



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas

Facultad de Química

En *Saccharomyces cerevisiae* la asociación enzimática confiere resistencia a la inactivación mediada por altas concentraciones de solutos compatibles.

Tesis

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Presenta

Daniela Araiza Olivera Toro

Tutor: Dr. Salvador Uribe Carvajal





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A Salvador, un día me dijiste que lo que hiciera en la vida tenía que apasionarme y aquí estoy. Gracias por confiar en mí, por tu guía y sobre todo tu amistad.

A los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Antonio Peña Díaz y el Dr. José de Jesús García Trejo por su asesoría en el proyecto.

A la Dra. Adela Mújica por su guía y a los integrantes de su laboratorio, Armando y Natalia por todas las enseñanzas.

A mi pa, ma, Ji, Ru y Juan. Gracias por hacer de mi lo que soy, por estar en todo momento, por creer en mí, por hacerme sentir la persona más especial, por lo maravilloso que es estar con ustedes y sobre todo por su amor. Gracias por la increíble familia que son.

A mi abue, gracias por todo el amor que nos diste y por lo que somos.

A Carlos, por tu amor, por hacerme la persona más feliz y por estar juntos. Hoppipolla.

A los del labo, Luis (por excelentes momentos), Sergito (por tu escucha), Manu (por tu confianza), Rod (por tu guía), Chris (por acompañarme), Gis (por tus locuras), Sergio (por tu ayuda) Alfredo (por tu platica). A todos gracias por ayudarme en esta faceta, por compartir sus conocimientos, por los consejos, la paciencia y el apoyo. En este trabajo en especial a Sergito, Luis y Rod.

A mis amigos: Lidia, Eduardo, Rebeca, Rox, Chavis, Sergio, Elsa, Esme, Pao, Anita, Zahuiti, David, Vic, Jonathan, Miguel y Juan Pablo por compartir momentos inimaginables.

A Ramón Méndez y Roció Romualdo por siempre ayudarnos.

INDICE

1	RESUMEN.....	6
2	INTRODUCCIÓN.....	7
2.1	Solutos Compatibles.....	8
2.1.1	Posibles mecanismos de estabilización.....	9
2.1.2	Protección por solutos compatibles.....	10
2.1.3	Toxicidad de la trehalosa.....	11
2.1.4	Síntesis y degradación de solutos compatibles.....	14
2.2	Metabolón y canalización.....	19
2.2.1	¿Qué es la asociación enzimática?.....	19
2.2.2	Asociaciones enzimáticas.....	21
3	HIPÓTESIS.....	25
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	General.....	26
4.2	Particulares.....	26
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1	Actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa....	27
5.2	Actividad de hexocinasa.....	28
5.3	Actividad de aldolasa.....	28
5.4	Actividad de fosfoglicerato cinasa.....	29
5.5	Actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.....	30
5.6	Extractos citoplásmicos de levadura.....	30

5.7 Producción de etanol mediada por trehalosa.....	32
5.8 Análisis de los datos... ..	33
6 RESULTADOS.....	34
6.1 La trehalosa inactiva algunas pero no a todas las enzimas aisladas de la glucólisis.....	34
6.2 El efecto de inactivación de la trehalosa cambia cuando las enzimas se encuentran en mezclas.....	38
6.3 La sensibilidad de la GAPDH a la trehalosa no se modifica con otras proteínas.....	42
6.4 La aldolasa no modifica la sensibilidad a la trehalosa de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, enzima de una vía metabólica diferente a la glucólisis.....	44
6.5 La inhibición de la fermentación ocurre únicamente a concentraciones elevadas de trehalosa.....	46
7 DISCUSIÓN.....	49
8 CONCLUSIONES.....	54
9 REFERENCIAS.....	55

ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALD	Aldolasa
ATH	Trehalasa ácida
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
HXK	Hexocinasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
NTH	Trehalasa neutra
P _i	Ortofosfato
PGK	Fosfoglicerato cinasa
PFK	Fosfofructocinasa
STRE	Elemento de respuesta al estrés
TPS	Trehalosa 6-P sintetasa/fosfatasa
YPD	Medio de cultivo: extracto de levadura-peptona-dextrosa

RESUMEN

Los solutos compatibles son moléculas que se acumulan durante el estrés en plantas, insectos y levaduras. Estos solutos deben eliminarse para poder mantener un crecimiento celular óptimo, de lo contrario es probable que la actividad de algunas enzimas sea inhibida. En contraste, la interacción enzimática optimiza el metabolismo a través de mecanismos tales como la canalización de intermediarios. Por tal motivo se decidió probar el efecto mediado por los solutos compatibles en algunas enzimas glucolíticas y observar si la asociación de enzimas evita la inhibición mediada por el soluto compatible. En este estudio se observó que algunas enzimas aisladas como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la hexocinasa (HXK) son inactivadas, pero otras como la aldolasa (ALD) y la fosfoglicerato cinasa (PGK) muestran resistencia a la inactivación. Sin embargo cuando las enzimas sensibles a la inactivación mediada por trehalosa, GAPDH y HXK, se mezclan con las resistentes, ALD y PGK, las primeras son protegidas contra la inactivación. Por otro lado se observó que la GAPDH no era protegida ni por HXK, ni por albúmina, ni por la lactato deshidrogenasa. Una enzima que no pertenece a la glucólisis, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) no fue protegida por la ALD contra la trehalosa. Esto sugiere que la protección mediada por la mezcla es específica. En extractos citoplásmicos de levadura se observó que la trehalosa no inhibe la fermentación, sugiriéndose que en la mezcla de todas las enzimas involucradas en la producción de etanol a partir de glucosa existe asociación. Se sugiere que la asociación de enzimas es importante para el mantenimiento de la actividad de al menos algunas vías metabólicas durante o después de la acumulación de solutos compatibles que se observa durante la respuesta al estrés.

INTRODUCCION

El ambiente celular contiene una alta concentración de iones orgánicos e inorgánicos, pequeñas moléculas de señalización, intermediarios metabólicos, lípidos y macromoléculas tales como ácidos nucleicos y proteínas (Ovádi y Saks, 2004). La concentración intracelular de la mayoría de estos componentes es constante, aunque existen algunas moléculas pequeñas conocidas como solutos compatibles, que aumentan dramáticamente su concentración durante la respuesta al estrés (De Virgilio y cols., 1994), saturando aún más el citoplasma celular (Somero y cols., 1986).

El efecto de saturación puede modificar el volumen excluido, el desplegamiento proteico y la formación de estructuras oligoméricas o complejos multienzimáticos, además de provocar la producción no fisiológica de agregados proteicos como las fibras amiloides (Ellis, 2001). Las fibras amiloides son importantes en el desarrollo de patologías (Ovádi y cols., 2004).

La saturación además de favorecer la asociación proteica, modifica las interacciones macromoleculares, dependiendo del tamaño y forma de las moléculas involucradas (Ellis, 2001). Por otro lado, se ha observado que el hacinamiento molecular restringe la movilidad de grandes solutos y la unión entre macromoléculas incluso restringe la movilidad de solutos pequeños (Verkman y cols., 2002).

Solutos Compatibles

Hay células que frecuentemente se ven expuestas a distintas situaciones de estrés como aumento de la temperatura, congelamiento, deshidratación, ayuno, químicos y estrés abiótico como oxidativo y osmótico; por tal motivo emplean diferentes mecanismos para sobrevivir (Hottiger y cols., 1994; Hounsa y cols., 1998; Singer y Lindquist, 1998). Algunos de estos mecanismos consisten en acumular moléculas orgánicas pequeñas, como derivados de carbohidratos y de aminoácidos que estabilizan la conformación nativa de las proteínas y protegen a la célula (Felix y cols., 1999; Ocón y cols., 2007; Zancan y Sola-Penna, 2005).

Estos compuestos llamados solutos compatibles pueden ser acumulados en altas concentraciones sin afectar el metabolismo o la actividad enzimática. Entre ellos encontramos aminoácidos como glicina, alanina, prolina, glutamato, N-acetil- β -lisina, glicina-betaína; ectoína e hidroxiectoína; monosacáridos como la glucosa; disacáridos como la trehalosa, sacarosa; derivados de carbohidratos como el glucosilglicerol y péptidos pequeños que se acumulan en bacterias heterotróficas y fototróficas (Nunes y cols., 1995; Zancan y Sola-Penna, 2005). Los polioles como el glicerol y el arabinitol, son los solutos compatibles más acumulados en levadura y hongos, mientras que los derivados de carbohidratos como el glucosilglicerol, galactosilglicerol y manosilglicerol, y los polioles se acumulan más en algas (Nunes y cols., 1995). Estas moléculas se acumulan en el citoplasma durante el estrés y se eliminan en cuanto éste desaparece (Sleator y Hill, 2002; Welsh y cols., 2000).

Entre los solutos compatibles encontramos a la α,α -trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranósido), que aparentemente es uno de los mejores estabilizadores y protectores (Kaushik y Bhat, 2003). La trehalosa es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa unidas en el carbono 1 que diferentes organismos sintetizan y acumulan para sobrevivir al estrés ambiental tales como la temperatura extrema, salinidad y deshidratación (Ocon y cols., 2007; Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998). Al acumularse, la trehalosa alcanza alrededor del 20% del peso seco de la célula. Sirve como

fuelle de carbono durante periodos de inanición o bien, como protector a cambios de temperatura, deshidratación o químicos. Se localiza en el citosol, y en las vacuolas en menor grado (Keller y cols., 1982). La máxima concentración encontrada in vivo es ligeramente superior a 0.5 M (Benaroudj y cols., 2001; Hottiger y cols., 1994; Sampedro y cols., 2001; 2002). Por eso, algunas enzimas aisladas que requieren de concentraciones mayores para ser protegidas contra la desnaturalización, como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de la levadura, pueden no ser protegidas *in situ* (Hottiger y cols., 1994).

Los solutos compatibles protegen la actividad y estructura de una serie de proteínas aisladas y de membranas, probablemente por una combinación de diversos mecanismos que incluyen tanto la interacción directa de las moléculas de agua con la superficie de la proteína como la interacción preferencial con el soluto (Crowe y cols., 1984; Timasheff, 1993). Es así que la alta viscosidad promovida por el soluto compatible, inhibe cualquier gran cambio estructural que pudiera ocurrir en las proteínas (Kaushik y Bhat, 2003; Sampedro y Uribe, 2004).

Posibles mecanismos de estabilización

Timasheff y colaboradores sugieren que los carbohidratos estabilizan la estructura plegada de las proteínas en solución mediante una interacción indirecta, fenómeno conocido como hidratación preferencial de las proteínas (Timasheff, 1993). Se postula que en un sistema trifásico que consiste en agua, proteína y cosolvente (un disacárido), el cosolvente estabiliza a la proteína al excluirse del agua circundante que compone la capa de solvatación de la proteína (Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998; Timasheff, 1993). Como resultado, la proteína está preferentemente hidratada; en este caso, la proporción de la capa de solvatación y el volumen aparente disminuyen, lo que da lugar a una conformación más estable (Kaushik y Bhat, 2003; Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998; Timasheff y cols., 1993). Se ha observado que la trehalosa estabiliza a la RNAsa A por el incremento de la tensión superficial

dada por el medio, lo que conlleva a la hidratación preferencial de la proteína (Sola-Penna y cols., 1997). La interacción de las moléculas del cosolvente con esta proteína y otras como la lisozima, el citocromo c y el α -quimotripsinógeno, depende de las propiedades fisicoquímicas tanto de la proteína como del cosolvente, por lo que el efecto estabilizador varía (Kaushik y Bhat, 2003). Esta estabilización depende de un balance entre las interacciones de las proteínas en estado nativo y desnaturalizado junto con las moléculas de cosolvente. Aunque la naturaleza de las proteínas contribuye a la interacción proteína-cosolvente, se ha observado que la trehalosa es un excelente estabilizador ya que forma puentes de hidrogeno por medio del grupo hidroxilo con las moléculas de agua, además tiene la capacidad para modificar la capa de solvatación de las proteínas (Kaushik y Bhat, 2003; Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998).

Para tratar de entender este mecanismo de estabilización proteica mediado por un soluto compatible se han estudiado algunas enzimas como la pirofosfatasa de levadura, sometida a inactivación térmica de 50 °C y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa inactivada por cloruro de guanidina, en el que el soluto compatible promueve el fenómeno de hidratación preferencial, evitando con esto la inactivación de las enzimas (Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998). En la fosfoglucosa isomerasa de la levadura, la glutamato deshidrogenasa de bovino y la endonucleasa de *E. coli* también se ha observado que el soluto compatible, trehalosa, a concentraciones fisiológicas aumenta la estabilidad de las enzimas ante la inactivación térmica (Hottiger y cols., 1994).

Protección por solutos compatibles

Cuando la levadura se expone a choque térmico, acumula solutos compatibles, lo cual puede deberse ya sea a que la actividad de síntesis aumenta o a que la degradación disminuye (Singer y Linqvist, 1998). Efectos similares se observan cuando la levadura se deshidrata; bajo esta condición, el soluto puede alcanzar hasta el 35% del peso seco de la célula, lo que es

importante para la capacidad de sobrevivir a la desecación (Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998). Se puede sugerir que existe una correlación entre la acumulación de solutos compatibles y la termotolerancia.

En *E. coli*, la síntesis del soluto está involucrada en la termotolerancia durante la fase estacionaria (Hengge-Aronis y cols., 1991). La aclimatación del nemátodo *S. carpocapsae* a ambientes calientes o fríos aumenta la tolerancia al calor (40 °C por 8 h) y al congelamiento (-20 °C por 4 h); este aumento en resistencia correlaciona positivamente con el incremento en los niveles de soluto compatible (Jagdale y Grewal, 2003) y en algunas plantas como la planta de la resurrección *Selaginella lepidophylla* se ha visto una importante acumulación de soluto compatible durante la deshidratación (Zentella y cols., 1999).

En el laboratorio se evaluó el papel protector sobre la actividad de la H⁺-ATPasa aislada de la membrana plasmática de la levadura *Kluyveromyces lactis* (Sampedro y cols., 1998). Se observó que la H⁺-ATPasa es protegida durante la liofilización y además evita la termoinactivación hasta 40 °C. En este trabajo analizaron los efectos de la acumulación de solutos compatibles observados en la levadura tanto *in vivo* como en la enzima aislada.

Toxicidad de la trehalosa

Contrario al efecto protector, también se ha demostrado, por lo menos *in vitro*, que algunos solutos compatibles como la trehalosa y el glicerol inhiben algunas enzimas (Faber-Barata y Sola-Penna, 2005; Singer y Linqvist, 1998). Al respecto, se ha propuesto que algunas enzimas sufren grandes cambios conformacionales durante la actividad catalítica (Hottiger y cols., 1994) y estos cambios conformacionales son inhibidos por la viscosidad generada por los solutos compatibles (Sampedro y cols., 2002; Sampedro y Uribe, 2004; Singer y Lindquist, 1998). La consecuencia de la inhibición de diferentes enzimas es el funcionamiento metabólico inadecuado.

Se ha propuesto que diversas enzimas son inhibidas al hacerse rígidas, debiéndose a que los solutos compatibles las estabilizan en sus estados más compactos (Esmann y cols., 2008; Sampedro y cols., 2002; Singer y Lindquist, 1998).

