

DISS. ETH 8735

TREHALOSE UND TREHALASE IN HEFE

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von
PAUL SCHMUTZ
Dipl. Chem. ETH Zürich
geboren am 16. März 1958
von Zürich und Vechigen BE

Angenommen auf Antrag von :
Prof. Dr. A. Wiemken, Referent
Prof. Dr. Ph. Matile, 1. Korreferent
Prof. Dr. Th. Leisinger, 2. Korreferent

1988

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Wiemken', is written over the printed name.

ABSTRACT

The nonreducing disaccharide trehalose is widely distributed in fungi. In yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) this sugar is accumulated in large amounts during periods of reduced growth, while fast-growing fermentative cells are nearly devoid of it. Two ideas about its function have been proposed: On the one hand trehalose is considered as a reserve carbohydrate, on the other hand it is suspected to protect the cytoplasm during stress situations (Thevelein et al., 1984).

A rapid accumulation of trehalose was induced by a heat stress (45°C). It was shown that the accumulated trehalose protects the cells against subsequent heat treatments (Hottiger et al., 1987 I). Glucose was required for trehalose accumulation during heat stress. Cells pregrown on glucose were able to use fructose and maltose in addition to glucose for trehalose synthesis. Cells pregrown on lactate synthesized small amounts of trehalose from lactate. They synthesized trehalose rapidly upon addition of glucose.

Cooling to 27°C after heat stress caused a rapid decrease of the trehalose pool. The pool rose again upon a second heat stress.

In order to understand these rapid changes of the trehalose pool the regulation and compartmentation of the key enzymes of trehalose metabolism were studied. These are trehalose-6-phosphate synthase and trehalase, of which two isoenzymes are known: One isoenzyme has the pH optimum in the neutral and the other in the acid range (Londesborough and Varimo, 1984). The neutral trehalase occurs in an inactive or little active form and is activated by a cAMP-dependent phosphorylation (van Solingen and van der Plaat, 1975). Trehalase activity present in protoplasts was found to be located in vacuoles and an inactive form, which could be activated by cAMP and ATP in vitro, was found in the cytoplasm (Wiemken and Schellenberg, 1982). In the present work it is shown that the neutral trehalase in its active and its inactive or little active form is located in the cytosol, while the acid trehalase is located in the vacuoles. Therefore, the neutral and acid trehalases are called cytosolic (C-) and vacuolar (V-) trehalase, respectively.

In addition to the localization, further characteristics of the two enzymes were found: The glucose analogue Nojirimycin inhibited the V-trehalase and not much the C-trehalase. The heat stability of both enzymes was surprisingly low: The exposure of yeast homogenate to 42°C for 30 min. caused a decrease of the activity of both enzymes to about 50% of the original activity.

During heat stress there was a rise of trehalose-6-phosphate synthase activity concomitant to the trehalose accumulation. After cooling to 27°C the decrease of the trehalose pool was paralleled by a decrease of synthase activity (Hottiger et al., 1987 II). Surprisingly, despite the increase of the trehalose pool, during heat stress trehalase activity rose and remained more or less constant after cooling. A small increase of the inactive C-trehalase occurred. These results indicate a control of the trehalose pool by trehalose-6-phosphate synthase rather than by trehalase during heat stress and subsequent recovery from it. A pulse labelling experiment showed a rapid turnover of trehalose during heat stress, which is in good agreement with the high activity of the key enzymes of trehalose metabolism (Hottiger et al., 1987 II).

