

PAPEL DE LA TREHALASA EN LA *LEVADURA SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*: DISTRIBUCIÓN DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN

J. Vicente Soler*, J. C. Argüelles* y M. Gacto*

Recibido: enero 1985

SUMMARY

Role of trehalase in *Schizosaccharomyces pombe*: **Distribution** during the life cycle, characterization and location

Vegetative cells of *Schizosaccharomyces pombe* lack trehalase activity but the enzyme activity is present at the ascospore stage and later disappears during germination. Cells of a yeast strain unable to sporulate are devoid of trehalase throughout the entire life cycle. The ascospore enzyme is not released to the culture medium and shows the properties of a nonregulatory trehalase with acidic optimum pH and $K_m = 10^9 \times 10^{-6} M$. On the basis of its *in vivo* sensitivity to mild acid treatments and of its behaviour during fractionation at low speed centrifugation of whole ascospore extracts, the enzyme appears to be externally located on the cells and covalently bound to the cell wall structure. *In situ* inactivation of the trehalase enzyme partially blocks the initial morphological changes of germination. Germination of trehalase-less ascospores is further delayed when resynthesis of the enzyme is prevented by addition of cycloheximide. The results suggest that the trehalase enzyme plays a critical role in the early events of germination by mobilizing the endogenous trehalose stored in ascospores so that the process can take place even in the absence of external carbon sources directly available provided other nutrients be present. Thus, the trehalose-trehalase system might represent in this yeast a significant mechanism that would allow to initiate germination under conditions in which the energy and carbon supplies in the surrounding medium are poor for the ascospores but could be used for the resulting vegetative cells.

RESUMEN

Las células vegetativas de *Schizosaccharomyces pombe* carecen de actividad trehalasa pero esta actividad está presente en las ascosporas y desaparece de nuevo durante la germinación. Una cepa incapaz de esporular carece de enzima a lo largo de todo el ciclo vital de la levadura. La enzima de las ascosporas no se libera al medio de cultivo y tiene las propiedades de una trehalasa no reguladora con pH óptimo 5,6 y $K_m = 10^9 \times 10^{-6} M$. Por su inactivación *in vivo* mediante tratamiento de ascosporas con ácidos diluidos y su comportamiento en centrifugación de extractos celulares a baja velocidad, la enzima parece localizada en el exterior de la célula unida covalentemente a la pared celular. La inactivación *in situ* de la trehalasa bloquea los cambios morfológicos iniciales que acompañan la germinación. La etapa inicial de la germinación de ascosporas con trehalasa inactivada se retrasa aún más cuando se impide la resíntesis de enzima por adición de cicloheximida. Los resultados sugieren que esta enzima desempeña un papel importante en el primer paso de la germinación, movilizand la trehalosa endógena acumulada en ascosporas y permitiendo el inicio de la germinación en ausencia de fuentes carbonadas exógenas utilizables, siempre que se presenten otros nutrientes esenciales. El sistema trehalosa-trehalasa puede por tanto representar en esta levadura un mecanismo que hace posible la germinación en condiciones que suponen una limitación nutricional para las ascosporas pero no para las células vegetativas resultantes de la germinación.

INTRODUCCIÓN

La trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que constituye la principal reserva carbonada intra-

celular en levaduras (PANEK, 1963). Las trehalasas (EC 3.2.1.28) son hidrolasas específicas capaces de desdoblar trehalosa en dos moléculas de glucosa. Dependiendo de las especies, se ha descrito la existencia de dos tipos

* Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

de trehalasas implicadas en la movilización de la trehalasa endógena en levaduras: reguladoras y no reguladoras (THEVELEIN, 1984). Las trehalasas reguladoras existen en forma inactiva y pueden pasar a forma activa mediante una modificación covalente por fosforilación que está mediada por ATP y una proteína-quinasa celular dependiente de AMP-cíclico; estas formas activas pueden a su vez desfosforilarse por acción de una fosfatasa perdiendo de nuevo su actividad catalítica (ORTIZ *et al.*, 1983). Las trehalasas no reguladoras se presentan, en cambio, en forma enzimática directamente activa y no sufren ciclos post-transcripcionales de fosforilación y desfosforilación.

Mientras que la utilización de la trehalosa endógena en levaduras con trehalasas del primer tipo está influenciada por los niveles intracelulares de ATP y AMP-cíclico, en las especies con trehalasas no reguladoras la hidrólisis del sustrato de reserva parece depender exclusivamente de cambios estructurales o de compartimentalización que normalmente limitan la interacción espaciotemporal entre la enzima y la trehalosa coexistente en las células.

INOUE & SHIMODA (1981a, 1981b) describieron la existencia de una trehalasa en ascosporas de *Schizosaccharomyces pombe* y observaron un notable descenso de la trehalosa intracelular durante la germinación de estas formaciones. Dichos autores sugirieron que el estímulo germinativo podría favorecer la unión enzima-sustrato para disponer de una fuente energética accesoria capaz de sustentar inicialmente el proceso de diferenciación. Sin embargo, en el estudio de la germinación realizado por estos autores se utilizó la presencia de una fuente carbonada exógena en el medio de germinación y, en consecuencia, el mecanismo postulado parece redundante, innecesario y de dudosa relevancia por implicar la movilización de un sustrato endógeno en condiciones en que precisamente su producto está en exceso en el medio de cultivo. Sobre esta base, el presente estudio se inició para comprobar la validez o no del modelo propuesto y establecer, en su caso, su significación fisiológica abordando entre otros los siguientes puntos: i) verificar la relación específica entre esporulación, germinación y presencia de actividad trehalasa durante el ciclo vital de esta levadura; ii) localizar y caracterizar la trehalasa presente en este microorganismo, incluyendo la determinación de su naturaleza reguladora o no reguladora y algunos parámetros cinéticos significativos, y iii) explorar el posible papel del sistema trehalosa-trehalasa en el fenómeno de la germinación analizando, en concreto, el proceso germinativo

en ausencia de fuentes energéticas exógenas alternativas a la trehalosa endógena.

Los datos obtenidos permiten apoyar el modelo propuesto por INOUE & SHIMODA (1981a, 1981b) y conducen a considerar como válido un mecanismo que, aunque resulta en apariencia paradójico, puede ayudar a esclarecer algunos aspectos fisiológicos del proceso morfogénico de la germinación.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO Y MEDIOS DE CULTIVO

Las dos cepas de *S. pombe* utilizadas en ese estudio derivan de la estirpe silvestre inicialmente descrita por LEUPOLD (1950): la cepa h⁹⁰ 968 (homotálica) y la cepa h⁻ 972 (heterotálica), caracterizadas por ESPOSITO & ESPOSITO (1975). A lo largo del presente trabajo ambas cepas se designan abreviadamente como h⁹⁰ y h⁷², respectivamente. Para su mantenimiento, las levaduras se crecieron por siembra en superficie en medio Winge sólido previamente esterilizado (2% glucosa, 0.3% extracto de levadura). Los cultivos se incubaron primero durante 24 h. a 29-30°C y se mantuvieron luego almacenados a temperatura ambiente mediante resiembras periódicas. Para estudios de esporulación y germinación los microorganismos se inocularon en medio MEL líquido (3% extracto de malta en tampón fosfato 50 mM pH 5.9) y los cultivos se desarrollaron mediante incubación a 29°C en un agitador orbital Lab-Line termostatzado.

