



Protein Structure and Regulation of the *TPS1* Gene of *Yarrowia lipolytica*

Estructura proteica y regulación del gen *TPS1* de *Yarrowia lipolytica*

Ana Fernanda Morales-Sibrian, José David Reyes-Ortiz^{ID}, Didiana Gálvez-López^{ID}, José Alfredo Vázquez-Ovando^{ID}, Raymundo Rosas-Quijano*^{ID}

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Boulevard Príncipe Akishino s/n. Tapachula, 30798, Chiapas, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: raymundo.rosas@unach.mx (R. Rosas-Quijano)

Article history:

Received: 16 April 2026 / Received in revised form: 15 July 2026 / Accepted: 20 August 2026 / Published online: 28 August 2026.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2026.11.3.26-46>

ABSTRACT

Microbial thermostability is fundamental in biotechnology, as high temperatures reduce cell growth and metabolic efficiency. *Yarrowia lipolytica* is a yeast of biotechnological interest due to its ability to produce metabolites of industrial value; however, its growth is limited at temperatures above 32 °C. In response to stress, *Y. lipolytica* accumulates trehalose, a protective disaccharide synthesized by trehalose-6-phosphate synthase (TPS1). Understanding the structure and regulation of the *TPS1* gene provides insight into elements associated with high-temperature tolerance, which are key for genetic engineering strategies. The bioinformatic analysis of the *TPS1* gene and protein in *Y. lipolytica* revealed a simple organization without introns and transcriptional regulation dependent on stress-related cis-motifs, including HSE, STRE, GC-box, and TATA box. The tertiary structure showed high conservation of essential catalytic domains, including GT-20, DXD, and HXH, and of key residues, confirming its central role in trehalose synthesis and the importance of the active site for catalysis, stability, and thermal stress tolerance. We conclude that the *TPS1* gene of *Y. lipolytica* is distinguished by its structural and regulatory efficiency under heat stress.

Keywords: DXD and HXH motifs, GT-20 domain, *TPS1* gene, trehalose-6-phosphate synthase, thermotolerance.

RESUMEN

La termoestabilidad microbiana es fundamental en la biotecnología, ya que las altas temperaturas reducen el crecimiento celular y la eficiencia metabólica. *Yarrowia lipolytica* es una levadura de interés biotecnológico por su capacidad para producir metabolitos de valor industrial; sin embargo, su crecimiento se ve limitado a temperaturas superiores a 32 °C. En respuesta al estrés, *Y. lipolytica* acumula trehalosa, un disacárido protector sintetizado por la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1). El conocimiento de la estructura y la regulación del gen *TPS1* permitirá identificar elementos asociados a la tolerancia a altas temperaturas, claves para estrategias de ingeniería genética. El análisis bioinformático del gen y de la proteína *TPS1* de *Y. lipolytica* reveló que existe una organización simple, sin intrones, con regulación transcripcional dependiente de los motivos cis asociados al estrés: HSE, STRE, GC-box y TATA. La estructura terciaria mostró alta conservación de los dominios catalíticos esenciales GT-20, DXD, HXH y de residuos clave, confirmando su papel central en la síntesis de trehalosa y la importancia del sitio activo para la catálisis, la tolerancia al estrés térmico. Concluimos que el gen *TPS1* de *Y. lipolytica* se distingue por su eficiencia estructural y regulatoria frente al estrés térmico.

Palabras clave: Dominio GT-20, Gen *TPS1*, motivos DXD y HXH, termotolerancia, trehalosa-6-fosfato-sintasa.

1. Introducción

La termoestabilidad de los sistemas biológicos es una necesidad en la producción de compuestos químicos, combustibles, alimentos y productos farmacéuticos, ya que los microorganismos son sometidos a constantes cambios de temperatura, provocando que el crecimiento y la actividad metabólica disminuyan y se reduzca la eficiencia global (Li *et al.*, 2024). Por tanto, la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo empleado es un punto crítico (Satomura *et al.*, 2013; Mahajan *et al.*, 2020). Para mantener la actividad metabólica y mejorar la eficiencia en la producción industrial se requieren microorganismos tolerantes a diferentes factores estresantes, como las altas temperaturas (Li *et al.*, 2024). Ante un estrés térmico los microorganismos responden mediante una estrategia integral conocida por sus siglas en inglés como *heat stress response* (HSR) que consiste en la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs) y la de metabolitos protectores como la trehalosa (α -D-glucopiranosil-[1,1]- α -D-glucopiranosido), un disacárido no reductor que funciona como fuente de carbono en una variedad de organismos (Deparis *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2024). Las enzimas encargadas de la síntesis de trehalosa se encuentran codificadas por los genes *Trehalose 6-phosphate Synthase* (*TPS1* o *TPS*) y *Trehalose 6-phosphate Phosphatase* (*TPP* o *TPS2*) (Fan *et al.*, 2024). La trehalosa se sintetiza en dos pasos, primero *TPS1* cataliza la síntesis de trehalosa-6-fosfato (T6P) a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, mientras que *TPS2* desfosforila a T6P para generar trehalosa libre (Fan *et al.*, 2024). Las dos enzimas que catalizan la síntesis forman un complejo en el que participan otras dos proteínas, *TSI1* y *TPS3*, que están implicadas en la estabilidad del complejo (Bell *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2022).

La trehalosa previene la desnaturalización proteica, protege la membrana plasmática y suprime la agregación de proteínas desnaturalizadas durante condiciones de estrés (Magalhães *et al.*, 2018; Sevriev *et al.*, 2024), actuando como inductor de la HSR (Sethi *et al.*, 2018). Esta respuesta metabólica es más rápida en levaduras en comparación con las bacterias (Vanaporn *et al.*, 2020).

Y. lipolytica es una levadura ampliamente utilizada, debido a su capacidad de producir grandes cantidades intracelulares de proteínas, alcoholes, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y terpenoides que poseen alto valor industrial y comercial (Park y Ledesma, 2023). Es considerada una levadura generalmente reconocida como segura (GRAS) (Timoumi *et al.*, 2018) y es capaz de adaptarse a cambios ambientales de pH y salinidad, mediante ajustes proteómicos que afectan el plegamiento de proteínas, la pared celular y vías antioxidantes, además, puede crecer en sustratos de bajo costo y producir una gran cantidad de biomasa, haciendo que esta levadura sea una de las más prospectivas para uso biotecnológico (Sekova *et al.*, 2021). Sin embargo, no es capaz de crecer a temperaturas superiores a 32 °C (Gálvez *et al.*, 2019); como respuesta al incremento en la temperatura, *Y. lipolytica* regula la transcripción de proteínas de choque térmico (HSPs) y la acumulación de trehalosa (Deparis *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que la disrupción del gen *TPS1* en *Y. lipolytica* impide el crecimiento bajo estrés térmico; mientras que, en cepas silvestres, la acumulación de trehalosa aumenta significativamente en respuesta al calor (Flores *et al.*, 2011). Esto confirma el papel central del gen *TPS1* en la tolerancia al estrés térmico.

