



Trehaloza – substancja przedziwna. Właściwości, występowanie, zastosowania

Barbara Wolska-Mitaszko

Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Trehalose – the amazing substance. Properties, appearance and applications

Summary

This review presents chemical and biochemical properties of trehalose. Moreover, the results of studies on biosynthesis and accumulation, as well as some aspects of thermotolerantion and osmoadaptation are discussed. The existing and potential applications in many fields, which may be medical or biological, are listed therein.

Key words:

trehalose, osmoadaptation, thermotolerantion, applications.

1. Wstęp

Nazwa trehaloza wprowadzona została przez francuskiego chemika M. Berthelota dla określenia substancji o charakterze węglowodanowym, identycznej z cukrem grzybowym tzw. mykozą. Substancja ta pochodzi z *trehala manna* – pustynnej miany występującej w kokonach poczwerek chrząszcza *Larinus nidificans* spotykanego na terenach Azji Mniejszej (1). W przeprowadzonej analizie struktury tej substancji wykazano, że jest ona zbliżona do sacharozy. Oba te dwucukry będące źródłem węgla i energii mogą także wykazywać funkcję bardziej specyficzną, uczestnicząc w mechanizmach ochronnych uruchamianych w ekstremalnych warunkach środowiska. Dotyczy to przede wszyst-

Adres do korespondencji

Barbara Wolska-Mitaszko,
Zakład Biologii
Molekularnej,
Instytut Mikrobiologii
i Biotechnologii UMCS,
ul. Akademicka 19,
20-033 Lublin;
e-mail:
krusinek@biotop.umcs.
lublin.pl

kim anhydrobiontów – organizmów zdolnych przetrwać stan całkowitego odwodnienia. Należą tu tzw. rośliny wskrzeszone (*resurrection plants*) jak np. *Selaginella lepidophylla* czy *Myrothamus flabellifolia*, a także cysty niektórych małży i krewetek, poczwarki owadów oraz drożdże.

W roślinach wyższych trehaloza jest spotykana rzadko. Obecność tego cukru obserwowana jest w prymitywnych gromadach roślin naczyniowych oraz w roślinach z mykoryzą jak i w brodawkach roślin motylkowatych, gdzie symbiotyczne rizobia mają zdolność wytwarzania tego dwucukru (2). Zastanawiający jest fakt, że rośliny pomimo generalnego braku trehalozy, wytwarzają trehalazę, enzym hydrolizujący ten cukier. Zaskakujące jest także występowanie trehalazy w niektórych narządach ssaków, chociaż zwierzęta również nie syntetyzują i nie akumulują tego substratu (3).

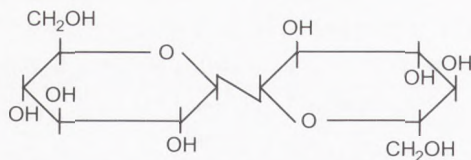
Ostatnio udowodniono, że włączenie drogą inżynierii genetycznej w genom roślin zbożowych genów odpowiedzialnych za syntezę trehalozy może znacznie poprawić tolerancję tych roślin na suszę i zasolenie. Wykazano również, że ekspresja drożdżowych genów TPS1 kodujących syntazę trehalozo-6-fosforanu, wprowadzonych w genom tytoniu, wystarcza by spowodować akumulację trehalozy w badanych roślinach transgenicznym, które nabywają cechę zwiększonej tolerancji na suszę (4). Akumulacja znacznych ilości trehalozy w mikroorganizmach w niekorzystnych warunkach środowiska, może sugerować, że gromadzenie tego cukru jest rodzajem komórkowej odpowiedzi na stres.

Drożdże zdolne do syntezy dużych ilości trehalozy i efektywnej jej hydrolizy do glukozy mogą szybko przechodzić ze stanu anabiozy (zamrożenie, wysuszenie) do stanu pełnej aktywności metabolicznej. Szczepy drożdży o takich właściwościach są bardzo poszukiwane i cenione w przemyśle spożywczym oraz piekarniczym.

Stwierdzono ponadto, że obecność trehalozy stabilizuje struktury termowrażliwych enzymów, a także wykazano jej zdolność do zmniejszenia stopnia agregacji białek. Z tych unikatowych właściwości wynikają możliwe zastosowania, jak np. stabilizacja i konserwacja niektórych leków, żywności i kosmetyków, a także możliwość stosowania trehalozy w leczeniu schorzeń wynikających z nadmiernej agregacji białek.

2. Trehaloza – charakterystyka i występowanie

Trehaloza (α -D-glukopiranozylo-1- α -D-glukopiranozyd) jest dwucukrem nieredukującym, zbudowanym z dwóch cząsteczek glukozy połączonych nietypowym wiązaniem α -glikozydowym (rys. 1). Łączy ono węgle nr 1 obu cząsteczek, eliminując właściwości redukujące. Trehaloza wykazuje wysoką hydrofilowość i chemiczną stabilność. Podczas akumulacji ma zdolność tworzenia niehigroskopijnego „szklawa”. Brak wewnętrznych wiązań wodorowych powoduje niezwykle elastyczność wiązania glikozydowego. Energia swobodna (ΔG_0) hydrolizy tego wiązania wynosi 18,4 kJ/mol (1). Trehaloza jest łatwo hydrolizowana do glukozy i może pełnić w ko-



Rys. 1. Chemiczna struktura trehalozy.

mórkach funkcję niereaktywnej rezerwy tego cukru. Występuje w postaci trzech izomerów: α,α -trehalozy, α,β -trehalozy i β,β -trehalozy. Izomer α,α jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie. Jego obecność wykazano w grzybach (1,5-7), bakteriach (8-10), niektórych roślinach (2,4,11,12), nicieniach (13) i owadach (14).

Oprócz magazynowania pewnej ilości glukozy udostępnianej procesom glikolizy (15), trehaloza jako związek osmotycznie czynny uczestniczy w chemicznym i fizycznym zabezpieczeniu integralności struktur komórkowych, a szczególnie błon i białek enzymatycznych (16). W najbardziej przekonującej koncepcji wskazuje się na możliwości asocjacji trehalozy z błonami biologicznymi dzięki wytworzeniu wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi cukru a resztami fosforanowymi tzw. „części głowowych” fosfolipidów błonowych (17). Taka asocjacja powoduje efektywne zabezpieczenie błon podczas procesów wysychania czy zamrażania, gdyż grupy hydroksylowe trehalozy zastępując cząsteczki wody utrzymują płynność dwuwarstwowych struktur lipidowych. Proces ten pozwala zachować przepuszczalność błon komórkowych zapobiegając ich przejściu do fazy żelu (17). Ponadto w porównaniu z innymi dwucukrami czy glicerolem trehaloza jest cząstką najbardziej efektywną w zapobieganiu wytworzenia połączeń pomiędzy odwodnionymi strukturami błon (18,19).

Trehaloza, której ilość w komórkach drożdży wzrasta podczas wysuszania, zamrażania lub szoku termicznego, zabezpiecza struktury białek dzięki dwóm głównym mechanizmom (17,20):

- 1) zastępuje wodę, wytwarzając wiązania wodorowe między grupami hydroksylowymi cukru a polarnymi ugrupowaniami białek,
- 2) jako cukier nieredukujący nie uczestniczy w reakcji Maillarda, w której cukry redukujące, np. glukoza reagują z wolnymi grupami aminowymi białek, podczas ich odwodnienia (21).