RECUENTOS CELULARES

El recuento celular a diferentes tiempos de incubación se llevó a cabo mediante recuento directo en cámara Burke calculando la concentración celular como número de células por mililitro (N) según la fórmula $N = 25 \times 10^4 \times A \times D$, donde A es la media del número de microorganismos determinado en los recuentos efectuados por cuadrícula de la cámara y D el factor de dilución correspondiente. Debido a las especiales características del microorganismo en medio MEL, que permite la conjugación, el factor A puede representar cuatro estadios morfológicos distintos en la cepa homotálica h⁹⁰: células vegetativas, zigotos, ascos y ascosporas. Por ello, el valor N se determinó en su caso mediante la siguiente expresión que incluye el recuento de cada uno de las formas celulares:

$$N = 25 \times 10^4 \times (v+2z+2a+s/2) \times D$$

donde v = formas vegetativas, z = zigotos, a = ascos y s = ascosporas, de acuerdo con el hecho de que 2v, por conjugación, forman y equivalen a 1z ó la en términos de recuento y originan a su vez 4s. La expresión en porcentaje de las formas z, a y s fue la siguiente: %z = $(2z/N) \times 100$; %a = $(2a/N) \times 100$; %s = $[(2a+s/2)/N] \times 100$.

De modo análogo, el recuento celular durante la germinación de la cepa h⁹⁰ requirió la determinación

directa de cada una de las etapas **morfológicas** resultantes del proceso.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES

En las pruebas que requirieron el uso de extractos celulares como fuente enzimática, se procedió a lavar repetidamente las células recogidas de los cultivos tras centrifugación a baja velocidad y a **resuspenderlas** finalmente en tampón acetato 0'1M pH 5'6. Las suspensiones obtenidas se sometieron a continuación a ruptura mecánica, en presencia de polvo de vidrio Ballotini (0'45-0'50 mm), en un desintegrador Braun MSK con refrigeración acoplada, durante aproximadamente 30 segundos. La eficiencia de rotura celular se comprobó mediante observación microscópica por contraste de fases en un microscopio Olympus BH-2. Los extractos se **centrifugaron** seguidamente a $3.000 \times g$ durante 20 min. en una centrifuga MSE y el precipitado obtenido fue lavado con tampón acetato y **posteriormente** resuspendido en el mismo tampón constituyendo la fracción particulada de paredes celulares. Los **sobrenadantes** resultantes y la fracción particulada se utilizaron directamente en las determinaciones enzimáticas como se indica en los correspondientes ensayos.

ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Para la realización de ensayos enzimáticos con células enteras se tomaron volúmenes fijos de cultivos de concentración celular conocida, que se sometieron a centrifugación a $3.000 \times g$ durante 10 minutos. Tras lavados sucesivos, las células se resuspendieron en un volumen de tampón acetato 0'1M pH 5'6 diez veces inferior al inicial y se utilizaron como fuente enzimática.

Como **sustrato** para las reacciones enzimáticas se emplearon soluciones de trehalosa 200 mM en tampón acetato 0'1M pH 5'6 que se mantuvieron congeladas hasta proceder a los correspondientes análisis enzimáticos.

Los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en un volumen final de 1 ml utilizando 0'5 ml de la suspensión de células (o. en su caso. extracto celular) a los que se añadió 0'5 ml de la solución del sustrato. En los casos particulares en que se deseó realizar la reacción a un pH determinado distinto del **estándar** señalado se emplearon alternativamente los tampones acetato (en el rango 3'8-5'6) o fosfato (en el rango 5'6-8'0) a una fuerza iónica 0'1 M tanto para resuspender las células como para preparar la solución de trehalosa. Los ensayos se incubaron a 30°C durante tiempos variables y la reacción se detuvo por adición de 1 ml del reactivo alcalino de Somogyi. La valoración de grupos reductores generados se estimó como glucosa por el método de **SOMOGYI-NELSON** (1952). A lo largo de los ensayos enzimáticos se dispusieron controles particulares sometidos a condiciones idénticas a las empleadas en los ensayos problema y en los que la actividad trehalasa **había** sido previamente inactivada por el elevado pH del reactivo de Somogyi adicionado a la fuente enzimática antes del comienzo de las reac-

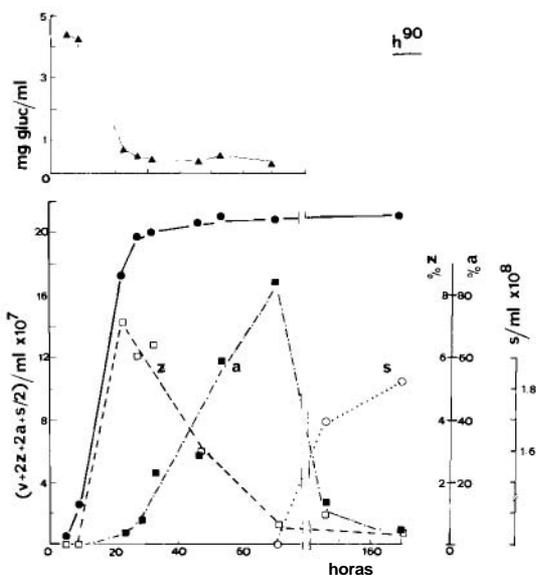


FIGURA 1. Curva de crecimiento de *S. pombe* h⁹⁰ en medio MEL a 29°C. Símbolos: v=células vegetativas; z=zigotos; a=ascos; s=ascosporas. La parte superior de la figura indica los grupos reductores presentes en el medio de cultivo valorados como glucosa.

Growth curve of *S. pombe* h⁹⁰ in MEL medium at 29°C. Symbols: v=vegetative cells; z=zygotes; a=asci; s=ascospores. Upper panel shows reducing groups in the growth medium measured as glucose.

ciones (tiempo cero). De este modo, el incremento de grupos reductores determinado en los ensayos corresponde a la acción enzimática de la trehalasa desarrollada bajo condiciones controladas.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar del sustrato 1 nmol de glucosa por minuto en las condiciones de pH y temperatura establecidas.

ENSAYOS DE ACTIVACIÓN ENZIMÁTICA POR AMP CÍCLICO Y ATP

Para determinar la posible activación de la trehalasa de *S. pombe* mediante modificación covalente por fosforilación, se tomaron dos alícuotas iguales de extracto celular. A 1 mililitro de extracto se adicionó en un caso 0'25 ml de tampón fosfato 50mM pH 7 y, en otro, 0'25 ml del mismo tampón conteniendo mezcla activadora para dar una concentración final de ATP 0'8mM, SO₄Mg 1'8mM, AMP cíclico 10μM, FNa 10mM (inhibidor de fosfatasas) y teofilina 1mM (inhibidor de fosfodiesterasas). Como control, se realizó una prueba paralela utilizando extractos celulares obtenidos de la levadura *Candida utilis* CECT 1061 cuya actividad trehalasa de tipo regulador resulta activada en tales condiciones por fosforilación mediada por AMP cíclico, ATP y proteína-cinasa celular presente en los extractos (ARGUELLES *et al.*, 1984).