Por otra parte, desde el punto de vista estructural, se ha encontrado que en otros microorganismos como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, *TPS1* pertenece a la familia de glicosiltransferasas GT-20 y conserva motivos catalíticos esenciales como DXD y HXH, que participan en la coordinación de iones divalentes y en la correcta orientación del sustrato durante la catálisis; estos motivos se ubican en un pliegue α/β repetitivo de tipo Rossman, que conforma el sitio catalítico encargado de la unión del UDP-glucosa y asegura la funcionalidad enzimática (Miao *et al.*, 2017). En ese mismo estudio, se evaluó la importancia de residuos específicos mediante mutagénesis puntual: D379, K285 y E387, cuya sustitución eliminó completamente la actividad enzimática a 37 °C, mientras que la mutación Y89 también redujo la actividad, aunque en menor medida. A 42 °C, incluso el mutante Y89 mostró sensibilidad térmica, evidenciando que la integridad de estos residuos es crítica tanto para la catálisis como para la tolerancia a altas temperaturas (Miao *et al.*, 2017). En plantas como *Populus deltoides*, *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, se han reportado dominios TPS (N-terminal) con los mismos motivos DXD y HXH, mientras que el dominio TPP (C-terminal) no resultó funcional (Yan *et al.*, 2023). Estos resultados sugieren que la expresión de *TPS1* es regulada directamente por el estrés térmico y que sus dominios catalíticos y pliegues Rossman son conservados entre hongos y plantas (Miao *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2025).

El interés en la vía de biosíntesis de trehalosa y en la regulación de *TPS1* se debe a su papel esencial en la termotolerancia de muchos microorganismos. Para abordar esta problemática, se han empleado técnicas bioinformáticas como el análisis estructural de la proteína, que permiten predecir la función de la proteína, así como identificar regiones

reguladoras en promotores génicos (Miao *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2025). De acuerdo con lo anterior, los dominios conservados de TPS1 son esenciales para la acumulación de trehalosa bajo estrés (Rodríguez-Castillejos, 2023). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar la regulación del gen *TPS1* y la estructura proteica de TPS1 a través de herramientas bioinformáticas, con el fin de comprender su papel en la tolerancia al estrés térmico en *Y. lipolytica*.

2. Materiales y métodos

2.1. Análisis bioinformático de los genes *TPS1*

Se llevó a cabo la búsqueda del gen *TPS1* en *Y. lipolytica* con la base de datos del GenBank del NCBI usando el genoma completo de *Y. lipolytica* (número de acceso (GCF_001761485.1) que fue descargado en formato FASTA desde el repositorio NCBI Genome (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000002525.2/). Para determinar la secuencia proteica codificada por el gen *TPS1*, se empleó la herramienta BLAST, versión 2.13.0+, mediante la función tblastn, aplicando un valor de corte (e-value) de 1e-5 para la detección de alineamientos significativos (Camacho *et al.*, 2009) empleando el algoritmo tblastn con un valor de corte (e-value) de 1e-5. Como secuencias de consulta se utilizaron las proteínas TPS1 de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales fueron recuperadas de la base de datos de GenBank.

2.2. Análisis de la estructura génica

La estructura primaria del gen *TPS1* se determinó a partir de la anotación genómica disponible en NCBI, identificando su estructura exón-intrón y las regiones no traducidas UTR 5' y UTR 3'. La representación gráfica fue construida con el software de análisis bioinformático GSDS (Gene Structure Display Server) (Hu *et al.*, 2015).

2.3. Identificación de los motivos y dominios conservados

Se analizaron las secuencias aminoacídicas de TPS1 provenientes de organismos representativos de distintos linajes evolutivos, con el objetivo de evaluar la conservación de dominios y motivos proteicos. La identificación de motivos conservados se realizó mediante la herramienta en línea Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (MEME, <http://meme-suite.org>) (Bailey *et al.*, 2015). El análisis de dominios funcionales se llevó a cabo utilizando la herramienta de anotación funcional InterPro (Blum *et al.*, 2021). Los parámetros de agrupación de la proteína TPS1 se establecieron mediante la identificación de dominios altamente conservados (Li *et al.*, 2024).

2.4. Identificación de elementos cis-reguladores en regiones promotoras

Para la identificación de la región promotora, se extrajo una secuencia de 1000 pares de bases (pb) río arriba del sitio de inicio de transcripción (TSS). La secuencia fue importada al software SnapGene (versión 7.0.2, Insightful Science, EE. UU.) para su visualización y anotación. Se delimitaron regiones regulatorias putativas mediante la búsqueda de

elementos conservados, como la caja TATA y secuencias ricas en GC, empleando la herramienta “Find Pattern” del programa con expresiones regulares basadas en consensos descritos para levaduras. La secuencia delimitada fue exportada en formato FASTA para el análisis de motivos de unión a factores de transcripción (TFBS) con la herramienta FIMO (MEME Suite, versión 5.5.5) (Grant *et al.*, 2011), utilizando matrices de posición de la base de datos JASPAR (colección de levaduras) y considerando un umbral de significancia de $p < 1e-4$ para la detección de sitios de unión a factores de transcripción (Mathelier *et al.*, 2014). FIMO proporciona únicamente la posición y la significancia estadística de los posibles TFBS, por lo que los resultados obtenidos se anotaron posteriormente en SnapGene, agregando cada motivo en su posición exacta sobre la secuencia para generar la representación visual completa de la región promotora.

2.5. Dendrograma de homología de las proteínas codificadas por el gen *TPS1*

Para analizar las relaciones de similitud entre las secuencias proteicas, se construyó un dendrograma de homología mediante un enfoque de agrupamiento jerárquico. Se seleccionaron secuencias codificadas por el gen *TPS1* provenientes de diferentes especies de hongos y levaduras, con el fin de evaluar la conservación de la proteína y las relaciones evolutivas entre taxones cercanos y distantes. En primer lugar, se recopilaron las secuencias de interés en formato FASTA y se alinearon utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar 2004) y ClustalW del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 11 (Tamura *et al.*, 2021) para garantizar una alineación múltiple precisa y consistente. Se aplicó el método de agrupamiento jerárquico Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) para construir el dendrograma de similitud con un soporte estadístico de 1000 Bootstraps. El dendrograma resultante fue visualizado y editado para anotar los clústeres con alta similitud y mejorar la legibilidad del gráfico.

2.6. Visualización de la estructura de la proteína *TPS1*

Se utilizó el modelo tridimensional de la proteína *TPS1* de *Y. lipolytica* (UniProt ID: O74932), obtenido mediante modelado por homología a través de la plataforma SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Para la selección del modelo se consideraron las plantillas estructurales con el mayor porcentaje de identidad de secuencia y cobertura, así como un índice de calidad global del modelo (GMQE) cercano a 1, lo que indica una alta confiabilidad en la predicción estructural (Waterhouse *et al.*, 2018).

Posteriormente, el modelo seleccionado fue analizado mediante visualización tridimensional en PyMOL v4.6 con el fin de identificar y caracterizar sus principales elementos estructurales, incluyendo dominios conservados, motivos estructurales y el sitio activo. Así mismo, se emplearon diferentes representaciones moleculares para facilitar la identificación de las estructuras secundarias (hélices α , láminas β y bucles).

3. Resultados

3.1. Análisis bioinformático de los genes *TPS1*

El gen *TPS1* fue identificado como YALI1_E17616g correspondiente al ensamblaje ASM176148v1, con una longitud de 1410 pb. En *S. cerevisiae* el gen *TPS1* se localizó en el cromosoma II, que posee una longitud de 1488 pb. En *A. niger* (número de acceso NT_166524.1) se identificaron dos copias del gen *TPS1*, registradas con diferentes números de acceso en las bases de datos genómicas. Ambas copias presentaron un 100 % de identidad en la región codificante (CDS) y codifican proteínas con secuencias de aminoácidos idénticas. Estos genes han sido previamente reportados por Pel *et al.* (2007) como *tpsA* y *tpsB*.

Respecto a la orientación de las secuencias, el gen *TPS1* se encontró en la hebra positiva del ADN genómico en *Y. lipolytica* y *A. niger*, mientras que en *S. cerevisiae* se localizó en la hebra negativa.