U drożdży i grzybów nitkowatych trehaloza występuje w sporach i sklerocjach (22). Wykazano, że gromadzona jest w okresach głodzenia, spoczynku oraz podczas procesów sporulacji, a wykorzystywana – w okresie kiełkowania spor. Możliwość wykorzystania trehalozy jako jedyne źródła węgla zaobserwowano w sporach grzybów, które mają zdolność kiełkowania w wodzie (23). Obecność trehalozy wykazano również w komórkach wegetatywnych drożdży poddawanych różnego rodzaju stresom, takim jak: działanie toksycznych substancji (np. metali ciężkich), ekstremalnie niskiej bądź wysokiej temperatury, ciśnienia hydrostatycznego, a także podczas wysuszania, odwodnienia i stresu tlenowego (5,6,22,24). Właściwości trehalozy jako czynnika zabezpieczającego przed uszkadzającym działaniem stresu lub

jako czynnika stabilizującego wykazano *in vivo*, na permeabilizowanych komórkach, jak również *in vitro* na liposomach, błonach komórkowych lub oczyszczonych białkach (25). Pomimo wielu badań molekularny mechanizm działania trehalozy pozostaje nie w pełni wyjaśniony.

3. Metabolizm trehalozy u mikroorganizmów

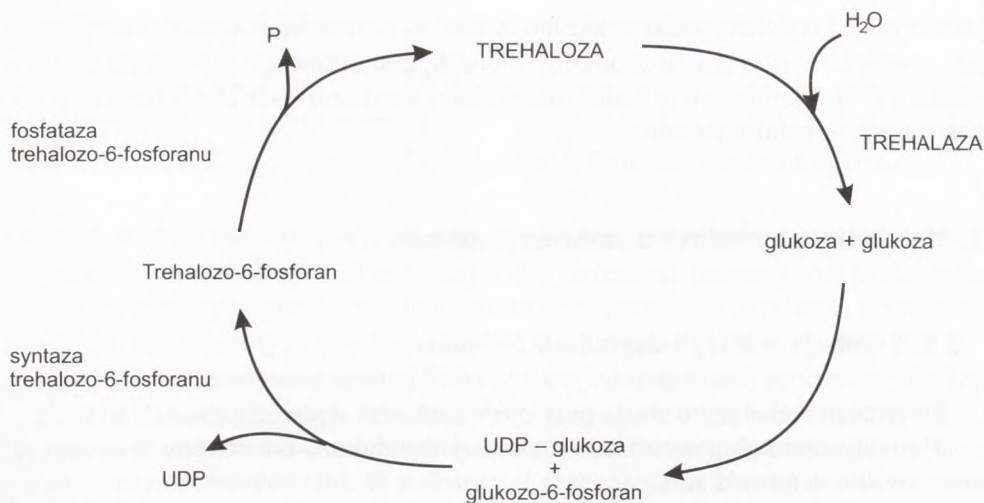
3.1. Regulacja syntezy i degradacji trehalozy

Biosynteza trehalozy u drobnoustrojów zachodzi w dwóch etapach (rys. 2):

- 1) przyłączanie glukozy z UDP – glukozy do glukozo-6-fosforanu z wytworzeniem trehalozo-6-fosforanu;
- 2) defosforylacja trehalozo-6-fosforanu z utworzeniem trehalozy oraz wolnego nieorganicznego fosforanu.

Etap pierwszy katalizowany jest przez syntazę trehalozo-fosforanu (TPS; EC 2.4.1.15). Natomiast drugi, defosforylacja trehalozo-6-fosforanu zachodzi przy udziale specyficznej fosfatazy (TPP; EC 3.1.3.12). Oba te enzymy obecne są w cytozolu i współdziałają ze sobą. W *S. cerevisiae* (26) opisano występowanie natywnego kompleksu (630-800 kDa) wykazującego obecność obu aktywności. Oczyszczony kompleks TPS zawiera trzy podjednostki o masach cząsteczkowych 130, 100 i 53 kDa (26). Podjednostki kompleksu TPS syntetyzowane są konstytutywnie, a ekspresję ich genów stymuluje podwyższona temperatura (27). Geny kodujące podjednostki zostały wyizolowane i zsekwencjonowane (27,28). Gen *TPS1* koduje najmniejszą podjednostkę TPS; gen *TPS2* – podjednostkę 100 kDa; a gen *TPS3* – największą podjednostkę. Wykazano, że mutanty z delecją w genie *TPS* charakteryzują się zredukowaną osmoadaptacją i termotolerancją.

W hydrolizie trehalozy uczestniczą różne enzymy mikroorganizmów (29). Trehalozo-fosfataza (TP; fosforylaza α - α trehalozy, EC 2.4.1.64) bierze udział w tym procesie u *Euglena gracilis* i *Pichia fermentas*. Hydrolaza trehalozo-fosforanu (TPH, α - α fosfotrehalaza, EC 3.2.1.93) występuje u *Bacillus popillae* i *E. coli*. Trehalaza (TH lub THA, α - α trehalozo-glukohydrolaza, EC 3.2.1.28) hydrolizuje ten substrat u innych bakterii, roślin, grzybów i zwierząt. Grzybowe trehalazy (THA, EC 3.2.1.28) zaliczane są do dwóch głównych klas różniących się optimum pH i termostabilnością (30,31). Występują trehalazy kwaśne (nieregulatorowe), które są glikoproteinami wakuolarnymi lub zewnątrzkomórkowymi oraz cytozolowe trehalazy neutralne (regulatorowe), które nie są glikozylowane (30,31). U wielu gatunków koegzystują dwa typy trehalaz co sugeruje istnienie dwóch typów wykorzystania trehalozy. Dekompartmentalizacja trehalazy proponowana jest jako mechanizm inicjujący hydrolizę trehalozy u gatunków wykazujących obecność kwaśnej trehalazy (6). U grzybów, w których dominuje trehalaza neutralna o aktywności regulowanej przez cAMP,



Rys. 2. Biosynteza i degradacja trehalozy; P – fosforan, UDP – difosforan urydyny.

przy wykorzystaniu trehalozy występują zależne od cAMP kaskadowe reakcje fosforylacji białek (31). Kwaśne trehalazy są szeroko rozpowszechnione u grzybów. Jednakże, u tych organizmów w nieznacznej ilości występuje trehalaza neutralna, która prawdopodobnie jest inicjatorem szybkiego rozkładu trehalozy. Oba typy trehalaz o takiej samej subkomórkowej lokalizacji występują w *S. cerevisiae* i *Candida utilis* (23,32). Drożdże te zawierają kwaśną trehalazę znajdującą się w wakuolach, gdzie z nieaktywnego prekursora w wyniku działania proteiny A powstaje forma aktywna enzymu, podczas gdy neutralna trehalaza zlokalizowana jest w cytozolu (32,33). Aktywna, ufosforylowana forma neutralnej trehalazy *S. cerevisiae* jest prawdopodobnie dimerem złożonym z dwóch identycznych podjednostek o masie 80 000 (23). Enzym aktywowany jest w procesie fosforylacji zależnej od cAMP zaś inaktywacja odbywa się przez defosforylację trehalazy.

Geny *NTH1*, *NTH2* i *ATH1* obu typów trehalaz oraz geny *TPS* kodujące kompleks syntazy trehalozo-6-fosforanu sklonowano i sekwencjonowano dla *S. cerevisiae* (27,28,33-35). Można oczekiwać zatem szybkiego postępu badań nad kontrolą metabolizmu trehalozy jak również identyfikacji homologicznych genów u innych niż drożdże mikroorganizmów.