Un ejemplo de inhibición enzimática mediada por solutos compatibles es la H⁺-ATPasa de *Kluyveromyces lactis*, donde se ha detectado una correlación entre la viscosidad y la disminución de la V_{max} y de la eficiencia catalítica ($V_{max}/S_{0.5}$) (Sampedro y cols., 2002; Uribe y Sampedro, 2003). Para evaluar este papel de la viscosidad sobre la actividad enzimática, se utilizó la H⁺-ATPasa a 20 °C en ausencia y presencia de agentes viscosogénicos. La inhibición se refleja en la disminución de V_{max} y aumento en la $S_{0.5}$, lo cual se debe a la inhibición de la difusión del sustrato (ATP) a través del soluto que rodea a la proteína (Sampedro y cols., 2002; Uribe y Sampedro, 2003). El efecto de la viscosidad sobre la hidrólisis de ATP catalizada por la enzima se determinó aumentando las concentraciones de los diferentes solutos. En ese ensayo se tomó en cuenta que la temperatura disminuye la viscosidad, lo que modificó la actividad de la H⁺-ATPasa (Uribe y Sampedro, 2003). Esto concuerda con la teoría de Kramer que indica que la viscosidad del solvente inhibe los cambios conformacionales en las proteínas y esto resulta en la inhibición de catálisis enzimática. La viscosidad del medio puede modificar la cinética enzimática o no (Sampedro y cols., 2002): algunas enzimas como la fosfoglicerato cinasa presentan cierta movilidad, pero algunas otras como la piruvato cinasa muestran una enorme restricción de movimiento. Es así que el efecto inhibitorio parece ser dependiente de la viscosidad de los solutos compatibles, trehalosa y glicerol.

En otras enzimas tales como la glutatión reductasa y la Na⁺/K⁺-ATPasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglucosa isomerasa de levadura, la pirofosfatasa de levadura y la glutamato deshidrogenasa de bovino se ha observado una reducción ligera de la actividad enzimática in vitro, de tal manera podemos decir que la trehalosa es relativamente tóxica a concentraciones elevadas (Esmann y cols., 2008; Hottiger y cols., 1994; Sebollela y cols, 2004).

El aumento de temperatura es un tipo de estrés donde se acumula trehalosa. En la glutatión reductasa se observó que la adición de 1.5 M de trehalosa a 25 °C inhibe alrededor del 70% de la actividad enzimática. La inhibición fue prácticamente abolida cuando se incrementó la temperatura hasta 70 °C. En un inicio se sugirió que la inhibición por la trehalosa podía deberse a cambios estructurales de la proteína, sin embargo no se detectaron cambios usando dicroísmo circular o espectroscopía, por lo que se planteó que la inhibición se debía a la viscosidad, que aumentó casi al doble (Sebollela y cols., 2004; Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998). Los resultados mostraron que existe correlación entre la viscosidad de las soluciones con trehalosa y la inhibición de la actividad enzimática a diferentes temperaturas. Esto sugiere que una vez pasado el estrés, se requiere la rápida degradación del disacárido para la recuperación de la función (Sebollela y cols., 2004).

En el caso de la pirofosfatasa citoplásmica, la alta concentración de trehalosa inhibe la actividad enzimática a temperatura ambiente (Lopes y cols., 1999). Esto puede deberse a que la enzima adquiere una conformación a 25°C, disminuyendo la actividad enzimática hasta el 60% en presencia de 1 M de trehalosa. En contraste, a una mayor temperatura, cuando la movilidad de la proteína es mayor, se observa la recuperación de la actividad catalítica (Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1994). Esto se debe a que la inhibición inducida por el disacárido disminuye al incrementar la temperatura, alcanzando el 31% a 40 °C (Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1994). Igualmente sucede con la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la cual a 25 °C se inhibe aproximadamente 57%, mientras que a 40 °C la inhibición es tan solo del 30%. Al parecer la estructura nativa de la pirofosfatasa y de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se mantiene ante la adición de trehalosa, ya que el espectro de emisión de fluorescencia intrínseco no se altera por la presencia del disacárido (Sebollela y cols., 2004).

La trehalosa se ha descrito también como modulador de la actividad enzimática, pues es capaz de: disminuir la K_m para P_i en la fosforilación catalizada por la ATPasa ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$) del retículo sarcoplásmico, de desacoplar la ATPasa de la membrana y de inhibir el bombeo de protones de la

ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) de levadura (Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998). En la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, la trehalosa activa la fosforilación y disminuye la K_m aparente para el P_i a pH 7.4. Al agregar el carbohidrato, aumenta la afinidad por el P_i durante la fosforilación, llevando a la enzima cerca del equilibrio y también favoreciendo la separación de P_i en el sitio hidrofóbico. Ambos efectos se explican por el cambio en la actividad del agua promovido por el carbohidrato (Chini y cols., 1991). Esta observación muestra la capacidad de modificar las diferentes conformaciones de la enzima. Se ha reportado para esta enzima que la trehalosa puede disminuir la movilidad por su interacción con los fosfolípidos de la membrana, causando un cambio conformacional, y por tanto alterando el transporte de Ca^{2+} (Sola-Penna y cols., 1994).

Probablemente la alta viscosidad producida por la trehalosa obliga a la célula a eliminar rápidamente el soluto compatible en el momento que termina el estrés (Attfield, 1987); si este mecanismo falla, se observa una disminución en el crecimiento (Wera y cols., 1999).

Síntesis y degradación de solutos compatibles

El control de los niveles de trehalosa es muy importante durante las diferentes fases de crecimiento y desarrollo celular, ya que permite que las células sobrevivan en condiciones de estrés. Los niveles intracelulares son resultado del balance entre la síntesis y la degradación enzimática (Thevelein y Hohmann, 1995). En el caso de la levadura, la síntesis de trehalosa es catalizada por el complejo multienzimático trehalosa 6-sintetasa/fosfatasa (TPS) que está formado por 4 genes: TPS1 y TPS2 que codifican para la trehalosa-6-fosfato sintasa y la trehalosa-6-fosfato fosfatasa, respectivamente, mientras que la TPS3 y TSL1 codifican para las subunidades reguladoras del complejo TPS. La trehalosa se sintetiza en dos pasos: el primero catalizado por Tps1p, condensa la glucosa 6-fosfato con la UDP-glucosa para formar la trehalosa 6-fosfato y el segundo catalizado por la Tps2p lleva a cabo la hidrólisis del grupo fosfato para formar la trehalosa (Fig. 1). La síntesis está regulada por la proteína cinasa dependiente de AMPc que fosforila a la Tps3p y

Tsl1p. La expresión de los genes TPS1, TPS2, TPS3 y TSL1 es inducida por el aumento de temperatura (Winderickx y cols., 1996). Esta inducción se lleva a cabo por la unión de los factores de transcripción Msn2p y MSn4p a la secuencia STRE (Stress Responsive Element) ubicado en el promotor de dichos genes.

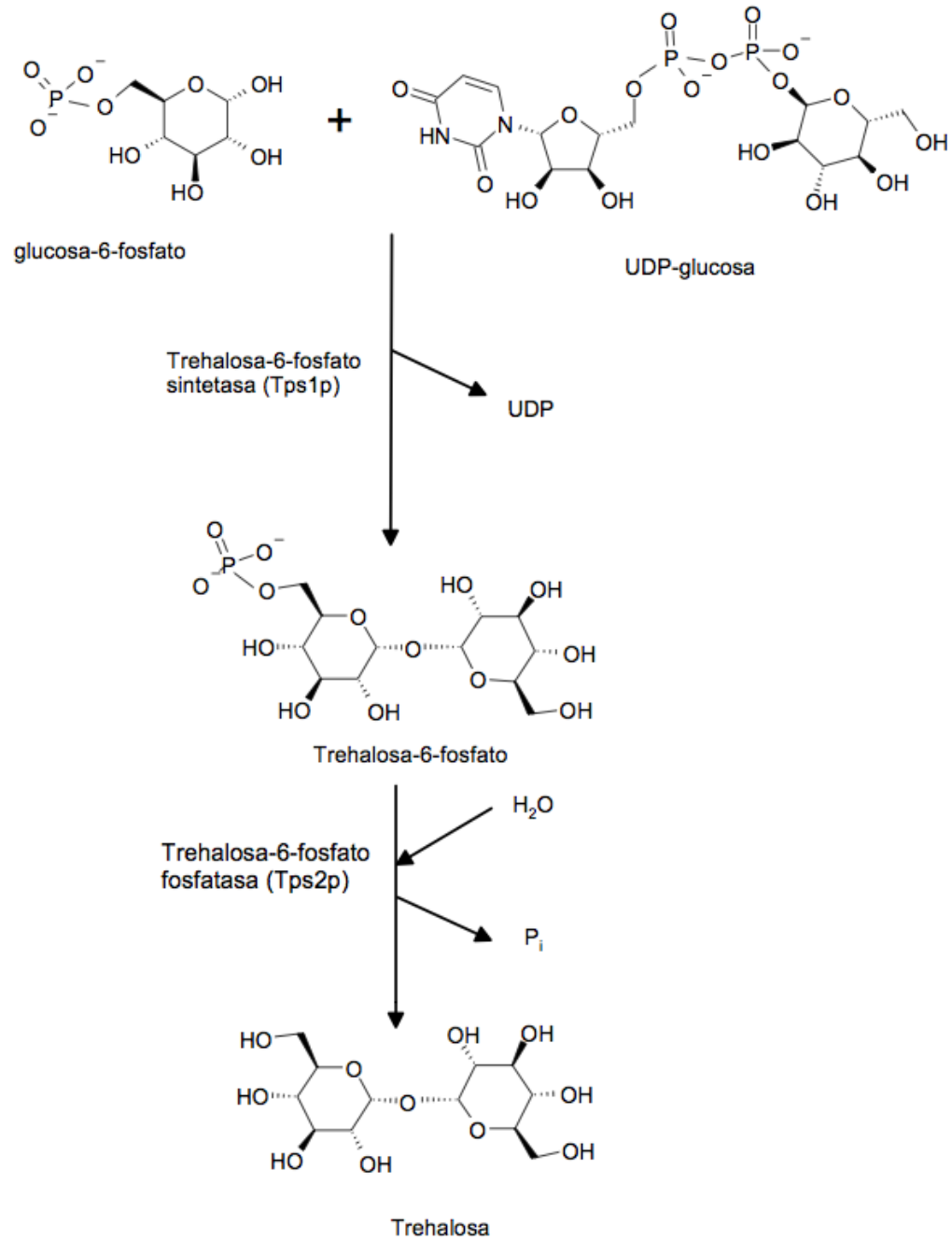


Figura 1. Síntesis de trehalosa

Se lleva a cabo por el complejo TPS en dos pasos. En el primero la Tps1p condensa la glucosa 6-fosfato con la UDP-glucosa para formar trehalosa 6-fosfato. En el segundo la Tps2p hidroliza a la trehalosa 6-fosfato en trehalosa y P_i.

La hidrólisis de la trehalosa a glucosa se lleva a cabo por medio de dos enzimas, una citoplásmica o trehalasa neutra, codificada por NTH1 y otra vacuolar o trehalasa ácida codificada por ATH1 (Basu y cols., 2006). La trehalasa neutra es responsable de la hidrólisis y eliminación intracelular de la trehalosa; se encuentra regulada por fosforilación llevada a cabo por una proteína cinasa dependiente de AMPc (Fig. 2). La trehalasa ácida es esencial para la asimilación de la trehalosa y parece estar involucrada en la utilización de trehalosa como fuente de carbono (Jules y cols., 2004; Nwaka y cols., 1994; Ratnakumar y Tunnacliffe, 2006; Winkler y cols., 1991).

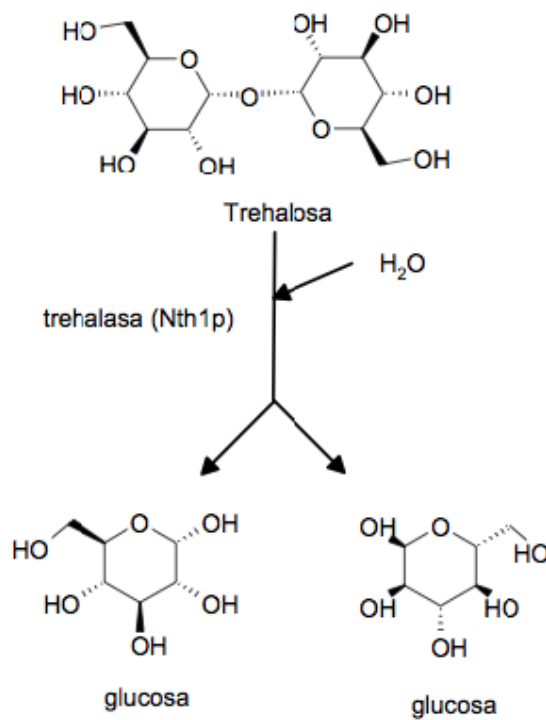


Figura 3. Hidrólisis de trehalosa

La trehalasa neutra (Nth1p) hidroliza la trehalosa a dos moléculas de glucosa. Esta reacción también es llevada a cabo en el citoplasma por la Nth2p y en la vacuola por la trehalasa ácida (Ath1p).

En condiciones de estrés los niveles de proteínas que sintetizan trehalosa aumentan, sin embargo cuando esto concluye la trehalasa, proteína encargada de degradar al disacárido, aumenta de manera importante (Fernández y cols., 1998; Hottiger y cols., 1994; Singer y Lindquist, 1998). Se ha encontrado que cepas mutantes incapaces de degradar la trehalosa (Nwaka y cols., 1995a; 1995b; Singer y Lindquist, 1998; Wera y cols., 1999) no pueden reanudar su metabolismo cuando desaparece la situación de estrés, a menos que la trehalosa sea eliminada.

Aún durante el estrés la célula mantiene una alta tasa de flujo en las vías metabólicas importantes, abasteciendo la energía y metabolitos necesarios para que la célula sobreviva (Hoffmann y Holzhütter, 2009; Hounsa y cols., 1998). Los mecanismos que la célula utiliza para evadir la inhibición mediada por la trehalosa en las vías metabólicas clave son desconocidos hasta ahora. Una posibilidad aun sin explorar es que la asociación de enzimas sea la que prevenga la inhibición. A continuación describimos los datos que se tienen sobre la asociación de las enzimas en la célula.

Metabolón y canalización

¿Qué es la asociación enzimática?

El concepto de célula se ha ido modificando con el tiempo; antes se creía que era una bolsa de enzimas solubles rodeada por una membrana formada de lípidos. Actualmente se tiene el concepto de que existen diferentes barreras lipídicas y proteicas rodeando a islas de fases acuosas en las que se llevan a cabo diversas actividades y en las que por medio de la saturación se promueven asociaciones ya sean proteína-proteína, proteína-membrana, proteína-ácidos nucleicos o proteína-polisacárido (Srere y Ovádi, 1990). La fase proteica está compuesta tanto de una red de microtrabéculas que organiza a las macromoléculas citoplásmicas como por las enzimas integrales de la citomatriz (Porter y cols, 1983).