3.2. Análisis de la estructura primaria del gen *TPS1*

El análisis de la estructura primaria del gen *TPS1* de *Y. lipolytica* reveló una secuencia codificante (CDS) de 1410 pb de acuerdo con la anotación genómica disponible (YALI1_E17616g), correspondiente a un marco de lectura abierto (ORF) continuo sin evidencia de intrones. La caracterización del transcrito se obtuvo mediante la comparación entre la secuencia del ARNm anotado de 1520 pb y la CDS, lo que permitió delimitar región 5' no traducida (UTR 5') de 26 pb y una región 3' no traducida (UTR 3') de 84 pb. El sitio de inicio de la transcripción (posición +1) se ubicó a 26 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). El CDS presentó una longitud de 1410 pb, correspondiente a un marco abierto de lectura (ORF) continuo, sin evidencia de intrones (Fig. 1). El transcrito completo (ARNm) mostró una longitud total de 1520 pb, compuesto por una región no traducida 5' (UTR 5') de 26 pb y una región 3' no traducida (UTR 3') de 84 pb (Fig. 1). El alineamiento entre la secuencia genómica con la secuencia de ARNm se observó una continuidad perfecta del marco de lectura abierto (ORF) y sin sitios de splicing (GT-AG) que pudiese interrumpir la secuencia codificante.

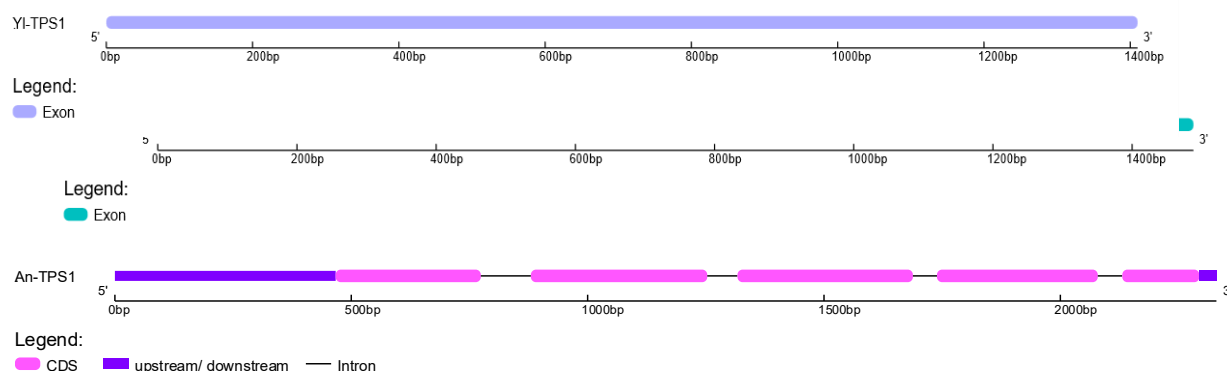


Fig. 1. Diagrama que presenta la estructura primaria de los genes *TPS1* en tres especies fúngicas.

Fig. 1. Schematic representation of the primary structure of the *TPS1* genes in three fungal species.

La comparación de los genes *TPS1* entre las tres especies fúngicas analizadas evidenció diferencias en su organización estructural, longitud total y contenido de GC (Tabla 1). En *Y. lipolytica*, el gen presentó una longitud de 1410 pb, mientras que en *S. cerevisiae* alcanzó los 1488 pb. Por su parte, *A. niger* mostró la mayor extensión con 3230 pb. Tanto en *Y. lipolytica* como en *S. cerevisiae*, el gen *TPS1* se encontró constituido por un único exón sin presencia de intrones, mientras que en *A. niger* está compuesto por cinco exones interrumpidos por cuatro intrones como se muestra en la figura 1, lo que explica su longitud mayor. En cuanto al contenido de GC en las regiones promotoras de los genes *TPS1*, los resultados mostraron que *A. niger* presentó el valor más alto de contenido GC con un 56.46%, seguido de *Y. lipolytica* con un valor intermedio de 55.73%, mientras que *S. cerevisiae* exhibió el menor contenido, con un 46% (Tabla 1).

Tabla 1. Elementos que conforman la estructura primaria de los genes *TPS1* en tres especies fúngicas.

Table 1. Structural elements of the *TPS1* genes in three fungal species.

Gen <i>TPS1</i>	Longitud (pb)		Contenido de GC (%)
	CDS + exones + intrones	mRNA	Región promotora
<i>YI-TPS1</i>	1410	1520	55.73
<i>Sc-TPS1</i>	1488	1488	46
<i>An-TPS1</i>	3230	1554	56.46

YI: *Yarrowia lipolytica*, *Sc:* *Saccharomyces cerevisiae*, *An:* *Aspergillus niger*
YI: *Yarrowia lipolytica*, *Sc:* *Saccharomyces cerevisiae*, *An:* *Aspergillus niger*

3.3. Identificación de motivos y dominios conservados de las proteínas *TPS1*

El análisis comparativo de 15 secuencias proteicas homólogas del gen *YITPS1* (Tabla 2) permitió identificar de manera consistente un dominio altamente conservado en todas las secuencias evaluadas: Trehalose-6-phosphate synthase domain (Pfam: PF00982, InterPro: IPR017853), alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming) (InterPro: IPR005835).

Se observaron ligeras variaciones en la longitud total de las proteínas y en la posición relativa del dominio identificado entre las secuencias analizadas. No obstante, dicho dominio estuvo presente en todas las proteínas evaluadas, evidenciando un alto grado de conservación estructural. Los motivos 1, 2 y 3 se localizan dentro de la región que corresponde al dominio GT-20 (Fig. 2), que sugiere su papel en la conservación de la función catalítica.

Tabla 2. Datos de la Proteína TPS1 en diferentes organismos aquí analizadas.

Table 2. Data of the TPS1 protein in the organisms analyzed in this study.

Organismo	Nombre	No. De accesoión	Longitud (aa)
<i>Candida albicans</i>	Ca-TPS1	KAL1579851.1	478
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Dh-TPS1	XP_460256.1	480
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Kl-TPS1	QEU61865.1	488
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sc-TPS1	NP_009684.1	495
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Yl-TPS1	CAA09463.1	469
<i>Pyricularia oryzae</i>	Po-TPS1	KAN0672291.1	529
<i>Fusarium graminearum</i>	Fg-TPS1	WXC66307.1	534
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Af-TPS1	KAM0101565.1	479
<i>Aspergillus niger</i>	An-TPS1	AAA21861.1	517
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Sp-TPS1	NP_594205.1	513
<i>Rhodotorula toruloides</i>	Rt-TPS1	BGP72782.1	576
<i>Malassezia furfur</i>	Mf-TPS1	KAI3628002.1	527
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cn-TPS1	AAT40476.1	670
<i>Coprinopsis cinerea</i>	Cc-TPS1	KAG2017678.1	531
<i>Sanghuangporus sanghuang</i>	Ss-TPS1	KAL5526446.1	576