There are cases, however, in which the trehalose pool seems to be controlled by trehalase activity. Addition of glucose to starving cells caused activation of trehalase and concomittant rapid decrease of the trehalose pool (van der Plaats and van Solingen, 1974). It was tried in this work to carry out similar experiments with protoplasts in order to allow cell fractionation for localizing the activated trehalase. However, neither addition of glucose nor of cAMP caused trehalase activation in protoplasts. It was already known that addition of uncoupling agents to yeast cells induces a transient rise of the intracellular cAMP content followed by an activation of trehalase (Thevelein, 1984 III). By addition of the uncoupler (protonophore) CCCP to protoplasts C-trehalase was activated and trehalose was rapidly degraded. The activated enzyme remained entirely cytosolic, had still a neutral pH optimum and was unglycosylated. No evidence of a transport of activated C-trehalase into vacuoles (as proposed by Wiemken und Schellenberg, 1982) was obtained.

The role of V-trehalase is still enigmatic. The activity remained constant after addition of CCCP to protoplasts. Since V-trehalase differs in many respects from activated C-trehalase, it is improbable that C-trehalase is a precursor of V-trehalase (Wiemken und Schellenberg, 1982). Incubation of isolated vacuoles in trehalose did not result in trehalose hydrolysis, indicating that the vacuolar membrane was impermeable to trehalose. Only C-trehalase seems to be responsible for trehalose degradation. V-trehalase appears to be a typical extraplasmatic enzyme, such as the cell wall trehalase in *Neurospora crassa* ascospores (Hecker and Sussman, 1973).

ZUSAMMENFASSUNG

Das nichtreduzierende Disaccharid Trehalose ist in Pilzen weit verbreitet. In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wird dieser Zucker in Phasen reduzierten Wachstums angehäuft. Schnellwachsende, fermentative Hefezellen enthalten hingegen fast keine Trehalose. Zur Funktion der Trehalose in Hefe existieren zwei Vorstellungen: Einerseits wird sie als Reservekohlehydrat betrachtet, andererseits wird vermutet, dass sie das Cytoplasma während Stresssituationen schützt (Thevelein et al., 1984).

Durch einen Hitzestress (45°C) wurde eine rasche Anhäufung von Trehalose in Hefe induziert. Es wurde gezeigt, dass diese Trehalose die Zellen bei nachfolgenden Hitzebehandlungen schützt (Hottiger et al., 1987 I). Für die Trehaloseanhäufung unter Hitzestress musste im Medium Glucose vorhanden sein. Auf Glucose angezogene Hefezellen konnten zudem Fructose und Maltose verwenden. Auf Lactat angezogene Hefezellen akkumulierten nur wenig Trehalose; nach Zugabe von Glucose nahm auch bei ihnen der interne Trehalosegehalt stark zu.

Das Abkühlen der Zellen auf 27°C nach dem Hitzestress führte zu einem raschen Absinken des Trehalosegehalts. Ein zweiter Hitzestress bewirkte ein erneutes Ansteigen der Trehalose.

Um diese raschen Änderungen des intrazellulären Trehalosepools zu verstehen, wurden Regulation und Kompartimentierung der Schlüsselenzyme des Trehalosestoffwechsels untersucht. Es sind dies die Trehalose-6-Phosphat-Synthase und die Trehalase, von der zwei Isoenzyme bekannt sind. Das eine hat ein neutrales und das andere ein saures pH-Optimum (Londesborough und Varimo, 1984). Die neutrale Trehalase kommt in einer inaktiven oder wenig aktiven Form vor und wird durch eine cAMP-abhängige Phosphorylierung aktiviert (van Solingen und van der Plaat, 1975). Die in Protoplasten vorhandene Trehalaseaktivität wurde in den Vakuolen lokalisiert. Eine inaktive Form, die durch cAMP und ATP in vitro aktiviert werden konnte, wurde im Cytoplasma gefunden (Wiemken und Schellenberg, 1982). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass sowohl die aktive als auch die inaktive bzw. wenig aktive Form der neutralen Trehalase im Cytosol, die saure Trehalase hingegen in den Vakuolen lokalisiert ist. Die neutrale bzw. saure Trehalase wird daher als cytosolische (C-) bzw. vakuoläre (V-) Trehalase bezeichnet.

