

Lokalizacija i fiziološka uloga proteina stanične stijenske kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

KUI 32/2002
Prispjelo 12. listopada, 2002.
Prihvaćeno 29. ožujka, 2002.

D. Kokanj i V. Mrša*

Laboratorij za biokemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu,
Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stanična stijenska kvasca *Saccharomyces cerevisiae* građena je od polisaharidnog kostura glukana, te sadrži više od 30 različitih manoproteina. Za njih se smatra da igraju različite uloge u izgradnji i modificiranju stanične stijenske kada to zahtijeva rast i različiti događaji tijekom staničnog ciklusa. Osim toga oni su važni za interakcije stanice s okolinom kao i za međustanične interakcije pri aglutinaciji ili flokulaciji. Proteini stanične stijenske mogu se podijeliti u tri grupe ovisno o mehanizmu ugradnje u staničnu stijenu. Jedna grupa proteina za stijenu je vezana nekovalentno, a identifikacija nekoliko predstavnika ove skupine pokazala je da najvjerojatnije svi oni posjeduju enzimatsku aktivnost. Druga skupina proteina vezana je kovalentno za β -1,3-glukan putem β -1,6-glukana. Ova skupina proteina može se izolirati iz stanične stijenske tretmanom različitim glukanznim preparatima. Posljednja skupina proteina može se izolirati iz stanične stijenske ekstrakcijom pomoću 30 mmol L^{-1} NaOH, ali veza kojom su oni vezani na stijenu zasad nije poznata.

Ovaj rad donosi pregled do sada identificiranih i djelomično karakteriziranih proteina stanične stijenske sve tri navedene grupe. Opisane su dosadašnje spoznaje o mehanizmima za ugradnju proteina u stijenu kao i saznanja o njihovoj strukturi, te potencijalnoj funkciji.

Ključne riječi: Stanična stijenska kvasca, manoproteini, biosinteza stanične stijenske, glukanaze

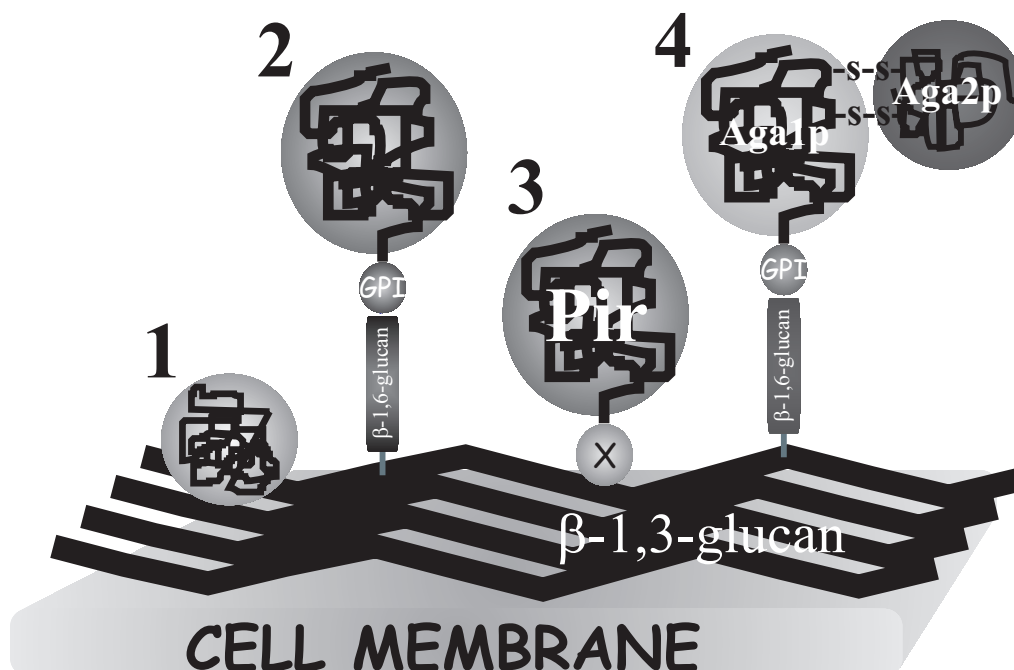
UVOD

Stanica kvasca omeđena je čvrstom polisaharidnom staničnom stijenkicom. Ta struktura često se opisuje kao "ekstracelularna organela" koja stanici daje nužnu mehaničku stabilnost, ali osim toga sudjeluje i u nizu procesa kojima stanica komunicira sa svojom okolinom. Poznato je da stanica kvasca može podnijeti tlak i do 15 bara¹ i pritom još uvijek zadržati dostatnu fleksibilnost prijeko potrebnu za rast i pupanje. Za razliku od stanične stijenske bakterija, struktura i djelovanje kvašćeve stijenske nisu ni približno tako dobro istražene. Iako je prikupljeno dosta saznanja o biokemijskim mehanizmima sinteze pojedinih komponenta stanične stijenske, još uvijek se malo zna o njihovoj ugradnji i komponiranju u složenu strukturu omotača. Posljedica kombiniranja gradivnih elemenata je kompleksna građna stanična stijenska kvasca koja se sastoji od β -1,3-glukana, β -1,6-glukana, hitina i manoproteina (slika 1.) Smatra se da se prvo izgrađuje unutrašnji strukturni sloj, koji se sastoji od β -1,3-glukana i odgovoran je za čvrstoću stijenske. Potom se sintetizira vanjski, manoproteinski sloj²⁻⁴ za koji se smatra da sudjeluje u različitim biološkim funkcijama. Osim te dvije komponente, stijenska ima i male količine β -1,6-glukana preko kojeg se jedna skupina mano-

proteina (vidi kasnije) veže na β -1,3-glukan^{5,6} i hitin koji se uglavnom nalazi u ožiljcima pupova koji preostaju od hitinskih prstenova koji se formiraju između stanice majke i stanice kćeri tijekom pupanja.^{7,8} Male količine hitina raspoređene su i u samoj staničnoj stijenci i tu su vjerojatno važni u održavanju njene čvrstoće.^{9,10} Općenito je prihvaćeno da je glavno djelovanje polisaharida stijenske u očuvanju mehaničke stabilnosti stanice, no još se uvijek ne zna točna funkcija većine njenih manoproteina. Interesantno je da se većina ovih proteina može ukloniti bez većih posljedica na oblik i osmotsku stabilnost stanice. Može se pretpostaviti da neki proteini posjeduju enzimatsku aktivnost koja je potrebna za izgradnju stijenske tijekom rasta i diobe stanica ili su uključeni u strukturalne promjene u stijenci tijekom pojedinih razdoblja staničnog ciklusa. Drugi proteini su najvjerojatnije potrebni za interakcije stanica kvasca s okolinom, kao i tijekom interakcija između stanica u procesima aglutinacije^{11,12} i flokulacije.¹³ Objavljeno je više pokušaja sistematizacije proteina stanične stijenske kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, ali svi oni pokazuju da se proteini stijenske u osnovi mogu podijeliti na dvije skupine prema načinu kojim su vezani na strukturalne polisaharide stijenske. Postupak izolacije proteina iz stijenske nužno odražava karakter veze između proteina i polisaharida. Budući da se jedna skupina proteina iz stijenske može osloboditi zagrijavanjem u SDS-u i β -merkaptetanolu, smatra se da su oni vezani nekovalentno na stijenu ili se drže za stijenu putem disulfidnih mostova. Za proteine koji u stijenci zaostaju nakon ovakvog tretmana i iz stijenske se mo-