Tras adicionar en un caso tampón sólo y tampón con

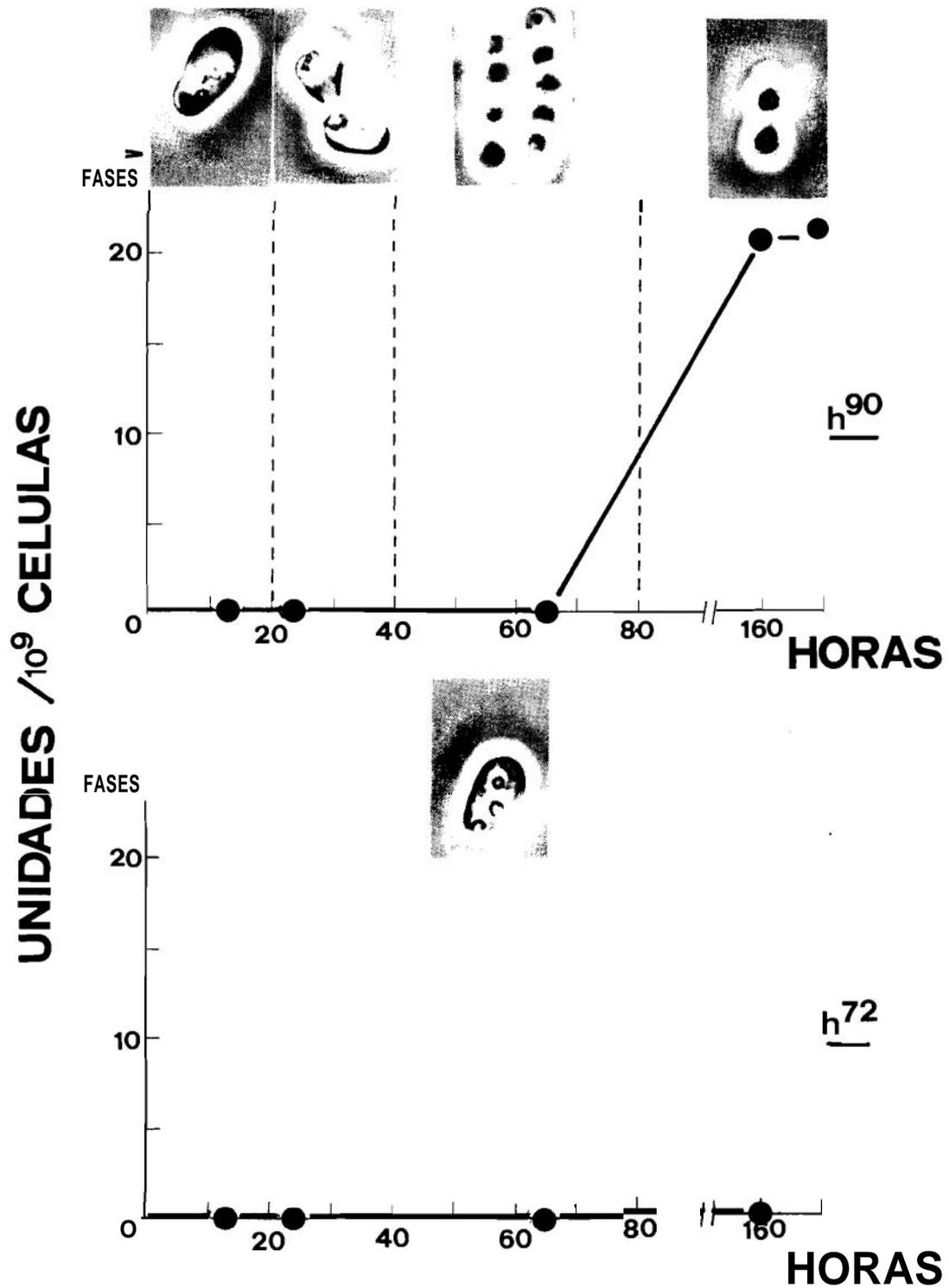


FIGURA 2. Actividad trehalasa en *S. pombe* *h⁹⁰* y *h⁷²* a lo largo de la curva de crecimiento. Las condiciones de crecimiento son las indicadas en la fig. 1.

Trehalase activity in *S. pombe* *h⁹⁰* and *h⁷²* throughout the growth curve. Experimental conditions are as those shown for fig. 1

mezclaactivadora en el otro. los extractos se incubaron para activación durante 10 minutos a 30°C y posteriormente se utilizaron en los correspondientes ensayos enzimáticos comparativos, valorándose la trehalasa como se ha descrito anteriormente.

INACTIVACIÓN IN SITU DE LA TREHALASA Y DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Un volumen de una suspensión de ascosporas de concentración celular conocida se resuspendió en CIH 0'1N y otro volumen idéntico se mantuvo sin tratamiento en agua destilada. Ambas suspensiones se incubaron durante 30 minutos a 18°C igualándolas finalmente a pH 5 tras sucesivos lavados, con el fin de evitar el efecto del bajo pH en el posterior ensayo enzimático de la muestra pretratada con ácido diluido y determinar solamente la acción previa del tratamiento sobre la enzima. Las respectivas suspensiones se utilizaron a continuación como fuente enzimática en reacciones comparativas para analizar la acción desnaturalizante del tratamiento previo y evidenciar la accesibilidad o no del ácido a la enzima estableciendo, en consecuencia, la disposición externa o interna respectivamente de la trehalasa en ascosporas intactas. El carácter selectivo de la inactivación detectada se comprobó en paralelo determinando por el método de la reducción del azul de metileno (ARNOLD, 1972; VILLANUEVA & GACTO, 1973) la viabilidad de las ascosporas tras el tratamiento empleado en la localización de la trehalasa.

PRODUCTOS Y REACTIVOS

Trehalosa fue obtenida de Merck. AMP cíclico, ATP, teofilina y cicloheximida fueron de Sigma. El resto de los productos y reactivos utilizados, de diversos orígenes, fue de calidad analítica.

RESULTADOS

ACTIVIDAD TREHALASA DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO

Para estudiar la presencia de la actividad trehalasa a lo largo del ciclo de desarrollo se analizó en primer lugar la curva de crecimiento de las cepas h⁹⁰ y h⁷² en medio MEL y se determinó a continuación la actividad enzimática en cada uno de los estadios o fases morfológicas del desarrollo.

La cepa homotética h⁹⁰ experimentó una transición morfológica desde formas vegetativas a ascosporas mientras, por el contrario, la cepa heterotética h⁷² no esporuló y se mantuvo en forma de células vegetativas tanto en la fase exponencial de crecimiento como en la fase estacionaria. El cultivo de h⁹⁰ inició la fase estacionaria hacia las 30 horas de incubación, cuando el descenso del nivel de grupos reductores en el medio fue notable, y la densidad celu-

lar se estabilizó en valores próximos a 2×10^8 células/ml (fig. 1). La transición de células vegetativas a zigotos ocurre en dicha cepa mediante un proceso de conjugación isógama y estas formas, junto a células vegetativas no conjugadas, predominan en el cultivo durante las primeras 40 horas de incubación; los zigotos originaron ascos que, hacia las 70 horas, empezaron a liberar las 4 ascosporas formadas en el interior de cada zigoto. El nivel final de ascosporas se mantuvo cuando se alcanzó en el medio una concentración de alrededor de 2×10^8 ascosporas/ml, equivalente a un 50% de esporulación teniendo en cuenta las formulaciones descritas en Materiales y Métodos. Aunque las distintas fases se presentan parcialmente superpuestas en el tiempo, con la cepa h⁹⁰ se logra en medio MEL una transición morfológica de conjunto relativamente sincronizada sobre un fondo de células vegetativas que no se conjugan durante el crecimiento del cultivo.

La determinación de la trehalasa a lo largo de la curva de crecimiento reveló que la actividad enzimática en la cepa h⁹⁰ sólo es detectable a partir de las 70 horas y nula hasta dicho momento, lo que se corresponde con el descenso en el cultivo de las formas celulares que preceden a las ascosporas y coincide con la aparición de éstas (fig. 2). En ningún caso la actividad se detectó en forma libre extracelular en el medio de cultivo. Ensayos paralelos realizados con la cepa h⁷² evidenciaron, en cambio, ausencia total de actividad en todos los tiempos ensayados. Estos resultados indican que la actividad trehalasa parece específicamente relacionada con funciones fisiológicas llevadas a cabo en el estadio de ascospora.