La saturación macromolecular da lugar a asociaciones proteicas en las que por medio de canalización se transfieren intermediarios de una enzima a la siguiente sin necesidad de difusión hacia la fase acuosa (Minton y Wilf, 1981; Ovádi y cols., 1996). Se sugirió que este comportamiento catalítico era único de los complejos enzimáticos debido a la organización estructural (Gaertner y cols., 1978). La canalización (channeling) es el fenómeno en el que un intermediario se transfiere del sitio activo de una enzima a la siguiente para formar un producto y ese producto a su vez es el sustrato de la siguiente enzima hasta obtener un producto final (Al-Habori, 2000; Robinson y cols., 1987). La canalización requiere interacciones estables, complejos multienzimáticos llamados metabolones, y da lugar a vías metabólicas más eficientes (Al-Habori, 1995; Cascante y cols., 1994; Ovádi y Srere, 1996; Ovádi y Saks, 2004; Srere y Ovádi, 1990; Srere, 1987). Esta asociación modifica tanto la estructura como la función de las especies que interactúan y modifica las propiedades tanto funcionales como reguladoras (Ovádi y Saks, 2004).

La canalización de sustratos entre las enzimas se facilita por la compartimentalización de la célula en diferentes organelos y estructuras. Esto sirve para colocalizar y optimizar tanto las concentraciones de enzimas como de sustratos (Jorgensen y cols., 2005). Es por eso que existen muchas

ventajas para formar un metabolón, como son: I) Promueve una mayor eficiencia catalítica de las enzimas por medio de la canalización de un intermediario que se forma en el sitio activo de una enzima hacia el sitio activo de la siguiente (Jorgensen y cols., 2005). Esto se define como cooperatividad de sitios activos contiguos y abate el tiempo en el que el intermediario va de un sitio a otro (Jorgensen y cols., 2005). II) Optimiza las constantes cinéticas, ya que no hay dilución de los intermediarios en la fase acuosa. III) Promueve el secuestro de intermediarios lábiles o tóxicos evitando su difusión dentro de la matriz celular (Jorgensen y cols., 2005). IV) Evita que compuestos inhibitorios alcancen el sitio activo de la enzima. V) Controla y coordina a las enzimas que funcionan en diferentes vías metabólicas, definiendo las rutas a seguir por los intermediarios compartidos. VI) Por último da la posibilidad de un cambio de dirección del metabolismo mediante la formación de metabolones alternativos para así enfrentar cambios ambientales (Jorgensen y cols., 2005).

La formación de metabolones implica interacciones entre enzimas solubles ancladas a una membrana mediante proteínas estructurales que sirven como andamiaje, como es el caso del citocromo P450 (Paine y cols., 2005). La formación de algunos de estos metabolones pueden ser transitorios, lo que ofrece la posibilidad del cambio rápido de algunos componentes polipeptídicos, promoviendo un mecanismo molecular para redireccionar el metabolismo (Jorgensen y cols., 2005).

Los metabolones han sido observados en diversas células y en distintas vías metabólicas (Green y cols., 1965; Ovádi y Saks, 2004; Srere, 1987). En tripanosoma se ha descrito el glucosoma que contiene a las enzimas de la glucólisis (Aman y cols., 1985); en *E. coli* la célula canaliza la fructosa 1,6 biP hasta CO₂ (Shearer y cols., 2005); en células tumorales se han obtenido agregados que contienen enzimas glucolíticas (Coe y Greenhouse, 1973); en *S. cerevisiae* se encontró un complejo de enzimas glucolíticas por una técnica de filtración en gel (Srere y Ovádi, 1990), y en mitocondrias de hígado de rata se ha obtenido un complejo del ciclo de Krebs en el que las enzimas interactúan con la membrana interna mitocondrial (Robinson, 1986; Srere,

1987); todo esto sugiere la existencia de la organización enzimática (Clegg y Jackson, 1989).

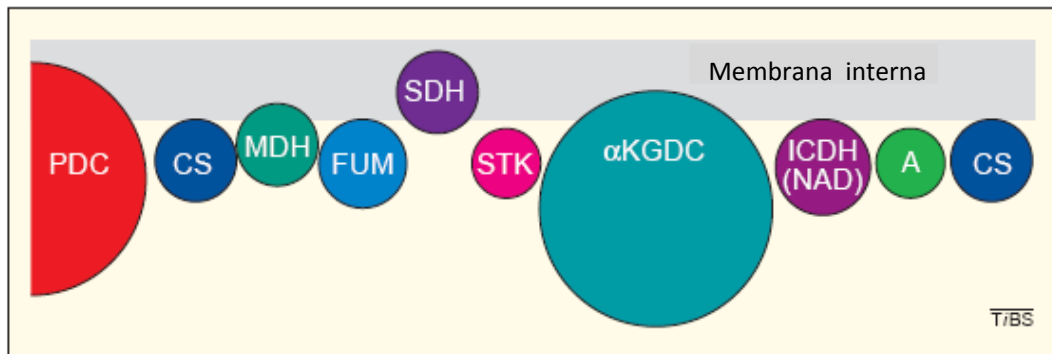


Figura 3. Representación esquemática de la interacción de las enzimas del ciclo de Krebs (TCA) entre ellas y con la membrana interna mitocondrial. Abreviaturas: A, aconitasa; CS, citrato sintasa; FUM, fumarasa; ICDH (NAD), isocitrato deshidrogenasa; α KGDC, complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa; MDH, malato deshidrogenasa; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; SDH, succinato deshidrogenasa; STK, succinato tiocinasa (Srere P, 2000).

Asociaciones enzimáticas

Las interacciones específicas de las enzimas de las vías metabólicas resultan en la modificación de sus propiedades cinéticas y en la relación entre productos y sustratos, por lo que se sugiere que las enzimas se encuentran formando complejos entre ellas o unidas a otras estructuras celulares (Keller y cols., 2007; Srere y Ovádi, 1990).

Una serie de estudios indican que las enzimas glucolíticas se encuentran ancladas a estructuras específicas y esta microcompartimentalización puede resultar en enriquecimiento de metabolitos. Por ejemplo, el adenosín trifosfato (ATP) requerido para la contracción del músculo esquelético puede producirse de manera más eficiente cuando las enzimas glucolíticas se anclan al sarcómero (Keller y cols., 2007). Es así que las enzimas interactúan entre sí pero también lo hacen con elementos tales como la actina o microtúbulos ya sea *in-vitro* o *in-vivo*, lo que le da estabilidad tanto al citoesqueleto como a la actividad enzimática (Keleti y cols., 1989; Walsh y cols., 1989). En algunas

enzimas glucolíticas como la isoforma M1 de la piruvato cinasa, la fosfofructocinasa (Kovács y cols., 2003) y la enolasa dicha relación con los microtúbulos regula el metabolismo energético (Keller y cols., 2007). Con respecto a la F-actina se ha observado que estabiliza diversas enzimas glucolíticas al interactuar con ellas tanto en fibras musculares como en el acrosoma del espermatozoide (Walsh y cols., 1989).

La interacción de las enzimas con los elementos del citoesqueleto además de brindar estabilidad, da protección al complejo proteico (Ovádi y Saks, 2004). Tal es el caso de la fosfofructocinasa (PFK) y la aldolasa, en donde la inactivación de la PFK es impedida al agregar aldolasa en exceso, sugiriéndose que la aldolasa se une a un dímero de la PFK formando un heterocomplejo donde la cinasa es completamente activa (Rais y cols., 2000). El dímero se estabiliza por la asociación con microtúbulos y recupera su actividad por el exceso de aldolasa (Vértessy y cols., 1997). En extractos de células musculares la cinética de la PFK es de carácter sigmoide pero al adicionar aldolasa exógena a la PFK se forma un heterocomplejo que da una cinética Michaeliana. Es así que la asociación entre la aldolasa con PFK y con elementos del citoesqueleto contribuyen considerablemente con la microcompartimentalización de las enzimas glucolíticas y a un cambio en el comportamiento cinético (Rais y cols., 2000).

Se ha encontrado evidencia tanto física como química de la asociación entre las enzimas consecutivas de la vía glucolítica. Dicha interacción proteína-proteína se da a concentraciones proteicas relativamente elevadas presentes en el citosol (Clegg, 1989; Srere, 1987). El acoplamiento entre dos enzimas se ha estudiado cinéticamente tanto en la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con la aldolasa (Ovadi y cols., 1978) como en la GAPDH con la PGK (Weber y cols., 1982) dando lugar a complejos que optimizan el funcionamiento de esas enzimas. El significado fisiológico de estos datos ha sido cuestionado, ya que se observó que la tasa de formación de 3-fosfoglicerato por medio de la fosfoglicerato cinasa no se afectaba ni por el exceso de NADH ni por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Kvassman y Pettersson, 1989). Por otro lado se demostró que la disociación

del 1,3-bisfosfoglicerato de la PGK era una reacción intrínseca igualmente rápida que la del complejo formado por la PGK y la GAPDH (Kellershohn y Seydoux, 1979). Esto fue tomado como evidencia de que la transferencia directa de metabolitos entre enzimas no había sido demostrada de manera convincente, por lo menos en las enzimas de la glucólisis hasta el momento (Kvaassman y Pettersson, 1989).

Muchos grupos han tratado de demostrar por medio de métodos fisicoquímicos la existencia de asociación entre la PGK y la GAPDH (Ashamarina y cols., 1984; Malhorta y cols., 1987; Sukhodolets y cols., 1987; 1988). Los estudios cinéticos han mostrado el acoplamiento entre PGK y GAPDH libres mediante cambios cinéticos de la reacción acoplada catalizada por el complejo bienzimático, lo que sugiere canalización del 1,3-bPG que va del sitio catalítico de la PGK a la GAPDH (Khoroshilova y cols., 1992). Por otro lado se ha demostrado que la catálisis se lleva a cabo cuando una subunidad del tetrámero de GAPDH exhibe su sitio activo y se acopla a la PGK por medio de un mecanismo de flip-flop (Stallcup y cols., 1973). Lo que sucede es que el sustrato se une a una de las subunidades del dímero funcional acelerando la catálisis de la siguiente subunidad (Ashamarina y cols., 1984). Esto indica que la cooperatividad entre las subunidades es parte integral de la catálisis de la GAPDH al unirse a la PGK, lo que constituye un mecanismo de regulación en el funcionamiento enzimático (Ashmarina y cols., 1984). Por medio del estudio de masas moleculares se ha visto la interacción entre PGK y GAPDH en presencia y ausencia de cada una (Malhorta y cols., 1995); cuando la PGK (monómero de 48 kDa) y la GAPDH (homotetrámero de 145 kDa) están juntas en una solución con 1 mol de cada una de las enzimas se puede observar por filtración en gel y en una columna de Sephadex G-150, una proteína de 82 kDa formada por el monómero de PGK y una subunidad de la GAPDH (Malhorta y cols., 1995). Esta unión también se pudo comprobar por medio de microscopía electrónica, en la que el complejo PGK-GAPDH se formaba dependiendo del estado funcional de ambas enzimas (Sukhodolets y cols., 1988).

De tal manera observamos cómo el metabolismo celular depende de la organización estructural enzimática formando microcompartimentos, los cuales brindan mecanismos para el control metabólico. Sin embargo durante el estrés la célula se vale también de otros medios para protegerse, entre los que encontramos distintas moléculas tales como la trehalosa.

En este trabajo, decidimos determinar si la asociación de enzimas de la glucólisis en la levadura puede prevenir la inactivación mediada por trehalosa en las enzimas de esta vía. Cuatro enzimas aisladas de la glucólisis fueron probadas para observar la inactivación mediada por la trehalosa. Se observó que enzimas como la GAPDH y la hexocinasa (HXK) son inactivadas, mientras que la aldolasa (ALD) y la PGK no sufren el mismo efecto. Luego, al mezclar ALD o PGK con GAPDH y HXK se observa protección contra la inactivación de las enzimas sensibles. Cuando analizamos el efecto de la trehalosa sobre un extracto citoplásmico de levadura que contiene a todas las enzimas de la vía glucolítica, observamos que la fermentación de la glucosa hasta etanol no se inhibe por diferentes concentraciones de trehalosa. Esto sugiere que las interacciones intramoleculares específicas confieren resistencia a la inactivación de enzimas que por sí solas son inactivadas por el soluto compatible. Esta resistencia a la inactivación puede ser una ventaja de la asociación de enzimas de distintas vías metabólicas.

HIPÓTESIS

Si la trehalosa inactiva a algunas enzimas cuando están aisladas pero no cuando se mezclan con otras enzimas de la misma vía metabólica, entonces debe haber asociación proteica que promueva la resistencia a la inactivación por trehalosa.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad y la sensibilidad a solutos compatibles de distintas enzimas de la glucólisis, tanto individualmente como en mezclas.

OBJETIVOS PARTICULARES

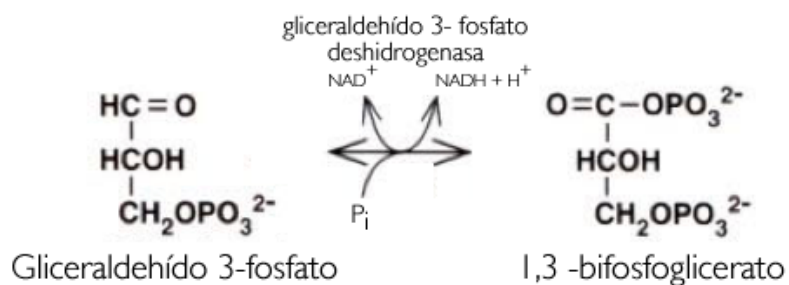
- Observar el efecto de la trehalosa en la vía glucolítica de la levadura.
- En enzimas, tanto aisladas como mezcladas, caracterizar la actividad enzimática en presencia y ausencia del soluto compatible trehalosa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Todos los reactivos son de calidad analítica. Glucosa, trehalosa, HEPES, EDTA, MES, TEA, $MgCl_2$, glicerol, 2-mercapto-etanol, SDS, hemisulfato de hidrazina, molibdato de amonio, ácido L-ascórbico, DTT, aldolasa (ALD), lactato deshidrogenasa (LDH) de músculo de conejo, hexocinasa (HXK), 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), alcohol deshidrogenasa (ADH) de levadura, D-fructosa 1,6 bisfosfato sal de sodio, D-glucosa 6-fosfato sal de sodio, ácido D-(-)-3-fosfoglicérico, DL-gliceraldehído 3-fosfato (GA3P), β - $NADP^+$, NADH, NAD, ATP fueron adquiridos de Sigma Co (St Louis MO). KOH, acetato de Mg^{2+} y K^+ , fosfato de Na^+ , H_2SO_4 , H_3PO_4 , TCA, NaOH y K_2HPO_4 fueron obtenidos de J.T Baker (Ecatepec, México). Acetato de Na^+ fue adquirido de Merck (Darmstadt, Germany). Extracto de levadura por DIFCO y peptona de Bioxon. El cocktail inhibidor de proteasas (Complete) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de levadura (G6PDH) fueron adquiridos de Roche (Basel, Switzerland). La proalbúmina fue de Celliance (San Francisco CA, USA).