*Corresponding author

Vladimir Mrša – Laboratorij za biokemiju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska
Tel +385 (01) 4605 293, E-mail vmrsamapbf.pbf.hr



Slika 1 – Načini povezivanja proteina stanične stijenke kvasca s β -1,3-glukanskim kosturom stijenke. 1. proteini nekovalentno vezani s β -1,3-glukanom koji se iz stijenke mogu ekstrahirati SDS-om; 2. proteini kovalentno vezani na β -1,3-glukan koji se iz stijenke ekstrahiraju glukanzama; 3. proteini kovalentno vezani na β -1,3-glukan koji se iz stijenke ekstrahiraju pomoću NaOH (Pir-porodica proteina); 4. Aga2p protein koji je za stijenku vezan disulfidnim mostom s Aga1p proteinom.

Fig. 1 – Ways of yeast cell wall proteins binding to the β -1,3-glucan moiety of the wall. 1. proteins noncovalently attached to β -1,3-glucan extractable by SDS; 2. covalently bound proteins extractable by glucanases; 3. covalently bound proteins extractable by NaOH; 4. Aga2p protein bound to the wall through a disulphide bond with Aga1p.

gu izolirati samo enzimskom razgradnjom glukana pomoću preparata glukanaza kao što su zimolijaza¹⁴ ili laminarinaza¹⁵ smatra se da su kovalentno vezani na polisaharidni dio stijenke.

Pri prvim pokušajima da se identificiraju pojedinačni proteini stanične stijenke, pojavili su se ozbiljni problemi zbog jakih nespecifičnih interakcija između glukana i intracelularnih proteina, osobito pri niskom pH.¹⁶ Kao rezultat tih interakcija, tijekom mehaničkog razaranja stanice stanična stijenka se onečišćuje intracelularnim proteinima, osobito glikolitičkim enzimima.¹⁷ Taj problem prevladan je specifičnim obilježavanjem proteina stanične stijenke sulfo-NHS-biotin reagensom za biotiniziranje proteina. Taj reagens zbog svoje izrazito hidrofilne prirode ne može proći kroz membranu stanice pri inkubaciji s čitavim stanicama, nego specifično reagira s proteinima stijenke.^{18,19} Elektroforetska analiza biotiniziranih proteina dovela je do identifikacije 10 proteina topljivih u SDS-u i 7 proteina izoliranih pomoću glukanaza. Također je nađena grupa proteina koja u stijenci zaostaje nakon tretmana SDS-om i β -merkaptotanolom, a izolira se ekstrakcijom pomoću 30 mmol L⁻¹ NaOH, preko noći na 4 °C, što je ukazivalo da postoji još jedan, do tada neotkriven mehanizam lokalizacije kojim se ekstracelularni proteini mogu uklopiti u staničnu stijenku.¹⁹

Cilj ovog pregleda je sumirati dosadašnje spoznaje o načinu kojim se te tri skupine proteina usmjeravaju i vežu na ugljikohidratni dio stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* te o tome na koji način je lokalizacija povezana s njihovom biološkom funkcijom.

Nekovalentno vezani proteini stanične stijenke

Raniji pokušaji izolacije i karakterizacije nekovalentno vezanih proteina stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* temeljili su se na ekstrakciji SDS-om te separaciji ekstrahiranih proteina elektroforezom. Za tako dobivene proteinske vrpce smatralo se da odgovaraju relativnoj količini i veličini izoliranih proteina stijenke, iako niti jedan pojedinačni protein nije bio identificiran. Velik broj elektroforetskih vrpca i sam njihov profil ukazivao je međutim već tada na to da većina proteina izoliranih tim postupkom možda nisu proteini stanične stijenke. Ispitivanje nekih fizikalno-kemijskih svojstava različitih polisaharida stanične stijenke pokazalo je da β -1,3-glukan nespecifično veže proteine, osobito pri niskim pH vrijednostima, pretežito vodikovim vezama. Zbog toga stapanje intracelularnim proteinima, koji se nalaze u velikoj količini nakon mehaničkog razaranja stanice, daje pogrešnu sliku na elektroforezi izvednoj s proteinima nakon izolacije. Specifično obilježavanje proteina stanične stijenke biotinom pomoglo je u prevladavanju ovog problema iako je pročišćavanje pojedinačnih ovako označenih proteina često otežano zbog toga jer su onečišćeni velikim količinama glikolitskih enzima ponekad iste veličine kao i neki od proteina stijenke (Cappellaro, C. usmeno priopćenje).

Proteini nekovalentno vezani na strukturne polisaharide stanične stijenke izoliraju se obično otopinom $w = 1-2\%$ SDS-a koja sadrži do 5% β -merkaptotetanol ili primjenom Leammli-pufera za uzorke za elektroforezu. Ekstrakcija se provodi kuhanjem 5–10 minuta na temperaturi od 95–100 °C^{14,15,20}. Vrlo sličan profil proteina može se dobi-

ti i tretiranjem cijelih stanica pomoću 2 mmol L⁻¹ DTT preko noći na 4 °C.²⁰ Ta činjenica ukazivala je na to da bi ovi proteini mogli biti vezani disulfidnim mostovima na druge proteine koji su u stijenci vezani kovalentno. Međutim takav način povezivanja dokazan je samo za jedan protein (a-aglutinin, vidi kasnije). Osim toga količina proteina izoliranih pomoću DTT-a uvijek je znatno manja od količine proteina izoliranih pomoću SDS-a, pa bi učinak DTT-a mogao biti i posljedica indirektnog utjecaja na strukturu stanične stijenke koji rezultira otpuštanjem manje količine nekovalentno vezanih proteina.

