Roxana Esmeriz Falcão Moreira

Evidências da multifuncionalidade da proteína p37 de *Kluyveromyces marxianus*

UNIVERSIDADE DO PORTO
1999

Roxana Esmeriz Falcão Moreira

Evidências da multifuncionalidade da proteína p37 de *Kluyveromyces marxianus*

UNIVERSIDADE DO PORTO
1999

Evidências da multifuncionalidade da proteína p37 de *Kluyveromyces marxianus*

Roxana Esmeriz Falcão Moreira

Dissertação apresentada ao Instituto
de Ciências Biomádicas Abel Salazar da
Universidade do Porto para obtenção
do Grau de Doutor em Ciências Biomédicas

Orientador:

Professor Doutor Pedro Moradas-Ferreira

Co-orientador:

Professor Doutor Paulo Fernandes

De acordo com o nº2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº388/70, foram utilizados na elaboração desta tese, resultados já publicados ou em vias de publicação que a seguir se descriminam:

Falcão Moreira, R., Fernandes, P.A. e Moradas-Ferreira, P. (1998) "*Kluyveromyces marxianus* flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37" *Microbiology*, **144**, 681-688

Falcão Moreira, R., Ferreira da Silva, F., Fernandes, P.A. e Moradas-Ferreira, P. "Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by transformation with the *GAP1* gene from *Kluyveromyces marxianus*", submetido à revista *Yeast*.

Falcão Moreira, R., Fernandes, P.A. e Moradas-Ferreira, P. "*Kluyveromyces marxianus* p37 – a multifunctional cell wall protein", a ser submetido à revista *FEBS Letters*.

Com base na disposição legal do Decreto-Lei acima mencionado, foi decidido apresentar parte da presente tese, na forma de compilação de artigos publicados ou em vias de publicação. Declara-se ainda serem da nossa inteira responsabilidade a execução das experiências, interpretação dos resultados, a sua discussão e redacção.

Ao João e aos nossos filhos

AGRADECIMENTOS:

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório da "Unidade de Stress em Microorganismos" do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto. Quero expressar os meus agradecimentos a todos aqueles que, directa ou indirectamente, contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar, ao Professor Doutor Pedro Moradas-Ferreira, quero manifestar a minha gratidão e apreço pela qualidade científica da orientação desta tese, assim como pelas críticas e sugestões que tanto contribuíram para o sucesso do projecto. A sua experiência, disponibilidade, confiança e simpatia, com que sempre pude contar, foram constantes e decisivos para o desenvolvimento deste trabalho.

Foi particularmente importante na realização deste trabalho poder contar com a experiência, empenho, incentivo e apoio do Professor Doutor Paulo Fernandes. A sua capacidade científica e orientação foram marcantes na minha formação e no sucesso do projecto.

Gostaria de deixar uma palavra em particular aos meus dois colegas de laboratório e amigos, Odília Queirós e Frederico Ferreira da Silva. A forma amiga com que sempre se prontificaram a apoiar, sugerir e discutir o meu trabalho foram contribuições valiosas. Quero agradecer-lhes, em especial, a sua ajuda na elaboração desta tese, à Odília, a revisão crítica, ao Frederico, a ajuda na elaboração das figuras.

Agradeço também a todos os elementos do laboratório da "Unidade de Stress em Microorganismos", por todo o apoio, interesse e amizade dispensada assim como pelo bom ambiente de trabalho que proporcionaram. Dedico um agradecimento particular ao Vítor, Marta, Paolo, António, Teresa, Dra. Albertina, Dra. Amélia, Ana Maria e D. Deolinda.

À minha Família e principalmente aos meus Pais agradeço todo o encorajamento e apoio que me dispensaram desde sempre.

À Beatriz agradeço todos os seus sorrisos, beijinhos e gracinhas por me fazerem tão feliz. Ao seu irmãozinho(a) agradeço a alegria de estar à sua espera.

Por último, mas em especial, ao João, agradeço todo o carinho e apoio com que sei sempre poder contar.

O trabalho apresentado nesta tese foi subsidiado pelo programa PRAXIS XXI, através do projecto Praxis 2/2.1/Bio/1052/95 e Bolsa de Doutoramento BD/4551/94.

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS:

ABC	"ATP binding cassetes"
ATP	adenosina trifosfatada
bp	pares de bases
CFW	"calcofluor white"
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfatado
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilenodiaminotetracetato dissódico
EtBr	brometo de etídeo
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	"green fluorescent protein"
GPI	guanosilfosfatidilinositol
GTP	guanosina trifosfatada
HSP	"heat shock protein"
kb	quilopares de bases
kDa	quilodalton
LB	meio Luria Bertani
MCS	"multicloning site"
mRNA	RNA mensageiro
o.n.	"over night"
PCR	"polymerase chain reaction"
PSA	persulfato de amónio

^{32}P	isótopo radioactivo de fósforo
r.p.m.	rotações por minuto
R.E.	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SR	receptor para a SRP
SRP	"signal recognition particle"
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
Temed	N,N,N',N' –tetrametiletilenodiamino
TRAM	"translocating chain associated protein"
URA	uracilo
U.V.	ultra-violeta
YPD	"yeast peptone dextrose"

ÍNDICE

RESUMO 3

SUMMARY 5

RESUMÉ 7

CAPÍTULO 1:

Revisão Bibliográfica 9

1. Parede celular

1.1. Introdução 11

1.2. Composição e organização da parede celular 12

1.2.1. Glucanos 15

1.2.1. a) β1,3 glucanos 17

1.2.1. b) β1,6 glucanos 19

1.2.2. Quitina 20

1.2.3. Lípidos 21

1.2.4. Proteínas 22

(Proteínas GPI, Proteínas Pir e Proteínas solúveis em SDS)

1.2.4.1. Modificações das proteínas de parede 25

1.2.4.1. a) Glicosilação 26

(N-glicosilação e O-glicosilação)

1.2.4.1. b) Fosforilação 28

1.2.5. Nota final 29

2. Floculação

2.1. Introdução 31

2.2. Bioquímica da floculação 32

2.2.1. Envolvimento de proteínas 33

2.2.2. Envolvimento de iões metálicos 35

2.2.3. Envolvimento de hidratos de carbono

Lectinas e fenótipos característicos 37

2.3. Modelos / mecanismos de floculação 41

2.4. Genética da floculação 44

2.5. Nota final 47

3. Secreção de proteínas em leveduras 48
3.1. Introdução 48
3.2. Translocação co-traducional 50
3.3. Translocação pós-traducional 52
3.4. Vias de secreção não dependentes de sequências sinal clássicas 54
3.5. Nota final 56
4. Multifuncionalidade da GAPDH 57
4.1. Introdução 57
4.2. Multifuncionalidade e localização 57
4.3. Presença da GAPDH e outras enzimas glicolíticas na parede celular 59
Objectivo da tese 60

CAPÍTULO 2:
"Construção e caracterização de um mutante de *Kluyveromyces marxianus* deficiente na síntese da proteína de parede p37 61

CAPÍTULO 3:
"Estudos de super-expressão da p37 em *Saccharomyces cerevisiae*" 75

CAPÍTULO 4:
"Determinação da capacidade enzimática da p37 presente na parede celular. Exportação da p37 para o meio extracelular" 106

CAPÍTULO 5:
Conclusões ; Discussão Geral 124
Perspectivas 139

BIBLIOGRAFIA 142

RESUMO:

A floculação de leveduras resulta da aglomeração de centenas ou milhares de células, devido a interacções entre componentes localizados à superfície das paredes celulares. Um conhecimento detalhado dos mecanismos moleculares envolvidos nestas interacções permitirá o controlo do fenómeno com vista a aplicações biotecnológicas. Em *Kluyveromyces marxianus*, uma levedura com potencial interesse industrial, foi identificada uma proteína glicosilada de cerca de 37 kDa (p37) que se acumula em elevadas quantidades na parede de células floculantes, apesar de não possuir sequência N-terminal clássica de endereçamento e apresentar uma elevada homologia com a enzima citosólica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Fernandes *et al*, 1992,1993,1995). Os estudos efectuados ao longo do trabalho desta tese esclareceram o envolvimento da p37 nas interacções que levam à floculação, e revelaram outras características funcionais da proteína.

A obtenção e estudo de um mutante de *K. marxianus* deficiente na síntese de p37, assim como do resultado da transformação de uma estirpe de *S. cerevisiae* não floculante com o gene codificante para a proteína, permitiram confirmar o envolvimento da p37 em interacções celulares associadas à floculação em ambas as estirpes de leveduras. De facto, a ausência da proteína no mutante coincide com a perda do fenótipo floculante, ao passo que a transformação de *S. cerevisiae* com o gene codificante para a p37, conduz à acumulação desta proteína na parede e concomitantemente, à aquisição de uma capacidade floculante semelhante à encontrada na estirpe selvagem de *K. marxianus*.

O endereçamento da p37 para a parede celular, que se verifica na ausência de uma sequência sinal clássica de endereçamento para o R.E., não é um mecanismo único de *K. marxianus*, podendo-se verificar igualmente o transporte da proteína para a parede celular em *S. cerevisiae*. Adicionalmente, tal mecanismo leva não só à integração da proteína na parede mas também à sua excrecção para o meio extracelular.

A enzima GAPDH surge citada em diversas publicações em que se descrevem um enorme leque de funções e localizações celulares para a enzima, para além da sua mais conhecida função glicolítica. Também se conclui que a p37 é uma proteína multifuncional, tendo sido reveladas funções da proteína em mecanismos relativos à integração da parede celular, morfologia e crescimento celular, termotolerância, actividade GAPDH e floculação.

Os resultados obtidos e discutidos na presente tese, sugerem que a p37 é uma proteína multifuncional específica de *K. marxianus* (ATCC 10022) mas que encontra mecanismos (de translocação, actividade enzimática, floculação, etc) que lhe permitem desempenhos análogos em *S. cerevisiae* .

SUMMARY:

Yeast flocculation results from the aggregation of hundreds or thousands of cells due to interactions between components of the cell wall surface. The identification of the molecular factors, involved in these interactions, will allow to control the phenomenon, which can be utilised in different biotechnological processes. In *Kluyveromyces marxianus* flocculent cells, a glycoprotein of 37 kDa was identified in the cell wall, although it revealed a high identity to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and it does not contain a N-terminal signal peptide (Fernandes *et al*, 1992, 1993, 1995). The work presented in this thesis gives further evidence of the correlation between p37 and flocculation and revealed additional functions of the protein.

The construction and characterisation of both a *K. marxianus* mutant deficient in p37 and a *Saccharomyces cerevisiae* transformant overexpressing p37, allowed the confirmation of p37 involvement in the cell interactions that lead to flocculation. In fact, the p37 absence in the *K. marxianus* mutant is concomitant with the loss of the flocculent phenotype, in contrast with the *S. cerevisiae* transformant overexpressing p37, which acquired the ability to flocculate.

The mechanism responsible for p37 secretion to the cell wall is not unique to *K. marxianus*, as the protein can also be detected in the cell wall of the *S. cerevisiae* transformant. Moreover, that mechanism also leads to the excretion of the protein into the extracellular medium.

Data from the study of different cellular systems revealed that the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) has many

different cellular localisations and functions. From the data obtained in this thesis, it can also be concluded that p37 is a multifunctional protein, related to different mechanism such as cell wall integrity, morphology, GAPDH activity, thermotolerance and flocculation.

The results presented suggest that p37 is a *K. marxianus* multifunctional protein, however it utilises mechanisms (of translocation, enzymatic activity, flocculation, etc) that enables it to perform identical function in *S. cerevisiae*.

RESUMÉ:

La flocculation des levures résulte de l'agglomération de centaines ou milliers de cellules due aux interactions entre les composants localisés à la surface de la paroi cellulaire. Une connaissance détaillée des mécanismes moléculaires impliqués dans ces interactions permettra le contrôle du phénomène en vue d'applications biotechnologiques. Chez *Kluyveromyces marxianus*, une levure d'un intérêt industriel potentiel, une protéine glycosylée d'un poids moléculaire apparent de 37 kDa (p37), s'accumulant sur la paroi de cellules flocculentes, bien que ne possédant pas la séquence N-terminale d'adressage classiquement rencontrée , et présentant une grande homologie avec l'enzyme cytosolique glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogènase (Fernandes *et al*, 1992; 1993; 1995), a été identifiée. Les études effectuées au cours de cette thèse ont eu pour but l'éclaircissement de l'intervention de p37 au niveau des interactions qui mènent à la flocculation, et ont révélé d'autres caractèristiques fonctionnelles de la protéine.

L'obtention et l'étude d'un mutant de *K. marxianus* déficient pour la synthèse de p37, ainsi que celle du résultat de la transformation d'une souche de *S. cerevisiae* non-flocculante par le gène codant pour la protéine, ont permis la confirmation de l'intervention de p37 au niveau des interactions cellulaires associées à la flocculation de ces deux souches de levure.

En effet, l'absence de la protéine chez le mutant coincide avec la perte du phénotype flocculant, tandis que la transformation de *S. cerevisiae* par le gène codant pour p37 conduit à l'accumulation de cette protéine sur la paroi cellulaire

ainsi que l'acquisition concomitante d'une capacité de flocculer similaire à celle rencontrée chez la souche sauvage de *K. marxianus*.

L'adressage de p37 vers la paroi cellulaire, qui a bien lieu malgré l'absence d'une séquence signal classique d'adressage vers le RE (reticulum endoplasmique), n'est pas un mécanisme exclusif à *K. marxianus*, la translocation de la protéine étant également observée chez *S. cerevisiae*. Ajoutons que ce mécanisme conduit non seulement à l'intégration de la protéine à la paroi, comme à sa secretion vers le milieu extracellulaire.

L'enzyme GAPDH est fréquemment mentionnée dans les plus diverses publications, décrivant un large éventail de fonctions et localisations cellulaires pour l'enzyme en plus de sa fonction glycolytique la plus connue. Il peut donc être également conclu que p37 est une protéine multifonctionnelle étant données ses fonctions au niveau de mécanismes relatifs à l'intégration à la paroi cellulaire, la morphologie et la croissance cellulaire, la thermotolérance, l'activité GAPDH et la flocculation.

Les résultats obtenus et discutés dans la presente thèse suggèrent que p37 est une protéine multifonctionnelle spécifique de *K. marxianus* mais qui utilise des mécanismes (translocation, activité enzymatique, flocculation, etc...) lui permettant de jouer un rôle analogue chez *S. cerevisiae*.

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

As leveduras são organismos de grande importância económica, biotecnológica e científica. O seu estudo tem permitido avanços no conhecimento da bioquímica celular, por serem de fácil manipulação e bons modelos de células eucariotas. A sua utilização biotecnológica envolve os mais diversos campos da vida humana, desde o social, alimentar, ao farmacêutico, podendo ser utilizadas no seu estado selvagem ou geneticamente manipulado em diversos processos industriais. A fermentação da cerveja por leveduras, foi provavelmente dos primeiros processos biotecnológicos do mundo. Algumas estirpes de leveduras, quando crescidas em meio liquido, são capazes de formar agregados celulares resultantes de uma agregação assexual de características únicas. O entendimento e controlo deste fenómeno que se designou por floculação de leveduras, trará benefícios não só científicos como industriais/económicos, dado que abre a possibilidade de utilização de biorreactores de alta densidade celular. O facto de resultar de interacções entre componentes da parede das leveduras justifica apresentar uma revisão sobre a composição e estrutura deste organelo. O trabalho desta tese incide sobre uma proteína de 37kDa isolada de células floculantes de *Kluyveromyces marxianus*, que surge na parede celular sem contudo possuir sinal N-terminal clássico de endereçamento para o retículo endoplasmático. Foi assim incluído nesta revisão um sub-capítulo sobre vias de secreção de proteínas existentes em leveduras. A finalizar este primeiro capítulo, abordou-se o tema da "multifuncionalidade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase", oportuno devido à alta homologia que a p37 revelou partilhar com este enzima glicolítico.

1. PAREDE CELULAR DA LEVEDURA

1.1. INTRODUÇÃO

A parede é uma estrutura da célula de levedura que não tem homóloga nas células animais, em contraste com o facto das estruturas subcelulares de células de animais, plantas e leveduras apresentarem grandes semelhanças. Este organelo reveste-se assim de importância significativa e os resultados do seu estudo têm encontrado aplicações quer na biologia básica quer na aplicada. As funcões celulares encontradas para a parede vão desde a manutenção da forma da célula determinada geneticamente (Osumi,1997), conferindo resistência mecânica e elasticidade, ao transporte de materiais para dentro e fora da célula e protecção contra enzimas extracelulares (Fleet, 1991; Klis, 1994; Cid *et al*, 1995). Na parede estão presentes enzimas (como a invertase e inulinase), responsáveis pela conversão de compostos em formas assimiláveis pela célula, e proteínas responsáveis pelos fenómenos de agregação celular (Moradas-Ferreira, 1994). A primeira linha de defesa do hospedeiro perante uma infecção fúngica é a parede celular que, em quimioterapia, é o 1º alvo dos agentes antifúngicos (Sheperd, 1987; Klis *et al*, 1994).

A composição química da parede celular de vários fungos é conhecida, mas pouco ainda foi estabelecido no que diz respeito às interacções entre as várias macromoléculas (Lipke e Ovalle,1998). Verifica-se que a sua estrutura e composição apresentam diferenças pontuais entre diferentes estirpes (Ballou, 1982). No entanto, *Saccharomyces cerevisiae* oferece um modelo atractivo e valioso para estudar a arquitectura e dinâmica da parede celular já que os

"princípios arquitecturais" usados por esta levedura parecem ser utilizados por muitas outras leveduras (Kapteyn *et al*, 1999). A parede de *S. cerevisiae* tem sido a mais estudada, sendo estes os estudos essencialmente referidos neste capítulo, juntamente com a citação de alguns trabalhos realizados em *Candida albicans*. Relativamente à parede de *Kluyveromyces marxianus*, a levedura estudada nesta tese, é de prever a existência de algumas diferenças de carácter pontual, mantendo-se em princípio uma organização estrutural semelhante à de *S. cerevisiae* (Fernandes, 1994).

1.2. COMPOSIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA PAREDE CELULAR

A parede celular constitui 15 a 30% do peso seco da célula (Orlean, 1997) e 25 a 50% do volume segundo cálculos feitos por "electron micrographs" (Lipke e Ovalle, 1998). A parede, é constituída 80 a 90% por polissacarídeos, que existem fundamentalmente em três formas distintas: (a) polímeros ramificados de glucose contendo ligações β1,3 e β1,6 (β-glucanos); (b) polímeros não ramificados de N-acetil-D-glucosamina contendo ligações β1,4 (quitina); e (c) polímeros de manose covalentemente associado a proteínas (glico(mano)-proteínas). Para além de hidratos de carbono, comprova-se na parede a existência de proteínas (6 a 25%) e quantidades pequenas de lípidos (1 a 7%). (Ballou, 1982; Cabib *et al*, 1982; Sheperd *et al*, 1985; Sheperd, 1987; Cassone, 1989; Calderone *et al*, 1993; Chaffin *et al*, 1998). A arquitectura molecular da parede celular não é constante. A célula pode fazer ajustamentos consideráveis à composição e estrutura da sua parede durante, por exemplo, o ciclo celular ou em resposta a condições ambientais tais como, disponibilidade de nutrientes ou oxigénio, temperatura e pH. Por exemplo, células em fase

estacionária têm uma composição relativa da parede alterada, nomeadamente na proporção glucano/manoproteínas (Lyons e Hough, 1970[1]) e no tamanho da cadeia de hidratos de carbono ligada às manoproteínas (Valentin *et al*, 1987;Fernandes,1994).

Quando a parede é afectada, podem ocorrer mudanças dramáticas na sua estrutura molecular, o que evidencia a existência de mecanismos reparadores da parede celular que compensam danificações celulares (Kaptyen *et al*, 1999). De estirpe para estirpe, a composição da parede pode variar pontualmente: por exemplo, *Schizosaccharomyces pombe* apresenta uma parede celular que difere da de *S. cerevisiae* por conter galactomanano (em vez de um glucomanano) e um α1,3-glucano alcalino solúvel (Osumi *et al*, 1997).

A microscopia electrónica de transmissão permitiu verificar a existência de camadas com diferentes densidades electrónicas na parede (Djaczenko e Cassone, 1971). Esse número de camadas é característico de cada espécie (rev. em Fleet, 1991). Em *S. cerevisiae*, encontram-se três camadas exteriores à membrana citoplasmática (Fleet, 1991): uma camada externa electronicamente densa constituída por manoproteínas (Zlotnik *et al*, 1984, De Nobel e Barnett, 1991), uma camada interna translúcida constituída principalmente por hidratos de carbono (β glucano e pequenas quantidades de quitina) (Fleet, 1991; Shaw *et al*, 1991;Hartland *et al*, 1994) e uma camada de separação entre a membrana citoplasmática e o lado interno do glucano que se denominou por espaço periplasmático. Segundo Arnold (1991), neste espaço periplasmático existem enzimas como a invertase e a fosfatase ácida, cuja

presença é responsável pelo aparecimento da camada electronicamente densa no interior.

O complexo β1,3-glucano - quitina é o maior componente da parede interna. O β1,6-glucano liga os componentes da parede interna com os da externa. Na superfície externa da parede encontram-se as manoproteínas, extensivamente O- e N-glicosiladas, densamente empacotadas e limitando a permeabilidade aos solutos (Zlotnik *et al*, 1984; De Nobel *et al*, 1990; Lipke e Ovalle, 1998).

As referidas localização e interacção dos componentes da parede celular têm sido estudadas por diversas estratégias. O facto de que é o β1,6-glucano que faz a ligação entre o β1,3-glucano com as proteínas da parede foi evidenciado ao se verificar que as proteínas extraídas com endo-β1,6 glucanase migram, em SDS-PAGE, como bandas discretas que são reconhecidas por anticorpos anti β1,6-glucano, mas não por anticorpos anti-β1,3-glucano (Kapteyn *et al*, 1996), enquanto as proteínas libertadas por β1,3 - glucanases se comportam como grandes moléculas heterogéneas que reagem com ambos os soros (Kapteyn *et al*, 1999). A utilização de Concavalina A e anticorpos específicos conjugados com ouro coloidal, permitiu constatar que a superfície mais externa da parede é formada principalmente por proteínas. Em *Candida albicans*, a existência de interacções entre glicoproteínas e quitina foi deduzida ao se constatar que o tratamento das paredes com quitinase solubiliza o meio proteico e que a cinética de incorporação de manoproteínas nas paredes de protoplastos em regeneração é alterada na presença de nicomicina, um antibiótico que bloqueia a síntese de quitina (Elorza *et al*, 1987; Marcilla *et al*, 1991; Chaffin *et al*, 1998). Para além das experiências

bioquímicas e imunológicas realizadas, o estudo de mutantes de estirpes laboratoriais com deficiências na parede celular (Hutchins e Bussey, 1983; Roncero *et al*, 1988; Ballou, 1990; Van Rinsum *et al*, 1991; Montijn *et al*, 1994; Hartland *et al*, 1994; Kapteyn *et al*, 1996) muito contribuiu para o conhecimento sobre a estrutura deste organelo. Foi proposto que as proteínas, juntamente com o β1,6-glucano e o β1,3-glucano constituam um "bloco de construção elementar" (Proteína→ β1,6-glucano→ β1,3-glucano) da parede (Klis *et al*, 1997). Uma minoria desses módulos contêm cadeias de quitina ligadas às cadeias de glucano (Kollar *et al*, 1995, 1997). São complexos macromoleculares que se organizam para formar a parede intacta, que não existe como uma estrutura sólida mas sim como uma "malha" de módulos unitários que apenas ocupam 10 a 20% do volume da parede (Lipke e Ovalle, 1998). Os componentes desses complexos estão ligados covalentemente e os módulos entre si, encontram-se associados por interacções não covalentes na camada glucano - quitina e por "cross-links" covalentes na camada de manoproteínas que incluem ligações dissulfureto entre manoproteínas e talvez ligações manoproteínas - glucano ainda não caracterizadas (Kollar *et al*, 1997; Lipke e Ovalle, 1998).

1.2.1. GLUCANOS

A presença de glucanos (homopolímeros de D-glucose) na parede é indicada pelo facto da hidrólise total da paredes isoladas resultar numa alta quantidade de glucose. É essa fracção glucânica que constitui o componente estrutural principalmente responsável pela rigidez da parede, determinando assim a sua forma e integridade osmótica (Feet, 1991; Hong *et al*, 1994;

Kapteyn *et al*, 1999). Baseando-se nas características de extracção e solubilidade, é possível classificar três tipos de glucanos presentes nas paredes celulares de levedura:

1) - fracção alcalino/ácido insolúvel de estrutura fibrilar, constituindo cerca de 35% do glucano existente na parede e fundamental para a estrutura da parede (Ballou, 1982; Steibvolá, 1984;Fleet, 1991): fundamentalmente constituído por resíduos de glucose ligados por ligações glicosídicas β1,3 formando polímeros de 1500 unidades em que algumas cadeias diferentes se ligam por ligações β1,6 (apenas 3% das ramificações) (Fleet, 1991). Este tipo de glucano surge sempre associado a uma pequena quantidade de quitina (Hartland *et al*, 1994; Klis, 1994).

2) - fracção ácido solúvel, representando cerca de 5% do glucano total da parede (Mannners *et al*, 1973) e constituído por cadeias de 140 resíduos de glucose predominantemente ligadas por ligações glicosídicas β1,6 (Manners *et al*, 1973; Hong *et al*, 1994).

3) - fracção alcalino solúvel, de estrutura amorfa, representando 20% do conteúdo em glucano da parede e composto por polímeros de cerca de 1500 moléculas de glucose unidas por ligações β1,3, 3% envolvido em ramificações (Fleet e Manners, 1977; Lopez - Romero e Ruiz - Herrero, 1977; Klis, 1994). O tamanho e estrutura deste glucano é semelhante com o da fracção insolúvel, à excepção da presença de uma pequena percentagem de resíduos β1,6 ligados (Fleet, 1991).

Apesar destas três estruturas terem sido isoladas de *S. cerevisiae*, é difícil concluir se estas três espécies de glucanos existem realmente e, se sim, como se associam entre si e com outros componentes da parede. Tal facto é

consequência das diferenças entre os métodos de obtenção das três fracções (e mesmo do material de partida que varia entre células intactas e paredes isoladas) e da possibilidade de degradação dos componentes durante a sua extracção (Fleet, 1991). No entanto, estudos com mutantes deficientes na incorporação da quitina (Roncero *et al*, 1988) e ensaios com quitinase (Mol e Wessels, 1987), demonstraram que o glucano alcalino solúvel é precursor da fracção insolúvel que se forma após a ligação da quitina, o que origina a insolubilidade (Hartland *et al*, 1994; Klis, 1994).

1.2.1. a) β 1,3 – Glucano

O β 1,3-glucano é predominantemente uma molécula linear de cerca de 1500 unidades de glucose, contendo 40 - 50 resíduos envolvidos em ramificações através do seu átomo de carbono C6 (Manners *et al*, 1973), o que faz com que este glucano tenha múltiplos terminais não redutores que funcionam como aceitadores quer para a ligação do β1,6-glucano, quer para a quitina (Kapteyn *et al*, 1999). Na cadeia de glucano β1,3 pode-se encontrar duas zonas de polaridade distinta: uma hidrofílica caracterizada pela existência de um alto número de grupos -OH e uma hidrofóbica com uma alta densidade de grupos –CH. A maioria do β1,3-glucano apresenta uma conformação helicoidal (Krainer *et al*, 1994), sendo tais hélices compostas por cadeias únicas de polissacarídeo ou por duas (Dufour e Malcorps, 1989) ou três (Jelsma e Kreger, 1975) cadeias unidas por ligações de hidrogénio (tripla hélice) (Williams *et al*, 1991; Stokke *et al*, 1993; Lipke e Ovalle, 1998). As hélices múltiplas conferem à parede a elevada rigidez assim como alguma elasticidade, por deslizamento das cadeias umas em relação às outras (Dufour

e Malcorps, 1989). As ramificações permitem às moléculas o diminuir do seu comprimento que pode chegar a um valor máximo de 3 a 6 vezes da espessura média da parede, no entanto o tamanho das ramificações ainda não é bem conhecido (Lipke e Ovalle, 1998). Ramificações longas favorecem a formação de hélices simples que associadas formam uma rede complexa, enquanto pequenas ramificações promovem as hélices triplas: estes dois tipos de regiões provavelmente alternam originando uma malha fibrosa (Saito *et al*, 1990; Williams *et al*, 1991; Lipke e Ovalle, 1998).

O β1,3-glucano é sintetizado por um complexo enzimático presente na membrana plasmática (Orlean, 1997), que funciona como uma glicosil transferase que utiliza UDP-glucose, e um transportador que exporta o produto linear vectorialmente através da membrana (Shemetek *et al*, 1980; Kopecka *et al*, 1989; Lipke e Ovalle, 1998). O homopolímero assim produzido é provavelmente modificado já na parede, no que diz respeito quer à formação de ramificações (processo em que a enzima Bgl2p está possivelmente envolvida (Goldman *et al*, 1995; Ram *et al*, 1996)), quer à ligação com a quitina ou com a própria parede através de reacções de transglicosilação que envolvem potencionalmente a proteína Gas1p (Popolo *et al*, 1993; Ram *et al*, 1995). A composição do complexo enzimático responsável pela síntese do β1,3-glucano é em parte conhecida, tendo alguns dos genes que codificam para os seus componentes já sido clonados (Douglas *et al*, 1994; Ram *et al*, 1995; Castro *et al*, 1995; Inoue *et al*, 1995; Mazur *et al*,1995; Drgonova *et al* 1996; Quadota *et al*, 1996) .

1.2.1. b) β 1,6-glucano

O β1,6-glucano é um polissacarídeo altamente ramificado que liga os componentes do "bloco elementar de construção" da parede (Kollar *et al*, 1997). Trata-se de uma estrutura que se reveste de importância quer na ligação das manoproteínas à parede (Klis, 1994; Kapteyn *et al*, 1996), quer ao conferir flexibilidade à estrutura (Fleet, 1991). Fleet e Manners (1977) demonstraram a ligação das manoproteínas ao β1,6-glucano, ao verificarem que a digestão de paredes isoladas com β1,6-glucanases levava à libertação de manoproteínas, enquanto o uso de β1,3-glucanases resultava em β1,6-glucanos e manoproteínas. A bioquímica e localização da síntese do β1,6-glucano assim como da sua ligação com o β1,3-glucano ainda está mal esclarecida (Lipke e Ovalle, 1998). Para o avanço do conhecimento neste campo, muito têm contribuído os estudos com mutantes em genes necessários para a síntese desse glucano, que é o receptor primário para o factor "assassino" K1 ("yeast K1 killer toxin") de levedura (Orlean, 1997). Estudos de secreção, demonstraram que a síntese do β1,6-glucano se processa ao longo da via secretória (Boone *et al*, 1990; Montijn *et al*, 1995) tendo início provavelmente no reticulo endoplasmático (Meaden *et al*, 1990; Jiang *et al*, 1996) e fim já ao nível da superfície onde podem ocorrer modificações dos polímeros.

1.2.2. QUITINA

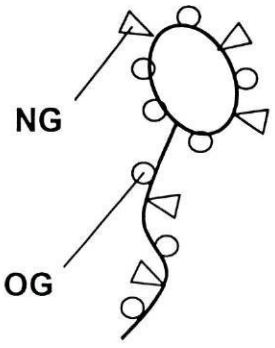
A quitina é um homopolímero linear, acetilado, de resíduos de N - acetilglucosamina ligadas por ligações glicosídicas β1,4. Em *S. cerevisiae* representa cerca de 1% dos componentes totais da parede (Cabib e Bowers, 1971; Sullivan *et al*, 1983). As cadeias lineares associam-se por ligações de hidrogénio, originando uma estrutura cristalina (Shaw *et al*, 1991; Cid *et al*, 1995). No que diz respeito à localização, a quitina encontra-se principalmente ao redor de zonas de gemulação que se formam quando a célula origina uma célula filha (Bacon *et al*, 1969; Cabib *et al*, 1971; Horisberger e Vonlanthen, 1977). Para além destas zonas de gemulação, toda a parede apresenta pequenas quantidades de quitina, uniformemente dispersas (Horisberger e Vonlanthen, 1977; Molano *et al*, 1980). As células filhas "recém-nascidas" não possuem quitina (Roncero *et al*, 1988; Shaw *et al*, 1991; Cid *et al*, 1995) e várias evidências indicam que a síntese de quitina na parede é regulada pelo ciclo celular sendo iniciada após a citocinese (Shaw *et al*, 1991; Cabib *et al*, 1997; Orlean, 1997). A síntese da quitina é vectorial, sendo a localização dos substractos e locais reguladores, intracelular, enquanto que o produto é extracelular, conforme indicam dados baseados em ensaios imunológicos, de microscopia e estudos dos locais de acção de inibidores impermeáveis à membrana (Cabib *et al*, 1983; Orlean,1997; Lipke e Ovalle, 1998). As enzimas responsáveis pela síntese da quitina são as quitina sintetases que fazem a transferência de resíduos de N-acetilglucosamina de moléculas de UDP-glucose para uma cadeia crescente de quitina. Em *S. cerevisiae* já foram identificados vários genes envolvidos na síntese da quitina, quer por

codificarem para a quitina sintetase quer por estarem envolvidos na regulação do processo de síntese (Roncero, 1988; Silverman *et al*, 1988; Valdivieso *et al*, 1988; Bulawa, 1992; Pammer *et al*, 1992; Bulawa, 1993; Cid *et al*, 1995).

1.2.3. LÍPIDOS

As quantidades de lípidos encontradas na parede de leveduras ronda valores entre 2 a 10%, conforme as estirpes (Chalinor *et al*, 1964; McMurrough e Rose, 1967; Killick *et al*, 1971). Os lípidos extraídos contêm frequentemente pequenas quantidades de manose, indicando possíveis ligações desses lípidos com a fracção de manano da parede (Nickerson, 1963; Nurminem e Suomalainen, 1971). A descoberta de proteínas de parede ancoradas à membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Conzelman *et al*, 1988; Vai *et al*, 1990) deu sentido à presença de lípidos na parede, já que até então nenhuma função para estas moléculas tinha sido encontrada (Fleet, 1991). Posteriormente foi mesmo verificado que a adição de GPI é essencial para a sobrevivência da célula (Leidich *et al*, 1994, 1995; Benghezal *et al*, 1995), estando envolvida na retenção à superfície de várias proteínas da membrana e parede celular (Conzelmann *et al*, 1990; De Nobel e Lipke, 1994). Exemplos de proteínas integrais de parede ligadas por âncoras de glicosilfosfatidilinositol são as proteínas Aga1p (Roy *et al*, 1991) e Agα1p (Lipke *et al*, 1989).

1.2.4. PROTEÍNAS



O uso de um reagente de biotinilação impermeável à membrana celular permitiu a identificação das proteínas de parede de levedura, evitando assim o risco de contaminação dos extractos com proteínas intracelulares (Casanova *et al*, 1992; Mrsa *et al*, 1997). Foram assim identificadas 20 proteínas de parede, das quais nove são extraídas com SDS/mercaptoetanol e onze são insolúveis (Mrsa *et al*, 1997; Kapteyn *et al*, 1999). As proteínas insolúveis dividem-se em dois grandes grupos: (1) proteínas GPI e (2) proteínas Pir.