La evolución de la actividad trehalasa durante la germinación de las ascosporas de la cepa h⁹⁰ fue también analizada. Para ello, un cultivo esporulado se ajustó a una concentración inicial de 10^8 ascosporas/ml y se incubó en medio MEL fresco determinándose la variación de la actividad enzimática a lo largo del proceso germinativo. La germinación de ascosporas de *S. pombe* comprende distintas etapas morfológicas que se presentan secuencialmente desde las ascosporas refráctiles hasta las células vegetativas resultantes de la germinación. Dicho proceso, que se resume en la figura 3, incluye el paso inicial de ascosporas refráctiles (a) hasta ascosporas oscuras (b), las cuales posteriormente derivan a formas protuberantes o piriiformes con inicio de tubo germinativo (c); estas últimas originan formas caracterizadas por la presencia de un gerrnotubo de longitud al menos igual al diámetro de las ascosporas (d), las cuales evolucionan a su vez hasta constituir las nuevas células vegetativas totalmen-

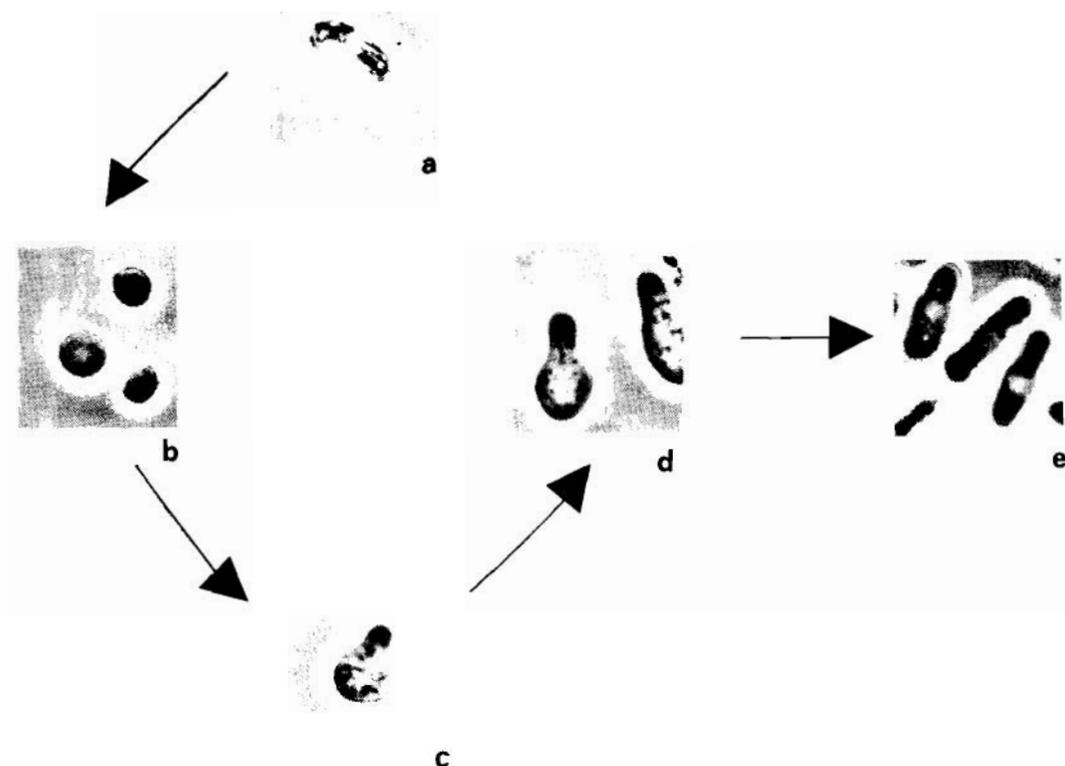


FIGURA 3. Secuencia del proceso de germinación de ascosporas de *S. pombe* h⁹⁰. Símbolos: a=ascosporas refringentes; b=ascosporas oscurecidas; c=formas piriformes; d=ascosporas germinadas; e=células vegetativas.

Germination process for *S. pombe* h^w ascospores. Symbols: a=refractile ascospores; b=dark ascospores; c=pear-shaped forms; d=germinated ascospores; e=vegetative cells.

te formadas (e). Como expresa la figura 4, la actividad trehalasa descende durante la germinación en paralelo a la desaparición en el cultivo de las formas refráctiles iniciales, lo que representa la etapa más temprana del proceso germinativo. Estos resultados, junto a los anteriormente mencionados, sugieren que durante el ciclo de desarrollo de este microorganismo la presencia de enzima está específicamente restringida a la fase representada por las ascosporas maduras capaces de iniciar la germinación. Teniendo en cuenta su aparición durante la esporulación y su desaparición durante la germinación, los resultados descritos apoyan además la idea de que la trehalasa desarrolla su función en ascosporas antes de que ocurra la segunda etapa morfológica del proceso germinativo, es decir, con anterioridad a que alcancen la fase de oscurecimiento e hinchamiento que precede a la emisión del tubo germinativo.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para determinar la influencia de la temperatura en la actividad trehalasa de las ascosporas se ensayó la actividad enzimática durante 10 minutos a diversas temperaturas utilizando suspensiones de esporas lavadas y resuspendidas en tampón, según se indicó en Materiales y Métodos. La hidrólisis del sustrato exógeno se incrementó considerablemente de 30°C a 60°C y la actividad máxima se alcanzó a 60°C; por encima de dicha temperatura el descenso de actividad relativa fue muy acusado (fig. 5). Por otra parte, para establecer el grado de desnaturalización térmica a varias temperaturas se mantuvieron alícuotas idénticas de suspensiones de ascosporas a las temperaturas indicadas en la figura 5 y, a continuación, se procedió a realizar la reacción enzimática sobre trehalosa

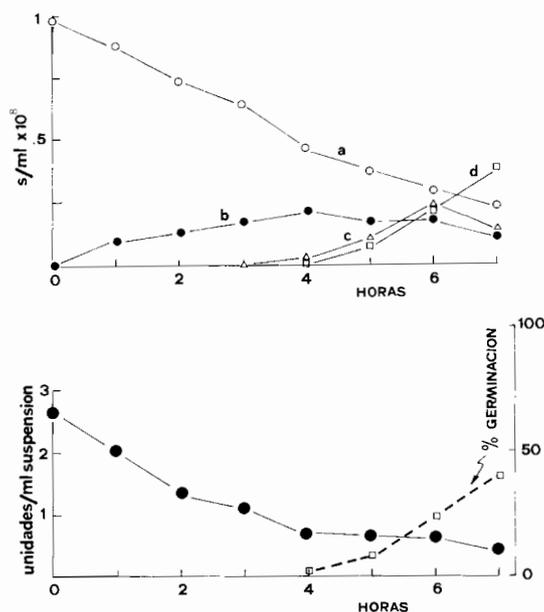


FIGURA 4. Evolución de la actividad trehalasa durante la germinación de ascosporas. Arriba: transición de etapas morfológicas durante el proceso; los símbolos a, b, c y d son los indicados en la fig. 3. Abajo: determinación paralela de la actividad trehalasa en el cultivo en germinación.

Changes in trehalase activity during ascospore germination. High: morphological changes during the process; symbols a, b, c and d are those indicated in legend for fig. 3. Bottom: trehalase determination in the germinating culture as a function of time.

durante 10 minutos en condiciones estándar de temperatura. Los resultados evidenciaron que a temperaturas de preincubación superiores a 50°C se presenta una ligera desnaturalización enzimática en ascosporas que se acentúa a partir de los 60°C y hace prácticamente nula su actividad a temperaturas superiores. Por su elevada termoestabilidad relativa, considerando en particular la ausencia de inactivación por calentamiento *in vitro* a 50°C durante 10 minutos, la actividad trehalasa estudiada parece encajar en el grupo de las trehalasas no reguladoras propuesto sobre la base de ésta y otras características por THEVELEIN (1984). Para establecer adicionalmente la naturaleza no reguladora de la enzima se ensayó su posible activación mediante fosforilación en presencia de AMP cíclico y ATP. Los resultados obtenidos con extractos celulares mostraron ausencia de activación enzimática en condiciones en que la trehalasa reguladora de *C. utilis*, utilizada como control, resultó notablemente activada.