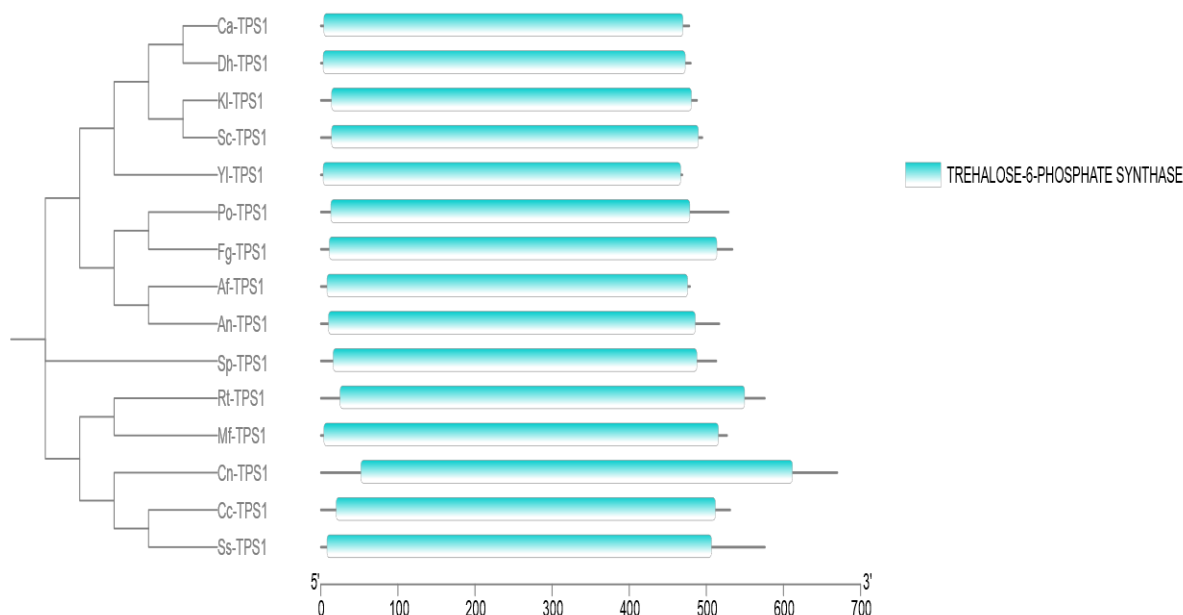


Fig. 2. Arquitectura de los dominios de las proteínas TPS1 utilizando el software Tbttools.

Fig. 2. Domain architecture of the TPS1 proteins analyzed in this study.



Fig. 3. Arquitectura de los motivos de las proteínas TPS1 aquí analizadas.

Fig. 3. Motif architecture of the TPS1 proteins analyzed in this study.

3.4. Identificación de elementos cis-reguladores del gen *TPS1*

En la región promotora del gen *TPS1* de *Y. lipolytica* se identificaron un total de 16 elementos reguladores *cis* distribuidos a lo largo de 1051 pb. Esta región comprendió aproximadamente 1000 pb de la secuencia promotora más 50 pb de la región 5'UTR.

Dentro de los elementos encontrados, los motivos HSE (Heat Shock Elements) fueron los más abundantes, con un total de 10 sitios caracterizados por las secuencias consenso GAAA y GAAG, los cuales están asociados a la respuesta a estrés térmico y a cambios en la disponibilidad de nutrientes.

Así mismo, se localizaron tres motivos STRE (Stress Response Elements), con las secuencias AGGGG, CCCCCG y GGGGA, relacionados con la respuesta general a condiciones de estrés. En la secuencia también se detectaron dos elementos GC-BOX (CGCCATGC y GGGCGGG), regiones reconocidas como sitios de unión para el factor de transcripción Sp1. Finalmente, se identificó una caja TATA, ubicada en la región proximal al sitio de inicio de transcripción, lo que confirma su papel en el anclaje de la maquinaria basal de transcripción (Fig. 4).



Fig. 4. Elementos cis-reguladores en la región promotora del gen *TPS1* de *Y. lipolytica*.

Fig. 4. Cis-regulatory elements in the promoter region of the *TPS1* gene from *Y. lipolytica*.

3.5. Dendrograma de homología de las proteínas *TPS1*

El dendrograma de homología obtenido a partir de las 15 secuencias de la *TPS1* permitió identificar diferentes clados bien definidos (Fig. 5); se muestra la organización jerárquica de las secuencias, evidenciando relaciones evolutivas entre las diferentes variantes analizadas. Las secuencias de *TPS1* se agruparon en clados concordantes con los principales linajes fúngicos. Dentro de Ascomycota se recuperaron los subfilos Saccharomycotina, integrado por las levaduras *Candida albicans*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*; Taphrinomycotina, representado por *Schizosaccharomyces pombe*; y Pezizomycotina, conformado por *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* y *Pyricularia oryzae*. Asimismo, las secuencias de Coprinopsis cinerea, Sanghuangporus sanghuang, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula toruloides* y *Malassezia furfur* se agruparon en un clado correspondiente a Basidiomycota, evidenciando la conservación evolutiva de *TPS1* dentro de cada linaje.

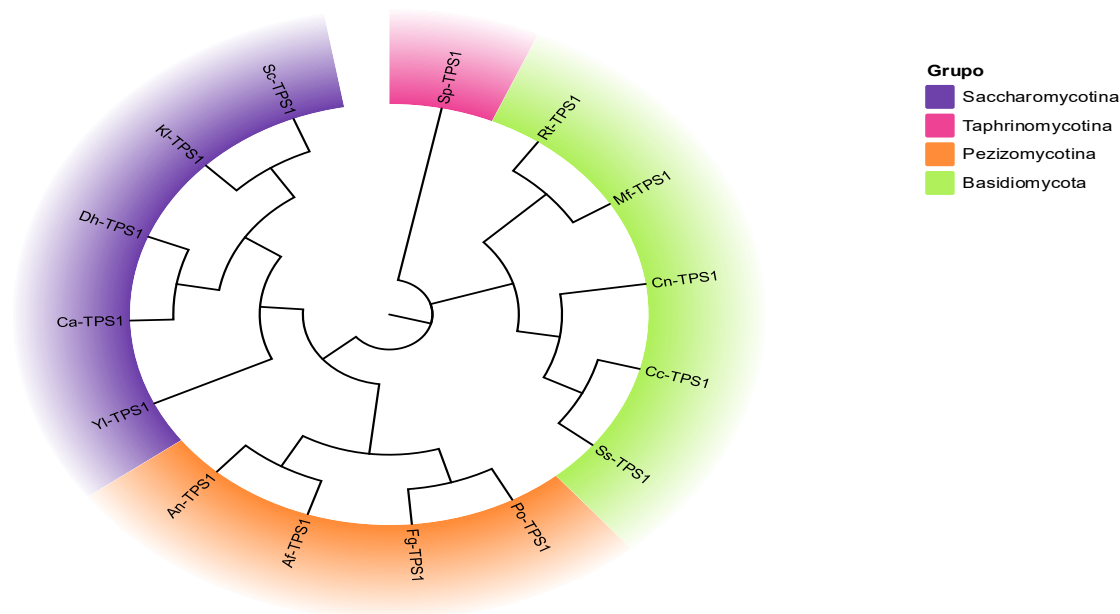


Fig. 5. Dendrograma de homología de máxima verosimilitud (1000 Bootstrap) de las proteínas TPS1.

Fig. 5. Maximum likelihood homology dendrogram (1000 bootstrap) of TPS1 proteins.

3.6. Organización estructural y motivos conservados en la proteína TPS1

El modelo tridimensional generado mediante homología de TPS1 de *Y. lipolytica* presentó una alta similitud con la estructura cristalina de α , α -trehalosa-fosfato sintasa de *S. cerevisiae* (PDB: 5HUT, 1.90 Å), con una cobertura del 99 % y una identidad de secuencia de aproximadamente 69-70 %. Se consultó el modelo de AlphaFold de UniProt pero se optó por el modelo de SWISS-MODEL porque existe mayor cobertura y mejor puntuación GMQE. La evaluación de la calidad global mostró un GMQE de 0.89 y un QMEANDisCo de 0.84 ± 0.05 , que indica que la estructura es confiable para análisis estructurales y funcionales (Fig. 6a). El modelo fue predicho como un homodímero, en concordancia con la oligomería reportada en la proteína cristalizada y depositada en la base de datos. La proteína consta de 469 aminoácidos y el modelo está disponible en la SWISS-MODEL Repository (UniProt ID: O74932), construido sobre la plantilla cristalográfica 5HUT, correspondiente a la trehalosa-6-fosfato sintasa de *S. cerevisiae*, con cobertura de residuos del 2 al 468.