(1) - proteínas GPI

Por digestão de paredes com β1,6-glucanases obtém-se as proteínas GPI. São proteínas que possuem, para além de um sinal peptídico no terminal amino, uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos no terminal carboxilíco que, no reticulo endoplasmático, uma transamidase substitui por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Ferguson e Williams, 1988; Cross *et al*, 1990; Udenfriend *et al*, 1991; Orlean, 1997). Diversos autores demostraram a importância do sinal hidrofóbico na retenção destas proteínas na parede quer por delecção do sinal quer por construção de proteínas quiméricas, conjugado com o estudo do endereçamento das proteínas (Schreuder *et al*, 1993; Wojciechowicz *et al* , 1993;. Van Berkel *et al* , 1994; Shimoi *et al* , 1995; Ram *et al* , 1998). Mutações que afectem a síntese de GPI são letais, indicando que a

presença destas moléculas é essencial (Leidich *et al*, 1995; Orlean, 1997). Restrições na síntese de GPI causam aberrações na biogénese da parede e limitam o crescimento celular (Vossen *et al*, 1997; Lipke e Ovalle, 1998). Após adição de GPI, as proteínas seguem a via secretória, sendo alvos de N-glicosilação e O-manosilação (Conzelmann *et al*, 1990). No aparelho de Golgi ocorre a adição da última manose e possivelmente a remodelação da parte lipídica das GPI (Sipos *et al*, 1994). Depois da secreção das proteínas GPI para a região externa à membrana pensa-se que a âncora GPI é clivada no glicano do seu terminal amino, sendo o remanescente dessa clivagem transferido para formar uma ligação glicosídica com o β1,6-glucano (De Nobel *et* al, 1994; Kaptyen *et al*, 1995; Lu *et al*, 1995; Van Der Vaart *et al*, 1996) que está por sua vez ligado ao complexo β1,3-glucano - quitina (Kaptyen *et al*, 1996; Kollar *et al*, 1997). A região de ligação entre as proteínas GPI e o β1,6-glucano foi tratada com endo-β1,6 glucanase e subsequentemente com ácido fluorídrico para quebrar a ligação fosfodiester no remanescente do GPI (Ferguson *et al*, 1992): o oligossacarídeo resultante consistiu em cinco resíduos de manose, ligados ao terminal não redutor dos di- ou tri-sacarídeos unidos por ligações β1,6. Concluiu-se que a composição do remanescente da âncora de GPI tem a seguinte estrutura: etanolamina-PO4-Man5 (Kaptyen *et al*, 1999). Já foram identificadas oito proteínas GPI de parede β1,6 glicosiladas: Agα1p (Lu *et al*, 1995) ; Cwp1p (Van Der Vaart *et* al, 1995); Cwp2p, Tip1p (Van Der Vaart *et al*, 1995); Flo1p e Sed1p (Van Der Vaart *et al*, 1996); Tir1p/Srp1p (Bourdineaud *et al*, 1998); Ycr089w (Kapteyn *et al*, 1999). As proteínas GPI de membrana diferem das de parede pela presença de um sinal de endereçamento adicional localizado na região do terminal amino da proteína relativamente ao local de

adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (Van Der Vaart *et al*, 1997; Hamada *et al*, 1998; Kapteyn *et al*, 1999).

(2) Proteinas Pir

Se em paredes previamente tratadas com SDS, realizarmos uma extracção alcalina (30 mM NaOH, 4ºC,8 horas) obtêm-se as proteínas Pir (Mrsa *et al*, 1997). São proteínas codificadas pelos genes *Pir*, sendo caracterizadas por possuirem um péptido sinal no terminal amino, um local de reconhecimento para a protease Kex2p e um ou mais "internal repeats" (Toh-E *et al*, 1993; Mrsa *et al*, 1997; Kapteyn *et al* ,1999). Há indicações que as proteínas Pir estejam ligadas aos outros componentes da parede celular através das suas cadeias laterais O-ligadas (Kapteyn *et al*, 1999). Tal como as proteínas GPI, as proteínas Pir são altamente O-glicosiladas e o papel das cadeias O-ligadas no ancoramento destas proteínas é baseado no facto de se verificar a ausência de proteínas Pir particulares em mutantes deficientes na O -glicosilação (Mrsa *et al*, 1997). As proteínas Pir ligam-se à parede através do β1,3-glucano, já que quase todas as proteínas de parede são libertadas com β 1,3-glucanase, enquanto apenas 84% são extraídas com β1,6-glucanase, o que pode significar que a fracção resistente a esta última enzima, corresponde às proteínas Pir, ligadas ao β1,3-glucano através das suas cadeias O-ligadas (Kapteyn *et al*, 1999). A ligação do glucano com as proteínas Pir parece necessitar da presença de manosilfosfato (Nakayama *et al*, 1999). Recentemente, Yun *et al* (1997) demonstraram que as proteínas Pir conferem resistência à proteína antifúgica (de planta), osmotina.

Proteínas solúveis

As proteínas de parede solubilizadas com SDS, são proteínas ligadas não covalentemente a este organelo. A sua incorporação na parede não depende da existência de um glucano bem formado conforme se pode deduzir de experiências realizados com protoplastos em regeneração (Pastor *et al*, 1984). São proteínas de massa molecular reduzida e manosiladas, com excepção da glicosidase Bgl2p (Valentin *et al*, 1984; Sanz *et al*, 1989; Van Rinsum *et al*, 1991). No que diz respeito às funções associadas a estas proteínas, foram descritas várias incluindo a de receptores em fenómenos de aglutinação, degradação e síntese da parede, modificação de factores nutricionais, factores de conjugação, factores de floculação e protecção contra o stress. Relativamente ao conteúdo em aminoácidos, predominam os resíduos acídicos (glutamato e aspartato) e hidroxi-aminoácidos (serina e treonina) (LipKe *et al*, 1989).

1.2.4.1. MODIFICAÇÕES DAS PROTEÍNAS DE PAREDE

Os organismos recorrem a certas modificações pós–tradução das proteínas para lhes conferir determinadas estruturas, controlar e regular as suas funções ou endereçá-las para localizações celulares específicas. Tais modificações consistem, por exemplo, em glicosilações, prenilações, fosforilações e adições de âncoras GPI (ver secção 1.2.4., em "Proteinas GPI") (Chaffin *et al*, 1998). O processamento proteico é feito principalmente no reticulo endoplasmático e complexo de Golgi (Cleves e Bankaitis, 1992) podendo ocorrer modificações adicionais na membrana plasmática e mesmo parede celular (Lu *et al*, 1994; Montijn *et al*, 1995).

1.2.4.1. a) Glicosilação

A glicosilação é a modificação mais importante a considerar para as proteínas de parede de levedura, originando a formação de glicoproteínas, na sua maioria manoproteínas que são as principais responsáveis pela limitação da porosidade da parede celular (Zlotnick *et al*, 1984; De Nobel *et al*, 1990). Encontram-se manoproteínas de parede de massas moleculares muito variadas, mas é principalmente nas de massa molecular elevada (maior que 200 kDa) que se conhecem funções na parede celular (Chaffin *et al*, 1998). Nestas proteínas, relativamente à sua massa molecular total, 50 a 90 % corresponde a manose e apenas uma pequena porção corresponde à fracção proteica. Verifica-se que o tamanho das cadeias laterais diferem entre as glicoproteínas, podendo estar associado à morfologia celular (Elorza *et al*, 1988). As glicoproteínas podem ser agrupadas em dois grandes grupos:(1) as N–glicosiladas; (2) as O–glicosiladas.

(1) N-glicosilação

A N-glicosilação corresponde à glicosilação mais frequente já que 90 % da manose das manoproteínas está ligada por ligações N-glicosídicas a resíduos de asparagina na sequência consenso "-Asparagina-X-Serina/Treonina- " (onde X pode ser qualquer aminoácido excepto prolina ou aspartato). As proteínas N-glicosiladas possuem um oligossacarídeo N-ligado com uma estrutura central de 10 a 14 manoses (Man) e dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) ligadas a uma asparagina (Asn) (Man10-14GlcNac2-Asn). Cinquenta a duzentos resíduos adicionais de manose distribuem-se numa cadeia principal de manoses α1,6 ligadas, à qual se ligam

várias pequenas cadeias laterais α1,2 e α1,3 ligadas (Lipke e Ovalle, 1998; Orlean, 1997). Segundo Ballou (1982) estas cadeias de hidratos de carbono N-ligadas estão expostas à superfície celular. A N-glicosilação de proteínas de parede ocorre essencialmente em quatro etapas: 1) ocorre no retículo endoplasmático a formação de um intermediário lipídico em que o dolicol-fosfato é o transportador de um oligossacarídeo constituído por dois resíduos de N-Acetilglucosamina, nove manoses e três glucoses (Dol-P-GlcNAc2Man9Glc3); 2) ainda no retículo, transferência em bloco do oligossacarídeo para uma asparagina aceitadora na proteína e 3) remoção de três resíduos de glucose e um de manose do oligossacarídeo; 4) ocorre no aparelho de Golgi, consistindo na adição de cadeias de polimanoses (Tanner e Lehle, 1987). O oligossacarídeo final N-ligado pode resultar na adição de 50000 a 100000 kDa à massa das proteínas (Lipke e Ovalle, 1998). Para a elucidação da estrutura e mecanismo de síntese dos oligossacarídeos N-ligados, muito contribuiram os estudos realizados com mutantes *sec* (secretory mutants), com diferentes etapas da via secretória bloqueadas (Cleves e Bankaitis, 1992) e com mutantes *mnn* (*mannan* defective), contendo alterações da estrutura polissacarídica das suas manoproteínas (Cohen e Ballou, 1981; Ballou, 1982). A N-glicosilação é essencial para a viabilidade da levedura (Silberstein *et al*, 1995), sendo vital para a incorporação de algumas proteínas na parede. A elongação das cadeias N-ligadas não é essencial para a biogénese da parede por si só, mas a ausência destas cadeias na superfície da célula aumenta a permeabilidade celular e afecta a sua integridade (De Nobel *et al*, 1990; Lipke e Ovalle, 1998).

(2)- O – Glicosilação

As proteínas de parede podem também ser O-glicosiladas com cadeias de manose não ramificadas de apenas 1 a 5 unidades de manose (Podzorski *et al*, 1990) que, com as proteínas, criam estruturas cilíndricas rígidas que as elevam acima da membrana e superfície celular (Gatti *et al*, 1994; Jentoft, 1990). É no reticulo endoplasmático que a primeira manose é transferida do transportador dolicol-fosfato para resíduos de serina ou treonina de proteínas (Kukuruzinska *et al*, 1987). Os restantes resíduos de manose são adicionados no aparelho de Golgi, cedidas por GDP-manose (Lehle, 1992). A disrupção da O-glicosilação causa um processamento aberrante das manoproteínas da parede e conduz a uma redução significativa do conteúdo da parede em β1,6-glucano (Lussier *et al*, 1997; Orlean, 1997; Lipke e Ovalle, 1998). Para explicar estas observações foram postas duas hipóteses: a) o β1,6-glucano é parcialmente sintetizado intracelularmente e a sua secreção é dependente da associação com manoproteínas O-glocosiladas (Orlean, 1997); b) a síntese do glucano é dependente de proteínas cuja localização e função é dependente da O-glicosilação (Lipke e Ovalle, 1998).

1.2.4.1. b) Fosforilação

A presença de fosfato associado às manoproteínas ocorre em baixas quantidades. É a substituição das cadeias laterais de manose por unidades de manosilfosfato ou manobiosilfosfato, que confere à parede de levedura a sua carga superficial aniónica (Orlean, 1997). A presença de fosfato também surge como consequência da ligação de algumas proteínas à parede celular, *via*

âncoras GPI, adicionadas ao C-terminal proteico por ligação fosfodiéster (Kapteyn *et al*, 1994; Chaffin *et al*, 1998).

1.2.5. Nota final

A descoberta do "bloco de construção elementar" da parede (Figura 1), constituído por manoproteínas, β1,6-glucano, β1,3-glucano e quitina permitiu grandes avanços no conhecimento da estrutura da parede celular de levedura. O modelo modular resultante (Kapteyn *et al*, 1996) juntamente com estudos genéticos e de biogénese permitiram compreender melhor reacções de "cross-linking" entre os vários constituintes assim como vias de síntese. A estrutura apresentada refere-se a uma estrutura geral da parede de levedura, que, é importante realçar, não é estática, mas antes pelo contrário altamente dinâmica, regulada segundo factores internos e externos à célula. Em caso de dano da parede, poderá mesmo ocorrer a activação de mecanismos de compensação e reparação dessa estrutura, recentemente descobertos e que constituem mais uma prova da possível variabilidade da composição da parede (Kapteyn *et al*, 1998).

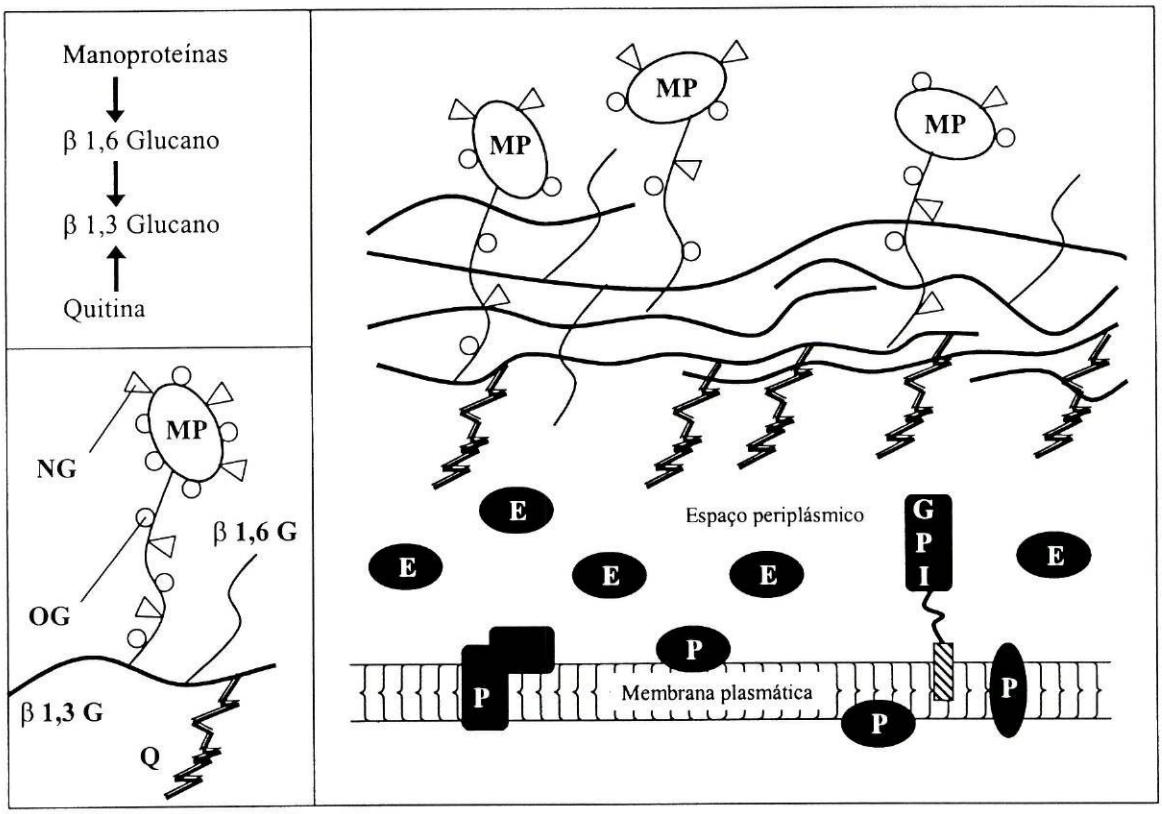


Figura 1:

Organização molecular da parede de levedura.

Estrutura do "Bloco de construção elementar da parede": as manoproteínas ligam-se, através de cadeias de β1,6-glucano, ao β1,3-glucano, ao qual se podem associar cadeias de quitina, que fortalecem a estrutura da parede.

A associação de vários "Blocos de construção elementar" leva à formação da parede celular.

NG – N- glicosilação; OG – O- glicosilação; P – Proteína; MP -- Manoproteína;

E -- Enzima; β 1,3 G - β1,3-glucano; β 1,6 G - β1,6-glucano; Q – Quitina;

GPI – Proteína com âncora de glicosilfosfatidilinositol

(Adaptado de LipKe *et al*, 1998; Kapteyn *et al*, 1999)

2. FLOCULAÇÃO

2.1. INTRODUÇÃO:

A primeira referência à floculação de leveduras data de 1876, observada por Louis Pasteur (Pasteur, 1876; Esser *et al*, 1987). A floculação ocorre quando células suspensas em meio líquido se agregam em aglomerados (flocos) de centenas ou milhares, que sedimentam devido à sua elevada densidade ou que vêm à superfície das culturas, como consequência da existência de bolhas gasosas de dióxido de carbono. É um fenómeno reversível, que ocorre durante o crescimento vegetativo das leveduras, não tendo relação com os fenómenos de aglutinação sexual. O termo autofloculação refere-se agregação de células de uma única estirpe enquanto cofloculação diz respeito à ocorrência do fenómeno, mas entre células de estirpes distintas (Stewart *et al*, 1975; Regan *et al*, 1979).

O porquê da ocorrência da floculação das leveduras no estado selvagem ainda não foi elucidado, embora o fenómeno já tenha sido sugerido como um mecanismo de defesa desenvolvido pelas células para sobreviverem a condições de stress (Rose, 1984; Moradas-Ferreira *et al*, 1994; Falcão Moreira *et al*, 1998). Biotecnologicamente, é dada particular importância à floculação como um fenómeno útil em vários processos industriais, tais como a produção de cervejas e outras bebidas espirituosas, o tratamento de águas residuais, bioconversões e mesmo produção de vacinas e proteínas heterólogas (Schreuder 1994). De facto, leveduras floculantes podem aumentar a produtividade por redução do tamanho dos fermentadores na produção de biomassa mesmo em líquidos com baixa quantidades de nutrientes (Bu'Lock *et al*, 1980; Meyrath *et al*, 1980). Segundo Teixeira *et al*, (1990), os biorreactores

de floculação funcionam a densidades mais elevadas e rendimentos acrescidos. Na indústria cervejeira, é a obtenção de um produto final, isento de leveduras, sem recorrer ao uso de processos dispendiosos como a filtração e/ou a centrifugação, que torna a floculação alvo de interesse (Fernandes, 1994). No entanto, a manipulação de estirpes floculantes é sempre complicada, devido à dificuldade de manter constante o grau de floculação e antever a altura de ocorrência do fenómeno (Esser *et al*, 1987), o que condiciona completamente a qualidade do produto pretendido: agregações prematuras originam fermentações incompletas e floculações tardias ou mesmo ausentes, causam a obtenção de uma cerveja não clarificada e possivelmente arruinada, por alteração do sabor causada por autólise das células (Stewart *et al*, 1976). Deste modo, e na tentativa de elucidar este tipo de agregação e de controlar a sua ocorrência atendendo a objectivos industriais, são úteis os estudos genéticos, fisiológicos e bioquímicos em geral que tentam avançar no conhecimento dos factores e mecanismos moleculares envolvidos na floculação de leveduras.

2.2. BIOQUÍMICA DA FLOCULAÇÃO

Embora a maioria dos estudos sobre a floculação, nomeadamente estudos genéticos, tenham sido realizados em *Saccharomyces cerevisiae*, a floculação foi já observada em pelo menos 16 espécies de 8 géneros diferentes (Teunissen e Steensma,1995), como por exemplo, *Hansenula anomala* (Saito *et al*, 1990), *Kluyveromyces marxianus* (Fernandes *et al*, 1993), *Pichia pastoris* (Mbawala *et al*, 1990) e *Schizosaccharomyces pombe* (Johnson *et al*, 1988). A variação de estirpes utilizadas assim como de métodos de trabalho, torna os

resultados dos vários estudos já descritos, difíceis de comparar, integrar e por vezes, de conciliar. No entanto, o efeito de determinados factores como o pH, composição do meio, temperatura, arejamento, fase de crescimento celular e, em destaque, o envolvimento de proteínas e a influência da presença de iões e de certos açucares, são frequentemente descritos em diferentes trabalhos.

2.2.1. Envolvimento de proteínas

O envolvimento de proteínas no processo de floculação de leveduras foi revelado por diversas evidências experimentais, algumas das quais se referem a seguir:

(1) inibição da floculação por acção da ciclohexamida, substância que interfere com a síntese proteica citoplasmática (Stewart *et al*, 1973; Nishihara *et al*, 1976; Stratford e Carter, 1993).

(2) abolição irreversível da floculação por agentes desnaturantes como ureia e cloreto de guanidina (Miki *et al*, 1982; Nishiara *et al*, 1982)

(3) efeito inibitório de temperaturas elevadas, atribuído à ocorrência e desnaturação proteica de proteínas da parede (Mill, 1964; Stewart *et al*, 1975; Taylor e Orton, 1975; Hussain *et al*, 1986)

(4) efeito de proteases que é diferente de estirpe para estirpe, indicando o envolvimento de proteínas específicas (Eddy e Rudin, 1958).

(5) inibição da floculação por agentes como DTT e β-mercaptoetanol, o que sugere o envolvimento de proteínas contendo ligações dissulfureto (Stewart *et al*, 1973).

O envolvimento de proteínas no fenómeno de floculação é um dado já adquirido, persistindo, no entanto, a dificuldade de identificar proteínas específicas (floculinas), devido à grande diversidade de resultados que se encontra nos trabalhos descritos (provavelmente consequência de diversos métodos de análise utilizados ou mesmo de diferenças entre os mecanismos de floculação entre as estirpes estudadas). No entanto, diversas proteínas já foram referenciadas na literatura como potenciais floculinas. Tais proteínas foram na sua maioria descobertas por análise e comparação das paredes de células em condições floculantes e não floculantes. Em *Saccharomyces cerevisiae*, várias possíveis floculinas de diferentes massas moleculares (p.e.: 10 kDa (Stewart *et al*, 1975) 13 kDa (Holmberg *et al*, 1978); 25 kDa (Robertson *et al*, 1980); 28 kDa e 43 kDa (Williams *et al*, 1992); 37 kDa (Stewart e Goring, 1976); 54 kDa e 67 kDa (Costa e Moradas-Ferreira, 1993); 400 kda (Straver, 1993)) foram identificadas. Noutras leveduras, tal como *Kluyveromyces marxianus* (Teixeira *et al*, 1989) e *Hansenula anomala* (Saito *et al*, 1990), foram igualmente identificadas proteínas de massa molecular de 37 kDa, potencialmente relacionadas com a floculação, embora ainda não tenha sido estabelecido qualquer tipo de homologia entre elas.

Apesar das várias proteínas candidatas ao título de floculina, a comprovação do envolvimento no processo de adesão celular só foi realmente apresentado no caso das proteínas codificadas pelos genes *FLO* (secção 2.3.): de facto, Bidard *et al* (1995), identificou, por imunofluorescência, a proteína Flo1p (produto do gene *FLO1*) em paredes de células de *S. cerevisiae* floculantes e provou que a mutação dessa proteína condicionava a capacidade floculante das células. As mutações estudadas afectavam o número de

sequências repetidas presentes na parte interna da Flo1p (Teunissen *et al*, 1995), ricas em resíduos de serina e treonina que poderão ser alvos de manosilação, condicionando a conformação proteica e a sua exposição à superfície celular. Bony *et al* (1998), mostraram que a Flo1p se acumula progressivamente na parede durante o crescimento celular, sugerindo que a quantidade disponível dessa proteína na parede é determinante do grau de capacidade floculante. O envolvimento proteico e, em particular desta proteína Flo1p, tornou-se assim inquestionável.

2.2.2. Envolvimento de iões metálicos

A influência de sais inorgânicos no fenómeno de floculação tem sido descrita desde fins do século XIX, sendo inicialmente explicado como o resultado de uma simples neutralização da carga superficial das leveduras, consequência da existência de grupos aniónicos como carboxilos e fosfatos. Essa carga manteria as células num estado disperso e os iões anulariam as repulsões entre elas, favorecendo a adesão. A teoria foi, no entanto, ficando desacreditada ao se constatar que a neutralização de carga superficial não era, por si só, suficiente para que a floculação ocorresse (Fisher, 1975) e que os efeitos diferenciados causados por diferentes sais (Stewart e Goring, 1976) não eram explicados (Stratford, 1991). De facto, o efeito de diversos catiões metálicos tem sido estudado e os resultados desses trabalhos são várias vezes pouco conclusivos, chegando-se a verificar que na sua maioria, conseguem realmente induzir a adesão celular, mesmo em células não floculantes (Mill, 1964; Nishiara *et al*, 1982). O catião cálcio é, até ao presente, o único ião que se reconhece como especificamente relacionado com o fenómeno de

floculação da maioria das estirpes (Miki *et al*, 1982; Stratford, 1989). A sua acção (notória, mesmo na presença de quantidades vestigiais) mostrou-se específica e reversível, verificando-se que o uso de outros catiões, mesmo com raios iónicos ou carga idênticas, não implica necessariamente o mesmo efeito (Stratford, 1989). Certos trabalhos mostraram mesmo que o efeito indutor de alguns iões pode-se também resumir num efeito provocado por catiões Ca^{2+}, por se dar uma saída de cálcio intracelular causada pela presença desses iões (Stratford, 1989). O reconhecimento da importância do cálcio na floculação, causou o aparecimento da "Calcium-bridging hypothesis" (Figura 2) (Harris, 1959; Mill, 1964), em que foi proposto que os iões bivalentes de cálcio originam ligações, suportadas por pontes de hidrogénio, entre as células de leveduras. Os grupos sugeridos como responsáveis pela interacção com os iões cálcio foram os carboxílicos (Mill, 1964) e os grupos fosfodiester das manoproteínas de parede (Lyons e Hough, 1970[1], 1970[2], 1971; Stratford, 1992).

O envolvimento de iões metálicos é assim um dado adquirido, (quanto mais não seja, para o ião cálcio) reforçando a teoria que se baseia em ensaios de desagregação intercelular com o ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) como requerimento para distinguir fenómenos de floculação de um qualquer outro de adesão celular, irreversível e não sensível ao agente quelante.

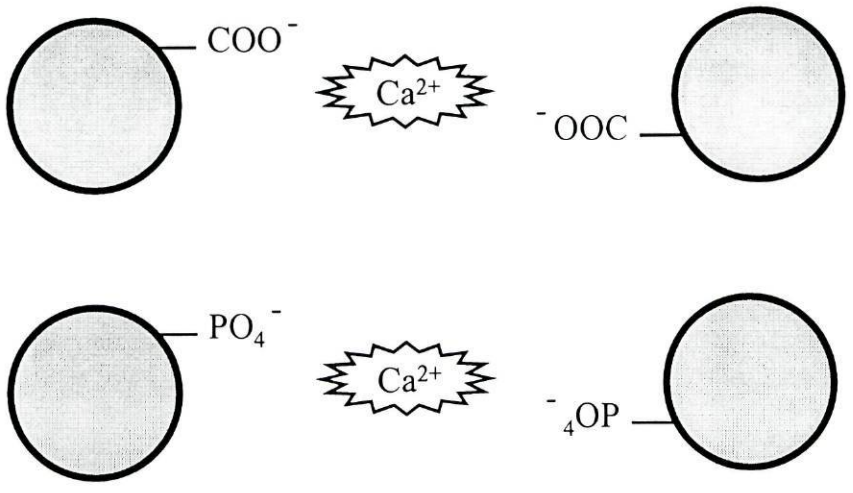


Figura 2:

"Calcium-bridging hypothesis" (Harris, 1959; Mill, 1964): os iões bivalentes de cálcio originam ligações, suportadas por pontes de hidrogénio, que possibilitam a floculação das leveduras.

(Adaptado de Fernandes, 1994)

2.2.3.Envolvimento de hidratos de carbono. Lectinas e fenótipos característicos.

O envolvimento de hidratos de carbono foi evidenciado pelas constatação de que a floculação de várias estirpes de leveduras é inibida pela presença de determinados açucares, nomeadamente manose, maltose, sacarose e glucose (Mill, 1964; Fujini e Yoshida, 1976), o que não é explicado à luz da teoria da "Calcium-bridging hypothesis" (secção 2.2.2.). Surgiu assim, a proposta de um outro mecanismo explicativo deste tipo de adesão celular: o "Mecanismo tipo-lectina" (Miki *et al*, 1982) (Figura 3), que atende à necessidade de envolvimento de proteínas de superfície, da presença de catiões cálcio e à susceptilidade à inibição por açúcares, integrando todos esses factores. As lectinas são proteínas que ligam iões metálicos

(nomeadamente o Ca^{2+} e Mn^{2+}) e com alta afinidade para a ligação a hidratos de carbono específicos. O modelo propõe que a floculação é consequência da ocorrência de ligações específicas, entre lectinas características de células floculantes e hidratos de carbono intrínsecos da parede de qualquer levedura. Segundo este mecanismo, qualquer levedura possui então o receptor (hidrato de carbono) para as ligações que levam à floculação, mas só as células tipicamente floculantes possuem as lectinas, o que explica os fenómenos de co-floculação entre uma estirpe floculante e uma não-floculante (Nishiara e Toraya, 1987; Stratford, 1992). Os iões cálcio entram neste mecanismo tipo-lectina, como moduladores conformacionais que se ligam às lectinas, induzindo conformações que permitem à proteína interactuar com o receptor em células adjacentes, tornando-se assim mais clara a alta especificidade do catião (relativamente a outros iões) para o processo. A inibição da floculação por açúcares específicos explica-se, segundo esta proposta, como resultado da saturação dos sítios de ligação ao receptor. Estudos realizados com concavalina A, reforçaram a teoria, já que o efeito inibitório desta lectina se justifica completamente por ela: a concavalina compete com as floculinas na ligação aos receptores para as ligações floculantes (Miki *et al*, 1982). Efeitos como os de factores que afectem a integridade proteica (secção 2.2.1) também são concordantes com a hipótese, com base na inactivação das lectinas. Masy *et al*, (1992) evidenciaram o papel dos hidratos de carbono ao demonstrar que células floculantes ligam especificamente à sua superfície proteínas fluorescentes contendo manose.

De entre os hidratos de carbono estudados, a glucose e a manose são os que apresentam maior capacidade em inibir o processo de floculação,

podendo-se até agrupar a maioria das estirpes floculantes em dois grandes grupos, atendendo à sua sensibilidade perante essas hexoses (Masy *et al*, 1991; Stratford e Assinder, 1991). A cada um desses grupos corresponde um fenótipo, designado de fenótipo Flo1, no caso de leveduras sensíveis especificamente à manose (células MS), e fenótipo NewFlo, no caso de células sensíveis não só à manose e derivados, mas também a glucopiranosídeos (células GMS). Adicionalmente, embora não incluídas em nenhum destes fenótipos é de referir a existência de um grupo menor de estirpes floculantes, insensiveis à manose (células MI), assim como o facto de estar descrita a inibição por galactose da floculação das leveduras *Kluyveromyces lactis* (Bellal *et al*, 1995) e *Kluyveromyces bulgaricus* (Al-Mahmmod *et al*,1988).

Perante a identificação dos dois fenótipos principais (Flo1 e NewFlo) foi proposta por Stratford e Assinder (1991) a existência de duas lectinas distintas apresentando diferentes sensibilidades para hidratos de carbono. Kobayashi *et al*, (1998), estudaram a proteína Flo1p e uma sua homóloga, a Lg-Flo1p, duas lectinas responsáveis pelos dois fenótipos floculantes distintos, um sensível apenas à presença de manose (Flo1p) e outro sensível quer à manose como à glucose (Lg-Flo1p). As regiões proteicas responsáveis pelo reconhecimento dos hidratos de carbono foram igualmente identificadas em ambas as proteínas. A hipótese da existência de dois tipos de lectinas foi apoiada pela constatação de que os dois fenótipos floculantes apresentam diferentes sensibilidades à acção de proteínases e baixa de pH (Stratford e Assinder, 1991), e capacidades distintas na ligação de neoglicoproteínas (proteínas marcadas e ligadas covalentemente a resíduos de açucar) (Masy *et al*, 1992).

A distribuição das lectinas pela superfície da parede mostrou-se também como um parâmetro de diferenciação entre os dois fenótipos, sendo polarizada no caso das células NewFlo e uniforme nas células Flo1 (Masy *et al*, 1991). No que diz respeito ao tipo de receptores, Stratford *et al* (1992) verificaram que em ambos os fenótipos são constituídos por dois ou três resíduos de manose da cadeia lateral da estrutura osídica elongada de manoproteínas (Fernandes, 1994). A baixa capacidade de adesão de mutantes *mnn*, reforçou a importância da manose no mecanismo que leva à floculação (Stratford *et al*, 1992).

A origem das lectinas foi também questionada, pondo-se como hipóteses, uma origem interna à célula (proteínas secretadas) ou uma origem externa, proveniente do meio de crescimento. Embora em certos casos seja necessária a presença de um chamado "péptido indutor" no meio de crescimento para que a floculação ocorra (Stewart, 1972), a origem externa das lectinas não é coerente com o já comprovado, efeito inibidor da ciclohexamida (Nishiara *et al*, 1976) ou com o crescimento de carácter não floculante de certas leveduras em meios em que já foi verificada a adesão de outras células (Sharma e Singh, 1990).

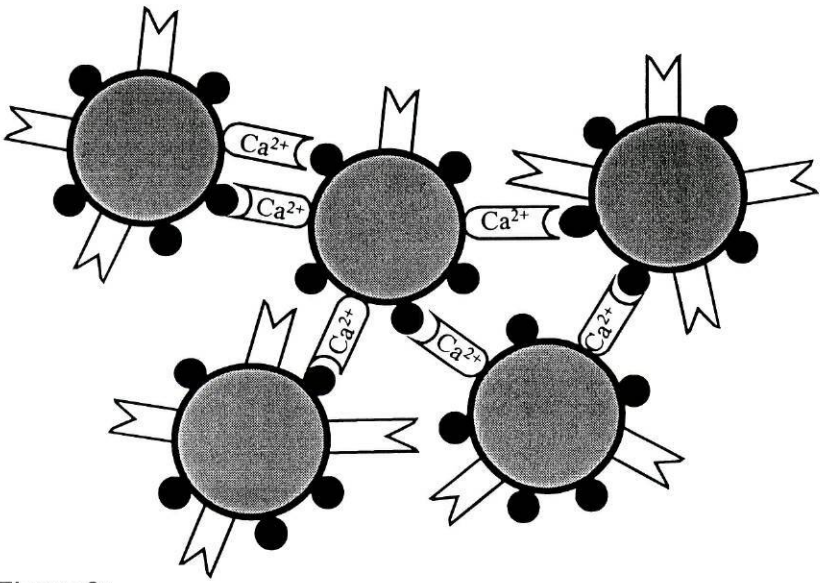


Figura 3:

"Mecanismo tipo lectina" (Miki *et al*, 1982): as lectinas (•) são proteínas celulares de superfície que após ligação de iões metálicos como o cálcio, adquirem conformações que lhe permitem interactuar com moléculas receptoras.

2.3. MODELOS/ MECANISMOS DE FLOCULAÇÃO

Em 1964, Mill propôs um mecanismo de floculação onde grupos aniónicos da superfície celular interactuavam por intermédio de uma ponte de cálcio, estabilizada por pontes de hidrogénio (secção 2.2.2.). No entanto, estudos que comprovaram a não intervenção dos grupos fosfatos nas interacções que levam à floculação (Stewart *et al*, 1976; Amory *et al*, 1988; Amory e Rouxhet, 1988; Stratford *et al*, 1992), juntamente com a incapacidade de outros iões de substituir o cálcio na promoção da adesão celular, e a comprovação do envolvimento de hidratos de carbono e lectinas (secção 2.2.3), tornaram este modelo insuficiente. Surgiu então uma hipótese avançada por Miki *et al* (1982), em que as células floculantes apresentam proteínas de superfície (lectinas), que são activadas pela presença de iões cálcio, após o que se ligam a receptores (hidratos de carbono) presentes nas paredes de células vizinhas. Tal modelo explica o envolvimento quer de proteínas, quer de iões ou hidratos de carbono e constitui a hipótese mais citada nos trabalhos

publicados até hoje. A sua universalidade é, no entanto, posta em causa pela existência de estirpes insensíveis à inibição por açúcares (Masy *et al*, 1991).