Zusätzlich zur Lokalisation wurden weitere Eigenschaften der beiden Enzyme bestimmt: Das Glucoseanalogon Nojirimycin hemmte die V-Trehalase stärker als die C-Trehalase. Die Hitzestabilität der beiden Enzyme war überraschend gering: In einem Hefehomogenat, das während 30 min. einer Temperatur von 42°C ausgesetzt war, sank die Aktivität von C- und V-Trehalase auf die Hälfte des ursprünglichen Werts.

Unter Hitzestress fand gleichzeitig mit der Anhäufung von Trehalose eine Zunahme der Trehalose-6-Phosphat-Synthaseaktivität statt. Nach Abkühlung auf 27°C wurde die Abnahme des Trehalosegehalts von einer Abnahme der Synthaseaktivität begleitet (Hottiger et al., 1987 II). Ueberraschenderweise nahm die Trehalaseaktivität während des Hitzestresses trotz der gleichzeitigen Trehaloseanhäufung zu. Nach dem Abkühlen blieb sie mehr oder weniger konstant; es fand aber eine leichte Zunahme der inaktiven C-Trehalase statt. Diese Resultate weisen darauf hin, dass der Trehalosepool unter Hitzestress und bei der Erholung davon durch Trehalose-6-Phosphat-Synthase und nicht durch Trehalase reguliert wird. Ein "pulse labelling"-Experiment zeigte einen

raschen Umtrieb der Trehalose unter Hitzestress, was mit den hohen Aktivitäten der Schlüsselenzyme des Trehalosestoffwechsels gut übereinstimmt (Hottiger et al., 1987 II).

Es gibt allerdings Fälle, in denen der Trehalosepool durch die Trehalaseaktivität reguliert wird. Zugabe von Glucose zu stationären Zellen bewirkte eine Aktivierung der Trehalase und gleichzeitig eine rasche Abnahme des Trehalosepools (van der Plaats und van Solingen, 1974). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ähnliche Experimente mit Protoplasten durchzuführen, um dann mittels Zellfraktionierung die aktivierte C-Trehalase lokalisieren zu können. Weder die Zugabe von Glucose noch von cAMP führte jedoch zu einer Trehalaseaktivierung. Es war bereits bekannt, dass die Zugabe von Entkopplern zu Hefezellen eine vorübergehende Zunahme des intrazellulären cAMP-Gehalts bewirkt, gefolgt von einer Aktivierung der Trehalase (Thevelein, 1984 III). Durch Zugabe des Entkopplers (Protonophors) CCCP zu Protoplasten wurde nun eine Aktivierung der C-Trehalase und ein rascher Abbau der Trehalose erreicht. Das aktivierte Enzym verblieb vollständig im Cytosol, hatte immer noch ein neutrales pH-Optimum und war nicht glycosyliert. Es wurden keine Hinweise auf einen Transport der aktivierten C-Trehalase in die Vakuolen gefunden (wie dies von Wiemken und Schellenberg 1982 vorgeschlagen wurde).

Die Rolle der V-Trehalase bleibt rätselhaft. Ihre Aktivität blieb nach der Zugabe von CCCP zu Protoplasten konstant. Da V-Trehalase sich in verschiedener Hinsicht von C-Trehalase unterscheidet, ist es unwahrscheinlich, dass C-Trehalase eine Vorstufe von V-Trehalase ist (Wiemken und Schellenberg, 1982). Die Inkubation isolierter Vakuolen bewirkte keine Hydrolyse von Trehalose, was darauf hindeutet, dass der Tonoplast für Trehalose undurchdringlich ist. Anscheinend ist die C-Trehalase für den Trehaloseabbau allein verantwortlich. V-Trehalase erscheint als ein typisches extraplasmatisches Enzym, vergleichbar mit der Zellwandtrehalase in Ascosporen von *Neurospora crassa* (Hecker und Sussman, 1973).