Cada subunidad del dímero contiene el dominio Glycosyl Transferase family 20 (GT-20), abarcando aproximadamente los residuos 3-468 (Fig. 6a). Los lóbulos N-terminal (residuos 1-235) y C-terminal (residuos 236-469) se asignaron a regiones estructurales responsables de la unión a nucleótidos y del soporte catalítico (Fig. 6b). Los motivos DXD (residuos 79-81) y HXH (residuos 100-102) fueron identificados como sitios activos catalíticos, localizados en ambas subunidades y separados por una hélice α que garantiza la orientación espacial adecuada para la catálisis (Fig. 6d). Los pliegues Rossmann, característicos de proteínas que utilizan nucleótidos como cofactores, se localizaron en los lóbulos N- y C-terminales de cada subunidad. Estos pliegues presentan repeticiones de hélices α y láminas β

formando un motivo α - β - α , que constituye el sitio de unión para la UDP-glucosa y facilita la interacción con los motivos catalíticos (Fig. 6c).

Adicionalmente, se identificaron los residuos Y87, K284, D378 y E387, los cuales representan los equivalentes y funcionales a los residuos descritos previamente en *C. albicans* (Y89, K285, D379 y E386). Estos residuos se localizan en la región catalítica de la proteína y corresponden a posiciones conservadas y asociadas a la unión del sustrato y a la actividad enzimática (Fig. 7). Estos mismos residuos de *Y. lipolytica* y *C. albicans* son homólogos a los residuos Y89, K285, D379 y E387 de *S. cerevisiae* (PDB: 5HUT), los cuales ayudan a conservar la geometría del sitio activo.

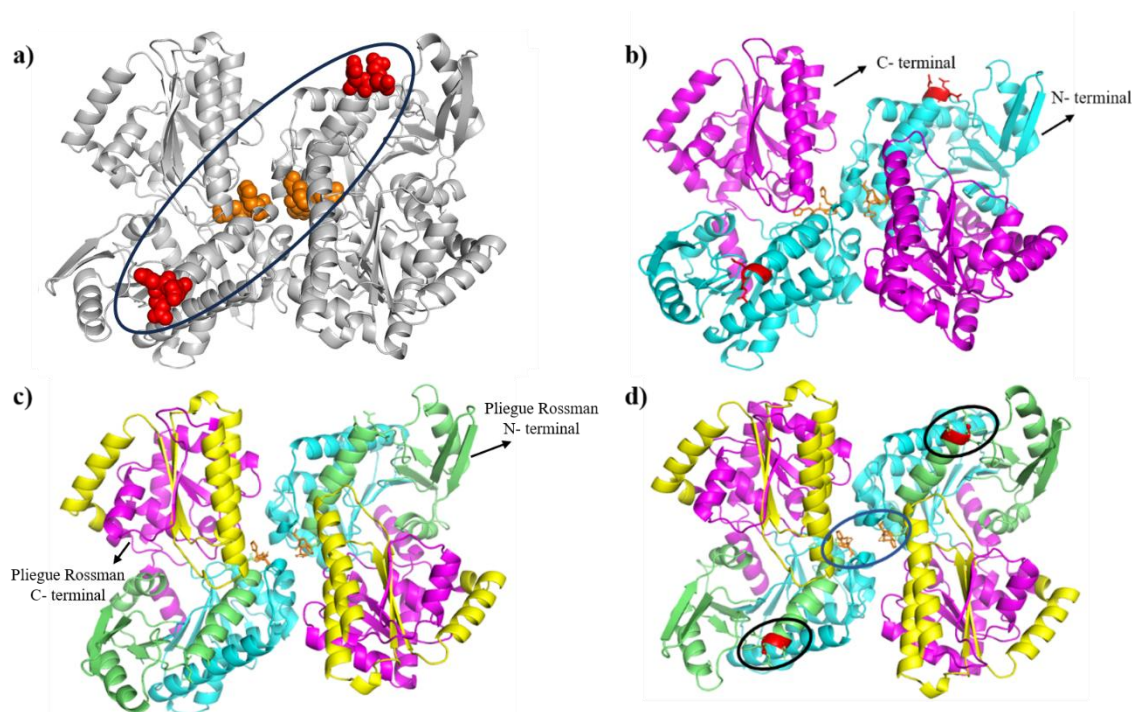


Fig. 6. Estructura cuaternaria de la proteína TPS1 de *Y. lipolytica*. Modelo general de la proteína, donde el dominio GT-20 se representa en color gris y el sitio catalítico se indica dentro del ovalo negro (a), representación de los extremos terminales, con el dominio C-terminal en color cian y el dominio N-terminal en color magenta (b), visualización de los pliegues tipo Rossmann, en la que se muestra en color lima y el pliegue C-terminal en color amarillo (c), motivos catalíticos conservados, destacando el motivo DXD (círculo negro) y el motivo HXH (círculo azul) en PYMOL (d).

Fig. 6. Quaternary structure of the *Y. lipolytica* TPS1 protein. General model of the protein, where the GT-20 domain is shown in gray and the catalytic site is indicated within the black oval (a), representation of the terminal ends, with the C-terminal domain in cyan and the N-terminal domain in magenta (b), visualization of the Rossmann-like folds, showing the N-terminal fold in lime and the C-terminal fold in yellow (c), conserved catalytic motifs, highlighting the DXD motif (black circle) and the HXH motif (blue circle) (d).

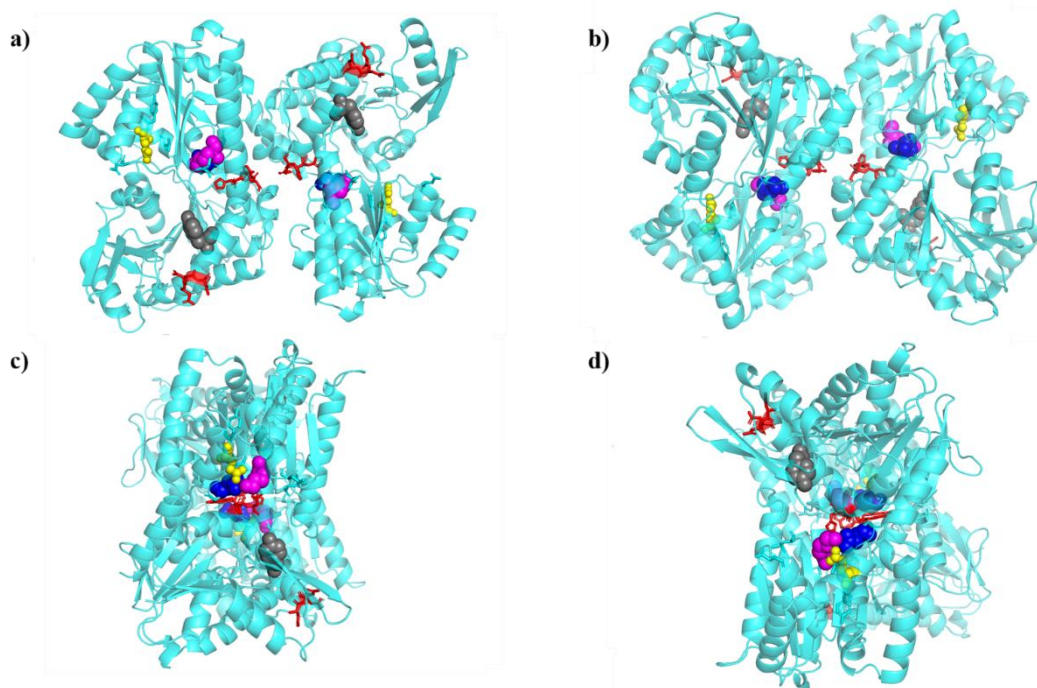


Fig. 7. Estructura cuaternaria de la proteína TPS1 de *Y. lipolytica*, se destacan los residuos funcionales Y87, K284, D378 y E387 marcados y vistos desde diferentes ángulos. Frontal (a), trasera (b), lateral izquierda (c) y lateral derecha (d). Se indica de color gris el residuo Y87, magenta residuo K284, azul residuo D378 y Amarillo E387.