O samom mehanizmu koji je odgovoran za vezanje proteina stanične stijenke na polisaharidne komponente ne zna se mnogo, budući da se nikakve vidljive strukturne karakteristike ovih proteina ne razlikuju od onih koje stanica luči u medij ili od onih koji se nalaze u periplazmatskom prostoru. Kao što je već ranije spomenuto, nađeno je da zbog izraženog potencijala za stvaranje vodikovih mostova, β -1,3-glukan može reagirati s mnogim proteinima *in vitro* u kiselom pH.¹⁶ Iznimku čine periplazmatski proteini invertaza i kisela fosfataza. Također se može primijetiti da mehaničko razaranje stanica u kiselom pH rezultira brojnim interakcijama između intracelularnih proteina i stanične stijenke, dok dodatkom tih proteina cijelim stanicama ne dolazi do takvih interakcija, što ukazuje na to da su one specifične za unutrašnji glukanski sloj stanične stijenke.²¹ Stoga se zapravo postavlja pitanje koje strukturno obilježja sprečava vezanje proteina izlučenih u podlogu vodikovim mostovima na glukan. Važno je spomenuti da stanice kvasca u normalnim uvjetima rasta luče u podlogu tek manji broj proteina, a neki od njih nađeni su i u samoj stijenci. Opisana je naravno i sekrecija brojnih heteroloških proteina, ali većina njih prekomijerno su producirani s plazmida koji se u stanici nalaze u velikom broju kopija. Zbog svega toga ne možemo sa sigurnošću utvrditi postojanje određenog biokemijskog mehanizma kojim se nekovalentno vezani proteini vežu na stijenk. Za odgovor na to pitanje potrebna su nova saznanja o strukturi tih proteina te njihovoj interakciji s ugljikohidratima stanične stijenke.

Hitinaza (Cts1p) i egzoglukanaza (Exg1p)

Prva dva opisana proteina stanične stijenke, hitinaza (Cts1p) i egzoglukanaza (Exg1p), identificirani su prvo kao proteini koji se izlučuju u podlogu. Preciznije studije njihove lokalizacije pokazale su da se oko 10% svakog proteina ugrađuje i u staničnu stijenk. Cts1p je enzim koji oslobađa stanicu kćeri od stanice majke razgradnjom hitinskog prstena, nakon što je stvoren primarni i sekundarni septum između dvije stanice²². Zato se smatra da je upravo dio proteina vezan na stijenk fiziološki aktivan. Mutanti kojima nedostaje protein Cts1p rastu u nakupinama, jer se stanice kćeri ne mogu odvojiti od stanica majki. C-terminalni kraj ovog proteina veže se specifično na hitin čime se osigurava njegova visoka koncentracija u području hitinskog prstena.

Exg1p glukanaza izolirana je iz podloge, a njegova egzo- β -1,3-glukanazna aktivnost određena je *in vitro*.²³ Pravo djelovanje Exg1p proteina kao i fiziološki supstrat s kojim reagira nije poznat, a *exg1* mutant nema nikakav vidljivi fenotip. Stoga niti važnost frakcije ovog enzima u staničnoj stijenci nije moguće prosuditi.

Endoglukanaza (Bgl2p)

Prvi izolirani i sekvencionirani nekovalentno vezani protein stijenke bio je Bgl2p.²⁴ Izoliran je iz staničnih stijenki zagrijavanjem u vodi ili puferu na 95 °C. Količina proteina u ekstraktu bila je razmjerno velika, što je znatno olakšalo njegovo pročišćavanje. Biokemijska karakterizacija izoliranog Bgl2p prvo je ukazivala na to da taj protein ima egzo- β -1,3-glukanaznu aktivnost, ali su kasnije *in vitro* studije pokazale da je taj protein zapravo ili endo- β -1,3-glukanaza²⁵ ili transglukozidaza²⁶, što ponajprije ovisi o koncentraciji supstrata. Disrupcija *BGL2* gena ne dovodi do vidljivog fenotipa,²⁴ ali do neke mjere uspijeva popraviti štetu nastalu mutacijama nekih drugih proteina stijenke (Scw4p, Scw10p i Scw11p). Ta činjenica ukazuje na moguću antagonističku funkciju Bgl2p prema tim proteinima, ali njegovo točno djelovanje u staničnoj stijenci još uvijek nije poznato.

Scw4p i Scw10p

Kao što je ranije spomenuto, obilježavanje stanične stijenke biotinom pokazalo se najuspješnijom metodom za identifikaciju i karakterizaciju proteina stijenke. U ekstraktu dobivenom iz obilježenih stijenki SDS-om i β -merkaptoetanolom identificirano je 9 proteina označenih sa Scw1p-Scw9p (soluble cell wall proteins).¹⁹ Budući da reakcija Scw proteina s SDS-om otežava njihovo daljnje pročišćavanje, isprobani su i alterativni postupci njihove ekstrakcije. Nađeno je da ekstrakcija staničnih stijenki pomoću 2 mmol L⁻¹ DTT na 4 °C preko noći daje sličan profil proteina²⁰, od kojih je sedam pročišćeno i sekvencirano s N-terminalnog kraja. Dobivene sekvencije pokazale su da je protein Scw2p već ranije opisana hitinaza Cts1p, dok je protein Scw6p identičan Exg1p, a protein Scw9p proteinu Bgl2p. Činjenica da nije došlo do obilježavanja intracelularnih proteina potvrdila je da su ranije nađeni glikolitski enzimi vezani na staničnu stijenk¹⁷ najvjerojatnije pogreške i da je označavanje biotinom vrlo specifično.

Pročišćavanjem iz biotiniziranog DTT ekstrakta nađena su tri nova, do tada neidentificirana proteina stijenke, označena kao Scw3p, Scw4p i Scw10p. Scw10p putuje jednako kao i Scw4p u gelu za elektroforezu, pa se može detektirati i izolirati samo iz *scw4* mutanta. Vrpca proteina Scw4p i Scw10p najjača je među Scw proteinima, te se njihovom izolacijom, pročišćavanjem i sekvenciranjem N-terminalnog kraja pokazalo da su ta dva proteina iste veličine i imaju povoljnu međusobnu homologiju te da su 63 % identičnosti. Uspoređivanjem sekvencija ta dva proteina s drugim genima i proteinima u različitim bazama podataka nađena je presudna homologija s nekolicom glukanaza ili proteina sličnih glukanazama. Zanimljiva je činjenica da je najveća homologija uočena s Bgl2p.²⁰ Zbog toga su ta dva proteina izolirana i testirana je njihova potencijalna hidrolitička aktivnost *in vitro* pomoću različitih polisaharidnih supstrata kao što su laminarin, kvaščev β -1,3-glukan, hitin, pustulan, *p*-nitrofenilglukozid itd. Niti Scw4p niti Scw10p nije hidrolizirao ni jedan od ovih supstrata, što ukazuje na činjenicu da ti proteini najvjerojatnije kataliziraju kompleksnije reakcije u stijenci, za koje im je potrebno ili više od jednog supstrata

ili točna struktura ili trodimenzionalna orijentacija supstrata.

