, estabilizando membranas y proteínas.

Para comprender mejor el papel que ha tenido la síntesis de trehalosa durante la evolución, en esta tesis se realizó la caracterización filogenética de las proteínas TPS y TPP en genomas totalmente secuenciados.

4.2 Objetivos

General:

Establecer la relación filogenética de los dominios TPS y TPP en distintas proteínas de eucariontes y procariontes.

Particulares:

- 1) Identificar las secuencias de proteínas de las diferentes vías de síntesis de trehalosa, tanto en procariontes como en eucariontes.
- 2) Determinar la relación intra e interespecífica de los dominios TPS y TPP.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Las proteínas de síntesis de trehalosa se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza.

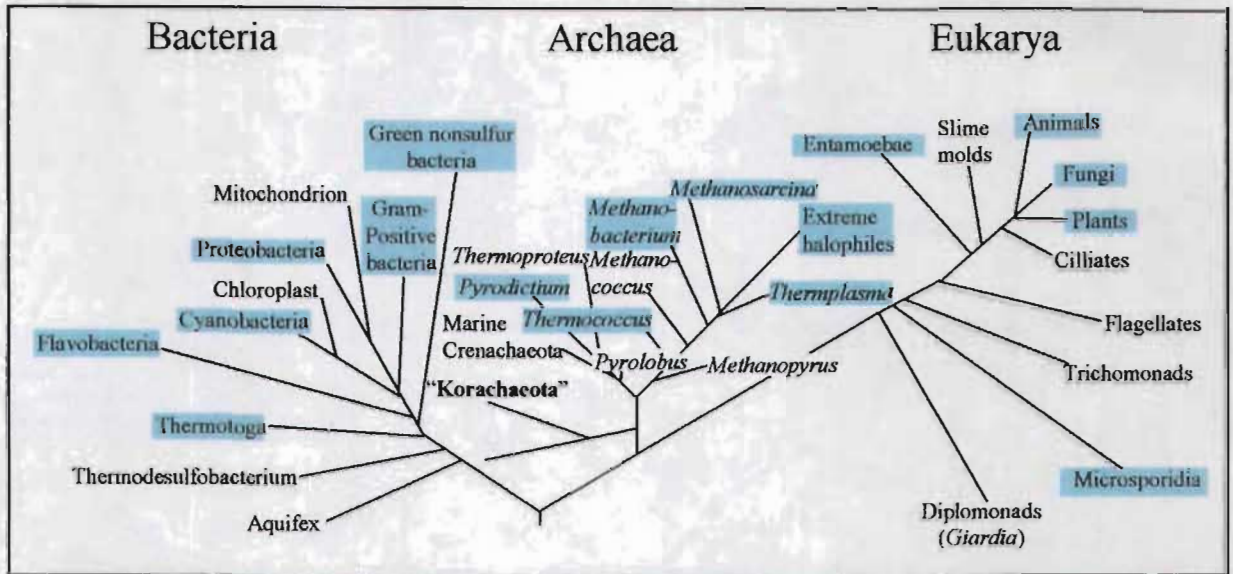
Para analizar la presencia de los diferentes genes codificantes para las proteínas de síntesis de trehalosa, se realizaron búsquedas de secuencias homólogas con el programa BLASTP en las bases de datos de secuencias no redundantes de proteínas, las secuencias utilizadas como cebadores se describen en “materiales y métodos”.

Se identificaron secuencias con homología significativa en un amplio rango de organismos, incluyendo varios phyla de archeas, eubacterias y eucariontes (Fig. 8a). Debido a que la cantidad de secuencias reportadas no es la misma en cada phylum, no se puede descartar que en los phyla no marcados en la Figura 8a existan organismos que contengan secuencias de síntesis de trehalosa. Originalmente la presencia de trehalosa fue relacionada con organismos criptobiontes (organismos capaces de detener su metabolismo indefinidamente en respuesta a condiciones ambientales adversas) sin embargo el hallazgo de que la trehalosa es sintetizada mediante cinco vías diferentes, así como la distribución de las proteínas de éstas en el árbol de la vida supone una gran importancia de dicho producto o sus intermediarios en la naturaleza. En los últimos años se han reportado nuevas funciones para el metabolismo de la trehalosa, además del papel ampliamente descrito como osmoprotector. Se sabe que la trehalosa regula la glucólisis en levaduras (Thevelein and Hohmann 1995); en plantas participa en la señalización de azúcares y ABA (Avonce *et al* 2004), y es un constituyente estructural de la pared celular en *Micobacterium* (De Smet *et al* 2000). Además, en las bases de datos de secuencias ambientales (“environmental samples”), que son muestras tomadas de mares o suelos y donde se aísla DNA, se amplifica por PCR y se determina la secuencia nucleotídica, es posible detectar un gran número de secuencias con homología significativa a las proteínas de síntesis de trehalosa (datos no mostrados), éstas secuencias pertenecen a organismos aún no clasificados.

Para realizar un análisis comprensivo y conclusivo de la biosíntesis de trehalosa en cada organismo, se decidió utilizar sólo aquellas secuencias de proteínas reportadas en organismos con genomas totalmente secuenciados, y se realizaron búsquedas en las bases de datos disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). El total de los genomas totalmente secuenciados reportados al momento de la última actualización realizada fue de 205, de los cuales 171 son bacterianos, 18 de archeas, 8 de Hongos, 3 de mamíferos, 2 de plantas 2 de insectos y 1 de nemátodos. Para determinar los valores de homología significativa de cada secuencia, se tomó como base el valor de e^{-} (expect value) determinado por la matriz BLOSUM62 utilizada para hacer los alineamientos en el BLASTP. Los valores fueron variables para cada alineamiento pero en todos los casos la

región de corte fue claramente detectada. Las secuencias seleccionadas en cada BLASTP fueron enlistadas para su análisis (Tabla IV).

a)



b)

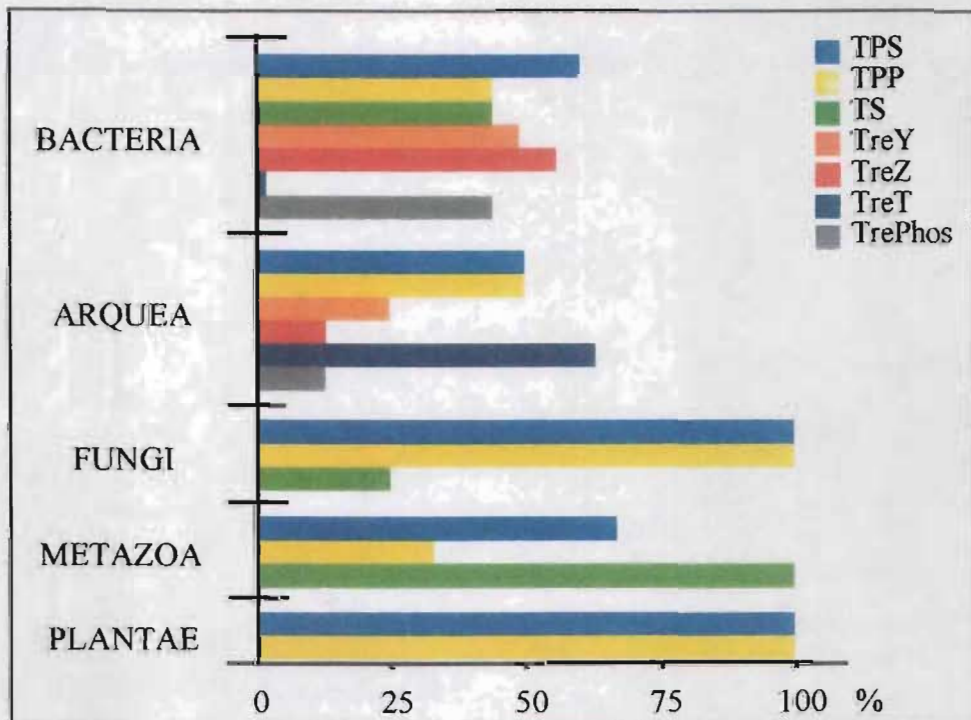


Figura 8. Distribución de las proteínas de síntesis de trehalosa en la naturaleza. a) Identificación de los phyla que tienen al menos una vía de síntesis de trehalosa, figura modificada de Madigan *et al* 2003. b) Análisis comparativo de los porcentajes de genomas totalmente secuenciados que tienen al menos una vía de síntesis de trehalosa

Debido a que la cantidad de genomas totalmente secuenciados no es la misma en cada grupo taxonómico, se contabilizó la presencia de dominios de síntesis de trehalosa por grupo y se calculó su porcentaje con respecto al total de los genomas de cada grupo que tuviera al menos una vía de síntesis (Fig. 8b).

La Tabla IV muestra que los procariontes son los organismos que presentan la mayor distribución de vías de síntesis de trehalosa. Las eubacterias fueron el único grupo en el que se detectaron secuencias de proteínas para las cinco vías de síntesis, algunas especies presentaron más de una vía de síntesis, como *Bradyrhizobium japonicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Mycobacterium avium*, *Streptomyces coelicolor* y *Geobacter sulfurreducens*, entre otras, aunque ninguna especie presentó las cinco vías. La presencia de varias vías de síntesis en el mismo organismo podría obedecer a la necesidad de sintetizar trehalosa bajo condiciones ambientales cambiantes que limiten las concentraciones de sustratos disponibles para cada vía de síntesis. En algunas eubacterias se detectaron más de una proteína para la misma vía de síntesis, por ejemplo *Mesorhizobium loti*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris* expresan dos proteínas TPS diferentes, mientras que *Thermoanaerobacter tengcongensis* expresa dos proteínas de Trehalosa Fosforilasa. Las vías de síntesis TREY/TREZ y TREPPOS parecen ser exclusivas de sistemas bacterianos, mientras que las secuencias identificadas de la vía TRET en su mayoría son de archeas, aunque también se encontró en *Thermotoga*. En los genomas de eucariontes analizados se identificaron solamente secuencias de las vías TPS/TPP y Trehalosa Sintasa. A diferencia de los procariontes, los genomas eucariontes contienen mayor número de secuencias de genes para la misma vía de síntesis, ya que se identificaron muchas proteínas de la vía TPS/TPP en levaduras y plantas, mientras que en *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* se identificaron varias proteínas de Trehalosa Sintasa, lo que sugiere que éstas reiteraciones génicas podrían tener más de una función en el metabolismo de trehalosa. Por otro lado, resulta importante resaltar el hallazgo de secuencias homólogas a Trehalosa Sintasa en *Homo sapiens* (GI: 4507019) y en otros mamíferos (Tabla IV). Este es el primer reporte de secuencias de síntesis de trehalosa en mamíferos, en *Homo sapiens* éste gen es expresado en riñón, donde la síntesis de trehalosa podría tener un papel como osmoprotector.

Tabla IV. Listado de las secuencias de síntesis de trehalosa detectadas en los genomas totalmente secuenciados. Los grupos taxonómicos son mostrados en la columna extrema izquierda, los numeros de acceso al NCBI (GI) son indicados para cada proteína trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS), trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP), trehalosa sintasa (TS), maltooligosil trehalosa sintasa (TREY), maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TREZ), trehalosa glicosiltransferasa sintasa (TRET) y trehalosa fosforilasa (TREPPOS).

| | ESPECIE | TPS | TPP | TS | TREY | TREZ | TRET | TREPPOS |
|-------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Archaea | <i>M.thermautotrophicus</i> | GI:15679745 | GI:15679748 | | | | | |
| | <i>P.aerophilum</i> | GI:18312516 | | | | | GI:18312520 | |
| | <i>P.furiosus</i> | | | | | | GI:18978114 | |
| | <i>P.horikoshii</i> | | | | | | GI:14596874 | GI:14590619 |
| | <i>S.solfataricus</i> | | | | GI:15898879 | GI:15898877 | GI:15898885 | |
| | <i>S.tokodaii</i> | | | | GI:15921163 | | GI:15921169 | |
| | <i>T.acidophilum</i> | GI:16082218 | GI:16082598 | | | | | |
| Bacteria | <i>T.volcanium</i> | GI:13542083 | GI:13542086 | | | | | |
| | <i>A.tumefaciens</i> | | | | | GI:16119513 | | |
| | <i>B.licheniformis</i> | | | | | | | GI:52079099 |
| | <i>B.subtilis</i> | | | | | | | GI:16080510 |
| | <i>B.fragilis</i> | | | | | | | GI:53714596 |
| | <i>B.bronchiseptica</i> | | | GI:33601839 | GI:33601844 | GI:33601842 | | |
| | <i>B.pertussis</i> | | | GI:33592443 | GI:33592439 | GI:33592440 | | |
| | <i>B.japonicum</i> | GI:27375433 | GI:27375434 | GI:27381878 | GI:27381882 | GI:27381881 | | |
| | <i>C.tepidum</i> | | | GI:21674898 | | | | GI:21673667 |
| | <i>C.diphtheriae</i> | GI:38234530 | GI:38234532 | | | | | |
| | <i>C.efficiens</i> | GI:25029064 | GI:25029066 | GI:25028761 | GI:25028574 | GI:25028581 | | |
| | <i>C.glutamicum</i> | GI:19553823 | GI:19553825 | GI:23308924 | GI:19553316 | GI:23308896 | | |
| | <i>D.radiodurans</i> | | | GI:15807030 | GI:15805490 | GI:15805491 | | |
| | <i>E.faecalis</i> | | | | | | | GI:29375540 |
| | <i>E.coli</i> | GI:16129848 | GI:16129849 | | | | | GI:16129277 |
| | <i>G.sulfurreducens</i> | GI:39997434 | GI:39997433 | GI:39997457 | GI:39997456 | GI:39997454 | | |
| | <i>L.johnsonii</i> | | | | | | | GI:42518299 |
| | <i>L.plantarum</i> | | | | | | | GI:28379843 |
| | <i>L.lactis</i> | | | | | | | GI:15673659 |
| | <i>M.loti_1</i> | 13470877 | 13470876 | | | | | |
| | <i>M.loti_2</i> | GI:33486444 | | | | | | |
| | <i>M.avium</i> | GI:41409671 | GI:41409576 | GI:41409626 | GI:41407367 | GI:41407366 | | GI:41409590 |
| | <i>M.bovis</i> | GI:31794666 | GI:31793186 | | | GI:31792747 | | GI:31794582 |
| | <i>M.leprae</i> | GI:15827204 | GI:15827129 | | | | | GI:15827117 |
| | <i>M.tuberculosis_1</i> | GI:15842926 | GI:15842968 | GI:15607268 | GI:15608701 | GI:15841029 | | GI:15842995 |
| | <i>M.tuberculosis_2</i> | GI:15843302 | | | | | | |
| | <i>N.meningitidis</i> | | | | | | | GI:15676304 |
| | <i>Nostoc sp.</i> | | | | GI:17227663 | GI:17227664 | | GI:17228553 |
| | <i>Parachlamydia sp.</i> | | | | GI:46447190 | | | |
| | <i>Pirellula sp.</i> | | | | | | GI:32473570 | |
| | <i>P.acnes</i> | GI:50842443 | | GI:50842592 | | | | GI:50842587 |
| | <i>P.aeruginosa</i> | | | GI:15597348 | | | GI:15597360 | |
| <i>P.putida</i> | | | GI:26990760 | GI:26990754 | GI:26990752 | | | |
| <i>P.syringae</i> | | | GI:28869947 | GI:28870301 | GI:28870299 | | | |
| <i>R.solanacearum_1</i> | 17548936 | GI:17549325 | GI:17548461 | GI:17548456 | GI:17548458 | | | |
| <i>R.solanacearum_2</i> | 17548932 | | | | | | | |
| <i>R.palustris</i> | GI:39937718 | GI:39937719 | GI:39936705 | GI:39936709 | GI:39936708 | | | |
| <i>S.enterica</i> | GI:16760877 | GI:16760878 | | GI:16760316 | GI:16760315 | | | |
| <i>S.typhimurium</i> | GI:16763270 | GI:16765271 | | GI:16764903 | GI:16764904 | | | |
| <i>S.flexneri</i> | | GI:30063346 | | | | | GI:30062835 | |
| <i>S.meliloti</i> | GI:16262578 | | | GI:16265234 | GI:16265024 | | | |
| <i>S.vermiformis</i> | GI:29830479 | GI:29830480 | GI:29829345 | GI:29828694 | GI:29828701 | | | |

| | ESPECIE | TPS | TPP | TS | TREY | TREZ | TRET | Tr-REPHOS |
|------------------------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>S.coelicolor</i> | GI:21222683 | GI:21222681 | GI:21223801 | GI:21224410 | GI:21224407 | | GI:21219247 |
| | <i>Synechococcus</i> sp. | GI:33865815 | | | | | | |
| | <i>Synechocystis</i> sp. | GI:16330944 | | | | | | |
| | <i>T.maritima</i> | | | | | | GI:15643158 | |
| | <i>T.fengcongensis_1</i> | | | | | | | GI:20807289 |
| | <i>T.fengcongensis_2</i> | | | | | | | GI:20807280 |
| Fungi | <i>X.axonopodis</i> | GI:21240937 | GI:21243935 | GI:21240929 | GI:21241202 | GI:21241200 | | |
| | <i>X.campestris_1</i> | GI:21232512 | GI:21232510 | GI:21229612 | GI:21229889 | GI:21229887 | | |
| | <i>X.campestris_2</i> | GI:21232463 | | | | | | |
| | <i>E.cuniculi</i> | GI:19075090 | GI:19075097 | | | | | |
| | <i>E.gossypii_1</i> | GI:45187485 | | | | | | |
| | <i>E.gossypii_2</i> | GI:45201228 | | | | | | |
| | <i>E.gossypii_3</i> | GI:45190879 | | | | | | |
| | <i>S.cerevisiae</i> ScTPS2 | GI:63202279 | | | | | | |
| | <i>S.cerevisiae</i> ScTPS3 | GI:6323917 | | | | | | |
| | <i>S.cerevisiae</i> ScTSL1 | GI:6323537 | | | | | | |
| Metazoa | <i>S.cerevisiae_1</i> | GI:6319682 | | GI:6321731 | | | | |
| | <i>S.pombe_1</i> SpTPS1 | GI:19115117 | | | | | | |
| | <i>S.pombe_2</i> SpTPS2 | GI:19115887 | | | | | | |
| | <i>S.pombe_3</i> SpTPS3 | GI:19115342 | | | | | | |
| | <i>S.pombe_4</i> SpTPS4 | GI:19114874 | | | | | | |
| | <i>S.pombe_5</i> SpTPS5 | GI:19115640 | | | | | | |
| | <i>A.gambiae</i> | GI:31222942 | | GI:31238031 | | | | |
| | <i>C.elegans</i> (1) | GI:32563851 | | GI:25147709 | | | | |
| | <i>C.elegans</i> (2) | GI:25147663 | | GI:32565753 | | | | |
| | <i>H.sapiens</i> | | | GI:4507019 | | | | |
| Plantae | <i>M.musculus</i> | | | GI:6678019 | | | | |
| | <i>R.norvegicus</i> | | | GI:8394307 | | | | |
| | <i>D.melanogaster</i> | GI:19920676 | | GI:24583749 | | | | |
| | <i>A.thaliana_1</i> AtTPS1 | GI:15218422 | | | | | | |
| | <i>A.thaliana_2</i> AtTPS2 | GI:15219969 | | | | | | |
| | <i>A.thaliana_3</i> AtTPS3 | GI:15219985 | | | | | | |
| | <i>A.thaliana_4</i> AtTPS4 | GI:15234194 | | | | | | |
| | <i>A.thaliana_5</i> AtTPS5 | GI:18414960 | | | | | | |
| | <i>A.thaliana_6</i> AtTPS6 | GI:12324075 | | | | | | |
| | <i>A.thaliana_7</i> AtTPS7 | GI:15221478 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_8</i> AtTPS8 | GI:30698024 | | | | | | | |
| <i>A.thaliana_9</i> AtTPS9 | GI:15220891 | | | | | | | |
| <i>A.thaliana_10</i> AtTPS10 | GI:15219002 | | | | | | | |
| <i>A.thaliana_11</i> AtTPS11 | GI:15224213 | | | | | | | |
| <i>A.thaliana_21</i> AtTPPA | | GI:42573652 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_22</i> AtTPPB | | GI:15218205 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_20</i> AtTPPC | | GI:15219843 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_19</i> AtTPPD | | GI:18399940 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_18</i> AtTPPE | | GI:15227161 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_17</i> AtTPPF | | GI:15234552 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_16</i> AtTPPG | | GI:15235713 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_14</i> AtTPPH | | GI:30692524 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_13</i> AtTPPI | | GI:30683008 | | | | | | |
| <i>A.thaliana_12</i> AtTPPJ | | GI:42568786 | | | | | | |
| <i>O.sativa_1</i> OsTPS1 | GI:34910846 | | | | | | | |
| <i>O.sativa_2</i> OsTPS2 | GI:34902280 | | | | | | | |
| <i>O.sativa_3</i> OsTPS3 | GI:34909526 | | | | | | | |
| <i>O.sativa_4</i> OsTPS4 | GI:37806209 | | | | | | | |
| <i>O.sativa_5</i> OsTPS5 | GI:42408334 | | | | | | | |
| <i>O.sativa_6</i> OsTPPA | | GI:37536726 | | | | | | |
| <i>O.sativa_7</i> OsTPPB | | GI:33146623 | | | | | | |
| <i>O.sativa_8</i> OsTPPC | | GI:37806433 | | | | | | |
| <i>O.sativa_9</i> OsTPPD | | GI:38345480 | | | | | | |
| <i>O.sativa_10</i> OsTPPE | | GI:45544517 | | | | | | |
| <i>O.sativa_11</i> OsTPPF | | GI:46390128 | | | | | | |