Fig. 7. Quaternary structure of the *Y. lipolytica* TPS1 protein, highlighting the functional residues Y87, K284, D378, and E387, marked and viewed from different angles. Front view (a), rear view (b), left lateral view (c) and right lateral view (d). The Y87 residue is shown in gray, K284 in magenta, D378 in blue, and E387 in yellow.

4. Discusión

La organización del gen *TPS1* de *Y. lipolytica* con un único exón, refleja la estructura del subfilo *Saccharomycotina*, que en estudios previos como los de Hooks *et al.* (2014) y Hurtig *et al.* (2020); se ha demostrado que han experimentado una pérdida masiva de intrones a lo largo de la evolución de los organismos unicelulares, razón por la que la mayoría de los genes del subfilo *Saccharomycotina* carecen o presentan un solo exón. La pérdida de intrones en estas levaduras se ha atribuido a mecanismos de recombinación homóloga entre cDNA generado por retrotranscripción del mRNA empalmado, y el genoma, que conducen a deleciones precisas y favorece la simplificación genómica (Hooks *et al.* 2014). Además, la reducción de intrones disminuye el costo energético de la transcripción y el procesamiento del mRNA, lo cual es ventajoso en organismos unicelulares con ciclos de división celular rápidos (Hooks *et al.*, 2014; Lynch y Marinov, 2015). No obstante, en *A. niger*

TPS1 se encuentra fragmentado en cinco exones; esta diferencia se atribuye a divergencias evolutivas entre los linajes *Saccharomycotina* y *Pezizomycotina* y podría conferir mayor flexibilidad regulatoria, al posibilitar eventos de *splicing* alternativo o al incluir elementos intrónicos con función reguladora (Hurtig *et al.*, 2020). De igual manera estas diferencias reflejan adaptaciones distintas en la arquitectura génica entre hongos unicelulares y filamentosos, aunque ambas estrategias mantienen la funcionalidad enzimática de *TPS1*, asegurando la conservación de su papel en la síntesis de trehalosa.

Los estudios de Flores *et al.* (2011) mostraron que la delección de *YITPS1* reduce la esporulación y ralentiza el crecimiento a 35 °C. En cambio, las cepas silvestres sometidas a choque térmico aumentaron los niveles de trehalosa; sin embargo, este aumento no se observó en la cepa mutante con delección del gen *TPS1* confirmando el papel esencial de la trehalosa en la tolerancia térmica.

La ausencia de intrones en *YITPS1* también podría sugerir que la regulación recae principalmente a nivel transcripcional; en este sentido, en este estudio se identificaron varios elementos *cis* regulatorios relevantes para la respuesta al estrés, como los motivos HSE, STRE y GC-box; por ejemplo, los elementos HSE son reconocidos por el factor de transcripción Hsf1, el cual regula genes asociados a la respuesta por calor mediante la activación de chaperonas y enzimas protectoras, para la estabilidad proteica bajo condiciones térmicas adversas (Kainth *et al.*, 2021; Alasady *et al.*, 2024; Simoncik *et al.*, 2024).

Por su parte, los STRE constituyen sitios de unión para Msn2 y Msn4, factores centrales en la respuesta general al estrés, cuya activación induce la expresión de genes implicados en la tolerancia a condiciones adversas, incluyendo deshidratación, oxidación y cambios de temperatura (Duy y Kim, 2023; Mühlhofer *et al.*, 2024). En *S. cerevisiae*, *TPS1* posee un motivo G4 en la región promotora que se superpone con un sitio STRE, sugiriendo que la expresión puede estar regulada tanto por la estructura del ADN G4 como por los factores de transcripción Msn2 y Msn4. Esto señala que la interacción G4-Msn2 constituye un mecanismo evolutivo que permite modular rápidamente la transcripción de *TPS1* bajo estrés como lo dan a conocer Duy y Kim, (2023). De la misma manera, Zhang *et al.* (2013) identificaron en *G. pullulans* elementos promotores C4T y AG4 en *GPTPS1*, asociados a la respuesta al estrés térmico, debido a que *G. pullulans* crece óptimamente a 15 °C, además, observaron que la actividad enzimática y la síntesis de trehalosa eran mayores a 25 °C que a 10-15 °C. En *Y. lipolytica*, la presencia simultánea de HSE y STRE en el promotor de *YITPS1* sugiere un modelo de regulación dual, en el que la transcripción de este gen puede responder tanto a estímulos específicos de calor, como a otros tipos de estrés general, que potencie su papel en la adaptación a condiciones ambientales desfavorables (Zhang *et al.*, 2013; Duy y Kim, 2023).

En estudios previos realizados en *Y. lipolytica* se reportó que acumula trehalosa bajo estrés térmico y osmótico (Rodríguez-Castillejos, 2023). Este hallazgo experimental respalda que la activación de *TPS1* mediada por elementos *cis* en el promotor constituye un mecanismo clave de regulación de la respuesta al estrés.

En *Y. lipolytica* se identificó que el contenido de GC es alto, lo cual predice la capacidad del promotor para regular dinámicamente la expresión de *TPS1*, al tener una mayor estabilidad estructural y una afinidad por factores de transcripción específicos, coincidiendo con la función del gen en la tolerancia al estrés térmico y osmótico (Gorczyca *et al.*, 2024). En *S. cerevisiae* el contenido de GC fue menor y se reporta una menor densidad de elementos reguladores HSE y STRE, que coincide con su limitada acumulación de trehalosa frente al calor, en comparación con otros hongos (Morano *et al.*, 2012). Por su parte, *A. niger* mostró el mayor contenido de GC en el promotor de *TPS1*, que se asocia con una mayor estabilidad de la doble hélice y con una regulación más compleja, lo que sugiere un sistema regulador más robusto (Ellena *et al.*, 2021). Estas diferencias podrían indicar que, en levaduras como *Y. lipolytica* la regulación de *TPS1* depende fuertemente de su promotor, mientras que en *A. niger* la complejidad intrínica podría aportar mecanismos adicionales de control (Guillemette *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013).

La organización estructural de los motivos catalíticos DXD y HXH presentes en el dominio GT-20 y organizados en los lóbulos N- y C-terminal y en pliegues Rossmann, es consistente con la arquitectura observada en *C. albicans* y *A. fumigatus*, donde dichos motivos constituyen el núcleo del sitio activo y son esenciales para la actividad enzimática y la tolerancia al calor (Miao *et al.*, 2017). Por otra parte, estudios en *A. thaliana* han mostrado que la organización de los dominios en *TPS1* es fundamental para el funcionamiento de la enzima. Fichtner *et al.* (2020) demostraron que la pérdida del dominio C-terminal o mutaciones puntuales en el dominio catalítico comprometen severamente el crecimiento y la viabilidad celular, incluso cuando se mantienen niveles elevados de trehalosa. Estos resultados refuerzan que la conservación estructural observada en *YITPS1* no solo asegura su capacidad catalítica, requisito indispensable para la función en la adaptación a estrés. La alta conservación encontrada en el dominio GT-20 de la proteína *YITPS1* indica que esta región es crítica para la función de la enzima, que sugiere que mutaciones en este dominio podrían comprometer la actividad catalítica, mientras que la conservación del dominio es un blanco adecuado para el desarrollo de estrategias de ingeniería genética dirigidas a mejorar la tolerancia al estrés a través de la síntesis de trehalosa.