Straver *et al* (1993) verificaram o aumento súbito da hidrofobicidade superficial celular no início da floculação da estirpe de *S. cerevisiae* MPY1 (fenótipo NewFlo), o que mostrou estar relacionado com o aparecimento de fímbrias na superfície das leveduras. Tais fímbrias destacavam-se das células se estas fossem agitadas violentamente, e intensificavam a floculação se adicionadas a células já floculadas, embora não conseguissem provocar o aglomerar de células não floculantes. Partindo duma suspensão de fímbrias, obteve uma glicoproteína hidrofóbica, 78% homóloga com Flo1p (secção 2.2.1.) na parte terminal amino, mas que concluiu não ser responsável pela floculação celular. De facto, a proteína mostrou não possuir actividade tipo lectina nem apresentou capacidade de induzir a floculação de células. Mais tarde, após incubação das leveduras (*S. cerevisiae* MPY1) a 60ºC, na presença de manose (Straver *et al*, 1994[1]), foi isolado um extracto proteico, constituído por aglutininas (proteínas responsáveis pela agregação celular) de baixo peso molecular, capaz de induzir a adesão celular nos moldes típicos de um fenómeno de floculação. Verificou-se que tais aglutininas estavam presentes na parede celular desde as fases iniciais do crescimento, embora a sua activação só acontecesse mais tarde, o que é concordante com o proposto por Stratford e Carter(1993). Straver *et al* (1994) proposeram então uma hipotese para o mecanismo de floculação (Figura 4), sugerindo que a proteína Flo1p presente nas fímbrias causadoras de hidrofobicidade superficial, funcionasse como um ligando entre as lectinas e hidratos de carbono de células vizinhas, facilitando interacções. O papel de Flo1p passa, neste modelo, a ser assim encarado

numa perspectiva passiva que contrapõe o papel activo previsto na hipótese de Miki *et al.* No entanto, a observação em algumas estirpes Flo1, de que as fimbrias se encontram presentes quer em células selvagens quer em células mutadas nos genes FLO, mostrou ser improvável o envolvimento dessas estruturas na floculação das estirpes (Teunissen, 1995). Depreende-se assim que proteínas como a Flo1p intervêm de forma distinta nos processos de floculação de dois tipos de fenótipos (NewFlo e Flo1).

Bony *et al* (1998), realizaram o estudo da localização e estrutura da Flo1p em *Saccharomyces cerevisiae*, em que se verificou que a proteína, de massa molecular superior a 200 kDa, extensivamente glicosilada e rica em resíduos de serina e treonina, localiza-se na camada manoproteica da parede celular e também a nível da membrana plasmática e periplasma. A detecção da Flo1p em organelos de secreção indica que segue a via clássica de endereçamento. Embora se tenha verificado que a proteína pode ser extraída eficientemente através de um tratamento com SDS-βmercaptoetanol (o que indica que Flo1p é uma proteína de parede não covalentemente ligada), Bony *et al* (1998) apresentam evidências de um ancoramento por GPI no seu terminal carboxílico, o que torna a Flo1p um membro invulgar entre as proteínas de parede. Os mesmos autores concluiram, por realização de truncagens da proteína, que é a região N-terminal que é essencial para possibilitar a ocorrência de interacção celular mediada pela Flo1p. Verificaram igualmente que a proteína não se encontra permanentemente na superfície celular mas que se vai acumulando na parede ao longo do crescimento das células, sendo essa acumulação determinante para a ocorrência da floculação

nas estirpes que estudaram. O estudo da localização e estrutura da Flo1p ajudou a compreender o papel da proteína no processo da agregação celular.

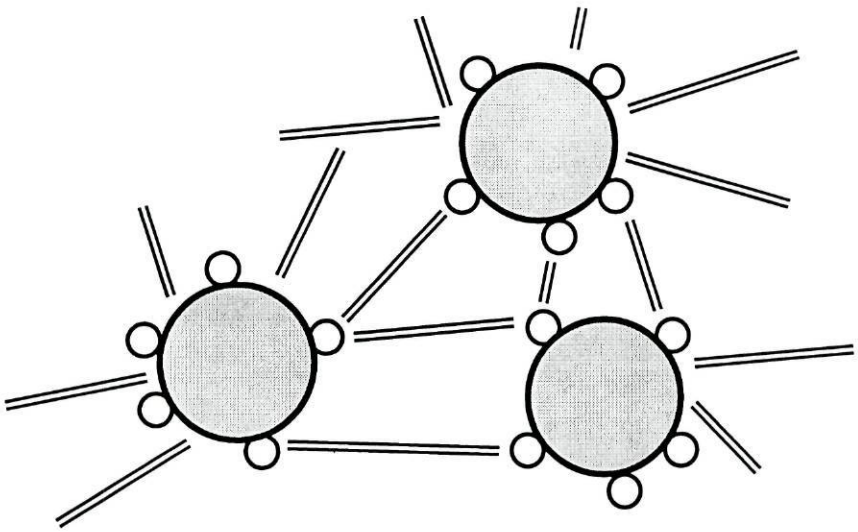


Figura 4:

Hipótese de Straver (1994) para a floculação: a proteína Flo1p presente nas fímbrias (=), funciona como um ligando entre as lectinas e os hidratos de carbono (•) de células adjacentes.

2.4. GENÉTICA DA FLOCULAÇÃO

A genética clássica definiu três genes dominantes potencialmente envolvidos na floculação de leveduras: os genes *FLO1*, *FLO5* e *FLO8* (Johnston e Reader, 1982, 1983; Yamashita e Fukui, 1983; Stratford, 1992). Tais genes são, presumivelmente, codificantes para lectinas, proteínas glicosiladas, secretadas e incorporadas na parede. Esta hipótese foi designada de "Single gene model of flocculation genetics" e de acordo com ela, estirpes não floculantes não possuiam os genes *FLO* e por conseguinte não são capazes de flocular (Hodgson *et al*, 1985). Contudo, este modelo simplista mostrou-se incorrecto quando se verificou a ocorrência de floculação, após certas mutações que não podiam de forma alguma originar de novo genes para lectinas (Lipke e Hull Pillsbury, 1984; Kramer *et al*, 1990; Stratford e Assinder,

1991). Foi então proposto que os genes *FLO* fossem genes regulatórios que codificam para activadores que exercem controlo positivo em genes estruturais que codificam para lectinas de superfície. Os genes estruturais estariam silenciosos em estirpes não floculantes e activos em células floculantes. As mutações poderiam então activar o gene específico para a lectina (Stratford, 1991). Recentemente, mais dois genes dominantes envolvidos na floculação de *S. cerevisiae* foram encontrados: os genes *FLO9* e *FLO10* (Teunissen e Steensma, 1995). Tais genes, juntamente com os genes *FLO1*, *FLO5* e *FLO 8* são agora considerados como os membros da "Flocculin family" e codificam para proteínas de alta grau de homologia (Teunissen e Stemsa, 1995; Bossier *et al*, 1997). Em 1996, Lo e Draginis, descreveram uma nova floculina de superfície codificada pelo gene *FLO11*, um gene de levedura relacionado com os genes *STA* e, em 1997, Sieiro *et al*, clonaram um gene capaz de conferir o fenótipo floculante (gene *FLO2*) que se mostrou suficiente para complementar a mutação *flo1*.

A análise da localização dos genes *FLO* nos cromossomas juntamente com estudos comparativos das sequências genéticas e de fenótipos floculantes resultantes, têm sido relatados em vários trabalhos. Está assim descrito que o gene *FLO1* se localiza no cromossoma I assim como o gene *FLO5* (Hodgson *et al*, 1985). Foi a localização cromossomal que mostrou que genes identificados como o *FLO4* (dominante) e *flo3* (recessivo), são alelos de *FLO1*, possuindo a mesma localização cromossomal (Russel *et al*, 1980). Da mesma forma, existe a suspeita de que os genes *flo6* e *flo7* sejam igualmente alelos de *FLO1* (Stratford, 1992; Johnston e Reader, 1982). O gene *FLO8* foi encontrado no cromossoma XIII e verifica-se elevada homologia entre ele e *FLO1* (Teunissen

e Steensma, 1995). O gene *FLO9* foi localizado no cromossoma I e codifica para uma proteína 94% homóloga à Flo1p, enquanto o gene *FLO10* foi encontrado no cromossoma XI e apresenta 81% homologia com os restantes genes *FLO* ao nível do terminal amino (Teunissen, 1995). Ensaios de disrupção genética e transformação de estirpes não floculantes foram realizados para os genes *FLO1* e *FLO5*: a disrupção de qualquer um dos genes provoca a inibição da floculação (Teunissen *et al*, 1995), enquanto a transformação de leveduras com *FLO1* é suficiente para conferir fenótipos floculantes (Teunissen *et al*, 1993).

Está descrito que certas mutações de genes envolvidos na regulação metabólica e síntese da parede celular, podem resultar num fenótipo floculante (Teunissen e Steensma, 1995). De entre as mutações citadas, as mais frequentes são as mutações nos genes *CYC8* (cromossoma III) e *TUP1* (cromossoma II). Foi sugerido que estes genes tenham uma função regulatória, sendo os seus produtos proteicos inibidores de uma certa classe de activadores de transcrição (Williams e Trumbly, 1990; Stratford, 1991). No caso da proteína Tup1p, foi observado que reconhece uma sequência específica de nucleotídeos, também presente no promotor de *FLO1* (Teunissen *et al*, 1993). Verificou-se que os mutantes sintetizam três mRNAs (ao contrário das células selvagens) , hibridando um deles com sondas específicas para o gene *FLO1* e tendo os outros dois tamanhos correspondentes aos transcriptos *FLO5* e *FLO9* (Teunissen *et al*, 1995).

2.5. Nota final

O processo de floculação é um processo de adesão celular, dependente da influência de factores internos relacionados com genótipo e que são

determinantes para o carácter floculante ou não de uma estirpe de levedura, e de múltiplos factores externos, tais como temperatura, pH e composição de meios de crescimento no que diz respeito por exemplo à presença de iões, açúcares ou mesmo certos péptidos indutores. A influência dos vários factores condicionantes da floculação aparenta ser consequência de influência directa ou indirecta na parede celular, quer por introdução de novas proteínas, ou modificação pós-traducional ou activação de proteínas já presentes. As várias estirpes de *S. cerevisiae* foram classificadas em três grandes grupos com base na sensibilidade à presença de açúcares e fenótipos de floculação apresentados. O modelo tipo lectina é o modelo mais abrangente até agora proposto, embora a existência de fenótipos pouco característicos questione a sua universalidade e indique a necessidade de aprofundar os nossos conhecimentos sobre este processo de agregação celular.

3. SECREÇÃO E EXCREÇÃO DE PROTEÍNAS EM LEVEDURAS

3.1. Introdução

A secreção em células eucariotas ocorre por etapas envolvendo uma série de componentes associados a membranas (Figura 5) e inicia-se no endereçamento das proteínas para o retículo endoplasmático (R.E.), seguindo-se a sua translocação através da membrana. Do R.E., as proteínas de secreção são transportadas em vesículas, para diferentes compartimentos celulares, nomeadamente, endossomas, lisossomas e superfície celular (Titorenko *et al*, 1997; Strirling, 1999). O transporte na membrana do R.E. pode ocorrer de uma forma co-traducional, sendo o polipéptido transferido enquanto está a ser sintetizado num ribossoma ou pós-traducionalmente, ocorrendo depois de completada a síntese da cadeia proteica no citosol (Rapoport *et al*, 1996[1]). As proteínas que entram na via de secreção não são necessariamente destinadas ao meio extracelular, podendo algumas delas tornar-se integrantes das membranas do R.E. ou aparelho de Golgi (desempenhando funções no enrolamento, glicosilação e processamento proteolítico de proteínas de secreção ou então na biossíntese de lípidos) e outras serem endereçadas para o vacúolo ou para a superfície celular (Klis, 1994). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a principal função da via secretória é o fornecimento de componentes do envelope celular (membrana plasmática + espaço periplásmico + parede celular) durante o crescimento, sendo reduzido o número de proteínas secretadas para o meio extracelular (proteínas de excreção) (De Nobel e Barnett, 1991; Klis, 1994). Compreende-se assim que a excreção de proteínas ocorra fundamentalmente nas zonas em crescimento

das células (Field e Scheckman, 1980). O estudo das vias secretórias tem sido realizado com um número limitado de proteínas como a carboxipeptidase Y, invertase e alfa-feromona, sendo a sua análise facilitada pelo recurso a mutantes sensíveis à temperatura em que passos específicos da via secretória são bloqueados a temperaturas determinadas. (Novick et al, 1980, Scheckman e Novick, 1982).

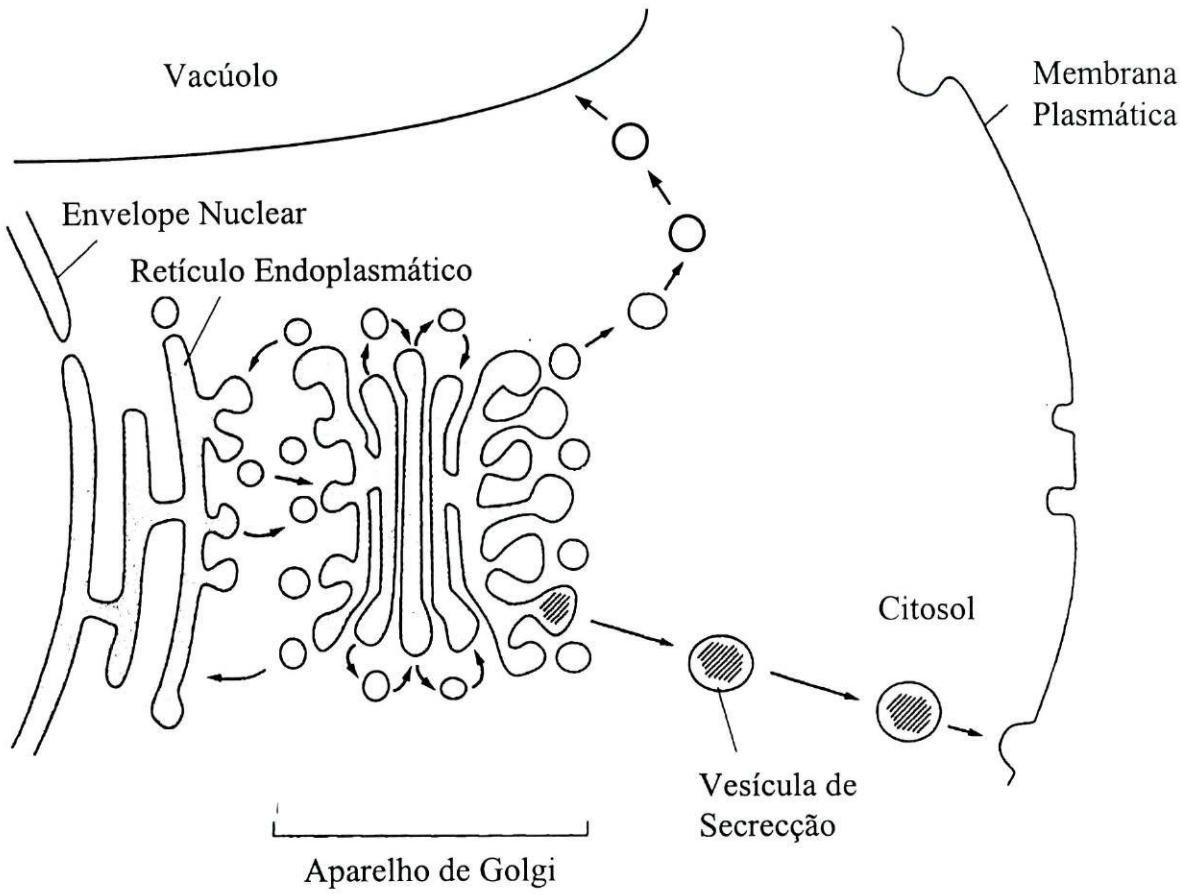


Figura 5:

Esquema simplificado da via secretória de proteínas em levedura.

(Adaptado de"Molecular Biology of the Cell" Third Edition, Garland Publishing, Inc., New York & London, (fig 13-3, p600))

3.2. Translocação co- traducional

Os endereçamentos co-tradução ou pós-tradução das proteínas para o R.E. são ambos extensivamente utilizados em *S. cerevisiae*, mas em células de mamíferos, é a via co-traducional (Figura 6) que predomina. Este tipo de translocação é iniciado com o surgir de uma sequência sinal no N-terminal de uma cadeia polipeptidica a ser sintetizada num ribossoma, à qual se liga a "Partícula de Reconhecimento de Sinal" (SRP-"*S*ignal *r*ecognition *p*article"), através da sua proteína p54 que contém um domínio rico em metionina. A SRP estabelece assim um contacto adicional com o ribossoma, o que favorece a ligação de um GTP à partícula. O complexo "ribossoma - cadeia nascente - SRP" liga-se então à membrana do R.E. quer através do próprio ribossoma com um complexo de proteínas de membrana (complexo sec61), quer através da SRP com a forma "GTP ligada" do seu receptor de membrana (SR ou "docking protein"). A SRP é então libertada quer da sequência sinal, quer do ribossoma e a cadeia polipéptidica é transferida através da membrana. A SRP desliga-se do seu receptor com hidrólise do GTP, ficando livre para iniciar novo ciclo. Nesta fase, o complexo ribossoma - cadeia nascente está fracamente ligado à membrana. A cadeia polipéptidica continua a ser sintetizada e dá-se então um 2º passo de reconhecimento da sequência sinal, que precede à inserção do polipéptido (numa conformação em loop) no local de translocação que se abre para o lúmen do R.E.. A sequência sinal estabelece interacções fortes quer com o complexo de proteínas de membrana, quer com os fosfolípidos. As interacções lipídicas são mais importantes no caso da síntese de proteínas de membrana, funcionando como âncoras (Jungnick e Rapoport, 1995; Rapoport *et al*, 1996[1]; Rapoport *et al*, 1996[2]). No que diz respeito aos

componentes de membrana responsáveis pela co-translocação de péptidos, foi demonstrado o envolvimento do complexo trimérico sec61p, do receptor para a SRP e da proteína TRAM ("Translocating chain associating membrane protein"). O complexo sec61p, encontrado em todos os eucariotas já estudados, é o componente central do local de translocação, consistindo em três diferentes polipéptidos, Sec 61α, Sec61β e Sec61γ. O Sec61α tem uma massa molecular de 40 kDa e atravessa a membrana cerca de 10 vezes, enquanto a Sec1β e a Sec1γ têm, respectivamente 12 e 10 kDa e apenas cruzam a membrana uma vez, com os seus terminais carboxílicos. A proteína TRAM parece estar envolvida nos primeiras etapas da translocação, mas a sua presença é só requerida para algumas proteínas. O receptor da SRP, consiste em duas subunidades e aparentemente está apenas envolvido no reconhecimento do endereçamento para o R.E., das proteínas. Estes três componentes parecem constituir o aparato mínimo de translocação na membrana, podendo contudo existir factores adicionais necessários para a estimulação ou regulação do processo (Rapoport *et al*, 1996[2]; Hartmann e Kalies, 1998).

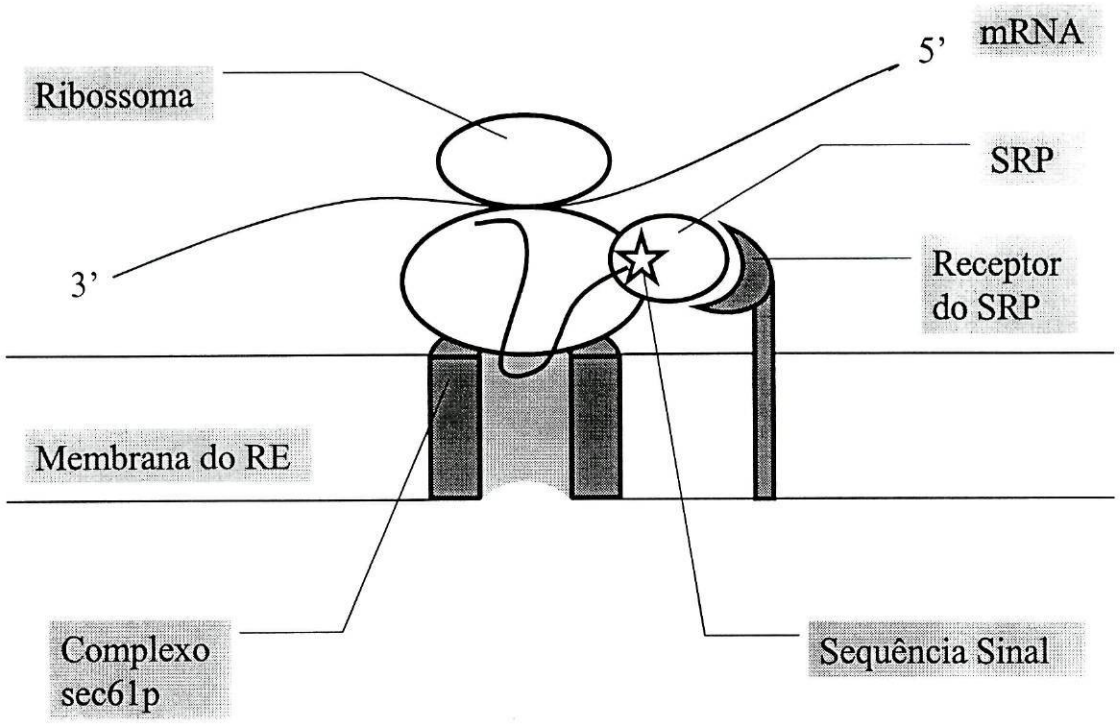


Figura 6:

Translocação co-traducional: interacções entre o complexo "ribossoma – cadeia nascente e SRP" e a membrana do retículo endoplasmático.

3.3. Translocação pós-traducional

É em *S. cerevisiae* que a via pós-traducional foi mais extensivamente estudada. Neste processo, o endereçamento do polipéptido para a membrana do R.E. é independente do ribossoma, da SRP e do seu receptor, envolvendo componentes não intervenientes na via co-traducional tal como o complexo tetramérico sec62/63p e chaperones da família hsp70, como é o caso da ATPase Kar2p (Brodsky e Schekman, 1993). O complexo trimérico sec61p é um factor comum aos dois tipos de translocação, sendo neste caso, a sua presença conjuntamente com as 4 proteínas do complexo sec62/63p (sec62p/sec63p/sec71p/sec72p) imprescindível ao processo. A função da Kar2p pode-se resumir à ligação com a cadeia polipeptidica fomentando a

translocação e impedindo o seu retrocesso, desempenhando um papel activo de condução da cadeia através da membrana (Glick, 1995). A presença da Kar2p (e ATP) funciona apenas como um efeito estimulador da translocação, constituindo mesmo um factor essencial no caso de certas proteínas (Rapoport *et* al, 1996[2]). No modelo hipotético até agora proposto para este processo de translocação, as cadeias proteicas são conduzidas à membrana do R.E. por chaperones citosólicas, nomeadamente da família das hsp70 e hsp40, cuja função é a manutenção das proteínas num estado conformacional "adequado" para a translocação (High, 1995; Hart e Ellis, 1999). As chaperones libertam-se previamente à inserção da proteína, sob a forma de uma conformação em loop, no local de translocação formado pelos complexos sec. À medida que a cadeia surge no lúmen do R.E., a chaperone Kar2p (na sua forma ADP ligada) liga-se à proteína, após ter interactuado com a subunidade sec63p, num processo ATP dependente. A ocorrência da ligação da Kar2p, conduz o movimento da proteína através do canal condutor. Neste processo, a chaperone reveste-se assim de particular relevo, conforme já foi descrito. Uma função adicional é-lhe atribuída no controlo da abertura do canal condutor das proteínas. Esta função é provavelmente desempenhada na via co-traducional, justificando a citação do seu envolvimento em ambas as vias (Rapoport *et al*, 1996[2]).

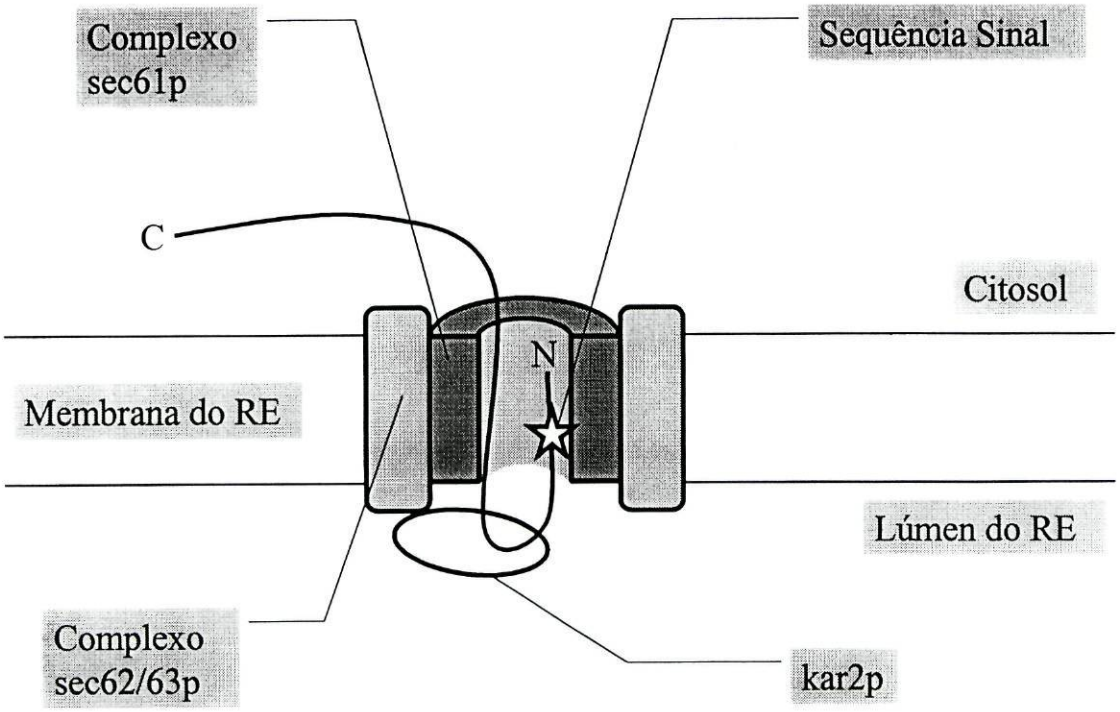


Figura 7:

Translocação pós-traducional: a cadeia polipeptídica completa atravessa o canal condutor formado pelo complexo sec, sendo a sua translocação mediada pela chaperone Kar2p.

3.4 Vias de secreção não dependentes de sequências sinal clássicas

Quer procariotas como eucariotas possuem várias proteínas de membrana e de secreção que não apresentam sequências sinal clássicas e que não utilizam as maquinarias de translocação gerais dependentes dos complexos sec. As vias de secreção alternativas são vias não clássicas utilizadas por proteínas que têm sequências sinais localizadas em posições invulgares como o C-terminal, sequências sinal pouco convencionais ou ainda por proteínas que não possuem sinais detectáveis. Como exemplos, pode-se citar o caso da hemolisina, que possui um sinal presente no seu terminal carboxílico, e de proteínas da família de metaloproteases de algumas bactérias, possuindo um sinal C-terminal ou então uma estrutura helicoidal

anfipática que funciona como sinal (Koronais e Hughes, 1993; Ghico e Wandersman, 1994). No transporte das metaloproteases há evidências do envolvimento dos designados "ABC transporters" ("ATP binding cassetes transporters"), proteínas de membrana formadas por 4 subunidades (duas de membrana e duas citosólicas) que hidrolisam ATP no transporte através da membrana. No caso da hemolisina, sabe-se do envolvimento de mais duas proteínas: HlyD e TolS localizadas nas membranas interna e externa, respectivamente (Rapoport *et al*, 1996[2]). Exemplos de proteínas sem sinal hidrofóbico, são as interleuquinas IL-1a, 1b e transaminases de eucariotas, cujo transporte não é bloqueado quando se afecta a via clássica de secreção, e cuja presença não é detectada associada com componentes dessa via (Muesch *et al*, 1990). Proteínas sem sinal hidrofóbico mas que possuem uma âncora de membrana localizada no C-terminal, também recorrem a vias não clássicas de secreção, embora tenham destinos exactos e não aleatórios como se chegou a pensar (Darrigo *et al*, 1993; Jantti *et al*, 1994). Em levedura, proteínas sem sinal N-terminal característico, foram mesmo detectadas na parede. É o caso da enzima 3-fosfoglicerato cinase de *Candida albicans* (Alloush *et al*, 1997) e a proteína p37, de elevada homologia com o enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, em *Kluyveromyces marxianus* (Fernandes *et al*, 1993). A comprovação do uso de vias alternativas utilizadas por algumas proteínas é realizada por estudos com a droga Brefeldina A que bloqueia o transporte vesicular característico da via clássica, assim como ensaios com proteolipossomas deficientes no complexo sec61p ou contendo apenas o receptor SRP, o complexo sec61 e a proteína TRAM (Kulay *et al*, 1995).

3.5. Nota final

A exportação de proteínas através da membrana do R.E. pode ocorrer quer co- quer pós-traducionalmente, sendo o seu endereçamento determinado, pela presença de uma sequência sinal. O transporte através da membrana ou a inserção na mesma, é feita através de um canal condutor provavelmente formado por um complexo heterotrimérico designado de sec61p (Rapoport *et al*, 1996[2]). Tal complexo funciona como a peça fundamental da maquinaria de translocação na membrana do R.E., colaborando com o receptor da SRP e a proteína TRAM na via co-traducional e com o complexo sec 62/63p na via pós-traducional (Rapoport *et al*, 1996[1]). Assim as duas vias clássicas de translocação parecem relacionadas embora mecanicamente distintas. Vias alternativas, independentes de sequências sinais no N-terminal, tornaram-se evidentes em estudos recentes, que levaram a descobertas de novos mecanismos ainda mal esclarecidos. Recentemente, em *Yarrowia olipolítica*, foi demonstrada a existência de vias de secreção diferentes. Foram propostas quatro vias de secreção que endereçam proteínas para diferentes destinos: (i) secreção; (ii) exportação de proteínas para a membrana plasmática e parede celular em síntese, durante o crescimento da levedura; (iii) entrega de proteínas para a membrana plasmática e parede celular em síntese, durante o crescimento micelial; (iv) peroxissomas em biogénese (Titorenko *et al*, 1997). As vias de secreção estão mais extensivamente estudadas em *S. cerevisiae*, sendo esses trabalhos provavelmente representativos das vias de secreção existentes em outros fungos, embora não se possa excluir a especificidade celular. O avanço destes conhecimentos é útil em processos como por exemplo, síntese de drogas antifúngicas e produção de proteínas heterólogas.

4. MULTIFUNCIONALIDADE DA GAPDH

4.1 Introdução

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um enzima glicolítico que catalisa a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. No genoma de *Saccharomyces cerevisiae* existem três genes estruturais pertencente a uma família multigénica GAPDH com regiões codificantes altamente homólogas e conservadas, designados por *TDH1*, *TDH2* e *TDH3* (Holland *et al*, 1979, 1985). Em *K. marxianus*, existe igualmente uma família GAPDH idêntica, constituída pelos genes *GAP1*, *GAP2* e *GAP3* (Fernandes *et al*, 1995). Foram construídos mutantes de *S. cerevisiae* em cada um dos genes da família multigénica GAPDH: foi observado que todos os mutantes simples são viáveis mas que os mutantes duplos em *TDH2* e *TDH3*, assim como o mutante triplo, são inviáveis. Estes dados indicam que a presença de um alelo funcional *TDH2* ou *TDH3* é necessário para o crescimento celular (Holland, 1985).

4.2. Multifuncionalidade e localização

Vários trabalhos descrevem funções para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que não se enquadram no papel que desempenha como enzima glicolítico. Juntamente com uma diversidade funcional, verifica-se igualmente a presença da proteína em locais que não o citosol, onde é muito abundante. Na tabela seguinte, encontram-se alguns exemplos de entre essas variadas funções e localizações da GAPDH, já descritas na bibliografia existente.

Tipo de célula	Localização	Função / Estado	Referência
(estudos *in vitro*)		Capacidade de ligação a DNA de cadeia simples	Perucho *et al*, 1977
Células de mamíferos	Núcleo	Associada a mecanismos de reparação do DNA	Cool e Sirover, 1989
Eritrócitos	Membrana plasmática	Liga-se ao transportador 1 da glucose e à banda 3.	Lachaal *et al*, 1990 Allen *et al*, 1987 Kliman e Steck, 1980
Células de placenta humana	Citosol	Uracil DNA glicosilase	Meyer-Siegler *et al*, 1991
Células HeLa	Núcleo	Associada a vias de exportação de tRNAs	Singh e Green, 1993
(estudos in vitro)		Capacidade de ligação a actina, tubulina e microtúbulos	Sommers *et al*, 1990 Robbins *et al*, 1995
Células CHO	Citosol	Associada com a endocitose	Robbins *et al*, 1995
Células humanas		Associada com a apoptose e neurodegeneração	Roses *et al*, 1996
Células humanas		Expressão aumentada em casos de cancro cervical humano	Kim *et al*, 1996
Células de *Schistosoma mansoni*	Superfície celular		Chaffin *et al*, 1998
Células de *Candida albicans*	Parede Celular		Gil-Navarro *et al*, 1997

Tabela 1: Exemplos de diferentes localizações e funções descritas para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

4..3. Presença da GAPDH e outras enzimas glicolíticas na parede celular

Em *K. marxianus*, foi detectada a acumulação de uma proteína homóloga à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, na parede celular de células floculantes (Fernandes *et al*, 1992). Evidências posteriores revelaram igualmente a presença da GAPDH na superfície de *Candida albicans* (Gil-Navarro *et al*, 1997). Não só a GAPDH mas também outros enzimas glicolíticas têm sido descritas como localizadas na parede celular. Em *C. albicans*, a enolase foi encontrada associada às camadas internas do β-glucano da parede celular (Chaffin *et al*, 1998), a fosfoglicerato cinase foi detectada na parede celular e à sua superfície (Alloush *et al*, 1996) e a presença de álcool desidrogenase foi igualmente sugerida (Pendrack *et al*, 1995). A álcool desidrogenase foi igualmente detectada na superfície de *Entamoeba histolytica* (Yang *et al*, 1994) e a fosfoglicerato cinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e triose-fosfato isomerase foram descritas na superfície de *Schistosoma mansoni* (Goudot-Grozet, 1989; Shoemaker *et al*, 1992; Lee *et al*, 1995; Chaffin *et al*, 1998). A localização destes enzimas glicolíticas na parede celular é bastante intrigante assim como os possíveis funções que tais moléculas possam desempenhar na parede celular e os mecanismos envolvidos na sua secreção (Chaffin *et al*, 1998).

OBJECTIVO DA TESE:

O trabalho apresentado nesta dissertação foi efectuado com o intuito de estudar uma possível floculina (p37) isolada de células floculantes de *Kluyveromyces marxianus* e contribuir para o esclarecerecimento do mecanismo molecular que associa a presença dessa proteína e o fenómeno de floculação. A exploração dos dados peculiares já conhecidos sobre a proteína, como seja a ausência de sinal clássico de endereçamento e homologia com o enzima GAPDH, constituiu um fio condutor no delinear das experiências que são aqui apresentadas. A experimentação utilizou quer a levedura *Kluyveromyces marxianus* que possui a p37 na parede, quer a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para introdução do gene codificante para a proteína, análise do respectivo endereçamento e realização de estudos funcionais.

CAPÍTULO 2

Construção e caracterização de um mutante de *Kluyveromyces marxianus* deficiente na síntese da proteína de parede p37.

O trabalho apresentado nesta tese teve como objectivo o estudo da proteína de parede p37 de *Kluyveromyces marxianus*, procurando estabelecer a relação existente com o mecanismo da floculação e outras funções que esta proteína possa desempenhar na célula.

ANTECEDENTES:

A proteína p37 foi descoberta em células floculantes de *Kluyveromyces marxianus*, notando-se uma diferença óbvia entre as quantidades presentes desta proteína, antes e após a floculação (Teixeira *et al*, 1989). Fernandes *et al*, (1992) realizaram a análise densitométrica do perfil das proteínas de parede extraídas por SDS, verificando que a p37 era uma proteína constitutiva da parede celular embora praticamente inexistente antes da floculação e muito abundante após as células terem floculado, correspondendo, nesse caso, a 11% das proteinas totais analisadas. A purificação da proteína e a sua caracterização mostrou ter uma elevada identidade com o enzima glicolítico gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* (Fernandes *et al*, 1992). No entanto, contrariamente à enzima citosólica, a p37 é N-glicosilada, sendo 35 kDa a massa correspondente à sua forma desglicosilada. Verificou-se que a floculação de *K. marxianus* podia ser induzida por aumento de temperatura para 40°C, na presença de 200 mM de Ca^{2+}, dando-se nestas condições a acumulação da p37 na parede celular (Fernandes *et al*, 1993). Posteriormente a p37 foi identificada como um dos elementos de uma família multigénica de *K. marxianus,* constituída por três genes. A região codificante de dois deles (*GAP2* e *GAP3*) é bastante similar

(99,6%), enquanto o terceiro gene (*GAP1*) apresenta uma homologia de cerca de 86% e é responsável pela expressão da p37 (Fernandes *et al*, 1995). A análise do gene e a sequenciação da proteína não permitiram encontrar qualquer sequência hidrofóbica que pudesse ser identificada como uma sequência sinal N-terminal clássica que justificasse a sua translocação para o retículo endoplasmático no trajecto para a parede celular (Fernandes *et al*, 1995).