| | | | | | |
|---------------------------|--------|--------|--------------------|-----------|--------------|
| | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | |
| <i>C. elegans</i> 1 | TYGGIS | IGLLP | ALHNLPEYEKILRAENCA | VRVNYQ | PAIDAVNRSPCP |
| <i>C. elegans</i> 2 | TYGGIS | IGLLP | ALHNLPEYELLRRCQ | VRVNYL | PAIDAVNRSPCP |
| <i>S. avermitilis</i> | AYNGI | ASVLA | AVVHMLQTAE-FRRQ | MAAHTYHRA | FAAALAREAA |
| <i>S. coelicolor</i> | AYNGI | ASVLA | AVVHMLQTAE-FRRQ | MAAHTYHRA | FAAALAREAA |
| <i>M. thermotrophicus</i> | YYSIIS | IGLLP | ALHNLPEYEKILRAENCA | VRVNYQ | PAIDAVNRSPCP |
| <i>C. efficiens</i> | YNEGFS | ATLAPL | PHDLIVPEV | VDVMDH | PREVNLK |
| <i>C. glutamicum</i> | YNEGFS | ATLAPL | PHDLIVPEV | VDVMDH | PREVNLK |
| <i>C. diphtheriae</i> | YNEGFS | ATLAPL | PHDLIVPEV | VDVMDH | PREVNLK |
| <i>M. tuberculosis</i> | YNEGFS | ATLAPL | PHDLIVPEV | VDVMDH | PREVNLK |
| <i>M. avium</i> | YNEGFS | ATLAPL | PHDLIVPEV | VDVMDH | PREVNLK |
| <i>M. leprae</i> | YNEGFS | ATLAPL | PHDLIVPEV | VDVMDH | PREVNLK |
| <i>synecocystis</i> sp. | YFHTSK | APWPI | LHS | PPWQPT | DSSDND |
| <i>Synechococcus</i> sp. | YFHTSK | APWPI | LHS | PPWQPT | DSSDND |
| <i>X. campestris</i> 2 | YFKRFS | EAFLM | PLHFMER | APFREDD | QVPLAV |
| <i>M. lotii</i> | YLYGPA | HEGLM | PLCHIA | TRPI | PRASDWA |
| <i>G. sulfurreducens</i> | YLYGPA | HEGLM | PLCHIA | TRPI | PRASDWA |
| <i>T. acidophilum</i> | YLDLNS | HTLAPL | PHY | PRERVK | TDNCST |
| <i>T. volcanium</i> | YLDLNS | HTLAPL | PHY | PRERVK | TDNCST |
| <i>P. aerophilum</i> | YEQPC | KILMPL | PHG | TVY | VPESKY |
| <i>D. melanogaster</i> | YINGCC | KIMPL | PHG | TVY | VPESKY |
| <i>A. gambiae</i> | YINGCC | KIMPL | PHG | TVY | VPESKY |
| <i>E. coli</i> | YINQFS | AVLAP | PHY | RLDLV | QPPR |
| <i>S. typhi</i> | YINQFS | AVLAP | PHY | RLDLV | QPPR |
| <i>R. solanacearum</i> 1 | YINGPA | ATLAPL | PHY | RVDLAF | EQE |
| <i>X. axonopodis</i> | YINGPA | ATLAPL | PHY | RVDLAF | EQE |
| <i>X. campestris</i> 1 | YINGPA | ATLAPL | PHY | RVDLAF | EQE |
| <i>S. melliloti</i> | YINGPA | ATLAPL | PHY | RVDLAF | EQE |
| <i>M. lotii</i> | ----- | MLGF | ----- | QTAE | ----- |
| <i>B. japonicum</i> | YINGPA | SALM | PAHLS | RSDDL | IRV |
| <i>R. palustris</i> | YINGPA | SALM | PAHLS | RSDDL | IRV |
| <i>R. solanacearum</i> 2 | YINGPA | SALM | PAHLS | RSDDL | IRV |
| <i>E. gossypii</i> 1 | YINGPS | SILAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>ScTPS1</i> | YINGPS | SILAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS2</i> | YINGPS | SILAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS3</i> | YINGPS | SILAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS4</i> | YINGPS | SILAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS4</i> | YINGPS | SILAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>E. uniuiculi</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>OstPS3</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>OstPS1</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS2</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS8</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS5</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS6</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>OstPS2</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS9</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS10</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS10</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>AtTPS11</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>E. gossypii</i> 2 | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>ScTPS2</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>ScTPS3</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>ScTPS11</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>E. gossypii</i> 3 | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>SpTPS1</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>OstPS4</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>OstPS5</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>SpTPS4</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>SpTPS5</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>SpTPS3</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| <i>SpTPS2</i> | YIDGFC | IKLAPL | PHY | PHG | INPDEN |
| ruler | | 100 | | 110 | |



Figura 9. Continuación.



| | | |
|--------------------|--|-----|
| C. elegans 1 | KVSTGFANLRLGLLPTKVFQVHRDRITVIELVQHTPGGMTCSLGVFPVSIKNDDELKFDVLPETIKLNDLKRIVGGGFPPSVERPFI | 256 |
| C. elegans 2 | KXKTAHPIRALLRPTKVFQVSRDRDTFVKLVAKHIGKMTCSLGVFPVSIKNDDELKFDVLPETIKLNDLKRIVGGGFPPSVERPFI | 266 |
| S. avermitilis | LPDDAAVLLGCGILGARRAFLQQRNADAFTDCCHAVLC--GTRIGVHOLGADDFLRERARRDPVEBRMAALREEVGGRKIVRVDFTELS | 255 |
| S. coelicolor | LPDDAAVLLGCGILGARRAFLQQRNADAFTDCCHAVLC--GTRIGVHOLGADDFLRERARRDPVEBRMAALREEVGGRKIVRVDFTELS | 256 |
| M. thermotrophicus | LPERRADIIGGLLSNTILGPHIHRPCANFPFCEDLGYDRKILVKSYPISVLPESMERTVSSPTFMKDFSVRKLKGNMFLITRTDRADLS | 263 |
| C. efficiens | LP--REIVRGMGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VBALRADLGSIVPLGVDRLEDT | 251 |
| C. glutamicum | LP--REIVRGMGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 251 |
| C. diphtheriae | LP--REIVRGMGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 252 |
| M. tuberculosis | MP--RTIILGGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 259 |
| M. avium | LP--RTIILGGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 262 |
| M. leprae | LP--RTIILGGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 263 |
| Synechocystis sp. | LP--REIIVESLLACDLCPPIIPRTVENPVAVARSLKPDDELNLDAFPVGNPANIRALVAKESVQCKVAEIKQDLG-KRLIVSAGRVIV | 263 |
| Synechococcus sp. | LP--REIIVESLLACDLCPPIIPRTVENPVAVARSLKPDDELNLDAFPVGNPANIRALVAKESVQCKVAEIKQDLG-KRLIVSAGRVIV | 265 |
| X. campestris 2 | VP--REIITCSLMCCDVGPHIIPROVENPVDVVRGVPDDEVALGAPVGTDLERLRAALSKEPVRNDIPLKLRREIG-RKLVLSVGRLOYI | 263 |
| M. lotii | CPW--REKILDGLLSSIVGPHITGGQNHFLPLSRLLIGSRVVRVGAAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 264 |
| G. sulfurreducens | CPW--REKILDGLLSSIVGPHITGGQNHFLPLSRLLIGSRVVRVGAAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 264 |
| T. acidophilum | LPB--REIILIDSLSRDFITPRTHTKRNFT-----NSRAKSLVPLIGIDVRYEYKRT---RGT-DLKSALMDR-KLIF-SIDRLDT | 242 |
| T. volcanium | LTE--REIILIDSLSRDFITPRTHTKRNFT-----REBPKSIAVPLIGIDVRYEYKRT---RGT-DLKSALMDR-KLIF-SIDRLDT | 242 |
| P. aerophilum | MPDPRALLDGGLASLVGPHIHEIVNHPVRAVSKPLGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 262 |
| D. melanogaster | LPW--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 259 |
| A. gambiae | LPW--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 258 |
| E. coli | LPT--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 254 |
| S. typhi | LPD--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 253 |
| R. solanacearum 1 | IPP--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 255 |
| X. axonopodis | MPD--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 254 |
| X. campestris 1 | MPD--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 254 |
| S. meliloti | MPV--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 258 |
| M. lotii 2 | ---RP-----SVRAFGSITPFDINGAASN-----GRTLVSPFPPIGIDVRYEYKRT---RGT-DLKSALMDR-KLIF-SIDRLDT | 87 |
| B. japonicum | VNBE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 257 |
| R. palustris | VPHB--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 256 |
| R. solanacearum 2 | IPQH--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 250 |
| E. gossypii 1 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 262 |
| ScTPS1 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 263 |
| AtTPS2 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 264 |
| AtTPS3 | LPSE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 243 |
| AtTPS4 | LPSE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 264 |
| AtTPS4 | LPSE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 263 |
| E. cuniculi | LACE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 250 |
| OsTPS3 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| OsTPS1 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| AtTPS7 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 264 |
| AtTPS5 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 265 |
| AtTPS6 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| OsTPS2 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| AtTPS9 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| AtTPS8 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| AtTPS10 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| AtTPS11 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| E. gossypii 2 | LPKE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 265 |
| ScTPS2 | LPRR--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| ScTPS3 | LANN--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| ScTPS11 | LQGE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| E. gossypii 3 | PAQE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 264 |
| SpTPS1 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| OsTPS4 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 267 |
| OsTPS5 | LPVE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 266 |
| SpTPS4 | LATR--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 272 |
| SpTPS5 | PARR--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 272 |
| SpTPS3 | FPRE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 272 |
| SpTPS2 | LSKE--REIILQGLGADLVGPHLQPHADNPLSLTRVAGGRKVVGVGAPPISIDTCAVEÇASÇSS----VLDLKLTEETVPLGVDRLEDT | 272 |
| ruler |190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270... | |



Figura 9. Continuación.



| | | |
|--------------------|--|-----|
| C.elegans 1 | KGIMEKLCAYKRYPERHPDRIGKDVLPQIAVINRRSVDTRVYQDHCIDLADKIHEI FKHPTNKPIVQQTGGLPSSHLVAAALAMDIGVVT | 357 |
| C.elegans 2 | KGISEKLRANQRYPEKYPDRIGKDVLPQVAVINRRSVDTRVYQDQDVLAVADLINOQPKYPEKPFVPEPTDGLPPTRLIAHYLAMDIGVVT | 357 |
| S. avermitilis | ENIVRGLLAYRELLASRPDRREKVVHVAAYPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 345 |
| S. coelicolor | KNIVRGLLAYRELLASRPDRREKVVHVAAYPDRQDLAVRENTARVERVANAVNEEPTGTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 346 |
| M. thermotrophicus | KNIIKGFRAIYELFLRDHPDFBGRVVKPLATGKPTDQKIRSRIRISEVVIDVVEEINREKYGIDENKPIEYIYR-ADYELVAAAPKMYDCLIVN | 353 |
| C. efficiens | KGILCRLLAPRELLSGLDPAITVPLQVATPERRIRIBKVSRSVEEAVGRINGRPGRMGHVTVHILHRS LFKDDMQ ILN TAAVVMVLT | 342 |
| C. glutanicum | KGILCRLLAPRELLSGLADPAITVPLQVATPERRIRIBKVSRSVEEAVGRINGRPGRMGHVTVHILHRS LSKNDLQVLT TAAVVMVLT | 342 |
| C. diphtheriae | KGILCRLLAPRELLSGLADPAITVPLQVATPERRIRIBKQARSVEEAVGRINGRPGFSIGRSVTVHHRHNDRSSELNKLRLAAVVMVLT | 343 |
| M. tuberculosis | KGIDVRLKAFSELLAEGRVKRDITVVLQVATPERRRVESQQLRND IERQVGHINGEYGEVGHVTVHILHRPAPRDLIAPVYAAVVMVLT | 350 |
| M. avium | KGIDVRLKAFSELLAEGRAKRDITVVLQVATPERRRVESQQLRND IERQVGHINGEYGEVGHVTVHILHRPAPRDLIAPVYAAVVMVLT | 353 |
| M. leprae | KGIDVRLKAFSELLAEGRAKRDITVVLQVATPERRRVESQQLRND IERQVGHINGEYGEVGHVTVHILHRPAPRDLIAPVYAAVVMVLT | 354 |
| synecococcus sp. | KGTKEMLMCEYRLLERRPELQGHISLVVPAKAAAGMRIRRAQREIERLACKINGRPAKLSNTFVVLMT SFLAYEHLIALPCAADIAMIT | 354 |
| Synechococcus sp. | KGNEELLLAFRELLEREDLQGVVLM LCAVAAASGMKIRREIQRSEEMAGRINGRPSQVDWIPYRSTRRIPYEMVAVPCHADVCMVIT | 356 |
| X. campestris 2 | KGLAKLRAFRELLDSQRLLQKVTLLMVCVPAAREMTIRTLQTI ECQVGRINGRPSRLDNTFVYPAQALPFFVAVHAAAVVMVLT | 354 |
| M. lotii | KGILDRFNALDELLILHPIEDKVAFLQIAAPRGTTLPAQQLTEACLRHAEELQYREGREGTFFVMTIENHQQVVEI TRAAVVMVLT | 355 |
| G. sulfurreducens | KGIPRRFMAVRELLPELHPVLEPFPVLAAPREKSALEKQAPRAVESHAKRINGRPSRDPAPAILKAEHSEDEAVNRVYRAADVCMVIT | 355 |
| T. acidophilum | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 333 |
| T. volcanium | KGILTRVLSIRELLRHHPNIGSFPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRVNGEFGTISMPILTYRAISDSHLSVSTYKNDIALIT | 333 |
| P. aerophilum | KGLVNRVHAWRELLKESFQWRQVSLILVLPVSRIGVQSDANKERL ERVGRINGELGVDWNTFVYISRPIPTTLLALYRAADVCMVIT | 353 |
| D. melanogaster | KGIVRELMARFALLKYPKHEKVSLLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 350 |
| A. gambiae | KGIVNRKLAFFVLLKBPDRHENVSLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 349 |
| E. coli | KGLPFRFLAYFALLEKYPKHEKVSLLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 345 |
| S. typhi | KGLPFRFLAYFALLEKYPKHEKVSLLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 344 |
| R. solanacearum 1 | KGLPFRFLAYFALLEKYPKHEKVSLLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 346 |
| X. axonopodis | KGLPFRFLAYFALLEKYPKHEKVSLLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 345 |
| X. campestris 1 | KGLPFRFLAYFALLEKYPKHEKVSLLQISVPEKTTVYKRELKEVDCVGRINGRPTTANAPIRYIYDYVSQELAAALRDAVCLVT | 345 |
| S. meliloti | KGITCRIDAFRFRILANPAQQGVVTLQITPKRSEVDEEAMQRTVABQCRVNGALGAUDVYPIRYINRSVGRHILACLRILCKVGLVT | 349 |
| M. lotii 2 | KGIFGRICAFARLLERHPDRITVPLQVATPERRRVESQQLRND IERQVGHINGEYGEVGHVTVHILHRPAPRDLIAPVYAAVVMVLT | 178 |
| E. japonicum | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 348 |
| R. palustris | KGILTRVLSIRELLRHHPNIGSFPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRVNGEFGTISMPILTYRAISDSHLSVSTYKNDIALIT | 347 |
| R. solanacearum 2 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 341 |
| B. gossypii 1 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 353 |
| ScTPS1 | KGVPCKLAMAVFLNEHPDRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 354 |
| AtTPS2 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 355 |
| AtTPS3 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 354 |
| AtTPS4 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 335 |
| AtTPS5 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 355 |
| AtTPS6 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 356 |
| OeTPS2 | KGISLKLAMRELLRQHPDRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 358 |
| AtTPS7 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 355 |
| AtTPS8 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 356 |
| AtTPS9 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 357 |
| AtTPS10 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 357 |
| AtTPS11 | KGIPCRYLAFKFLPENPWRKVVLVQVAVPDRQDLAVRD TAAVQRLADEINAEYGTTPGNTFVVLVVK -DDFARSLAA RLAAVVALVN | 357 |
| B. gossypii 2 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 354 |
| ScTPS2 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 358 |
| ScTPS3 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 354 |
| ScTS11 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 354 |
| B. gossypii 3 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 354 |
| SpTPS1 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 357 |
| OeTPS4 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 358 |
| OeTPS5 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 350 |
| SpTPS4 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 361 |
| SpTPS5 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 361 |
| SpTPS3 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 360 |
| SpTPS2 | KGIVNRVLSIRELLERHPDLVQKPVTVMTPTKRTTYSVAVANKRELEMI GRINGEFGSISMPILTYRAISDKMLVSTYKNDIALIT | 362 |
| ruler |280.....290.....300.....310.....320.....330.....340.....350.....360..... | |



Figura 9 Continuación.

Para estimar las relaciones filogenéticas de estas proteínas, se realizaron análisis de distancia y parsimonia usando los programas Neighbour Joining y Protpars de acuerdo con los paquetes de ClustalX y Phylip, respectivamente. Los árboles resultantes fueron muy similares, así que se decidió utilizar sólo el obtenido por parsimonia (Fig. 10).