Pojedinačna disrupcija *SCW4* ili *SCW10* gena nije dovela do vidljivog fenotipa, što se svakako može smatrati posljedicom velike sličnosti ta dva proteina. Dvostruki mutant osjetljiv je na djelovanje inhibitora biosinteze stanične stijenke, bojila Kalkofluor bijelo i Kongo crveno. Ta dva spoja često se primjenjuju za inhibiciju sinteze stanične stijenke. Smatra se da Kalkofluor bijelo reagira s kristalnom strukturom hitinskih lanaca i na taj način sprječava njihov rast i sintezu, dok Kongo crveno djeluje u prvom redu na sintezu glukana. Dvostruki mutant *scw4scw10* ima smanjenu sposobnost parenja, što je najvjerojatnije indirektna posljedica strukturalnih promjena u stijenci. Stanična stijenka *scw4scw10* mutanta ima znatno manje kovalentno vezanih proteina koji se izoliraju pomoću glukanaza, što ukazuje na to da bi ta dva proteina mogla na neki način sudjelovati u vezanju proteina kovalentnim vezama na β -1,6-glukan²⁰. To može biti ili direktno, sudjelovanjem u enzimskom sistemu koji prenosi proteine s GPI-sidrom na glukan, ili indirektno pri oblikovanju pravilne strukture glukana.

Scw3p

Scw3p je još jedan od proteina identificiranih *N*-terminalnim sekvenciranjem biotiniliranih proteinskih vrpca. Gen *SCW3* je uspoređen s drugim genima dostupnim u različitim bazama podataka. Najveća homologija nađena je između *SCW3* i članova tzv. *SUN* porodice. Ta skupina gena sastoji se od tri člana, *SIM1*, *UTH1* i *NCA3*, čiji su produkti uključeni u različite stanične procese. *Sim1p* sudjeluje u regulaciji aktivnosti CDK,²⁷ *Uth1p* pridonosi starenju stanice i uključen je u odziv u različitim stresnim situacijama,²⁸ dok je *NCA3* kloniran zahvaljujući sposobnosti da kao supresor ispravi pogrešku u mitohondrijskoj sintezi podjedinica 6 i 8 F0 dijela ATP sintetaze.²⁹ Očigledno je

da niti jedan od ovih proteina nije protein stanične stijenke i ostaje nepoznanica što ta četiri proteina imaju zajedničko. Osim sličnosti sa *SUN* porodicom, *SCW3* je sličan i genu kvasca *Candida wickerhamii* koji kodira za β -glukanazu koja ima nutritivno djelovanje kada stanice rastu na podlozi u kojoj su celulodekstrani izvor ugljika.³⁰ Da li i ta ekstracelularna glukanaza slično utječe na *S. cerevisiae*, još se uvijek ne zna. Nedavno je postulirano da taj protein ima utjecaj na odvajanje stanica majki od stanica kćeri, budući da *scw3* mutanti često imaju veći broj pupova,³¹ a nađeno je i da je djelovanje hitinaze kod tog mutanta poremećeno. Još jedan homolog *Scw3p* proteina, *Psu1p* opisan je kod *Schizosaccharomyces pombe*, ali je kod tog kvasca taj protein prijeko potreban za rast.³²

Scw8p

Scw8p je još jedan protein stijenke koji je identificiran biotiniliranjem. Nađeno je da je *Scw8p* identičan *Ccw5p* proteinu koji je kovalentno vezan na staničnu stijenku (vidi kasnije). Zbog toga se može pretpostaviti da je *Scw8p* ili intermedijer *Ccw5p* koji još nije kovalentno vezan na glukan ili je iz nekog razloga krivo lokalizirani oblik tog proteina.

Iz svih tih podataka o proteinima koji su nekovalentno vezani u staničnoj stijenci kvasca *S. cerevisiae* možemo zaključiti da su ti proteini ili enzimi s hidrolitičkom osobito glikolitičkom aktivnošću ili su homolozi takvih enzima. Budući da neki od njih ne reagiraju s uobičajnim supstratima za glukozidaze, može se pretpostaviti da kataliziraju specifičnije reakcije i da svi ne posjeduju hidrolaznu aktivnost, već neki mogu imati i ulogu transglukozidaza. Niz različitih, ponekad i antagonističkih djelovanja mogla bi objasniti i relativno velik broj tih enzima u staničnoj stijenci.

Do sada identificirani nekovalentno vezani proteini navedeni su u tablici 1.

Tablica 1 – Proteini stanične stijenke nekovalentno vezani na polisaharidni kostur stijenke

Table 1 – Cell wall proteins noncovalently attached to the polysaccharide moiety of the wall

Protein Protein	Ypd-oznaka Ypd-code	Veličina Size	Funkcija Function	Literatura References
Cts1p/Scw2p	YLR286c	116 kDa	hitinaza chitinase	22
Scw3p	YNL066w	95 kDa	homolog glukanaza glucanase homologue	19, 31
Scw4p	YGR279c	66 kDa	homolog glukanaza glucanase homologue	19,20
Scw10p	YMR305c	66 kDa	homolog glukanaza glucanase homologue	19, 20
Exg1p/Scw6p	YLR300w	44 kDa	egzoglukanaza exoglucanase	19,23
Scw8p/Ccw5p	YJL158c	41 kDa	Pir-protein Pir-protein	19
Bgl2p/Scw9p	YGR282c	29 kDa	endoglukanaza/transglukozidaza endoglucanase/transglucosidase	24

Kovalentno vezani proteini koji se iz stanične stijenke mogu izolirati pomoću glukanaza

I nakon intenzivnog ispiranja staničnih stijenki kvasca reagensima koji djeluju na nekovalentne interakcije i disulfidne mostove poput SDS-a, β -merkaptetanola, uree, guanidin-hidroklorida ili DTT-a, uglavnom pri povišenim temperaturama, u stijenci još uvijek zaostaju proteini. Stoga se smatra da su ti proteini vezani kovalentno na strukturne polisaharidne komponente stijenke. *Valentin* i sur.¹⁴ prvi su izolirali proteine iz stijenki koje su prethodno tretirane vrućim SDS-om i β -merkaptetanolom pomoću zimolijaze, komercijalnog preparata glukanaze. Kasnija istraživanja pokazala su da je laminarinaza, sličan komercijalni preparat koji se primjenjuje za analizu staničnih stijenki kvasca, mnogo povoljnija za izolaciju opisanih proteina^{15,19}, vjerojatno zbog niže proteolitičke aktivnosti sadržane u preparatu. Također se rabe i različiti glukanazni preparati koji sadrže manje nečistoća i više čiste β -1,3-glukozidazne aktivnosti, ali nakon izolacije svim tim preparatima uvijek se dobiva sličan elektroforetski profil proteinskih vrpca ekstrahiranih proteina. Tako izolirani proteini upotrijebljeni su kao osnova za karakterizaciju ove skupine proteina.