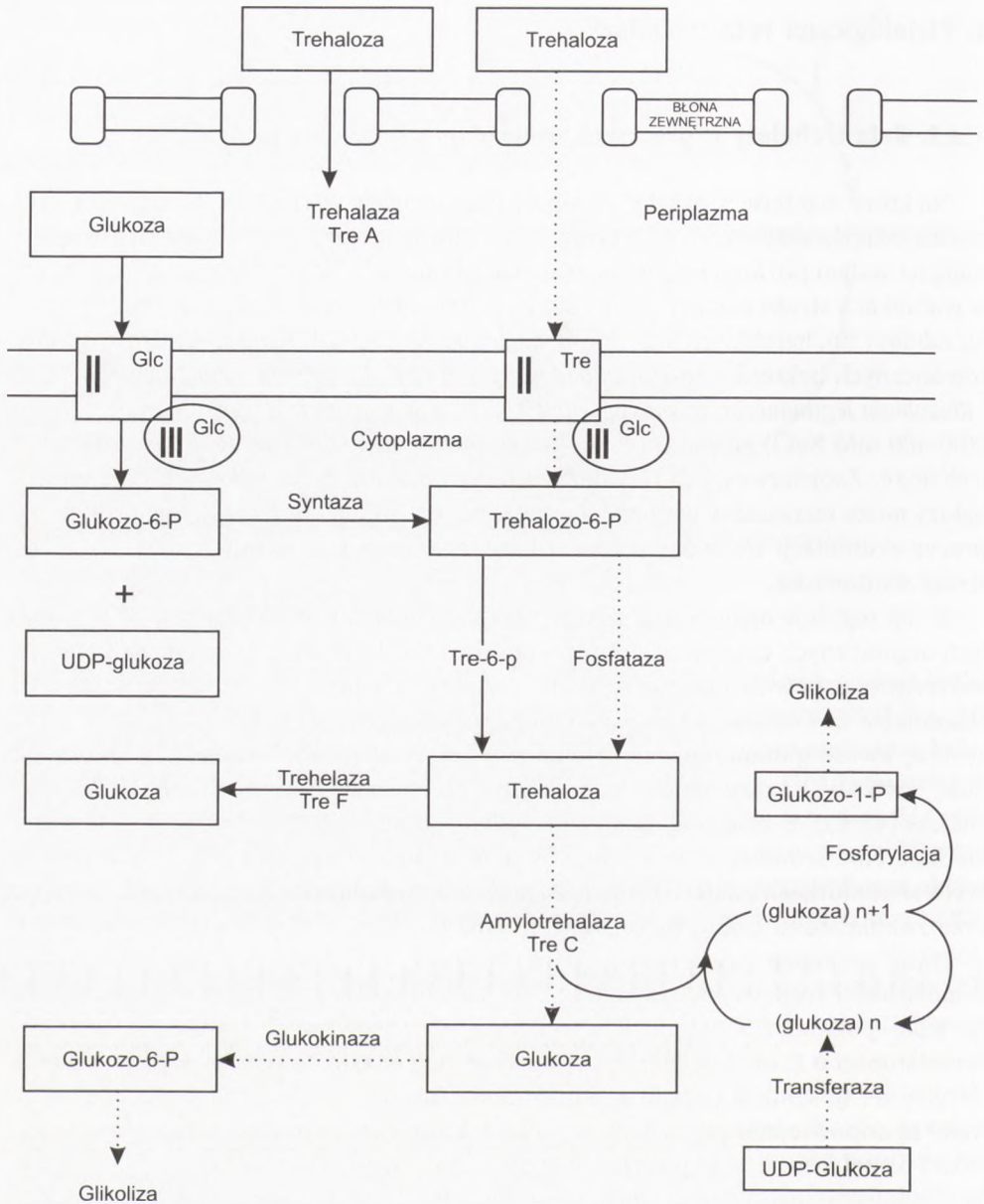
4. Fizjologiczna rola trehalozy

4.1. Rola trehalozy w procesach osmoadaptacji mikroorganizmów

Niektóre bakterie i grzyby w hiperosmotycznych warunkach środowiska gromadzą związki aktywne osmotycznie, które chronią je przed odwodnieniem i utrzymują na stałym poziomie ciśnienie wewnątrz komórki (36,37). Akumulację trehalozy w warunkach stresu osmotycznego stwierdzono u *Pseudomonas fluorescens* (38), *Bacillus subtilis* (39), halofilnych sinic (*Cyanobacterium* sp.) i u halofilnych beztlenowych fototroficznych bakterii z rodzaju *Rhodospirillum* (40). *Rhizobium meliloti* szczep SU47 i *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifoli* TA1 (41) w warunkach stresu osmotycznego (200-600 mM NaCl) gromadzą kwas glutaminowy, a w stacjonarnej fazie wzrostu – trehalozę. Zaobserwowano również, że u tych bakterii brodawkowych poziom trehalozy może wzrastać w warunkach obniżonego ciśnienia tlenu (41). Sugeruje to, że proces akumulacji trehalozy u bakterii może występować w odpowiedzi na różne stresy środowiska.

E. coli reguluje osmotyczną wytrzymałość cytoplazmy przez akumulację K^+ i małych organicznych cząstek osmoprotektantów (42). Tolerancję osmotyczną komórce bakteryjnej zapewnia obecność proliny, betainy i cholin (43). Po wyczerpaniu tych składników ze środowiska komórka może osiągnąć wyższy stopień tolerancji przez syntezę kwasu glutaminowego i trehalozy (42). W warunkach stresu osmotycznego duże ilości kwasu glutaminowego wykryto u *Enterobacter aerogenes* i *Salmonella typhimurium* (42,43). U halofilnej bakterii *Ectothirhodospira halochloris* odpornej na wysokie zasolenie środowiska występuje betaina, etoina i trehaloza (40). Trehalozę wykryto w komórkach bakterii fototroficznych oraz w komórkach drożdży zdolnych do przetrwania stanu całkowitego odwodnienia (1,36).

Drogi przemian biochemicznych trehalozy u *E. coli* są różne w niskiej i wysokiej osmolarności środowiska (rys. 3) (36). Mechanizm syntezy trehalozy regulowany jest na kilku poziomach. Akumulacja trehalozy obserwowana w warunkach wysokiej osmolarności u *E. coli* jest niezbędna do aktywacji enzymów syntezy tego cukru (44). Enzymy te, tj. syntaza trehalozo-6-fosforanu i fosfataza trehalozo-6-fosforanu kodowane są odpowiednio przez geny *otsA* i *otsB*, które tworzą operon indukowany w wysokiej osmolarności oraz podczas wejścia w stacjonarną fazę wzrostu (45). Przejście to regulowane jest przez produkt genu *rpoS* (44), który wymagany jest podczas syntezy glikogenu, przy wytwarzaniu odporności na nadtlenek wodoru i podczas długotrwałego głodzenia komórek. U *E. coli* indukuje on wytwarzanie od 15 do 20 białek i działa jako alternatywny czynnik δ (44,45). Trehaloza nie jest zaangażowana w ten proces i gromadzony dwucukier jest rozkładany do glukozy przez trehalazę (Tre F) zlokalizowaną w cytoplazmie bakterii (46). W hydrolizę gromadzonej trehalozy może być zaangażowany drugi enzym, trehalaza TreA (47). Aktywność tej trehalazy zlokalizowanej w przestrzeni periplazmatycznej komórek *E. coli* pojawia się przy ciś-



Rys. 3. Drogi syntezy i degradacji trehalozy u *E. coli* przy niskiej (⋯→) i wysokiej (→) osmolarności (36).

nieniu osmotycznym środowiska rzędu 250 mM NaCl powodując hydrolizę nadmiaru trehalozy wytworzonej w odpowiedzi na stres osmotyczny. Pozwala to na wykorzystanie trehalozy jako źródła węgla i energii w tych warunkach środowiska.

Zarówno regulacja aktywności trehalazy Tre A, jak i Tre F jest częściowo zależna od czynnika δ (45). Tre A jest silnie indukowana przez wzrost w wysokiej osmolarności, natomiast Tre F jest słabo indukowana przez wysoką osmolarność, za to silnie przez trehalozę (45). Opinie dotyczące funkcji Tre F są podzielone. Horlacher i wsp. (46) donoszą, że funkcją Tre F jest transport i przekształcenie wewnątrzkomórkowej trehalozy po przeniesieniu komórek ze środowiska o wysokiej do niskiej osmolarności. Wtedy aktywność Tre F jest wystarczająco niska by nie hamować syntezy trehalozy w wysokiej osmolarności, ale wystarczająco wysoka by zapewnić wykorzystanie zmagazynowanej trehalozy po powrocie do niskiej osmolarności, gdy synteza została już zakończona.