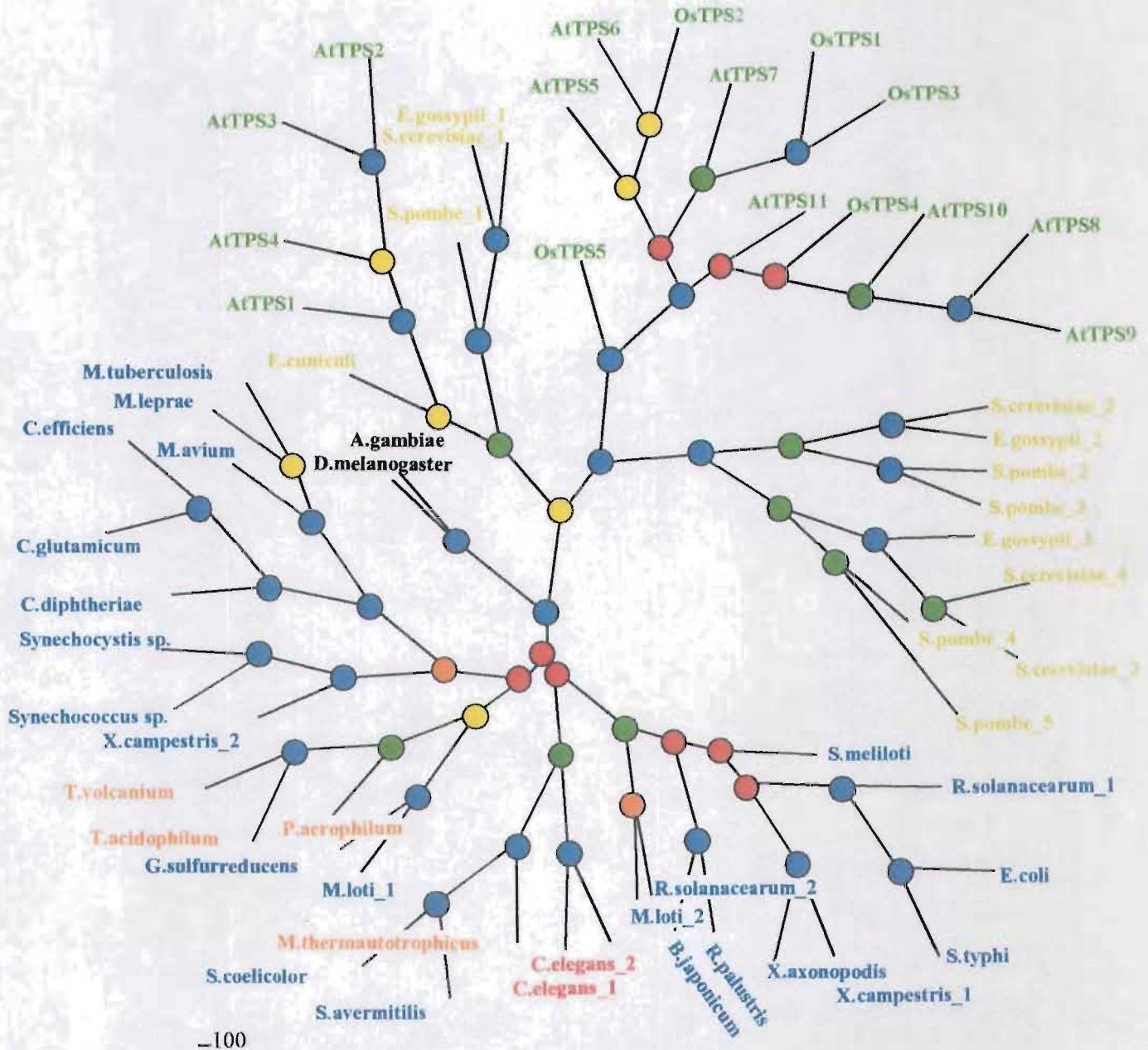


Figura 10. Filogenia del dominio TPS. El árbol fue calculado por parsimonia usando el programa Protpars del paquete Phylip. Las secuencias son representados con colores de acuerdo con el grupo taxonómico al que pertenecen: **Bacterias**, **Archaea**, **Fungi**, **Plantas**, **Insectos**, **Nematodos**.

Los valores de Bootstrap (1000X) son representados en porcentajes:
 ● 91-100 % ● 75-90 % ● 66-74 % ● 50-65 % ● 0-49 %

Las proteínas TPS se agrupan claramente en dos grandes ramas: En la primera se encuentran eubacterias y archaeas y en la otra las plantas y los hongos, lo que indica que los dominios TPS de éstos últimos tienen un origen monofilético. La topología del árbol TPS esta bien sustentada por los altos valores de Bootstrap observados. Debido a que las plantas y los hongos presentan diversas isoformas de las proteínas con dominios TPS, podría sugerirse que las duplicaciones génicas encontradas en estos organismos ocurrieron antes de que divergieran. Las secuencias TPS de hongos se agrupan claramente en dos ramas, en la primera se encuentran sólo proteínas de hongos (probablemente resultado de duplicaciones), mientras que en la otra rama las secuencias *S. cerevisiae_1*, *E. gossypii_1*, *S. pombe_1* y *E. cuniculi* comparten mayor similitud con algunos dominios TPS de plantas (*AtTPS1-4*). En el caso de las proteínas TPS de plantas, se observa una distribución similar a la de hongos, una rama que contiene exclusivamente secuencias de plantas y otra compartida con hongos. Curiosamente en la rama compartida entre plantas y hongos se agrupan las proteínas con actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa comprobada bioquímicamente (*AtTPS1*, *ScTPS1*, *SpTPS1*). Las secuencias TPS de *Drosophila melanogaster* y *Anopheles gambiae* se localizaron como un grupo aparte de las bacterias, hongos y plantas. Resulta interesante que las proteínas TPS de *Caenorhabditis elegans* se localizan dentro del grupo de los procariontes, cercano a *Methanothermobacter thermautotrophicus* y los Streptomicetes, lo que sugiere un probable evento de transferencia horizontal.

Dentro de la rama de los procariontes se encontró una clara división en dos grupos: En uno se encuentran secuencias de especies del phylum Proteobacteria que abarca las alphaproteobacterias (*Bradyrhizobium japonicum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Sinorhizobium meliloti*), betaproteobacteria (*Ralstonia solanacearum*), gamaproteobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas campestris* y *Xanthomonas axonopodis*). En el otro grupo se encuentran las llamadas Actinobacterias o también conocidas como Bacterias Gram-positivas con alto contenido de GC que abarca los géneros *Mycobacterium* y *Corynebacterium*, así como miembros del phylum Cyanobacteria (*Synechocystis sp.* y *Synechococcus sp.*). Sin embargo, se encontraron proteínas que por su posición en el árbol filogenético parecen ser el resultado de un evento de transferencia horizontal. En todos

éstos casos son proteínas codificadas por más de un gen en la célula, lo cual podría implicar la transferencia horizontal sin el desplazamiento del gen ortólogo. Por ejemplo *Xanthomonas campestris* presenta dos proteínas TPS, una de ellas (*X.caspestris_1*) se agrupa con el resto de las gamaproteobacterias, mientras que *X.caspestris_2* se encontró más relacionada con las secuencias de Cyanobacterias. En el caso de *Mesorhizobium loti* que también presenta dos secuencias TPS, al parecer la proteína *M.loti_1* fue adquirida también por transferencia horizontal, probablemente después de perder casi la mitad del gen que codifica para *M. loti_2*. De igual manera, la secuencia TPS de *S. meliloti* parece más cercana a las de gamaproteobacterias que a las de alphaproteobacterias en las cuales ha sido clasificado. Por último, las proteínas de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* también fueron encontradas lejos del grupo de las actinobacterias donde pertenecen. Las secuencias TPS de archaeas se agrupan en una sola rama, excepto por *M. thermautotrophicus* que parece tener mayor similitud con actinobacterias del genero Streptomyces.

4.3.3 El sitio activo de la proteína OTSA es altamente conservado.

Durante la síntesis de trehalosa, la enzima TPS utiliza UDP-glucosa como donador y glucosa 6-fosfato como aceptor produciendo de ésta manera trehalosa 6-fosfato. La determinación de la estructura tridimensional de la enzima OTSA de *E. coli* ha permitido encontrar los residuos de aminoácidos involucrados en la unión a los sustratos en la catálisis (Gibson *et al* 2002), los residuos involucrados en la unión al aceptor glucosa 6-fosfato son Arg9, Trp40, Tyr76, Trp85 y Arg300, mientras que Gly22, Asp130, His154, Arg262, Asp361 y Glu369 están involucrados en la unión a UDP. En el presente trabajo analizamos si los residuos arriba mencionados han sido conservados filogenéticamente entre las secuencias TPS seleccionadas. Se encontró que los residuos que constituyen el sitio catalítico se encuentran altamente conservados en dominios TPS de bacterias, archaeas, hongos, plantas e insectos (Fig. 11). Estos datos coinciden con los datos bioquímicos reportados anteriormente, en donde las enzimas que tienen actividad trehalosa 6-fosfato sintasa demostrada, tales como OTSA de *E. coli*, ScTPS1 de *S. cerevisiae*, y AtTPS1 de *A. thaliana* en las que el sitio activo esta perfectamente conservado (Strøm and Kaasen 1993, Bell *et al* 1998, Blázquez *et al* 1998). Por otro lado, el sitio activo tiene

diversos cambios en proteínas como ScTPS2, ScTPS3 y ScTSL1, en las cuales se ha demostrado que no sintetizan trehalosa 6-fosfato y participan en la regulación del complejo trehalosa sintasa en levadura (Bell *et al* 1998). En el caso de las proteínas TPS de *A. thaliana*, únicamente AtTPS1 y AtTPS2 conservan el sitio activo intacto, sin embargo sólo ha sido demostrada la actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa en AtTPS1 (Blázquez *et al* 1998).

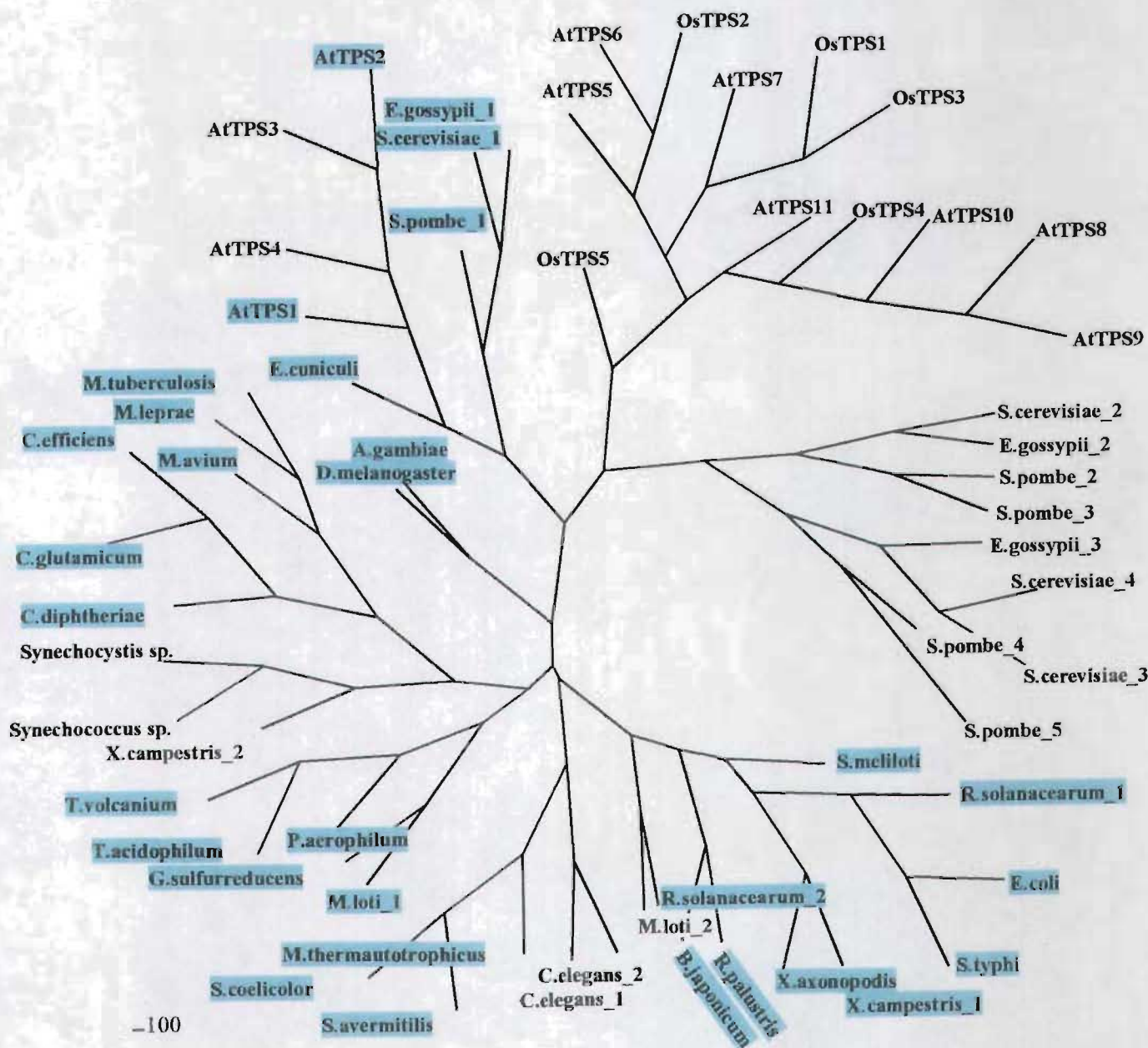


Figura 11. Conservación del sitio activo del dominio TPS. Los dominios que conservan todos los residuos de aminoácidos del sitio activo son indicadas con el fondo azul.

Ninguna de las proteínas TPS de *Oriza sativa* conserva intactos los residuos del dominio catalítico y no cuenta con otra vía de síntesis de trehalosa. Sin embargo, ha sido demostrado que en presencia de NaCl el arroz es capaz de acumular pequeñas cantidades de trehalosa (García *et al* 1997). Éstos datos plantean el reto de demostrar si existe alguna vía de síntesis alterna en *O. sativa*, ó sí las *OsTPS1*, 2 y/ó 3 son sintasas a pesar de no tener los residuos consenso del dominio catalítico.

El análisis de las secuencias de proteínas de plantas y hongos que no conservan intacto el sitio activo, mostró que se han seleccionado sólo algunos cambios en éstos residuos, uno de los cambios más notorios es R262D (en *A. thaliana* y *O. sativa*) y R262Q/K (en *S. cerevisiae* y *S. pombe*); así como W40Y/F encontrado en plantas. Quizás la sustitución con mayor relevancia biológica (por el posible impacto que tendría en la estructura) es G22S, la cual se encontró en plantas y hongos. Sin embargo se desconoce el significado de la conservación en estas sustituciones y su relevancia biológica.

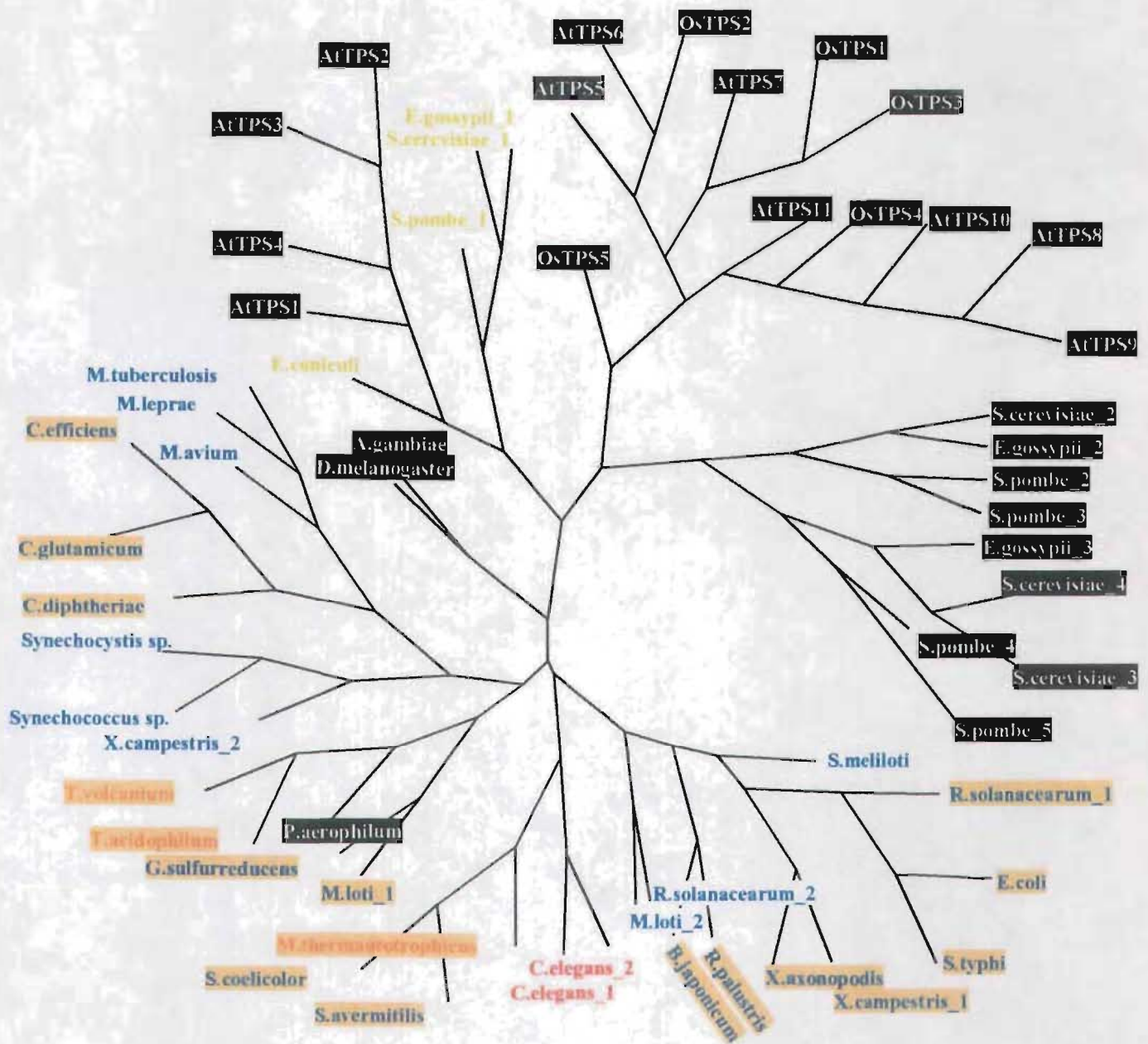
4.3.4 Relación filogenética entre los dominios TPS y TPP.

Según la base de datos SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) el dominio TPS está constituido por 485 aminoácidos, de acuerdo con las bases de datos dominios conservados del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) se agrupan dentro del COG0380 (Cluster Orthologous groups). En procariontes las proteínas TPS están constituidas básicamente por un solo dominio, mientras que en eucariontes se ha observado que muchas de las proteínas TPS están constituidas también por un dominio TPP (COG1877). Por otro lado, en algunas bacterias se ha encontrado que las proteínas TPS y TPP forman un operón. En este estudio nos planteamos la pregunta de si existía una relación filogenética entre los dominios TPS y TPP, tanto en la estructura de las proteínas (organización de dominios) de eucariontes como en el contexto genómico en procariontes.

Para el análisis del contexto genómico utilizamos el servidor GeCont (<http://www.ibt.unam.mx>), en el cual se muestra el contexto genómico de cualquier gen en los genomas totalmente secuenciados (Ciria *et al* 2004).