Los residuos identificados y su posición son clave en la unión de los sustratos, en consecuencia, de la actividad enzimática de *YITPS1*, que son los equivalentes a los descritos en *C. albicans*, esto da evidencia del alto grado de conservación estructural. Miao *et al.* (2017), estos aminoácidos que se localizan en el dominio catalítico cumplen un papel crítico en la interacción con el sustrato UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato. Los ensayos de mutagénesis sitio específico en estos residuos eliminaron por completo la actividad enzimática a 37 °C. Estos hallazgos confirman que dichos residuos son los esenciales no solo para la síntesis, sino también para la estabilidad de la enzima bajo condiciones de estrés térmico. La identificación de los mismos residuos en *YITPS1* respalda la arquitectura y funcionalidad del sitio activo que es altamente conservado entre levaduras. Esto abre la posibilidad de diseñar estrategias de mutagénesis dirigidas en *Y. lipolytica* con el propósito de tener una respuesta favorable frente al estrés térmico. De acuerdo con Miao *et al.* (2017), los residuos D378 y E387 interactúan directamente con el sustrato (actividad catalítica), mientras que otros residuos conservados en la región contribuyen principalmente al mantenimiento de la estructura tridimensional.

En términos evolutivos, los resultados de este estudio sitúan a YITPS1 dentro de un clado con alto soporte estadístico junto con proteínas homólogas, que evidencian su estrecha relación con genes de otras levaduras como las incluidas en este estudio y sugieren una conservación funcional (Zhang *et al.*, 2013). Este patrón contrasta con lo observado en plantas, donde la familia *TPS* ha experimentado expansiones significativas, por ejemplo, describieron que en *Populus deltoides*, *Arabidopsis thaliana* y en *Oryza sativa* existen hasta 12 genes *TPS*, divididos en dos clases (I y II), con funciones divergentes, a donde los genes de clase I mantienen una alta conservación de los residuos catalíticos, similar a lo encontrado en levaduras; mientras que los de clase II han perdido parcial o totalmente la actividad enzimática, desempeñando funciones regulatorias (Yan *et al.*, 2023; Fan *et al.*, 2024). En plantas la diversificación de la familia *TPS* permitió la especialización de isoformas para funciones metabólicas y regulatorias (Fichtner *et al.* 2020), mientras que en levaduras del subfilo Saccharomycotina, como *Y. lipolytica* y *S. cerevisiae*, la estrategia adaptativa parece centrarse mayormente en mantener una proteína catalíticamente eficiente, con regulación secundaria a través de genes asociados como *TPS2* y *TPS3*.

Finalmente, el gen *YITPS1* combina tres características clave para la adaptación al calor: a) la región promotora con elementos *cis* asociados al estrés, b) una estructura altamente conservada con motivos catalíticos críticos y residuos clave para la interacción con UDPG y G6P, semejante a la de otras especies fúngicas y plantas; c) y una posición evolutiva que, a diferencia de las variantes génicas en plantas, en *Y. lipolytica* se enfatiza la conservación de una isoforma única funcional. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la síntesis de trehalosa constituye un mecanismo adaptativo conservado, donde la estabilidad estructural de *TPS1* es esencial para sostener la actividad catalítica y, en consecuencia, la termotolerancia de *Y. lipolytica* (Miao *et al.*, 2017; Rodríguez-Castillejos, 2023).

Con este trabajo bioinformático, fortalece el conocimiento del papel del gen *TPS1* y de la estructura de la enzima *TPS1* en el estrés térmico de *Y. lipolytica*. Estrategias específicas de biología sintética podrían incluir la multiplicación en tándem de los motivos HSE y STRE identificados en el promotor para potenciar la transcripción bajo calor, o la mutagénesis dirigida del residuo K284 para evaluar su impacto en la termoestabilidad de la enzima, tal como se ha explorado en *C. albicans* (Miao *et al.*, 2017).

5. Conclusión

El análisis bioinformático del gen y la proteína *TPS1* de *Y. lipolytica* reveló que existe una organización simple sin intrones, con regulación transcripcional dependiente de los motivos *cis* asociados al estrés HSE, STRE, GC-box y TATA. La estructura terciaria mostró alta conservación de los dominios catalíticos esenciales GT-20, DXD, HXH y de residuos clave, constituyen la evidencia de la eficiencia estructural y regulatoria del gen *TPS1* frente al estrés térmico en esta especie.

Contribución de los autores

Ana Fernanda Morales-Sibrian: Metodología y diseño experimental y adquisición de datos. **José David Reyes-Ortíz:** Adquisición de datos. **Didiana Gálvez-López:** Análisis de datos, revisión y edición final. **Alfredo Vázquez-Ovando:** Análisis de datos, revisión y edición. **Raymundo Rosas-Quijano:** Conceptualización, metodología y diseño experimental, análisis de datos, redacción del borrador original, revisión y edición final.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

Alasady, M.J., Koeva, M., Takagishi, S.R., Segal, D., Amici, D.R., Smith, R.S., Ansel, D.J., Lindquist, S., Whitesell, L., Bartom, E.T., Taipale, M. and Mendillo, M.L. 2024. An HSF1-JMJD6-HSP feedback circuit promotes cell adaptation to proteotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 121(29), e2313370121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2313370121>

Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E. and Noble, W.S. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res.* 43(W1), W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>

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. *J. Biol. Chem.* 273(50), 33311–33319. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33311>

Blum, M., Chang, H.Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., Nuka, G., Paysan-Lafosse, T., Qureshi, M., Raj, S., Richardson, L., Salazar, G.A., Williams, L., Bork, P., Bridge, A., Gough, J., Haft, D.H., Letunic, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H. and Finn, R.D. 2021. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic acids Res.* 49(D1), D344–D354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977>

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. and Madden, T.L. 2009. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinf.* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H.R., Frank, M.H., He, Y. and Xia, R. 2020. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Mol. Plant.* 13(8), 1194–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>

Chen, A., Vargas-Smith, J., Tapia, H. and Gibney, P.A. 2022. Characterizing phenotypic diversity of trehalose biosynthesis mutants in multiple wild strains of *Saccharomyces cerevisiae*. G3.12(8), jkac196. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac196>

- Deparis, Q., Claes, A., Foulquié-Moreno, M.R. and Thevelein, J.M. 2017. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* 17(4), fox036. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox036>
- Duy, D.L. and Kim, N. 2023. Yeast transcription factor Msn2 binds to G4 DNA. *Nucleic Acids Res.* 51(18), 9643–9657. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad684>
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Ellena, V., Bucchieri, D., Arcalis, E., Sauer, M. and Steiger, M.G. 2021. Sclerotia formed by citric acid producing strains of *Aspergillus niger*: Induction and morphological analysis. *Fungal Biol.* 125(6), 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.01.008>
- Fan, S., Wang, Z., Xiao, Y., Liang, J., Zhao, S., Liu, Y., Peng, F. and Guo, J. 2024. Genome-wide identification of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family reveals the potential role in carbohydrate metabolism in peach. *Genes.* 15(1), 39. <https://doi.org/10.3390/genes15010039>
- Fichtner, F., Olas, J.J., Feil, R., Watanabe, M., Krause, U., Hoefgen, R., Stitt, M. and Lunn, J.E. 2020. Functional features of TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE1, an essential enzyme in *Arabidopsis*. *Plant. Cell.* 32(6), 1949–1972. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00837>
- Flores, C.L., Gancedo, C. and Petit, T. 2011. Disruption of *Yarrowia lipolytica* TPS1 gene encoding trehalose-6-P synthase does not affect growth in glucose but impairs growth at high temperature. *PLoS One.* 6(9), e23695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023695>
- Gálvez-López, D., Chávez-Meléndez, B., Vázquez-Ovando, A. and Rosas-Quijano, R. 2019. The metabolism and genetic regulation of lipids in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Braz. J. Microbiol.* 50(1), 23–31. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0004-7>
- Gorczyca, M., Korpys-Woźniak, P. and Celińska, E. 2024. An interplay between transcription factors and recombinant protein synthesis in *Yarrowia lipolytica* at transcriptional and functional levels—the global view. *Int. J. Mol. Sci.* 25(17), 9450. <https://doi.org/10.3390/ijms25179450>
- Grant, C.E., Bailey, T.L. and Noble, W.S. 2011. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics.* 27(7), 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>
- Guillemette, T., van Peij, N., Goosen, T., Lanthaler, K., Robson, G.D., van den Hondel, C. A., Stam, H. and Archer, D.B. 2007. Genomic analysis of the secretion stress response in the enzyme-producing cell factory *Aspergillus niger*. *BMC Genom.* 8, 158. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-158>
- Hooks, K.B., Delneri, D. and Griffiths-Jones, S. 2014. Intron evolution in Saccharomycetaceae. *Genome Biol. Evol.* 6(9), 2543–2556. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu196>