La figura 6 representa los resultados obtenidos sobre la determinación del pH óptimo referidos a

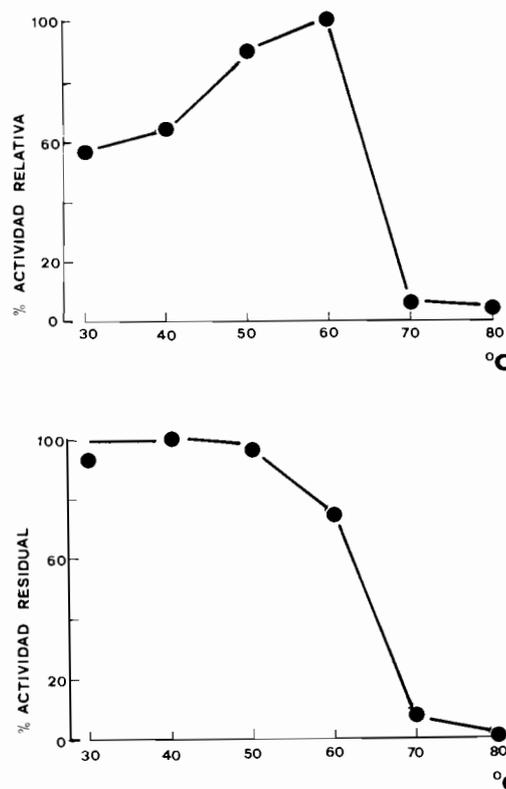


FIGURA 5. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en condiciones estándar de ensayo (arriba) y tras pretratamientos de 10 min a diversas temperaturas en ausencia de sustrato (abajo).

Effect of temperature on the enzyme activity at standard assay conditions (high) and after 10 min pretreatments at various temperatures in the absence of substrate (bottom).

porcentaje de actividad respecto al valor máximo. La actividad exhibe su pH óptimo cercano a 5.5. El pH óptimo en zona ácida es también una característica que coincide con lo descrito para trehalasas no reguladoras (THEVELEIN, 1984). La influencia de la concentración de sustrato en la actividad detectada y la determinación de la K_m por el método de los dobles inversos están indicadas en la figura 7. Para la representación de Lineweaver-Burk la recta fue ajustada por mínimos cuadrados a partir de los datos experimentales obtenidos y el valor K_m calculado para la actividad trehalasa de esta levadura fue 10⁻⁹ mM.

LOCALIZACIÓN DE LA TREHALASA EN ASCOSPORAS

La actividad trehalasa recuperada en ascospo-

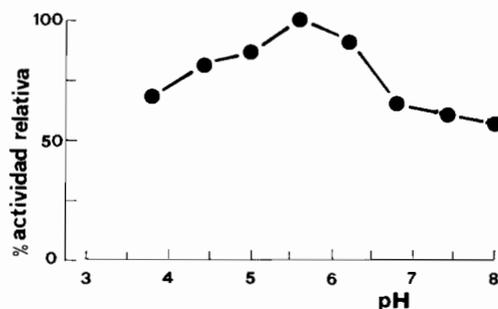


FIGURA 6. Influencia del pH en la actividad trehalasa.

Effect of pH on trehalase activity.

ras tras tratamientos con ácidos diluidos bajo condiciones controladas fue tan sólo del 4% respecto a la actividad obtenida con ascosporas no pretratadas (tabla 1). En consecuencia, estos resultados sugirieron que al menos el 96% de la actividad detectada en ascosporas es pericelular y el resto puede considerarse debida a enzima intracelular en vías de secreción o insensible al ácido. Para discernir entre una localización periplásmica, a nivel del espacio determinado por la membrana y la pared celular, o una disposición ligada covalentemente a la pared celular se procedió a la obtención de extractos celulares y a un fraccionamiento por centrifugación a baja velocidad.

Como se señala en la tabla 2, la distribución de la actividad enzimática de extractos de ascosporas indicó que la trehalasa se localiza mayoritariamente en la fracción particulada obtenida a baja velocidad sin resultar solubilizada tras la ruptura celular; estos datos revelan que la trehalasa se encuentra por tanto asociada a la pared celular de las ascosporas como un componente estructural.

TABLA 1. Localización externa de trehalasa en ascosporas de *S. pombe*. 1=porcentaje de viabilidad determinado mediante recuento celular aplicando la prueba del azul de metileno; 2= μg de glucosa liberados a los respectivos tiempos de incubación en los ensayos enzimáticos; 3=unidades de trehalasa valoradas en 10^9 ascosporas lavadas tras pretratamiento. (0)=trazas, valores menores a $1 \mu\text{g}$ de glucosa o 0.4 unidades enzimáticas en condiciones de ensayo.

External location of trehalase in ascospores of *S. pombe*. 1=percentage determined by cell counting following the methyleneblue test. 2= μg of glucose released at the indicated times in assay conditions. 3=trehalase units per 10^9 ascospores washed after pretreatment. (0)=traces, values lower than $1 \mu\text{g}$ glucose or 0.4 enzyme units in assay conditions.

TRATAMIENTO PREVIO	NINGUNO		CIH 0'1N 30 min	
	15 MIN	30 MIN	15 MIN	30 MIN
Viabilidad ¹	97	97	98	97
Glucosa liberada ²	58	118	(0)	5
Unidades enzimáticas ³	21.48	21.85	(0)	0.92

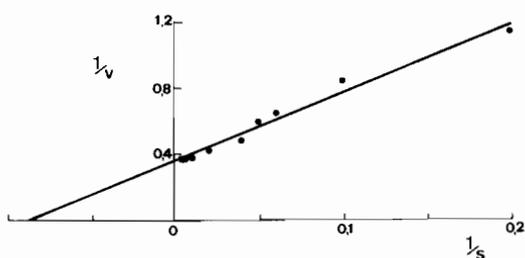
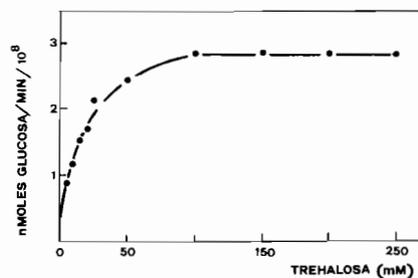


FIGURA 7. Influencia de la concentración de sustrato en la actividad trehalasa. Arriba: curva de saturación por trehalosa. Abajo: determinación de la K_m por el método de Lineweaver-Burk.

Effect of substrate concentration on trehalase activity. High: saturation curve for trehalose. Bottom: K_m value according to the Lineweaver-Burk method.

ANÁLISIS DEL PROCESO GERMINATIVO EN ASCOSPORAS CARENTES DE TREHALASA

La falta de inhibidores conocidos que actúen específicamente sobre la enzima trehalasa *in vivo* y la inexistencia de mutantes de esta leva-

TABLA 2. Asociación de la actividad trehalasa a la pared celular de ascosporas. Para detalles experimentales, véase Materiales y Métodos.

Linkage of trehalase activity to the ascospore cell wall. For experimental details, see Materials and Methods.

	μg GLUCOSA/min/ml SUSPENSIÓN	UNIDADES ENZIMÁTICAS/ 10^9 ESPORAS	% RECUPERACIÓN	% DISTRIBUCIÓN
Células enteras	17'6	24'4	100	—
Extractos celulares	14'8	20'5	84'1	100
—Fracción soluble	1'6	2'2	9'1	10'8
—Fracción particulada	13'2	18'3	75'0	89'2

dura que suministren ascosporas viables carentes de trehalasa impiden clarificar de modo concluyente la función de esta enzima durante la germinación. No obstante, una aproximación al papel desempeñado por la trehalasa en este proceso puede lograrse teniendo en cuenta, por un lado, la naturaleza de las enzimas pericelulares descritas en levaduras (GACTO, 1973) y, por otra parte, la evolución del proceso germinativo cuando dichas enzimas resultan inactivadas.