W warunkach niskiego ciśnienia osmotycznego środowiska rozkład trehalozy u *E. coli* jest przeprowadzany przez amylorehalazę. Enzym ten uwalnia z trehalozy jedną cząsteczkę glukozy, natomiast druga cząsteczka zostaje przeniesiona na akceptor typu polimeru glukozy analogiczny do maltodekstryn (47). W tym przypadku wysoka osmolarność środowiska hamuje transport i hydrolizę trehalozy natomiast indukuje wewnątrzkomórkową syntezę trehalozy.

Zaobserwowano, że *E. coli* szczep DH i *Bacillus thuringiensis* szczep HD-1 w obecności trehalozy w środowisku, wykazują zwiększoną odporność na odwodnienie spowodowane zamrażaniem komórek (16). Brak trehalozy podczas odwodnienia redukuje przeżywalność bakterii odpowiednio do 8% u *E. coli* i 14% dla *B. thuringiensis* (16). Natomiast w obecności 100 mM roztworu trehalozy w środowisku przeżywalność *E. coli* wynosi 70%, a *B. thuringiensis* 57%.

Przy umiarkowanym niedoborze wody spowodowanym wysokim ciśnieniem osmotycznym, różne roztwory osmotycznie czynne mogą utrzymywać żywotność komórek. Jednak ochronę komórek mikroorganizmów w ekstremalnych warunkach odwodnienia zapewniają dwucukry nieredukujące, np. trehaloza.

4.2. Rola trehalozy w nabyciu termotolerancji

W przeprowadzonych badaniach nad *S. cerevisiae* wykazano, że trehaloza niezbędna jest do przetrwania wysokich temperatur, które niszczą integralność błon komórkowych, powodując denaturację i agregację białek (48-50). W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono (51), współdziałanie trehalozy z białkami szoku termicznego, HSP (*heat shock proteins*), które funkcjonują jako białka opiekuńcze (chaperony) zapobiegające agregacji białek lub jak np. HSP-104, ułatwiające resolubilizację i reaktywację już agregujących białek (52,53).

Akumulacja trehalozy i białek HSP w drożdżach (*S. cerevisiae* (54) i *S. pombe* (55)) oraz w *Neurospora crassa* (56) może być indukowana zarówno przez szok termiczny jak i przez inne stresi (57). W laboratorium Wiemkena (1) stwierdzono ścisłą korelację między zawartością trehalozy a odpornością na działanie szoku termicznego. Szczepy drożdży z mutacjami powodującymi obniżoną syntezę neutralnej trehalazy, zawierały

większe ilości trehalozy i były bardziej odporne na szok termiczny w porównaniu z drożdżami szczepu dzikiego (58). Korelację między poziomem trehalozy a odpornością szeregu pokrewnych gatunków drożdży na wysoką i ekstremalnie obniżoną temperaturę wykazał również Attfield (59). Podczas logarytmicznej fazy wzrostu drożdży poziom syntezy trehalozy oraz białka HSP-104 jest niski, natomiast podnosi się w komórkach ze stacjonarnej fazy wzrostu, w sporach drożdży jak również w komórkach z logarytmicznej fazy wzrostu poddanych działaniu wysokich temperatur (60). Sugeruje to rolę trehalozy nie tylko jako rezerwy energetycznej, ale również jako czynnika ochraniającego przed niszczącym działaniem stresu (61,62). Mutacje genu *TPS* powodują, że komórki drożdży, stając się niezdolne do wytwarzania trehalozy, są bardziej wrażliwe na wysoką temperaturę (61). Z kolei fakt, że mutanty w genie *TPS* wykazują zmniejszoną termotolerancję, sugeruje, że nie tylko trehaloza, ale także np. białko TPS1 może odgrywać ważną rolę w nabyciu odporności na stres. Dzieje się to prawdopodobnie poprzez stymulację ekspresji genów białek szoku termicznego (63). Nie wiadomo jednak dlaczego u mutantów, charakteryzujących się wysokim poziomem trehalozy, którym brakuje genu *NTH1* kodującego enzym odpowiedzialny za hydrolizę trehalozy, obserwuje się niewielką zdolność przetrwania ekstremalnych warunków. Wzmoczone wytwarzanie trehalozy podczas szoku termicznego może wynikać ze wzrostu aktywności kompleksu syntazy trehalozy (TPS) w podwyższonej temperaturze, wzrostu syntezy białek TPS1 i TPS2 lub zwiększenia puli substratów do syntezy trehalozy, tj. UDP – glukozy i glukozy-6-fosforanu (64). Jednakże problemem niemal wszystkich badań, wskazujących na korelację między poziomem trehalozy a termotolerancją drożdży jest fakt, że badane warunki i rodzaje mutacji wpływają nie tylko na poziom trehalozy, ale również na syntezę białek szoku termicznego.

Trehaloza hydrolizowana jest przez wiele trehalaz, których geny zidentyfikowano i sklonowano (33-35,64). U drożdży, gen *ATH1*, kodujący kwaśną trehalazę wyrażany jest w fazie stacjonarnej (65). Mutanty delecyjne *ath1* mając wysoki poziom trehalozy, lepiej przeżywają dehydratację, zamrożenie czy ekspozycję na etanol (66), lecz niezdolne są do wykorzystania egzogennej trehalozy jako źródła węgla (67). Enzymy kodowane przez geny *NTH1* i *NTH2* syntetyzowane są konstytutywnie, ale ekspresja ich genów zwiększona jest w podwyższonej temperaturze, co prowadzi do paradoksalnej sytuacji, że enzymy zarówno syntezy jak i hydrolizy trehalozy są równocześnie aktywowane termicznie. Podczas wychodzenia komórek drożdżowych z szoku termicznego lub z fazy stacjonarnej w hydrolizie trehalozy uczestniczy neutralna trehalaza cytozolowa (THA), białko NTH1p (68). Usunięcie genu *NTH1* powoduje, że komórki rosnące w podwyższonej temperaturze akumulują większe ilości trehalozy (67,68). Drugi gen, *NTH2*, wykazujący 77% identyczności sekwencji nukleotydów z genem *NTH1* został również zidentyfikowany u *S. cerevisiae* (68). Rola tego genu nie jest jasna, a jego utrata nie powoduje nadmiernej syntezy trehalozy. W komórkach niosących pojedynczą mutację *nth1* obniża się hydroliza trehalozy po szoku termicznym (68). Oba białka NTH1p i NTH2p mają po dwa potencjalne miejsca fosforylacji i aktywność ich może być regulowana przez kinazę białkową zależną od cAMP (69).

Mutanty drożdżowe z mutacją w genie *bcy1-1*, kodującym regulatorową podjednostkę kinazy zależnej od cAMP, niezdolne do wysokiej akumulacji trehalozy, są bardzo wrażliwe na temperaturę. Zaś komórki z mutacją w strukturalnym genie cykazy adenylowej *cyr1-2*, wytwarzają trehalozę w sposób konstytutywny i są wyraźnie termotolerancyjne (70). Rola trehalozy w tych zjawiskach nie jest jasna, ponieważ warunki, które indukują akumulację trehalozy wpływają również na produkcję białek HSP, o których wiadomo, że zabezpieczają komórki przed stresem termicznym.