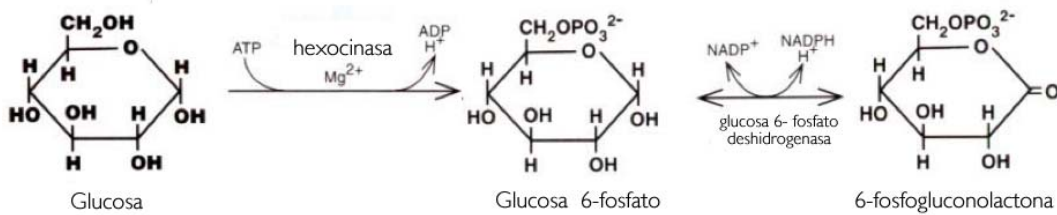
Actividad de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Se midió en un amortiguador con 20 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT y 1 mM EDTA a pH 7.5 en presencia de diferentes concentraciones de trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M), con 0.81 mM NAD^+ , 1.33 mM P_i y 1.7 μ M GAPDH. Después de 15 segundos se añadió G3P 50 μ M. La absorbencia se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Aminco/Olis DW2000 de doble haz en modo "split" a una temperatura de 20 °C (Bergmeyer, 1983).



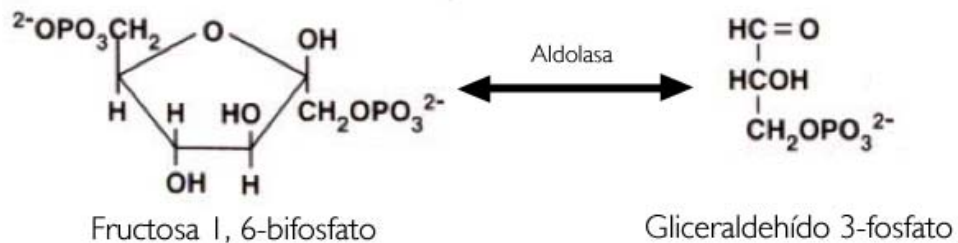
Actividad de hexocinasa

Se utilizó un amortiguador 40 mM MES-TEA pH 7.6 con diferentes concentraciones de trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M) en presencia de 50 mM glucosa, 8 mM MgCl₂, 0.64 mM ATP y 10 µg/ml HXK. Después de 10 minutos se agregó 0.1ml de TCA al 30% y las muestras se centrifugaron durante 20 min. El sobrenadante se neutralizó con NaOH 1 mM. A las muestras se añadió 0.9 mM NADP⁺ y 0.55 U/ml G6PDH. La actividad se siguió mediante la absorbencia del NADPH formado a 340 nm en un espectrofotómetro Aminco-Olis DW 2000 de doble haz en modo "split", temp. 20 °C (Bergmeyer, 1983).



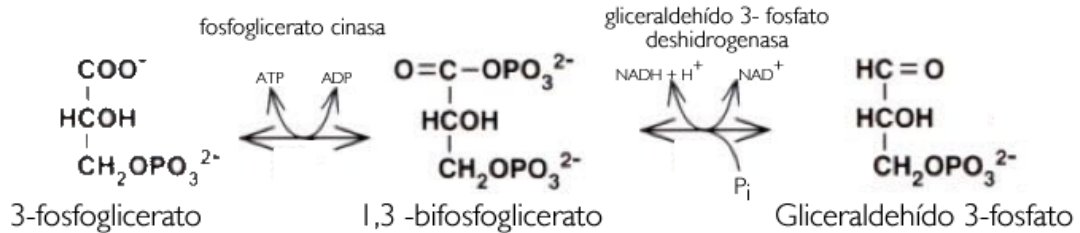
Actividad de aldolasa

Se realizó en un amortiguador 10 mM de fosfato de sodio, 0.1 mM EDTA pH 7.6 con trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M). Después se agregó 3.5 mM hemisulfato de hidrazina, 0.1 mM fructosa 1,6-bisfosfato y 9 µg/ml aldolasa. La temperatura se mantuvo a una temperatura constante de 20 °C. Se cuantificó la absorbencia en un espectrofotómetro Aminco-Olis DW 2000 de doble haz en modo "split". La concentración de hidrazona se midió a 240 nm usando un coeficiente molar de extinción de 2.73 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹ (Sygusch y Beaudry, 1984).



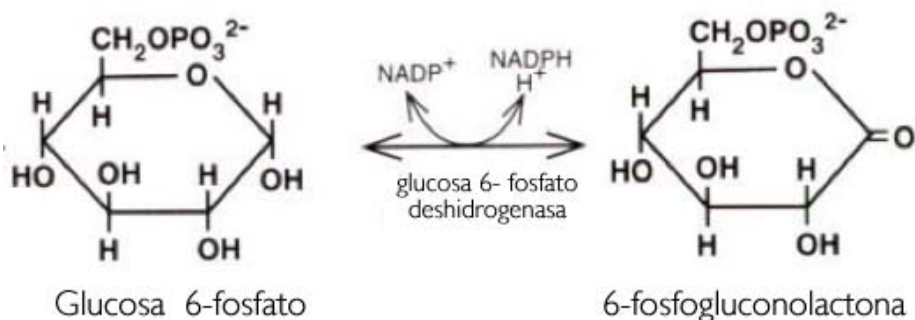
Actividad de fosfoglicerato cinasa

Se midió en un amortiguador 20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT y 1 mM EDTA, pH 7.5 con diferentes concentraciones de trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M), ATP 0.2 mM, 1 nM PGK y 6 mM ácido D-(-)-3-fosfoglicérico. A las muestras incubadas durante 10 minutos a 20 °C, se les agregó TCA 30%, se centrifugaron por 20 min y se neutralizaron con NaOH 1 mM. Posteriormente se agregó al sobrenadante 0.16 mM NADH y 1.7 μM GAPDH. Las muestras se incubaron en un baño de agitación (New Brunswick) durante 1 h a 20 °C. La reacción se detuvo con SDS al 5% dejando las muestras en frío. Para determinar la concentración de Pi agregamos a la muestra 0.5 ml de H₂SO₄ 3N y 0.1 ml de molibdato de amonio al 2.5%. Finalmente se agregó el reactivo reductor (hemisulfato de hidrazina/ ácido ascórbico) y se incubó durante 30 min. La absorbencia se midió a 820 nm en un espectrofotómetro 650 DU Beckman. Los resultados se encuentran en μmoles Pi (mg prot. min)⁻¹ (Katewa y Katyare, 2003).



Actividad de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Se utilizó un amortiguador 2 mM MES-TEA pH 7.0 con diferentes concentraciones de trehalosa (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M) con 0.9 mM NADP⁺, 10 µg/ml G6PDH y después de 30 segundos se agregó G6P 24 mM. La absorbencia de NADPH se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Aminco-Olis DW 2000 de doble haz en modo “split” a temperatura de 20 °C (Bergmeyer, 1983).



Extractos citoplásmicos de levadura

Se utilizó la cepa industrial de *S. cerevisiae* (La Azteca, S. A.). Se realizó un precultivo en 50 ml YPD (extracto de levadura 1%, peptona de gelatina 5%, dextrosa 5%) por 16 h. Posteriormente con los 50 ml se realizó un cultivo en 1000ml de YPD por 10 h y se ayunó bajo aeración 3 L (min)⁻¹ durante las siguientes 16 h. Las células fueron lavadas y centrifugadas dos veces con agua a 2500 rpm por 5 min en un rotor GSA (Sorval), el pellet se lavó con agua estéril. Se calculó el peso húmedo de las células obtenidas y se resuspendió al 50% (W/V) en un amortiguador de lisis (100 mM HEPES/KOH pH 7.5, 600 mM acetato de potasio, 10 mM acetato de Mg²⁺, 1 mM EDTA, glicerol al 20%, 8 mM 2-mercapto-etanol y una tableta de inhibidor de proteasas “Complete”). Las células fueron lisadas en el Bead-Beater (Biospec Products) con perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro por 20 seg x 3. Finalmente los extractos fueron centrifugados a 24500 x g por 1 h a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman, el sobrenadante se guardó a -80 °C. (Lebedeva y cols., 2006).

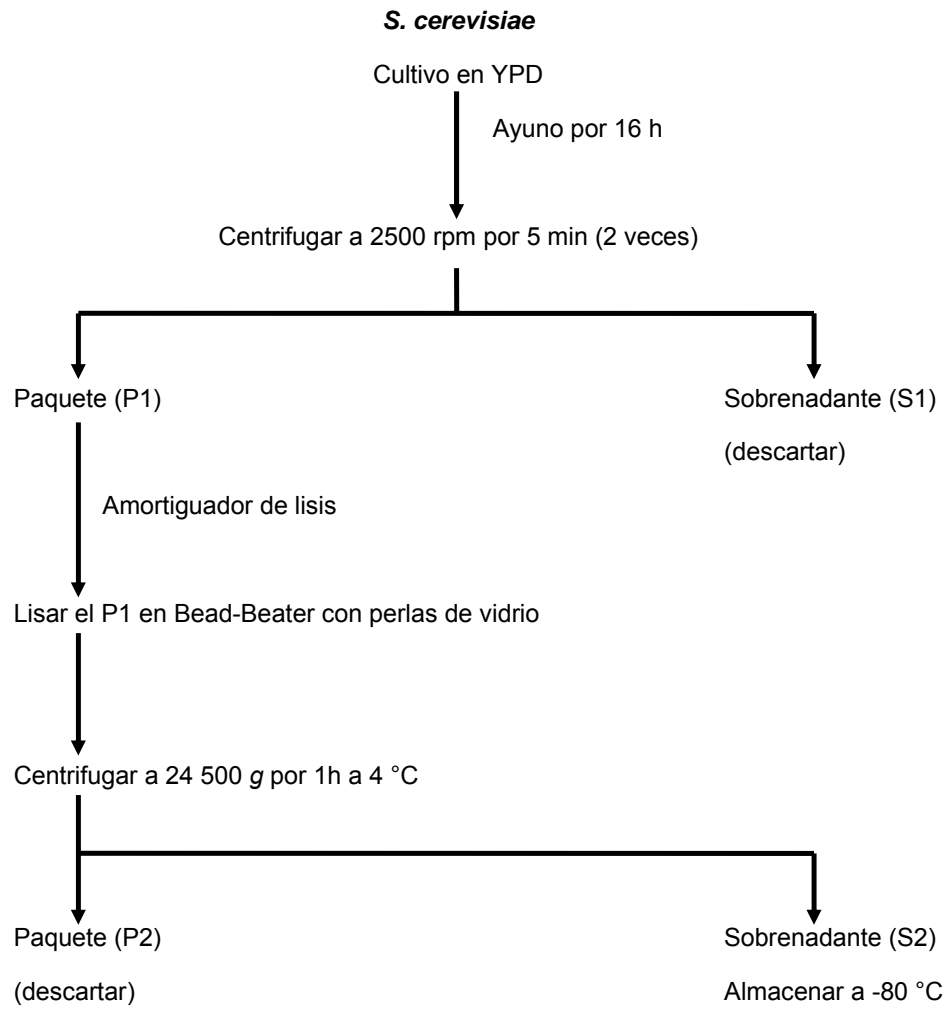


Figura 4. Diagrama de flujo para la obtención de extractos citoplásmicos a partir de *S. cerevisiae*.

Producción de etanol a partir de glucosa

Se midió mediante la fermentación de extractos citoplásmicos 11.75 mg/ml de proteína en amortiguador 0.1 M MES-TEA, pH 7.0, con 20 mM glucosa y 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 o 1 M de trehalosa. Las muestras se incubaron a 20 °C durante distintos tiempos (0, 1, 2, 4, 8 y 16 minutos). Se detuvo la reacción con 0.1 ml de TCA al 30% y se centrifugó a 1 000 rpm durante 25 min en una centrífuga clínica. El sobrenadante se neutralizó con NaOH 1 mM. Para la cuantificación de etanol se utilizó un amortiguador 114 mM K₂HPO₄ pH 7.6 y 1.8 mM NAD⁺ con una alícuota de 0.05 ml de la muestra y a los 10 segundos se agregó ADH 30 µg/ml. La absorbencia del NADH se midió a 340 nm en un espectrofotómetro Aminco/Ollis DW 2000 de doble haz a 20 °C. Para calcular la concentración de etanol utilizamos la siguiente ecuación:

$$\Delta \text{ Absorbencia del NADH} / \text{Coef. de absorción del NADH} \times \text{mg prot.}$$

Análisis de los datos

Se analizaron los datos para obtener el modelo de inactivación de algunas proteínas en presencia de trehalosa, donde se graficó la actividad residual contra la concentración de trehalosa.

Se analizó también la curva de fermentación con trehalosa donde se graficó la concentración de etanol producido con respecto al tiempo en presencia de distintas concentraciones de trehalosa.

Inactivación de distintas proteínas en presencia de trehalosa

La curva de diferentes concentraciones de trehalosa contra la actividad de las proteínas se ajustó a la ecuación correspondiente utilizando el programa OriginPro versión 8.0. Para las condiciones experimentales estudiadas se utilizó la ecuación de decaimiento exponencial:

$$\frac{A}{A_0} \times 100 = A_1 e^{-kt} + A_\infty \quad (1)$$

Donde A es la actividad al tiempo t , A_0 es la actividad inicial, A_1 es la amplitud del cambio de actividad, A_∞ es la actividad al t infinito y k es la constante de la pérdida de actividad.

Producción de etanol en extractos citoplásmicos en presencia y ausencia de trehalosa

Los datos del efecto de la trehalosa sobre de la cinética de producción de etanol se analizaron por regresión no lineal usando el programa OriginPro versión 8.0 y la siguiente ecuación:

$$A = A_1 (1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

Donde A es la concentración de etanol en $\mu\text{mol (mg prot)}^{-1}$ al tiempo t , A_1 es la máxima concentración de etanol producida y k es la constante de velocidad de producción de etanol.

RESULTADOS

En condiciones de estrés la levadura acumula cerca de 0.5 M de trehalosa, lo que incrementa la viscosidad del citoplasma (Hottiger y cols., 1994; Singer y Lindquist, 1998). Esta acumulación de trehalosa tiene un efecto doble, ya que por un lado protege pero a la vez inhibe a diferentes enzimas (Esmann y cols., 2008; Sampedro y cols., 2002; Sebollela y cols., 2004; Singer y Lindquist, 1998; Uribe y Sampedro, 2003). Es posible que la asociación de enzimas ayude a resistir la inactivación mediada por trehalosa de vías metabólicas completas, lo que constituiría una ventaja durante el estrés. Es así que los resultados a continuación mostrados pueden ser útiles para comprender la supervivencia ante los solutos compatibles.