Con dicho fin se dispuso de cultivos esporulados inducidos a germinar en paralelo mediante adición de medio MEL fresco. Dichos cultivos fueron divididos previamente en dos series de idéntica concentración de ascosporas. Una primera serie estuvo constituida por ascosporas intactas como referencia del proceso de germinación (células TRE⁺). Una segunda serie comprendió ascosporas que habían sido pretratadas con ácido diluido como se ha indicado anteriormente, carentes por tanto de trehalasa funcional en el inicio de la germinación (células TRE⁻). En ambas series se siguió morfológicamente el proceso de germinación cuantificado mediante microscopía de contraste de fases las distintas etapas, como se indica en la figura 8. En el primer caso, las ascosporas refrigerantes TRE⁺ (a) pasaron a formas oscuras en medio MEL (b), dando lugar a formas piriformes o protuberantes (c) que desarrollaron un germotubo claramente reconocible (d). En el segundo caso, la inactivación inicial de la trehalasa retrasó la desaparición en los cultivos de las formas refringentes; lo mismo sucedió respecto a las formas oscurecidas, a la vez que se impidió la formación completa del germotubo en el intervalo de tiempo considerado (véase fig. 8). Estos experimentos revelaron que la carencia de trehalasa (y otros enzimas externos) afecta la secuencia de la germinación a nivel de la primera etapa de dicho proceso, retrasando la pérdida de refringencia y subsecuentemente

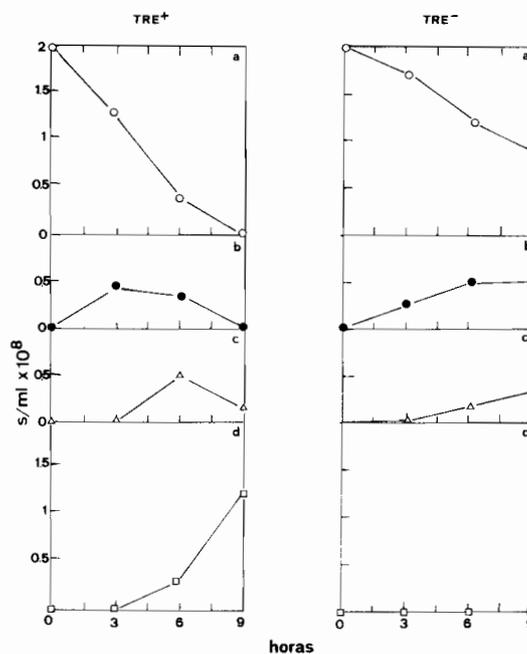


FIGURA 8. Germinación de ascosporas intactas (TRE⁺) y de ascosporas carentes de trehalasa por pretratamiento con ácido diluido (TRE⁻). En cada caso 2×10^8 ascosporas/ml en medio MEL se incubaron a 29°C. Símbolos, como en la fig. 3.

Germination of untreated ascospores (TRE⁺) and of trehalase-less ascospores obtained by mild-acid pretreatment (TRE⁻). In each case 2×10^8 ascospores/ml in MEL medium were incubated at 29°C. Symbols are as in fig. 3.

todas las fases posteriores. Aparentemente, la inactivación enzimática no origina un bloqueo total de la germinación, sino sólo su retardo; ello parece debido a que las células permanecen viables tras el tratamiento ácido (véase tabla 1) y son capaces por tanto de sintetizar *de novo* la enzima en condiciones de germinación.

Cuando el seguimiento de la germinación de ascosporas TRE^+ y TRE^- se realizó en presencia del inhibidor de síntesis proteica cicloheximida, los resultados indicaron que este agente por sí solo no inhibe la primera etapa de la germinación en ascosporas intactas (fig. 9); la pérdida de refringencia no parece por tanto requerir síntesis de nuevas proteínas. La cicloheximida, en cambio, impide que se lleve a cabo el segundo paso de la germinación, es decir, la conversión de formas oscuras a piriformes, provocando que las primeras se acumulen en el medio y bloqueando en consecuencia el posterior desarrollo del germotubo (fig. 9, arriba). Por otra parte, la inhibición de la resíntesis de enzima en ascosporas TRE^- , superpuesta a la inactivación previa de la trehalasa, determina un notable bloqueo de la primera etapa de la germinación (fig. 9, abajo).

Estas observaciones implican que el proceso de germinación de ascosporas se inicia en condiciones normales bajo la influencia de un estímulo germinativo sin necesidad de síntesis proteica. Este requerimiento se presenta sin embargo con posterioridad a la etapa de oscurecimiento y hace posible que la germinación progrese. Adicionalmente, los datos revelan que en ascosporas carentes de trehalasa se hace evidente un bloqueo de la primera etapa germinativa, que se amplifica si se refuerza la carencia de enzima con cicloheximida para impedir su resíntesis. Tales resultados, en su conjunto, sugieren que la trehalasa pericelular desarrolla específicamente su papel en la primera etapa del proceso germinativo, es decir, durante la transición de ascosporas refráctiles intactas a formas oscuras preparadas para germinar.

GERMINACIÓN DE ASCOSPORAS EN AUSENCIA DE FUENTE CARBONADA EXÓGENA

La hidrólisis de trehalosa endógena constituye un suceso temprano que acompaña la germinación de ascosporas de esta levadura (INOUE & SHIMODA, 1981a, 1981b). Si tal movilización representara un mecanismo significativo de arranque de la germinación mediado por la trehalasa, entonces sería posible evidenciar el inicio de la germinación incluso en ausencia de fuente carbonada externa.

El inicio de la germinación ocurre sin diferencias notables tanto en medio complejo como en medio sintético definido. La figura 10 (izqda.) representa la evolución de la etapa inicial (paso de formas refringentes a oscurecidas) durante la germinación de ascosporas en medio complejo MEL y en medio sintético formado por 1% de glucosa y 0.5% de $SO_4(NH_4)_2$ en tampón fosfato

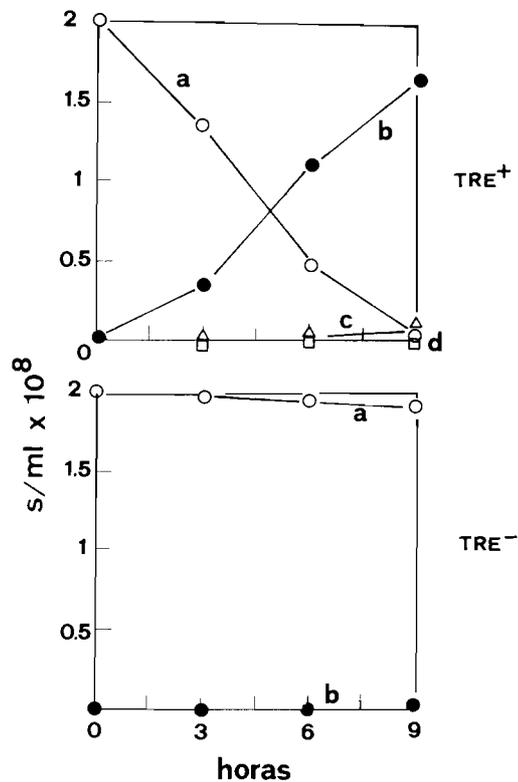


FIGURA 9. Germinación de ascosporas TRE^+ y TRE^- en medio MEL en presencia de 0.005% cicloheximida. Símbolos, como en la fig. 3.

Germination of TRE^+ and TRE^- ascospores in MEL medium supplemented with 0.005% cycloheximide. Symbols, as in fig. 3.

50mM pH 5.9. La eliminación de la glucosa del medio definido permite aún el inicio de la germinación en ausencia de fuente de carbono y fuente de energía externa (fig. 10, dcha.); tal iniciación ocurre tanto en presencia de fuente nitrogenada inorgánica como orgánica (YNB, *yeast nitrogen base*) e incluso cuando se adiciona a la fuente nitrogenada un análogo de la glucosa no metabolizable, como 2-deoxiglucosa al 1%. Estos resultados ponen de manifiesto que la mera presencia de una fuente nitrogenada asimilable sirve como estímulo germinativo y hace posible el inicio de la germinación a expensas de una fuente endógena de carbono y energía que parece representada por la trehalosa intracelular.