Przypuszczenie, że trehaloza wykazuje ochronną funkcję pochodzi z obserwacji, że jest wytwarzana w odpowiedzi na stres podobnie jak białka HSP. Hipoteza, że do wytworzenia HSP niezbędne jest białko TPS1 lub trehaloza, wynika stąd, iż podczas szoku termicznego w mutantach *tps1* występuje niższy poziom białek HSP i znaczne obniżenie termostabilności (64,71). Żeby wyjaśnić obniżoną termotolerancję mutantów *tps1* zaproponowano trzy hipotezy (71,72):

1) białko syntazy (TPS1p) oprócz swej enzymatycznej roli w syntezie trehalozy, konieczne jest do ekspresji genów szoku termicznego. Termowrażliwość mutantów *tps1* wynikałaby z niemożności indukowania ekspresji rodziny genów *HSP*;

2) trehaloza zabezpiecza komórki jedynie przed średnio podwyższonymi temperaturami, pozwalając na syntezę białek HSP, które z kolei powodują, że komórki stają się zdolne do przetrwania wysokich temperatur;

3) w termotolerancji u drożdży występuje funkcjonalna dichotomia: najpierw trehaloza działa bezpośrednio na białka, a następnie z białkami zabezpieczonymi przez obecność trehalozy wiążą się białka szoku termicznego, zwiększając ich termostabilność.

Mutanty *tps1*, z równoczesną mutacją w genie *HSP104*, nie wytwarzają tego podstawowego białka stresu termicznego i wykazują obniżoną termotolerancję w fazie stacjonarnej (72,73). Natomiast trudne do wyjaśnienia jest to, że mutanty *nth1*, mając wysoki poziom trehalozy, wykazują obniżoną termotolerancję (65,68). Te obserwacje mogą wskazywać na znaczącą rolę trehalozy w termotolerancji, jak również na jej współdziałanie z białkami szoku. Przypuszcza się, że stabilizacja przez trehalozę termicznie zdenaturowanych białek może interferować z ich reaktywacją, jeżeli trehaloza nie jest dość szybko degradowana po szoku termicznym (71). W ten sposób trehaloza może utrudniać białkom HSP usunięcie zniszczonych spowodowanych wysoką temperaturą (7).

5. Możliwe zastosowania trehalozy

5.1. Metody izolacji i ilościowego oznaczania trehalozy

Trehaloza występuje w stosunkowo dużych ilościach w drożdżach piekarniczych (7,22). Konwencjonalne metody izolacji tego cukru oparte są na jego ekstrakcji gorącym roztworem 70-95% etanolu (74). Metody te wymagają dodatkowej procedu-

ry deproteinizacji z użyciem siarczanu rtęci, siarczanu cynku lub kwasu trichlorooctowego (74). W aktualnie opracowanej przez Yoshikawę i wsp. (75) metodzie izolacji trehalozy przed ekstrakcją 45% etanolem występuje etap wstępnego ogrzewania świeżych lub suszonych drożdży przez 1-2 godzin w temp. 70°C, w celu inaktywacji trehalazy oraz rozluźnienia i deformacji ściany komórkowej drożdży.

Metodę syntezy znakowanej ^{14}C – trehalozy z *E. coli* opracowali Horlacher i wsp. (76). W tym systemie enzymy odpowiedzialne za syntezę trehalozy kodowane przez chromosomalne geny *ostA* i *otsB*, indukowano wysoką osmolalnością środowiska (77) lub przy użyciu izopropylotiogalaktozydu (IPTG) (76). Stosując metody inżynierii genetycznej uzyskano mutanty nie tylko defektywne w genie *treA*, który koduje periplazmatyczną trehalazę u *E. coli*, ale również w genie *treF* kodującym trehalazę cytoplazmatyczną tych bakterii. Wydajność syntezy trehalozy w tej metodzie jest wysoka. Akumulowaną trehalozę łatwo oczyścić ekstrahując ją 70% etanolem na gorąco oraz stosując techniki radiochemiczne i chromatografię (77).

Ilościowe oznaczenia trehalozy wykonywano metodami kolorymetrycznymi i enzymatycznymi (78), a obecnie najczęściej przy użyciu chromatografii HPLC (54). W metodach enzymatycznych hydrolizowano trehalozę, np. przy użyciu trehalazy z *S. cerevisiae* (78) lub z konidiów grzyba *Humicola grisea*, (74), a następnie oznaczano ilość uwolnionej glukozy przy zastosowaniu jednej ze znanych metod. Nowa, szybka metoda określania ilości trehalozy, znana jako FIA (*flow injection analysis*) (79), polega na hydrolizie trehalozy za pomocą oczyszczonej trehalazy z *E. coli* immobilizowanej na odpowiednim nośniku. Ilość glukozy wytworzonej z trehalozy oznaczana jest spektrofotometrycznie po reakcji z heksokinazą, ATP oraz dehydrogenazą glukozy-6-fosforanu, na podstawie ilości wytworzonego NADPH (79).

5.2. Zastosowanie trehalozy w biologii i medycynie

Anhydrobiotyczne organizmy, takie jak drożdże, niektóre grzyby, krewetki czy nicienie mogą ulegać znacznemu odwodnieniu przy jednoczesnej akumulacji trehalozy. W badaniach przeprowadzonych z użyciem sztucznych błon wykazano przydatność trehalozy w zastępowaniu wody w błonie podczas procesów dehydratacji. Te obserwacje zostały wykorzystane w krioprotekcji komórek roślinnych pochodzących z hodowli tkankowych. Kondycjonowanie komórek marchwi (*Daucus carota*) i tytoniu (*Nicotiana tabacum* i *Nicotiana glauca*) 5-10% trehalozą przez 3-6 dni przed głębokim zamrożeniem w obecności 40% trehalozy jako jedynej krioprotektanta pozwoliło osiągnąć zwiększoną w porównaniu z innymi metodami zamrażania przeżywalność komórek roślinnych rzędu 71-74% (80). Porównywano również przeżywalność komórek drożdży (81). Po ich zamrożeniu uzyskiwano przeżywalność około 71,5%, natomiast po liofilizacji jedynie 25%. Stopniowe ochładzanie komórek drożdży w obecności trehalozy przeprowadzone przed procesem liofilizacji powodowało wzrost przeżywalności do około 60% (81).

Innym problemem w zootechnice, biologii czy medycynie jest zamrażanie i przechowywanie embrionów ssaczy w stanie zamrożenia. Pewna ilość wewnątrzkomórkowej wody powinna być usunięta z ich tkanek i zastąpiona cząsteczkami krioprotektantów. Wykazano, że szybkie zamrożenie embrionów mysich w płynnym azocie możliwe jest z zastosowaniem trehalozy jako jedyne krioprotektanta. Użycie trehalozy pozwala także na bezpośrednie, jednoetapowe odmrożenie przez przeniesienie embrionów do temperatury 37°C (82).

Delikatne biomolekuły, jak enzymy restrykcyjne i inne enzymy modyfikujące DNA, mogą być *in vitro* suszone w obecności trehalozy, a następnie przechowywane w temperaturze pokojowej praktycznie bez utraty aktywności (83). Preparaty przeciwciał do oznaczania głównych grup krwi suszone w obecności trehalozy zachowują biologiczną aktywność, nawet po kilku latach przechowywania (84). Podobne wyniki uzyskano z innymi przeciwciałami (85) i czynnikami krzepnięcia krwi (85) oraz enzymami używanymi w biologii molekularnej do sekwencjonowania genomu (84). Niedawno wykazano, że trehaloza nie tylko pozwala zachować pełną aktywność enzymów w wysokich temperaturach (termostabilizacja), ale może również wzmacniać ich aktywność (termoaktywacja) w warunkach, w których z reguły enzymy te są już nieaktywne. Taka stabilizacja trehalozą odwrotnej transkryptazy wirusa białaczki mysiej Moloneya umożliwiła syntezę cDNA komplementarnego do całego wirusowego genomu *in vitro* (86).