La trehalosa inactiva a algunas pero no a todas las enzimas de la glucólisis

Durante el estrés la levadura necesita producir grandes cantidades de moléculas de alta energía para mantener el gradiente iónico y otros procesos vitales (Attfield, 1987; Hoffmann y Holzhütter, 2009; Hounsa y cols., 1998; Sampedro y cols., 1998; Singer y Lindquist, 1998). En la levadura la mayor fuente de energía está dada por la glucólisis, por lo que debe mantenerse una alta fermentación durante el estrés. Es así que las enzimas de la glucólisis deben resistir la alta concentración de trehalosa acumulada en citoplasma (Hottiger y cols., 1994). Para evaluar esto, probamos mediante ensayos de actividad enzimática el efecto de la trehalosa sobre cuatro enzimas aisladas de la glucólisis. Observamos que dos enzimas fueron inactivadas por la trehalosa, mientras que las otras dos fueron resistentes a la inactivación, como se muestra a continuación (Fig. 5): la HXK y la GAPDH fueron inactivadas conforme la concentración de trehalosa aumentó. En contraste la ALD no se inactivó, mientras que la PGK presentó un efecto dual, ya que de 0.2 a 0.6 M de trehalosa incrementó la actividad pero con 0.8 y 1 M de trehalosa la actividad disminuyó (Fig. 5). Los datos de la GAPDH y la HXK fueron ajustados tanto a una ecuación de decaimiento exponencial para determinar si

era inactivación así como a una hiperbólica para saber si era inhibición. El coeficiente de correlación de la GAPDH obtenido con la ecuación de inactivación (1) fue de 0.9952 mientras que el de inhibición fue de 0.8891. Por lo tanto sugerimos que se trata de inactivación ya que los datos se aproximan mejor a una ecuación de decaimiento exponencial. Para confirmar que fuera inactivación realizamos la cinética de la GAPDH y encontramos que la V_{max} disminuye en presencia de trehalosa pero la K_m no se afecta (Fig. 6). El grado de inactivación va a depender de la concentración del inactivador, en este caso de la trehalosa. La presencia de la trehalosa como inactivador no va a afectar la unión del sustrato a la enzima, lo que al parecer ocurre es que el complejo resultante es inactivo debido a que la trehalosa modifica el medio, interfiriendo así con los cambios conformacionales necesarios para que se lleve a cabo la catálisis. Por lo tanto con distintas concentraciones de trehalosa la actividad enzimática va a ir disminuyendo, en consecuencia la V_{max} en presencia de trehalosa será menor que la V_{max} en ausencia del inactivador. La K_m no va a cambiar ya que el inactivador no va a afectar la afinidad de la enzima por el sustrato.

En la Tabla 1 se muestra la constante a la cual se obtiene $\frac{1}{2}$ del decaimiento de actividad de la GAPDH y HXK ajustadas a la ecuación (1). También se muestra el valor en $\mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$ de la actividad de las enzimas aisladas.

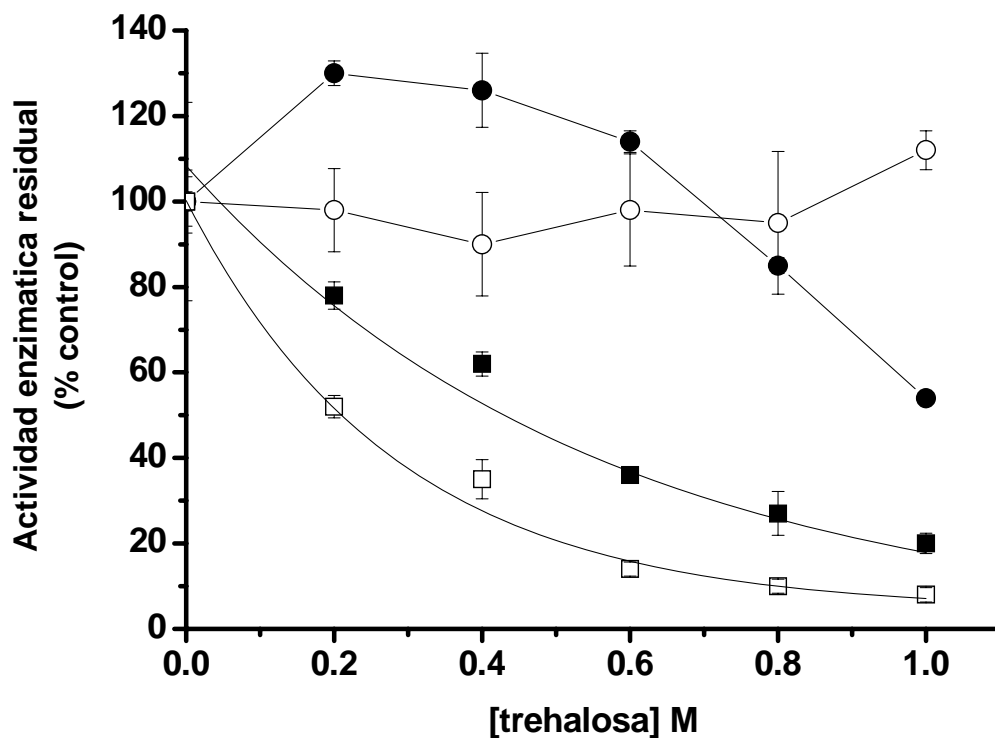


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de trehalosa sobre la actividad de cuatro enzimas de la glucólisis.

Cada enzima se midió en presencia de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1 M de trehalosa. Fosfoglicerato cinasa (●), Aldolasa (○), Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa (■) y Hexocinasa (□). Los puntos son los datos experimentales y las líneas son teóricas, resultado del ajuste de los datos con la ecuación (1).

Tabla 1. Actividad y parámetros de inactivación de enzimas de la glucólisis

Enzimas	Actividad $\mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$	k [M]
ALD	1.526 ± 0.231	
GAPDH	0.055 ± 0.005	0.555 ± 0.04
H XK	0.458 ± 0.022	0.282 ± 0.02
PGK	0.638 ± 0.007	

En la tabla se muestra el valor de la actividad enzimática en ausencia de trehalosa y la constante de pérdida de actividad de GAPDH y HXK con trehalosa.

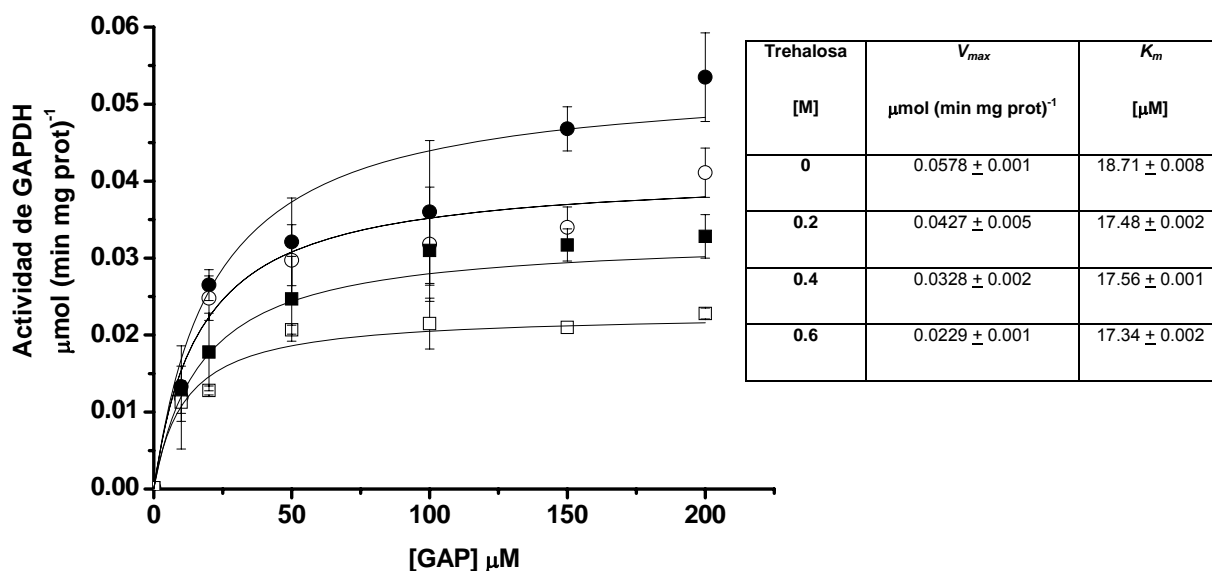


Figura 6. Efecto de la trehalosa sobre la cinética de GAPDH.

Se utilizó trehalosa: 0 (●); 0.2 M (○); 0.4 M (■) y 0.6 M (□). Se midió la GAPDH con gliceraldehído 3-fosfato 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM . La cinética se siguió mediante la absorbancia del NADH formado a 340 nm.

El efecto de inactivación de la trehalosa cambia cuando las enzimas se encuentran en mezclas

La inactivación mediada por trehalosa de HXK y GAPDH (Fig. 5) indica que la fermentación debería estar inhibida por la trehalosa, a menos que exista un mecanismo por el cual la célula resista la inhibición. Por muchos años la asociación de enzimas de la glucólisis se ha estudiado y en algunos casos se ha observado que esta asociación protege contra agentes desnaturalizantes (Raïs y cols., 2000). Es así que decidimos analizar si al mezclar enzimas en parejas hay resistencia contra la inactivación mediada por trehalosa.

Las enzimas sensibles a trehalosa mostradas anteriormente (Fig. 5) se mezclaron con cada una de las enzimas resistentes para así observar el efecto de la trehalosa. La mezcla de GAPDH con aldolasa o PGK resultó en la disminución del efecto de la trehalosa (Fig. 7). En la mezcla GAPDH/ALD, el primer efecto observado fue que la actividad aumentó 20 veces comparada con la GAPDH aislada (Fig. 7A). Después en presencia de concentraciones crecientes de trehalosa, a partir de 0.4 M, se observó una ligera disminución en la actividad (Fig. 7A). La actividad de la GAPDH aislada también se muestra en la figura para realizar la comparación. En la mezcla GAPDH/PGK (Fig. 7B), la actividad de la GAPDH al agregar PGK aumentó ligeramente comparada con la enzima aislada a partir de 0.2 M hasta 0.6 M, sin embargo con las concentraciones más elevadas se observó una pequeña disminución de la actividad (Fig. 7B). Para facilitar la comparación, la actividad de la mezcla y la GAPDH aislada se incluyeron en la figura.

La ALD, GAPDH y la PGK son enzimas consecutivas de la glucólisis, es por eso que decidimos determinar si la ALD y/o la PGK conferían protección a la hexocinasa, la cual cataliza la primera reacción de la vía glucolítica. En la mezcla HXK/ALD, la actividad de la hexocinasa fue resistente a la inactivación de la trehalosa en las concentraciones probadas (Fig. 7C). Cuando probamos la mezcla HXK/PGK, observamos que también la hexocinasa era resistente a los efectos de la trehalosa a excepción de las concentraciones más altas (0.8 y

1 M), donde se encontró una ligera disminución (Fig. 7D). La actividad de la mezcla y la HXK aislada se incluye en la misma figura.

Es así que al mezclar enzimas sensibles a la trehalosa tales como GAPDH o HXK junto con enzimas resistentes, ALD y PGK, podemos observar resistencia a la inactivación dada por la trehalosa además del aumento de la actividad enzimática, lo que abre la posibilidad de pensar que esta misma protección ocurre en la célula. Los parámetros del ajuste de los datos con la ecuación (1) de la Tabla 2 muestran que la constante de la pérdida de actividad de la mezcla GAPDH/ALD es menor que la enzima aislada, lo cual sugiere que hay protección ya que la inactivación de la mezcla es mínima comparada con la enzima aislada.

Tabla 2. Actividad y parámetros de inactivación de la enzimas aisladas y en mezcla

<i>Enzimas</i>	<i>Actividad $\mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$</i>	<i>k [M]</i>
GAPDH	0.050 ± 0.01	0.557 ± 0.04
GAPDH/ALD	1.186 ± 1.4	0.139 ± 0.07
HXK	0.436 ± 0.07	0.276 ± 0.02

En la tabla se muestra el valor de la actividad enzimática en ausencia de trehalosa y la constante de pérdida de actividad de las enzimas aisladas y en la mezcla GAPDH/ALD en presencia de trehalosa.

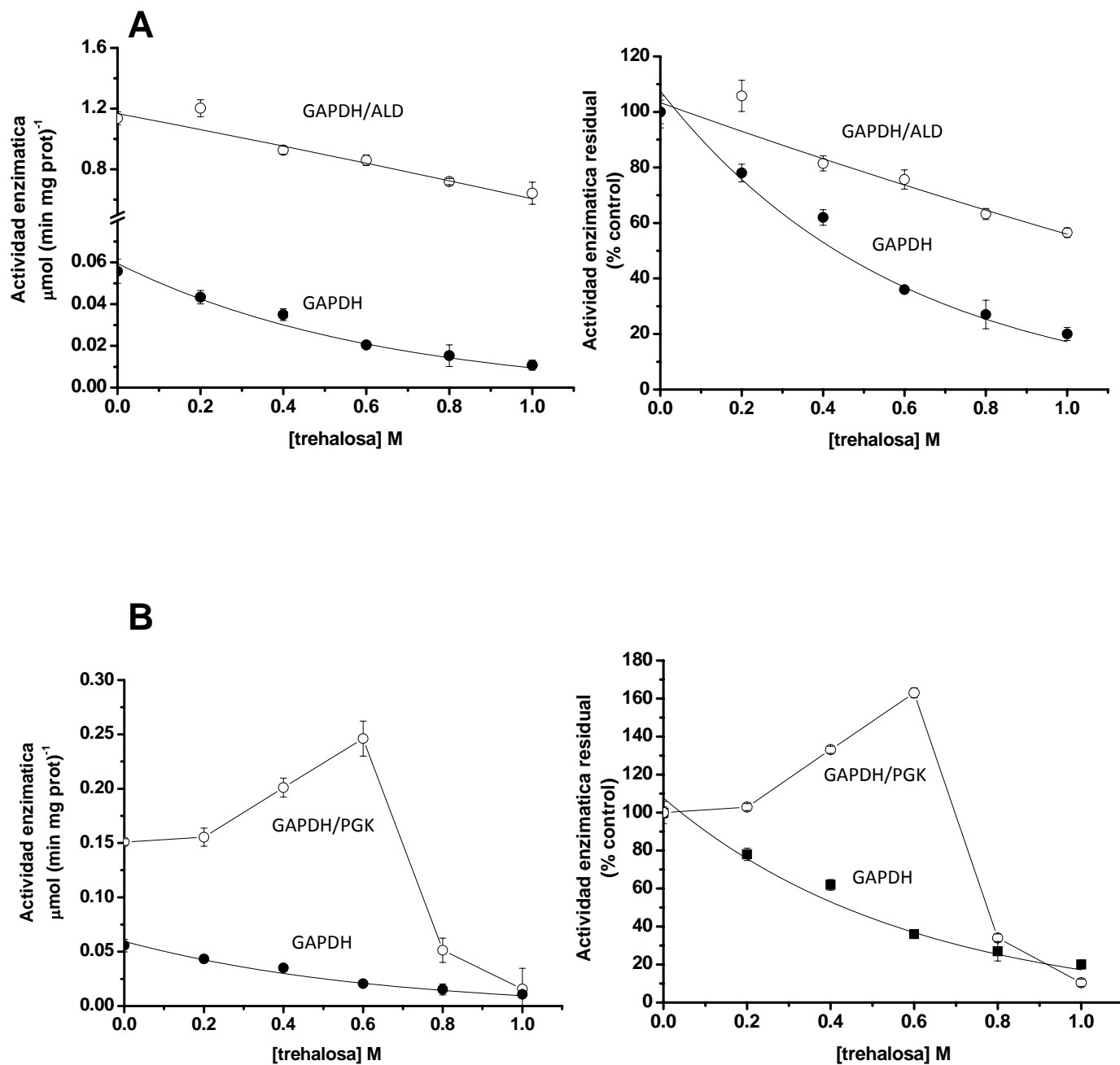


Figura 7. Efecto de la trehalosa sobre dos enzimas sensibles al mezclarse con dos enzimas resistentes.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que en la Fig. 1 para la GAPDH y HXK. El efecto de la trehalosa de cada enzima aislada y con la mezcla se muestra a continuación. **A.** GAPDH/ALD: GAPDH (●) y la mezcla GAPDH/ALD (○) (9 $\mu\text{g/ml}$ ALD). **B.** GAPDH/PGK: GAPDH (●) y GAPDH/PGK (○). Las figuras a la izquierda muestran la actividad en $\mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$ y a la derecha se muestra la actividad residual en porcentaje.