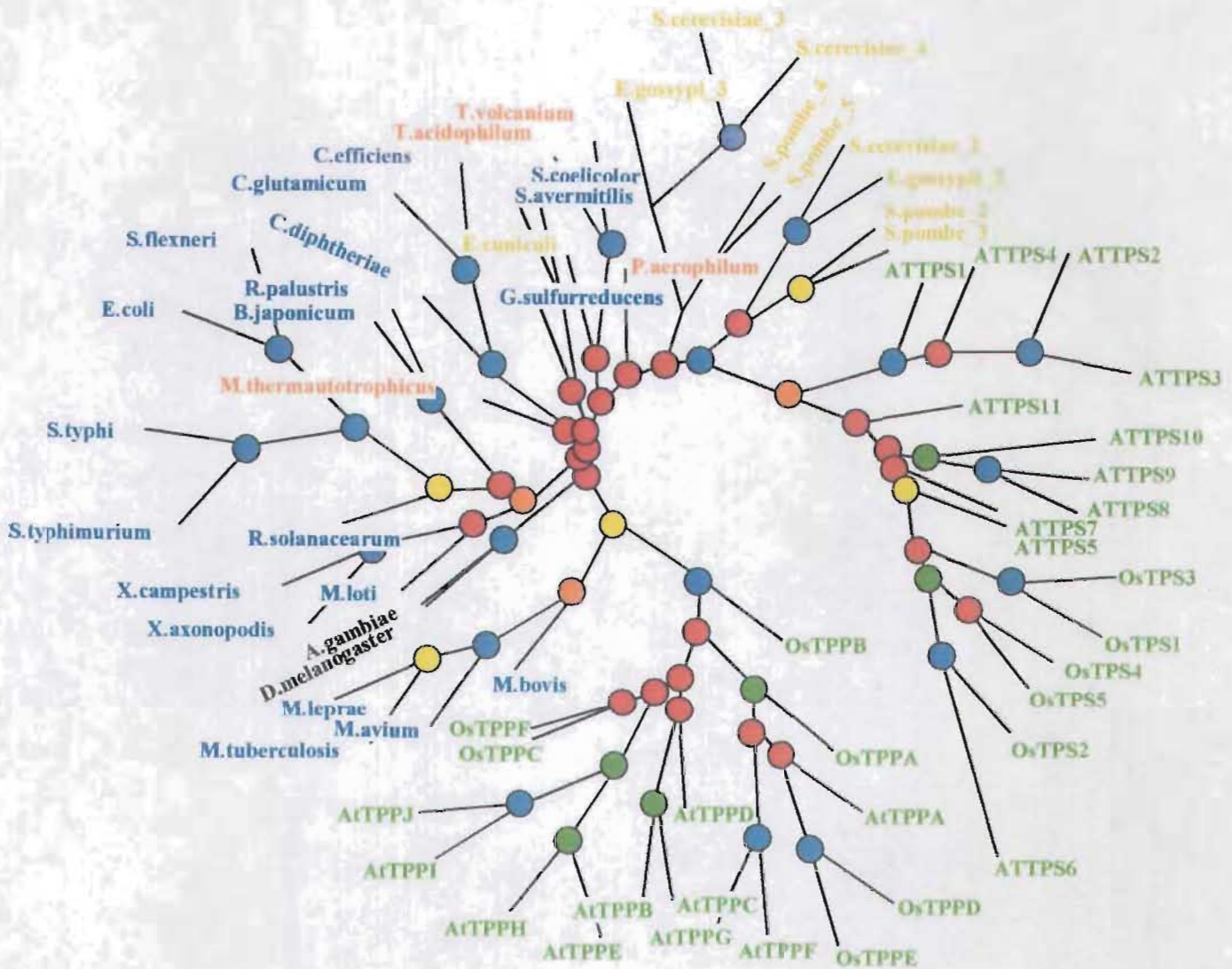
Los resultados de este estudio muestran que existe una alta conservación en el contexto genómico de las proteínas TPS y TPP en bacterias y archaeas, (exceptuando a las bacterias del genero *Mycobacterium*, las cyanobacterias y a *S. meliloti*) lo que sugiere que ambas proteínas han evolucionado juntas (Fig. 12). Por otro lado, se encontró que en la gran mayoría de las proteínas TPS de eucariontes, los dominios TPS se encuentran fusionados con dominios TPP. Esta estructura proteica es encontrada tanto en plantas, hongos e insectos, lo que sugiere que todas las proteínas TPS de eucariontes descienden de un ancestro común (Fig. 12). Las proteínas *E. gossypii_1*, *S. cerevisiae_1*, *S. pombe_1* y *E. cuniculi* probablemente perdieron su dominio TPP. El hecho de que las proteínas *C. elegans_1* y *C. elegans_2* no presenten la estructura de las demás TPS de eucariontes, apoya la hipótesis señalada anteriormente de un origen por transferencia horizontal a partir de algún organismo bacteriano. En organismos procariontes, sólo la proteína TPS de la archaea *P. aerophilum* presentó esta estructura proteica.

La marcada diferencia entre la organización de las proteínas procariontes y eucariontes sugiere que la evolución de los dominios TPS y TPP ha estado estrechamente relacionada; de hecho, si se sobrelapan los árboles filogenéticos de los dominios TPS y TPP, en la gran mayoría de los casos se observa la misma distribución tanto para las proteínas TPS como las TPP. Aparentemente el hecho de que en eucariontes la gran mayoría de las proteínas tengan los dos dominios, así como la reiteración de genes, han tenido una gran importancia biológica, ya que el fenómeno es observado en diferentes organismos (hongos, plantas e insectos). La estrecha relación y posterior fusión de TPS con TPP en eucariontes pudo deberse a la necesidad por un lado de garantizar la síntesis de trehalosa, pero también, la de evitar la presencia de trehalosa 6-fosfato libre en el citosol ya que es tóxico. Pero además, la trehalosa 6-fosfato tiene un papel regulatorio o de mensajero secundario en el metabolismo de azúcares y en el desarrollo de las plantas, por lo que su acumulación debe estar finamente regulada.



-100

Figura 12. Relación filogenética entre los dominios TPS y TPP. Los genes TPS que tienen una relación cercana con genes TPP de acuerdo con su contexto genómico, se enmarca en amarillo. Las proteínas que tienen fusionados los dominios TPS y TPP se enmarcan en negro.



-100

Figura 14. Filogenia del dominio TPP. El árbol fue calculado por parsimonia usando el programa Protpars del paquete Phylip. Las secuencias son representados con colores de acuerdo con el grupo taxonómico al que pertenecen: **Bacterias**, **Archaea**, **Fungi**, **Plantas**, **Insectos**, **Nemátodos**.

Los valores de Bootstrap (1000X) son representados en porcentajes:

- 91-100 %
- 75-90 %
- 66-74 %
- 50-65 %
- 0-49 %

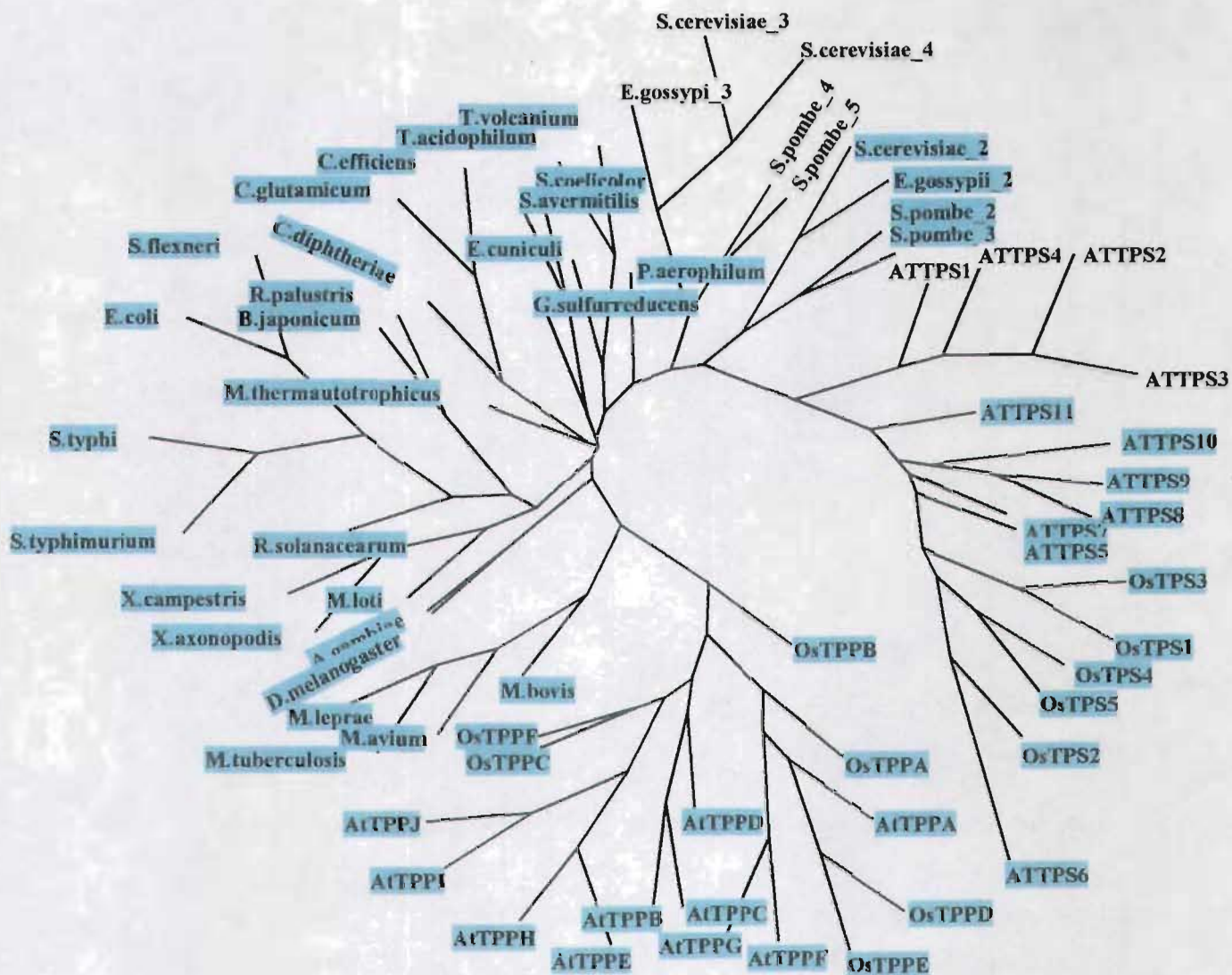
propuestas para *A. thaliana*, clase I (*AtTPS_1-4*), Clase II (*AtTPS_5-11*) y clase III (*AtTPPA-J*) (Leyman *et al* 2001, Eastmond and Graham 2003); también muestra que en *O. sativa* existen secuencias homólogas para las clases II y III solamente. Las clases I y II que son aquellas proteínas que tienen fusionado el dominio TPS, parecen tener el mismo origen monofilético que los dominios TPP de hongos. La clase III está conformada por proteínas más pequeñas constituidas solo por un dominio TPP. Esta clase de proteínas probablemente apareció en plantas después de que las plantas y hongos divergieron, ya que no se encontraron en hongos; su cercanía con las proteínas TPP de *Mycobacterium* sugiere que las proteínas clase III de plantas pudieron ser adquiridas mediante transferencia horizontal a partir de bacterias cercanas a *Mycobacterium*. Tanto en plantas como en hongos, parece que las proteínas con dominios TPP sufrieron varias duplicaciones a lo largo de su evolución, por lo que dicha posible transferencia debió ser en las plantas primitivas. De las tres clases de proteínas TPP de plantas, solo se ha demostrado la actividad enzimática de trehalosa 6-fosfato fosfatasa en miembros de la clase III como *AtTPPA* y *AtTPPB*, al ser sobreexpresadas son capaces de complementar la mutante *tps2Δ* de *S. cerevisiae* (Vogel *et al* 1998), aunque no se descarta que alguno de los otros miembros de las clases I y II tengan actividad fosfatasa.

Las secuencias de hongos se agrupan entre sí y al parecer son más cercanas a las de plantas clase I y II que a las de bacterias, aunque la proteína TPP de *E. cuniculi* parece más cercana a las archaeas *T. volcanium* y *T. acidophilum*. Otras archaeas como *M. thermautotrophicus* y *P. aerophilum* parecen estar más cercanas a las secuencias bacterianas. A diferencia de los dominios TPS de bacterias, en ninguna especie bacteriana se encontró duplicación de proteínas con dominios TPP.

4.3.6 Conservación de regiones características de proteínas fosfatasas en dominios TPP.

De acuerdo con Thaller *et al* (1998) y Leyman *et al* (2001), existen dos regiones consenso comúnmente presentes en proteínas fosfatasas donde se incluyen proteínas como OTSB, ScTPS2, AtTPPA-B, AtTPS5-11 entre otras. En este trabajo nos preguntamos si

estas secuencias (6-LDYDG/DT L/M-12 y 196-GDDRSD-201) se encuentran conservadas en las secuencias utilizadas en el alineamiento de los dominios TPP. Los datos muestran una alta conservación en las secuencias antes mencionadas en proteínas de archaeas, bacterias, hongos y plantas (Fig. 15).



-100

Figura 15. Conservación de las regiones consenso de las proteínas fosfatasa. Los dominios que conservan ambas regiones son indicadas con el fondo azul.

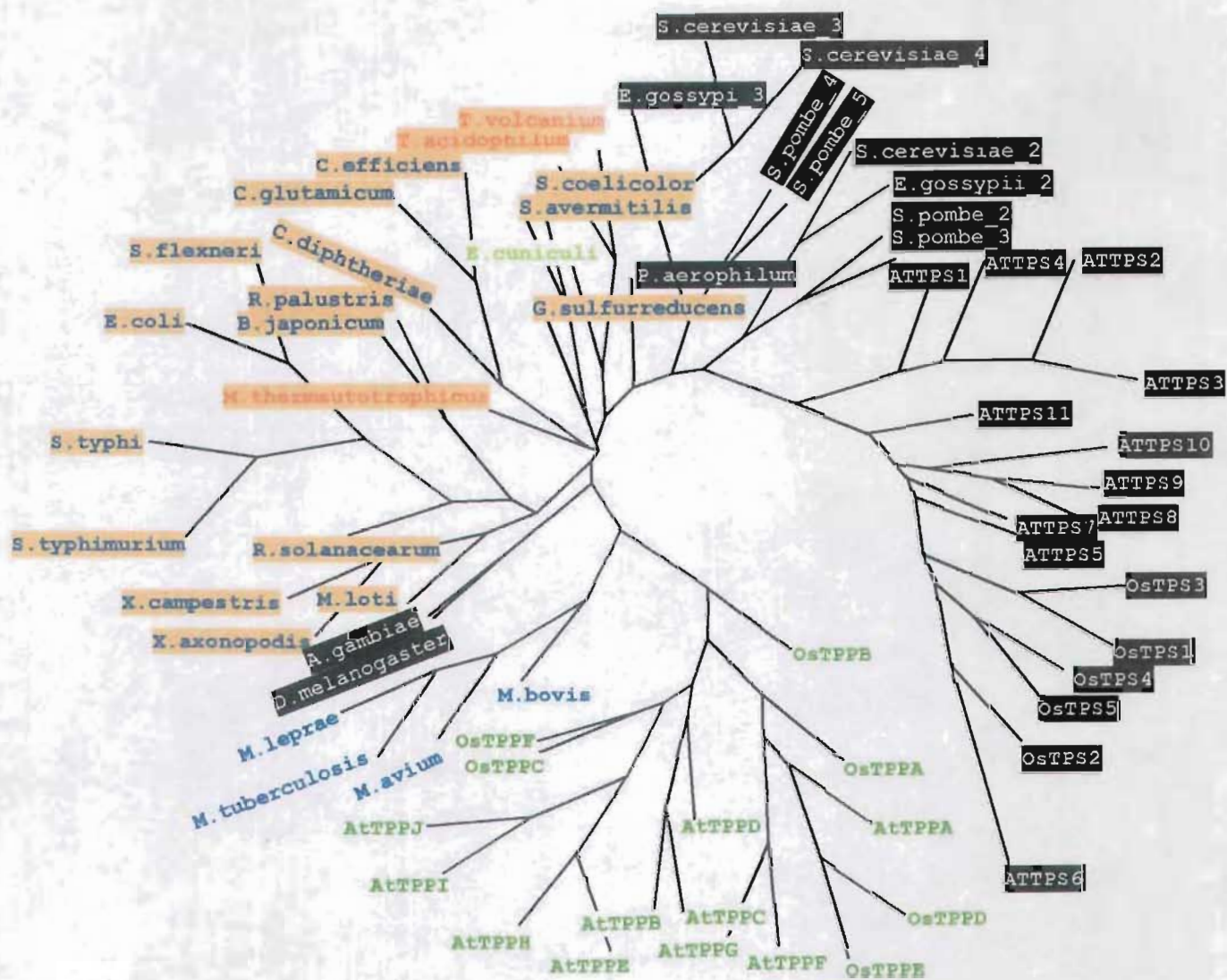
Además, se encontró que sólo las proteínas clase I de *A. thaliana* (*AtTPS1-4*) y algunas proteínas de levaduras no conservan estos motivos, entre ellas se encuentran *S. cerevisiae_3* y *S. cerevisiae_4* (*ScTPS3* y *ScTSL1*, respectivamente) que son proteínas sin actividad TPS y/o TPP. El resto de las proteínas de hongos (*S. pombe_4*, *S. pombe_5* y *E. gossypii_3*) probablemente tengan funciones similares a *ScTPS3* y *ScTSL1*. Los hallazgos de que los motivos no sean conservados en proteínas sin actividad de trehalosa 6-fosfato fosfatasa (*AtTPS1*, *ScTPS3*, *ScTSL1*) y que por otro lado sean tan conservadas en el resto de la filogenia del dominio, sugiere que estas regiones se encuentran altamente comprometidas con la función de la proteína.

4.3.7 Relación filogenética entre dominios TPP y TPS.

Al analizar la base de datos del SMART se encontró que el dominio TPP está constituido por aproximadamente 230 aminoácidos; de acuerdo con las bases de datos dominios conservados del NCBI se agrupan dentro del COG1877. Como se mencionó anteriormente en eucariontes es frecuente encontrar proteínas con dominios TPP fusionados con dominios TPS; mientras que en procariontes los genes *TPP* se encuentran normalmente en la cercanía de los genes *TPS*. En este trabajo analizamos la relación que tienen las proteínas con dominios TPP con proteínas con dominios TPS (Fig. 16). Los resultados confirman que existe una alta relación evolutiva entre los dominios TPP y TPS que ha llevado a la fusión de éstos en muchas de las proteínas eucariontes.

¿Qué significado evolutivo ha tenido la fusión de los dominios TPS y TPP en las proteínas de eucariontes? En realidad se desconoce el porqué de la fusión entre los dominios TPS y TPP; existen proteínas en eucariontes constituidas por los dos dominios (TPS/TPP) o sólo con uno de ellos, que conservan alguna de las actividades de trehalosa 6-fosfato sintasa o trehalosa 6-fosfato fosfatasa, aunque en ninguna proteína se ha demostrado que conserven ambas. Por otro lado, existen proteínas TPS/TPP que no conservan ninguna de las actividades y sólo mantienen funciones regulatorias, como es el caso de *ScTPS3* y *ScTSL1* (Bell *et al* 1998). De acuerdo con el análisis de la conservación del sitio activo del dominio TPS y de las regiones consenso presentes en los dominios TPP, se identificaron

tres proteínas que conservan tanto los residuos del sitio activo del dominio TPS y las regiones consenso del dominio TPP, estas pertenecen a *Pyrobaculum aerophilum*, *Drosophila*



- 100

Figura 16. Relación filogenética entre los dominios TPP y TPS. Los genes TPP que tienen una relación cercana con genes TPS de acuerdo con su contexto genómico, se enmarca en amarillo. Las proteínas que tienen fusionados los dominios TPP y TPS se enmarcan en negro.

melanogaster y *Anopheles gambiae*. Probablemente éstas sean las primeras proteínas con las dos funciones (trehalosa 6-fosfato sintasa y fosfatasa) encontradas en la naturaleza, ya que artificialmente esto ya ha sido demostrado. Recientemente se publicó el análisis bioquímico de la fusión traduccional de los genes *OTSA* y *OTSB* de *Escherichia coli*, la proteína quimérica resultante fue capaz de conservar ambas actividades y sintetizar trehalosa en *E. coli* (Seo *et al* 2000) y en *O. sativa* (Garg *et al* 2002), confirmando a ésta última mayor tolerancia a estrés por sequía, salinidad y bajas temperaturas. De igual manera, como se describe en la sección de resultados 3 de ésta tesis, la fusión traduccional de los dominios TPS y la región carboxilo-terminal de TPP de las proteínas TPS1 y TPS2 de *Sacharomyces cerevisiae*, es capaz de sintetizar trehalosa y complementar las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ-tps2Δ* de *Sacharomyces cerevisiae* (Avonce *et al* datos no publicados).