Duże zainteresowanie budzi możliwość wprowadzenia trehalozy do wnętrza komórek ssaczy. Może to mieć ogromne znaczenie przy przechowywaniu i transporcie komórek, tkanek czy nawet organów. Użycie α -hemolizyny z genetycznie zmodyfikowanego mutantu *Staphylococcus aureus* umożliwiło wprowadzenie trehalozy do wnętrza fibroblastów zwiększając ich przeżywalność do 80% podczas zamrażania, a ludzkich keratynocytów do 70% (87). Luo i wsp. (88) przy użyciu zrekombinowanego wektora adenowirusowego wprowadzili do fibroblastów ludzkich geny *ostA* i *ostB*, które kodują enzymy syntezy trehalozy u *E. coli*. Stwierdzono, że fibroblasty takie mogą być przechowywane w stanie wysuszenia bez utraty biologicznej aktywności.

Spośród szerokiego wachlarza możliwych zastosowań trehalozy zwraca uwagę jej użycie jako składnika cukrowego w mieszaninie aminokwasów i witamin stosowanych do odżywiania pozajelitowego (89). Trehaloza, dwucukier nieredukujący w przeciwieństwie do glukozy może być przechowywana razem z aminokwasami bez spowodowania reakcji Maillarda. Wykorzystanie glukozy pochodzącej z trehalozy może zachodzić przy udziale trehalazy, którą zlokalizowano u królików w części rdzeniowej nerki, a która jest także obecna w organizmie człowieka (3).

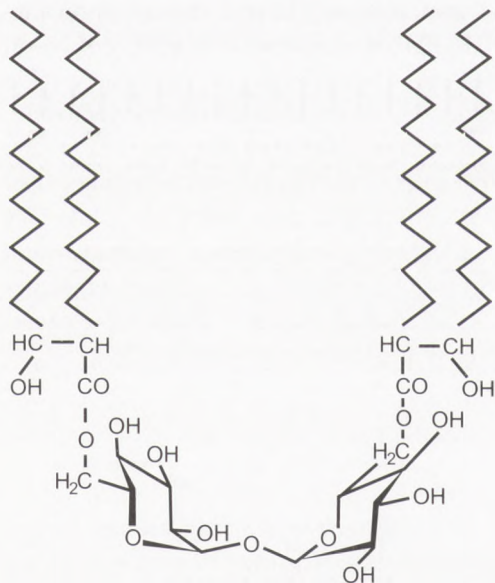
5.3. Inne funkcje trehalozy

Bakterie typu „coryneform” hodowane na n-alkanach wytwarzają trehalozo-lipidy, które wchodzi w skład ścian komórkowych drobnoustrojów. W starzejących się

hodowlach substancje te uwalniane są poza komórkę (90). Należą one do tzw. „biosurfaktantów”, związków chemicznych pochodzenia biologicznego, które mają w niskich stężeniach zdolność obniżania napięcia powierzchniowego (91). Można je wyizolować, np. z hodowli *Arthrobacter parafineus* prowadzonej na substratach hydrofobowych (93). Aktywne powierzchniowo trehalozo-lipidy zidentyfikowano także w hodowlach *Rhodococcus* sp. namnożonych na węglowodorach (92) lub zużytych olejach technicznych (92). Opracowano warunki, w których wytwarzanie znacznej ilości trehalozo-lipidu w (ilości 3g/l hodowli) występowało po 160 godzinach hodowli (94). Estry trehalozy wytwarzane m.in. przez *Rhodococcus erythropolis* mogą być stosowane do zwiększenia pozyskiwania ropy z pokładów piaskowcowych (94). Emulsje trehalozo-lipidów o właściwościach biodetergentów, aktywne w niskich stężeniach, używane są do zmniejszenia efektów skażenia środowiska ropą (94).

Trehaloza może także tworzyć estrowe połączenia z kwasem mykolowym. Ten rodzaj związków jest spotykany w ścianach komórkowych bakterii rodzaju *Mycobacterium*, *Corynebacterium* oraz *Nocardii* (95-97). Spośród czynników immunostymulacyjnych znajdujących się w ścianach komórkowych tych mikroorganizmów najsilniejsze działanie wykazywały diestry trehalozy z kwasem mykolowym, np. TDM (6,6'-dimykolan- α - α' -D-trehalozy), stanowiące strukturalny element frakcji lipidowej ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Mycobacterium* (95) (rys. 4).

O aktywności TDM decyduje konfiguracja reszty cukrowej, gdyż tylko D-stereozomery wzmacniają odpowiedź immunologiczną organizmu pełniąc rolę adiuwantów. Obecność kwasu mykolowego jest również istotna i pochodne cukrowe estryfikowane tym kwasem wykazują silniejsze właściwości immunostymulacyjne w po-



Rys. 4. 6,6'-dimykolan- α - α' -D-trehalozy (TDM).

równaniu z estrami nierozgałęzionych kwasów tłuszczowych. Stosowanie dimykolanu trehalozy *in vivo* podwyższa niespecyficzną odporność organizmów zwierzęcych na infekcje bakteryjne i wirusowe. TDM w połączeniu z innym immunostymulatorem – monofosforylolipidem A (MPLA) wywołuje szereg efektów biologicznych takich jak: aktywację makrofagów, zwiększenie odporności na infekcje bakteryjne i pasożytnicze zwierząt doświadczalnych (96), zwiększenie poziomu interleukiny-1 (IL-1), interferonu (IFN), czynnika nekrozy nowotworów (TNF) i czynnika stymulującego powstawanie kolonii (CSF). Ponadto doguzowe lub dożylnie podanie TDM w połączeniu z MPLA może powodować regresję guzów nowotworowych (95). Należy dodać, że stosowanie wysokich dawek TDM może powodować zjawisko kacheksji u zwierząt doświadczalnych (97).

Do grupy związków będących estrami trehalozy z kwasem mykolowym należy również 2,3,6'-trimykolan trehalozy (TTM). Został on wykryty w ścianie komórkowej psychotrofilnej i kwasolubnej bakterii *Rhodococcus aurantiacus* (98) spokrewnionej z *Mycobacterium*. Dożylnie lub dootrzewnowe podanie myszom preparatu TTM powoduje zwielokrotnienie klonów cytotoksycznych limfocytów T skierowanych przeciwko komórkom nowotworowym (99). Zwiększa się również aktywność komórek NK (*natural killers*) oraz wytwarzanie przeciwciał. TTM może indukować aktywność otrzewnowych makrofagów w kierunku lizy komórek nowotworowych. TTM nie wywołuje objawów ubocznych, takich jak kacheksja, występująca przy stosowaniu wysokich dawek TDM (99).

Trehaloza, obok glikogenu, uważana jest za główny cukier wielu owadów, osiągając znaczny (1-2%) poziom w hemolimfie (14). Synteza trehalozy i jej hydroliza jest u owadów pod kontrolą hormonalną i ma zasadnicze znaczenie w ich fizjologii. Poziom aktywności trehalazy owadów jest czynnikiem kontrolującym ich zapotrzebowanie na glukozę i energię, wydatkowane znacząco w czasie lotu czy podczas zmian morfologicznych w różnych stadiach rozwoju owadów. Specyficzne inhibitory trehalazy, typu strukturalnych analogów substratu, zakłócają fizjologiczną metamorfozę, zwłaszcza w stadium larwalnym, co prowadzi do zmniejszenia przeżywalności form stadialnych owadów.