Aglutinini

Prvi bolje proučen kovalentno vezani protein stijenke kvasca *S. cerevisiae* bio je α -aglutinin.^{33,34} Biosinteza tog proteina inducira se feromonom α -faktorom nakon čega se protein ugrađuje u staničnu stijenkicu gdje podstiče reakciju aglutinacije reagirajući specifično s α -aglutininom, koji je sastavni dio stijenke stanica suprotnog tipa parenja.^{35,36} Protein je glikozilirani i ima *N*- i *O*-glikozidno vezane ugljikohidratne lance. Jedan dio proteina bogat je serinima i treoninima, te se čini da je taj dio proteina intenzivno *O*-glikozilirani. Analiza sekvencije α -aglutinina pokazala je da taj protein sadrži signal za dodavanje glikozil-fosfatidilinozitolnog (GPI) sidra na C-terminalnom kraju³⁷. Studija intermedijernih oblika α -aglutinina koji prolaze kroz sekretorni put ukazuje da se taj protein transportira od ER do Golgija, a zatim i do citoplazmatske membrane u molekulskom obliku koji već sadrži GPI-sidro. Kada protein dosegne vanjsku stranu stanične membrane, jedna od glikozidnih veza unutar GPI-sidra se hidrolizira, a protein se translocira u staničnu stijenkicu. Identifikacija sljedeća tri proteina koja se također mogu ekstrahirati pomoću glukanaza, koja su nazvana Cwp1p, Cwp2p i Tip1p, pokazala je da i ti proteini sadrže potencijalni signal za dodavanje GPI-sidra,³⁸ što ukazuje na to da je taj način vezanja proteina na staničnu stijenkicu općeniti princip. U isto vrijeme postavljena je hipoteza da se ta skupina proteina veže na β -1,6-glukan stijenke koji je s druge strane vezan za osnovni β -1,3-glukanski kostur (slika 1). Na takav zaključak navodi rezultat da se ti proteini izoliraju laminarinazom koja ima β -1,3-glukanaznu aktivnost, te da nakon toga reagiraju s antitijelima specifičnim za β -1,6-glukan.^{15,38} Pretpostavlja se da prijenos GPI-sidra na β -1,6-glukan uključuje reakciju transmanozilacije,^{6,39} ali detalji mehanizma te reakcije, niti enzimi koji sudjeluju u njima, za sad nisu poznanati.

Osim α -aglutinina u povezivanju stanica kvasca prilikom parenja *MAT α* stanica sudjeluje i partnerski protein stanične stijenke *MAT α* stanice nazvan α -aglutinin. Taj protein je zapravo kompleks koji se sastoji od dvije komponente

koje su produkti *AGA1* i *AGA2* gena. Aga2p je zapravo aktivna podjedinica α -aglutinina koja stupa u izravnu interakciju s α -aglutininom u procesu aglutinacije. Aga1p, predstavlja tzv. "core" protein, koji je na stijenkicu vezan preko GPI-sidra⁴⁰ i služi kao "nosač" α -aglutinina. Ta dva proteina povezana su pomoću dva disulfidna mosta³⁶ i za sada niti jedna druga funkcija proteina Aga1p nije poznata.

Iako se dodatkom β -merkaptetanola i DTT-a povećava količina izoliranih proteina koji su na stijenkicu vezani nekovalentnim vezama, niti za jedan od njih nije dokazano da je za njihovu lokalizaciju nužna veza s nekim drugim proteinom stijenke disulfidnim mostovima. Zbog toga je vezanje α -aglutinina za sada jedini primjer takvog načina lokalizacije u *S. cerevisiae*.

Flokulacijski proteini

Još jedna specifična funkcija stanične stijenke u kojoj sudjeluju manoproteini je flokulacija. To je nesporna reverzibilna agregacija stanica koju je većina laboratorijskih sojeva *S. cerevisiae* izgubila. Smatra se da pri flokulaciji dolazi do interakcija specifičnih lektina stijenke s mananskim dijelom drugih manoproteina. Tri su gena, *FLO1*, *FLO5* i *FLO8*, prijeko potrebna za flokulaciju.⁴¹ Flo1p protein izoliran je i pročišćen iz laminarinaznog ekstrakta.⁴² Lokalizacija tog proteina nije posve jasna jer su znatne količine istog izolirane produljenim i ponovljenim tretmanom vrućim SDS-om. Ipak, izgleda da je Flo1p uglavnom vezan preko GPI-sidra, što je dokazano činjenicom da delecijom C-terminalnog djela proteina koji je odgovoran za vezanje molekule GPI dolazi do izlučivanja Flo1p u medij. Osim toga, ta delecija dovodi i do gubitka sposobnosti flokulacije, što ukazuje na to da je Flo1p izravno odgovoran za međustanične interakcije tijekom flokulacije.⁴²

Cwp1p, Cwp2p i Tip1p

Tri proteina nazvana Cwp1p, Cwp2p i Tip1p izolirana su iz pročišćenih stijenki laminarinazom te je uočeno da na blotu reagiraju s anti- β -1,6-glukan antitijelima.¹⁵ Kao što je već spomenuto, činjenica da su ti proteini još uvijek nosili β -1,6-glukan epitop vodi zaključku da je ta skupina proteina povezana s β -1,3-glukanskom mrežom stijenke preko β -1,6-glukana. Čini se da ni jedan od ta tri proteina nema bitni utjecaj na rast, parenje ili sporulaciju te na bilo koju drugu poznatu značajku stijenke, jer odgovarajući mutanti ne pokazuju nikakav vidljiv fenotip. Uočeno je općenito slabljenje stijenke *cwp1* i *cwp2* mutanata, kao i povećana osjetljivost *tip1* stanica pri nižim temperaturama, no prava fiziološka funkcija tih proteina još nije pojašnjena.