La demostración de que se requiere energía (interacción entre trehalosa y trehalasa) para la realización del primer paso del proceso germinativo se deduce de los datos representados en la figura 11. En ausencia de fuente nitrogenada, la

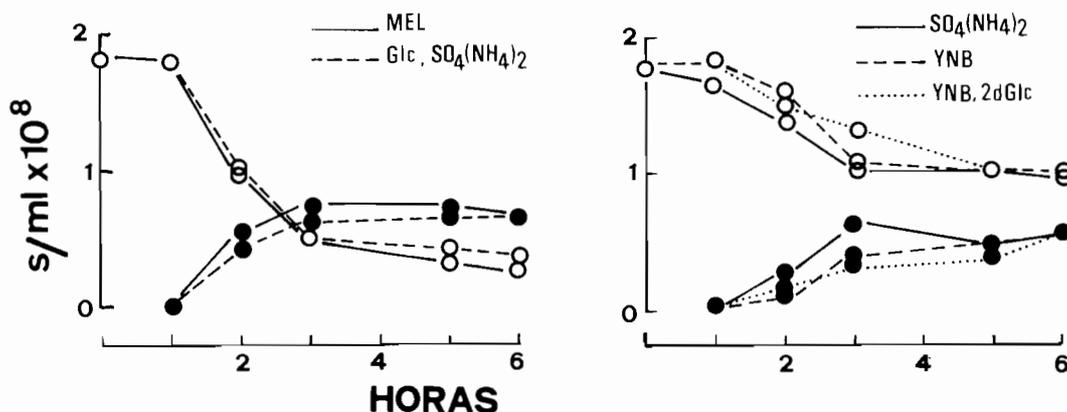


FIGURA 10. Iniciación de la germinación en presencia y ausencia de fuente carbonada. Izquierda: germinación en medio MEL y en medio sintético (1% glucosa, 0,5% sulfato amónico en tampón fosfato 50mM pH 5,9) a 29°C. Derecha: germinación en medios definidos sin fuente carbonada asimilable (YNB=yeast nitrogen base 0,5%; 2dGlc=2-deoxiglucosa 1%). Sólo las etapas iniciales de la germinación se representan en ambos casos. Círculos blancos=ascosporas refráctiles; círculos negros=ascosporas oscurcidas.

Initiation of germination with and without carbon source. Left: germination in MEL medium and in synthetic medium (1% glucose, 0,5% ammonium sulphate in 50mM phosphate buffer pH 5,9) at 29°C. Right: germination in defined media without assimilable carbon source (YNB=yeast nitrogen base 0,5%; 2dGlc=2-deoxyglucose 1%). Only the initial steps of germination are shown in both cases. Open circles=refractile ascospores; closed circles=dark ascospores.

incubación de ascosporas con glucosa tamporada permite también que se lleve a cabo el inicio de la germinación, que resulta luego bloqueada en el segundo paso (transición de formas oscuras a piriformes) por imposibilidad de síntesis proteica bajo condiciones de limitación en nutrientes nitrogenados. La presencia de glucosa externa, por tanto, supone *per se* un estímulo germinativo independiente, al igual que la sola presencia de fuente nitrogenada, como se indicó anteriormente. Esta estimulación no se registra en cambio en presencia de tampón fosfato solo (fig. 11). La adición de 1mM iodoacetato —un inhibidor de la glucólisis— o de 1mM N_3Na —un inhibidor de la respiración— a ascosporas estimuladas por glucosa impide la primera etapa de la germinación por bloqueo de los mecanismos energéticos que generan ATP por fosforilación a nivel de sustrato o mediante fosforilación oxidativa (véase fig. 11). Similares resultados se obtienen cuando se utilizan ascosporas estimuladas por la presencia de $SO_4(NH_4)_2$.

Los resultados indicados demuestran que la puesta en marcha del proceso germinativo requiere un sistema previo de generación de energía que actúa en la etapa morfológica correspondiente a la pérdida de refringencia y oscurecimiento de las ascosporas. La energía no deriva necesariamente de la utilización de compuestos carbonados exógenos asimilables del medio, ya que el proceso de iniciación de la germinación puede ocurrir en ausencia de dichos compuestos.

La interacción entre el sustrato endógeno, trehalosa, y la enzima pericelular, trehalasa, parece por tanto representar un mecanismo alternativo que permite la iniciación del proceso en condiciones pobres respecto a la fuente carbonada para las ascosporas, pero que pueden ofrecer una oportunidad de desarrollo para las células vegetativas resultantes. El patrón de utilización de azúcares por estas últimas parece, de hecho, diferir del de las ascosporas (SHIMODA, 1980), lo que supone que condiciones nutritivas deficientes para unas formas no lo sean para otras. En consecuencia, el sistema trehalosa-trehalasa puede permitir que la mera presencia de fuente de nitrógeno o de carbono utilizable, o cualquier otro estímulo germinativo ponga en marcha el proceso como una expectativa de desarrollo y supervivencia.

DISCUSIÓN

La aparición en esta levadura de la trehalasa, restringida a la fase de ascospora, y su desaparición tras la primera etapa de la germinación, coincide con la observación descrita por INOUE & SHIMODA (1981a, 1981b) sobre un rápido descenso inicial de la trehalosa endógena en ascosporas en condiciones de germinación. Por vías distintas a las seguidas por dichos autores, el presente trabajo ha llegado a establecer una implicación directa de la trehalasa en el proceso

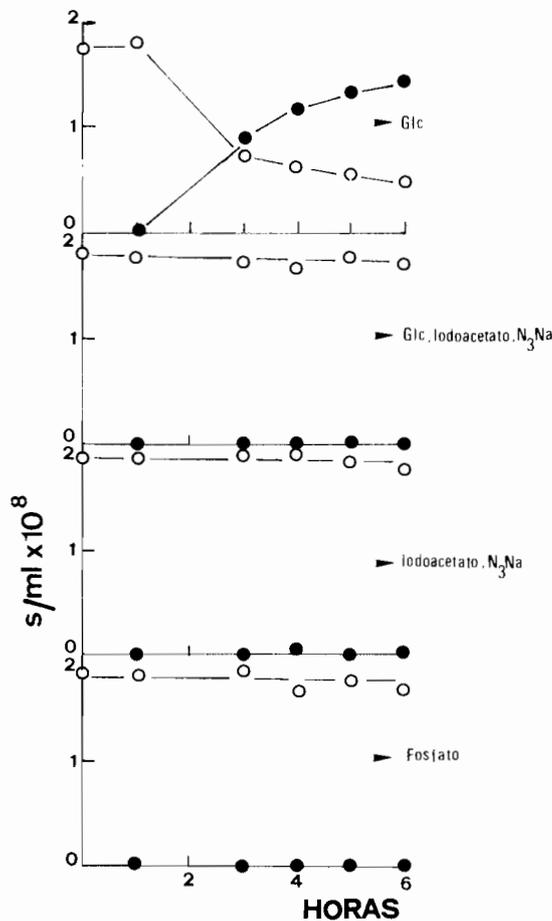


FIGURA 11. Efecto de inhibidores de la fosforilación sobre la primera etapa de la germinación. De arriba hacia abajo: ascósporas incubadas en 1% glucosa con tampón fosfato 50mM pH 5.9; idem, más iodoacetato 1mM y N_3Na 1mM; idem, sin glucosa; incubación en tampón fosfato solo. Símbolos, como en la fig. 10.

Effect of phosphorylation inhibitors on the first step of germination. From high to bottom: ascospores incubated in 1% glucose and 50mM phosphate buffer pH 5.9; idem, plus 1mM iodoacetate and 1mM N_3Na ; as above without glucose; ascospores in buffer alone. Symbols as in fig. 10.

germinativo. Ninguna de las enzimas previamente descritas como pericelulares en levaduras (invertasa, inulinasa, amilasa, fosfatasa, arilsulfatasa, glucañasa) parece poder desempeñar un papel funcional relevante en el proceso de la germinación excepto la trehalasa. Incluso la síntesis de la mayor parte de ellas está sometida a represión por catabolito carbonado en condiciones normales de germinación. Por ello, los pretratamientos seguidos para desnaturalizar *in situ* la

trehalasa, aunque no específicos, son válidos para deducir el efecto de su ausencia sobre la germinación.