O mutante *gap1*:

Os resultados previamente publicados indicavam uma possível relação entre a acumulação da proteína na parede de *K. marxianus* e a ocorrência de floculação. Para esclarecer essa questão foi decidido construir o mutante *gap1*, pretendendo obter uma evidência, no campo da biologia molecular, do envolvimento da proteína no fenómeno. Assim, foi feita a anulação da produção da p37 por "knock out" do gene relacionado *(GAP1)*. O facto de existir uma elevada homologia entre os membros da família multigénica GAPDH, à qual pertence o gene *GAP1*, codificante da p37, suscitou algumas dificuldades no trabalho experimental. Para afectar especificamente o gene da possível floculina, usaram-se na disfunção as zonas "flanking" do *GAP1*, que não são homólogas com as dos outros genes da família. O mutante *gap1*, mostrou-se não floculante, confirmando as expectativas geradas por trabalhos anteriores. No artigo seguinte, apresentam-se os dados relativos à obtenção do mutante e sua caracterização. A proteína p37 revelou estar envolvida (para além do processo de floculação de *K. marxianus*) na estabilidade da parede

celular e em mecanismos de resistência a temperaturas elevadas. A sua ausência mostrou levar a uma diminuição da actividade GAPDH citosólica.

Microbiology (1998), **144**, 681–688

Printed in Great Britain

Kluyveromyces marxianus flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37

R. Falcão Moreira,[1,3] P. A. Fernandes[1,2] and P. Moradas-Ferreira[1,4]

Author for correspondence: P. Moradas-Ferreira. Tel: +351 2 6074900. Fax: +351 2 6099157. e-mail: pmferrei@ncc.up.pt

[1] Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Rua do Campo Alegre, 823, 4150 Porto, Portugal

[2] Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

[3] Instituto Superior de Ciências da Saúde[3], Paredes, Portugal

[4] Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal

A *Kluyveromyces marxianus* mutant deficient in p37, a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-like protein, was obtained and characterized with respect to flocculation behaviour, resistance to temperatures above the optimum for growth, morphology, growth, calcofluor white sensitivity and GAPDH activity. In YPD media, the mutant cells were unable to flocculate and were thermosensitive. However, this thermosensitivity could be overcome by the presence of calcium. Calcofluor white was toxic to the mutant, indicating that the mutation affects cell wall structure. The contribution of p37 to total GAPDH activity was 25% when cells were using glucose as carbon source and 50% when cells were growing in 3% ethanol. These results indicate that p37 is likely to be involved in thermotolerance and flocculation, which can be related to its contribution to cell wall integrity.

Keywords: thermotolerance, flocculation, *Kluyveromyces marxianus*, cell wall proteins

INTRODUCTION

Yeast flocculation results from the aggregation of hundreds or thousands of cells due to interactions between components of the cell wall surface. The nature of these cell interactions has been elucidated by several approaches, for example protein synthesis inhibition by cycloheximide (Nishihara *et al.*, 1976) and proteinase K digestion (Nishihara *et al.*, 1977), indicating the involvement of proteins (Moradas-Ferreira *et al.*, 1994). In 1982, Miki *et al.* proposed a tentative model in which flocculation results from interactions between lectins and carbohydrates on the surface of the cell walls. More data have since become available that support this model (Stratford & Carter, 1993).

Kluyveromyces marxianus flocculation is concomitant with the accumulation of a protein (p37) in the wall of flocculent cells. Indeed, the p37 concentration in the cell wall increases to 11% of the total wall proteins released by SDS, suggesting that it is involved in the interaction between cells leading to flocculation (Fernandes *et al.*, 1992, 1993). Although it is well established that cell wall proteins are responsible for flocculation and different putative flocculins have been identified in *Saccharomyces cerevisiae* (Stewart *et al.*, 1976; Holmberg, 1978) and *Hansenula anomala* (Saito *et al.*, 1990), definitive proof for such a role has only been presented for proteins encoded by the *Flo* genes in *S. cerevisiae* (Stewart & Russell, 1977; Russell *et al.*, 1980; Vezinhet *et al.*, 1991; Teunissen, *et al.*, 1993). Brewer's yeast flocculence has been related to an increase in cell surface hydrophobicity, apparently induced by growth limitation, and correlated with the presence of large numbers of bundles of long fimbriae-like structures on the cell surface (Straver *et al.*, 1993).

Purification and characterization of *K. marxianus* p37 revealed a high identity to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Subsequently, the gene encoding p37, *GAP1*, was cloned, sequenced and identified as a member of the GAPDH multigenic family of *K. marxianus*, which consists of three genes: *GAP1* (encoding p37), *GAP2* and *GAP3*. The coding region of these genes has high homology: the identity between *GAP2* and *GAP3* is almost 99·6%, and between these two genes and *GAP1* is 86% (Fernandes *et al.*, 1995). In contrast, the homology between the known flanking regions of *GAP1* and the flanking regions of *GAP2* and *GAP3* is lower (55%). There is differential expression of the members of the GAPDH family: in the presence of glucose, *GAP1* and *GAP2* mRNA synthesis is observed but no *GAP3* transcripts can be detected; using a non-

Abbreviation: GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

0002-2065 © 1998 SGM

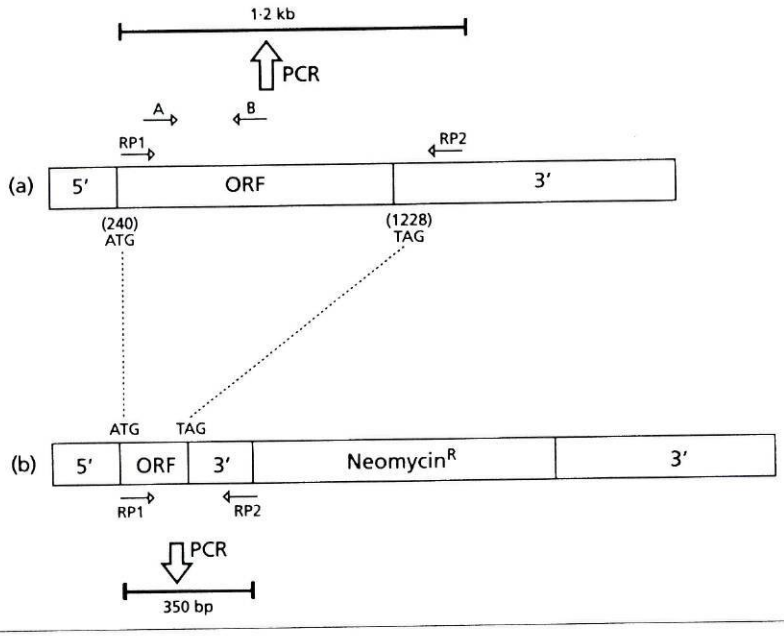


Fig. 1. *GAP1* disruption by excision of part of the coding region and introduction of the neomycin resistance gene. (a) PCR amplification of the *GAP1* coding region using RP primers results in PCR products of 1·2 kb. The positions of primers A and B are shown. (b) PCR amplification of the disrupted *GAP1* gene using RP primers results in PCR products of 350 bp. 3′, 3′ flanking region; 5′, 5′ flanking region.

fermentable carbon source such as ethanol, the transcription of the *GAP2* gene is strongly reduced, in contrast to the transcription activation of *GAP1* (Fernandes *et al.*, 1995).

Since p37 is present on the cell surface, a signal peptide was expected to be found in its amino-terminal end. However, gene sequence analysis did not show any sequence coding for a hydrophobic peptide that could be identified as a signal for protein translocation to the endoplasmatic reticulum. Therefore, this translocation could not be mediated by the SRP (signal recognition particle); thus it must utilize another mechanism, as also reported for 3-phosphoglycerate kinase, another glycolytic enzyme (Alloush *et al.*, 1997).

In the present work, aimed at evaluating the role of p37 in the cell wall and its correlation with flocculation, a *K. marxianus* mutant deficient in p37 was obtained by *GAP1* disruption. The mutant cells were no longer able to flocculate and became temperature-sensitive. This could be related to changes in cell wall stucture, as suggested by the sensitivity of the mutants to calcofluor white.

METHODS

Cell growth conditions. *K. marxianus* ATCC 10022 cells were grown in YPD (2% glucose, 2% Bactopeptone and 1% yeast extract) or YP supplemented with ethanol as a carbon source (2% Bactopeptone, 1% yeast extract and 3% ethanol) at 26 °C or 40 °C.

***GAP1* disruption.** This was performed using the 'one-step gene disruption method' (Rothstein, 1983). Part of the coding region between base 353 and base 1205 was excised by digestion with *Sal*I. The neomycin resistance gene was introduced in the 3′ flanking region of the disrupted gene (Fig. 1). A PCR amplification product of this fragment, including the 240 bp 5′ flanking region and 800 bp of 3′ flanking region, was used to transform *K. marxianus* ATCC 10022 cells.

Yeast transformation. *K. marxianus* cells were transformed by the spheroplast transformation method (Ausubel *et al.*, 1987).

PCR. This was performed using 500 ng genomic DNA and PCR primers RP1 (5′ AAAGGATCCAGATGGTTTCTATTGCTAT 3′) and RP2 (5′ AACGGATCCCTAAGACCTGAAAGACATT 3′). A final volume of 50 µl was used and the conditions were as follows: 1 mM of each primer, 200 mM Tris/HCl (pH 8·4) 500 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs. One unit of *Taq* polymerase (Gibco BRL) was added after an initial denaturation step of 10 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 94 °C for 40 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. The PCR products were analysed on a 0·8% agarose gel.

Southern blot and hybridization. Aliquots (20 µl) of *K. marxianus* ATCC 10022 wild-type and *gap1* mutant genomic DNA were digested with *Hin*dIII. The digested DNA was separated in a 0·8% agarose gel and transferred onto Hybond-N nylon membrane (Amersham) under alkaline conditions (Sambrook *et al.*, 1989). The DNA was covalently bound to the membrane by UV irradiation and subsequently pre-hybridized for 1 h at 65 °C with 6 × SSC, 5 × Denhardt's solution, 0·5% SDS and 20 mg herring sperm DNA ml^{-1}. The blot was hybridized in the same solution at 65 °C for 16 h using as probe the ^{32}P-labelled PCR fragment obtained from the amplification of the initial part (350 bp) of the coding region of *GAP1* with primers A (5′ ATTCGCTCATTCAACTGGTTTCGG 3′) and B (5′ AGGCAGTCAG ATGATGCTTTTATG 3′) (the positions of primers A and B are shown in Fig. 1), and using as template 25 ng of the plasmid pGAPKm1 (containing the coding region and part of the flanking regions of *GAP1*).

Cell growth. Cells were inoculated into YPD or YPD supplemented with $CaCl_2$ in an Erlenmeyer flask with five times the capacity of the volume of cell culture used. The cell cultures were incubated with shaking at 26 °C or 40 °C. The

optical density at 600 nm was determined each hour to evaluate cell growth.

Quantification of biomass. Aliquots (50 ml) of cell culture were filtered under vacuum using a pre-weighed filter (ME 25/41 ST membrane filter, Schleicher & Schuell). The cells were washed twice with sterile water and the filter was dried at 80 °C for 24 h. The filter was cooled in a dessicator and weighed to determine the amount of biomass present, expressed in g l^{-1}.

Quantification of glucose and ethanol in cell cultures. Samples (2 ml) of culture were taken and centrifuged at 16000 *g* for 2 min. The supernatants were stored at −20 °C until use. Ethanol was quantified using the ethanol UV test kit from Boehringer Mannheim. Glucose was quantified by the glucose oxidase/peroxidase method: 2·5 ml TGO reagent [0·5 M Tris/HCl (pH 7), 20 U glucose oxidase ml^{-1}, 0·38 U peroxidase ml^{-1}, 0·05 mg *o*-dianisidine hydrochloride ml^{-1}, 1% Triton X-100] was added to 0·5 ml of sample, the mixture was incubated for 20 min at 37 °C and the absorbance at 420 nm was determined. Glucose was estimated by reference to a standard curve prepared with known amounts of glucose.

Calcofluor white sensitivity tests. These were performed according to the method described by Ram *et al.* (1994), with the following modifications: cells were incubated in 5 ml YPD medium and incubated at 26 °C until an OD_{640} of 8 was reached. Dilutions of 10, 100, 1000 and 10000 times were prepared and 5 µl of each spotted on a YPD plate containing 50 µg calcofluor white ml^{-1}. The plates were incubated at 26 °C and growth was evaluated after 2 d incubation (F. M. Klis, personal communication)

Enzyme assays. These were performed using the method described by Holland & Westhead (1973).

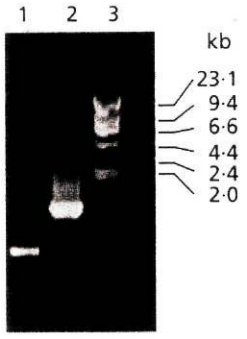


Fig. 2. PCR products obtained using RP primers designed for the amplification of the *GAP1* coding region. Lanes: 1, *gap1* mutant; 2, wild-type; 3, *Hin*dIII-digested λ DNA size markers.

Fig. 3. Southern analysis of genomic DNA for the identification of the coding region of the three GAPDH genes of *K. marxianus*. Lanes: 1, wild-type; 2, *gap1* mutant.

RESULTS

Disruption of the *GAP1* gene

To determine whether *K. marxianus* flocculation is dependent on the presence of p37, a *gap1* mutant was produced by homologous recombination (Rothstein, 1983). This was performed by the introduction into *K. marxianus* ATCC 10022 of a DNA fragment of 3448 bp, obtained by PCR amplification of the disrupted gene. Two hundred and forty base pairs of *GAP1* 5′ flanking region and 800 bp of its 3′ flanking region were included in the PCR product used to transform the *K. marxianus* cells. This approach guaranteed that the homologous recombination could only occur between the flanking regions, aiming the specificity in the targeting of the mutation to *GAP1*, since the flanking regions, in contrast to the coding regions, are not homologous between the different members of the GAPDH gene family of *K. marxianus*.

Analysis of genomic DNA

To confirm the mutation of the *GAP1* gene in the yeast genome, genomic DNA was prepared from either *K. marxianus* wild-type or transformed cells and screened by PCR and Southern blotting.

PCR. When the PCR products from the *gap1* mutant obtained using primers (RP1 and RP2) designed for amplification of part of the *GAP1* coding region were separated on an agarose gel (0·8%), a DNA fragment of the expected size, 350 bp, was revealed, whilst the PCR product from the wild-type was 1·2 kb (Figs 1, 2).

Southern blotting. *K. marxianus* genomic DNA from wild-type and *gap1* mutant cells was digested with *Hin*dIII and hybridized with a ^{32}P-labelled probe specific for the coding region of the three *K. marxianus* GAPDH family genes. As reported previously (Fernandes *et al.*, 1995), a DNA fragment of 8·0 kb due to the presence of *GAP2* and *GAP3* and one band of 4·0 kb due to the presence of *GAP1* should be obtained for wild-type cells. In fact, the two expected fragments were observed for wild-type *K. marxianus*, but only the 8·0 kb fragment was obtained for the mutant cells, indicating the absence of the intact *GAP1* gene (Fig. 3).

Characterization of the mutant

With the aim of evaluating the effects of *GAP1* disruption in *K. marxianus*, the mutant cells were characterized with respect to morphology, flocculation behaviour, growth, biomass, metabolism, calcofluor white sensitivity and GAPDH activity.

Morphology. Morphological analysis of the *gap1* mutant by light microscopy showed that the (*gap1*) mutant cells

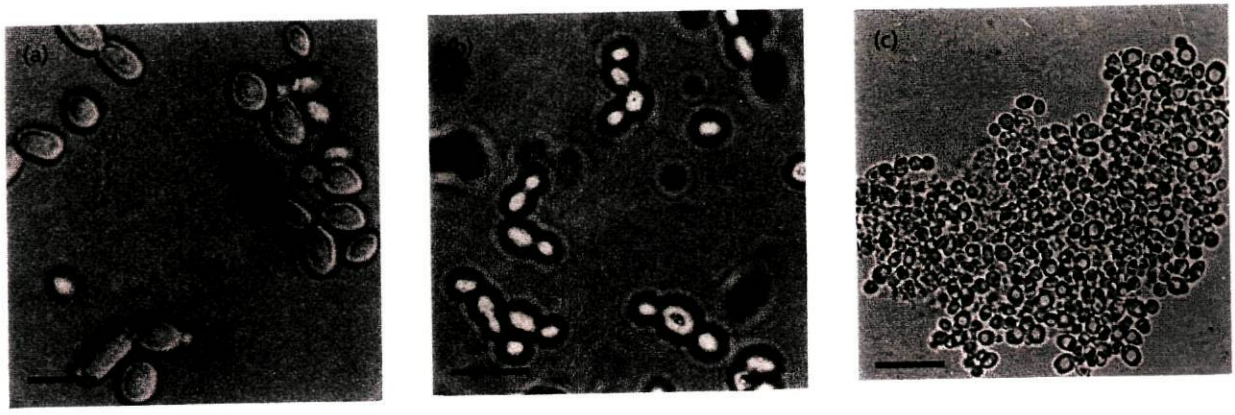


Fig. 4. (a) *K. marxianus* wild-type cells grown in YPD at 26 °C. Bar, 6 μm. (b) *gap1* mutant cells grown in YPD at 26 °C. Bar, 6 μm. (c) Flocculated *K. marxianus* wild-type cells grown in YPD medium containing 200 mM $CaCl_2$ at 40 °C. Bar, 15 μm.

were smaller and looked spherical, in contrast to the elongated appearance of wild-type cells (Fig. 4a, b).

Flocculation behaviour. Flocculation tests revealed that the mutant cells were no longer able to flocculate when growing at 40 °C in the presence of calcium as described for wild-type cells (Fernandes *et al.*, 1993) (Fig. 4c).

Cell growth. This was evaluated at different temperatures, with carbon sources and in the presence of $CaCl_2$. The results indicated that in YPD and at 26 °C, growth of the mutant cells was different from that of wild-type *K. marxianus*. The *gap1* mutant had a much longer lag phase, followed by an exponential phase that led to a considerably higher final OD_{600} (Fig. 5a). When ethanol was used as the carbon source, the growth curve of the mutant differed from that of the wild-type, again leading to a higher OD_{600} (Fig. 5b). With regard to the effect of temperature on growth, it was verified that mutant cells were sensitive to an increase in temperature. Indeed, incubation of mutant cells at 40 °C caused death, in contrast to wild-type cells, which were not affected (Fig. 5c). If calcium (200 mM) was added to the culture medium of mutant cells, growth was rescued, although with a lower yield (Fig. 5c). It was verified that the mutant growth rate at 40 °C was dependent on the calcium concentration; at increasing calcium concentrations (50, 100 and 150 mM) growth increased proportionally (data not shown).

Biomass, glucose uptake and ethanol production. The results obtained concerning biomass showed that the dry weight values of the *gap1* mutant cells were lower (about 15% less) than those of wild-type cells at equivalent OD_{600} values. Glucose uptake and ethanol production of mutant and wild-type *K. marxianus* cells were also different; in fact, the rate of glucose consumption was relatively higher in the *gap1* mutant, and ethanol was produced in greater amounts (Fig. 6a, b). The ratio between the amount of biomass produced and quantity of substrate consumed was calculated for both mutant and wild-type cells. A lower value (about 0·14) was obtained for the *gap1* mutant, compared to that (about 0·20) obtained for the wild-type cells.

Calcofluor white sensitivity. Calcofluor white is a negatively charged fluorescent dye that is used to detect cell wall mutants because it interferes with cell wall assembly. Cells with a weakened cell wall might not be able to withstand the additional disturbance of the cell wall caused by such a drug, resulting in lethality at concentrations that are not lethal to wild-type cells (Ram *et al.*, 1994). Fig. 7 shows the effect of calcofluor white on *gap1* mutant cells (Fig. 7b ii) compared to its effects on wild-type *K. marxianus* cells (Fig. 7a ii).

Contribution to total GAPDH activity. The contribution of the *GAP1* gene encoding p37 to total GAPDH activity was about 25% when cells were using glucose as carbon source and 50% in 3% ethanol (Table 1).

DISCUSSION

In previous studies on the flocculation of *K. marxianus* it was revealed that this yeast accumulates a small glycoprotein with an apparent molecular mass of 37 kDa – p37 – concomitant with the ability to flocculate (Fernandes *et al.*, 1993). This protein is encoded by a member of a GAPDH family named *GAP1* which has high homology with the other two members of the family. However, in contrast to the other GAPDH genes, *GAP1* expression was increased when ethanol was used as a carbon source. With the aim of elucidating the role of the p37 in flocculation behaviour, a *gap1* mutant was obtained and characterized.

To this end, disruption of the *GAP1* gene was achieved by removing a large portion of the coding region and inserting the neomycin resistance gene, a strategy that made use of the differences in the sequence of the flanking regions between *GAP1*, *GAP2* and *GAP3*. The disruption of *GAP1* was verified both by analysis of the

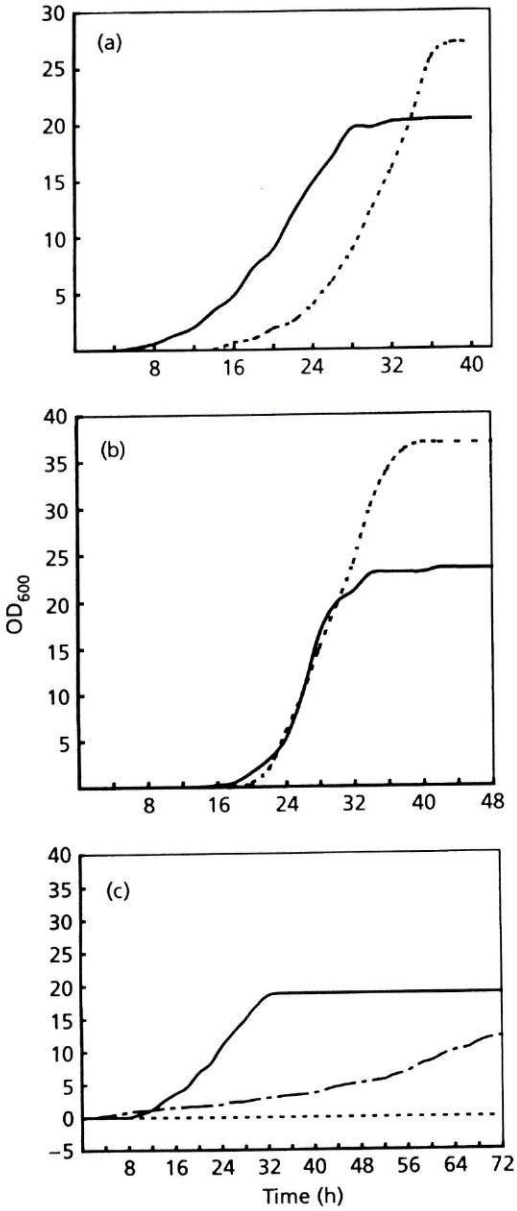


Fig. 5. (a) Growth of *K. marxianus* wild-type (——) and *gap1* mutant (– – –) cells in YPD medium at 26 °C. (b) Growth of *K. marxianus* wild-type (——) and *gap1* mutant (– – –) cells in YP medium supplemented with ethanol (3%) at 26 °C. (c) Growth of wild-type *K. marxianus* cells in YPD medium at 40 °C (——), and *gap1* mutant cells in YPD medium (– – –) and YPD supplemented with 200 mM $CaCl_2$ (— – —) at 40 °C.

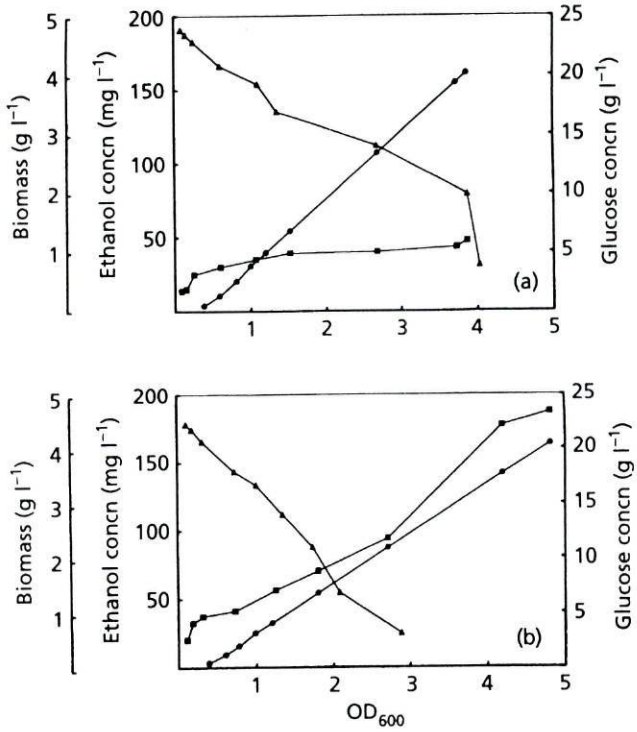


Fig. 6. Biomass (●), glucose consumption (▲) and ethanol production (■) by (a) wild-type *K. marxianus* cells and (b) *gap1* mutant cells.

DNA fragments obtained by PCR using specific primers (Fig. 2) and by Southern analysis (Fig. 3), and both assays led to the conclusion that the mutation of *GAP1* had been successful.

The mutant cells exhibited a different morphology (Fig. 4a, b) when compared with the wild-type: they were smaller in size and they had a spherical instead of a more elongated shape. This altered morphology can be a natural consequence of genetic manipulation of the yeast as has been reported by Veenhuis *et al.* (1978); Wright *et al.* (1988); Binder *et al.* (1991); Simon *et al.* (1992); and Vergères *et al.* (1993).

The correlation between the expression of the *GAP1* gene and the subsequent presence of the protein in the cell wall with the flocculation behaviour of the *K. marxianus* strain is clear as the mutant cells were no longer able to flocculate in the presence of calcium as occurs with the wild-type. Additionally, the mutant was sensitive to calcofluor white (Fig. 7a, b), which indicates that the structure of the cell wall is affected (Ram *et al.*, 1994).

Besides the loss of flocculation, the disruption of *GAP1* led to other changes such as those in growth and temperature tolerance. When *gap1* cells were growing at 26 °C they exhibited a more prolonged exponential phase and cell density reached a higher value (Fig. 5a); however, due to a change in cell size, the biomass yield remained the same (Fig. 6). With regard to the fermentation yield, when glucose and ethanol were estimated, it was found that the mutant cells were able to produce more ethanol. The shift to a more fermentative metabolism can be related to the decrease in GAPDH activity (Table 1). In fact, since *GAP1* contributes to GAPDH activity, its disruption probably affects the rate of production of energy and reducing equivalents by the glycolytic pathway. As a consequence, the cells change to a more fermentative metabolism, which is a less

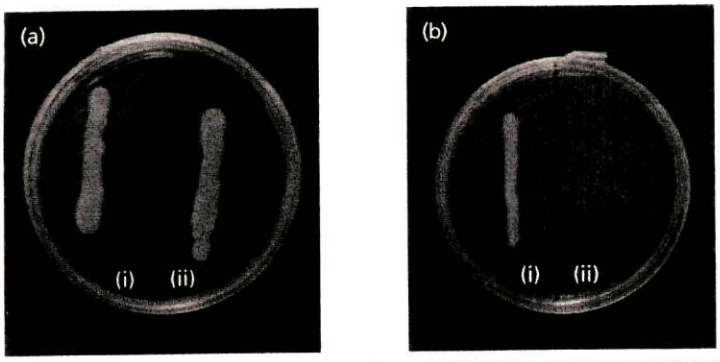


Fig. 7. Wild-type (a) and *gap1* mutant (b) *K. marxianus* cells grown on YPD agar (i) and YPD agar supplemented with calcofluor white (ii).

Table 1. Assay of GAPDH activity in *K. marxianus* strains using different carbon sources

Strain	Growth medium	GAPDH activity [min^{-1} (mg total protein)$^{-1}$]
Wild-type	2% glucose	2·0
gap1 mutant	2% glucose	1·5
Wild-type	3% ethanol	1·4
gap1 mutant	3% ethanol	0·7

efficient but quicker way of obtaining energy for cell survival. In the wild-type, the contribution of p37 to total GAPDH activity was not negligible as it represented 25% when glucose was utilized as carbon source. When ethanol was used as the carbon source, it contributed 50% of total activity. This is in agreement with a previous finding that *GAP1* expression is increased when cells are growing in ethanol, the expression of *GAP2* being very reduced (Fernandes *et al.*, 1995). In the presence of ethanol, this high GAPDH activity cannot be related to the rate of glycolysis, suggesting an additional role for the protein. In fact, data from different cell systems revealed that it has many different cellular localizations and functions. Recent evidence revealed the presence of GAPDH in the surface of *Candida albicans* (Gil-Navarro *et al.*, 1997) and previously GAPDH has been found to be associated with the red blood cell membrane (Allen *et al.*, 1987). Its mutation alters endocytosis in CHO cells (Robbins *et al.*, 1995); it is involved in multiple binding activity in group A streptococci (Pancholi & Fischetti, 1992); in bundling and unbundling of miocrotubules (Huitorel & Pantolini, 1985); protein kinase activity in the phosphorylation of transverse-tubule proteins (Kawamoto & Caswell, 1986); ssDNA binding activity (Perucho *et al.*, 1977); tRNA binding activity (Singh & Green, 1993) and uracil DNA glycosylase activity (Meyer-Siegler *et al.*, 1991).

K. marxianus is quite tolerant of temperatures up to 42 °C (Sá Correia & van Uden, 1982; Vivier *et al.*, 1993), and the mutant strain grows well at 40 °C provided that calcium is present. Indeed, the *gap1* mutant cannot grow at 40 °C in the absence of calcium and cell death is observed (Fig. 5c). The addition of calcium after a 24 h period at 40 °C cannot rescue cell growth. A relationship between thermosensitivity and the ability of the cells to flocculate was also reported for *S. cerevisiae*, which becomes more thermoresistant when the cells are able to flocculate (Bossier *et al.*, 1997). At present we cannot put forward any mechanisms that could account for the effect of calcium on thermotolerance; however, it is plausible to envisage that, by interacting with the negative charges on the surface, calcium can stabilize the structure of cell walls affected by the absence of p37, allowing the cells to avoid cell disruption and survive.

The present work provides evidence that p37 plays a key role in the architecture of the cell wall in conditions where flocculation occurs as there is a net correlation between the presence of p37 with the ability of cells to flocculate, and in thermotolerance as mutant cells are no longer able to grow at a more elevated temperature. Flocculation of *K. marxianus* is induced by a temperature upshift from 26 °C to 40 °C (Fernandes *et al.*, 1993); therefore p37 is probably related to a cell protection mechanism against thermal stress, which leads to flocculation. In fact, flocculation has already been described as a defensive mechanism developed by cells to survive under stress (Moradas-Ferreira *et al.*, 1994).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grant PRAXIS 2/2.1/Bio/1052/95 and R. F. Moreira thanks PRAXIS for grant BD/4551/94. The neomycin resistance gene was kindly provided by Professor Rudi Planta (Vrije University, Amsterdam, The Netherlands). We thank Professor Cecília Leão (University of Minho, Portugal) for helpful suggestions.

REFERENCES

Allen, R. W., Trach, K. A. & Hoch, J. A. (1987). Identification of the 37 kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as GAPDH. *J Biol Chem* **262**, 649–653.

Alloush, H. M., López-Ribot, J. L., Masten, B. J. & Chaffin, W. L. (1997). 3-Phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candica albicans*. *Microbiology* **143**, 321–330.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. & Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Interscience.

Binder, M., Schanz, M. & Hartig, A. (1991). Vector-mediated overexpression of catalase A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induces inclusion body formation. *Eur J Cell Biol* **54**, 305–312.

Binder, M., Hartig, A. & Sata, T. (1996). Immunogold labelling of yeast cells: an efficient tool for the study of protein targeting and morphological alteration due to overexpression and inactivation of genes. *Histochem Cell Biol* **106**, 115–130.

Bossier, P., Goethals, P. & Rodrigues-Pousada, C. (1997). Constitutive flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of the GTS1 gene, coding for a 'Glo'-type Zn-finger-containing protein. *Yeast* **13**, 717–725.

Fernandes, P. A., Keen, J. N., Findlay, J. B. C. & Moradas-Ferreira, P. (1992). A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim Biophys Acta* **1159**, 67–73.

Fernandes, P. A., Sousa, M. & Moradas-Ferreira, P. (1993). Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast* **9**, 859–866.

Fernandes, P. A., Sena Esteves, M. & Moradas-Ferreira, P. (1995). Characterization of the glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase gene family from *Kluyveromyces marxianus* – Polymerase Chain Reaction-single-strand conformation polymorphism as a tool for the study of multigenic families. *Yeast* **11**, 725–733.

Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. & Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol* **179**, 4992–4999.

Holland, M. J. & Westhead, E. W. (1973). Chemical reactivity at the catalytic sites of aspartic-semialdehyde dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **12**, 2276–2281.

Holmberg, S. (1978). Isolation and characterization of a polypeptide absent from non-flocculent mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res Commun* **43**, 401–413.

Huitorel, P. & Pantolini, D. (1985). Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem* **150**, 265–269.

Kawamoto, R. M. & Caswell, A. H. (1986). Autophosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry* **25**, 656–661.

Meyer-Siegler, K., Mauro, D. J., Seel, G., Weirzer, J., Deriel, J. K. & Sirover, M. A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37 kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8460–8464.

Miki, B. L. A., Poon, N. H., James, A. P. & Seligy, V. L. (1982). Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **150**, 878–889.

Moradas-Ferreira, P., Fernandes, P. A. & Costa, M. J. (1994). Yeast flocculation – the role of cell wall proteins. *Colloids Surf B Biointerf* **2**, 159–164.

Nishihara, H., Toraya, T. & Fukui, S. (1976). Induction of floc-forming ability in brewer's yeast. *J Ferment Technol* **54**, 356–360.

Nishihara, H., Toraya, T. & Fukui, S. (1977). Effect of chemical modification on cell surface components of a brewer's yeast on the floc forming ability. *Arch Microbiol* **115**, 19–23.

Pancholi, V. & Fischetti, V. A. (1992). A major surface protein on group A *Steptococci* is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with a multiple binding activity. *J Exp Med* **176**, 415–423.

Perucho, M., Salas, J. & Salas, M. L. (1977). Identification of the mammalian DNA-binding protein P8 as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J Biochem* **81**, 557–560.

Ram, A. F. J., Wolters, A., Ten Hoopen, R. & Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019–1030.

Robbins, A. R., Ward, R. D. & Oliver, C. (1995). A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO Cells. *J Cell Biol* **130**, 1093–1104.

Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 202–210.

Russell, I., Stewart, G. G., Reader, H. P., Johnston, J. R. & Martin, P. A. (1980). Revised nomenclature of genes that control flocculation. *J Inst Brew* **86**, 120–121.

Sá Correia, I. & van Uden, N. (1982). Effects of ethanol on thermal death and on the maximum temperature for growth of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol Lett* **4**, 805–808.

Saito, K., Sato, S., Shimoi, H., Iefugi, H. & Tadenuma, M. (1990). Flocculation mechanism of *Hansenula anomala*. *Agric Biol Chem* **54**, 1425–1432.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Simon, M., Binder, M., Adam, G., Hartig, A. & Ruis, H. (1992). Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by ADR1, SNF1, and SNF4. *Yeast* **8**, 303–309.

Singh, R. & Green, M. R. (1993). Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**, 365–368.

Stewart, G. G. & Russell, I. (1977). The identification, characterization, and mapping of a gene for flocculation in *Saccharomyces* sp. *Can J Microbiol* **23**, 441–447.

Stewart, G. G., Garrison, I., Goring, T. G., Meleg, M., Pipats, P. & Russell, I. (1976). Biochemical and genetic studies on yeast flocculation. *Kem Kemi* **3**, 465–479.

Stratford, M. & Carter, A. (1993). Yeast flocculation: lectin synthesis and activation. *Yeast* **9**, 371–378.

Straver, M. H., Smit, G. & Kijne, J. W. (1993). Induced cell surface hydrophobicity influences flocculation of brewer's yeast in flocculation assay. *Colloids Surf B Biointerf* **2**, 173–180.