Icw1p

Icw1p izoliran je i karakteriziran jer sadrži epitop za monoklonska antitijela pripremljena prema ekstraktu stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*.⁴³ Imunofluorescencijska analiza pokazala je da bi protein mogao biti smješten u unutarnjem sloju stanične stijenke jer je utvrđeno da antitijela mogu doprijeti do njega samo kada je vanjski manoproteinski sloj oštećen antibiotikom tunikamicinom. Moguća funkcija tog proteina je također nepoznata, a disrupcija odgovarajućeg gena dovodi do povećane osjetljivosti stani-

ca na zimoliazu te na Calcofluor white i Congo red. Autori su za ovaj protein⁴³ predložili strukturnu ulogu.

Sed1p

Sed1p izoliran je digestijom pročišćenih staničnih stijenki djelovanjem serinske proteaze I. Ta proteaza izolirana je iz *Rarobacter faecitabidus* i djeluje tako da prepozna mananski lanac vezan na molekulu proteina i cijepa peptidnu vezu u njegovoj blizini. Čini se da je Sed1p jedan od najza-stupljenijih proteina stijenke u stacionarnoj fazi rasta.⁴⁴ Zanimljivo je da je *SED1* gen prvo karakteriziran kao supresor *erd1* mutanta koji je deficitaran u zadržavanju proteina kojima je stanično odredište ER⁴⁵. No kakva je veza između tog procesa i hiperprodukcije jednog proteina stanične stijenke, potpuno je nejasno. Jedini vidljiv fenotip *sed1* mutantata je osjetljivost stanica na zimolijazu, što međutim pokazuje velik broj mutantata proteina stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*

Tir1p i Tir2p

Još je jedan protein, veličine oko 100 kDa, izoliran iz stanične stijenke kulture u stacionarnoj fazi djelovanjem proteaze I iz *Rarobacter faecitabidus*. Uočeno je da tog proteina ima vrlo malo u kulturi uzgojenoj uz aeraciju.⁴⁶ Taj protein identificiran je kao produkt *TIR1/SRP1* gena čija je indukcija stimulirana glukozom, "hladnim šokom" i anaerobiozom. Također je nađeno da je njegova regulirana Rox1p represorom.⁴⁶ Izolirani protein reagira s anti- β -1,6-glukan antitijelima što ukazuje na to da je i taj protein vezan na polisaharide stijenke, kao i drugi proteini te grupe. Tir2p je protein homologan Tir1p. Kao i za većinu drugih proteina te grupe fiziološko djelovanje tog proteina nije poznato. Osim toga, posve je nejasno zašto bi rast u anaerobnim uvjetima uzrokovao indukciju niza novih proteina stanične stijenke.

Ccw12p i Ccw13p

Označavanje proteina stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae* biotinom i njihova sistematska identifikacija otkrila je većinu kovalentno vezanih proteina stanične stijenke opisanih u drugim studijama. Pet biotiniziranih proteinskih vrpce dominirale su nakon elektroforeze,¹⁹ a naknadno su identificirana još dva proteina koja zaostaju u gelu za sabijanje⁴⁷. Prvih pet proteinskih vrpce označene su kao Ccw1p-Ccw5p, dok su dva naknadno otkrivena proteina označena s Ccw12p i Ccw13p. Sekvenciranje *N*-terminalnog kraja proteina izoliranih iz gela pokazalo je da je Ccw1p identičan proteinu *lcwp1p*, Ccw2p predstavlja *Tip1p*, a za Ccw3p pokazalo se da je smjesa proteina *Tip1p* i *lcwp1* (M. Ecker, neobjavljeni rezultat). Ccw4p nije identificiran, dok je Ccw5p bio novi do sada neidentificiran protein. Kako taj protein posjeduje sve strukturne karakteristike treće grupe proteina koji se izoliraju iz stijenke pomoću NaOH, on će biti opisan s tom skupinom u sljedećem poglavlju.

Za Ccw12p nađeno je da je produkt već ranije opisanog $\alpha 0.6$ gena koji je negativno reguliran α -faktorom.⁴⁸ To je mali, ali intenzivno *O*- i *N*-glikozilirani protein. Upitno je, međutim, može li dodatak šećera biti odgovoran za tako

veliko povećanje u veličini da protein ne ulazi u gel za razdvajanje tijekom elektroforeze. Mutacije u *CCW12* genu povećavaju osjetljivost kvasca na Calcofluor white i Congo red. Također su uočene teškoće u parenju kod ovog mutanta koje su posljedica otežanog procesa aglutinacije.⁴⁷ Kako mutant sadrži jednake količine aglutinina u stijenci tijekom indukcije feromona, teškoće u aglutinaciji se objašnjavaju promjenama strukture stanične stijenke koje onemogućuju odgovarajući kontakt između stanica suprotnog tipa parenja. Zanimljivo je da je gen *CCW12* homologan u većem dijelu genu *SED1*, ali biološko značenje te činjenice nije jasno.

Ccw13p je produkt *DAN1* gena koji se poput Tir1p i Tir2p inducira u anaerobnim uvjetima rasta.⁴⁹ Međutim nema istaknute homologije između Ccw13p i Tir1p proteina i oni očito ne pripadaju istoj porodici. Kao i za proteine Tir1p i Tir2p, tako ni za Ccw13p / Dan1p fiziološka funkcija nije poznata.

Skupina kovalentno vezanih proteina koji se ekstrahiraju pomoću glukanaza uključuje manoproteine koji dijele mnoge strukturne sličnosti. Svi oni posjeduju signal za vezanje GPI sidra na C-terminalnom kraju koji je nužan za njihovu točnu lokalizaciju. Osim toga svi su bogati hidrosilnim aminokiselinama koje su posebno brojne u pojedinim djelovima njihove sekvencije. Konačno, svi proteini ove skupine jako su glikozilirani i *N*- i *O*-glikozilacijom. O samom fiziološkom djelovanju te skupine proteina malo se zna osim onih koji se induciraju tijekom pojedinih događaja u stanici poput aglutinacije ili flokulacije. Mutacija nekih od proteina te skupine dovodi općenito do povećane osjetljivosti i slabljenja stanične stijenke.^{43,44,47} Međutim višestruka disrupcija *CCW12*, *CCW13*, *CWP1*, *TIP1* i *ICWP1* gena (čime su uklonjene najjače proteinske vrpce ove skupine) nije dovela do nekih bitnih problema u rastu mutanta, niti je za njegov rast potreban osmotski sabilizer (M. Ecker, neobjavljeni rezultat). Također, čini se da se prilikom anaerobnog rasta inducira cijeli niz proteina stanične stijenke iako veza između anaerobioze i strukture stanične stijenke za sada još uvijek nije jasna. Do sada identificirani proteini te skupine prikazani su u tablici 2.