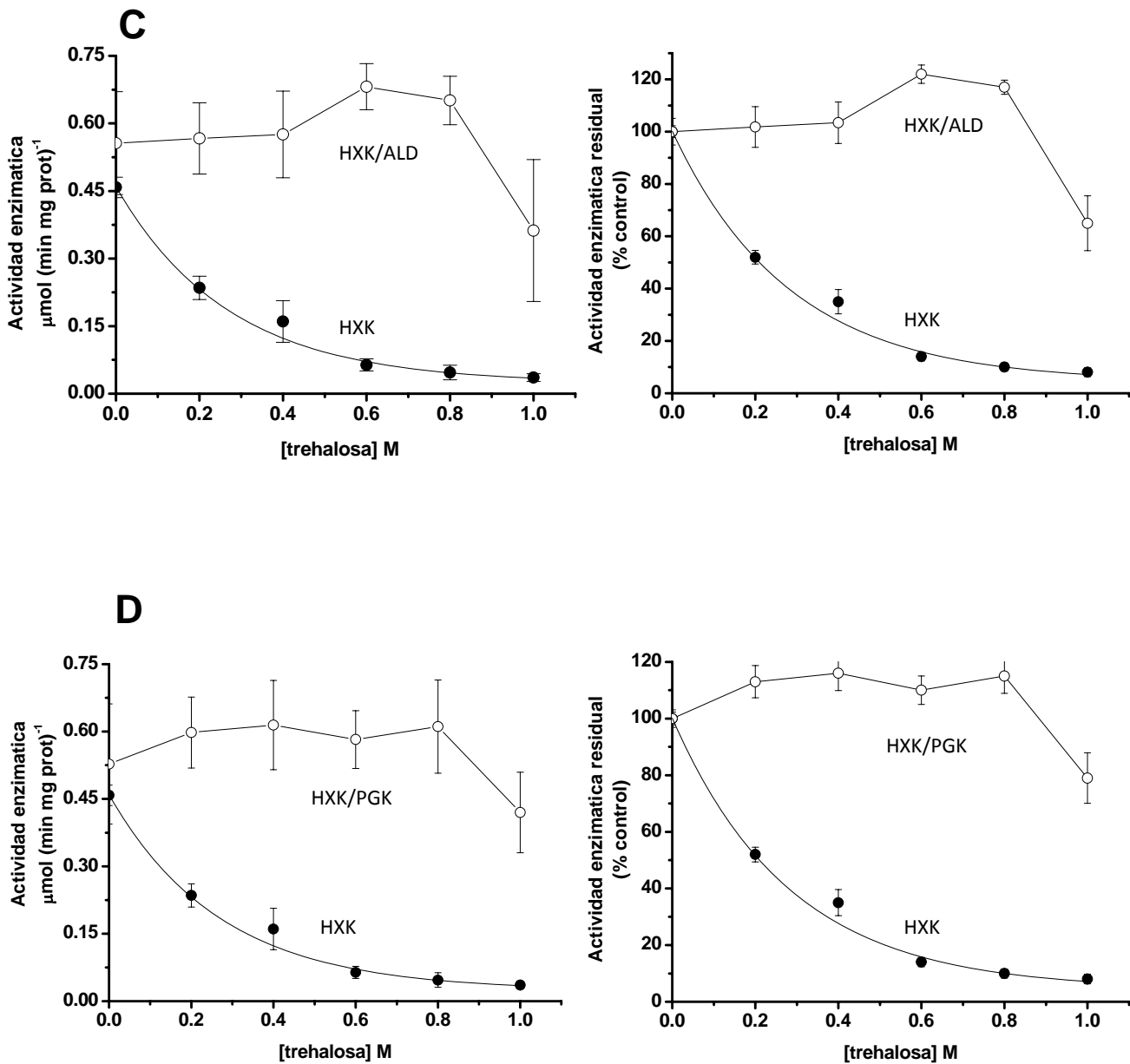


Figura 7. Efecto de la trehalosa sobre dos enzimas sensibles al mezclarse con dos enzimas resistentes.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que en la Fig. 1 para la GAPDH y HXK. El efecto de la trehalosa de cada enzima aislada y con la mezcla se muestra a continuación. **C.** HXK/ALD: HXK (●) y HXK/ALD (○) (9 $\mu\text{g/ml}$ ALD). **D.** HXK/PGK: HXK (●) y HXK/PGK (○). Las figuras a la izquierda muestran la actividad en $\mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$ y a la derecha se muestra la actividad residual en porcentaje.

La sensibilidad de la GAPDH a la trehalosa no se modifica con otras proteínas

Para definir si la protección que brindaban la PGK o la ALD a la GAPDH era específica de la interacción entre dichas enzimas, decidimos mezclar la GAPDH con otras proteínas, tales como albúmina, HXK y lactato deshidrogenasa a concentraciones similares a las utilizadas para la PGK y ALD. Ninguna de estas proteínas protegió a la GAPDH contra la inactivación dada por la trehalosa (Fig. 8). Al ajustar los datos a la ecuación (1) observamos que la inactivación de la enzima aislada es menor que en las mezclas, indicándonos que no hay protección (Tabla 3). Esto sugiere que la interacción de la GAPDH es específica con la PGK o la ALD. De tal manera podemos especular que esta interacción está ocurriendo in vivo y probablemente juegue un papel fisiológico en la protección de la actividad de las enzimas durante el estrés. Si otras proteínas de la glucólisis se protegen por asociación, esta vía es resistente a la inactivación mediada por trehalosa.

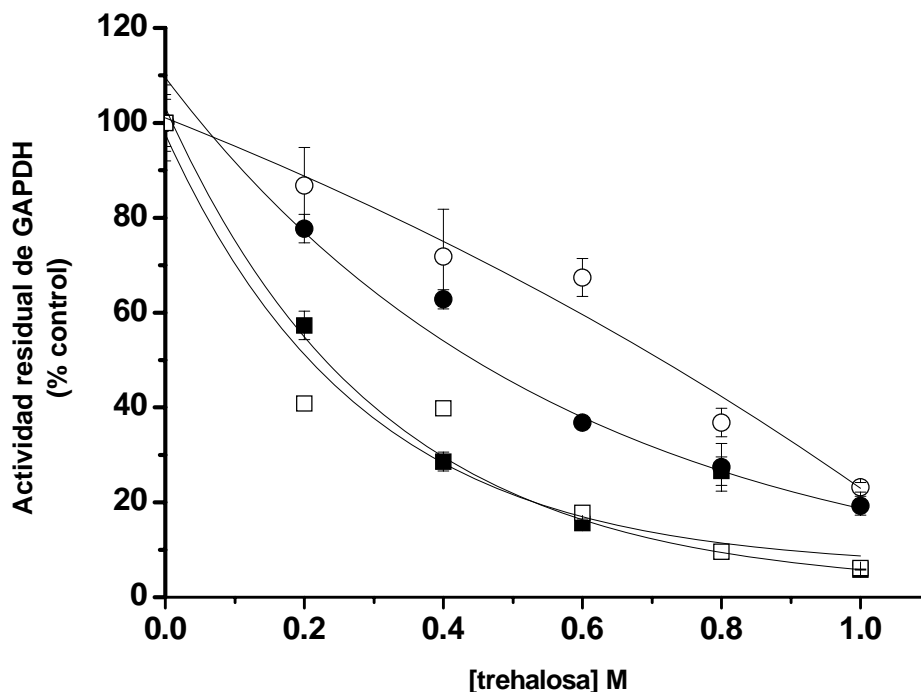


Figura 8. Efecto de la trehalosa sobre la actividad de GAPDH con distintas proteínas.

GAPDH se mezcló con diferentes proteínas y se midió la actividad de la GAPDH como se muestra en la Fig. 1. Proteínas: Ninguna (●), 1 nM HXK (○), 1 nM lactato deshidrogenasa (LDH) (■) and 1 nM albúmina (□).

Tabla 3. Actividad y parámetros de inactivación de GAPDH con trehalosa en presencia de distintas proteínas

<i>Enzimas</i>	<i>Actividad nmol (min mg prot)⁻¹</i>	<i>k [M]</i>
GAPDH	0.055 ± 0.005	0.565 ± 0.05
GAPDH/HXK	0.037 ± 0.006	0.108 ± 0.07
GAPDH/LDH	0.024 ± 0.008	0.308 ± 0.07
GAPDH/Albúmina	0.029 ± 0.001	0.282 ± 0.09

En la tabla se muestra el valor de la actividad enzimática en ausencia de trehalosa y la constante de pérdida de actividad de las enzimas aisladas y en mezclas en presencia de trehalosa.

La aldolasa no modifica la sensibilidad a la trehalosa de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, enzima de una vía metabólica diferente a la glucólisis

Para comprobar si la protección mediada por la aldolasa era específica de las enzimas de la glucólisis, analizamos el efecto de la trehalosa sobre la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), enzima del ciclo de las pentosas fosfato (Fig. 9). Observamos que la G6PDH también es inactivada por la presencia de todas las concentraciones de trehalosa (Fig. 9). Posteriormente mezclamos la G6PDH con aldolasa y observamos su sensibilidad. Lo que encontramos fue el mismo patrón de inactivación de la G6PDH, lo que nos sugiere que la protección mediada por aldolasa exhibe cierto grado de especificidad (Fig. 9). Los parámetros de inactivación de la G6PDH aislada y en mezcla con ALD en presencia de trehalosa muestran que la k es similar, lo que indica que no hay protección en la mezcla (Tabla 4).

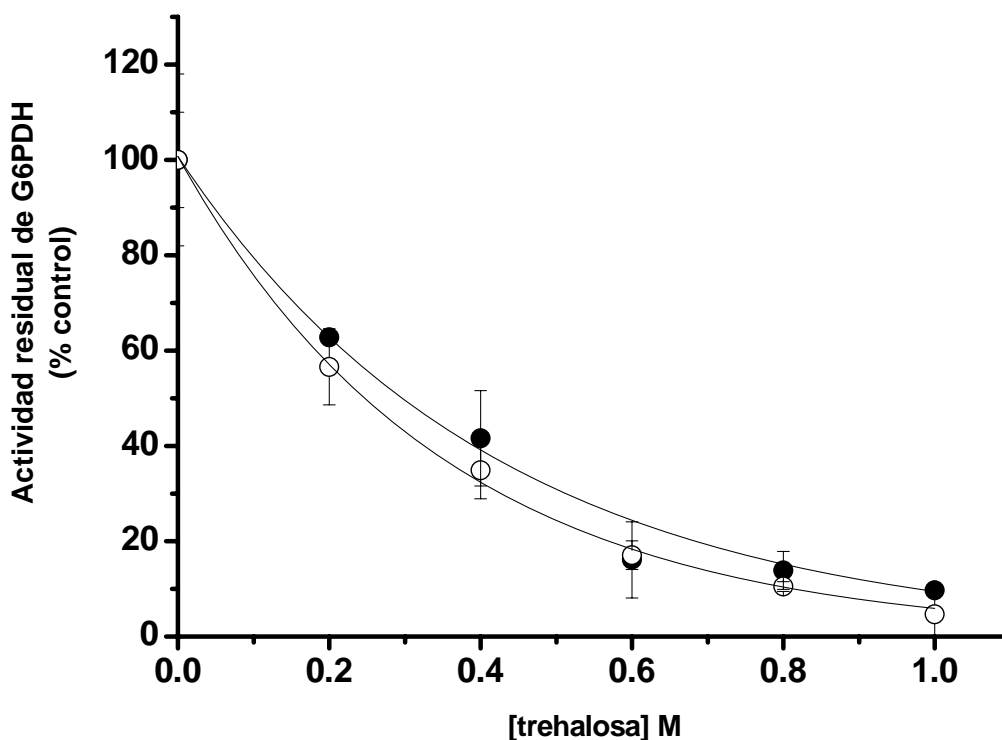


Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de trehalosa sobre la actividad de glucosa 6- fosfato deshidrogenasa en ausencia o presencia de ALD

G6PDH (●): Amortiguador 2 mM MES-TEA pH 7.0 con 0.9 mM NADP⁺ y G6PDH 10 µg/ml; después de 30 seg se añadió 24 mM G6P. Mezcla G6PDH/ALD (○) 9 µg/ml aldolasa. La actividad se midió a 340 nm.

Tabla 4. Actividad y parámetros de inactivación por trehalosa de G6PDH en ausencia y presencia de ALD

<i>Enzimas</i>	<i>Actividad</i> $\mu\text{mol (min mg prot)}^{-1}$	<i>k</i> [M]
G6PDH	1.071 ± 0.10	0.423 ± 0.012
G6PDH/ALD	1.180 ± 0.18	0.352 ± 0.008

En la tabla se muestra el valor de la actividad enzimática en ausencia de trehalosa y la constante de pérdida de actividad de la enzima aislada y en mezcla en presencia de trehalosa.

La inhibición de la producción de etanol ocurre únicamente a concentraciones elevadas de trehalosa

Nuestros datos de la inactivación mediada por trehalosa de algunas enzimas aisladas de la glucólisis sugieren que algunas enzimas son sensibles a la inactivación, mientras que otras son resistentes. Sin embargo al mezclar las enzimas resistentes con las sensibles, éstas adquieren resistencia. Además observamos que el consumo de oxígeno en células completas de levadura era el mismo que el de células sujetas a estrés térmico (datos no mostrados). Esto sugiere que *in vivo* la acumulación de trehalosa que se observa durante el estrés no afecta la glucólisis, ni el ciclo de Krebs, ni la fosforilación oxidativa.

Para explorar este efecto, decidimos observar el efecto de la trehalosa sobre la fermentación en extractos citoplásmicos de levadura. En el extracto medimos la producción de etanol dependiente de glucosa. Observamos que en ausencia de trehalosa, se produjo etanol rápidamente durante los primeros 4 minutos y posteriormente se estabiliza, alcanzando una concentración de 30 nmol (mg prot)⁻¹ entre 8 y 15 minutos (Fig. 10). Al aumentar la concentración de trehalosa desde 0.2 a 0.6 M observamos que la producción de etanol era ligeramente menor que el control, aunque finalmente las concentraciones se igualaron a éste (Fig. 10). Sin embargo con concentraciones suprafisiológicas de trehalosa como 0.8 M y 1 M si observamos inhibición (Fig. 10). En la mezcla citoplásmica todas las enzimas de la vía glucolítica estaban activas con 0.6 M de trehalosa, sugiriendo que las enzimas sensibles se estabilizaron por las mezclas. Los datos de producción de etanol en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de trehalosa fueron ajustados con la ecuación (2) cuyos datos muestran que conforme aumenta la concentración de trehalosa la concentración máxima de etanol disminuye y la constante de velocidad aumenta hasta concentraciones fisiológicas (Tabla 5).