Teunissen, A. W. R. H., Van den Berg, J. A. & Steensma, H. Y. (1993). Physical localization of the gene *Flo1* on a chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 1–10.

Veenhuis, M., van Dijken, J. P., Pilon, S. A. F. & Harder, W. (1978). Development of crystaline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Arch Microbiol* **117**, 153–163.

Vergères, G., Yen, T. S. B., Aggeler, J., Lausier, J. & Waskell, L. (1993). A model system for studying membrane biogenesis: overexpression of cytochrome b_5 in yeast results in marked

proliferation of the intracellular membrane. *J Cell Sci* **106**, 249–259.

Vezinhet, F., Blondin, B. & Barre, P. (1991). Mapping of the *Flo5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* by transfer of a chromosome during cytoduction. *Biotechnol Lett* **13**, 47–52.

Vivier, D., Ratomahenina, R., Moulin, G. & Galzy, P. (1993). Study of physicochemical factors limiting the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J Indust Microbiol* **11**, 157–161.

Wright, R., Bassom, M., D'ari, L. & Rine, J. (1988). Increased amounts of HGM-CoA reductase induce "Karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surrounding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**, 101–114.

Received 4 August 1997; revised 3 November 1997; accepted 7 November 1997.

Como é referido no artigo apresentado, o crescimento celular foi analisado em diferentes temperaturas, fontes de carbono e na presença de determinados solutos. Os resultados obtidos mostraram que em YPD, o mutante não cresce a 40ºC ao contrário das células selvagens. Contudo, se for adicionado cálcio ao meio de cultura, volta-se a observar crescimento das células mutadas. Foi também verificado que o efeito das altas temperaturas no mutante não é um efeito de inibição de crescimento mas sim de capacidade de formar colónias ou crescimento em meio líquido.

Realizaram-se estudos que mostraram que não só o cálcio mas também o magnésio (Figura 8), consegue reverter o efeito das altas temperaturas no crescimento do mutante. As curvas de crescimento nessas condições mostram que o aumento da concentração destes iões no meio levam a um aumento no crescimento das células mutadas. Verificou-se igualmente que o sorbitol e o glicerol (Figura. 9) são osmólitos que podem também reverter o efeito da temperatura. Contudo, estes solutos não são tão eficazes como os iões referidos, já que se verifica terem que estar a concentrações superiores a 200mM e as densidades ópticas atingidas pelo mutante a 40ºC na sua presença, serem bastante inferiores.

A reversão da termossensibilidade das células deficientes em p37, por adição destes outros solutos, indica que não se trata de uma interacção única do cálcio, mas sim de uma estabilização inespecífica da parede celular quando a elevação da temperatura afecta a sua estrutura já enfraquecida pela ausência da proteína. A maior eficiência das partículas carregadas (Ca^{2+} e Mg^{2+}) vem provavelmente de uma maior estabilização celular por neutralização

das cargas negativas superficiais. O efeito global será de qualquer forma o mesmo, ao evitar a lise celular, possibilitando a sobrevivência.

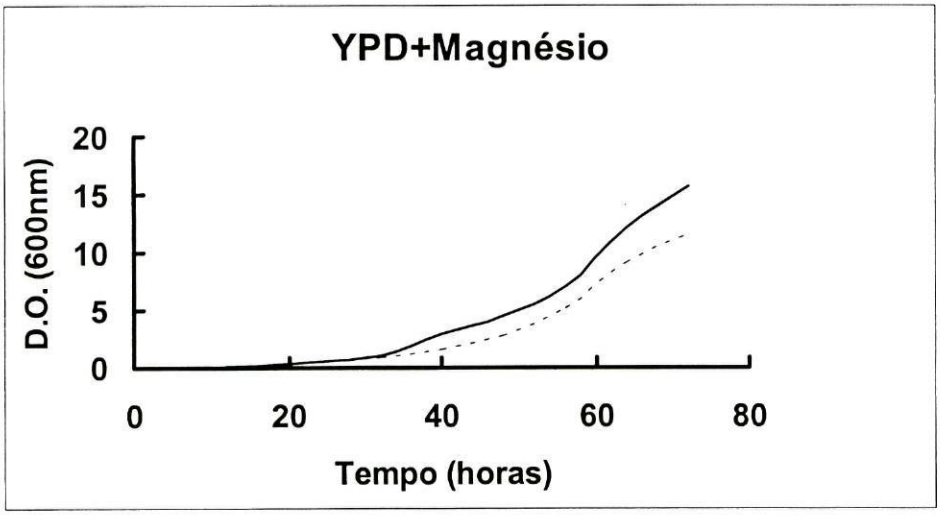


Figura 8: Crescimento de células mutantes *gap1* de *K. marxianus* em meio YPD suplementado com 100 mM (----) e 200 mM de de Mg^{2+} (—), a 40°C.

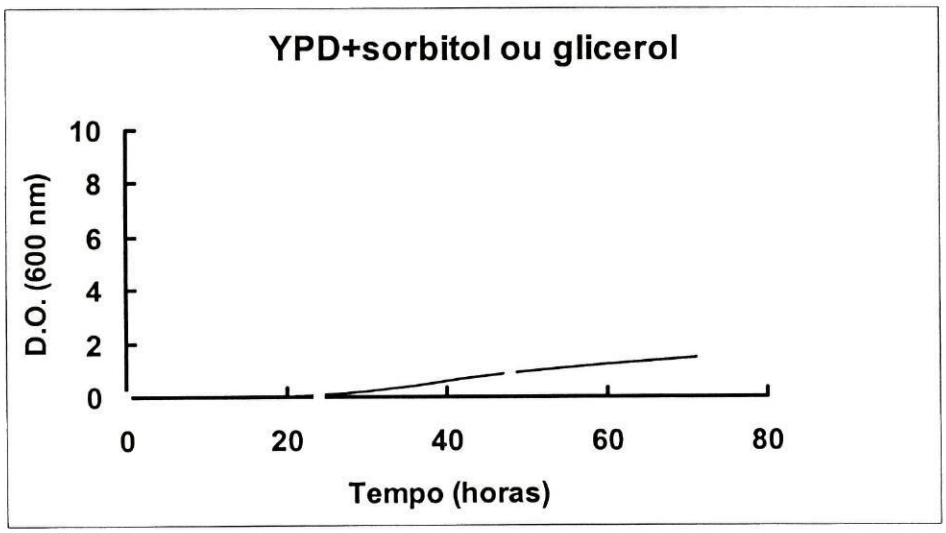


Figura 9: Crescimento de células mutantes *gap1* de *K. marxianus* em meio YPD suplementado com 200 mM de glicerol ou sorbitol, a 40°C.

CAPÍTULO 3

Estudos de super-expressão da p37 em *Saccharomyces cerevisiae*

Conforme foi referido no capítulo 2, a floculação da levedura *K. marxianus* é concomitante com a acumulação de uma proteína (p37), altamente homóloga com a GAPDH, na parede celular (Fernandes *et al*, 1992,1993, 1995). A possibilidade de a p37 estar directamente relacionada com o fenómeno de adesão celular, foi confirmada pelos resultados obtidos com o mutante *gap1*, deficiente na síntese da proteína p37 e incapaz de flocular (Falcão Moreira *et al*, 1998). Com o objectivo de explorar mais profundamente o papel da p37 como potencial floculina, realizou-se a transformação de uma estirpe não floculante de *S. cerevisiae*, esperando obter um fenótipo floculante, o que foi confirmado. Estratégia semelhante foi aliás igualmente utilizada para demonstrar a participação da proteína Flo1p no fenómeno de floculação (Teunissen *et al*, 1993). Os resultados referentes à construção e estudo do transformante de *S. cerevisiae* são mostrados no seguinte artigo: a possibilidade da p37 induzir a adesão celular, influenciar a estrutura da parede e a actividade enzimática numa estirpe que não a *K. marxianus* é aqui evidenciada. Adicionalmente, é comprovado o endereçamento da proteína para a parede, apesar da ausência de um sinal hidrófóbico característico de uma proteína de secreção. Caso idêntico foi já descrito para outras enzimas glicolíticas encontradas na superfície celular, como por exemplo o da 3-fosfoglicerato cinase (Alloush *et al*, 1997).

Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by transformation with the *GAP1* gene from *Kluyveromyces marxianus*

R. Falcão Moreira[1,3], F. Ferreira da Silva[1], P.A. Fernandes [2], and P. Moradas Ferreira[1,4]

[1] Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) and [2] Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo and [3] Instituto Superior de Ciências da Saúde 4180 Paredes and [4] Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal

Key words:

flocculation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, cell wall proteins, GFP

Abstract

A non-flocculent strain of *Saccharomyces cerevisiae* was transformed with the *GAP1* gene which encodes p37, a GAPDH-like protein present in the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* flocculent cells. The transformed cells were characterised with respect to flocculation behaviour, morphology, growth, cell wall integrity and GAPDH activity. A flocculent phenotype was acquired by the transformed cells, showing a behaviour in respect to flocculation/deflocculation very similar to *K. marxianus*. The presence of p37 in the cell wall was assessed by immunoprecipitation of biotinylated cell wall proteins and an accumulation of p37 in the cell wall of transformed cells was observed. This result was confirmed by studies using a chimeric protein

resulting from fusing the protein with a yeast-enhanced green fluorescent protein – yEGFP (Cormack *et al*, 1997). The recombinant protein was localised mainly in the cell wall of the transformed strain, although the presence of p37 in the cytosol - subsequently to be targeted to the cell wall – is indicated by an increase in GAPDH activity. Calcofluor white sensitivity tests indicated that the cell wall structure is affected by p37. These results provided further evidence of p37 function regarding flocculation and that although lacking a N-terminal signal peptide the p37 is targeted to the cell wall.

1. Introduction

Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is generally reported as a reversible process of cell aggregation that involves protein-carbohydrate interactions between specific lectin like surface proteins and the cell wall mannan (Teunissen and Steensma, 1995); this model is supported by the fact that protein denaturation and the presence of sugars can influence the flocculation ability (Statford and Assinder, 1991; Sieiro *et al*, 1995, 1997).

The complexity of cell wall architecture and composition, as well as its adaptation to culture and environmental conditions (reviewed in Kapteyn *et al*, 1999) accounts for the fact that the underlying molecular mechanisms of flocculation are still unclear. So far, thirty three genes have already been reported to be involved in flocculation or cell aggregation (Teunissen and Steensma, 1995), and different putative flocculins have been identified (Stewart *et al*, 1976; Holmberg, 1978).

Three dominant flocculation genes have been found by classical genetics: *FLO1*, *FLO5* and *FLO8* (Johnston and Reader, 1982, 1983;

Yamashita and Fukui, 1983; Stratford, 1991) and recently, two more possible flocculation dominant genes (*FLO9* and *FLO10*) were identified in *S. cerevisiae* (Teunissen and Steensma, 1995). These genes, together with *FLO1*, *FLO5* and *FLO8*, are now considered the "flocculin family" and encode for proteins with high degree of homology (Bossier *et al*, 1997, Teunissen and Steensma, 1995). In 1996, Lo and Draginis, reported a new flocculin, encoded by *FLO11*, a yeast gene related to *STA* genes and later Sieiro *et al* (1997) cloned a flocculation-conferring gene (*FLO2*) that was able to complement the *flo1* mutation.

Although the flocculation data reported above has been obtained using *S. cerevisiae*, there are several reports of similar works done with other yeast strains such as *Hansenula anomala* (Saito *et al*, 1990) and *K. marxianus* (Teixeira *et al*, 1989, Fernandes *et al*, 1992, 1993), leading to the identification of putative flocculins.

When *K. marxianus* is flocculent, a protein - p37 - accumulates in the cell wall, corresponding to 11% of the total wall proteins released by SDS, suggesting that this protein is involved in the interaction between adjacent cells leading to aggregation (Fernandes *et al*, 1992, 1993). p37 purification and characterisation revealed a high identity to cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Fernandes *et al*, 1992, 1995). Although it seems surprising to find a GAPDH like protein in the cell wall, a similar situation was described by Alloush *et al* (1997) about 3-phosphoglycerate kinase and by Gil *et al* (1998) about GAPDH itself, in *Candida albicans*.

The correlation of p37 with flocculation was supported by the fact that a *K. marxianus* mutant, deficient in the synthesis of p37, is no longer able to flocculate (Falcão Moreira *et al*, 1998).

Although p37 has been localised in the cell wall of *K. marxianus* (Fernandes *et al*, 1992, 1993), the sequencing data of the *GAP1* gene (Fernandes *et al*, 1995) revealed that the protein has no N-terminal leader sequence targeting it to the endoplasmic reticulum.

The present paper reports on the transformation of a non-flocculent strain of *S. cerevisiae* with the *GAP1* gene from *K. marxianus*. The results provide further evidence that p37 function is correlated with flocculation phenotype since the transformant cells acquired the ability to flocculate. Furthermore, we show that p37 is incorporated in the cell wall of *S. cerevisiae,* although lacking a known targeting sequence. The role of the protein as a flocculin in *K. marxianus* and its capacity of inducing cell aggregation is discussed in the present work, providing evidence that mechanisms leading to flocculation of non-conventional yeast can be used to induce flocculation of *S. cerevisiae*.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and plasmids

The yeast strain of *S. cerevisiae* W303 1A (*leu*2-3,112 *ura* 3-1, *trp*1-1, *his*3-11,15, *ade*2-1, *can*1-100) was used in this study. The *E. coli* strain employed was XL1 blue. The vector pYES2 is an autonomous shuttle vector containing the ampicilin resistance gene, the *URA3* gene and the *GAL1* promoter induced by galactose (Fig 1). The vector pGAPKm1 is a pBS ^{TD} KS + (Stratagene) derived vector containing the coding region of *K. marxianus GAP1* gene which encodes the p37 protein. pYPD-ADH-yEGFP3 is a pYPB-ADH-derived vector obtained by insertion of the yEGFP3 gene after the *C. albicans*

ADH1 promoter. The *ADH* promoter is a strong and constitutive yeast promoter and *yEGFP* is an EGFP gene codon-optimised for yeasts (Cormack *et al*, 1997)

2.2. Cell growth conditions

E. coli cells were grown in LB (1% sodium chloride, 1% bactotryptone and 0.5% yeast extract) and transformed *E. coli* cells were grown in LB supplemented with ampicilin (50 μg/ml) for selection.

S. cerevisiae were grown in YPD (2% glucose, 2% bactopeptone, 1% yeast extract) or in minimal medium (2% galactose, 0.67% yeast nitrogen base) supplemented with leucine (0.008%), histidine (0.004%), tryptophane (0.004%), adenine (0.004%) and for wild type cells, uracil (0.004%).

2.3. PCR

The PCR reactions were performed using 40 ng of plasmids and PCR primers:

X1 (5'AAAGGATCCAGATGGTTTCTATTGCTAT3'),

X2 (5'GGAGCATGCCTAAGCAACGTGTTCGACCA3'):

Y1 (5'TTTTAAAAGAGATCTATGGTTTCTATTGCTA3')

Y2 (5'AGGAAATAACATCGATAGCAACGTGTTC3')

(The positions of the primers are shown in Fig1).

A final volume of 100 μL was used and the conditions were as follows: 1 mM of each primer, 100 mM Tris/HCL (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTP's. One unit of AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer) was added after an initial denaturation step of 10 minutes at 94° C followed, in PCR_X, by 30 cycles of 94° C for 40 seconds, 60° C for 1 minute and 72° C for 1 minute and,

in PCR_Y by 30 cycles of 94° C for 40 seconds, 62° C for 1 minute and 72° C for 2 minutes. The PCR products were analysed on a 0.8 % agarose gel.

2.4. Construction of p37 expression vectors

For the overexpression of p37 in *S. cerevisiae*, a pYES2 derived expression vector was constructed (Fig1). *GAP1* gene encoding p37 was amplified by PCR reaction of the plasmid pGAPKm1 with primers X1 and X2. Since these primers included a *Bam*HI (X1 primer) and a *Sph*I (X2 primer) restriction sites, the PCR product was digested with these enzymes and subsequently inserted in the *Bam*HI/*Sph*I digested pYES2 vector. The new vector was designated pY37.

For the expression of the chimeric protein p37-yegfp, the *GAP1* gene was amplified by PCR reaction of the plasmid pGAPKm1 with primers Y1 and Y2. Since these primers included a *Bgl*II (Y1 primer) and *Cla*I (X2 primer) restriction sites, the PCR product was digested with these enzymes and subsequently inserted into the pYPD-ADH-yEGFP3 vector. The *GAP1* gene was this way inserted in front of the ADH promoter, before the yEGFP3 gene and in frame with the last. The new vector was designated pA37G (Fig 1)

Plasmids were prepared using the PROMEGA "Minipreps DNA Purification System".

2.5. Bacteria transformation

E. coli transformation was performed using the $CaCl_2$ method (Ausubel *et al*, 1987). Transformed cells were plated in LB medium with ampicilin (for selection), solidified with 1.5% bactoagar.

2.6. Southern Blot and hybridisation

The DNA (plasmids or PCR products) was separated in a 0.8% agarose gel and transferred onto Hybond-N nylon membrane (Amersham) under alkaline conditions (Sambrook *et al*, 1989). The DNA was covalently bound to the membrane by UV irradiation and subsequently pre-hybridised for 1 hour at 65ºC with 6XSSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS and 20 mg herring sperm DNA ml^{-1}. The blot was hybridised in the same solution at 65º C for 16 hours using as probe the ^{32}P-labelled PCR fragment obtained from the amplification of the initial part (350 pb) of the coding region of *GAP1* with primers A (5'ATTCGCTCATTCAACTGGTTTCGG3') and B (5'AGGCAGTCAGATGATGCTTTTATG3') (the positions of primers A and B are shown in Fig 1) and using as template the plasmid pGAPKm1.

2.7. Yeast transformation

S. cerevisiae cells were transformed by the electroporation method (Ausubel *et al*, 1987). Transformed cells were plated in minimal medium (without uracil, for selection) supplemented with sorbitol 1M, leucine, histidine, tryptophane, adenine and solidified with 1.5% bactoagar.

2.8. Quantification of biomass

Aliquots (50 ml) of cell culture were filtered under vacuum using a pre-weighed filter (ME 25/41 ST membrane filter, Schleicher & Schuell). The cells were washed twice with sterile water and the filter was dried at 80° C for 24 hours. The filter was cooled in a dessicator and weighed to determine the amount of biomass present, expressed in g/L.

2.9. Flocculation measurements

A preculture was used to inoculate a culture at a concentration of $2X10^6$ cells/ml in an Erlenmeyer flask plugged with cotton wool on a shaker at 100 rpm. Cells were grown during 3 days at 26° C. The cells were harvested at the stationary phase by centrifugation (2500g, 4° C, 5 minutes), washed four times with distilled water and finally suspended at such a concentration that would give an absorbance of 1.5 at 640 nm. The test tubes, containing the cell suspension, were sealed and rotated upside down on a mechanical device during 15 minutes. After agitation, the tubes were allowed to stand undisturbed for 15 minutes and 2 ml of the suspension were pipeted and its absorbance measured at 640 nm (adapted from Kihn *et al*, 1988).

2.10. Imunoprecipitation of biotinylated cell wall proteins

2.10.1. Labelling of yeast cell wall proteins

Yeast cells were grown in 100 ml of YPD medium until an $O.D._{600}$ of 4, centrifuged and washed twice with 4 ml of K-phosphate buffer (50 mM, pH 8). Cells were ressuspended in 2 ml of K-phosphate buffer containing 1 mg of Sulfo-NHS-LC-Biotin reagent (sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate;

Pierce, Rockford, USA), incubated for 90 minutes on ice, centrifuged and washed twice with 4 ml of 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 + 50 mM $MgCl_2$ and finally with 4 ml of 50 mM K-phosphate buffer pH8 (Mrsa *et al*, 1997).

2.10.2. Isolation of cell wall proteins

Cell walls were obtained by mechanical disruption of the cells with glass beads, followed by centrifugation at 3000g. Cell walls were washed 5 times with K-phosphate buffer (50 mM pH 8).

The cell wall proteins were solubilized at 100°C for 5 minutes with sodium dodecyl sulphate (SDS)-sample buffer (0.625 M Tris, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol).

Protein concentration was determined using the "BCA Protein Assay Reagent Kit" (Pierce Kit #23225).

2.10.3. Immunoprecipitation

The anti-p37 serum was produced in rabbit using recombinant protein expressed in *E. coli*.

The protein extract was incubated with p37 antiserum (dilution 1: 500) for 1 hour at 37° C and overnight at 4° C in 20 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycolate and 0.1% methionine. Protein A-Sepharose (50 μg) was added and incubated 2 hours at 4° C. The immunocomplex was pelleted by centrifugation and washed four times with 10 mM Tris/HCl, pH 7.5. Immunoprecipitates were dissociated with SDS-sample buffer for 5 minutes at 60° C and 1 minute at 95° C.

2.10.4. Electrophoresis and blotting

The proteins were then analysed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12.5%), using the method described by Laemmli (1970). To visualise immunoprecipitated biotin-labelled proteins, they were blotted to nitrocellulose membranes, which were then incubated for 1 hour in 10 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 4% bovine serum albumin (BSA), and subsequently for 1 hour in the same buffer with 1% BSA and Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (dilution 1:5000), washed three times with the same buffer and developed using the ECL kit (Amersham) (Mrsa *et al*, 1997).

2.11. Confocal microscopy

A preculture was used to inoculate a culture at a concentration of $2X10^6$ cells/ml in an Erlenmyer flask plugged with cotton wool on a shaker at 200 rpm. Cells were grown at 26° C until they reached the stationary phase. All preparations were observed with a BioRad MRC 600 confocal laser microscope.

2.12. Calcofluor white sensitivity tests

These were performed according to the method described by Ram *et al* (1994), with the following modifications: cells were incubated in 5 ml minimal medium and incubated at 26° C until an O.D. (640 nm) of 8 was reached. Dilutions of 10, 100, 1000 and 10 000 times were prepared and 5 μL of each were spotted on a YPD plate containing 50 μg calcofluor white ml^{-1}. The plates

were incubated at 26° C and growth was evaluated after 2 days incubation (F.M. Klis, personal communication).

2.13. Enzyme assays

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity was estimated using the method described by Holland and Weshead (1973).

3. Results

3.1. pY37 expression vector

Several lines of evidence indicate that the accumulation of p37 (encoded by *GAP1* gene) in the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* is correlated with flocculation, namely from the fact that *gap1* mutant no longer exhibit a flocculent phenotype and the absence of p37 affects the cell wall structure (Falcão Moreira *et al*, 1998). To determine whether the presence of *K. marxianus* p37 protein in *Saccharomyces cerevisiae* would produce a flocculent phenotype, a vector for overexpressing p37 was constructed. This was performed by insertion of the ORF of *GAP1* (1 kb) into the multicloning site of pYES2 vector, under the control of *GAL1* promoter (Fig 1). To confirm the subcloning of the *GAP1* gene in the pYES2 vector, the plasmid was prepared from *E. coli* and screened by PCR and Southern Blotting. The PCR product (obtained using primers X1 and X2) was separated on a agarose gel 0.8%, revealing the DNA fragment of the expected size of 1.2 kb which confirmed the subcloning of *GAP1* into the expression vector. To obtain further confirmation of the insertion, plasmid and the PCR product were hybridised with a ^{32}P-labelled probe specific for the

coding region of *GAP1*. Positive bands were obtained in both cases indicating the presence of the O.R.F. (open reading frame) encoding p37 (Fig 2 and 3).

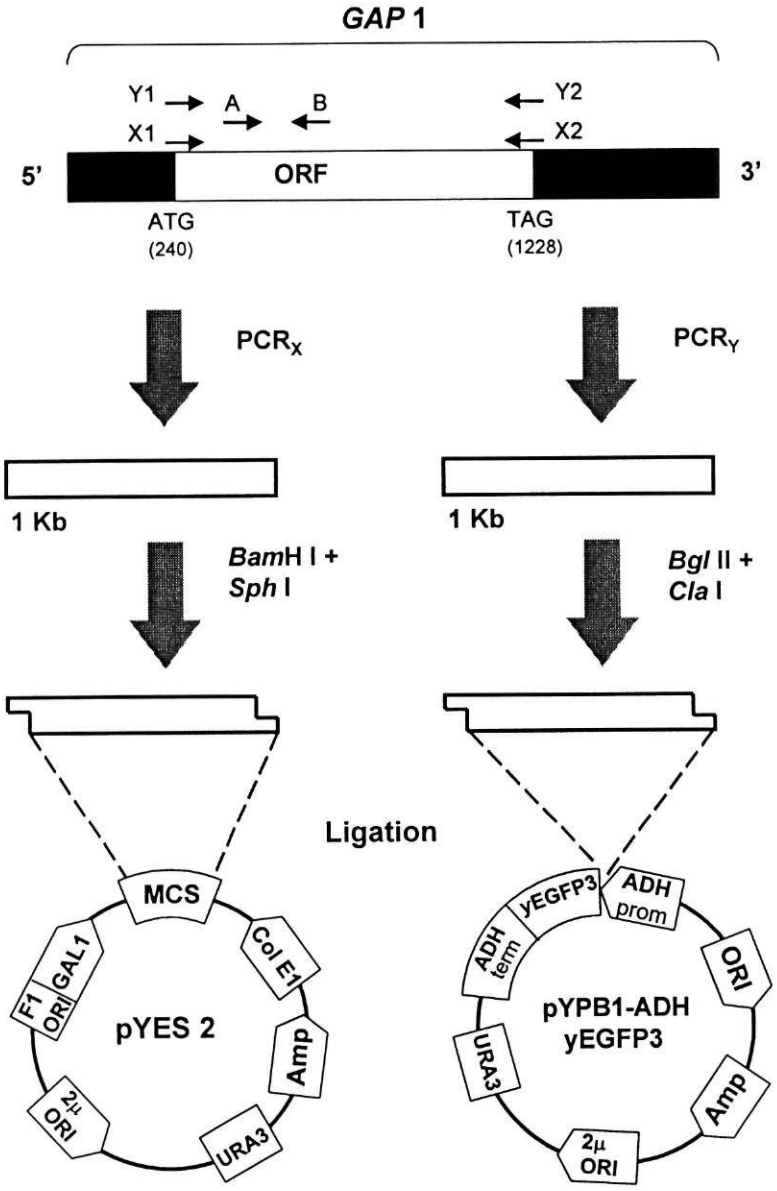


Figure 1.

PCR $_x$:

Construction of p37 expression vector by insertion of *GAP1* gene encoding p37 in the multicloning site of pYES2. The amplification of *GAP1* gene with primers X1 and X2 resulted in a PCR product that after digestion with *Bam*HI and *Sph*I was ligated with the *Bam*HI/*Sph*I digested pYES2 vector

PCR$_y$:

Construction of a p37-yEGFP expression vector by insertion of *GAP1* gene encoding p37 in front of the *ADH* promoter and in frame with yEGFP, present in pYPB1-ADH-YEGFP. The amplification of GAP1 gene with primers Y1 and Y2 resulted in a PCR product that after digestion with *Bgl*II and *Cla*I was ligated with the *Bgl*II/*Cla*I digested plasmid.

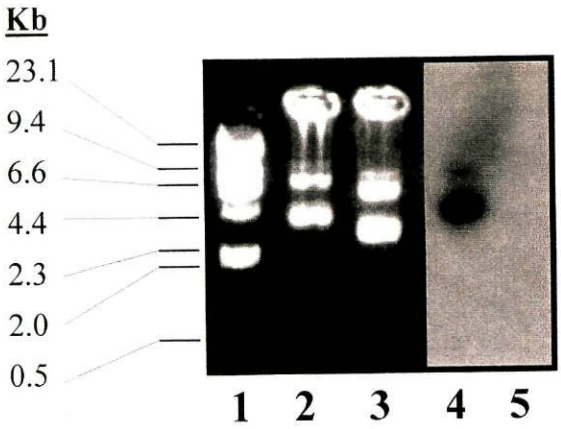


Figure 2.

Gel electrophoresis of plasmid pY37 (lane **2**) and plasmid pYES2 (lane **3**). (lane **1**: *Hin*dIII digested λ DNA size markers). Southern analysis of the plasmids: pY37 (lane **4**) and pYES2 (lane **5**).

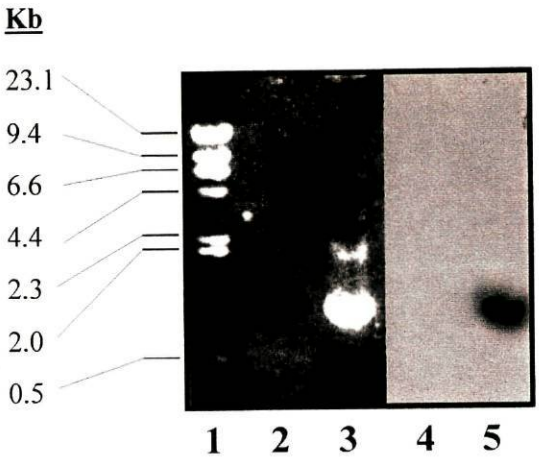


Figure 3.

PCR products obtained using X1 and X2 primers designed for the amplification of the GAP1 coding region. Lanes: **1**, *Hin*dIII digested λ DNA size markers; **2,** template: pYES2; **3**,. template: pY37. Southern analysis of the PCR products: positive bands were revealed in the lane concerning the constructed plasmid pY37 (lane **5**), in contrast to the one referring to pYES2 (lane **4**).

3.2. Characterisation of the *Saccharomyces cerevisiae* transformant

S. cerevisiae cells were transformed by electroporation, either with the vector or with the vector with the insert, and the effects of *GAP1* overexpression in *S. cerevisiae* were characterised regarding flocculation behaviour, growth, biomass, cell wall integrity and GAPDH activity. All cells were grown in minimal medium supplemented with galactose.

3.2.1. Flocculation behaviour

The transformed *S. cerevisiae* acquired a stable flocculation phenotype, presenting an increase of about 60% of cell aggregation, comparatively to *S. cerevisiae* wild type cells or transformed with the empty vector. Considering 100% the percentage of cells in suspension in the beginning of the flocculation measurements, the pY37 transformed *S. cerevisiae* had only 15 % of cells in suspension when grown in galactose rich medium (Tab1). Deflocculation of transformed cells was only achieved with high concentration of EDTA (250 mM) and high mechanical agitation (above 200 rpm).

		TIME	
		5'	15'
STRAIN	W	90	68
	G	40	13

Table 1.

Percentage of cells still in suspension after 5 and 15 minutes of rest in the flocculation measurements. **W**: wild type *S. cerevisiae* cells; **G**: transformed *S. cerevisiae* (Cells grown in minimal medium with galactose).

3.2.2. Cell growth

Cell growth was estimated at 26° C and in minimal medium (Fig. 4). The results indicated that growth of transformed cells had a longer lag phase, followed by a shorter exponential phase that led to relatively higher final biomass.

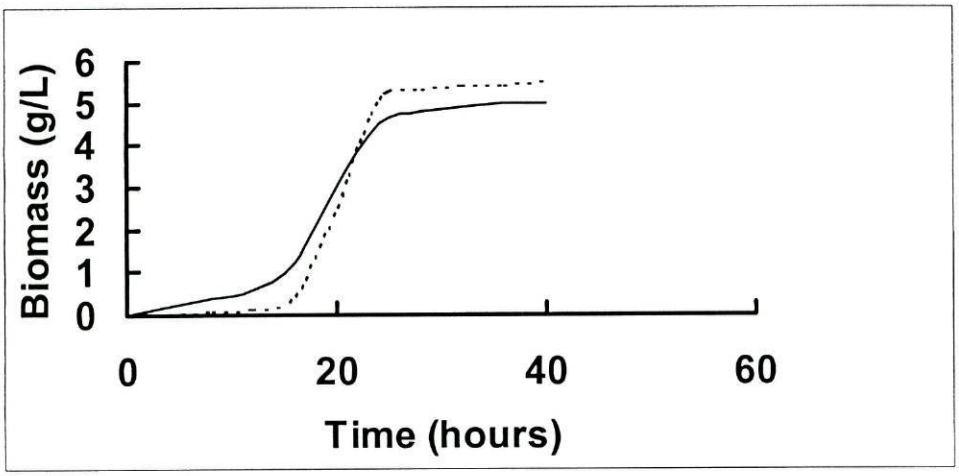


Figure 4.

Growth of *S. cerevisiae* wild type (—) and transformed *S. cerevisiae* (- - -) in minimal medium at 26° C. Growth is expressed in biomass in relation to the time of growth of cells.

3.2.3. Biomass

The results obtained for biomass showed that the dry weight values of the transformed *S. cerevisiae* cells were 18% higher than those of wild type cells at equivalent O.D. (640 nm) values (Fig 5).

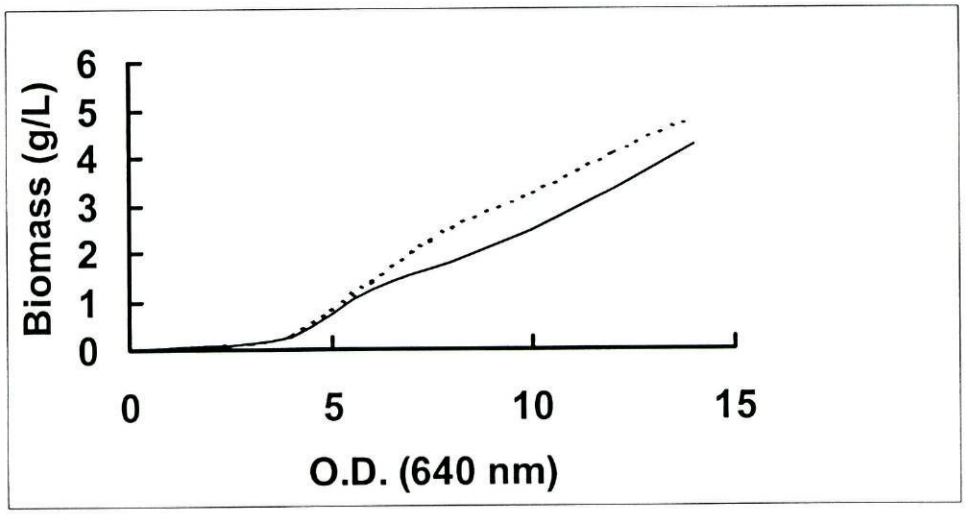


Figure 5.

Wild type *S. cerevisiae* cells biomass (—) and transformed *S. cerevisiae* cells biomass (----) in relation to cell $O.D_{640\ nm}$. Biomass was measured in dry weight.

3.2.4. Effect of ion concentration on flocculation

The effect of Ca^{2+} was analysed and the flocculation measurements indicated that in the presence of the ion, cell aggregation was increased and this effect is dependent to the calcium concentration (5, 50, 150, 200 mM) - Tab 2.

Calcium Concentration / mM	Flocculacion rate increase / %
5	20
50	24
150	40
200	47

Table 2.

Effect of calcium concentration on flocculation.

3.2.5. GAPDH activity

The results obtained in *K. marxianus* revealed that p37 contributes to the total GAPDH activity (Falcão Moreira *et al*, 1998). Therefore the estimation of the total enzyme activity in the *S. cerevisiae* transformant was performed. Cytosolic GAPDH activity in the transformed *S. cerevisiae* was about 30 % higher compared to wild type cells, which indicates that the p37 protein is synthesised in an enzymatic active form in these cells (Tab 3).

S.cervisiae	GAPDH activity ($min^{-1}(mg\ total\ protein)^{-1}$)
Wild type	0,62
Transformant	0.80

Table 3.

Assay of GAPDH activity in wild type and transformed *S. cerevisiae*.

3.3. p37 cellular localisation

3.3.1. Imunoprecipitation of biotinylated cell wall proteins

S. cerevisiae cell wall proteins were labelled with Sulfo-NHS-LC-Biotin, immunoprecipitated with anti-p37 serum and visualised *via* a streptavidin-mediated colour reaction. Using a biotinylation reagent that does not cross the plasma membrane of the cell, we were able to eliminate cytosolic contaminations in the protein extract. The results obtained showed the presence of p37 in the cell wall of transformed cells whereas no protein could be detected in the wild type cell walls (Fig 6).