Kovalentno vezani proteini stanične stijenke izolirani pomoću NaOH

Posebna skupina proteina dobivena je inkubacijom stijenki koje su prethodno tretirane vrućim SDS-om preko noći u 30 mmol L⁻¹ NaOH na 4 °C (tablica 3). Pet proteinskih vrpce može se razdvojiti elektroforezom biotiniziranih proteina ekstrahiranih pomoću NaOH i oni su nazvani Ccw6p – Ccw11p.¹⁹ Četiri proteina su pročišćena i sekvencirani su njihovi *N*-terminalni krajevi, što je pokazalo da je Ccw11p identičan proteinu Ccw5p koji je već ranije identificiran u laminarinaznom ekstraktu. Zbog toga se taj protein dalje označava Ccw5p. Kao što je već ranije spomenuto, osim Ccw5p još su tri druga proteina te grupe, Ccw6p, Ccw7p i Ccw8p, identificirana sekvenciranjem njihovih *N*-terminalnih krajeva. Za gen *CCW6* nađeno je da je identičan već ranije opisanom *PIR1* genu, *CCW7* odgovara genu *PIR2*, dok je *CCW8* gen identičan *PIR3* genu. Ta tri gena nađena su sekvenciranjem *FSR2* gena (odnosno njegove okoline) koji je smješten neposredno uz *PIR1* gen⁵⁰. Hibridizacijom po Southernu nađena su još dva homologna gena nazvana

Tablica 2 – Proteini stanične stijenke kovalentno vezani na polisaharidni kostur stijenke koji se mogu ekstrahirati gluknazama.
Table 2 – Glucanase extractable cell wall proteins covalently attached to the polysaccharide moiety of the wall

Protein Protein	Ypd-oznaka Ypd-code	Ekstrahiran s Extractable by	Veličina Size	Funkcija/regulacija Function/regulation	Literatura References
Ccw12p/ α 0.6p	YLR110c	glukanazama glucanases	300 kDa	negativno reguliran α -faktorom down-regulated by α -factor	47
Ccw13p/Dan1p	YJR150c	glukanazama glucanases	300 kDa	anaerobni rast anaerobic growth	47
Flo1p	YAR050w	glukanazama glucanases	300 kDa	flokulacija flocculation	41, 42
Sed1p	YDR077w	<i>R. faecitabidus</i> proteinazom I <i>R. faecitabidus</i> proteinase I, glucanases	300 kDa	stacionarne stanice stationary cells	44
Ag α 1p	YJR004c	glukanazama glucanases	250 kDa	α -aglutinin α -agglutinin	33, 34
Aga1p	YNR044c	glukanazama glucanases	73 kDa	"core" dio a-aglutinina "core" part of a-agglutinin	40
Aga2p	YGL032c	2-merkaptetanolom 2-mercaptoethanol, glucanases	22 kDa	funkcionalni dio a-aglutinina functional part of a-agglutinin	35
Tir1p/Srp1p	YER011w	<i>R. faecitabidus</i> proteinazom I <i>R. faecitabidus</i> proteinase I, glucanases	100 kDa	anaerobni rast anaerobic growth	46
Cwp1p	YKL096w	glukanazama glucanases	55 kDa	?	15
Tip1p	YBR067c	glukanazama glucanases	80 kDa	?	15
Cwp2p	YKL444	glukanazama glucanases	180 kDa	?	15
Icwp1p/Ccw1p	YLR391w	glukanazama glucanases	250 kDa	?	43

Tablica 3 – Proteini stanične stijenke kovalentno vezani na polisaharidni kostur stijenke koji se mogu ekstrahirati pomoću NaOH.
Table 3 – NaOH extractable cell wall proteins covalently attached to the polysaccharide moiety of the wall

Protein Protein	Ypd-oznaka Ypd-code	Ekstrahiran s Extractable by	Veličina Size	Literatura References
Ccw5p/Ccw11p/Scw8p	YJL158c	glucanases, NaOH	41 kDa	19
Ccw6p/Pir1p	YKL164c	NaOH	250 kDa	19
Ccw7p	YJL159c	NaOH	115 kDa	19, 51
Ccw8p/Pir3p	YKL163w	NaOH	57 kDa	19

PIR2 i *PIR3*. Ta skupina gena prvotno je privukla pozornost zbog svojih realtivno dugačkih ponavljajućih sekvencija. Za Ccw7p/Pir2p nađeno je da je identičan već ranije identificiranom proteinu HSP150, čija se biosinteza inducira na povišenoj temperaturi pri čemu dolazi do izlučivanja veće količine tog proteina u okolni medij⁵¹. Biotiniliranjem i ekstrakcijom pomoću NaOH Pir1p, Pir2p i Pir3p pronađeni su u staničnoj stijenci,¹⁹ a također je utvrđeno da i Ccw5p pripada istoj porodici koju karakterizira visoki stupanj homologije i nekoliko zajedničkih strukturnih značajki. Svi imaju identičnu ponavljajuću sekvenciju na N-terminalnom kraju, a broj ponavljajućih jedinica kreće se između 2, kod Ccw5p, i 10, kod Ccw7p. Također svi imaju mjesto

koje prepoznaje i procesira Kex2p proteaza, što je potvrđeno usporedbom s veličinom ovih proteina u *kex2* mutantu.¹⁹ Niti jedan od proteina te porodice ne sadrži signal za dodatak GPI-sidra na C-terminalnom kraju, što je karakteristično za ostale kovalentno vezane proteine stanične stijenke. Zato način njihova vezanja na glukan mora biti drugačiji od mehanizma vezanja skupine proteina koji se iz stijenke oslobađaju gluknazama. Kako se ti proteini iz stijenke izoliraju pod uvjetima blage β -eliminacije, a kako su svi intenzivno O-glikozilirani, može se pretpostaviti da O-glikozidni mananski lanci sudjeluju na neki način u povezivanju tih proteina na staničnu stijenkku. Kako je nađeno da Ccw5p izoliran iz stijenke digestijom β -1,3-glukana-

zom ne reagira s anti- β -1,6-glukan antitijelima, može se zaključiti da su ovi proteini vjerojatno izravno vezani na β -1,3-glukan.

Moguće djelovanje tih proteina u stijenci za sada je nepoznato. Disrupcija pojedinih gena koji kodiraju za tu porodicu proteina nije dovela do vidljivog fenotipa, kao što bi se moglo i očekivati s obzirom na njihovu veliku međusobnu sličnost.¹⁹ Višestruka mutacija sva četiri identificirana proteina te porodice rezultirala je povećanom osjetljivošću prema Calcofluor white i Congo red te izmjenjenom morfologijom. Stanice mutanta su veće, često nepravilnog oblika i rastu u nakupinama.⁵² Točna promjena koja se javlja u staničnoj stijenci kod tog mutanta nije poznata, ali je intenzitet promjene fenotipa u korelaciji s brojem disruptiranih gena.