4.3.8 Determinación de la tasa de substitución de mutaciones en proteínas TPS eucariontes.

Debido a que al parecer la mayoría de las proteínas TPS/TPP carecen de alguna (o ambas) de las actividades enzimáticas, y a manera de predecir si estas proteínas tienen alguna función, en este trabajo determinamos la tasa de substitución de mutaciones en cada uno de los dominios TPS o TPP de las proteínas eucariontes, tanto en aquellas que presentan ambos, como en las que están constituidas por uno solo. Este parámetro permite identificar secuencias funcionalmente importantes para la célula y que son altamente conservadas entre especies. La tasa de substitución de mutaciones es la diferencia entre la proporción de mutaciones no sinónimas (dN) menos las mutaciones sinónimas (dS) para cada codon, $\omega = dN-dS$, si el valor ω es negativo, significa que la mayoría de las mutaciones acumuladas para el mismo codon en todas las secuencias comparadas son mutaciones sinónimas, lo que indica que la selección natural esta actuando sobre ésta posición preservando funcionalidad. En el caso contrario, cuando el valor de ω es positivo significa que en su mayoría se han seleccionado mutaciones no sinónimas en la posición analizada y sugiere que no existe restricción en las substituciones posibles (Suzuki *et al* 1999).

Los datos obtenidos con el programa SLAC (Single Likelihood Ancestor Counting, www.datamonkey.org/) muestran que prácticamente todos los cambios encontrados en las secuencias de DNA en los dos dominios provocan mutaciones sinónimas en las secuencias de proteínas; solo se detectaron 5 codones del dominio TPP en los cuales su valor de ω resultó positivo, mientras que todos los residuos del dominio TPS presentaron un valor negativo (Fig. 17). Estos datos indican que en las proteínas de fusión TPS/TPP, ambos dominios se encuentran bajo presión de selección natural y por lo tanto, se sugiere que deben tener alguna función en particular y que no son pseudogenes, los cuales tienen un valor ω positivo para la gran mayoría de sus codones (Colin and Durbin 2004)

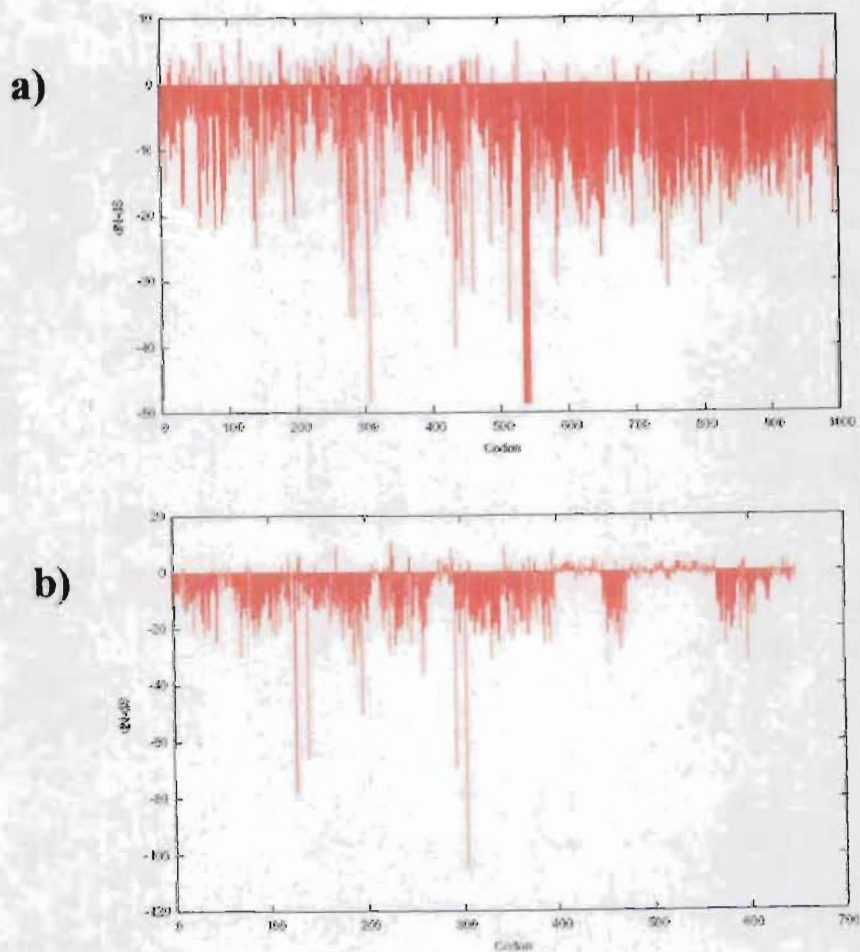


Figura 17. Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas en los dominios TPS y TPP. Las gráficas indican la diferencia entre las sustituciones no sinónimas (dN) y las sinónimas (dS) ($\omega = dN-dS$) calculadas para cada codon de los dominios TPS (a) y TPP (b).

¿Porqué los organismos eucariontes presentan varias copias de los genes *TPS*? La síntesis y metabolismo de trehalosa ha sido estudiada en diversos organismos, sin embargo son *S. cerevisiae* y *A. thaliana* los eucariontes en los que el metabolismo de trehalosa ha sido mejor caracterizado. En *S. cerevisiae* existen cuatro proteínas con dominios TPS y TPP, éstas forman un complejo holoenzimático en donde dos de ellas tienen funciones catalíticas (ScTPS1 y ScTPS2) y ScTPS3 y tienen funciones regulatorias (Bell *et al* 1998). En *A. thaliana* se desconocen las funciones de los homólogos a *AtTPS1*, una posibilidad es que podrían formar parte de un complejo proteico similar al encontrado en levaduras (Eastmond and Graham 2003, Eastmond *et al* 2003).

El hallazgo de que las secuencias *TPS* de las clases I, II y III de plantas se encuentran bajo presión de selección sugiere que todos ellos tienen alguna función en particular, dichas funciones hasta ahora desconocidas podrían probablemente estar relacionadas con otros procesos además de la señalización en respuesta a azúcares y osmoprotección. Por ejemplo, estudios con los genes de Arabidopsis *AtTPS7* y *AtTPS8* mostraron que éstos son incapaces de sintetizar trehalosa y de complementar el fenotipo de las mutantes *tps1Δ* y *tps2Δ* de *S. cerevisiae* (Vogel *et al* 2001), lo cual contrasta con el caso de *AtTPS1* (Zentella *et al* 1998, Blázquez *et al* 1998). Por otro lado, en *A. thaliana* se encontró que la transcripción de los genes *TPS* es regulada diferencialmente por la presencia de glucosa: Algunos genes como *AtTPS1* (Avonce *et al* 2004, Avonce *et al* 2005) *AtTPS8*, *AtTPS9* y *AtTPS10* son reprimidos; mientras que la expresión de *AtTPS5* se incrementa significativamente y en el resto permanecen sin cambios (Price *et al* 2004). La expresión diferencial de los genes *TPS* en respuesta a la glucosa podría significar una ventaja evolutiva de las plantas, en donde la regulación de la expresión de los miembros de una familia multigénica podría provocar diferentes respuestas de la planta al mismo estímulo, tanto temporal como espacialmente. Además, el hecho de que las proteínas *AtTPS7* y *AtTPS8* no funcionen en levadura, no necesariamente significa que no contengan actividad TPS, ya que podrían estar sujetas a un mecanismo regulatorio a nivel enzimático dependiente de las concentraciones locales de cofactores en los distintos tejidos vegetales.

4.3.9 Análisis de la expresión de genes *TPS* y *TRE1* en *Arabidopsis thaliana*.

En este trabajo se analizaron los patrones de expresión de los genes *TPS* y de trehalasa (*AtTRE1*) de *A. thaliana* durante el desarrollo y en los órganos de la planta. Se utilizó el servidor Genevestigator (Zimmermann *et al* 2004) el cual permite la búsqueda de la expresión de genes en una base de datos que cuenta con los resultados de microarreglos realizados en *A. thaliana*, provistos por: AtGenExpress (The Arabidopsis Functional Genomics Network, www.unifrankfurt.de/fb15/botanik/mcb/AFGN/AFGNHome.html) NASCArrays (Nottingham Arabidopsis Stock Center Transcriptomics Service; Craigon *et al* 2004), GEO (Gene Expression Omnibus; Edgar *et al* 2002), Array Express (Repository of the European Bioinformatics Institute; Brazma *et al* 2004), y se utilizó el programa Meta-Analyzer, el cual permite analizar la expresión de una familia multigénica bajo diferentes condiciones.

En la figura 18 se muestran los niveles de expresión de los genes *AtTPS1* a *AtTPS11* y del gen de la trehalasa, durante las diferentes etapas de desarrollo de la planta. Los datos muestran que todos los genes *TPS* son expresados en la planta, al menos durante alguna(s) etapa(s) de su desarrollo. Cada gen mostró tener un máximo de expresión durante alguna de las etapas analizadas, y ésta es variable para cada gen. Los genes *AtTPS1*, *AtTPS6*, *AtTPS7* y *AtTPS11* muestran expresión constitutiva en la planta, mientras que *AtTPS2*, *AtTPS3*, *AtTPS4* y *AtTPS5* se expresan preferentemente durante la senescencia de la planta. Por otro lado, el gen de la *AtTRE1* mostró también un patrón de expresión diferencial, con un máximo de expresión en la senescencia de la planta. Estos datos muestran que existe una regulación diferencial en la expresión de los miembros de la familia *TPS*, lo cual sugiere que cada uno de ellos tiene una función particular durante las diferentes etapas del desarrollo de la planta.

La figura 19 muestra los niveles de expresión de los genes *TPS* y *AtTRE1* en diferentes órganos de *A. thaliana*. Los patrones de expresión detectados fueron variables para cada gen, aunque podrían clasificarse en grupos: 1) Formado por los genes *AtTPS1*, *AtTPS6*, *AtTPS7*, *AtTPS8* y *AtTPS11* que se expresan de forma más generalizada y tienen

un máximo de expresión en la flor. 2) Constituido por los genes *AtTPS2*, *AtTPS3*, *AtTPS4* y *AtTPS5* que alcanzan su máximo en las semillas y el embrión; y en el resto de los tejidos se expresan muy poco. 3) Formado por los genes *AtTPS9* y *AtTPS10* que se expresan principalmente en la raíz. La expresión del gen *AtTRE1* fue principalmente localizada en los tejidos relacionados con la floración, y su nivel máximo de expresión se localizó en los sépalos.

Como se ha discutido anteriormente, *AtTPS1* es la única proteína en la que se ha demostrado la actividad de TPS, el resto de la familia parece no tener ésta actividad, lo cual es posible ya que el consenso del sitio activo está ausente en todos los miembros de la familia excepto en *AtTPS1* y *AtTPS2*. Por otro lado, probablemente algunos genes de la clase II tienen actividad TPP. Sin embargo, los patrones de expresión de los genes *TPS*, junto con los resultados de la tasa de sustitución, sugieren fuertemente que las proteínas TPS tienen funciones particulares durante las diferentes etapas del desarrollo de la planta.

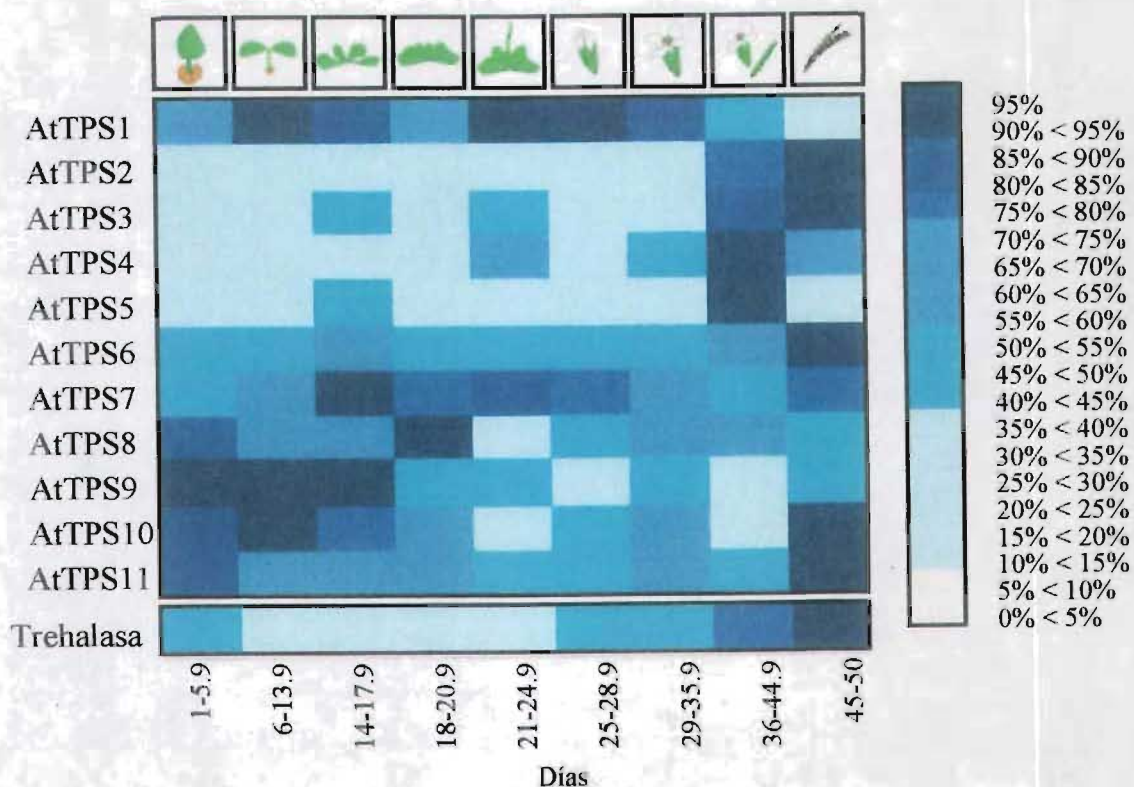


Figura 18. Expresión de los genes TPS y de la trehalasa durante el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. Los niveles de expresión para cada uno de los genes es indicado por la intensidad del color azul de acuerdo a la escala mostrada, el color azul intenso representa el máximo detectado.

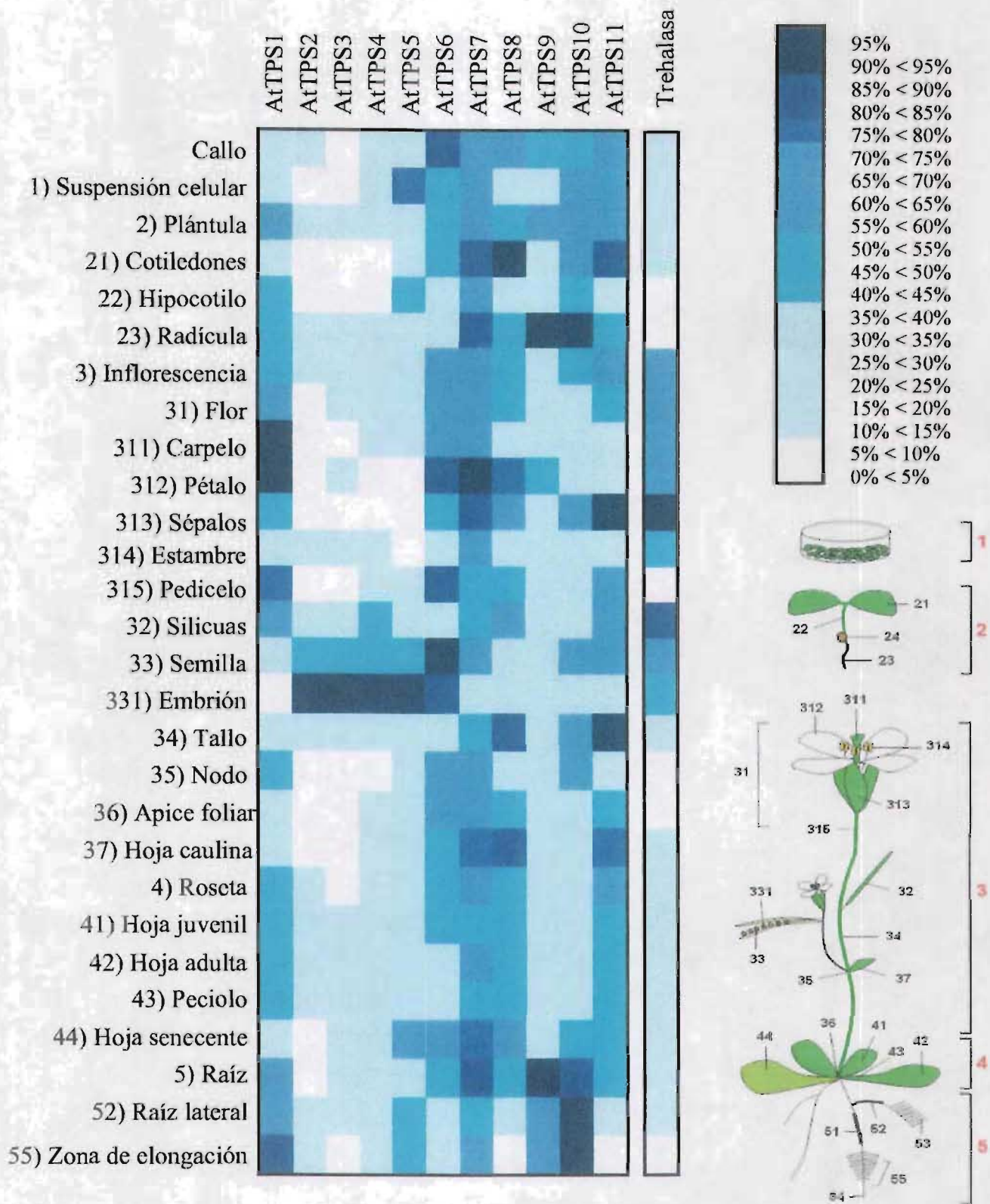


Figura 19. Expresión de los genes TPS y de la trehalasa en los diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*. Los niveles de expresión para cada uno de los genes es indicado por la intensidad del color azul de acuerdo a la escala mostrada, el color azul intenso representa el máximo detectado. Cada órgano analizado es indicado con un número en el esquema de la planta.

Una posibilidad es que la función de las proteínas TPS sin el sitio activo consenso, secuestren a la trehalosa 6-fosfato que se sabe es tóxica para la célula y la liberen paulatinamente para ser degradado a trehalosa por las TPP y/o TPS clase II, dando lugar entonces a una regulación fina de los niveles disponibles de trehalosa 6-fosfato/trehalosa. Esta posible unión trehalosa 6-fosfato/proteína podría estar regulada por condiciones particulares del ambiente intracelular de cada tejido, como son la concentración de iones, azúcares u otros cofactores.

Esta es la primera vez que se analiza el patrón de expresión de los genes *TPS* de *A. thaliana*, sin embargo habrá que confirmar los datos de los microarreglos y determinar el papel que juega cada uno de ellos en plantas, y así entender las nuevas funciones que la evolución ha seleccionado para los miembros de ésta familia multigénica.