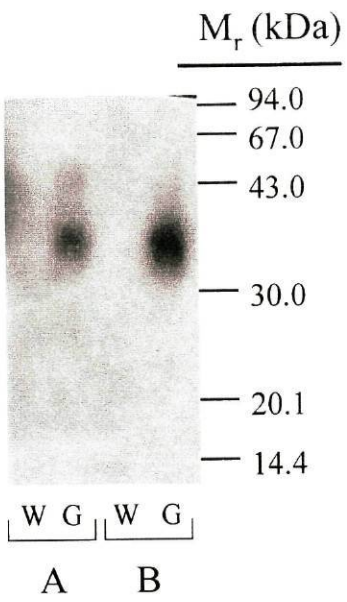


Figure 6.

Immunoprecipitation of biotinylated cell wall proteins (**A** – 50 μg of total protein; **B** - 150 μg of total protein) of wild type *S. cerevisiae* (**W**) and transformed (**G**) cells.

3.3.2. Localisation of p37 using a fusion with green fluorescent protein

To determine p37 localisation inside the cell, this protein was fused with yegfp. For that purpose the *GAP1* ORF (expressing p37) was inserted into the shuttle vector pYPB-ADH-yEGFP3 between the ADH promoter and the *yEGFP* ORF (Fig 1). After transforming *S. cerevisiae* cells with this vector - pA37G - we were able to locate *in vivo* the fusion protein p37-yegfp by confocal microscopy. As can be observed in figure 7, fluorescence is detected in the cell wall of the transformant cells expressing p37-yegfp, in contrast to control cells transformed with pYPB-ADH-yEGFP3. This accumulation of p37-yegfp seems not to be at random, as patches of fluorescence appear throughout the cell wall.

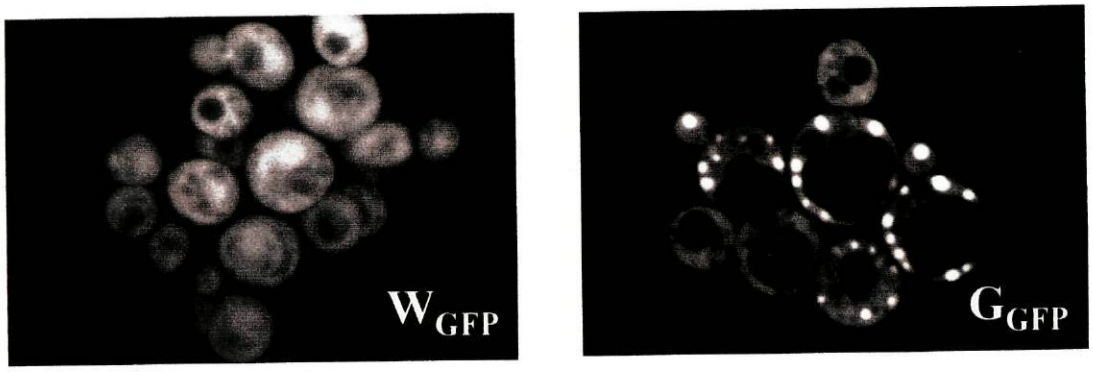


Figure 7.

Detection of p37-yEGFP using confocal microscopy:

W_{GFP} - W303 1A transformed with pYPB-ADH-yEGFP3

G_{GFP} - W303 1A transformed with pA37G

3.4. Cell wall integrity

3.4.1. Calcofluor white sensitivity

Alterations in the cell wall structure may result in a different resistance to calcofluor white, and indeed the results. (Figure 8) show the transformed *S. cerevisiae* cells exhibiting higher resistance to the drug, compared with the effect either on wild type cells or transformed with the vector.

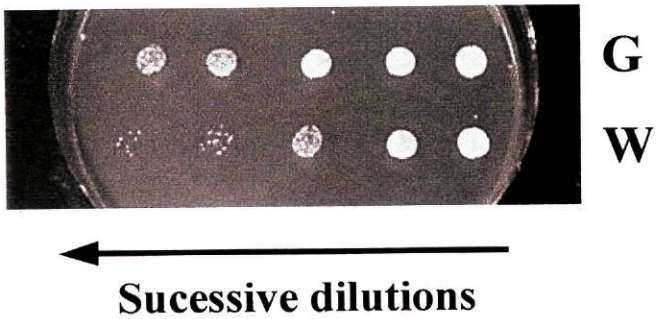


Figure 8.

Wild type (**W**) and transformed (**G**) *S. cerevisiae* cells grown on YPD agar supplemented with calcofluor white (100 μg/mL).

4. Discussion

In *K. marxianus*, a protein, p37, has been associated with flocculation, as it is accumulated in the cell wall of cells grown in culture conditions that induce flocculation. Aiming at elucidating the role of p37 as a flocculin, the gene *GAP1* was introduced and over-expressed in a non-flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. The p37 expression vector was constructed, inserting the *GAP1* open reading frame into the multicloning site of pYES2 vector, under the control of the *GAL1* promoter (Fig 1). The transformed cells acquired a flocculent phenotype showing a behaviour in respect to flocculation/deflocculation very similar to *K. marxianus*, and the flocculation degree is dependent on the presence of calcium in the culture medium. However, in *K. marxianus*, the calcium is essential to promote flocculation, but in the transformed *S. cerevisiae* cells there is only a correlation between the amount of calcium present and the degree of flocculation (Tab2). The role of calcium in the aggregation of cells mediated by p37 is most likely to promote the contact and the establishment of interactions between cells, by neutralising negative charges at the surface of the cell. The differences of composition/structure between cell walls of both strains can justify the effect of calcium in the flocculation behaviour.

Imunoprecipitation of biotinylated cell wall proteins showed an accumulation of p37 in the cell wall of transformed cells whereas no protein could be detected in the wild type cell walls (Fig 6). Confirmation of the presence of p37 in the cell wall, was provided when p37 was fused with yegfp, as fluorescence is detected in the cell wall of the transformant cells expressing the chimeric protein in contrast to control cells transformed with pYPB-ADH-yEGFP3 (Fig 7). These results show that p37 incorporation in the cell wall

occurs independently of the absence of a classical targeting signal. The mechanisms involved in its secretion have not yet been elucitated, as it also happens for various glycolytic enzymes, found in the cell wall of *C. albicans* (Chaffin *et al*, 1998) or secreted by *Saccharomyces cerevisiae* (Pardo *et al*, 1999)

The presence of p37 in the cell wall affects somehow the cell wall structure, as it is suggested by the calcofluor white (CFW) sensitivity tests: the transformed cells, when over-expressing p37, are more resistant to CFW (Fig 8). In contrast, *K. marxianus gap1* mutant cells are more sensitive to CFW than the wild type (Falcão Moreira *et al*, 1998). The association of a GAPDH like protein with a yeast cell wall has also been reported by Gil *et al* (1998) and it was shown that this protein could interact with laminin and fibronectin. Beside cell wall stability, p37 overexpression influences the behaviour of *S. cerevisiae* cells in respect to other parameters. The growth curve of the transformed cells exhibit a longer lag phase, and these cells present higher values of biomass (Fig 4 and 5), probably due to changes of the cell size, as transformed *S. cerevisiae* cells are larger than the wild type. An altered morphology can be expected when a cell is genetically manipulated (Veenhuis *et al*, 1978; Wright *et al*, 1988; Binder *et al*, 1991; Simon *et al*, 1992; Vergéres *et al*, 1993).

The enzymatic nature of p37 was confirmed as GAPDH activity in the transformed cells was about 30% higher compared to the one registered for the wild type cells (Tab3), which is consistent with the results obtained with the *gap1* mutant (Falcão-Moreira *et al*, 1998).

In summary, there is a net correlation between the presence of p37 in the cell wall and the ability of cells to flocculate (either of *K. marxianus* or *S.*

cerevisiae). The ubiquity of GAPDH has been the subject of several reports in bibliography (Huitorel and Pantolini, 1985; Kawamoto and Caswell, 1986; Allen *et al*, 1987; Meyer-Siegler *et al*, 1991; Pancholi and Fischetti, 1992; Singh and Green, 1993; Robbins *et al*, 1995; Gil-Navarro *et al*, 1997) and the results presented in this paper clearly show that this GAPDH like protein (p37) has other functions than its glycolytic enzymatic activity, as its overexpression influences growth, biomass yield, cell wall stability, cell morphology and aggregation. The facts that p37 can induce cell aggregation in *Saccharomyces*, although it is a *Kluyveromyces* protein, and that there is no description of a *Saccharomyces* flocculin similar to p37, show that the protein should mediate a mechanism that is specific for a non-conventional yeast as *K. marxianus* but that can be used as a "tool" to induce flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Ackowledgements

This work was supported by PRAXIS 2/2.1/BIO/1052/95, R. Falcão-Moreira thanks PRAXIS for grant BD/4551/94 and F. Ferreira-da-Silva thanks PRAXIS for grant BIC/4695/96. Alistair J. P. Brown (University of Aberdeen, U.K.) kindly provided the pYPB1-ADH-yEGFP3 plasmid. We thank António Castro for his input into the anti-p37 serum production. We also wish to thank Professor Cláudio Sunkel and Tatiana Moutinho (Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto) for kindly help with the confocal microscopy.

References

Allen, R. W., Trach, K. A. and Hoch, J. A. (1987). Identification of the 37 kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as GAPDH. *J. Biol Chem* **262,** 649 - 653

Alloush, H. M., Lopez-Ribot, J. L., Masten, B. J. and Chaffin, W. L. (1997). 3-Phosphoglycerate kinase: a glycolitic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 321 - 330

Ausubel, F., Brent, R., Kinston, R., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. and Struhl, K. (1987). *Current protocols in Molecular Biology*, New York: Wiley Interscience

Binder, M., Schanz, M. and Hartig, A. (1991). Vector-mediated overexpression of catalase A in the yeast Saccharomyces cerevisiae induces inclusion body formation. *Eur J Cell Biol* **54**, 305 - 312

Bossier, P. Goeethals, P. and Rodrigues-Pousada, C. (1997). Constitutive flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of the *GTS1* gene, coding for a 'Glo'-type Zn-finger-containing protein. *Yeast* **13**, 717 – 725

Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 130-180

Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A. R., Falkow, S. and Brown, A. J. P. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 303-311

Falcão Moreira, R., Fernandes, P. A. and Moradas-Ferreira, P. (1998). *Kluyveromyces marxianus* flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37. *Microbiology* **144**, 681 - 688

Fernandes, P. A., Keen, J. N., Findlay, J. B. C. and Moradas Ferreira, P. (1992). A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is

induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim Biophys Acta* **1159**, 67 - 73

Fernandes, P. A., Sousa, M. and Moradas-Ferreira, P. (1993). Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast* **9**, 859 - 866

Fernandes, P. A., Sena-Esteves, M. and Moradas-Ferreira, P. (1995). Characterisation of the glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase gene family from *Kluyveromyces marxianus* - Polymerase chain reaction- single- strand conformation polymorphism as a tool for the study of multigenic families. *Yeast* **11**, 725 - 733

Gil - Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. and Gozalbo, D. (1998). The glycolitic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Candida albicans is a surface antigen. *J Bacteriol* **179**, 4992 - 4999

Holland, M. J. and Westhead, E. W. (1973). Chemical reactivity at the catalytic sites of aspartic semialdehyde dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **12**, 2276 - 2281

Holmberg, S. (1978). Isolation and characterization of a polypeptide absent from non-flocculent mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun*, **43**, 401- 413

Huitorel, P. and Pantolini, D. (1985). Bundling of microtubules by glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur J Biochem* **150**, 265 - 269

Johnston, J. R. and Reader, H. P. (1982). Genes conferring and suppressing flocculation in brewing and laboratory strains of *Saccharomyces*. *Proc 11 th Int.Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology*, Montpelier, p.124

Johnston, J. R. and Reader, H. P. (1983). Genetic control of flocculation. In Spencer, J.F.T., Spencer, DM and Smith, A.R.W. (Eds.), *Yeast Genetics, Fundamental and applied Aspects*. Springler-Verlag, New-York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, pp 205 - 224

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall *Biochim Biophys Acta* **1426**, 373 - 383

Kawamoto, R. M. and Caswell, A. H. (1986). Autophosphorylation of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry* **25,** 656 – 661

Kihn, J. C., Masy, C. L., Mestdagh, M. M. and Rouxhet, P. G. (1988). Yeast flocculation: factors affecting the measurements of flocculence. *Can J Microbiol* **34 (6)**: 779 – 781

Kramer, R. [a], Tomchak, L., Ruben, S. M. and Rosen, C. A. (1990). Expression of the HTLV-1 Tax transactivator in yeast: correlaction between phenotypic alterations and tax functions in higher eukaryotes. *Aids res. Hum. Retroviruses* **6**, 1305 - 1309

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lo, W. S. and Draginis, A. M. (1996). *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* **178**, 7144 - 7151

Meyer-Siegler, K., Mauro, D. J., Seel, G., Weirzer, J., Deriel, J. K. ans Sirover, M. A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37 kDa subunit of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8460 - 8464

Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M. and Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1154

Pancholi, V. and Fischetti, V. A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldeyde - 3 - phosphate dehydrogenase with a multiple binding activity. *J Exp Med* **176**, 415 – 423

Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sánchez, M., Gil, C. and Nombela, C. (1999). Two dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**, 459-472

Ram, A. F.J., Wolters, A., TenHoopen, R. and Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019 - 1030

Robbins, A. R., Ward, R. D: and Oliver, C. (1995). A mutation in glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J. Cell Biol* **130**, 1093 - 1104

Saito, K., Sato, S., Shimoi, H., Iefugi, H. and Tadenuma, M. (1990). Flocculation mechanism of *Hansenula anomala*. *Agric Biol Chem* **54**, 1425 - 1432

Sieiro, C., Reboredo, N. M. and Villa, T. G. (1995). Flocculation of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 461-466

Sieiro, C., Reboredo, N. M., Blanco, P. and Villa, T. G. (1997). Cloning of a new *Flo* gene from the flocculating *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b strain. *Fems Microbiology Letters* **146**, 109 - 115

Simon, M., Binder, M., Adam, G., Hartig, A. and Ruis, H. (1992). Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by AdR1, SNF1, and SNF4. *Yeast* **8**, 303 - 309Singh, R. and Green, M. R. (1993). Sequence-specific binding of transafer RNA by glyceraldeyde - 3 - phosphate dehydrogenase. *Science* **259**, 365 - 368

Stewart, G. G., Garrinson, I., Goring, T. G., Meleg, M., Pipats, P. and Russel, I. (1976). Biochemical and genetic studies on yeast flocculation. *Kem Kemi* **3**, 465 - 479

Stratford, M. and Assinder, S. (1991). Yeast flocculation: *Flo1* and *New FLO* phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**, 559- 57

Stratford, M. (1992). Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetic viewpoints. *Yeast* **8**, 25-38

Teixeira, J., Gonçalves, M. H., Gama, F. M., Moradas-Ferreira, P. and Mota, M. (1989). *Biotechnol. Lett.* **11**, 579-582.

Teunissen, A. W .R. H. and Steensma, H. Y. (1995). The dominant flocculation genes of Saccharomyces cerevisiae constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**, 1001-1013

Yamashita, I. and Fukui, S. (1983). Mating signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene *FLO 8* in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2889 – 2896

Veenhuis, M., van Dijken, J. P., Pilon, S. A: F. and Harder, W. (1978). Development of crystaline peroxisomes in methanol - grown cells of the yeast Hansenula polymorpha and its relation to environmental conditions. *Arch Microbiol* **117**, 153 - 163

Vergères, G., Yen, T.S. B., Aggeler, J., Lausier, J. and Waskell, L. (1993). A model system for studying membrane biogenesis: overexpression of

cytochrome b_5 in yeast results in marked proliferation of the intracellular membrane. *J. Cell Sci* **106**, 249 - 259

Wright, R., Bassom, M., Dári, L. and Rine, J. (1988). Increased amounts of HGM - CoA reductase induce "Karmellae": a proliferation of stacked membrane pairs surronding the yeast nucleus. *J Cell Biol* **107**, 101-114

CAPÍTULO 4

Determinação da capacidade enzimática da proteína p37 presente na parede celular.

Verificação da secreção da p37 para o meio extracelular.

Apesar da p37 ter sido localizada na parede celular e se ter verificado a sua glicosilação, a sequenciação do gene codificante (*GAP1*) revelou que a proteína não possui qualquer sequência "leader" N-terminal, característica de proteínas endereçadas para o reticulo endoplasmático (Fernandes *et al*, 1995). Uma situação similar foi descrito para a enzima 3-fosfoglicerato cinase (Alloush *et al*, 1997) e foi demonstrado *in vitro* a possibilidade de translocação para o R.E., processamento e transporte para a sua localização final, das enzimas carboxipeptidase Y e fosfatase ácida, mesmo na ausência do seu péptido sinal (Blachly- Dyson e Stevens, 1987; Haguenaeur- Tsapis, 1992). Estes resultados indicaram que possivelmente existiria um mecanismo de reconhecimento alternativo ao clássico mediado pelo sinal N-terminal, responsável pela presença da proteína p37 na parede. Foi posta a hipótese da translocação da p37 ser mediada por "chaperones", podendo um mecanismo deste tipo explicar até o facto de que, embora o gene *GAP1* seja constitutivamente expresso, o transporte e a acumulação da p37 só se verifica em condições específicas (como a fermentação em contínuo ou a elevação da temperatura a 40ºC), que induzem a floculação (Fernandes *et al*, 1992, 1993, Fernandes, 1994). Tal hipótese está de acordo com o proposto por Hann e Walter (1991), que sugerem que na ausência de SRP, as proteínas podem ser translocadas *via* interacções com uma proteína da família hsp70. O envolvimento da hsp70 na translocação de proteínas foi já sugerido por Chirico *et al* (1988) e Deshaies *et al* (1988). A proposta de um mecanismo alternativo para o endereçamento da p37 para a parede celular, levantou a questão de se o mesmo processo levará a p37 a ser secretada para o meio extracelular. Foi assim realizada a imunoprecipitação do meio extracelular de diferentes culturas após biotinilação

da proteína na parede celular, sendo os resultados apresentados no artigo a seguir incluído. Nesse trabalho é igualmente descrito a pesquisa da actividade enzimática da proteína presente na parede. Foi anteriormente verificado que a p37 é capaz de actividade glicolítica, já que a sua presença ou ausência leva a alterações dos valores de actividade GAPDH total medida (Falcão Moreira *et al*, 1998; Falcão Moreira *et al*,1999). No entanto a preservação da conformação que lhe permite a capacidade enzimática, quando incluída na estrutura da parede celular, foi só neste trabalho descrita. Situação similar foi já igualmente descrita para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, mas de *Candida albicans* (Gil *et al*, 1997).

Kluyveromyces marxianus p37 – a multifunctional cell wall protein

R. Falcão Moreira[1,3], P. A. Fernandes [2] and P. Moradas-Ferreira [1,4]

[1] Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), [2] Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, [3]Instituto Superior de Ciências da Saúde 4180 Paredes and [4] Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Key words:

cell wall, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, GAPDH, secretion

Abstract

A gliceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase like protein (p37), encoded by the gene *GAP1* is accumulated in the cell wall of flocculent *Kluyveromyces marxianus* cells. This protein contributes to the total GAPDH cytosolic activity and the present work reveals that p37 is targeted transiently to the cell wall, where it assumes an enzymatic active conformation, before being secreted. These results were obtained either in *K. marxianus* wild type cells and in non floculent *Saccharomyces cerevisiae* cells transformed with the *GAP1* gene. In both cells the surface enzyme activity is sensitive to iodoacetate or to the binding of p37 antibody. The transient retention of p37 is indicated by the presence of biotinilated p37 in the extracellular medium. Besides supporting

evidence that p37 is targeted to the cell surface in an active form, it shows that the wall structureof flocculent cells exits in a dynamic state.

1. Introduction

When *Kluyveromyces marxianus* cells are grown at 40 ºC, it is observed an accumulation in the cell wall of a glycoprotein with an apparent molecular weight of 37 kDa (p37) together with a flocculent phenotype (1). Purification and characterization of this *K. marxianus* protein revealed a high identity to cytosolic glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Subsequently, the gene encoding p37, *GAP1*, was cloned, sequenced and identified as a member of the GAPDH multigenic family of *K. marxianus*, which consists of three genes that share high homology (2). The p37 is present in the cell surface, thus a signal peptide was expected to be found in its amino-terminal end. However, gene sequence analysis did not show any sequence coding for a hydrophobic peptide that could be identified as a signal for protein translocation to the endoplasmatic reticulum (E.R.) (2). Therefore, this translocation is unlikely to be mediated by the SRP (signal recognition particle) and probably is targeted post-translationally to the E.R. by chaperones (3).

The presence of glycolitic enzymes in the cell wall of microorganisms has been subject of various reports. In *Candida albicans*, enolase was found to be associated with glucan in the inner layers of the cell wall (4), phosphoglycerate kinase was also found in the cell wall and at the surface (5), a cell wall-bound form of GAPDH has been described (6) and the presence of alcohol dehydrogenase in the cell wall was also suggested (7). In other microorganisms such as *Entamoeba histolytica,* alcohol dehydrogenase was also detected in the

surface (8) and phosphoglycerate cinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and triose-phosphate isomerase have been found on the surface of *Schistosoma mansoni* (4; 9; 10; 11). Studies done with a *K. marxianus* mutant deficient in p37 (12) revealed that the protein contributes to cytosolic enzyme activity, is related to thermotolerance, flocculation and cell wall integrity. The characterisation of a *S. cerevisiae* strain transformed with a p37 expression vector under the control of the *GAL1* promoter, confirmed these results and showed that the protein is also targeted to the cell wall when overexpressed in the transformant (13).

The present work reports new data about this GAPDH like protein, providing evidence of a p37 in an enzymatically active form when present in the cell wall, being subsequently excreted to the extracellular medium.

2. Materials and methods

2.1. Strains

Kluyveromyces marxianus ATCC 10022.

Kluyveromyces marxianus gap1 mutant, deficient in p37 synthesis.

Saccharomyces cerevisiae W3031A (*leu* 2-3, 112 *ura* 3-1, *trp* 1-1, *his* 3-11, 15, *ade* 2-1, *can* 1-100).

Saccharomyces cerevisiae W3031A *GAP1* transformant, over-expressing p37.

2.2. Cell growth conditions

K. marxianus was grown in minimal medium: (2 % galactose, 0.67 % yeast nitrogen base) wild type cells were grown either at 26ºC or 40ºC, and the mutant was incubated at 26ºC.

S. cerevisiae cells were grown in minimal medium supplemented with leucine (0.008 %), histidine (0.004 %), triptophane (0.004 %), adenine (0.004%) and, for the wild type cells, uracil (0.004 %).

2.3. Enzyme assays: determination of the enzymatic activity of p37, present in the cell wall

Samples of $3X10^8$ cells were obtained from different growth phases and incubated with and without glyceraldehyde-3-phosphate (4 mM) in the presence of NAD^+ (1 mM) in buffer A (40 mM tris, 50 mM Na_2HPO_4, 5 mM EDTA, 0.1 mM DTT pH 7.4) and in a final volume of 1 mL. The reaction mixture was incubated 5 minutes at room temperature, the cells were centrifuged and the supernatant analysed in respect to NADH presence, determining the optical density at 340 nm. The enzymatic activity was expressed as the micromolar quantity of NADH gerated in the assays. Enzymatic activities of cells incubated with iodoacetate (16 mM), anti-p37 serum (dilution 1:50; one hour of incubation) or at pH 6.6 were also determinated. To confirm that the cells were not lysed during the assays, the cell samples, were tested for the lactate dehydrogenase activity, incubating the samples with lactate (8 mM) in the presence of NAD^+ (1 mM). Aditionally, alcohol dehydrogenase activity was also measured, incubating samples with ethanol (10 mM) in the presence of NAD^+ (45 mM). As a positive control of these last assays, cellular extracts obtained by mechanical disruption of the cells were used (adapted from (6)).

2.4. p37 secretion to the extracelular medium

2.4.1. Labelling of yeast cell wall proteins

Biotin labelling was done according to Mrsa *et al* (1997) and modified as follows: Yeast cells were grown in 100 mL of medium until an $O.D._{600\ nm}$ of 4, centrifuged and washed twice with K-phosphate buffer (50 mM, pH 8.0). Cells were ressuspended in 2 mL of K-phosphate buffer containing aminoacids, 2% of glucose or galactose, 0.67% of yeast nitrogen base and 1 mg of Sulfo-NHS-LC-Biotin reagent (sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate; Pierce, Rockford, USA) and incubated for 90 minutes on ice. The cells were centrifuged, washed two times with buffer, ressuspended in 2 mL of K-phosphate buffer containing aminoacids, galactose and yeast nitrogen base, and incubated 5 hours in the initial growth conditions. After cell centrifugation, the supernatans were immunoprecipitaded.

2.4.2. Immunodetection

An anti-p37 serum produced in rabbit using recombinant protein expressed in *E.coli*, was used. The supernatant was incubated with p37 antiserum (dilution 1:500) for one hour at 37ºC and overnight at 4ºC in 20 mM tris, 50 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 0.5 % sodium deoxicolate and 0.1 % methionine. Protein A-sepharose (50 μg) was added and incubated 2 hours at 4ºC. The immunocomplex was pelleted by centrifugation and washed four times with 10 mM Tris/HCl, pH 7.5. Immunoprecipitates were dissociated with SDS-sample buffer for 5 minutes at 60ºC and 1 minute at 95ºC.

2.4.3. Electrophoresis and blotting

The proteins were analysed by SDS poliacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12,5%), using the method described by Laemmli (1970) (14). To visualise immunoprecipitated biotin-labelled proteins, they were blotted onto nitrocellulose membranes, which were then incubated for 1 hour in 10 mL 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 4% bovine serum albumin (BSA), and subsequently for 1 hour in the same buffer with 1 % BSA and Streptavidin-horseradish conjugate (dilution 1:5000), washed three times with the same buffer and developed using the ECL kit (Amersham) (15).

3. Results

3.1. Enzyme assays: determination of the enzymatic activity of p 37 present in the cell wall

Aiming at determining if p37 present in the yeast cell wall exhibits enzymatic activity, intact cells were tested for GAPDH enzyme assays (fig 1 and 2). Enzyme activity was detected in *Kluyveromyces marxianus* wild type cells and *Saccharomyces cerevisiae GAP1* transformed cells, in contrast to *gap1* mutant and wild type *S. cerevisiae*. Neither cell catalysed NADH formation when the enzyme substract was absent. The enzymatic activity was proportional to cell growth and the results showed that it can be partially inhibited by incubating cells with anti-p37 serum or iodoacetate (tab 1 and 2). At pH 6.6, which corresponds to the pH of the yeasts culture medium, the values determined for the GAPDH activity were considerably lower than the ones registered at pH 7.4, (the optimum pH for measuring GAPDH activity) (tab1 and 2). The lactate dehydrogenase (an yeast mitochondrial enzyme) and alcohol dehydrogenase

(an yeast cytosolic enzyme) activities were tested to confirm the absence of cell lysis: the activities were not detected in the intact cells, in contrast to the cellular extracts that were prepared as a positive control of the experiments.

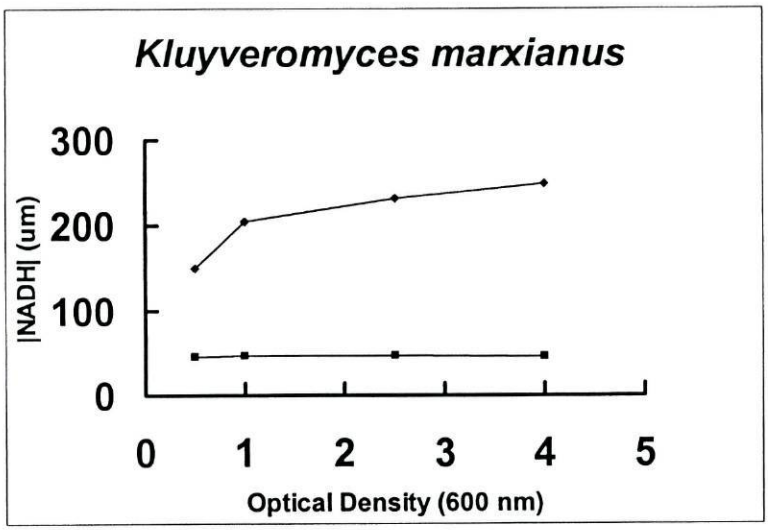


Figure 1:

GAPDH activity in intact cells of wild type (upper line) and *gap1* mutant (bottom line) of *Kluyveromyces marxianus* cells. Activity is expressed as the μmolar quantity of NADH produced in the presence of glyceraldehyde-3-phosphate. "Optical density" refers to the cell culture growth.

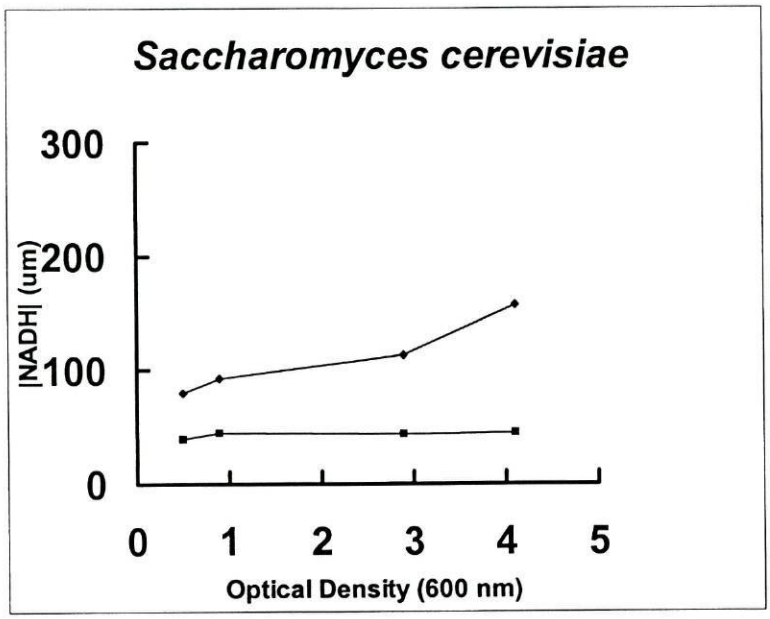


Figure 2:

GAPDH activity in intact cells of wild type (upper line) and *GAP1* transformant (bottom line) of *Saccharomyces cerevisiae* cells. Activity is expressed as the μmolar quantity of

NADH produced in the presence of glyceraldehyde-3-phosphate. "Optical density" refers to the cell culture growth.

Treatment	Activity |NADH| (μm)	Inhibition
None (control)	248	0
Iodoacetate	129	48
Anti-p37 serum	193	22
pH 6.6	99	60

***Kluyveromyces marxianus* wild type**

Table 1:

Effect of iodocetate, pH modification and anti-p37 serum treatment on GAPDH activity in *Kluyveromyces marxianus* cells.

Treatment	Activity |NADH| (μm)	Inhibition
None (control)	157	0
Iodoacetate	96	39
Anti-p37 serum	115	27
pH 6.6	74	53

***Saccharomyces cerevisiae GAP1* transformant**

Table 2:

Effect of iodoacetate, pH modification and anti-p37 serum treatment on GAPDH activity of *Saccharomyces cerevisiae GAP1* transformed cells.

3.2. p37 secretion to the extracellular medium

As p37 is not covalently bound to the cell wall glucan, to be verify if the protein accumulation in the cell wall could be transient, yeasts were incubated at specific growth conditions after the labelling of the cell wall proteins with a non-permeable biotinilation reagent (Sulfo-NHS-LC-Biotin). The presence of p37 in the extracellular medium was carried out by immunoprecipitation with anti-p37 serum and the results visualised by streptavidin-mediated colour reaction. Using

this approach, only the presence of the surface GAPDH like protein was assessed. The results showed the presence of p37 in the extracellular mediums corresponding to *K. marxianus* grown at 40ºC and to *S. cerevisiae GAP1* transformant grown in galactose. The protein was not detected in the assays referring to the *gap1* mutant, the wild type *S. cerevisiae* and to the *K. marxianus* when grown at 26 ºC.

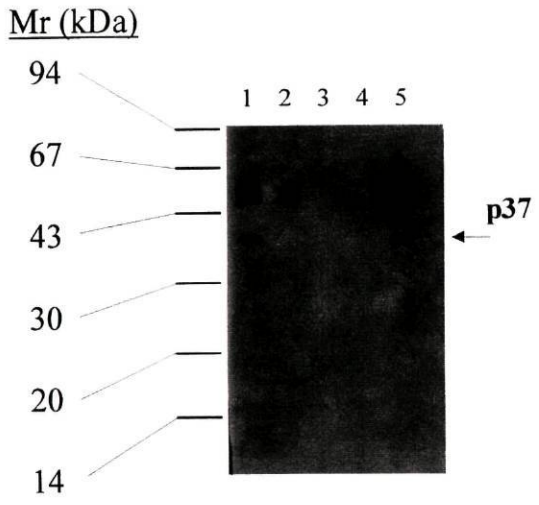


Figure 3:
Immunoprecipitation of the extracellular mediums of
1-*Kluyveromyces marxianus* grown at 40ºC
2-*Kluyveromyces marxianus* grown at 26ºC
3-*Kluyveromyces marxianus gap1* mutant grown at 26ºC
4-*Saccharomyces cerevisiae* grown at 26ºC
5-*Saccharomyces cerevisiae GAP1* transformant grown at 26ºC

4. Discussion

In previous studies that involved *Kluyveromyces marxianus* cells, it was revealed that this yeast accumulated a protein with a molecular mass of 37 Kda -p37- (16). The protein has been so far related to the flocculation mechanism, thermotolerance and cell wall integrity (1; 2; 12; 13; 16). An enzymatic nature of

the p37 was suggested by studies of the *K. marxianus gap1* mutant (which showed a decrease on total GAPDH activity;(12) and the *S. cerevisiae GAP1* transformant (which showed an increase on total GAPDH activity; (13)). Although p37 has been localised in the cell wall, the sequencing data of the *GAP1* gene revealed that the protein has no terminal leader sequence targeting it to the endoplasmatic reticulum (2). The transport of p37 is *via* the endoplasmatic reticulum, since the protein is N-glycosilated. To be targeted to the cell wall, it can be suggested a post-translational mechanism and thus this protein has to go through a number of steps involving unfolding and re-folding. Whether the final conformation of the protein led to be enzimatically active was an open question. To determine whether p37 in the cell wall has any enzymatic activity, assays with intact cells were performed. The assays detected enzymatic activity in wild type *K. marxianus* and *S. cerevisiae GAP1* transformed cells, in contrast with the absence of activity both in the *gap1* mutant and wild type *S. cerevisiae*. The results obtained in cells harbouring p37, clearly indicate that p37 is in a conformational structure with a dehidrogenase activity. The increasing enzymatic activity verified during the cell growth, must be a result of a continuous accumulation of p37 in the cell wall. The absence of enzyme activity in *K. marxianus gap1* mutant and in wild type *S. cerevisiae*, confirm the relationship between the p37 in the cell wall and the measured enzymatic activity. Indeed, NADH is only formed in the presence of glyceraldehyde-3-phosphate and is reduced (50 % in *K. marxianus* and 40 % in *S. cerevisiae*) when iodoacetate (an inhibitor of GAPDH) is added (tab 1 and 2). In addition, the previous incubation with p37 anti-serum also led to a net inhibition of activity (-20% of activity) (tab 1 and 2). The measured enzymatic

activity in the assays performed in physiological conditions (pH 6.6 – which corresponds to the pH value of the medium used in the yeast's growth), indicate that this activity is still detected, although at low level To rule out the possibility of cell lysis and, therefore measuring activity due to the presence of cytosolic enzymes, lactate and alcohol dehydrogenase activities were determined, and were not detected. A glycolitic protein present in the cell wall, where it presents enzymatic activity, was also reported in other microorganisms such as *Candida albicans*, where an immunogenic, enzymatically active cell wall-associated form of the glycolitic enzyme GAPDH was found (6). This is in agreement with different data that reported GAPDH as a multifunctional protein, that can be present at different cellular localizations (17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24).

Subsequently, we addressed the question, if the presence of the protein could be transient as it is not a normal component of the cell wall. Thus, secretion to the extracellular medium was analysed by immunoprecipitation of p37 from the extracellular medium of different cultures, after biotinilation of the cell wall proteins. The protein was identified in the medium of *K. marxianus* growth at 40ºC and *S. cerevisiae GAP1* transformant groth in galactose. The referred growth conditions were the same that were used when p37 accumulation was detected in the cell wall. The assays using the *gap1* mutant and the wild type *S. cerevisiae* are negative controls as these yeasts do not synthesise p37. The fact that p37 was not detected in the medium referring to *K. marxianus* grown at 26 ºC, is in agreement with the fact that there is no significant accumulation of p37 in the cell wall in this condition.