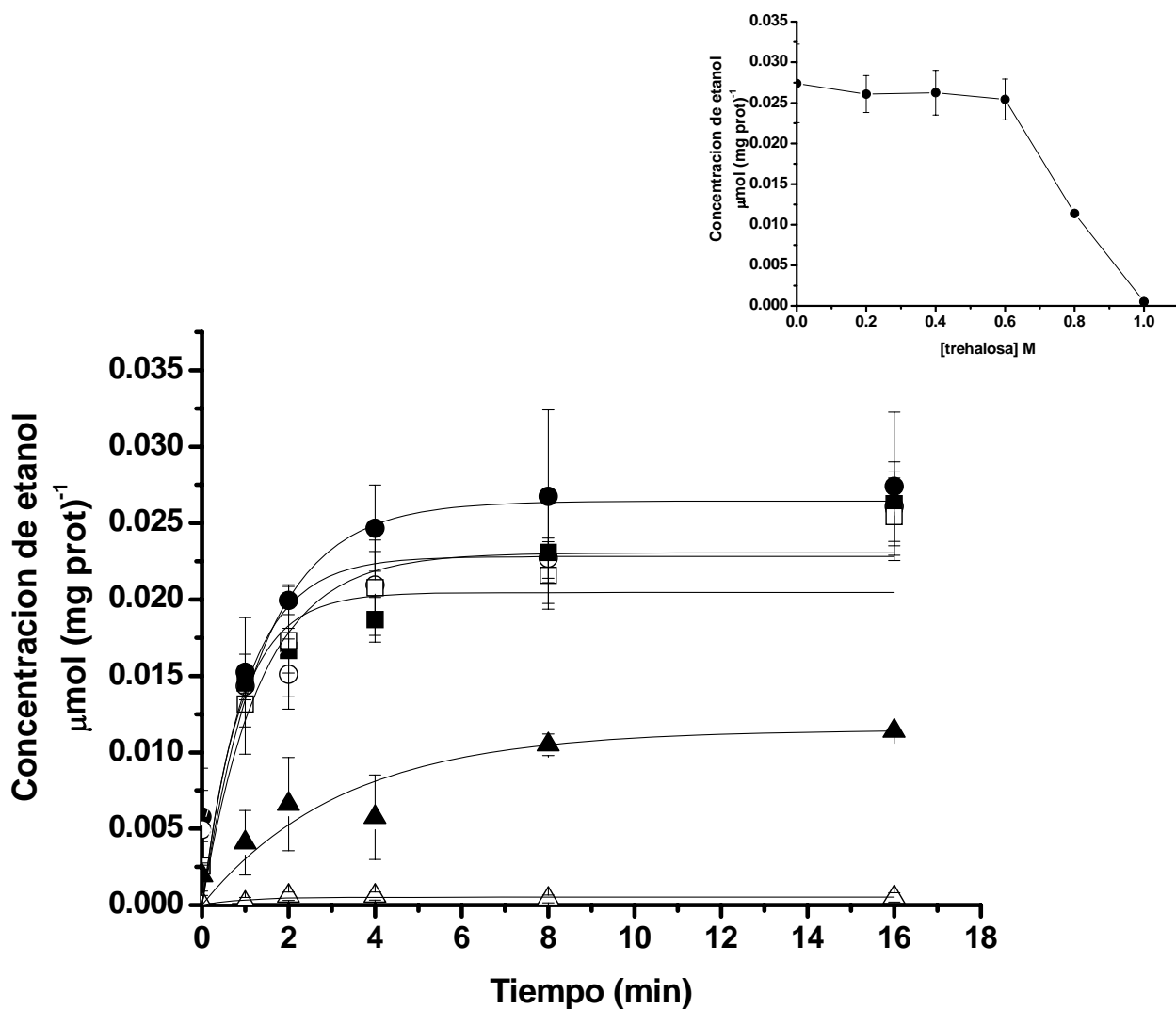


Figura 10. Producción de etanol a partir de glucosas en extractos citoplásmicos de *S. cerevisiae* en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de trehalosa .

Se utilizó trehalosa: 0 (●); 0.2 M (○); 0.4 (■); 0.6 (□); 0.8 (▲); o 1.0 M (Δ) y extracto citoplásmico $11.75 \text{ mg prot (ml)}^{-1}$. Las muestras fueron incubadas a 20°C durante 0, 1, 2, 4, 8 y 16 min. Se utilizó ADH para medir la absorbencia del NADH formado. El inserto muestra la concentración máxima de etanol producida en presencia de las diferentes concentraciones de trehalosa.

Tabla 5. Efecto de la trehalosa sobre la producción de etanol a partir de glucosa en extractos citoplásmicos

[trehalosa]	A_1 mmol (mg prot) ⁻¹	K (min ⁻¹)
0	26.4 ± 0.002	0.7098 ± 0.18
0.2	23.0 ± 0.009	0.7429 ± 1.5
0.4	22.8 ± 0.001	0.9725 ± 0.14
0.6	20.4 ± 0.001	1.1238 ± 0.35
0.8	11.4 ± 0.003	0.3068 ± 1.4
1	5.0 ± 0.00007	1.0560 ± 0.86

Donde A es la concentración de etanol en mol (mg prot)⁻¹ al tiempo t , A_1 es la máxima concentración de etanol producida y k es la constante de velocidad de producción de etanol

DISCUSIÓN

El citoplasma se encuentra saturado de macromoléculas, lo que favorece la compartimentalización de las enzimas. Los estudios clásicos de Green y cols. (1958), Fulton (1982) y Clegg (1964) sugerían que las enzimas no se encontraban difundiendo libremente en el citoplasma. Paul Srere (1987) describió en la matriz mitocondrial la asociación de las enzimas del ciclo de Krebs en supercomplejos llamados metabolones. En cuanto a la glucólisis, se ha estudiado en algunos organismos como los tripanosomas, la organización de enzimas de esta vía dentro de pequeñas partículas llamadas glicosomas (Aman y cols., 1985). Se ha propuesto que las enzimas se encuentran organizadas en sitios específicos donde existe la canalización de intermediarios, favoreciendo reacciones más rápidas y por tanto un metabolismo más eficiente (Ellis, 2001). En este sistema, la asociación/disociación de las enzimas sería un mecanismo para controlar la actividad metabólica (Ashmarina y cols., 1984; Malhotra y cols., 1995; Ovádi y Srere, 1996; Sukhodolets y cols., 1987; Vas y Batke, 1981). Nosotros exploramos la posibilidad de que la asociación de enzimas de una vía específica confiera protección contra la inactivación mediada por los solutos compatibles. Probablemente sea la asociación de la vía glucolítica completa la que permita mantener la producción de energía en la célula, aun durante el estrés, tal y como lo observamos en las células completas (datos no mostrados), en las cuales el estrés térmico no parece modificar el metabolismo energético de *S. cerevisiae*. En los extractos citoplásmicos de levadura también pudimos observar que la asociación proporciona protección, ya que la producción de etanol a partir de glucosa no es inhibida por concentraciones fisiológicas de trehalosa. Se sugiere por tanto que la acumulación de solutos compatibles durante el estrés no afecta la actividad de enzimas debido a la asociación entre enzimas de algunas vías metabólicas.

Durante el estrés térmico, la levadura acumula el soluto compatible trehalosa mediante la fosforilación de las enzimas que sintetizan el disacárido por medio de proteínas cinasas dependientes de AMPc. La inducción de la expresión de genes de dichas enzimas se lleva a cabo por la unión de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p a la secuencia CCCCT (STRE, Stress Responsive Element) ubicada en los promotores de dichos genes (Winderickx y cols., 1996; Versele y cols., 2004). Sin embargo tan pronto termina el estrés los solutos compatibles son eliminados rápidamente (Singer y Lindquist, 1998). Una falla al producir (durante el estrés) o al eliminar (después del estrés) la trehalosa, resulta en la disminución de la supervivencia (Wera y cols., 1999). Se ha especulado que durante el estrés, la trehalosa protege a una serie de enzimas, evitando que sean dañadas y desnaturalizadas, pero en algunos casos se ha visto como la trehalosa inhibe la actividad de algunas (Hottiger y cols., 1994; Kaushik y Bhat, 2003; Sebollela y cols., 2004). La sensibilidad de las enzimas ante los solutos compatibles depende tanto de las características físicas como químicas de la enzima, modificándose su estructura y actividad de manera distinta. Tal es el caso de la RNAsa A, la lisozima, el citocromo c y el α -quimotripsinógeno que son estabilizadas por la trehalosa al adquirir una conformación más estable (Kaushik y Bhat, 2003); o la glutatión reductasa, la Na^+/K^+ -ATPasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglucosa isomerasa de levadura, la pirofosfatasa de levadura y la glutamato deshidrogenasa de bovino en las que disminuye de manera ligera la actividad enzimática in vitro (Esmann y cols., 2008; Hottiger y cols., 1993; Sebollela y cols., 2004); o como la H^+ -ATPasa de *Kluyveromyces lactis*, fosfoglicerato cinasa y la piruvato cinasa, en las cuales la viscosidad del solvente puede modificar o no la cinética enzimática debido a los cambios conformacionales en las proteínas (Sampedro y cols., 2002; Kramers, 1940). Por eso consideramos necesario comprender la relación de la trehalosa con las enzimas de una vía metabólica. En este trabajo encontramos que algunas enzimas aisladas de la glucólisis son inactivadas por la trehalosa, tal es el caso de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y hexocinasa, sin embargo algunas otras como la adolasa y la fosfoglicerato cinasa son resistentes al efecto del disacárido. La sensibilidad variada de diversas enzimas a la inactivación reversible mediada

por el soluto compatible reportada en este trabajo nos brinda una herramienta importante para explorar.

Al menos para trehalosa, sacarosa y glicerol se ha visto que el mecanismo de inactivación de la actividad enzimática es debido al incremento de la viscosidad dada por los solutos compatibles (Sampedro y cols., 1998, 2002). Si se considera que la viscosidad basal del citoplasma saturado (Ellis, 2001) incrementa con la acumulación de solutos compatibles, es probable que esta alta viscosidad sea la que inhibe la motilidad de algunas enzimas (Sampedro y Uribe, 2004). Entonces es interesante especular que las enzimas resistentes a la inactivación son más rígidas. Es decir que durante su ciclo catalítico no sufren grandes cambios conformacionales (sensibles a viscosidad). En este mismo escenario las enzimas que sufren grandes cambios conformacionales durante la catálisis serán más sensibles a la viscosidad (Sampedro y Uribe, 2004). De tal manera se puede pensar que la protección puede estar dada por la interacción entre las enzimas muy móviles con las enzimas rígidas, evitando la inhibición de la catálisis (Esmann y cols., 2008; Sampedro y cols., 2002; Singer y Lindquist, 1998). En este estudio encontramos que al mezclar las enzimas sensibles a la inactivación mediada por la trehalosa (GAPDH y HXK) con las resistentes (ALD y PGK), las primeras son protegidas contra la inactivación.

Es probable que la asociación entre enzimas favorezca el estado más compacto o plegado de las enzimas para que lleve a cabo la catálisis con la menor cantidad de cambios conformacionales o vibraciones, promoviendo así la canalización del sustrato (Srere, 1987), lo que permitirá que la reacción sea más eficiente y no sea afectada por el efecto de la trehalosa, por el contrario que ésta favorezca la conformación más estable. Esta asociación podría ser el mecanismo mediante el cual las enzimas que durante la inactivación térmica experimentan una serie de vibraciones de la cadena polipeptídica modificando su estructura nativa (Butler y Falke, 1995), sean protegidas y estabilizadas para continuar con el metabolismo de manera adecuada. La trehalosa también puede estar contribuyendo a la estabilización de las enzimas durante el estrés, ya que al establecer puentes de hidrógeno con los aminoácidos de superficie

se mantiene la estructura nativa de la enzima, inhibiendo los cambios estructurales que desnaturalicen a la proteína e impida su función (Crowe y cols., 1984).

Nosotros observamos que la actividad de la GAPDH previamente inactivada por la trehalosa, era protegida tanto por la PGK como la aldolasa; ésta última además de proteger contra la inactivación de la trehalosa incrementaba varias veces más la actividad de la mezcla. Por otro lado observamos también que al mezclar ambas enzimas resistentes, PGK y aldolasa, con la HXK la actividad era protegida pero de manera discreta. En ambos casos pudimos observar que en la mezcla había protección, quizá debido a que la asociación y la presencia del soluto compatible generen conformaciones más compactas, en las que el sitio activo este parcialmente estructurado y los cambios estructurales sean mínimos para llevar a cabo la catálisis. Esto nos lleva proponer que probablemente la aldolasa sea el ancla de este metabolon glucólítico, que al unirse a un andamio, como elementos del citoesqueleto, confiera estabilidad para llevar a cabo la catálisis y a la vez protección ante situaciones de estrés. Con respecto a esto, se ha comprobado que la glucólisis, uno de los sistemas más antiguos de producción de energía en los organismos, junto con sus enzimas tiene diversas funciones (Kim y Dang, 2005). Se ha visto que la aldolasa es una enzima capaz de interactuar con otras proteínas de la misma glucólisis, así como con otros elementos del citoesqueleto (Keleti y cols., 1989; Vértessy y cols., 1997; Walsh y cols., 1989). Su capacidad para proteger enzimas ha sido demostrada al revertirse la inactivación de PGK promovida por la asociación con microfilamentos (Raïs., 2000). Por otro lado junto con la GAPDH (Beth y cols., 1986), la aldolasa se puede unir a la banda 3 de la membrana del eritrocito (Strapazon y Steck, 1976; Uribe y cols., 1990). Es entonces que la aldolasa en presencia de su sustrato, fructosa 1,6-bisfosfato o el inhibidor competitivo butanediol 1,-bisfosfato, modifica su conformación liberándose de su sitio de unión a la banda 3 (Uribe y cols., 1990). Se ha descrito la posibilidad de que la aldolasa y la PGK se asocien para constituir el andamiaje de la glucólisis para que otras enzimas se unan (Campanella y cols., 2005; Raïs y cols., 2000; Vértessy y

cols., 1997; Walsh y cols., 1989). Sin embargo es necesario realizar estudios específicos que analicen la estructura de las enzimas durante esta asociación en dichas condiciones.