Como se ha discutido anteriormente, es probable que la función más antigua de la trehalosa sea la de agente osmoprotector, la cual pudo estar presente incluso en los primeros organismos, los cuales pudieron ser criptobiontes (Cavalier-Smith 2001). Cuándo, cómo y porqué el metabolismo de trehalosa adquirió diferentes funciones? No se sabe con certeza, sin embargo se puede especular que a medida que la evolución fue generando nuevos retos, el metabolismo de trehalosa fue adaptándose a las nuevas circunstancias. El metabolismo de trehalosa en plantas es un buen ejemplo de ello, ya que como se ha venido discutiendo, las funciones de la síntesis de trehalosa en plantas son más bien regulatorías que de osmoprotección. Por otro lado, sacarosa es el disacárido libre más abundante en el citoplasma de las plantas, la cual al igual que la trehalosa es un azúcar no reductor y en algunos organismos funciona como agente osmoprotector (Lunn 2002). La síntesis de sacarosa en muchos sentidos es similar a la de trehalosa, ésta es sintetizada principalmente por la vía de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) y la sacarosa fosfato fosfatasa (SPP), los genes que codifican para estas enzimas se encuentran separados en cianobacterias filamentosas (similar a *TPS* y *TPP* en procariontes), mientras que en plantas y en el resto de las cianobacterias forman una sola proteína (Salerno and Curatti 2003). Sin embargo, a diferencia de la trehalosa, la síntesis de sacarosa se encuentra prácticamente limitada a plantas y cianobacterias (Castleden *et al* 2004), aunque también ha sido reportada en

algunas proteobacterias como *Methylobacter alcaliphilus* y *Methylobacter modestohalophilus* (Khmelenina *et al* 1999) donde funciona como agente osmoprotector. Esta enorme diferencia en la distribución de los genes de síntesis de trehalosa vs. sacarosa indica la especialización en las funciones de cada uno de éstos azúcares. Se cree que la síntesis de sacarosa se originó en primera instancia como agente osmoprotector, probablemente en proteobacterias, o en un ancestro común a las proteobacterias y cianobacterias. Posteriormente fue adoptado como un componente de transporte de carbono y energía en las cianobacterias filamentosas y fue adquirido por células de eucariontes durante el proceso de endosimbiosis de un ancestro capaz de sintetizar sacarosa (Lunn 2003). Las plantas, entre los eucariontes (Viridiplantae) son el único grupo que sintetiza sacarosa, por lo que el ancestro endosimbionte debió ser una cianobacteria que fue el ancestro de los cloroplastos (Cavalier-Smith 2000). Dado que la biosíntesis de trehalosa está ampliamente distribuida entre todos los dominios de organismos, es probablemente mucho más antigua que la de sacarosa, sin embargo la evolución adaptó a la sacarosa como el principal componente de transporte y de reserva en plantas (Salerno and Curatti 2003), dejando al metabolismo de trehalosa funciones regulatorias, seleccionando a la trehalosa 6-fosfato como molécula señalizadora. Una posible explicación del porqué la sacarosa es más abundante que la trehalosa en los organismos fotosintéticos, podría deberse a que la energía de enlace de la sacarosa es de 27 kcal/mol mientras que en el caso de la trehalosa es de -1 kcal/mol, lo cual hace a la primera una molécula con mayor tendencia a ser degradada para la obtención de energía (Roser 1991).

Las plantas tienen un mayor número de enzimas de metabolismo de carbohidratos con respecto a los demás organismos, probablemente debido a que la biosíntesis y degradación de los polisacáridos de la pared celular demanda vías complejas para sintetizar estos compuestos (Coutinho *et al* 2003). Este andamiaje de glicosil-transferasas y glicosil-hidrolasas, ha permitido el surgimiento de nuevas funciones para estas enzimas, éste es quizás el caso de familias multigénicas como la de *TPS*, en donde su papel ancestral de osmoprotector derivó en funciones similares a las de hormonas.

4.4 Conclusiones

Los resultados del análisis de secuencias de proteínas de síntesis de trehalosa realizados en éste trabajo demuestran que la trehalosa es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza. De las cinco vías de síntesis de trehalosa hasta ahora conocidas, la vía TPS/TPP es la más representativa en la naturaleza. Las eubacterias son el grupo de organismos con un mayor número de vías de síntesis, mientras que los eucariontes presentan básicamente la vía TPS/TPP. La presencia de alguna vía de síntesis no excluye a las demás, algunas eubacterias presentaron hasta cuatro vías diferentes.

Los dominios TPS y TPP conservan una alta relación evolutiva tanto en procariontes como en eucariontes, el análisis del contexto genómico indica que ambos dominios han tenido una evolución conjunta. Los residuos de aminoácidos del sitio activo del dominio TPS y las regiones consenso características de los dominios TPP son altamente conservados entre los diversos grupos taxonómicos estudiados. La tasa de substitución de mutaciones en las proteínas de fusión TPS/TPP sugiere que están bajo presión de selección y por lo tanto deben de tener alguna función. Los patrones de expresión de los 11 genes *AtTPS* muestran que éstos son expresados de forma particular y que dependen del desarrollo y del tejido de la planta.

4.5 Material y métodos

La estrategia experimental consistió en seleccionar secuencias de proteínas correspondientes a cada una de las vías de síntesis de trehalosa e identificar sus secuencias homólogas en todos los genomas totalmente secuenciados disponibles en las bases de datos. Se determinaron las regiones correspondientes a los dominios TPS y TPP presentes en cada proteína, se alinearon y editaron las secuencias para construir árboles filogenéticos con dos métodos diferentes (Neighbour Joining y Protpars de acuerdo con los paquetes de ClustalX y Phylip, respectivamente). Se determinó el contexto genómico de los dominios *TPS* y *TPP*, así como la tasa de substitución de mutaciones.

Para la búsqueda de secuencias homólogas a cada dominio se utilizó el programa BLASTP con las secuencias de las proteínas OTSA (*Escherichia coli*, GI:16129848), OTSB (*Escherichia coli*, GI:16129849), trehalosa sintasa (*Streptomyces avermitilis*, GI:29829345), TREY (*Streptomyces coelicolor*, GI:21224410), TREZ (*Rhodopseudomonas palustris*, GI:39936708), TRET (*Pyrococcus furiosus*, GI:18978114) y TREPPOS (*Propionibacterium acnes*, GI: 50842587) como sondas para compararlas contra las bases de datos de todos los genomas totalmente secuenciados. Los parámetros utilizados en cada BLASTP fueron con un valor de expectancia mínimo de 0.0001 y sin filtro. Las secuencias seleccionadas fueron alineadas con el programa ClustalX y los alineamientos fueron editados manualmente utilizando el programa SeaView.

Para calcular la similitud y ordenar por subgrupos las secuencias de los alineamientos se hicieron árboles filogenéticos con 1000 replicas (bootstrap), utilizando los programas ClustalX y PHYLIP. Ambos métodos dieron como resultado subgrupos similares, subsecuentemente el árbol consenso final fue construido por el programa Protpars del paquete PHYLIP con 1000 repeticiones de Bootstrap.

Para determinar el contexto genómico de los genes codificantes para las proteínas con dominios TPS y TPP, se utilizó el programa Gene Context Tool del servidor del Instituto de Biotecnología-UNAM (www.ibt.unam.mx). Para calcular la tasa de sustitución de mutaciones, las secuencias de aminoácidos de los alineamientos TPS y TPP fueron reverso traducidos a su secuencia de DNA mediante el programa JEMBOS 2.7.1 del paquete EMBOS, posteriormente se utilizó el programa SLAC (Single Likelihood Ancestor Counting) del servidor Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>) para determinar los valores dN/dS para cada posición. Los patrones de expresión de los genes *AtTPS* fue determinada utilizando el programa Meta-Analizer del servidor Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch/).

DISCUSION GENERAL

En los últimos años el estudio del metabolismo de la trehalosa ha experimentado un creciente interés, por dos razones: En primer lugar la producción de trehalosa para su uso como conservador de alimentos y medicinas (Richards *et al* 2002, Higashiyama *et al* 2002, Elbein *et al* 2003), y como criopreservador de órganos y tejidos (Guo *et al* 2000, Eroglu *et al* 2000, Pubhlev *et al* 2001). Por otro lado, al ser la trehalosa un excelente agente osmoprotector, también se ha explorado la posibilidad de mejorar genéticamente plantas de interés agrícola sobreexpresando genes de síntesis de trehalosa y de esta manera mejorar la tolerancia a condiciones de estrés (Paul *et al* 2001, Rontein *et al* 2002, Penna 2003).

Pese a que las primeras plantas transgénicas sobreexpresantes de genes *TPS* de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* mostraron una pequeña acumulación de trehalosa, también mostraron mayor tolerancia a estrés (Holmström *et al* 1996, Pilon-Smith *et al* 1998). Sin embargo, estas plantas también mostraron efectos pleiotrópicos en su desarrollo, básicamente las plantas fueron enanas, con hojas lanceoladas y con una baja producción de semillas. La baja acumulación de trehalosa llevo a probar una molécula análoga a trehalosa, la Validamicina A que es capaz de inhibir específicamente a la trehalasa; ésta enzima degrada específicamente a la trehalosa (Goddijn *et al* 1997). Los resultados mostraron que la trehalasa degradaba la mayor parte de la trehalosa sintetizada por el transgen, pero también mostró que plantas no transformadas de papa y tabaco acumulaban trehalosa. Todos estos hallazgos sugerían que el metabolismo de trehalosa no era exclusivo de organismos criptobiontes, sino que al menos en plantas existía síntesis de trehalosa y que la acumulación de una mínima concentración tenía enormes consecuencias en la planta.

La caracterización funcional de los genes *SITPS1* y *AtTPS1* de las plantas *Selaginella lepidophylla* y *Arabidopsis thaliana* en *S. cerevisiae* mostró que el metabolismo de trehalosa en plantas y levaduras tiene similitudes: Los genes *SITPS1* y *AtTPS1* son capaces de restaurar el crecimiento en medio con glucosa de las mutantes *tps1Δ* y *tps1Δ/tps2Δ* y la termosensibilidad en las mutantes *tps2Δ*, *tps1Δ/tps2Δ* de levadura

(Zentella *et al* 1998, Blázquez *et al* 1998). Versiones truncadas de éstas proteínas mostraron mayor actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa, lo que sugería que las proteínas de plantas son capaces de interactuar con las proteínas regulatorias del complejo TPS en levaduras (Van Dijck *et al* 2002). Otra similitud entre plantas y levaduras es que ambos organismos expresan varias proteínas TPS, aunque aparentemente no todas tienen actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa (Leyman *et al* 2001).

En este trabajo nos propusimos objetivos que nos permitieran: 1) Entender cual es el papel que juega en plantas la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa (AtTPS1) de una planta que no es naturalmente tolerante al estrés hídrico extremo. 2) Construir proteínas quiméricas con actividad TPS y TPP, que sirvieran como herramientas biotecnológicas para la producción de trehalosa. 3) Dilucidar las relaciones filogenéticas de las proteínas TPS y TPP.

En la primera parte del trabajo se describe la caracterización de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *AtTPS1*. El principal hallazgo realizado durante el desarrollo de éste trabajo fue que las plantas sobreexpresantes de *AtTPS1* si bien son tolerantes al estrés por deshidratación, acumulan niveles muy bajos de trehalosa. Además, las plantas transgénicas mostraron fenotipos de insensibilidad a altas concentraciones de glucosa y ABA. Este proceso parece al menos en parte estar mediado por la regulación de la expresión de genes como *HXK1* y *ABI4*, demostrando por primera vez la relación entre el metabolismo de trehalosa y la señalización mediada por glucosa y ABA en plantas.

Aunque existe abundante evidencia que demuestra que el intermediario de la síntesis de trehalosa, la trehalosa 6-fosfato (T6P) participa en la regulación del metabolismo de carbono, crecimiento y desarrollo en plantas (Eastmond *et al* 2002, Schluempmann *et al* 2003, Schluempmann *et al* 2004), no había sido demostrado que el metabolismo de trehalosa participa en la regulación de genes involucrados en la señalización mediada por glucosa y ABA. Los hallazgos de insensibilidad a glucosa y ABA pueden ser explicados por los cambios en la expresión de genes como *HXK1* y *ABI4*. Por un lado, la enzima hexocinasa (*HXK1*) ha sido ampliamente reconocida como una proteína reguladora del metabolismo de

azúcares en plantas, capaz de señalar la expresión de genes de fotosíntesis (Jang and Sheen 1994, Jang *et al* 1997, Moore *et al* 2003), y por el factor transcripcional *ABI4* el cual tiene un papel fundamental en la señalización de glucosa mediada por ABA (Arenas-Huertero *et al* 2000, Huijser *et al* 2000, Laby *et al* 2000).

En el modelo presentado en la Figura 20, se resumen los resultados del análisis de PCR en tiempo real y RT-PCR presentados en los resultados de la primera parte de la tesis. En éste modelo se propone la manera en que *AtTPS1* podría participar en las vías de señalización de glucosa y su conexión con ABA.

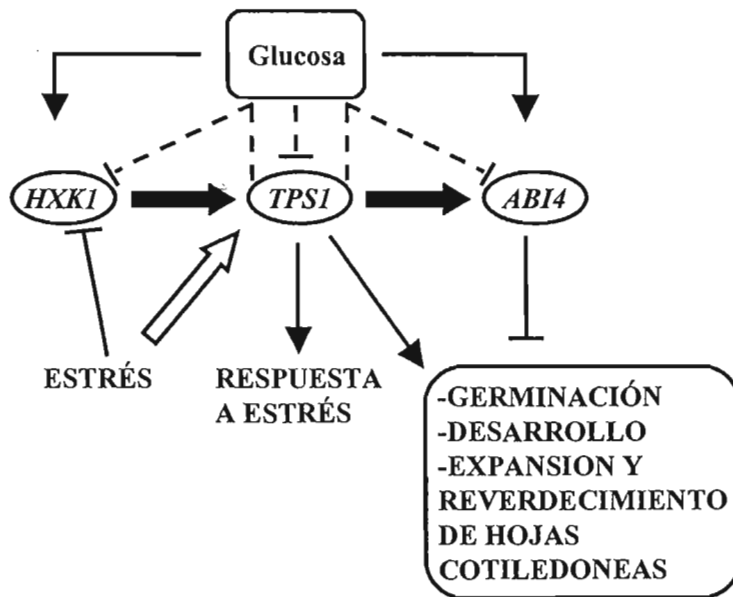


Figura 20. Modelo de las interacciones regulatorias propuestas entre glucosa, estrés, *HXK1*, *TPS1* y *ABI4*. Las flechas continuas indican activación a nivel transcripcional (negras y blanca). Las líneas negras con extremos romos indican represión de la transcripción y las discontinuas indican represión en presencia de altas concentraciones de glucosa.

En primer lugar, *AtTPS1* es regulado negativamente por glucosa: Tanto en las plantas control como en las transgénicas el transcrito de *AtTPS1* disminuyó en presencia de altas concentraciones de glucosa (Fig. 5 y 6 en Avonce *et al* 2004). Así mismo el análisis de germinación en medio con glucosa (Fig. 3 en Avonce *et al* 2004) sugiere que *AtTPS1* es parte de la cascada de señalización mediada por glucosa, que entre otros efectos retarda la

germinación e inhibe el desarrollo de la plántula (Jang *et al* 1997, Arenas-Huertero *et al* 2000).

Nuestros datos indican que *AtTPS1* es parte de la vía de señalización mediada por hexocinasa, no se detectó la expresión de *AtTPS1* en plantas que expresan *HXK1* en antisentido; y por el contrario, en las plantas que sobreexpresan *HXK1* la detección del transcrito de *AtTPS1* fue mayor que en el control. Por otro lado, la sobreexpresión de *AtTPS1* tiene como consecuencia el incremento en la expresión de genes como *CAB1* que se sabe son regulados por la vía de la hexocinasa (Jang *et al* 1997, Xiao *et al* 2000).

En presencia de glucosa *AtTPS1* regula negativamente la expresión de *HXK1* y *ABI4* (Fig. 5 en Avonce *et al* 2004). Los datos indican que el aumento en la expresión de *AtTPS1* provoca que *HXK1* no responda a los altos niveles de glucosa, lo cual sugiere que las sobreexpresantes de *AtTPS1* podrían mimetizar el fenotipo observado en las plantas que expresan *HXK1* en antisentido (Jang *et al* 1997) o el de la mutante en *HXK1 gin2* (Moore *et al* 2003). Se ha demostrado que el gen *HXK1* se induce por glucosa (Price *et al* 2004).

Por otra parte *ABI4* es un gen que responde positivamente a glucosa, regulando respuestas como la disminución de la germinación y reverdecimiento de las hojas cotiledoneas (Arroyo *et al* 2003). Sin embargo, en las plantas sobreexpresantes de *AtTPS1* ésta respuesta se encuentra sumamente disminuida (Fig. 3 y 5 en Avonce *et al* 2004). Estos fenotipos son similares a los encontrados en mutantes *ABI4* (Arenas-Huertero *et al* 2000, Huijser *et al* 2000, Laby *et al* 2000). La proteína ABI4 es un factor transcripcional de la familia AP2 (APETALA 2) que en *Arabidopsis* regula la expresión de genes relacionados con respuesta a ABA como las *AtEm6*, *AtEm1* y *PAP140* (Söderman *et al* 2000), genes relacionados con fotosíntesis como *PC*, (Arenas-Huertero *et al* 2000, Rook *et al* 2001) y genes modulados por azúcares como *APL3* y *ADH* (Arenas-Huertero *et al* 2000, Rook *et al* 2001, Niu *et al* 2002). La represión de la transcripción de *ABI4* por *AtTPS1* no fue observada en las plantas control, por el contrario la expresión de *ABI4* fue positivamente regulada cuando las plantas fueron crecidas en medio sin glucosa. Además, el hallazgo de que *APL3* tuvo una respuesta moderada a glucosa en las plantas transgénicas (Fig. 5 en

Avonce *et al* 2004), concuerda con que *AtTPS1* reprime a *ABI4*, ya que *APL3* es regulado positivamente por *ABI4* (Rook *et al* 2001). Cuando se determinó la concentración de ABA en las plantas transgénicas en presencia o ausencia de glucosa, no se encontró una diferencia (Tabla II en Avonce *et al* 2004); además, cuando se determinó la expresión de *AtTPS1* en la mutante *abi4* no se detectaron cambios con respecto a las plantas control, lo que sugiere que *AtTPS1* podría encontrarse arriba de *ABI4* en la cascada de señalización.

La hexocinasa (HXK1) ha sido ampliamente reconocida como una proteína reguladora del metabolismo de azúcares en plantas (Jang *et al* 1997, Xiao *et al* 2000). Debido a la similitud entre el metabolismo de azúcares entre plantas y levaduras, se creyó que la T6P podría regular negativamente a la hexocinasa de plantas como lo hace en levaduras (Blázquez *et al* 1993). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la T6P es incapaz de inhibir a la hexocinasa de plantas (Eastmond *et al* 2002). El mecanismo por el cual *AtTPS1* regula la expresión de *HXK1* es incierto, aunque algunos datos sugieren que la estructura de la proteína *AtTPS1* podría estar jugando un papel importante en la regulación. Cuando se sobreexpresó una versión truncada del gen *AtTPS1* que codifica para una proteína que carece de una región de 100 aminoácidos del extremo amino terminal (Δ NA*AtTPS1*), encontramos que la planta acumula más trehalosa, aunque es sensible a glucosa y algunas líneas muestran fenotipos aberrantes (N. Avonce y G. Iturriaga, datos no publicados). El efecto de la región amino terminal de *AtTPS1* y *SITPS1* fue evaluado en mutantes de levadura, encontrándose que la actividad de las enzimas truncadas fue mayor que las silvestres, además se acumuló mayor cantidad de trehalosa y el fenotipo de las mutantes fue complementado (Van Dijck *et al* 2002). Es posible que en plantas esta región amino-terminal tenga funciones regulatorias, entre ellas la de modular la actividad de la enzima (Leyman *et al* 2001), su interacción con otras, su regulación transcripcional o su localización intercelular. Un candidato para interactuar con la proteína *AtTPS1* y modular la actividad, localización o interacción con otras, son las proteínas 14-3-3, las cuales se sabe son capaces de interactuar con la proteína TPS de coliflor, la cual de hecho se encuentra fosforilada *in vivo* (Moorhead *et al* 1999).

Recientemente se reportó que al incrementarse los niveles intracelulares de trehalosa se produce una mayor acumulación de trehalosa 6-fosfato y un arresto en el crecimiento de la planta, lo cual indica que existe una vía similar a la trehalosa hidrolasa capaz de convertir trehalosa en trehalosa-6-fosfato (Schluepmann *et al* 2004). Al adicionar fuentes alternativas de carbono, la inhibición del crecimiento mediado por la trehalosa es revertido, lo cual sugiere que la planta establece un balance entre los niveles de trehalosa 6-fosfato y los azúcares adicionados. También se observan cambios a nivel de la transcripción cuando la planta se encuentra en ausencia de fuentes de carbono y los niveles de trehalosa 6-fosfato son altos, se induce la expresión de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa y se reprime a la trehalosa 6-fosfato sintasa (Schluepmann *et al* 2004). Todos estos datos sitúan al metabolismo de trehalosa en plantas, con la subsecuente síntesis y degradación de trehalosa 6-fosfato, como un intermediario entre la percepción y respuesta a diferentes estímulos (Fig. 21).