Hu, B., Jin, J., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J. and Gao, G. 2015. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*. (Oxford, England), 31(8), 1296–1297. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu817>

Hurtig, J.E., Kim, M., Orlando-Coronel, L.J., Ewan, J., Foreman, M., Notice, L.A., Steiger, M.A. and van Hoof, A. 2020. Origin, conservation, and loss of alternative splicing events that diversify the proteome in *Saccharomycotina* budding yeasts. *RNA (New York, N.Y.)*, 26(10), 1464–1480. <https://doi.org/10.1261/rna.075655.120>

Kainth, A.S., Chowdhary, S., Pincus, D. and Gross, D.S. 2021. Primordial super-enhancers: heat shock-induced chromatin organization in yeast. *Trends Cell Biol.* 31(10), 801–813. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.04.004>

Li, X., Zhang, Y., Wang, Z. and Liu, H. 2024. Thermo-adaptive evolution of *Corynebacterium glutamicum* reveals the regulatory functions of *fasR* and *hrcA* in heat tolerance. *Microb. Cell Fact.* 23(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02568-x>

Lynch, M. and Marinov, G.K. 2015. The bioenergetic costs of a gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(51), 15690–15695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514974112>

Magalhães, R.S.S., Popova, B., Braus, G.H., Outeiro, T.F. and Eleutherio, E.C.A. 2018. The trehalose protective mechanism during thermal stress in *Saccharomyces cerevisiae*: the roles of Ath1 and Agt1. *FEMS Yeast Res.* 18(6), 10.1093/femsyr/foy066. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy066>

Mahajan, M., Kuiry, R. and Pal, P.K. 2020. Understanding the consequence of environmental stress for accumulation of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants.* <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100255>

Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D.J., Buchman, S., Chen, C.Y., Chou, A., Ienasescu, H., Lim, J., Shyr, C., Tan, G., Zhou, M., Lenhard, B., Sandelin, A. and Wasserman, W.W. 2014. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids Res.* 42, D142–D147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt997>

Miao, Y., Tenor, J.L., Toffaletti, D.L., Maskarinec, S.A., Liu, J., Lee, R.E., Perfect, J.R. and Brennan, R.G. 2017. Structural and *In vivo* studies on Trehalose-6-phosphate synthase from pathogenic fungi provide insights into its catalytic mechanism, biological necessity and potential for novel antifungal drug design. *mBio.* 8(4), e00643-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00643-17>

Morano, K.A., Grant, C.M. and Moye-Rowley, W.S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>

Mühlhofer, M., Offensperger, F., Reschke, S., Wallmann, G., Csaba, G., Berchtold, E., Riedl, M., Blum, H., Haslbeck, M., Zimmer, R. and Buchner, J. 2024. Deletion of the transcription factors Hsf1, Msn2 and Msn4 in yeast uncovers transcriptional reprogramming in response to proteotoxic stress. *FEBS Lett.* 598(6), 635–657. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14821>

Park, Y.K. and Ledesma-Amaro, R. 2023. What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends Biotechnol.* 41(2), 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>

Pel, H.J., de Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G. J. and de Vries, R.P. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25(2), 221–231. <https://doi.org/10.1038/nbt1282>

Rodríguez-Castillejos, L.A. 2023. Sobreexpresión del gen TPS1 en *Yarrowia lipolytica*. Tesis de Licenciatura inédita. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, México.

Saitou, N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4), 406–425, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Satomura, A., Katsuyama, Y., Miura, N., Kuroda, K., Tomio, A., Bamba, T., Fukusaki, E. and Ueda, M. 2013. Acquisition of thermotolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* by breeding via stepwise adaptation. *Biotechnol. Prog.* 29(5), 1116–1123. <https://doi.org/10.1002/btpr.1754>

Sekova, V.Y., Kovalyov, L.I., Kovalyova, M.A., Gessler, N.N., Danilova, M.A., Isakova, E.P. and Deryabina, Y.I. 2021. Proteomics readjustment of the *Yarrowia lipolytica* yeast in response to increased temperature and alkaline stress. *Microorganisms.* 9(12), 2619. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122619>

Sevriev, B., Dimitrova, S., Kehayova, G. and Dragomanova, S. 2024. Trehalose: neuroprotective effects and mechanisms-an updated review. *NeuroSci.* 5(4), 429–444. <https://doi.org/10.3390/neurosci5040032>

Sethi, R., Iyer, S.S., Das, E. and Roy, I. 2018. Discrete roles of trehalose and Hsp104 in inhibition of protein aggregation in yeast cells. *FEMS Yeast Res.* 18(6), 10.1093/femsyr/foy058. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy058>

Simoncik, O., Tichy, V., Durech, M., Hernychova, L., Trcka, F., Uhrik, L., Bardelcik, M., Coates, P.J., Vojtesek, B. and Muller, P. 2024. Direct activation of HSF1 by macromolecular crowding and misfolded proteins. *PLoS ONE.* 19(11), e0312524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312524>

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Mol. Biol. Evol. 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Timoumi, A., Guillouet, S.E., Molina-Jouve, C., Fillaudeau, L. and Gorret, N. 2018. Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102(9), 3831–3848. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8870-3>

Vanaporn, M. and Titball, R.W. 2020. Trehalose and bacterial virulence. Virulence. 11(1), 1192-1202. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809326>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, TAP., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. and Schwede, T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. 2;46(W1):W296-W303. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Xiao, X., Liu, Q., Zhang, Q., Yan, Z., Cai, D. and Li, X. 2024. Exogenous trehalose assists *Zygosaccharomyces rouxii* in resisting high-temperature stress mainly by activating genes rather than entering metabolism. J. Fungi. 10(12), 842. <https://doi.org/10.3390/jof10120842>

Yan, X.M., Zhou, S.S., Liu, H., Zhao, S.W., Tian, X.C., Shi, T.L., Bao, Y.T., Li, Z.C., Jia, K.H., Nie, S., Guo, J.F., Kong, L., Porth, I.M. and Mao, J.F. 2023. Unraveling the evolutionary dynamics of the *TPS* gene family in land plants. Front. Plant Sci. 14, 1273648. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273648>

Zhang, F., Wang, Z.P., Chi, Z., Raoufi, Z., Abdollahi, S. and Chi, Z.M. 2013. The changes in Tps1 activity, trehalose content and expression of TPS1 gene in the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 grown at different temperatures. EXTREMOPHILE. 17(2), 241–249. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0511-2>

Zhang, Z., Xiong, T., Li, K., Huang, K., Liao, C. and Liu, G. 2025. Evolution and amplification of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in Theaceae. BMC genomics. 26(1), 273. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11475-3>