Rozwój badań nad strukturalnymi analogami trehalozy spowodowany jest możliwością zastosowania tych związków jako bioinsektycydów. Na przykład trehazolina, pseudosacharyd, który naśladuje substrat trehalazy, wyizolowany z hodowli *Micromonospora* sp. (100) i *Amycolatopsis trehalostatica* (101) czy trehazolamina (102), unikatowy aminocyklopentitol oraz cały szereg ich różnych pochodnych izolowanych pierwotnie z grzybów, obecnie wytwarzanych jest drogą syntezy chemicznej (103,104). Potencjalne znaczenie w hamowaniu aktywności trehalazy owadów wykazują również wyizolowana wcześniej walidomycyna A (105) o właściwościach antybiotycznych oraz walidoksyłamina A (106), której pochodne hamują wzrost larwy szkodnika tytoniu *Spodoptera litura* (106). Nowa generacja bioinsektycydów to np. kalystegina B₄ wytwarzana z korzeni *Scopolia japonica* (107) czy suidastryna wyizolowana ze *Streptomyces* sp. (108). Suidastryna (50 razy silniejsza niż walidoksyłamina A) wpro-

wadzona do larw *Protophonia*, *Spodoptera* czy karalucha *Periplaneta americana* (108) powoduje głębokie zakłócenie wzrostu larw, a przy zwiększeniu dawki – śmiertelność.

Niezwykłe właściwości trehalozy dotyczące stabilizacji białek wykazane w wielu laboratoriach mogą stwarzać szerokie możliwości jej praktycznego wykorzystania. Zwiększenie tolerancji na stres wielu mikroorganizmów mogłoby ułatwić produkcję rekombinacyjnych białek o znaczeniu handlowym. Zjawisko stabilizacji białek przy udziale trehalozy może mieć także zastosowanie w leczeniu schorzeń prionowych wynikających z niestabilności czy agregacji białek. Dotyczy to np. takich neurodegeneracyjnych schorzeń prionowych jak CDJ (syndrom Creutzfelda–Jakoba) czy gąbczastej encefalopatii krów. Schorzenia te rozwijają się, gdy prawidłowe komórkowe białko PrP^C (*prion protein*) ulega konformacyjnym zmianom prowadzącym do powstania form patologicznych. Innym przykładem jest mukowiscydoza, schorzenie, powstające w wyniku mutacji destabilizujących białko tworzące kanały chlorkowe. Wykazano, że w tych przypadkach dodanie roztworów małych cząstek organicznych, np. trehalozy do komórek hodowli tkankowych zabezpiecza ich białka przed przyjmowaniem niekorzystnych, związanych z danym schorzeniem konformacji (109,110). Można przypuszczać, że odpowiednie, małe cząsteczki mogłyby być użyte jako czynniki terapeutyczne, niewykluczone, że w zakłóceniach amyloidowych również, gdy natywny stan białka jest niestabilny z powodów naturalnych bądź genetycznych (111,112).

Przedstawione w tym artykule wiadomości dotyczą przede wszystkim roli trehalozy w metabolizmie drobnoustrojów oraz możliwych jej biotechnologicznych i medycznych aplikacji. Natomiast przedstawienie znaczenia trehalozy w metabolizmie nicieni, owadów czy w brodawkach roślin motylkowatych wymaga odrębnego opracowania.

Literatura

1. Wiemken A., van Leewenhoek A., (1990), *J. Gen. Mol. Microbiol.*, 58, 209-217.
2. Müller J., Boller T., Wiemken A., (1995), *Plant Science*, 112, 1-9.
3. Ishihara R., Taketani S., Takedatsu-Sasai M., Kino M., Tokunaga R., Kobayashi Y., (1997), *Gene*, 202, 69-74.
4. Romero C., Bellés J., Vaya' J., Serrano R., Culiáñez-Macia' F., (1997), *Planta*, 20, 293-297.
5. van Leare A., (1989), *FEMS Microbiol. Rev.*, 63, 201-210.
6. Jorge J., Polizeli M., Thevelein J., Terenzi H., (1997), *FEMS Microbiol. Lett.*, 154, 165-171.
7. Singer M., Linquist S., (1998), *TIBTECH.*, 16, 460-468.
8. Boos W., Ehman U., Forkl H., Klein W., Rimmele M., Pastma P., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 3450-3461.
9. Herzog R., Galiński E., Trüper H., (1990), *Arch. Microbiol.*, 153, 600-606.
10. Marechal L., (1984), *Arch. Microbiol.*, 137, 70-73.
11. Müller J., Zhi-Ping Xie, Staechelin C., Mellor R., Boller T., Wiemken A., (1994), *Physiol. Plantarum*, 90, 86-92.
12. Goddijn O., Smeekens S., (1998), *Plant J.*, 14, 143-146.
13. Behm C., (1997), *Int. J. Parasitol.*, 27, 215-229.
14. Becker A., Schlöder P., Steel J., Wegener G., (1996), *Experientia*, 52, 443-439.

15. Thevelein J., Hohmann S., (1995), *TIBS*, 20, 3-10.
16. Leslie S., Israeli E., Lightart B., Crowe J., Crowe L., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3592-3597.
17. Crowe J., Hoekstra F., Crowe L., (1992), *Ann. Rev. Physiol.*, 54, 579-599.
18. Womersley C., Uster P., Rudolph A., Crowe J., (1986), *Cryobiology*, 23, 245-255.
19. Mouradian R., Womersley C., Crowe L., Crowe J., (1985), *Cryobiology*, 22, 119-127.
20. Hottiger T., de Virgilio C., Hall M., Boller T., Wiemken A., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 219, 187-193.
21. Loomis S., O'Dell S., Crowe J., (1979), *J. Exp. Zool.*, 208, 355-360.
22. Attfeld P., (1987), *FEBS Lett.*, 225, 259-263.
23. Thevelein J. M., (1996), *The Mycota III. Biochemistry and Molecular Biology*, 395-420, Eds. Brambl and Marzluf, Springer Verlag, Berlin.
24. Fujii S., Iwahashi H., Obuchi K., Fujii T., Komatsu T., (1996), *FEBS Lett.*, 141, 97-101.
25. Panek A. D., (1995), *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28, 169-181.
26. Londesborough J., Vuorio O., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 216, 841-848.
27. de Virgilio C., Bürket N., Bell W., Boller T., Wiemken A., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 212, 315-323.
28. Vuorio O., Kalkkinen N., Londesbrough J., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 216, 849.
29. Porchia A., Fiol D., Salerno G., (1999), *Plant Sci.*, 149, 43-49.
30. Thaevelin J. M., (1984), *Microbiol. Rev.*, 48, 42-59.
31. Thaevelin J. M., (1988), *Exp. Mycol.*, 12, 1-12.
32. Argüelles J., Gacto M., (1988), *A. Leeuwenhoeck*, 54, 555-565.
33. Mittenbühler K., Holzer H., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 8537-8543.
34. Kopp M., Müller H., Holzer H., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 4766-4774.
35. Kopp M., Nwaka S., Holzer H., (1993), *Gene*, 150, 403-407.
36. Boos W., Ehmann U., Forki U., Klein W., Rimmele M., Postma P., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 3450-3461.
37. Horlacher R., Peist R., Boos W., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3861-3863.
38. Gaballa A., Abeyinghe P., Urich G., Matthijs S., de Greve H., Corhelis P., Koedam N., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4340-4345.
39. Gotsche S., Dahl M., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 2721-2726.
40. Herzog R., Galiński E., Trüper H., (1990), *Arch. Microbiol.*, 153, 600-606.
41. Hoelze J., Streeter J., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3213-3215.
42. Styrvold O., Strøm A., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 1187-1192.
43. Larsen P., Sydnes L., Landfeld B., (1987), *Arch. Microbiol.*, 147, 1-7.
44. Henge-Aronis R., Klein W., Lange R., Rimmele M., Boos W., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 7918-7924.
45. Horlacher R., Boos W., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 13036-13042.
46. Horlacher R., Uhland K., Klein W., Ehrmann M., Boos W., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 6250-6257.
47. Kaasen J., Falkenberg P., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 889-898.
48. Piper P., (1993), *FEMS Microbiol. Rev.*, 11, 339-356.
49. Colaco C., Smith C., Sen S., Roser D., Newman Y., Ring S., Roser B., (1994), *Formulation and Delivery of Proteins and Peptides*, 222-240, Eds. Cleland J., Langer R., American Chemical Society, Washington.
50. Singer M., Lindquist S., (1998), *Mol. Cell.*, 1, 639-648.
51. Lindquist S., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 1151-1159.
52. Sanchez Y., Lindquist S., (1990), *Science*, 248, 1112-1115.
53. Parsell D., Kowal A., Singer M., Lindquist S., (1994), *Nature*, 372, 475-478.
54. Hottiger T., Schmutz P., Wiemken A., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 5518-5522.
55. de Virgilio C., Simmen U., Hottiger T., Wiemken A., (1990), *FEBS Lett.*, 273, 107-110.
56. Neves M., Jorge J., Terenzi H., (1991), *FEBS Lett.*, 283, 19-22.
57. Sanchez Y., Taulien J., Borkovich K., Lindquist S., (1992), *EMBO J.*, 11, 2357-2364.
58. Panek A., Ferreira R., Panek A. C., (1989), *Biochimie*, 71, 313-318.
59. Attfeld P., Roman A., Northcott C., (1992), *FEMS Lett.*, 94, 271-276.
60. Hottiger T., Schmutz P., Wiemken A., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 5518-5522.
61. de Virgilio C., Hottiger T., Dominquez J., Boller T., Wiemken A., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 219, 178-186.
62. Crowe J., Crowe L., Chapman D., (1984), *Science*, 223, 701-703.
63. Hazell B., Nevalainen H., Attfeld P., (1995), *FEBS Lett.*, 377, 457-460.