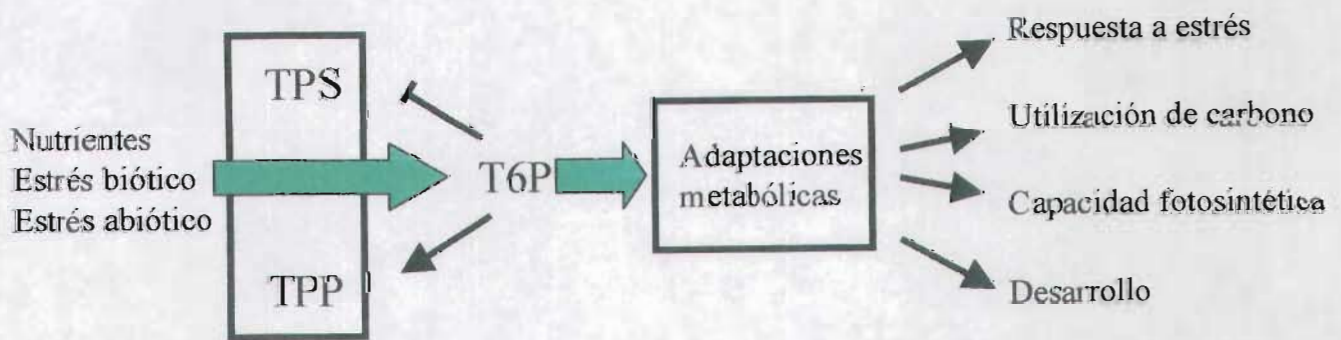


Figura 21. Papel del metabolismo de la trehalosa 6-fosfato en plantas. Diferentes tipos de estrés pueden alterar los niveles de trehalosa 6-fosfato, los cuales a su vez regulan respuestas metabólicas de la planta. (Modificado de Schluepmann *et al* 2004).

El fenotipo de tolerancia al estrés por sequía es también un hallazgo importante en éste trabajo. Esta es la primera vez que se reporta que la sobreexpresión de un gen de trehalosa 6-fosfato sintasa confiere tolerancia al estrés sin el inconveniente de que las plantas transgénicas presenten efectos aberrantes en su desarrollo (Holmström *et al* 1996, Pilon-Smith *et al* 1998, Romero *et al* 1997). En este trabajo sugerimos que la tolerancia adquirida al sobreexpresar el gen *AtTPS1* se debe a que las plantas experimentaron cambios en la concentración de T6P, lo que provocó cambios en las vías de señalización de glucosa y ABA responsables de alterar la respuesta al estrés y conferirles mayor tolerancia. Como se ha mencionado en la sección de resultados, la cantidad de trehalosa detectada en las plantas transgénicas no explica *per se* el fenotipo de tolerancia, ya que es insuficiente para tener efecto como osmoprotector ya que se necesitarían al menos 100 veces mayor concentración (Gaff 1996). En un estudio previo se demostró que la acumulación de trehalosa en plantas transgénicas sobreexpresantes de los genes *OTSA* y *OTSB*, fue la misma bajo condiciones de estrés por sequía como en condiciones normales de crecimiento (Pilon-Smith *et al* 1998), lo que sugiere que la tolerancia a desecación en éstas plantas no es consecuencia de una mayor acumulación de trehalosa en condiciones de estrés. De manera similar, en otros trabajos donde sobreexpresan la *TPS1* de levadura reportan niveles muy bajos de trehalosa, si bien al igual que en esta tesis utilizan un promotor constitutivo, y en todos estos casos las plantas transgénicas son tolerantes a sequía (Holmström *et al* 1996, Romero *et al* 1997).

El fenotipo de tolerancia a glucosa planteó además la posibilidad de utilizar a la *AtTPS1* como un marcador de selección de plantas transgénicas. Debido a que las plantas sobreexpresantes de *AtTPS1* son insensibles a la germinación en altas concentraciones de glucosa y al mismo tiempo no mostraron fenotipos aberrantes, se planteó la posibilidad de utilizar el sistema de sobreexpresión de *TPS* y crecimiento en glucosa como un método de selección de plantas transgénicas. Los experimentos desarrollados con ese objetivo no fueron parte de ésta tesis, sin embargo es importante hacerlos notar ya que derivan de los resultados presentados aquí y son motivo de una publicación (Leyman *et al* 2004), una patente internacional (Thevelein *et al* 2001) y un manuscrito en preparación (Leyman *et al* 2005). Este avance en la selección plantas transgénicas es importante ya que evita el uso de

genes de resistencia a antibióticos, utilizando en su lugar la selección en un medio barato, inocuo y natural, la glucosa. El sistema ha sido probado eficientemente en *A. thaliana* y *N. tabacum*.

La segunda parte del trabajo se dividió en dos secciones, en la primera se presentan los resultados de la caracterización molecular de una construcción quimérica entre genes *TPS* y *TPP* que codifica a una proteína bifuncional capaz de sintetizar trehalosa; en la segunda de la caracterización filogenética de las proteínas con dominios *TPS* y *TPP*.

La proteína bifuncional ScTPS1/ScTPS2 demostró conservar ambas actividades y ser capaz de restaurar el fenotipo de las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ* y *tps1Δ/tps2Δ* de *S. cerevisiae* y de sintetizar trehalosa. La primer proteína bifuncional *TPS-TPP* reportada fue generada fusionando los genes completos de *OTSA* y *OTSB* de *E.coli*, sólo separados por una secuencia insertada de 8 aminoácidos (Seo *et al* 2000). En este trabajo los autores reportan que al purificar la proteína de fusión expresada en *E.coli*, se observó mayor actividad en el dominio *TPS* cuando éste se encuentra fusionado al dominio *TPP*, que cuando se expresa solo. La actividad del dominio *TPP* fue conservada en la proteína de fusión, aunque fue la misma que la detectada con la proteína *OTSB* purificada. Posteriormente al transformar plantas de *Oriza sativa* con ésta construcción quimérica, se observo un mayor tolerancia a estrés por sequía, salinidad y bajas temperaturas (Garg *et al* 2002).

Nuestros datos indican que la proteína de fusión ScTPS1/ScTPS2 es capaz de sintetizar trehalosa en levaduras y probablemente también en plantas. Aunque no se determinó la cantidad de trehalosa 6-fosfato generada por la enzima, asumimos que la cantidad de ésta será mucho menor a la generada con la sobreexpresión de solo del gen de trehalosa 6-fosfato sintasa, lo que genera una herramienta invaluable para la caracterización futura del efecto de la acumulación de trehalosa en plantas. Además, sí las plantas son resistentes al estrés como lo son las que sobreexpresan la construcción hecha con los genes de *E. coli*, también se convierte en candidato a impactar el desarrollo de nuevas tecnologías en plantas transgénicas en México.

El estudio filogenético de las proteínas con dominios TPS y TPP aportó mucha información relevante al campo de la síntesis de trehalosa, entre otras la de demostrar que los genes de síntesis de trehalosa se encuentran ampliamente distribuidos en el árbol de la vida, que la biosíntesis de trehalosa ha sido importante a lo largo de la evolución, ya que existen 5 vías distintas (con sustratos y enzimas distintas) en procariontes y dos en eucariontes, que los genes de la vía *TPS/TPP* mantienen una relación evolutiva estrecha, que el sitio activo de la enzima TPS y las regiones TPP son altamente conservadas y que las secuencias reiteradas de eucariontes son secuencias funcionales. En el caso particular de *Arabidopsis*, se encontró que la expresión de los 11 genes *TPS* se regula espacial y temporalmente de manera diferencial en los órganos de la planta; y que todos ellos están sujetos a presión selectiva, lo que sugiere fuertemente que tienen funciones específicas.

Este es el primer estudio filogenético de proteínas de síntesis de trehalosa, los resultados nos permiten proponer que la biosíntesis de trehalosa es tan antigua como la vida misma. Las funciones que desarrolla la trehalosa en los organismos actuales son muy variadas, se le usa como un agente estabilizador y protector de estructuras celulares en los organismos criptobiontes (Weisburd 1988; Colaço *et al* 1992), como un factor crucial en la respuesta adaptativa de las levaduras a diferentes tipos de estrés, como son el salino, térmico, hídrico, osmótico y oxidativo (Hounsa *et al* 1998; De Virgilio *et al* 1994; Hottiger *et al* 1994, Singer and Lindquist 1988, Argüelles 2000), componente de reserva (Elbein 1974; Thevelein 1984), como un agente regulador de la glicólisis en levaduras (Thevelein and Hohmann 1995; Neves *et al* 1995; Hohmann *et al* 1996; Gancedo and Flores 2004) y como regulador de las vías de señalización de glucosa y ABA en plantas (Avonce *et al* 2004, Avonce *et al* 2005). Al ser la trehalosa tan ubicua en la naturaleza, probablemente tenga algunas funciones aún desconocidas.

CONCLUSIONES

1) Los fenotipos de insensibilidad a glucosa y ABA, observados en las plantas sobreexpresantes de *AtTPS1*, son resultado de los cambios en la regulación de la expresión de genes relacionados con las vías de señalización de azúcares (*HXK1*) y ácido abscísico (*ABI4*).

2) Debido a que las plantas transgénicas no acumularon altas cantidades de trehalosa, ésta no parece funcionar como osmolito, por lo que el fenotipo de tolerancia a estrés por sequía podría ser consecuencia del proceso de desregulación de las vías de señalización de azúcares y ABA.

3) Esta alteración en la regulación génica parece ser debida a la trehalosa, la trehalosa 6-fosfato y/o a la proteína *AtTPS1* *per se*.

4) *AtTPS1* actúa en la vía de señalización dependiente de *HXK1*, y regula a *ABI4* en coordinación con los niveles de glucosa presentes en la planta, lo que convierte a *AtTPS1* en un modulador de la expresión genética que integra las respuestas de la planta a estímulos metabólicos y del ambiente durante el desarrollo de la planta.

5) El metabolismo de trehalosa puede tener varias funciones en distintos organismos, tales como osmolito, componente estructural de la pared celular, regulador del metabolismo de carbohidratos, vías de señalización mediadas por azúcares, ABA o de vías de respuesta al estrés osmótico.

6) La enzima bifuncional *ScTPS1/ScTPS2* conserva sus actividades de trehalosa 6-fosfato sintasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa, y es capaz de sintetizar trehalosa.

7) Los genes de las vías de síntesis de trehalosa se encuentran prácticamente en todos los organismos, lo que sugiere que la síntesis de trehalosa es evolutivamente muy antigua y tiene funciones importantes para los organismos.

8) Los dominios TPS y TPP mantienen una estrecha relación evolutiva tanto en procariontes como en eucariontes, lo que indica que la síntesis de trehalosa (o su intermediario T6P) ha sido conservada fielmente.

9) Las proteínas TPS/TPP de eucariontes están sujetas a presión de selección, lo que sugiere que son funcionales.

10) La expresión de los genes *TPS* de *Arabidopsis* está regulada temporal y espacialmente en el desarrollo de la planta.

PERSPECTIVAS

1) Para continuar con la caracterización de *AtTPS1*, sería importante determinar si la sobreexpresión de éste gen regula a otros genes no estudiados en este trabajo. Los microarregos serían la mejor opción para ello, ya que permitirían detectar nuevos genes de la vía de señalización, entre ellos posiblemente a otros miembros de la familia *TPS* de *Arabidopsis*.

2) La cruce de las plantas sobreexpresantes de *AtTPS1* con mutantes previamente caracterizadas como *gin6*, o con líneas transgénicas como el antisentido y sobreexpresión de *HXK1*, arrojaría nuevos datos sobre la vía de señalización.

3) En este trabajo se determinó la tolerancia al estrés por sequía en las plantas sobreexpresantes de *AtTPS1*. Sin embargo, es posible que estas plantas sean capaces de tolerar otros tipos de estrés como frío o calor, por lo que sería importante hacer éstas pruebas.

4) El análisis de la enzima bifuncional en levaduras mostró que ésta es capaz de sintetizar trehalosa y complementar a las mutantes *tps1Δ*, *tps2Δ*, *tps1Δ-tps2Δ* de *S. cerevisiae*. La transformación de plantas con esta construcción y su posterior

caracterización arrojaría resultados interesantes que podrían ayudar a discernir el papel de la síntesis de trehalosa para efectos de osmoprotección y de regulador en las vías de señalización de glucosa y ABA.

5) Existen al menos cinco vías de síntesis de trehalosa en distintos grupos de organismos. En este trabajo se presentó la filogenia de la vía TPS/TPP que es la única presente en plantas; sin embargo, sería importante determinar la filogenia de las otras vías de síntesis.

6) Sería importante mutagenizar cada uno de los genes de organismos que tienen más de una vía de síntesis de trehalosa y analizar el fenotipo conferido. Este estudio podría indicar el papel de la síntesis de trehalosa y sus intermediarios en estos organismos.

LITERATURA CITADA

- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and León, P. (2000). Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development*. **14**: 2085-2096.
- Argüelles, J.C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*. **174**: 217-224.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R.R. and León, P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (Abscisic acid insensitive 4, Abscisic acid insensitive 5 and Constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **133**:231-242.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., and Iturriaga, G. (2004). The *Arabidopsis* Trehalose-6-P Synthase AtTPS1 Gene Is a Regulator of Glucose, Abscisic Acid, and Stress Signaling. *Plant Physiology*. **136** (3):3649-59.
- Avonce, N., Leyman, B., Thevelein, J.M. and Iturriaga, G. (2005). Trehalose metabolism and glucose sensing in plants. *Biochemical society transactions*. **33** (1): 276-279.
- Becker, A., Schloeder, P., Steele, J.E. and Wegener, G. (1996). The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experimentia*. **52**:433-439.
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., Wiemken, A. and Thevelein, J.M. (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *The Journal of Biochemical Chemistry*. **273**: 33311-33319.
- Blázquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C. and Gancedo, J.M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS letters*. **329**: 51-54.
- Blázquez, M.A. and Gancedo, C. (1994). Identification of extragenic suppressors of the *cif1* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **25**:89-94.
- Blázquez, M.A., Santos, E., Flores, C.L., Martínez-Zapater, J.M., Salinas, J. and Gancedo, C. (1998). Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant Journal*. **13** (5): 685:689.
- Breiteubach-Schmitt, L., Schmitt, H.D., Heinisch, J. and Zimmermann, F.K. (1984). Genetic and physiological evidence for the existence of a second pathway in yeast parallel to the phosphofructokinase-aldolase reaction sequence. *Mol. Gen. Genet*. **195**:536-540.

- Brazma, A., Parkinson, H., Sarkans, U., Shojatalab, M., Vilo, J., Abeygunawardena, N., Holloway, E., Kapushesky, M., Kemmeren, P., Lara, G.G., Oezcimen, A., Rocca-Serra, P., Sansone, S.A. (2003). ArrayExpress--a public repository for microarray gene expression data at the EBI. *Nucleic Acids Research*. **31**: 68-71.
- Brocard-Gifford, I.M., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2003). Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signalling. *Plant Physiology*. **131**:78-92.
- Brodmann, A., Schuller, A., Ludwig-Muller, J., Aeschbacher, R.A., Wiemken, A. and Boller T.W.A. (2002). Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. **15** (7):693-700.
- Cabib, E. and Lenoir, L.F. (1958). The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* **231**: 259-275.
- Cannon, J.F., Pringle, J.R., Fiechter, A. and Khalil, M. (1994). Characterization of a glycogen-deficient *glc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. **136**:485-503.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*. **2**:202-207.
- Castleden, C.K., Aoki, N., Gillespie, V.J., MacRae, E.A., Quick, W.P., Buchner, P., Foyer, C.H., Furbank, R. T., and Lunn, J.E. (2004). Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiology*. **135**:1753-1764.
- Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science*. **5**:174-182.
- Cavalier-Smith T. (2001). Obscure cells as proto-organisms: Membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the First Cells, and Photosynthesis. *J Mol Evol*. **53**:555-595
- Ciria, R. Abreu – Goodger, C., Morett, E. and Merino, E. (2004). GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics*. **20** (14):2307-8.
- Colaço, C., Sen, S., thangavelu, M., Pinder, S. and Roser B. (1992). Extraordinary stability of Enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Biotechnology*. **10**:1007-1011.
- Coruzzi, G.M. and Zhou, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: Emerging “matrix effects”. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**:247-253.
- Coutinho, P.M., Stam, M., Blanc, E. and Henrissat, B. (2003). Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? *TRENDS in Plant Science*. **8** (12):563-565.

- Colin, L. and Durbin, R. (2004). Improved techniques for the identification of pseudogenes. *Bioinformatics*. **20** Suppl. 1: i94-i100.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J., May, S.(2004). NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res.* **32** Database issue: D575-577
- Crowe, J.H., Hoceksra, F.A. and Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*. **54**:579-599.
- Cushman, J.C. and Bohnert, H. (2000). Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology*. **3**:117-124.
- Devit, M. J., Widdle, J.A. and Johnston, A. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell*. **8**:1603-1618.
- De Smet, K.A.L., Weston, A., Brown, I.N., Young D.B. and Robertson. (2000). Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology*. **144**:199-208.
- De Virgilio C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *FEBS*. **219**:179-186.
- De Winde, J.H., Crauwels, M., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Winderickx, J. (1996). Differential requirement for the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem*. **241**:633-643.
- Eastmond, P.J., van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G. Smeekens, S.C. and Graham, I.A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *The Plant Journal*. **29** (2):225-235.
- Eastmond P.J., Li, Y. and Graham I.A. (2003). Is trehalose-6-phosphate a regulator of sugar metabolism in plants? *Journal of Experimental Botany*. **54** (382): 533-537.
- Eastmond P.J. and Graham, I.A. (2003). Trehalose metabolism: a regulatory role for trehalose-6-phosphate? *Current Opinion in Plant Biology*. **6**:231-235.
- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**: 207-210.
- Elbein, A.D. (1974). The metabolism of α , α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*. **30**: 227-256.
- Elbein, A.D., Pan. Y.T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. **13** (4):17R-27R.

- Elble R (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeast. *Biotechniques*. **13**:18-20.
- Epstein, P.N., Boschero, A.C., Atwater, I. Cai, X. and Overbeek, P.A. (1992). Expression of yeast hexokinase in pancreatic β cells of transgenic mice reduces blood glucose, enhances insulin secretion and decreases diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**:12038-42.
- Eroglu, A., Russo, M.J. Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H. And Toner, M. (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology*. **18**:163-167.
- Finkelstein, R.R. and Gibson, S.I. (2001). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology*. **5**:26-32.
- Foster, A.J., Jenkinson, J.M. and Talbot, N.J. (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The EMBO Journal*. **22** (2):225-235.
- Fritzius, T., Aeschbacher, R., Wiemken, A. and Wingler, A. (2001). Induction of *ApL3* expression by trehalose complement the starch-deficient Arabidopsis mutant *adg2-1* lacking *ApL1*, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology*. **126**:883-889.
- Gaff, D.F. (1971). Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. *Science*. **174**: 1033-1034.
- Gaff D. (1996). Tobacco- plant desiccation tolerance. *Nature*. **382**:502.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbial and molecular biology reviews*. **62** (2):334-361.
- Gancedo, C. and Flores C.L. (2004). The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeast and fungi. *FEMS Yeast Research*. **4**: 351-359.
- Garg, A.K., Kim, J.K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V. and Wu, R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*. **99** (25): 15898-15903.
- Goddijn, O.J.M., Verwoerd, T.C., Voogd, E., Krutwagen, R.W.H.H., de Graaf, P.T.H.M., Poels, J., van Dun, K., Ponstein, A.S., Damm, B. and Pen, J. (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology*. **113**: 181-190.
- Goddijn, O. and Smeekens, S. (1998). Sensing trehalose biosynthesis in plants. *The Plant Journal*. **14** (2):143-146.