De los resultados presentados se puede considerar que la trehalasa estudiada se encuadra en el grupo de las trehalasas no reguladoras donde, al igual que en otros casos, la compartimentalización a través de una barrera de permeabilidad mantiene separados enzima y sustrato como único mecanismo de control de la actividad enzimática (THEVELEIN, 1984). La K_m de la trehalasa de *S. pombe* es, sin embargo, algo mayor que los valores descritos para este parámetro en otras trehalasas no reguladoras de levaduras y hongos filamentosos (PRASAD & MAHESHWARI, 1978; KELLER *et al.*, 1982).

La interacción entre trehalosa y trehalasa durante la fase inicial de la germinación parece difícil de racionalizar a la vista de su distinta localización topográfica en los ascósporas. Es obvio, sin embargo, que, por ejemplo, una fuente nitrogenada como $SO_4(NH_4)_2$ debe permitir dicha interacción, pues las ascósporas germinan consumiendo energía generada a partir de trehalosa endógena en ausencia de fuente energética exógena. Según este criterio, cualquier substancia capaz de alterar la compartimentalización entre trehalosa y trehalasa constituye un estímulo germinativo capaz de poner en marcha la germinación, con independencia de que el proceso llegue o no a término. La naturaleza del mecanismo que lleva a cabo la interacción enzima-sustrato es una cuestión que está aún por resolver, aunque hay antecedentes sugestivos al respecto. Una posible interpretación es que la activación opere mediante cambios en la permeabilidad de la membrana que permitan la difusión de la trehalosa al exterior, donde sería hidrolizada pericelularmente por la trehalasa de la pared celular a la vez que la glucosa generada se transportaría de nuevo a la ascóspora (SUSSMAN, 1976). Este complejo mecanismo permitiría asegurar en todo momento a las ascósporas la energía necesaria y los metabolitos intermediarios requeridos para los primeros pasos de la germinación, incluso en medios deficientes en fuente carbonada, con tal que otros nutrientes asimilables, que podrían actuar como estímulo germinativo, estuvieran presentes.

La figura 12 resume en esquema el ciclo de desarrollo de *S. pombe* en relación con la aparición y desaparición de actividad trehalasa y detalla la secuencia morfológica durante el proceso germinativo con indicación de inhibidores de generación de energía y de síntesis proteica que bloquean, respectivamente, el primer y el segundo paso de dicho proceso morfogénico.

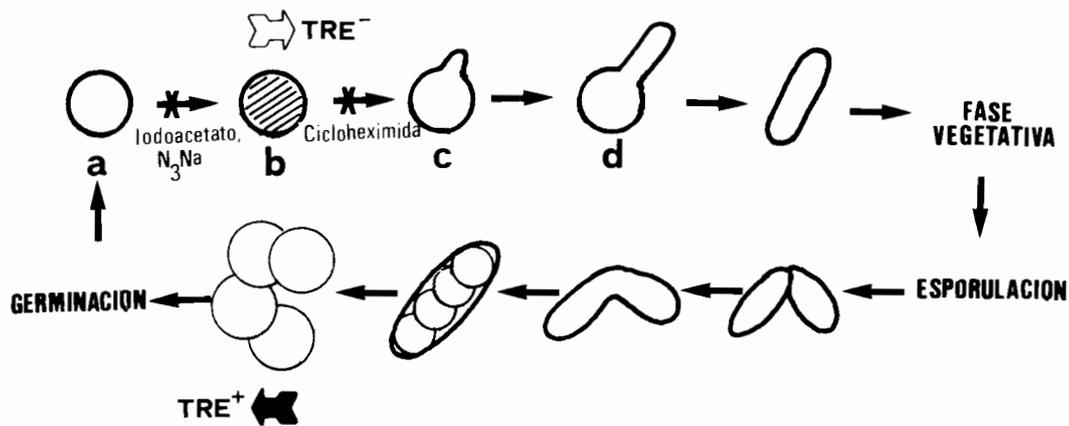


FIGURA 12. Representación esquemática del ciclo de desarrollo de *S. pombe* h⁹⁰. a=ascosporas refringentes; b=ascosporas oscuras; c=formas piriformes con inicio de germotubo; d=ascosporas germinadas. Las células vegetativas resultantes se fusionan para originar zigotos que forman ascos con cuatro ascosporas que se liberan al medio. Las flechas negra y blanca indican, respectivamente, la aparición y desaparición de la actividad trehalasa. Se señala también el bloqueo de las fases germinativas iniciales mediado por inhibidores de la formación de ATP y de la síntesis proteica.

Cycle of development in *S. pombe* h⁹⁰. a=refractile ascospores; b=dark ascospores; c=pear-shaped forms with outgrowth of germ tube; d=germinated ascospores. The vegetative cells fuse to form zygotes that originate asci containing four ascospores which are later released. Black and white arrows indicate presence and absence of trehalase activity, respectively. Also shown is the blockage of the initial steps of germination by inhibitors of ATP formation and protein synthesis.

BIBLIOGRAFÍA

- ARGUELLES, J. C., ROS, M. & GACTO, M. 1984. Regulación por fosforilación de la actividad trehalasa en levaduras. In: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA (Ed.), *Resúmenes de Ponencias y Comunicaciones. 2.ª Reunión Conjunta de Micología*: 94. Barcelona.
- ARNOLD, W. N. 1972. The structure of yeast cell wall: solubilization of a marker enzyme by the autolytic enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 247: 1.161-1.169.
- ESPOSITO, M. & ESPOSITO, R. 1975. Mutants of meiosis and ascospore formation. In: PRESCOTT, D. M. (Ed.), *Methods in Cell Biology*, XI: 303-325. Academic Press. New York.
- GACTO, M. 1973. *Aportaciones al estudio de enzimas líticas sobre la pared celular de levaduras*. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- INOUE, H. & SHIMODA, C. 1981a. Induction of trehalase activity on a nitrogen-free medium: a sporulation-specific event in the fission yeast. *Mol. Gen. Gen.*, 183: 32-36.
- INOUE, H. & SHIMODA, C. 1981b. Changes in trehalose content and trehalase activity during spore germination in fission yeast. *Arch. Microbiol.*, 129: 19-22.
- KELLER, F., SCHELLENBERG, M. & WIEMKEN, A. 1982. Localization of trehalase in vacuoles and trehalose in the cytosol of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 131: 298-301.
- LEUPOLD, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Ctes. rend. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.*, 24: 381-480.
- ORTIZ, C. H., MAIA, J. C. C., TENAN, M. N., BRAZPADRAO, G. R., MATTON, J. R. & PANEK, A. D. 1983. Regulation of yeast trehalase by a monocyclic, cyclic-AMP dependent phosphorylation-dephosphorylation cascade system. *J. Bacteriol.*, 153: 644-651.
- PANEK, A. D. 1963. Function of trehalose in baker's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100: 422-425.
- PRASAD, A. R. S. & MAHESHWARI, R. 1978. Growth and trehalase activity in the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Proc. Ind. Acad. Sci.*, 87B: 231-241.
- SHIMODA, C. 1980. Differential effects of glucose and fructose on spore germination in the fission yeast. *Can. J. Microbiol.*, 26: 741-745.
- SOMOGYI, M. 1950. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195: 19.
- SUSSMAN, A. S. 1976. Activators of fungal spore germination. In: WEBER, D. J. & HESS, W. M. (Ed.), *The fungal spore: form and function*: 101-139. John Wiley. New York.
- THEVELEIN, J. M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.*, 48: 42-59.
- VILLANUEVA, J. R. & GACTO, M. 1973. Characterization of glucanases of yeasts. In: SOUMALAINEN, H. (Ed.), *Metabolism and regulation of cellular processes*: 261-283. Otaniemi. Helsinki.