The present work supports the model in which *GAP1* gene encodes a protein -p37- localised in the cytosol and exhibits dehydrogenase activity and

upon specific signals the p37 is targeted to the endoplasmic reticulum where it is glycosylated. Subsequently the p37 moves to the cell surface where it accumulates in an enzymatic active form prior to be secreted. The p37 belongs to the group of proteins without a recognisable signal peptide such as enolase and phosphoglycerate kinase in *Candida albicans*, that can be targeted to the cell wall and secreted.

Ackowledgements

This work was supported by PRAXIS 2/2.1/BIO/1052/95, R. Falcão Moreira thanks PRAXIS for grant BD/4551/94.

We thank António Castro and Frederico Ferreira da Silva for their input in the production of the p37 anti-serum.

References

(1) Fernandes, P. A., Sousa, M. and Moradas-Ferreira, P. (1993). Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast* **9**, 859-866

(2) Fernandes, P. A., Sena Esteves, M. and Moradas-Ferreira, P. (1995). Characterization of the glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase gene family from *Kluyveromyces marxianus* –Polymerase Chain Reaction–single –strand conformation polymorphism as a tool for the study of multigenic families. *Yeast* **11**, 725-733

(3) Stirling, C. J. (1999). Protein targeting to the endoplasmic reticulum in yeast. *Microbiology* **145**, 991-998

(4) Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martínez, J.P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*:

identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar.1998, 130-180

(5) Alloush, H. M., López-Ribot, J. L., Masten, B. J. and Chaffin, W. L. (1997). 3-Phosphoglycerate kinase: a glycolitic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. Microbiology **1143**, 321-330

(6) Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. and Gozalbo, D. (1997). The glycolitic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* **179**, 4992-4999

(7) Pendrak, M. L. and Klotz, S. A. (1995). Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 103-114

(8) Yang, W., Kairong, T. and Stanley Jr., S. L. (1994). *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional adhE gene product of *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**, 2930-2935

(9) Goudot-Crozel, V., Caillol, D., Djabali, M. and Dessein, A. J. (1989). The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kDa glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J. Exp. Med.* **170**: 2065-2080

(10) Lee, K. W., Shalaby, K. A., Thakur, A., Medhat, A., Karim, A. M., and LoVerde, P. T. (1995). Cloning of the gene for phosphoglycerate kinase from *Schistosoma mansoni* and characterization of its gene product. *Mol.Biochem. Parasitol.* **71**, 221-231

(11) Shoemaker, C., Gross, A., Gebremichael, A. and Harn, D., (1992). cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1842-1846

(12) Falcão Moreira, R., Fernandes, P. A. and Moradas-Ferreira, P. (1998). *Kluyveromyces marxianus* flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37. *Microbiology* **144**, 681-688

(13) Falcão Moreira, R., Ferreira da Silva, F., Fernandes, P. A. and Moradas-Ferreira, P. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by transformation with the *GAP1* gene from *Kluyveromyces marxianus (1999)*. submitted to Yeast

(14) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

(15) Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M. e Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1154

(16) Fernandes, P. A., Keen, J. N., Findlay, J. B. C. and Moradas Ferreira, P. (1992). A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim Biophys Acta* **1159**, 67 – 73

(17)/ Allen, R. W., Trach, K. A. and Hoch, J. A. (1987). Identification of the 37 kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as GAPDH. *J. Biol. Chem.* **262,** 649 – 653

(18) Robbins, A. R., Ward, R. D. and Oliver, C. (1995). A mutation in glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J. Cell. Biol.* **130**, 1093 – 1104

(19) Pancholi, V. and Fischetti, V. A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldeyde - 3 - phosphate dehydrogenase with a multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**, 415 – 423

(20) Huitorel, P. and Pantolini, D. (1985). Bundling of microtubules by glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur. J. Biochem.* **150**, 265 - 269

(21) Kawamoto, R. M. and Caswell, A. H. (1986). Autophosphorylation of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry* **25,** 656 – 661

(22) Perucho, M., Salas, J., and Salas, M. L. (1977). Identification of the mammalian DNA-binding protein P8 as a glyceradehyde-3-phosphate desidrogenase. *Eur. J. Biochem.* **81**, 557-560

(23) Singh, R. and Green, M. R. (1993). Sequence- specific binding of transfer RNA by glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**, 365 – 368

(24) Meyer - Siegler, K., Mauro, D. J., Seel, G., Weirzer, J., Deriel, J. K. ans Sirover, M. A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37 kDa subunit of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8460 - 8464

CAPÍTULO 5

Discussão Geral

Conclusões

Perspectivas

A floculação de leveduras é um fenómeno de adesão celular de características únicas entre células eucariotas e que pode ser utilizado vantajosamente em processos biotecnológicos e industriais. A possibilidade de regulação do despoletar da floculação, permitiria o desenvolvimento de métodos de imobilização celular ou de remoção controlada de leveduras, sem necessidade de aplicação de metodologias de elevado custo, para remoção das células. O estudo dos mecanismos moleculares da floculação tem igualmente interesse como modelo de interacção celular.

Os estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos realizados sobre a floculação não têm sido até agora suficientes para clarificar totalmente os mecanismos moleculares ou os elementos celulares envolvidos. Esta dificuldade de sistematização do conhecimento sobre o fenómeno é, em parte, consequência da diversidade de metodologias utilizadas, fazendo suspeitar da inexistência de um processo de floculação universal, mas sim de diferentes mecanismos usados por diferentes estirpes ou grupos de estirpes. A maioria dos estudos existentes utilizam células de *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, também são realizados trabalhos sobre *Kluyveromyces marxianus,* uma levedura de potencial interesse para utilização industrial, já que apresenta características vantajosas, tal como o pequeno tempo de geração que possibilita a obtenção de elevados rendimentos de biomassa em baixo tempo. Trabalhos anteriores utilizando células floculantes de *K. marxianus* revelaram a acumulação na parede de uma proteína de massa molecular aparente de 37 kDa (p37), que se considerou assim possivelmente envolvida na agregação celular (Teixeira *et al*, 1989; Fernandes *et al*, 1992). Os estudos efectuados na caracterização da proteína e os genes com ela relacionados tornam-se assim

justificados, ainda mais que as análises bioquímicas e genéticas são as abordagens mais adequadas na tentativa de explorar o papel de uma proteína como possível floculina. O trabalho apresentado nesta tese permitiu obter novos dados e assim contribuir para esclarecer o papel da p37 na floculação:

1- A expressão do gene *GAP1* é determinante para a floculação da *Kluyveromyces marxianus* e é capaz de induzir a floculação de uma estirpe não floculante de *S. cerevisiae*

A presença aumentada de p37 nas paredes de leveduras *K. marxianus* floculantes levantou desde logo a questão se tal acumulação tinha uma relação causal com o fenótipo apresentado ou se era, simplesmente, uma presença sem relação funcional. Para responder a este problema foi decidido seguir duas abordagens experimentais:

(a) obtenção de um mutante de *K. marxianus* deficiente na síntese da proteína

(b) expressão do gene codificante da proteína (*GAP1*) numa estirpe não floculante de *S. cerevisiae*

A hipótese de uma relação entre a presença da proteína p37 na parede e a ocorrência da floculação é apoiada pelo facto do mutante *gap1* de *K. marxianus* perder a capacidade de flocular, em contraste com o transformante *GAP1* de *S. cerevisiae* que adquiriu um fenótipo floculante. Estabeleceu-se assim uma associação entre a expressão do gene *GAP1* e a existência de floculação nestas duas estirpes. De facto, a acumulação de p37 na parede está associada ao desencadear da floculação e a sua ausência origina a perca de capacidade de agregação. A floculação da *S. cerevisiae* super-expressando o

GAP1, é indicativa de que a proteína deve mediar um mecanismo específico para a *K. marxianus*, mas que pode ser utilizada como uma ferramenta para induzir a floculação de *S. cerevisiae*.

2- Similarmente ao que sucede em *K. marxianus*, a floculação de *S. cerevisiae* é concomitante com a acumulação da p37 na parede.

A presença da proteína na parede como condição necessária para que ocorra floculação foi confirmada pelas experiências com o mutante e com as células que realizam a super-expressão do gene *GAP1*. A floculação poderia não ser necessariamente uma consequência directa da expressão do gene codificante para a p37, sendo a proteína não especificamente responsável pela agregação, mas apenas envolvida como molécula activadora ou reguladora do processo. A presença da proteína na parede de células floculantes de *K. marxianus* já tinha sido demonstrada e tornou-se então importante a pesquisa da presença da p37 nas células transformadas de *S. cerevisiae*. A imunoprecipitação das respectivas proteínas de parede após serem biotiniladas revelou a acumulação da proteína p37, em contraste com o que aconteceu com as paredes das células selvagens. A utilização de um reagente de biotinilação que não atravessa a membrana plasmática, excluíu a hipótese de contaminação das proteínas preparadas com material citosólico, ficando assim comprovada a associação da presença da p37 na parede com o fenótipo floculante. Ensaios de localização intracelular da p37, usando a proteína de fusão com a "Proteína verde fluorescente" (GFP- "Green fluorescent protein"), mostrou acumulação de fluorescência na parede de células com ela

transformadas, o que não sucedeu com células transformadas apenas com a GFP (Falcão Moreira *et al*, 1999). A acumulação da proteína de fusão aparentou não ser aleatória, mas sim surgir em aglomerados pontuais na parede celular. Os estudos apresentados permitem assim associar o fenómeno de floculação à presença da proteína p37 na parede, nos casos referidos.

3- O fenótipo de floculação originado pela expressão do gene *GAP1* é susceptível (positivamente) à presença de iões, nomeadamente o cálcio, no meio de cultura das leveduras.

No que diz respeito ao fenótipo floculante, *a S. cerevisiae* transformada adquiriu características de floculação e desfloculação semelhantes às apresentadas pela *K. marxianus* selvagem, apresentando até flocos morfologicamente idênticos que apenas se desagregam em condições de agitação forte e na presença de concentrações de EDTA superiores a 250 mM. A dependência da presença de cálcio é comum às duas estirpes embora o factor seja apenas essencial no caso da *Kluyveromyces*. No entanto, a relação demonstrada, entre o grau de floculação e a quantidade de cálcio presente nas culturas de *S. cerevisiae*, evidencia um efeito indutor do ião na agregação celular. De facto, na presença de 200 mM de cálcio, a capacidade floculante do transformante *GAP1* aumenta cerca de 47%. Supõe-se que o papel desempenhado pelos iões cálcio consista em interactuar com as cargas negativas da superfície celular, neutralizando-as parcialmente favorecendo então a agregação celular. A função do ião deve ser semelhante em ambas as estirpes consideradas. As diferenças entre a arquitectura das suas paredes

celulares, deve determinar a dependência entre a ocorrência da floculação e a presença de cálcio. A parede celular de *K. marxianus* é descrita como sendo mais complexa (Hussain,1986) que a de *S. cerevisiae*, de modo que o efeito estabilizador do cálcio é, provavelmente, de maior importância em *K. marxianus*. É de salientar que é possível a indução da floculação de *K. marxianus*, não só pela presença de cálcio (associada a uma temperatura elevada), mas através de uma fermentação em contínuo (Teixeira e Mota, 1987). No entanto, nunca foi demonstrada experimentalmente algum tipo de interacção, ou afinidade de ligação, específica entre a p37 e o cálcio (Fernandes, 1994), assim como com outros iões que podem ser usados na indução da floculação (Sousa, 1992; Teixeira, 1989). Igualmente, a taxa de floculação da *S. cerevisiae* transformada é incrementada pela presença de outros iões (como por exemplo o magnésio (Luís Silva,1998)) no meio de cultura, embora seja inegável a maior eficiência dos iões cálcio.

4 - A presença/ausência da p37 tem influência na integridade da parede celular e a anulação ou a super-expressão do gene *GAP1* estão relacionados com modificações morfológicas e de crescimento celular

Sendo a presença da p37 na parede celular uma evidência essencial para estabelecer a sua relação com o fenómeno de floculação, era adequado ter mais resultados que comprovassem a sua localização. Sendo previsível que a ausência ou presença da proteína afectasse a arquitectura e provavelmente, as propriedades da parede, nomeadamente a resistência ao "calcofluor branco"

(CFW - "Calcofluor white"), um corante fluorescente de carga negativa, que é usado para detectar mutantes de parede por interferir com a estrutura da parede (Ram *et al*, 1994). Nos ensaios realizados com o CFW, foi verificado que o mutante *gap1 de K. marxianus* é sensível à droga, enquanto o transformante de *S. cerevisiae* apresenta maior resistência, para concentrações que a estirpe selvagem já se mostra afectada. Os resultados são indicativos de uma fragilização da parede no mutante, deficiente na síntese da p37, em oposição a um fortalecimento do organelo no transformante que super-expressa a proteína. Presentemente desconhece-se o mecanismo responsável por esta alteração na sensibilidade ao CFW, mas será possível que resulte de um efeito directo da presença ou ausência da p37 na parede.

É interessante notar que a alteração na estrutura da parede tem efeitos na morfologia celular. De facto, verifica-se que o mutante *gap1* tornou-se mais pequeno e esférico do que as células selvagens, de aparência elongada. Por outro lado, as células transformantes *GAP1* apresentam um aumento de tamanho. Estas alterações podem ser justificadas dado que o enfraquecimento da estrutura da parede celular do mutante poderá causar a sua forma esférica, a forma cuja manutenção, exige menos tensão exercida pelo organelo. De qualquer modo, alterações morfológicas são geralmente esperadas como consequência natural, quando se realizam manipulações genéticas (Vergères *et al*, 1993).

5- A p37 está relacionada com um mecanismo de protecção contra o stress térmico que leva à floculação.

Os resultados descritos indicam que a p37 na parede tem funções estruturais que não estão relacionados com a actividade enzimática. A importância funcional da p37 é evidenciada pelos resultados obtidos nos ensaios de estudo de resistência a condições de stress. Assim, o estudo do mutante *gap1*, revelou a existência de uma sensibilidade à temperatura diferente da exibida pela célula selvagem, uma levedura bastante tolerante a temperaturas até os 42ºC, havendo nas células mutadas a perca de capacidade de crescimento celular, induzida a 40ºC. No entanto, este efeito é revertido se for adicionado, desde o início do crescimento, ao meio de cultura determinados iões (cálcio ou magnésio) ou osmólitos (sorbitol ou glicerol). É frequente que células com a estrutura da parede celular alterada se tornem osmoticamente frágeis; é de referir a existência de um grupo de leveduras mutantes, designados de "Fragile mutants", que consistem em células com defeitos na biossíntese de manoproteínas de parede e consequentemente osmoticamente sensíveis. O efeito de reversão da sensibilidade às altas temperaturas por tais solutos deve resultar de uma estabilização da arquitectura da parede fragilizada pela ausência da p37. A capacidade de neutralização das cargas superficiais negativas por parte dos iões deve ser a razão que os torna mais eficientes na estabilização celular, comparativamente com o glicerol ou sorbitol, na presença dos quais as células crescem, mas não atingem densidades ópticas tão elevadas. No entanto, não é de excluir um

papel mais específico do ião cálcio na reversão dessa termossensibilidade, já que é notório ser a sua presença significativamente a mais eficaz.

Uma relação entre termossensibilidade e floculação foi sugerida por Bossier *et al* (1997) que descreveu que células de *S. cerevisiae* tornaram-se mais termorresistentes quando capazes de flocular. Dado que a floculação em geral ocorre na fase pós-diauxica, a resistência à elevação da temperatura poderá ser relacionada com um aumento da tolerância geral a diferentes formas de stress que ocorre na fase estacionária (Fuge, 1997). Não obstante, os resultados obtidos podem indicar que a p37 está envolvida num mecanismo de protecção contra o stress térmico que conduz à floculação. Assim, o mutante não será capaz de flocular e igualmente de não resistir a temperaturas elevadas. Já Rose (1984), relacionou o fenómeno de floculação com um mecanismo de resistência ao stress, justificando a ocorrência da floculação de leveduras na natureza, pelo facto de a formação de flocos levar à constituição de microambientes favoráveis às células como resposta a factores adversos. A própria indução da floculação da *K. marxianus*, pressupõe a existência de um stress, quer por elevação de temperatura, quer por fermentação em contínuo que origina a existência de elevado número de células bastante velhas nos biorreactores (Fernandes, 1994). Também Moradas–Ferreira *et al* (1994) referiu a floculação de *Kluyveromyces marxianus* como um mecanismo de defesa desenvolvido pelas células para sobreviver quando sujeitas a stress, nomeadamente falta de nutrientes.

6- O gene *GAP1* codificante para a p37 contribui para a actividade enzimática GAPDH total da célula .

A elevada homologia entre a p37 e a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase fizeram suspeitar de que a proteína pudesse desempenhar uma função adicional, dando uma contribuição para a capacidade glicolítica total da célula. Uma natureza enzimática da p37 foi indicada ao determinar-se a actividade GAPDH total, que se mostrou diminuída nas células mutantes *gap1*. A interpretação dos resultados levou à conclusão que o gene *GAP1* codificante para a p37, contribui 25% para a actividade GAPDH total, quando se utiliza glucose como fonte de carbono e 50% quando etanol é utilizado. O facto de que a expressão do gene *GAP1*, ao contrário do que sucede com o *GAP2*, é aumentada quando as células crescem em etanol (Fernandes *et al*, 1995), está de acordo com esses resultados. No entanto, em etanol não se pode considerar que esse aumento de actividade enzimática corresponda a um acréscimo de actividade glicolítica, pelo que se pode supor a existência de funções alternativas para a proteína. A confirmar a actividade enzimática da p37, foi verificado no transformante *GAP1* de *S. cerevisiae*, o aumento de cerca de 30% na actividade GAPDH total relativamente às células selvagens. Concordante com estes resultados é o facto de se ter observado que o mutante *gap1* apresenta um metabolismo mais fermentativo relativamente à *K. marxianus* selvagem, produzindo maiores quantidades de etanol no seu crescimento. De facto, já que a p37 apresenta actividade enzimática, a sua ausência afecta provavelmente a taxa de obtenção de energia e equivalentes redutores, geralmente obtidas na via glicolítica, pelo que as células recorrem a

um metabolismo mais fermentativo, que constitui uma via menos eficiente, mas mais rápida, de obtenção de energia. Alterações a nível metabólico são igualmente patentes nas diferenças notadas a nível de crescimento celular, nomeadamente no que diz respeito à maior duração da fase "lag", significativa de um atraso no arranque do crescimento das células, cujo metabolismo foi alterado relativamente ao organismo selvagem. Tais alterações metabólicas são esperadas em organismos que sofreram manipulações genéticas (Vergéres *et al*,1993).

7- A p37 presente na parede celular encontra-se enzimaticamente activa

O facto da p37 se acumular na parede celular levantou a questão de se a sua integração nesse organelo levaria a uma alteração conformacional que originasse a perda de actividade enzimática. Os resultados obtidos demonstraram que a proteína mantém, (ou readquire após inserção na parede) uma conformação que lhe permite desempenhar actividade catalítica da reacção que converte o gliceraldeído-3-fosfato em 1,3 bifosfoglicerato. Essa actividade foi verificada quer na *K. marxianus* selvagem, quer no transformante *GAP1* de *S. cerevisiae*. Ensaios na presença e ausência do substrato indicaram a especificidade dos ensaios assim como as experiências de inibição da reacção com iodoacetato, que se mostrou eficaz. A diminuição da actividade nos ensaios realizados após incubação das células intactas com o soro anti-p37, contribuíram igualmente para esclarecer que a actividade era resultante da presença da p37 assim como indicaram que a proteína enzimaticamente

activa permanece igualmente imunogénica. Para eliminar a hipótese da actividade medida ser fruto da ocorrência de lise celular que originasse a libertação de GAPDH citosólica, a determinação das actividades quer de lactato desidrogenase (enzima mitocondrial) como de álcool desidrogenase (enzima presente no citosol de leveduras) foram quantificadas. Não foi detectada qualquer actividade enzimática pelo que se exclui a possibilidade de contaminações citosólicas.

Os ensaios enzimáticos para a p37 presente na parede celular foram realizados a pH 7,4, valor óptimo para a actividade da GAPDH. No entanto o meio de cultura que utilizamos é geralmente mais ácido (cerca de pH 6,8) por ser mais favorável ao crescimento das leveduras. A determinação da actividade enzimática da p37 na parede, medida nessas condições, permitiu concluir que a actividade da proteína é bastante diminuída nessas condições (cerca de 70 a 80% inferior), podendo afirmar-se que as actividades medidas não têm provavelmente significado biológico. Os resultados obtidos não devem ser interpretados como uma indicação de que a p37 apresenta algum tipo de função catalítica relacionada com a glicólise, quando inserida na parede, para o que seria bastante difícil de encontrar alguma justificativa ou vantagem para a célula. São sim evidências de que a proteína mantêm uma estrutura na parede que não lhe altera a capacidade enzimática, podendo a célula não tirar, na parede, partido dessa capacidade, pelo menos nos mecanismos até agora conhecidos. A p37 de *K. marxianus* não é caso único de uma proteína glicolítica presente na parede celular com preservação das suas capacidades enzimáticas: caso muito idêntico foi descrito por Gil *et al* (1997) referente à GAPDH de *Candida albicans*.

8- A p37 é uma proteína multifuncional

O enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é descrita em variados trabalhos que a associam a funções que não a actividade glicolítica, conforme é referido na revisão bibliográfica apresentada nesta tese. Tal diversidade funcional é igualmente verificada para a proteína p37, altamente homóloga ao enzima. De facto, os trabalhos realizados demonstraram que a p37 não se relaciona apenas com o fenómeno de floculação mas também com processos relativos à integridade da parede celular, crescimento celular, termotolerância e actividade enzimática. A relação da p37 na floculação dá-lhe um capacidade de mediadora da adesão celular que provavelmente é conseguida pela ligação da proteína a certos componentes da parede celular de células adjacentes. A capacidade de ligação da GAPDH aos mais diversos factores e componentes (DNA, tubulina, proteínas de membrana,etc) é, aliás, uma característica da enzima que se encontra descrita (secção 4.2; capítulo1)

9-Existe, não só em *K. marxianus* como também *S. cerevisiae*, um mecanismo alternativo para endereçamento da p37 na via de secrecção.

A natureza enzimática da p37, comprovada pelo alterações no registo da actividade GAPDH nas células do mutantes *gap1* e do transformante *GAP1*, indica que, após a sua síntese, a proteína permanece no citosol, contribuindo para a actividade enzimática. É então de supô r que o endereçamento da p37

para o R.E., onde é glicosilada (Fernandes, 1993), ocorre pós-tradução. A ausência de péptido sinal indica que a proteína deve utilizar um mecanismo alternativo para essa translocação. Trata-se de uma situação similar à descrita por Alloush *et al* (1997) referente à 3-fosfoglicerato cinase, outra enzima glicolítica, sem sequência sinal aparente, também detectada na parede celular de uma levedura (*Candida albicans*). De qualquer forma, a presença de um péptido de sinal, não é a única característica que determina a translocação de uma proteína para o R.E.. Prova disso são, por exemplo as interleuquinas ou certas transglutaminases, que são endereçadas embora tenha sido demonstrado que não utilizam a via clássica de secrecção (Muesch *et al*, 1990). Estudos *in vitro*, mostraram que a enzima vacuolar carboxipeptidase Y ou a fosfatase ácida podem ser translocadas mesmo quando privadas do seu péptido sinal, para o R.E. e posteriormente para a sua localização final, embora menos eficientemente (Blachly-Dyson e Stevens, 1987; Haguenauer–Tsapis, 1992). Pouco está esclarecido sobre os componentes e vias que são usadas pelas proteínas nos mecanismos de endereçamento independentes de SRP, sendo sugerido a intervenção de proteínas de membrana e de chaperones citosólicas. No caso da p37 ainda não está esclarecido quais as chaperones que permitem que a proteína assuma uma estrutura desenrolada compatível com a translocação, mas é de supor que as proteínas hsp70 e hsp40 possam estar envolvidas.

10-A p37 é secretada para o meio extracelular, após uma incorporação transiente na parede celular.

Dado que a p37 é uma proteína não constitutiva da parede, pôs-se a hipótese da sua presença ser transitória, ou seja dar-se a sua secreção para o meio extracelular. Para esclarecer a questão, realizou-se a imunoprecipitação dos meios de diferentes culturas celulares com vista à detecção da p37 exportada após ter sido biotinilada na parede celular. A exportação da proteína foi verificada nas culturas referentes à *K. marxianus* crescida a 40ºC e ao transformante de *S. cerevisiae* em condições de indução da expressão do gene *GAP1*, enquanto não foi detectada proteína nos meios referentes ao mutante *gap1* ou à *S. cerevisiae* selvagem, células que não sintetizam a p37. Embora o gene *GAP1* seja constitutivamente expresso (Fernandes *et al*, 1995), em condições de crescimento da *K. marxianus* a 26ºC não é detectada acumulação significativa da p37 na parede celular, o que pode explicar a não detecção de exportação da proteína para o meio extracelular, pelo menos em quantidades detectáveis pelo método utilizado. A proteína exportada foi detectada através do uso de estreptavidina que reage com o agente de biotinilação usado para marcar as proteínas na parede celular. Pode-se assim depreender que a secrecção da p37 para o meio extracelular ocorre após uma incorporação transiente da proteína na parede celular.

Perspectivas:

Os resultados obtidos neste trabalho levantam algumas questões, entre as quais se encontram as relacionadas com a compreensão da regulação da expressão do gene que codifica para a p37, e conhecimento do mecanismo de endereçamento para a parede.

Para o estudo da regulação de expressão do gene *GAP1*, a sua região promotora terá que ser clonada e sequenciada. A análise da sua sequência e o estudo comparativo com outras regiões promotoras permitirão identificar sequências específicas que influenciem a regulação da transcrição. Estudos de "deslocação de bandas" utilizando extractos nucleares de células floculantes e não floculantes serão úteis na identificação de proteínas de ligação que possam estar envolvidas na regulação genética. A associação da região promotora com um "gene reporter" e a realização de delecções de certas regiões nucleotídicas, permitirão identificar a importância de certas sequências na taxa de expressão do gene. Os trabalhos realizados sobre a região promotora do gene *GAP1* justificam-se não só pelo esclarecimento das condições de regulação da expressão da própria p37, mas também como contributo para o conhecimento da regiões promotoras em geral de *Kluyveromyces*, que é até agora muito restrito.

O esclarecimento do mecanismo de endereçamento da proteína passará pela pesquisa de sequências topogénicas que determinem a sua localização na parede, a partir da construção de proteínas quiméricas entre domínios da p37 e a proteína GFP. A utilização do "Two hibrid system"permitirá identificar proteínas que interactuem com a p37 "*in vivo*" e que assim possam

estar possivelmente envolvidas no seu endereçamento. A transformação de leveduras mutadas em vários estágios da via de secrecção clássica (mutantes sec) assim como estudos com drogas inibidoras do transporte vesicular como a brefeldina A, permitirão identificar locais de divergência entre o mecanismo de endereçamento tradicional e a via utilizada pela p37, na sua incorporação na parede celular e secrecção para o meio extracelular.

A comprovada actividade enzimática da p37 indica que a proteína deve permanecer, após a sua síntese, no citosol onde desempenha essa função glicolítica. No entanto, foi verificado que a proteína é endereçada para a parede e até secretada para o meio extracelular. É então de supor a existência de um equilíbrio entre a quantidade de p37 que permanece no citosol e a que é direccionada para o R.E. (Figura 1). A p37 presente no citosol agregar-se-á, formando tetrâmeros, enquanto que a direccionada para o R. E. entrará na via secretória, condicionada provavelmente por motivos estruturais ainda não identificados. A pesquisa dos factores que regulam esse equilíbrio e a determinação dos efeitos da deslocação forçada do mesmo para um dos mecanismos é um desafio interessante a enfrentar.

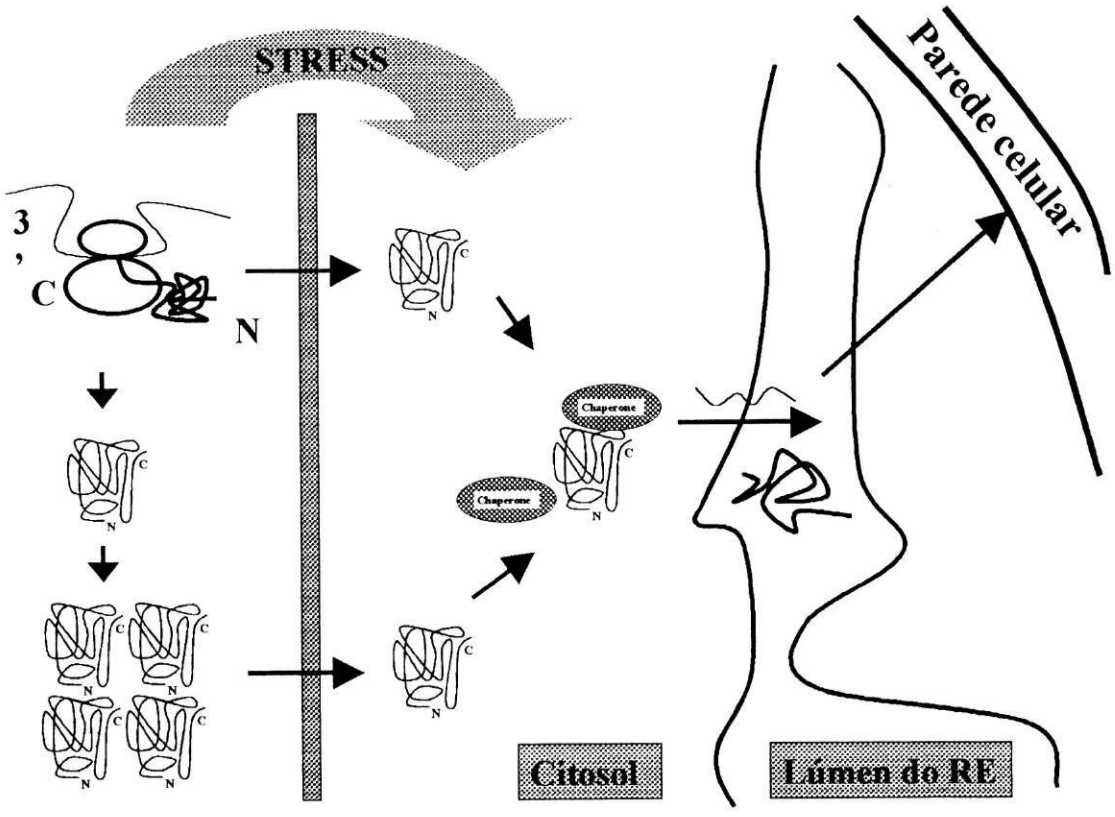


Figura 1:

Esquema ilustrativo de um possível equilíbrio entre a produção de p37 sob uma forma tetramérica que permanece no citosol e sob uma forma de cadeia única que é endereçada para a parede.