- Goddijn, O.J.M. and van Dun, K. (1999). Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*. **4** (8):315-319.
- Godt, D.E., Riegel, A. and Roitsch, T. (1995). Regulation of sucrose synthase expression in *Chenopodium rubrum*: characterization of sugar induced expression in photoautotrophic suspension in plants. *Plant Physiology*. **146**:231-238.
- Graham, I.A., Denby, K.J. and Leaver, C.J. (1994). Carbon catabolite repression regulates glyoxylate gene expression in cucumber. *Plant Cell*. **6**:761-772.
- Guo, N., Puhlev, I., Brown, D.R., Mansbridge, J. and Levine, F. (2000). Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nature Biotechnology*. **18**:168-171.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem*. **74** (7): 1263-1269.
- Hilgarth, C., Sauer, N. and Tanner, W. (1991). Glucose increase the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase genes in *Chorella*. *Journal of Biochemical Chemistry*. **266**: 24044-24047.
- Hohmann, S., Huse, K., Valentin, E., Mbonyi, E., Thevelein, J.M. and Zimmermann, F.K. (1992). Glucose-induced regulatory defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *byp1* growth initiation mutant and identification of *MIG1* as a partial suppressor. *J. Bacteriology*. **174**: 4183-4188.
- Hohmann, S., Neves, M.J., de Koning, W., Alijo, R., Ramos, J. and Thevelein, J.M. (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. *Current Genetics*. **23**:281-289.
- Hohmann, S., Bell, W., Neves, M.J., Valckx, D. and Thevelein J.M. (1996). Evidence for trehalose-6-phosphate-dependent and -independent mechanisms in the control of sugar influx into yeast glycolysis. *Molecular Microbiology*. **20** (5): 981-991.
- Holmström, K.O., Mäntylä, E., Welin, B., Mandal, A. and Palva, E.T. (1996). Drought tolerance in tobacco. *Nature*. **379**:683-684.
- Horlacher, R. and Boss, W. (1997). Characterization of *TreR*, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system. *The Journal of Biological Chemistry*. **272** (20): 13026-13032.
- Hottiger, T., Schmutz, P. and Wiemken, A. (1987). Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. **169** (12): 5518-5222.
- Hottiger, T., De Virgilio C., Hall, N.M., Boller, T. and Wiemken, A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological

- concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins *in vitro*. FEBS. **219**: 187-193.
- Hounsa, Ch.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. and Prior, B.A. (1988). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. Microbiology. **144**: 671-680.
- Huijser, C. Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E. and Smeekens, S. (2000). The *Arabidopsis* SUCROSE UNCOUPLE-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: involvement of abscisic acid in sugar responses. The plant Journal. **23**:577-585.
- Jang, J.C., and Sheen, J. (1994). Sugar sensing in higher plants. Plant Cell. **6**:1665-1679.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L. and Sheen, P. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell. **9**:5-19.
- Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. TIG. **15** (1): 29-33.
- Khemelenina, V.N., Kalyuzhnaya, M.G., Sakharovsky, V.G., Suzina, N.E. and Trotsenko, Y.A. (1999). Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. Arch. Microbiology. **172**:321-329.
- Koch, K.E. (1996). Carbohydrate-modulate gene expression in plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. **47**:509-540.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current in plant biology. **7**:235-246.
- Krapp. A., Hofmann, B., Schafer, C. and Stitt, M. (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the sink regulation of photosynthesis. Plant Journal. **3**:817-828.
- Laby, R.J., Kincaid, N.S., Kim, D. and Gibson, S. (2000). The *Arabidopsis* sugar insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and responses. The Plant Journal. **23**:587-596.
- León, P. and Sheen, J. (2003). Sugar and hormone connections. Trends in Plant Science. **8** (3): 110-116.
- Leyman, B., Van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (2001). An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. TRENDS in Plant Science. **6** (11): 510-513.
- Leyman, B., Avonce, N., Ramon, M., Van Dijck, P., Thevelein, J.M. & Iturriaga, G. (2004). "A new selection marker for plant transformation". Methods in Molecular Biology, **267**:385-96.

- Leyman, B., Avonce, N., Ramon, M., Van Dijck, P., Iturriaga, G. and Thevelein, J.M. (2005). Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. Manuscrito en preparación.
- Lunn, J. E. (2002). Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiology*. **128**:1490-1500.
- Madigan, M.T., and Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol*. **2**:265-269.
- Martin, T., Hellman, H., Schmidt, R., Willmitzer, L. and Frommer, W.B. (1997). Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant Journal*. **11**:53-62.
- Mascorro-Gallardo, J.O., Covarrubias, A.A. and Gaxiola, R. (1996). Construction of a *CUP1* promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **172**:169-170.
- McMullan, G., Christie, J.M., Rahman, T.J., Banat, I.M., Ternan, N.G., Marchant, R.(2004). Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Gaobacillus*. *Biochem Soc Transactions*. **32**:214-217.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H. Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J. (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*. **300**: 332-336.
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotellet, V., Harthill, J., Morrice, N.n Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. and MacKintosh C. (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. **18**(1):1-12.
- Müller, J., Wiemken, A. and Aeschbacher, R. (1999). Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Science*. **147**:37-47.
- Müller, J., Aeschbacher, R.A., Winkler, A., Boller, T. and Wiemken, A. (2001). Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **125**:1086-1093.
- Navon, G., Shulman, R.G., Yamane, T., Eccleshal, T.R., Lam, K.B., Baronofsky, J.J. and Marmor, J. (1979). Phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies of wild-type and glycolytic pathway mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. **18**:4487-4499.
- Neves, M.J., Terenzi, H.F., Leone, F.A. and Jorge, J.A. (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.
- Neves, M.J., Hohmann, S. Bell, W., Dumortier, F., Luyten, K., Ramos, J., Cobbaert, P., de Koning, W., Kaneza, Z. and Thevelein, J.M. (1995). Control of glucose influx into

- glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Current Genetics*. **27**: 110-122.
- Niu, X., Helentjaris, T. and Bate, N.J. (2002). Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *The Plant cell*. **14**:2565-2575.
- Paul, M., Pellny, T. and Goddijn, O. (2001). Enhancing photosynthesis with sugar signals. *TRENDS in Plant Science*. **6** (5): 197-200.
- Pego, J.V., Weisbeek, P.J. and Smeekens, S.C.M. (1999). Mannose inhibits arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology*. **119**:1017-1023.
- Penna, S. (2003). Building stress tolerance thought over-producing trehalose in transgenic plants. *TRENDS in plant Science*. **8** (8): 355-357.
- Pilon Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Kim, H., Zayed, A., Hwang, S., van Dun, K., Voogd, E., Verwoerd, T., Krutwagen, R.W. and Goddijn, O.J.M. (1998). Trehalose producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant Physiol*. **152**:525-532.
- Price, J., Laxmi, A., St, Martin, S. and Jang, J.Ch. (2004). Global transcriptional profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis. *Plant Cell*. **16**:2128-2150.
- Puhlev, I., Guo, N., Brown, D.R. and Levine, F. (2001). Desiccation tolerance in human cells. *Cryobiology*. **42**:207-217.
- Qu, Q., Lee, S.J. and Boss, W. (2004). TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of Biochemical Chemistry*. **279**(46):47890-47897.
- Richards, A.B., Krakowka, S., Dexter, L.B. Schmid, H., Wolterbeek, A.P.M., Waalkens-Berendsen, D.H., Shigoyuki, A. and Kurimoto, M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology*. **40**: 871-898.
- Roitsch, T., Bittner, M. and Godt. (1995). Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*. **108**:285-294.
- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*. **2**:198-206.
- Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J.M. (2001). Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences*. **26** (5):310-317.
- Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*. S185-S205.

- Romero, C., Bellés, J.M., Vayá, J.L., Serrano, R., Culiañez-Macia, F.A. (1997). Expresión of the yeast *trehalose-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*. **201**:293-297.
- Rontein, D., Basset, G. and Hanson, A.D. (2002). Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering*. **4**: 49-56.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C. and Bevan, M.W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *The Plant Journal*. **26** (4): 421-433.
- Roser, B. (1991). Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science and Technology*. **2**: 166-169.
- Salerno, G.L. and Curatti, L. (2003). Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why. *TRENDS in Plant Science*. **8** (2):63-69.
- Sasai-Takedatsu, M., Taketani, S., Nagata, N., Furukawa, T., Tokunaga, R., Kojima, T. and Kobayashi, Y. (1996). Human trehalase: characterization, localization, and its increase in urine by renal proximal tubular damage. *Nephron*. **73**: 179-185.
- Schiraldi, Ch., Di Lernia, I. and De Rosa M. (2002). Trehalose production: exploiting novel approaches. *TRENDS in Biotech*. **20** (10): 420-425.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeeckens, S. and Paul, M. (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academic of Science (PNAS)*. **100** (11): 6849-6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B. and Paul, M. (2004). Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiology*. **135**: 1-12.
- Seo, H.S. Koo, Y.J., Lim, J.Y. Song, J.T., Kim, C.H. Kim, J.K. Lee, J.S. and Choi, Y.D. (2000). Characterization of a Bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66** (6):2484-2490.
- Sheen, J., Zhou, L. and Jang, J.Ch. (1999). Sugars as signaling molecules. *Current opinion in plant biology*. **2**:410-418.
- Singer, MA and Lindquist, S. (1988). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *TIBTECH*, Nov. **16** (11): 460-468.
- Smeeckens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**:49-81.

- Söderman, E.M., Brocard, I.M., Lynch, T.J. and Finkelstein, R.R. (2000). Regulation and function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signalling networks. *Plant Physiology*. **124**: 1752-1765.
- Streeter, J.G. and Bhagwat A. (1999). Biosynthesis of trehalose from maltooligosaccharides in Rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **45**:716-721.
- Strøm, A.R. and Kaasen I. (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular Microbiology*. **8** (2):205-210.
- Suzuki, Y. and Gojobori, T. (1999). A method for detecting positive selection at single amino acid sites. *Mol. Biol. Evol.* **16** (10): 1315-1328.
- Thaller, M.C., Schippa, S. and Rosilini, G.M. (1998). Conserved sequence motifs among bacterial, eukaryotic, and archaeal phosphatases that define a new phosphohydrolase superfamily. *Protein Science*. **7**: 1647-1652.
- Thevelein, J.M. (1984). Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* **48**: 42-59.
- Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995). Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *TIBS* **20**:3-10.
- Thevelein, J.M., Leyman, B., Van Dijck, P., Avonce, N., Iturriaga, G. (2001). "Transgenic plant production". International patent filed in UK (No GB0100105.6/K1932-PCT).
- Treitel, M.A. and Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:3132-3136.
- Unemura, T., Perata, P., Futsuhara, Y. And Yamaguchi, J. (1998). Sugar sensing and α -amylase gene repression in rice embryos. *Planta*. **204**:420-428.
- Van Aelst, L., Hohmann, S., Bulaya, B., de Koning, W., Sierkstra, L., Neves, M.J., Luyten, K., Alijo, R., Ramos, J., Coccetti, P., Martegani, E., de Magalhães-Rocha M., Lopes R.B., Van Dijck, P., Vanhalewyn, M., Durnez, P., Jans, A.W.H. and Thevelein, J.M. (1993). Molecular cloning of a gene involved in glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. **8** (5): 927-943.
- Van Dijck, P., Mascorro-Gallardo, J.O., de Bus, M., Royackers, K., Iturriaga, G. And Thevelein, J.M. (2002). Truncation of Arabidopsis thaliana and Selaginella lepidophylla trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast. *Biochemical Journal*. **366**:63-71.
- Van de Poll, K., Kerkenaar, A. and Schamhart, D.H.J. (1974). Isolation of a regulatory mutant of fructose-1,6-diphosphatase in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriology*. **117**: 965-970.

- Van Vaeck, Ch., Wera, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (2001). Analysis and modification of trehalose 6-phosphate levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with the use of *Bacillus subtilis* phosphotrehalase. *Biochemical Journal*. **353**: 157-162.
- Vogel, G., Aeschbacher, Muller, J., Boller, T. and Wiemken, A. (1998). Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *The Plant Journal*. **13** (5):673-683.
- Vogel, G., Fiehn, O., Bressel, L.J.R., Boller, T. Wiemken, A., Aeschbacher, R.A. and Winkler, A. (2001) Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *Journal of Experimental Botany*. **52** (362):1817-1826.
- Wannet, W.J.B., Op den Camp, H.J.M., Wisselink, H.W., van der Drift, C. Van Griensven, L.J.L.D., and Vogels, G.D. (1998). Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochemical and Biophysical Acta*. **1425**:177-188.
- Weisburd, S. (1988). Death-Defying Dehydration" *Science News* Feb. **13**: 107-110.
- Winkler, A., Fritzius, T., Wiemken, A., Boller, T. and Aeschbacher, R.A. (2000). Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *Apl3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **124**:105-114.
- Woods, A, Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M. and Carling, D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates Acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *J. Biol. Chem*. **269**: 19509-19515.
- Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J.Ch. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*. **44**:451-461.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. **217**:1214-1222.
- Yeo, E.T., Kwon, H.B., Han, S.E., Lee, J.T., Ryu, J.C. and Byun M.O. (2000). Genetic engineering of drought resistance potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*. **10** (3):263-268.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, Ch., Gaxiola, R., Covarrubias, A.A., Nieto-Sotelo, J., Thevelein, J.M. and Iturriaga, G. (1998). A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiology*. **199**:1473-1482.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology*. **136**: 2621-2632.

INDICE DE TABLAS

Página

| | |
|--|-------|
| Tabla I. Complementación de las mutantes <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> y <i>tps1Δ-tps2Δ</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con tres construcciones quiméricas. | 44 |
| Tabla II. Contenido de trehalosa en las mutantes <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> y <i>tps1Δ-tps2Δ</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y controles transformados con pSAL4::ScTPS1/ ScTPS. | 49 |
| Tabla III. Actividad enzimática determinada en las mutantes <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> y <i>tps1Δ-tps2Δ</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y controles transformados con pSAL4::ScTPS1/ScTPS. | 50 |
| Tabla IV. Listado de las secuencias de síntesis de trehalosa detectadas en los genomas totalmente secuenciados. | 61-62 |

INDICE DE FIGURAS

Página

| | |
|---|-------|
| Figura 1. La trehalosa esta compuesta por dos moléculas de glucosa unidas por enlaces 1 α 1 α . | 3 |
| Figura 2. Las cinco vías de síntesis y degradación de la trehalosa. | 6 |
| Figura 3. Los azúcares provocan diferentes efectos en la actividad de tejidos fuente y poza. | 15 |
| Figura 4. Diseño de fusiones quiméricas TPS/TPP. | 42 |
| Figura 5. Construcciones quiméricas en el vector pSal4. | 43 |
| Figura 6. Complementación para crecer en glucosa de las mutantes <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> y <i>tps1Δ-tps2Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> . | 46 |
| Figura 7. Complementación para crecer a 38.5 °C de las mutantes <i>tps1Δ</i> , <i>tps2Δ</i> y <i>tps1Δ-tps2Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> . | 47 |
| Figura 8. Distribución de las proteínas de síntesis de trehalosa en la naturaleza. | 59 |
| Figura 9. Alineamiento múltiple de dominios TPS. | 63-67 |
| Figura 10. Filogenia del dominio TPS. | 68 |

| | |
|---|-------|
| Figura 11. Conservación del sitio activo del dominio TPS. | 71 |
| Figura 12. Relación filogenética entre los dominios TPS y TPP. | 74 |
| Figura 13. Alineamiento múltiple de los dominios TPP. | 75-77 |
| Figura 14. Filogenia del dominio TPP. | 78 |
| Figura 15. Conservación de las regiones consenso de las proteínas fosfatasas | 80 |
| Figura 16. Relación filogenética entre los dominios TPP y TPS. | 82 |
| Figura 17. Proporción de sustituciones sinónimas y no sinónimas en los dominios TPS y TPP. | 84 |
| Figura 18. Expresión de los genes TPS y de la trehalasa durante el ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i> . | 87 |
| Figura 19. Expresión de los genes TPS y de la trehalasa en los diferentes órganos de <i>Arabidopsis thaliana</i> . | 88 |
| Figura 20. Modelo de las interacciones regulatorias propuestas entre glucosa <i>HXK1</i> , <i>TPS1</i> y <i>ABI4</i> . | 95 |
| Figura 21. Papel del metabolismo de trehalosa 6-fosfato en plantas. | 98 |

ABREVIATURAS EMPLEADAS

| | |
|-------------------|---|
| 3-O-mGlc | 3-O-metil glucosa |
| 6-dGlc | 6-deoxi glucosa |
| aa | Aminoácidos |
| ABA | Ácido abscísico |
| ABI4 | Mutante insensible a ABA |
| <i>adg2-1</i> | Mutante en ADPG-pirofosforilasa |
| ADH | Alcohol deshidrogenasa |
| AGPasa | ADP-glucosa pirofosforilasa |
| APL1 y 3 | Genes codificantes para subunidades mayores de AGPasa |
| AtEM1 | Proteína LEA |
| AtEm6 | Proteína LEA |
| AtHXK1 | Hexocinasa 1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| AtTPPB | Trehalosa 6-fosfato fosfatasa B de <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| AtTPS1-11 | Trehalosa 6-fosfato sintasa (1-11) de <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| <i>byp1</i> | Mutante ScTPS1 |
| CAB | Proteína de unión a clorofila a/b |
| CaCl ₂ | Cloruro de calcio |
| <i>cai</i> | Mutante insensible a carbohidratos |
| <i>cif1</i> | Mutante ScTPS1 |
| CuSO ₄ | Sulfato de cobre |
| dS | Substituciones sinónimas |
| dN | Substituciones no sinónimas |
| <i>fdp1</i> | Mutante ScTPS1 |
| <i>gin</i> | Mutantes insensibles a glucosa |
| <i>gin6</i> | Mutante en el gen ABI4 |
| <i>glc6</i> | Mutante ScTPS1 |
| GLK | Glucocinasa |

| | |
|---------------------------------|--|
| <i>Glo</i> | Mutantes hipersensibles a glucosa |
| HXK | Hexocinasa |
| MIG1 | Proteína represora de levadura durante el crecimiento en glucosa |
| MTHasa | Enzima maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa |
| MTSasa | Maltooligosil trehalosa sintasa |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sodio |
| nc | Nucleótidos |
| NR | Nitrato reductasa |
| OTSA | TPS de <i>E. coli</i> |
| OTSB | TPP de <i>E. coli</i> |
| PAP140 | Proteína LEA |
| PC | Plastocianina |
| RBSC | Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa |
| ScTPS1 | Trehalosa 6-fosfato sintasa de <i>S. cerevisiae</i> |
| ScTPS2 | Trehalosa 6-fosfato fosfatasa de <i>S. cerevisiae</i> |
| ScTPS3 | Subunidad regulatoria del complejo TPS en <i>S. cerevisiae</i> |
| ScTSL1 | Subunidad regulatoria del complejo TPS en <i>S. cerevisiae</i> |
| SGal | Medio mínimo con galactosa como fuente de carbono. |
| SGlc | Medio mínimo con galactosa como fuente de carbono. |
| SLAC | Single Likelihood Ancestor Counting |
| SMART | Simple Modular Architecture Research Tool |
| SNF1 | Proteína cinasa de serina/ treonina |
| SPP | Sacarosa fosfato fosfatasa |
| SPS | Sacarosa fosfato sintasa |
| T6P | Trehalosa 6-fosfato |
| TPP | Trehalosa 6-fosfato fosfatasa |
| TPS | Trehalosa 6-fosfato sintasa |
| <i>tps1-1</i> | mutante TPS en <i>A. thaliana</i> |
| <i>tps1Δ</i> | Mutante TPS en <i>S. cerevisiae</i> |
| <i>tps2Δ</i> | Mutante TPP en <i>S. cerevisiae</i> |
| TREC | Trehalosa 6-fosfato hidrolasa. |

| | |
|----------------------------|---|
| TREH | Trehalasa. |
| TREPHOS | Trehalosa fosforilasa. |
| COG | Cluster Orthologous Groups |
| TRET | Trehalosa glicosiltransferasa sintasa |
| TREY | Maltooligosil trehalosa sintasa |
| TREZ | Maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa |
| TS | Trehalosa sintasa |
| Val A | Validamicina A |
| YHXKII | Hexocinasa de <i>S. cerevisiae</i> |
| Δ NA α TPS1 | Delección amino terminal en el gen AtTPS1 |
| Δ NSITPS Δ C | Delección amino y carboxilo terminal en el gen AtTPS1 |