64. Destruelle M., Holzer H., Klionsky D., (1995), *Yeast*, 11, 1015-1025.
65. Nwaka S., Mechler B., Destruelle M., Holzer H., (1995), *FEBS Lett.*, 360, 286-290.
66. Kim J., Alizadeh P., Harding P., Hefner-Gravink A., Klionsky D., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1563-1569.
67. Nwaka S., Mechler B., Holzer H., (1996), *FEBS Lett.*, 386, 235-238.
68. Nwaka S., Kopp M., Holzer H., (1999), *J. Biol. Chem.*, 270, 10193-10198.
69. van der Plaats J., van der Dolingen P., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56, 580-587.
70. Hottiger T., Boller T., Wiemken A., (1989), *FEBS Lett.*, 225, 431-434.
71. Singer M., Lindquist S., (1998), *Mol. Cell*, 1, 639-648.
72. de Virgillio C., Hottiger T., Dominquez J., Boller T., Wiemken A., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 219, 179-186.
73. Elliot B., Haltiwanger R., Fitcher B., (1996), *Genetics*, 144, 923-933.
74. Neves M., Terenzi F., Jorge J., Leone E., (1994), *W. J. Microb. Biotech.*, 10, 17-19.
75. Yoshikawa Y., Motsumoto K., Nagata S., Sato T., (1994), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1226-1230.
76. Horlacher R., Peist R., Boos W., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3861-3863.
77. Brand B., Boos W., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2414-2415.
78. Arayo P., Panek A., Ferreira R., Panek A. D., (1989), *Anal. Biochem.*, 176, 432-436.
79. Meyer zu Düttingdorf H., Bachmann B., Buchholz M., Leuchtenberg W., (1997), *Anal. Biochem.*, 253, 8-12.
80. Bhandal I., Hauptman R., Widholm J., (1985), *Plant Physiol.*, 78, 430-432.
81. Diniz-Mendez L., Bernardo P., de Araujo P., Panek A., Paschoelin V., (1999), *Biotechnology and Bioengineering*, v. 65, Eds. J. Wiley, 572-558.
82. Hondel T., Killian G., (1988), *Cryobiology*, 25, 331-337.
83. Colaco C., Sen S., Thangaveln M., Pinder S., Roser B., (1992), *Bio/Technology*, 10, 1007-1011.
84. Roser B., (1991), *Biopharm.*, 5, 44-53.
85. Crowe J., Carpenter J., Crowe L., Anchordoguy T., (1990), *Cryobiol.*, 27, 218-231.
86. Carnici P., Nishiyama Y., Westower A., Otoh M., Nagaoka Y., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 520-524.
87. Eroglu A., Russo M., Bieganski R., Fowler A., Cheley S., Bayley H., Toner M., (2000), *Nature Biotech.*, 18, 163-167.
88. Iuo N., Puchler I., Brown D., Mansbridge J., Levine F., (2000), *Nature Biotech.*, 18, 168-171.
89. Sato S., Okamoto K., Minami R., Kohri K., Yamando S., (1999), *J. Nutrition*, 158-164.
90. Martin M., Bosch P., Parra J., Espuny M., Virgili A., (1991), *Carbohydrate Res.*, 220, 93-100.
91. Parkinson M., (1985), *Biotechnology Adv.*, 3, 65-80.
92. Espuny M., Egado S., Mercade' M., Manresa R., (1995), *Toxicol. Environm. Chem.*, 48, 83-88.
93. Espuny M., Egado S., Manresa R., Mercade' M., (1996), *Toxicol. Environm. Chem.*, 5, 521-526.
94. Ristan E., Wagner F., (1983), *Biotechnol. Lett.*, 5, 95-100.
95. Romanowski P., Dzierzbicka K., Myśliwski A., Kołodziejczyk A., (1991), *Post. Bioch.*, 37, 159-171.
96. Madonna G., Ledney G., Elliot T., (1989), *Infect. Immun.*, 57, 2496-2501.
97. Silva C., Tincani J., (1988), *J. Gen. Microbiol.*, 134, 1629-1633.
98. Fujita T., Sugimoto N., Yokoi F., Ohtubo Y., Shuton M., (1990), *Microbiol. Immunol.*, 39, 523-532.
99. Ohtsubo Y., Furukowa M., Imagawa T., (1991), *Immunology*, 74, 479-503.
100. Ando O., Satoka H., Itoi K., Sato A., Nakajima M., Takahashi S., Haruyoma H., (1991) *J. Antibiot.*, 44, 1165-1167.
101. Nakayama T., Amachi T., Murao S., Sakai T., Shin T., Kenny P., Iwashita T., Zagorski M., Komura H., Nomoto K., (1991), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 919-921.
102. Dolak L., Castle T., Laborde A., (1980), *J. Antibiotics*, 33, 390-394.
103. Lubineau A., Grand E., Scherrman M.-C., (1997), *Carbohydrate Res.*, 297, 168-174.
104. Storch de Gracia I., Dietrich H., Bobo S., Chiara J., (1998), *J. Org. Chem.*, 63, 5883-5889.
105. Iwasa T., Higashide H., Yamamoto M., Shibata M., (1971), *J. Antibiotics*, 24, 107-113.
106. Asano N., Takencki M., Kameda Y., Matsui K., Kono Y., (1990), *J. Antibiotics*, 43, 722-726.
107. Asano N., Kato A., Kizu H., Matsui K., Watson A., Nash R., (1996), *Carbohydrate Res.*, 293, 195-204.

108. Knusel J., Murao S., Shin T., Amachi T., Kayser H., (1998), *Comp. Biochem. Physiol.*, 120, 639-646.
109. Tatzelt J., Prusiner S., Welch W., (1996), *EMBO J.*, 15, 6363-6373.
110. Brown C., Hong-Brown L., Biwasi J., Verkman A., Welch W., (1996), *Cell Stress Chaperones*, 1, 117-125.
111. Welch W., Brown C., (1996), *Cell Stress Chaperones*, 1, 109-115.
112. Wetzel R., (1996), *Cell*, 86, 699-702.