BIBLIOGRAFIA

A

Allen, R. W., Trach, K. A . e Hoch, J. A. (1987). Identification of the 37 kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as GAPDH. *J. Biol. Chem.* **262**, 649-653

Al-Mahmood, S., Giummelly, S., Bonaly, R., Delmotte, F. e Monsigny, M. (1988). *Kluyveromyces bulgaricus* yeast lectins. Isolation of N-acetylglucosamine and galactose-specific lectins, their relation with flocculation. *J. Biol. Chem.* **263**, 3920-3934

Alloush, H. M., López-Ribot, J. L., Masten, B. J. e Chaffin, W. L. (1997). 3-Phosphoglycerate kinase: a glycolitic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans. Microbiology* **1143**, 321-330

Amory, D. E:, Rouxhet, P. G. e Dufour, J. P. (1988).Flocculence of brewery yeasts and their surface properties: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. *J. Inst. Brew.* **94**, 79-84

Amory, D. E. e Rouxhet, P. G. (1988). Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis*: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 61-70

Arnold, W. N. (1991). Periplasmic space. em "The yeasts-yeast organelles." (Rose, A. H. and Harrison, J. S. (Eds.)). Academic press, London, 279-295

B

Bacon, J. S. D., Farmer, V. C., Jones, D. e Taylor, I. F. (1969). The glucan components of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastucture. *Biochem. J.*, **114**, 557-567

Ballou, C. E. (1982). em "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: life cycle and inheritance." (Strathern, J. N., Jones, E. W. e Broach, J. R. (Eds)). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 335-360

Ballou, C. E. (1990). Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae mnn* mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Meth. Enzymol.* **185**, 440-470

Bellal, M., Boudrant, J. e Bonaly, R. (1995). Flocculation dispersion in *Kluyveromyces lactis. Process Biochemistry*, vol **30, 7**, 641-648

Benghezal, M., Lipke, P. N. e Conzelmann, A. (1995). Identification of six complementation classes involved in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell. Biol.* ***130***, 1333-1344

Bidard, F., Bony, M., Blondin, B., Dequin, S. e Barre, P. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae FLO1* flocculation gene encodes a cell surface protein. *Yeast* **11**, 809-822

Blachly-dyson, E. e Stevens, T. H. (1987). Yeast carboxipeptidase Y can be translocated and glycosylated without its amino-terminal signal sequence. *J. Cell. Biol.* **104**, 1183-1191

Bony, M., Barre, P. e Blondin, B. (1998). Distribution of the flocculation protein, flo1p, at the cell surface during yeast growth: the availability of flo1p determines the flocculation level. *Yeast*, **15**, 25-35

Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A. e Bussey, H. (1990). Yeast *KRE* genes provide evidences for a pathway for cell wall β-glucan assembly. *J. Cell. Biol.* **110**, 1833-1843

Bossier, P., Goethals, P. e Rodrigues-Pousada, C. (1997). Constitutive flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of the *GTS1* gene, coding for a 'Glo'- type Zn-finger- containing protein. *Yeast* **13**, 717-725

Bourdineaud, J. P., VanDer Vaart, J. M., Donzeau, M., De Sampaio, G. e Verrips, C. T. (1998). Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Microbiol.* **27**, 85-98

Brodski, J. L. e Schekman, R. (1993). A sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteolipossome. *J. Cell. Biol.* **123**, 1355-1363

Bulawa, C. E. (1992). *CSD2*, *CSD3* and *CSD4* genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell Biol.* **12**, 1764-1776

Bulawa, C. E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Ver. Microbiol.* **47**, 505-534

Bu'Lock, J. D. (1980) Reactor design for conversion of dilute sugar wastes into useful biomass. *Int. Ferm. Symp. London* **6**, 93

C

Cabib, E. e Bowers, B. (1971). Chitin and yeast budding: localization of chitin in yeast bud scars. *J. Biol. Chem.* **246**, 152-159

Cabib, E., Roberts, R. L. e Bowers, B. (1982). Synthesis of the yeast cell and its regulation. *Annu. Rev. Biochem. 51*, 763-793

Cabib, E., Bowers, B. e Roberts, R. L. (1983). Vectorial synthesis of a polysaccharyde by isolated plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3318-3321

Cabib, E., Drgon, T., Drgonova, J., Ford, R. A. e Kollar, R. (1997). The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 200-204

Calderone, R. A. e Braun, P.C. (1993) Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch. Med. Res.* **24**, 275-279

Carlile, G. W., Tatton, W. G. e Borden, K. L. (1998). Demonstration of a RNA-dependent nuclear interaction between the promyelocytic leukemia protein and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* Nov. 1, **335 (Pt 3)**, 691-696

Casanova, M., Lopezribot, J. L., Martinez, J. P. e Sentandreu, R. (1992). Characterization of cell wall proteins of yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labbeling with biotin: comparison with other techniques. *Infect. Immun.* **60**, 4898-4901

Cassone, A. (1989). Cell wall of *Candida albicans*:its functions and its impact on the host. *Curr. Top. Med. Mycol.* **3**, 248-314

Castro, C., Ribas, J. C., Valdivieso, H., Varona, R., del Rey, F.e Durán, A. (1995). Papulacandin b resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (2,3) β-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol.* **177**, 5732-5739

Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, M., Gozalbo, D., e Martínez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* Mar 1998, 130-180

Challinor, S. W., Power, D. M. e Tonge, R. J. (1964). Effects of inositol-deficiency on yeast with particular reference to chemical composition of the cell and of the cell wall. *Nature*, **203**, 250-251

Cid, V. J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M., Nombela, C. and Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Rev.* Sep. 1995, 345-386

Cleves, A. E. e Bankaitis, V. A. (1992). Secretory pathway function in *Saccharomyces cerevisiae. Adv. Microbial. Physiol.* **33**, 73-144

Cohen, R. E. e Ballou, C. E. (1981). Mannoproteins: stucture. em "Encyclopedia of plant physiology" vol 13B (Tanner, W. e Lewuns, F. A. (Eds)). Springer Verlag, Berlin, 441-458

Conzelman, A., Riezman, H., Desponds C. D. e Bron, C. (1988). A majour 125 kDa membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* **7**, 2233-2240, 653-661

Conzelmann, A. Frankhauser, C. e Desponds, C. (1990). Myoinositol gets incorporated into numerous membrane glycoproteins of *Saccharomyces cerevisiae*, incorporation is dependent on phosphomannomutase (SEC53). *EMBO J.* **9**, 653-661

Cool, B. L. e Sirover, M A. (1989). Immunocytoichemical localization of the base excision repair enzyme uracil DNA glycosylase in quiescent and proliferating normal human cells. *Cancer. Res.* **49**, 3029-3036

Costa, M. J. e Moradas-Ferreira, P. (1993). *S. cerevisiae* flocculation: identification of specific cell wall proteins. *Proc. E. B. C. Cong.* 283-290

Cross, G. A. M. (1990). Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 1-39

D

D'Arrigo, A., Manera, E., Longhi, R. e Borgenese, N. (1993). The specific subcellular localization of two isoforms of cytichrome b5 suggests novel targeting pathways. *J. Biol. Chem.* **268**, 2802-2808

De Nobel, J. G., Klis, F. M., Priem, J., Munnik e Van den Ende, H. (1990). The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity *in Saccharomyces cerevisiae. Yeast* **6,** 491-499

De Nobel, J. G. e Barnett, J. A. (1991). Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* **7**, 589-598

De Nobel, H. e Lipke, P. N. (1994). Is there a role for GPIs in cell wall assembly in yeast? *Trends Cell. Biol.* **4**,42-45

Djaczenko, W. e Cassone, A. A. (1971). Visualization of new ultrastructural components of the cell wall of *Candida albicans* with fixatives containing TAPO. *J. Cell Biol.* **52**, 185-192

Douglas, C.M., Foor, F. e Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Mandala, S. M., Frommer, B. R. e Kurtz, M. B. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae FKS1 (ETG1)* gene encodes an integral membrane protein which is a sub-unit of β 1,3-glucan- synthase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**, 12907-12911

Drgonova, J., Orgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, S. G., Ford, R. A., Chan, C. S. M. Takai, Y. e Cabib, E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis., *Science*, **272**, 277-279

Duffour, J. P. e Malcorps, P. (1989). Molecular structure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *XIII International Specialised Symposium on Yeasts.*, 3-14

E

Eddy, A. A. e Rudin, A. D. (1958) Part of the yeast surface apparently involved in flocculation. *J. Inst. Brew.* **64**, 19-21

Elorza, M. V., Marcilla, A. e Sentandreu, R. (1987). Formation of a new cell wall by protoplast of *Candida albicans*: effect of papulacandin B, tunicamycin and nikomycin. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2315-2325

Elorza, M.V., Marcilla, A. e Sentandreu, R. (1988) Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of the glycosidic bonds and polydispersity of their mannan moieties. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 2393-2404

Esser, K., Henrichs, J. e Kues, U. (1987). Genetic control of flocculation of yeast with respect to application in biotechnology. *Process biochem.* **18**, 21-23

F

Falcão Moreira, R., Fernandes, P.A. e Moradas-Ferreira, P. (1998) *Kluyveromyces marxianus* flocculence and growth at high temperature is dependent on the presence of the protein p37. *Microbiology* **144**, 681 – 688

Fernandes, P. A., Keen, J. N., Finnndlay, J: B. C. e Moradas-Ferreira, P. (1992). A protein homologous to glyceraldeyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochem. Biophys. Acta* **1159**,, 67-73

Fernandes, P.A., Sousa, M. and Moradas-Ferreira, P. (1993) Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast* **9**, 859 – 866

Fernandes, P. A. (1994) Tese de Doutoramento. Floculação da *Kluyveromyces marxianus*: caracterização molecular da proteína de parede p37 e respectivo gene. Universidade do Porto

Fernandes, P. A., Sena Esteves, M. e Moradas-Ferreira, P. (1995). Characterization of the glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase gene family from *Kluyveromyces marxianus* –Polymerase Chain Reaction–single –strand conformation polymorphism as a tool for the study of multigenic families. *Yeast* **11**, 725-733

Ferguson, M. A: J: e Williams, A. F. (1988). Cell surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol stuctures. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**.285-320

Ferguson, M. A. em "Lipid Modification Of Proteins: A Practical Approach" (Turner, A. J., Hoope,r N. (Eds.)), IRL Press, Oxford, 1992, 191-230

Field, C. e Schekman, R. (1980). Localized secretion of acid phosphatase reflects the pattern of cell surface growth in *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol.* **86**, 123-128

Fisher, D. J. (1975). Flocculation- some observation on the surface charges of yeast cells. *J. Inst. Brew.* **81**, 107-110

Fleet, G. H. e Manners, D. J: (1977). The enzymatic degradation of an alkali-soluble glucan from the cells walls of *Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol.* **98**, 373-386

Fleet, G. H. (1991). em "The yeasts-yeast Organelles". (Rose, A:H: e Harrison, J: S. (Eds.)), Academic Press 199-277

Fuge, E. K. (1997). em Yeast stress responses, (Cap2), stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (Margaret Werner- Washburne, Hohmann, S. e Mager, Willemith (Eds.))

Fujino, S. e Yoshida, T. (1976). Premature flocculation of yeast induced by some wort constituents. *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd* **19**, 45-53

G

Gatti, E., Popolo, L., Vai, M., Rota, N. e Alberghina, L. (1994). O-linked oligosaccharides in yeast glycosyl phosphatidylinositolç-anchored protein gp115 are clustered in a serine-rich region not essential for its function. *J. Biol. Chem.* **269**, 19695-19700

Ghigo, J. M.e Wandersman, C. (1994). A carboxyl-terminal four aminoacid motif is required for secretion of the metalloprotease PitG through the erwinia chrysanthemi protease secretion pathway *J. Biol. Chem.* **269**, 8979-8985

Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. e Gozalbo, D. (1997). The glycolitic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* **179**, 4992-4999

Glick, B. S. (1995). Can hsp 70 proteins act as force-generating motors? *Cell* 80, 11-14

Goldman, R. C., Sullivan, P. A., Zakula, D. e Copobianco, J. O. (1995) Kinetics of β 1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur. J. Biochem* **227**, 372-378

Goudot-Crozel, V., Caillol, D., Djabali, M. e Dessein, A. J. (1989). The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37 kDa glyceraldehyde-3P-dehydrogenase. *J. Exp. Med.* **170**: 2065-2080

H

Haguenaeur-Tsapis, R. (1992) Protein-specific features of the general secretion pathway in yeast: the secretion of acid phosphatase. *Mol. Microbiol.* **6**, 573-579

Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. e Kitada, K. (1998) Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 53-59

Hartl, F. U: e Ellis, R. J. (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Current Opinion in structural Biology* **9**, 102-110

Hartland, R. P., Vermmeulen, C. A., Klis, F. M., Sietsma, J. H. e Wessels, J. G. H. (1994). The linkage of 1,3 β-glucan yo chitin duting cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae. Yeast* **10**, 1591-1599

Hartmann, E. e Kalies, K-U. (1998). Protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Biochem.*, **254**,1-8

Harris, J. O. (1959). Possible mechanism of yeast flocculation. *J. Inst. Brew.* **65**, 5-6

High, S. (1995). Protein translocation at the membrane of the endoplasmic reticulum. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* vol **63**, 233-250

Hodgson, J. A., Berry, D. R. e Johnston, J. R. (1985). Discrimination by heat and proteinase treatment between flocculent phenotypes conferred on *Saccharomyces cerevisiae* by the genes *FLO 1* and *FLO5. J. Gen. Microbiol.* **131**, 3219-3227

Holland, M. J. e Holland J. P. (1979). Isolation and characterization of a gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **254**, 5466-5474

Holland, M. J e McAlister, L,. (1985). Isolation and characterization of yeast strains carrying mutations in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. The J. of Biol. Chem., 260, 15013-15018

Holmberg, S. e Kielland-Brandt, M. C. (1978). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* temperature sensitive for flocculation. Influence of oxygen and respiratory deficiency on flocculence. *Carlsberg Res. Commun* **43,** 231-233

Hong, Z. Mann, P., Brown, N. H., Tran, L. E., Shaw, K. J., Hare, R. S. e DiDomenico, B. (1994). cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in 1,3 β-glucan synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1017-1025

Horisberger, M. e Vonlanthen, M. (1977). Localization of mannan and chitin in thin section of budding yeasts with gold markers. *Arch. Microbiol. 115*, 1-5

Hussain, T., Lematre, J., Charpentier, C.. e Bonaly, R. (1986). Comparative studies of flocculation and deflocculation of *Saccharomyces uvarum* and *Kluyveromyces bulgaricus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 269-273

Hutchins, K. e Bussey, H. (1983). Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of β 1,6 glucan. *J. Bacteriol.* **154**, 161-169

I

Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Adachi, C., Arisawa, M., Furuichi, Y. e Watanable, T. (1995). Characterization and cloning of a β 1,3-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **321**, 845-854

J

Jantti, J.., Keranen, S., Toikkanen, Kuiismanen, E. e Ehnholm, C. (1994). Membrane insertionand intracellular transport of yeast syntaxin sso2p in mammalians cells. *J. Cell Sci.* **107**, 3623-3633

Jelsma, J, e Kreger, D. R. (1975). Ultrastructural observations on β 1,3-D-glucan from fungal cell walls. *Carbohydr. Res.* **43**, 200-203

Jentoft, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends. Biochem. Sci.* **15**, 291-294

Jiang, B., Ram, A. F., Sheraton, J., Klis, F. M. e Bussey, H. (1996). CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in β 1,6 –glucan assembly. *J. Bacteriol.* **178**, 1162-1171

Johnston, J. R. e Reader, H. P. (1982). Genes conferring and suppressing flocculation in brewing and laboratory strains of *Saccharomyces*. Proc. 11th Int. conf. On yeast Genetics and Molecular Biology, Montpelier, 124

Johnston, J. R. e Reader, H. P. (1983). Em "Genetic control of flocculation. Yeast Genetics, fundamental and Applied Aspects. (Spencer J. F. T e Smith D. M. (Eds)), Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelbegerg, Tokyo, 205-224

Johnson, B. F., Walker, T., Calleja, G. B. e Seligy, V. I. (1988). Sexual co-flocculation and assexual self-flocculation in budding and fission yeasts: experimental establishment of fundamental difference. *Can. J. Microbiol.* **34**, 1105-1107

Jungnickel, B. e Rapoport, T. A., (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulim membrane. *Cell*, **82**, 261-270

K

Kapteyn, J. C., Montiijn, R. C., Dijkgraaf, G.J e Klis, F. M. (1994). Identification of β1,6-glucosylated cell wall proteinsin yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur. J. Cell Biol.* **65**, 402-407

Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G.J., Van den Ende, H. e Klis, F. M., (1995). Covalent association of β 1,3 glucan with β 1,6 glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **177**, 3788-3792

Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. e Klis, F. M. (1996). Retencion *of Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β 1,3-/ β 1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**, 337-345l

Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. e Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. et biophys. Acta* **1426**, 373-383

Kawamoto, R. M. e Caswell, A. H. (1986). Autophosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microssomes. *Biochem.* **25**, 656-661

Kilick, K. A. (1971). Modification of the composition and stucture of the yeast cell wall by culture in the presence of sulfur aminopacids. *J. bacteriol.* **106**, 931-937

Kim, J. W., Kim, S. J., Hans, S. M., Paik, S. Y., Hur, S. Y,, Kim, Y. W., Lee, J. M. e Namkoong, S. E. (1998). Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human cervical cancers. Gynecol. Oncol. Nov. **71 (2)**, 266-269

Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**,851-869

Klis, F. M. (1994). Em "Protein secretion in yeast. in The mycota I, growth, differentiation and Sexuality." (Wessels/Meinhardts (Eds.)), Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Klis,F. M., Caro, L.H. P., Vossen, J. H., Kapteyn, J. C., Ram, A. F. J., Montijn, R. C., Van Berkel, M. A. A. e Van Den Ende, H. (1997). Identification and characterization of a major building block in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Soc. Trans.* **25(3)** 6279-6284

Kliman, H. F. e Steck, T. I. (1980). Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the human red cell membrane. A kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 6314-6321

Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R. e Sone, H. (1998). Region of *FLO1* proteins responsible for sugar recognition. J. *Bacteriol.* **180**, 6503-6510

Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, Robbins, P. W. e Cabib, E.(1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β1,3 glucan. *J. Biol. Chem.* **270**, 1170-1178

Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., kapteyn, J. C., Klis, F. M. e Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. β1,6 glucan interconnets mannoprotein, β1,3 glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**, 17762-17775

Kopecka, M. e Kreger, D. R. (1989). Assembly of microfibrils in vivo and in vitro from 1,3 β-D glucan synthesized by protoplasts of *Sacharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **143**, 387-395

Koronakis, V. e Hughes, C. (1993). Bacterial signal peptide-independent protein export: Hlyb-directed secretion of hemolysin. *Semin. Cell. Biol.* **4**, 7-15

Krainer, E., Stark, R. E., Naider, F., Alagramam, K. e Becker, J. M. (1994). Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ^{13}C-NMR. *Biopolymers* **34**, 1627-1635

Kramer, R. A., Tomchak, I. Ruben, S. M. e Rosen, C. A. (1990). Expression of the HTLV-1 taz transactivator in yeast: Correlaction between phenotypic alterations and Tax function in higher eukaryotes. *Aids. Res. Hum. Retroviruses,* **6**, 1305-1309

Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L. E. e Jackson, B. J. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 915-944

Kulay, U.; Anhert-Hilger, G. , Hartmann, E., Wiedenmann B., Rapoport, T. a. (1995). Transport route for synaptobrevin *via* a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J.* **107**, 14, 217-223

L

Lachaal, M., Berenski, C. J., Kim, J. e Jung, C. Y. (1990). An ATP-modulated specific association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **265**, 15449-15454

Lee, K. W., Shalaby, K. A., Thakur, A., Medhat, A., Karim, A. M., e LoVerde, P. T. (1995). Cloning of the gene for phosphoglycerate kinase from *Schistosoma mansoni* and characterization of its gene product. *Mol.Biochem. Parasitol.* **71**, 221-231

Lehle, L. (1992). Protein glycosylation in yeast. *Antoine van Leeuwenhoeck* **61**, 133-134.

Leidich, S. D., Drapp, D. A. e Orlean, P. (1994). A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinisitol anchor synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 10193-10196

Leidich, S. D., Kostova, Z., Latek, R. R., Costello, L. C., Drapp, D. A, Gray, W., Fassler, J. S. e Orlean, P. (1995) Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants *gpi2* and *gpi3* are defective in the synthesis of N-acettttylglucosaminyl phosphatidylinositol. Cloning of the *GPI2* gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 13029-13035

Lipke, P. N. e Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new stucture and new challenges. *J. of Bacteriol.*, **180**, 3735-3740

Lipke, P. N. e Hull-Pillsbury, C. (1984). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae tup1* mutants. *J. Bacteriol.* **159**, 797-799

Lipke, P. N., Wojciechwicz, D. e Kurjan, J. (1989). *AGα1* is the structural gene for *Saccharomyces cerevisiae* α-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3155-3165

Lo, W.S. e Draginis, A.M. (1996) *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* **178**, 7144 – 7151

Lopez-Romero, e. Ruiz-Herrero, J (1977). Bioynthesis of β-glucans by cell-free extracts from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* **500**, 372-384.

Lu, C., Kurjan, J. e Lipke, P. N. (1994). A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* α-agglutinin. *Mol. Cell Biol.* **14,** 4825-4833

Lyons, T. P. e Hough, J. S. (1970)[1]. The role of yeast cell wall in brewing. *Brew. Dig.* **45,** 52-60

Lyons, T. P. e Hough, J. S. (1970)[2]. Flocculation of brewer's yeast. *J. Inst. Brew.* **76**, 564-571

Lyons, T. P. e Hough, J. S. (1971). Further evidence for the cross-bridging hypothesis of flocculation of brewer's yeast. *J. Inst. Brew.* **76**, b300-305

Lu, C. F., Montijn, R. C., Brown, J. L. Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H. e Lipke, P. N. (1995). Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of α-agglutinin and β1,6 glucan in the *S. cerevisiae* cell wall. *J. Cell. Biol.* **128**, 333-340

Lussier, M. A., Sdieu, A. M., Winnetr, E., Vo, D. H., Sheraton, J., Storms, R. K. e Bussey, H. (1997) Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome allows identification of *KTR5, KTR6* and *KTR7* and definition of the nine-membered *KRE2/MNT1* mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast* **13,** 267-274

M

Manners, D. J., Masson, A. J., Patterson, J. C, Bjorndale, H. e Lindberg, B. (1973). The structure of the β 1,6-glucan of the yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**, 31-36.

Marcilla, A., Elorza, M. V., Mormeneo, H., Rico, H. e Sentandreu, R. (1991). *Candida albicans* mycelial cell wall stucture: supramolecular complexes released by Zymolase, chitinase and β-mercaptoethanol. *Arch. Microbiol.* **155**, 312-319

Manners, D. J., Masson, A. J. e Patterson, J. C. (1973). *Biochem. J.* **135**, 19-30

Masy, C. L., Henquinet, A. e Mestdagh, M. M. (1991) Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1298-1306.

Masy, C. L., Henquinet, A. e Mestdagh, M. M. (1992) Fluorescence study of lectinlike receptors involved in the flocculation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Can j. microbiol.* **38**, 405-409

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. e Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3 β-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5761-5681

Mbawala, A. Al Mahmood, Al, Loppinet, S, e Bonaly, R. (1990) Acetolysis and ^{4}HNMR studies on mannans isolated from very flocculent and weakly flocculent cell of *Pichia pastoris. IFP 206,J. Gen. Microbiol.* **136**, 1279-1284

McMurrough, I. e Rose, A. H. (1967). Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and stucture of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **105**, 189-203

Meaden, P., Hill, K., Wagner, J., Sliipetz, D. e Mann, A. (1990). The yeast *KRE5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for β 1,6-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3013-3019

Meyrath, J. e Braun, R. (1980).Optimization of yeast production from effluents using flocculant strains. *Int. Ferment. Symp. London* **6**, 25-31

Miki, B.L:A., Poon, N. H., James, A. P. e Seligy, V. I. (1982) Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **150**, 878-889

Mill, P. J. (1964). The nature of the interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **35,** 661-68

Molano, J., Bowers, B. e Cabib, E. (1980) Distribution of Chitin in the yeast cell wall. A structural and biochemical study. *J. Cell Biol.* **85**, 199-212

Moll, P. C. e Wessels, J. G. H. (1987). Linkages between glucosaminoglycan and glucan determine alkali-insolubility of the glucan in walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**, 95-99

Montijn, R. C., Van-Rinsum, J., Van Schagen, F. A. e Klis, F. M. (1994). Glucommannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* **269**, 19338-19342

Montijn, R. C., Vink, E., Roemer, T., Bussey, H., Lipke, P. N. e Klis, F. M. (1995). Intracellular synthesis of β 1,6-glucan of yeast in a *KRE6* and *SKN1* dependent fashion. *Proc. 17th Int. Conf. On Yeast Genetics and Mol. Biol.*, S334

Moradas-Ferreira, P., Fernandes, P. A. e Costa, M J. (1994). Yeast flocculation-the role of cell wall proteins. *Colloids surf B Biointerf.* **2**, 159-164

Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M. e Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1145-1154

Muesch, A., Hartmann, E., Rohde, K., Rubartelli, A., Sitia, R. e Rapoport, T. A. (1990). A novel pathway for secretory proteins? *Trends Biochem. Sci.* **15**, 86-88

N

Nakayama, K. I., Fang, Y., Tanaka, A. e, Jigami, Y. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*

Nishiara, H., Toraya, T. e Fukui, S. (1976). Induction of floc-forming ability in brewe's yeast. *J. Ferm. Technol.* **54**, 356-360

Nishiara, H., Toraya, T. e Fukui, S. (1982). Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effect of metal ions, protein denaturants and enzyme treatments. *Arch. Microbiol.* **131**, 112-115

Nishiara, H., Toraya, T. e Fukui, S. (1987). Effect of chemical modification of cell surface components on the floc-forming ability. *Arch. Microbiol.* **115**, 19-23

Nickerson, W. J. (1963) *Bacteriol. Rev.* **27**, 305

Novick, P., Field, C. e Scheckman, R. (1980). Identification of 23 comploementation groups required for post-translational events in the yeast secretory path way. *Cell* **21**, 205-215

Nurminem, T.e Suomalainen, H. (1971) *Biochem. J.* **125**, 963

O

Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components, p 229-362., em "Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, vol. 3. Cell cycle and cell biology". (J. Pringle, J. Broach, e E. Jones (Eds.)) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Osumi, M., sato, M., Ishijima, S. A., Konomi, M., takagi, T. e Yaguchi, H. (1997) Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Scizosacharomyces pombe. Fung. Genet. and Biol.* 24, 178-206

P

Pammer, M., Briza, P., Ellinger, A., Schuster, T., Stucka, R., Feldmann, H. e Breitenbach, M. (1992). DIT101(CDS2, CAL1), a cell cycle –regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast* **8,** 1089-1099

Pasteur, L. (1876). Etudes sur la bierre. *Gauthier Villars, Paris*

Pastor, F. I: J., Valentin, E., Herrero, E. e Sentandreu, R. (1984). Stucture of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannoproteins released by zymolase and their contribution to wall architecture. *Biochem. Biophys. Acta* **802**, 292-300

Pendrak, M. L. e Klotz, S. A. (1995). Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**, 103-114

Perucho, M., Salas, J. e Salas, M. L. (1977). Identification of the mammalian DNA-binding protein P8 as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **81**, 557-560

Podzorski, R. P., Gray, G. R. e Nelson, R. D. (1990). Different effects of *Candida albicans* mannan and mannan-derived oligosaccharides on anti-gen-stimulated lymphoproliferation in vitro. *J. Immunol.* **144**, 707-716

Popollo, L., Vai, M., Gatti, M., Porello, e Bonfante, S., Baleswtrini, P., Alberghinnna, I. (1993). Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI- anchored protein gp115 in morphogenesis and cell separation. *J. Bacteriol.* **175**, 1879-1885

Q

Quadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B, Arisawa,M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, TD. E. e Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory sub-unit of β 1,3 glucan synthase. *Science* **272**, 279-281

R

Ram. A. F. J., Brekelmans, S. S. C., Oehlen, L. J. W. M. e Klis, F. M. (1995). Identification of two cycle-regulated genes affecting the β1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**, 165-170

Ram, A. F. J. (1996). Isolation and characterization of calcofluor white hypersensitive mutants involved in the synthesis of β -glucan in *Saccharomyces cerevisiae.* Tese de doutoramento. Univ. Amsterdam, Holanda

Ram, A. F. J., Van Den Ende, H. e Klis, F. M. (1998). Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 249-255

Rapoport, T. A., Rolls, M. M. e Jungnickel, B. (1996)[1]. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 499-504

Rapoport, T. A., Jungnickel, B. e Kulay, U. (1996)[2]. Protein transport across the eukariotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 271-303

Regan, D. L. e Skicko, J. (1979). Flocculation of *Chlorella vulgaris* by *Lactobacillus casei. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechhnol.***7**, 155-160

Robbins, A. R., Ward, R. D. e Oliver, C. (1995). A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *The J. of Cell Biol.*, **130**, 1093-1104

Robertson, R. (1980). *Can. J. Microbiol.* **58**, 564

Roncero, C., Valdivieso, M.H., ribas, J. c. and Durán, A. (1988). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistyant to Calcofluor white. *J. Bacteriol.* **170**, 1945-1949

Roses, A. D., Burke, J. R., Vance, J. M. e Strittmatter, W. J. (1996). A role for GAPDH in apoptosis and neurodegeneration. *Nature Med.* June1996, **vol2, nº6**, 609-610

Rose, A. H., (1984). Physiology of cell aggregation flocculation by *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. em "Microbial adhesion and aggregation."(Marshal, K. C. (Ed.)) 323-335

Roy, A., Lu, C. F., Marykwas, D. L., Lipke, P. N. E. e Kursan, J. (1991). The AGA1 product is envolved in cell surface attachement of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4196-4206

Russell, I. Dowhanick, T., Raspor, P., Sobczak e Je Stewart, G. G. (1980) Yeast flocculation-the influence of divalent ions. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congress*, 529-536

S

Saito, H., Yoshioka, Y., Yoloi, M. e Yamada, J. (1990). Distinct gelation mechanisms between linear and branched 1,3 β-D-glucans as revealed by high resolution solid state ^{13}C NMR. *Biopolymers* **29**, 1689.1698

Saito, K., Sato, S., Shimoi, H., Lefugi, H. e Tadenuma, M. (1990). Flocculation mechanism of *Hansenula anomala*. **J224**. Agric Biol. Chem. 54, 1425-1432

Sanz, P. Herrero, E. e Sentandreu, R. (1989). Role of glycosylation in the incorporation of intrinsic mannoproteins into cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**, 265-270

Schekman, R. e Novick, (1982). The secretory process and yeast cell surface assembly. em "The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Metabolism and gene expression." (Strathern, J. N., Jones, E. W. e Broach, J. R. (Eds.)) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 361-398

Schreuder, M. P., Brekelmans, S., Van den Ende, H. e Klis, F. M. (1993). Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 399-409

Schreuder, M. P. (1994). Targeting of heterologous proteins to the cell wall of yeast and possible applications. Tese de Doutoramento. Univ. Amsterdam, Holanda

Sharma, S. C. e Singh,(1990). Lipid composition and lectin mediated agglutination of yeast cells grown in fatty acid enriched medium. *Biochem. Arch.* **6**, 223-232

Shaw, J. A., Moll, P. C., Bowers, B., Silverman, B., Valdivieso, M. H., Durán, A. e Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell. Biol.* **114**, 111-123

Shemaetek, E. M. e Cabib, E. (1980) Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation β 1,3 glucan synthase by ATP and GTP. *J. Biol. Chem.* **235**, 895-902

Sheperd, M. G., Poulter, R. T: M. e Sullivan, P. A. (1985). *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenecity. *Annu. Ver. Microbiol.* **39**, 579-614

Sheperd, M G. (1987). Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit. Ver. Microbiol.* **15,** 7-25

Shimoi, H., Limura, Y. e Obata, T. (1995) Molecular cloning of *CWP1*: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein solubilised with *Rarobacter faecitabidus* protease. *I. J. Biochem.* **118,** 302-311

Shoemaker, C., Gross, A., Gebremichael, A. e Harn, D., (1992). cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1842-1846

Siegler, K. M., Mauro, D. J., Seal, G., Wurzer, J., de Riel, J. K. e Sirover, M. A. (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8460-8464

Sieiro, C., Reboredo, N.M. e Villa, T.G. (1997) Flocculation of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 461-466

Silberstein, S., Collins, P. G. , Kelleher, D. J., Rapiejko, P. J. e Gilmore, R. (1995) The αsubunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase complex is essential for vegetative growth of yeast and is homologous to mamalian ribophorin *I. J. Cell Biol.* **128**, 525-536.

Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. L. e Cabib, E. (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4735-4739

Silva, L. R. S. (1998). In relatório de estágio "Estudo das caracteísticas fermentativas de uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada"

Simon, S. M., Peskin, C. S. e Oster, G. F. (1992). What drives the translocation of proteins? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3770-3774

Singh, R. e Green, M. R. (1993). Sequence–specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science (Wash. DC)* **259**, 365-368

Sipos, G., Puoti, A. e Conzelmann, A. (1994). Glycosylphosphatidylinositol mmembrane anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: absence of ceramides from complete precursor glycolipids. *EMBO J.* **13**, 2789-2796

Somers, M., Engelborghs, Y. e Baert, J. (1990). Analysis of the binding of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to microtubules, the mechanism of bundle formation and the linkage effect. *Eur. J. Biochem.* **193**, 437-444

Sousa, M. J., Teixeira, J. A. e Mota, M. (1992). Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 14, 213-218

Stewart, G. G. e Garrison, I. F. (1972). Some observations of co-flocculation in *Saccharomyces cerevisise*. *Proc. Amer. Soc. Brew. Chem.* 118-131

Stewart, G. G., Russel e Garrison, I. F. (1973). Further studies on flocculation and co-flocculation in brewer's yeast strains: *Proc. Amer. Soc. Brew. Chem.* 100-106

Stewart, G. G., Russel, I, e Garrison, I. F. (1975). Some considerations of the flocculation characteristics of ale and larger yeast strains. ZJ. *Inst. Brew.* **81**, 248-257

Stewart, G. G.e Goring, T. E. (1976). Effect of some monovalent and divalent ions on the flocculation of brewer's yeast strains. *J. Inst. Brew.* **82,** 341-342

Stewart, G. G., Garrison, I. F., Goring, T. E., Meleg, M., Pipasts, P and Russel, I. (1976). Biochemical and genetic sstudies on yeast flocculation. *Kemia-Kemi* **3,** 465-479

Stirling, C. J. (1999). Protein targeting to the endoplasmic reticulum in yeast. *Microbiology*, **145**, 991-998.

Stokke, B. T., Elgsaeter, A., Hara, C., Kitamura, S. e Takeo, K. (1993). Physicochemical properties of 1,6-branched 1,3 –β D glucans. 1. Physical dimensions estimated from hydrodynamic and electron microscopic data. *Biopolymers* **33**, 561-573

Stratford, M. (1989). Yeast flocculation:calcium specificity. *Yeast* **5**, 487-496

Stratford, M and Assinder, S. (1991). Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**, 559-574

Stratford, M. (1992) Yeast flocculation: receptor definition by *mnn* mutants and concavalin A. *Yeast* **8**, 635-645

Stratford, M e Carter, A. (1993). Yeast flocculation:lectin synthesis and activation. *Yeast* **9**, 371-378

Straver, M.H., Van der Aar, P.C, Smit, G. e Kijne, J. W. (1993) Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort. *Yeast* **9**, 527-532

Straver, M. H., Smit, G. e Kijne, J. W. (1994)[1]. Purification and partial characterization of a flocculin from brewer's yeast involved in flocculation. *Appl. Envirom. Microbiol.* **60**, 2754-2758

Straver, M. H., Traas, V. M., Smit, G. e Kijne, J. W. (1994)[2]. Isolation and partial purification of mannose-specific agglutinin from brewer's yeast involved in flocculation. *Yeast* **10**, 1183-1193

Steiblová, E. (1984). The yeast cell wall- a marker system for cell cycle controls. em "The microbial cell cycle", (Nurse, P. E Steiblová (Eds)) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 127.141

Sullivan, P. A., Chiew, Y.Y., Moloy, C., Templeton, M. D. e Sheperd, M. G. (1983). An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Can. J. Microbiol.* **29**, 1514-1525

T

Tanner, W. e Lehle, I. (1987) Protein glycosylation in yeast. *J. bacteriol.* **166**, 364-367

Taylor, N. W. e Orton, W. I. (1975).Calcium in flocculence of *Saccharomyces cerevisiae. J. Inst. Brew.* **81**, 53-57

Teixeira, J., Gonçalves, M. H., Gama, G., Moradas-Ferreira, P e Mota, M. (1989). *Biotechnol. Lett.*

Teixeira, J. A., e Mota, M. (1990). Utilization of an external loop bioreactor for the isolation of a flocculent strain of *Kluyveromyces marxianus. Curr. Microbiol.* **20**, 209-214.

Teunissen, A. W. H. R., Van den Berg, J. e Steensma, H. Y. (1993). Physical localiuzation of the flocculation gene *FLO1* on chromosome I of *Saccharomyces cerevisiae. Yeast* **9**, 1-10

Teunissen, A.W.R.H. e Steensma, H.Y. (1995) The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**, 1001-1013

Titorenko, V. I., Ogrydziak, D. M. e Rachubinski, R. A. (1997). Four distinct secretory pathways serve protein secretion, cell surface growth, and peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica. Molecular and Cellular Biology*, Sept 1997, 5210-5226

Toh-E, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T. and Matsui, Y. (1993). Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**, 481-494

U

Udenfriend, S., Micanovic, R. e Kodukula, K. (1991) Structural requirements of a nascent protein for processing to a PI-G anchored form: studies in intact cells and cell free systems. *Cell Biol. Intl. Ref.* **15**, 739-759

V

Vai, M. Popolo, L., Grandori, R., Lacan, e.Albergina, L. (1990). The cell cycle modulated glycoprotein is one of the major yeast proteins containing glycosylphosphatidyl-inositol. *Biochem. Biophys. Acta*, **1038**. 277- 285

Valentin, E., Herrero, E., Pastor, F. I. J. e Sentandreu, R. (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae. J. Gen . microbiol.* **130**, 1419-1428

Valentin, E., Herrero, E., Rico, H., Miragall, F. e Sentandreu, R. (1987). Cell wall manoproteins during the population growth phases in *Saccharomyces cerevisiae. Arch: microbiol.* **148**, 88-94

Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E. e Durán, A. (1998). *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **114**, 101-109

Van Berkel, M. A. A., Caro, L. H. P., Montijn, R. C. e Klis, F. M. (1994) Glucosylation of chimeric proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* **177**, 3104-3110

Van Der Vaart, J. M., Caro, L. H. P., Chapman, J. W., Klis, F. M. e Verrips, C. T. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae J. Bacteriol.* **177**, 3104-3110

Van Der Vaart, J. M., te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Klis, F. M. e Verrips, C. T. (1996). The β 1,6 glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 401-407

Van Der Vaart, J. m., Te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Toschka, H. Y., klis, F. M. e Verrips, C. T. (1997). Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins *Appl. Envirom. Microbiol.* **63**, 615-620

Van Rinsum, J. e Van den Ende, H. (1991). Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae mmm9*. *Yeast* **7**, 717-726

Vergères, G., Yen, T.S. B., Aggeler, J., Lausier, J. e Waskell, L. (1993). A model system for studying membrane biogenesis: overexpression of cytochrome b_5 in yeast results in marked proliferation of the intracellular membrane. *J. Cell Sci* **106**, 249 - 259

Vossen, J. H., Muller, W. H., Lipke, P. N. e Klis, F: M. (1997). Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrent biogenesis of cell wall proteins. *J. Bacteriol.* **179**, 2202-2209

W

Williams, F. E. e Trumbly, R. J. (1990). Characterization of *TUP1*, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6500-6511

Williams, D. L., McNamee, R.B., Jones, E. L., Pretus, H. A., Ensley, H. E., Pretus, H. A., Ensley, H. E., Browder, I. W. e Di Luzio, N. R. (1991). A method for the solubilization of 1,3 β-D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.* **219**, 203-213

Williams, J. W., Ernandez, J. R. e Stewart, G.G. (1992). Temperature-sensitive flocculation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Tech.*, 105-110

Wojciechowicz, D., Lu, C. F., Kurjan, J. e Lipke, P. N. (1993). Cell surface anchorage and ligand-binding dommains of the *Saccharomyces cerevisiae* call adhesion protein alpha-agglutinin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Mol. Cell. Biol.* **13,** 2554-2563

Y

Yamashita, I. e Fukui, S. (1983). Mating signals control expression of both starch fermentation genes and a novel flocculation gene *FLO8* in the yeast *Saccharomyces. Agric. Biol. Chem.* **47**, 2889-2896

Yang, W., Kairong, T. e Stanley Jr., S. L. (1994). *Entamoeba histolytica* has an alcohol dehydrogenase homologous to the multifunctional adhE gene product of *Escherichia coli. Mol. Biochem. Parasitol.* **64**, 2930-2935

Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo. J. M., Narasimhan, M. L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L. R., Paino D'urzo, M. e Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1997). Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7082-7087

Z

Zlotnik, H., Fernandez, P., Bowers, B. and Cabib, E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external wall layer that determines porosity. *J. Bacteriol.* **159**, 1018-1026n