Uno puede imaginar que si las enzimas de las vías metabólicas no están protegidas contra los solutos compatibles en la célula, entonces es por eso que hay que eliminar el soluto compatible en cuanto la situación de estrés acaba (Wera y cols., 1999). Por tanto, aun in situ debe haber enzimas sensibles a los solutos compatibles y otras que se protejan debido a la asociación entre ellas. Esta asociación debe ser específica de ciertas vías como la glucólisis, el ciclo de Krebs (Green, 1964; Srere y Ovádi, 1990) pero no de todas como el ciclo de las pentosas fosfato. Para comprobar esta especificidad realizamos dos ensayos diferentes. En el primero observamos que la actividad de la GAPDH no es protegida contra la inactivación de la trehalosa ni por la presencia de HXK, ni albumina, ni lactato deshidrogenasa. Para el segundo tomamos una enzima perteneciente al ciclo de las pentosas, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la cual no fue protegida por la aldolasa en contra de los efectos de la trehalosa. Esto nos indica que la asociación es específica de las enzimas de una misma vía metabólica, lo que permite que ésta continúe con el metabolismo aun en situaciones de estrés.

Por tanto parece ser que la asociación de enzimas de una vía es específica, lo que confiere estabilidad a ésta aun durante situaciones de estrés y hace más eficiente el metabolismo.

CONCLUSIONES

- En el extracto citoplásmico observamos que la producción de etanol a partir de glucosa no es inhibida por concentraciones fisiológicas de trehalosa.
- La trehalosa inactiva a algunas enzimas aisladas como la HXK, la GAPDH y la G6PDH pero no a todas, pues la aldolasa y la PGK son resistentes.
- La asociación de enzimas protege contra la inactivación producida por la trehalosa (GAPDH/PGK, GAPDH/ALD, HXK/PGK y HXK/ALD).
- La protección de la GAPDH es específica de ALD y PGK
- La ALD no protege a enzimas de otras vías metabólicas, como la G6PDH.

REFERENCIAS

1. Al-Habori M. Microcompartmentation, metabolic channelling and carbohydrate metabolism. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1995; 27(2):123-32.
2. Aman RA, Wang CC. An improved purification of glycosomes from the procyclic trypomastigotes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1986; 21(3):211-20.
3. Ashmarina LI, Muronetz VI, Nagradova NK. Immobilized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase forms a complex with phosphoglycerate kinase. *Biochem. Int.* 1984; 9(4):511-21.
4. Attfield PV. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett.* 1987; 225(1-2):259-63.
5. Basu A, Bhattacharyya S, Chaudhuri P, Sengupta S, Ghosh AK. Extracellular trehalose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1760(2):134-40.
6. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(26):24261-7.
7. Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis. Samples, Reagents, Assesment of Results. 1983; Vol II, p.p.202, 203, 212, 213, 222, 223.
8. Beth AH, Conturo TE, Venkataramu SD, Staros JV. Dynamics and interactions of the anion channel in intact human erythrocytes: an electron paramagnetic resonance spectroscopic study employing a new membrane-impermeant bifunctional spin-label. *Biochemistry* 1986; 25(13):3824-32.
9. Butler SL, Falke JJ. Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study. *Biochemistry* 1996; 35(33):10595-600.
10. Campanella ME, Chu H, Low PS. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102(7):2402-7.
11. Cascante M, Sorribas A, Canela EI. Enzyme-enzyme interactions and metabolite channelling: alternative mechanisms and their evolutionary significance. *Biochem. J.* 1994; 298 (Pt 2):313-20
12. Chini EN, Meyer-Fernandes JR, Sola-Penna M. Monosaccharides and disaccharides decrease the Km for phosphorylation of a membrane-bound enzyme ATPase. *Z. Naturforsch C.* 1991; 46(7-8):644-6.
13. Clegg JS. The control of emergence and metabolism by external osmotic pressure and the role of free glycerol in developing cysts of *artemia salina*. *J. Exp. Biol.* 1964; 41:879-92.

14. Clegg JS, Jackson SA. Evidence for intermediate channelling in the glycolytic pathway of permeabilized L-929 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 160(3):1409-14.
15. Coe EL, Greenhouse WV. Possible regulatory interactions between compartmentalized glycolytic systems during initiation of glycolysis in ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973; 329(2):171-82.
16. Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science* 1984; 223(4637):701-703.
17. De Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J, Boller T, Wiemken A.. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 1994; 219(1-2):179-86.
18. Ellis RJ. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* 2001; 26(10):597-604.
19. Esmann M, Fedosova NU, Marsh D. Osmotic stress and viscous retardation of the Na,K-ATPase ion pump. *Biophys. J.* 2008; 94(7):2767-76.
20. Faber-Barata J, Sola-Penna M. Opposing effects of two osmolytes--trehalose and glycerol--on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase. *Mol. Cell. Biochem.* 2005; 269(1-2):203-7.
21. Felix CF, Moreira CC, Oliveira MS, Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR, Scofano HM, Ferreira-Pereira A. Protection against thermal denaturation by trehalose on the plasma membrane H⁺-ATPase from yeast. Synergetic effect between trehalose and phospholipid environment. *Eur. J. Biochem.* 1999; 266(2):660-4.
22. Fernández J, Soto T, Franco A, Vicente-Soler J, Cansado J, Gacto M. Enhancement of neutral trehalase activity by oxidative stress in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet. Biol.* 1998; 25(2):79-86.
23. Fulton AB. How crowded is the cytoplasm? *Cell* 1982; 30(2):345-7.
24. Gaertner FH. Unique catalytic properties of enzyme clusters. *Trends Biochem. Sci.* 1978; 3, 63.
25. Green DE, Murer E, Hultin HO, Richardson SH, Salmon B, Brierley GP, Baum H. Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of the red blood corpuscle and yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 1965; 112(3):635-47.
26. Hengge-Aronis R, Klein W, Lange R, Rimmele M, Boos W. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991; 173(24):7918-24.
27. Hoffmann S, Holzhütter HG. Uncovering metabolic objectives pursued by changes of enzyme levels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1158:57-70

28. Hottiger T, De Virgilio C, Hall MN, Boller T, Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur. J. Biochem.* 1994; 219(1-2):187-93.
29. Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S, Prior BA. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 1998; 144:671-80.
30. Jagdale GB, Grewal PS. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33(2):145-52.
31. Jørgensen K, Rasmussen AV, Morant M, Nielsen AH, Bjarnholt N, Zagrobelny M, Bak S, Møller BL. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005; 8(3):280-91.
32. Jules M, Guillou V, François J, Parrou JL. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70(5):2771-8.
33. Katewa SD, Katyare SS. A simplified method for inorganic phosphate determination and its application for phosphate analysis in enzyme assays. *Anal. Biochem.* 2003; 323(2):180-7.
34. Kaushik JK, Bhat R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(29):26458-65.
35. Keleti T, Ovádi J, Batke J. Kinetic and physico-chemical analysis of enzyme complexes and their possible role in the control of metabolism. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1989; 53(2):105-52.
36. Keller A, Peltzer J, Carpentier G, Horváth I, Oláh J, Duchesnay A, Orosz F, Ovádi J. Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1770(6):919-26.
37. Keller F, Schellenberg M, Wiemken A. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* 1982; 131(4):298-301.
38. Kellershohn N, Seydoux FJ. Functional asymmetry of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the transient kinetics of reductive dephosphorylation of 1,3-diphosphoglycerate. *Biochemistry* 1979; 18(12):2465-70.
39. Khoroshilova NA, Muronetz VI, Nagradova NK. Interaction between D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase and its functional consequences. *FEBS Lett.* 1992; 297(3):247-9.

40. Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 2005; 30(3):142-50.
41. Kovacs J, Low P, Pacz A, Horvath I, Olah J, Ovadi J. Phosphoenolpyruvate-dependent tubulin-pyruvate kinase interaction at different organizational levels. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(9):7126-30.
42. Kramers, HA. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica.* 1940; 7: 284-304.
43. Kvassman J, Pettersson G. Evidence that 1,3-bisphosphoglycerate dissociation from phosphoglycerate kinase is an intrinsically rapid reaction step. *Eur. J. Biochem.* 1989; 186(1-2):261-4.
44. Lebedeva N, Auffret Vander Kemp P, Bjornsti MA, Lavrik O, Boiteux S. Trapping of DNA topoisomerase I on nick-containing DNA in cell free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 2006; 5(7):799-809.
45. Lopes DH, Meyer-Fernandes JR, Sola-Penna M. Effects of trehalose and ethanol on yeast cytosolic pyrophosphatase. *Z. Naturforsch C.* 1999; 54(3-4):186-90.
46. Malhotra OP, Prabhakar P, Sen Gupta T, Kayastha AM. Phosphoglycerate-kinase-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase interaction. Molecular mass studies. *Eur. J. Biochem.* 1995; 227(1-2):556-62.
47. Minton AP, Wilf J. Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* 1981; 20(17):4821-6.
48. Nunes OC, Manaia CM, Da Costa MS, Santos H. Compatible Solutes in the Thermophilic Bacteria *Rhodothermus marinus* and "*Thermus thermophilus*" *Appl. Environ. Microbiol.* 1995 Jun; 61(6):2351-2357.
49. Nwaka S, Kopp M, Burgert M, Deuchler I, Kienle I, Holzer H. Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? *FEBS Lett.* 1994; 344(2-3):225-8.
50. Ocón A, Hampp R, Requena N. Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 2007; 174(4):879-91.
51. Ovádi J, Keleti T. Kinetic evidence for interaction between aldolase and D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 1978; 85(1):157-61.
52. Ovádi J, Srere PA. Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell. Biochem. Funct.* 1996; 14(4):249-58.
53. Ovádi J, Saks V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Mol. Cell Biochem.* 2004; 256-257(1-2):5-12.

54. Paine MJI, Scrutton NS, Munro AW, Gutierrez A, Roberts GCK, Wolf CR, Electron transfer partners of cytochrome P450. In: P.R. Ortiz de Montellano, Editor, *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (3rd edition), Kluwer Academic/Plenum Publishers (2005), pp. 115–148.
55. Porter ME, Johnson KA. Transient state kinetic analysis of the ATP-induced dissociation of the dynein-microtubule complex. *J. Biol. Chem.* 1983; 258(10):6582-7.
56. Raš B, Ortega F, Puigjaner J, Comin B, Orosz F, Ovádi J, Cascante M. Quantitative characterization of homo- and heteroassociations of muscle phosphofructokinase with aldolase. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1479(1-2):303-14.
57. Ratnakumar S, Tunnacliffe A. Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(6):902-13.
58. Robinson JB Jr, Inman L, Sumegi B, Srere PA. Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon. *J. Biol. Chem.* 1987; 262 (4):1786-90.
59. Sampedro JG, Guerra G, Pardo JP, Uribe S. Trehalose-mediated protection of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration. *Cryobiology* 1998; 37(2):131-8.
60. Sampedro JG, Cortés P, Muñoz-Clares RA, Fernández A, Uribe S. Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1544(1-2):64-73.
61. Sampedro JG, Muñoz-Clares RA, Uribe S. Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *J. Bacteriol.* 2002; 184(16):4384-91.
62. Sampedro JG, Uribe S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 256-257(1-2):319-27.
63. Sebollela A, Louzada PR, Sola-Penna M, Sarone-Williams V, Coelho-Sampaio T, Ferreira ST. Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2004; 36(5):900-8.
64. Shearer G, Lee JC, Koo JA, Kohl DH. Quantitative estimation of channeling from early glycolytic intermediates to CO in intact *Escherichia coli*. *FEBS J.* 2005; 272(13):3260-9.
65. Singer MA, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 1998; 16(11):460-8.
66. Sleator RD, Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002; 26(1):49-71.
67. Somero GN. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am. J. Physiol.* 1986; 251(2 Pt 2):197-213.

68. Sola-Penna M, Meyer-Fernades JR. Protective role of trehalose in thermal denaturation of yeast pyrophosphatase. *Z. Naturforsch C.* 1994; 49(5-6):327-30.
69. Sola-Penna M, Ferreira-Pereira A, Lemos AP, Meyer-Fernandes JR. Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme. *Eur. J. Biochem.* 1997;248(1):24-9.
70. Sola-Penna M, Meyer-Fernandes JR. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* 1998; 360(1):10-4.
71. Srere PA. Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56:89-124.
72. Srere PA, Ovadi J. Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett.* 1990; 268(2):360-4.
73. Stallcup WB, Koshland DE Jr. Half-of-the sites reactivity in the catalytic mechanism of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 1973; 80(1):77-91.
74. Strapazon E, Steck TL. Binding of rabbit muscle aldolase to band 3, the predominant polypeptide of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1976; 15(7):1421-4.
75. Sukhodolets MV, Muronetz VI, Nagradova NK. Kinetic evidence for the interaction between rabbit muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochem. Int.* 1987; 15(2):373-9.
76. Sukhodolets MV, Muronetz VI, Tsuprun VL, Kaftanova AS, Nagradova NK. Association of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. The biochemical and electron-microscopic evidence. *FEBS Lett.* 1988; 238(1):161-6.
77. Sygusch J, Beaudry D. Catalytic activity of rabbit skeletal muscle aldolase in the crystalline state. *J. Biol. Chem.* 1984; 259(16):10222-7.
78. Timasheff SN. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993; 22:67-97.
79. Thevelein JM, Hohmann S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20(1):3-10.
80. Uribe S, Dalton LA, Samson P, McIntyre JO. Interaction of spin-labeled aldolase with resealed erythrocytes. American Soc. Biochemistry and Molecular biology Meeting New Orleans, USA June 3-7, 1990. Abstract.
81. Uribe S, Sampedro JG. Measuring Solution Viscosity and its Effect on Enzyme Activity. *Biol. Proced. Online* 2003; 5:108-115.

82. Vas M, Batke J. Evidence for absence of an interaction between purified 3-phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1981; 660(2):193-8.
83. Verkman AS. Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments. *Trends Biochem. Sci.* 2002; 27(1):27-33.
84. Versele M, Thevelein JM, Van Dijck P. The high general stress resistance of the *Saccharomyces cerevisiae* fil1 adenylate cyclase mutant (Cyr1Lys1682) is only partially dependent on trehalose, Hsp104 and overexpression of Msn2/4-regulated genes. *Yeast.* 2004; 21(1):75-86.
85. Vértessy BG, Orosz F, Kovács J, Ovádi J. Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/ microtubule system. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(41): 25542-6.
86. Walsh JL, Keith TJ, Knull HR. Glycolytic enzyme interactions with tubulin and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 999(1):64-70.
87. Weber JP, Bernhard SA. Transfer of 1, 3-diphosphoglycerate between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase via an enzyme-substrate-enzyme complex. *Biochemistry* 1982; 21(17):4189-94.
88. Welsh DT. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 2000; 24(3):263-90.
89. Wera S, De Schrijver E, Geyskens I, Nwaka S, Thevelein JM. Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 1999; 343 Pt 3:621-6.
90. Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Van Dijck P, Thevelein JM. Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol. Gen. Genet.* 1996; 252(4):470-82.
91. Winkler K, Kienle I, Burgert M, Wagner JC, Holzer H. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. *FEBS Lett.* 1991; 291(2):269-72.
92. Zancan P, Sola-Penna M. Trehalose and glycerol stabilize and renature yeast inorganic pyrophosphatase inactivated by very high temperatures. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; 444(1):52-60.
93. Zentella R, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Folch-Mallol J, Bonini B, Van Vaeck C, Gaxiola R, Covarrubias AA, Nieto-Sotelo J, Thevelein JM, Iturriaga G. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant Physiol.* 1999; 119(4):1473-82.