Zaključak

Brojne studije proteina stanične stijenke kvasaca, najčešće *Saccharomyces cerevisiae*, pokazale su da postoje tri skupine proteina stijenke koje se međusobno razlikuju po mehanizmu kojim se proteini ugrađuju u ovu ekstracelularnu organelu. Analizom fizioloških funkcija tih proteina pokazano je da bi način na koji se oni ugrađuju u stijenku mogao biti u korelaciji s njihovim djelovanjem u stijenci. Tako su enzimi vjerojatno potrebni za oblikovanje, očuvanje i promjene strukture stanične stijenke nađeni uglavnom među nekovalentno vezanim proteinima. Za kovalentno vezane proteine često se smatra da su samo strukturalne komponente, ali njihov relativno velik broj i raznolikost ukazuju na to da i ti proteini imaju neke konkretne, za sad nepoznate, uloge. Proteini koji se iz stijenke izoliraju pomoću NaOH su najmanje istraženi, ali budući da svi pripadaju istoj porodici, moguće je da je i njihova uloga u stijenci na neki način povezana s načinom njihove ugradnje u stijenku. Kako su mnogi aspekti strukture stijenke kao i njene moguće funkcije još uvijek u velikoj mjeri nepoznata, buduća istraživanja bit će usmjerena identifikaciji preostalih proteina, potom rasvjetljavanju molekularnih mehanizama koji sudjeluju u vezanju proteina u stijenku i konačno spoznajama o njihovom fiziološkom djelovanju.

Literatura References

1. D. G. Emus, D. H. Jennings, u P. G. Ayres, L. Body (Uredn.), *Water, Fungi and Plants* (Symp. Brit. Mycol. Soc. 1985), Cambridge University Press, Cambridge, 1986, str. 27–47.
2. G. H. Fleet, u A. H. Rose, J. S. Harrison (Uredn.), *The Yeast*, 2nd Ed., Academic Press, London, 1991, str. 335–360.
3. D. J. Manners, A. J. Mason, J. C. Patterson, H. Bjorndal, B. Lindberg, The structure of a β -1,6-glucan from yeast cell walls, *Biochem. J.* **135** (1973) 19.
4. F. I. J. Pastor, E. Valentin, E. Herrero, R. Sentandreu, *Biochem. Biophys. Acta* **802** (1984) 292.
5. J. C. Kapteyn, R. C. Montijn, E. Vink, J. De La Cruz, A. Llobell, J. E. Douwes, H. Shimoi, P. N. Lipke, F. M. Klis, *Glycobiology* **6** (1996) 337.
6. R. Kollar, B. B. Reinhold, E. Petrakova, H. J. C. Yeh, G. Ashwell, J. Drgonova, J. C. Kapteyn, M. F. Klis, E. Cabib, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 17762.
7. E. Cabib, R. Roberts, B. Bowers, *Ann. Rev. Biochem.* **51** (1982) 763.
8. R. L. Roberts, B. Bowers, M. L. Slater, E. Cabib, *Mol. Cell. Biol.* **3** (1983) 922.
9. J. Molano, B. Bowers, E. Cabib, *J. Cell. Biol.* **85** (1980) 199.
10. R. Kollar, E. Petrakova, G. Ashwell, W. P. Robbins, E. Cabib, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 1170.
11. G. Fehrenbacher, K. Perry, J. Thorner, *J. Bacteriol.* **134** (1978) 893.
12. S. Doi, Y. Suzuki, M. Yoshimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91** (1979) 849.
13. M. Stratford, *Yeast* **8** (1992) 635.
14. E. Valentin, W. Herrero, J. F. I. Pastor, R. Sentandreu, *J. Gen. Microbiol.* **130** (1984) 1419.
15. R. C. Montijn, J. Van Rinsum, F. A. Van Schoger, F. M. Klis, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 19338.
16. V. Mrša, T. Ugarković, S. Barbarić, *Arch. Biochem. Biophys.* **296** (1992) 569.
17. L. Angiolella, M. Facchin, A. Stringaro, B. Maras, N. Simonetti, A. Cassone, *J. Infect. Dis.* **173** (1996) 684.
18. M. Casanova, J. L. Lopez-Ribot, J. P. Martinez, R. Sentandreu, *Infect. Immun.* **60** (1992) 4898.
19. V. Mrša, T. Seidl, M. Gentzsch, W. Tanner, *Yeast* **13** (1997) 1145.
20. C. Cappelaro, V. Mrša, W. Tanner, *J. Bacteriol.* **180** (1998) 5030.
21. R. Vuković, V. Mrša, *Croat. Chem. Acta* **68** (1995) 597.
22. M. J. Kuranda, P. W. Robbins, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 19758.
23. C. R. Vasques de Aldana, J. Correa, P. San Segundo, A. Bueno, A. R. Nebreda, E. Mendez, F. del Rey, *Gene* **97** (1991) 173.
24. F. Klebl, W. Tanner, *J. Bacteriol.* **171** (1989) 6259.
25. V. Mrša, F. Klebl, W. Tanner, *J. Bacteriol.* **175** (1993) 2102.
26. R. C. Goldman, P. A. Sullivan, D. Zakula, J. O. Capobianco, *Eur. J. Biochem.* **227** (1992) 372.
27. C. Dahman, J. F. X. Diffley, K. Nasmyth, *Curr. Biol.* **5** (1995) 1257.
28. B. K. Kennedy, N. R. Australico, J. Zhang, L. Guarente, *Cell* **80** (1995) 485.
29. P. P. Pelisser, N. Camongrand, G. Velors, M. Guerin, *Curr. Genet.* **27** (1995) 409.
30. C. D. Skory, S. N. Freer, *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 518.
31. M. Mouassite, N. Camougrand, E. Schwob, G. Demaison, M. Laclau, M. Guerin, *Yeast* **16** (2000) 905.
32. K. Omi, H. Sonoda, K. Nagata, K. Sugita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262** (1999) 368.
33. K. Hauser, W. Tanner, *FEBS Lett.* **255** (1989) 290.
34. P. N. Lipke, D. Wojciechowicz, J. Kurjan, *Mol. Cell. Biol.* **9** (1989) 3155.
35. C. Cappelaro, K. Hauser, V. Mrša, M. Watzel, C. Gruber, W. Tanner, *EMBO J.* **10** (1991) 4081.
36. C. Cappelaro, C. Baldermann, R. Rachel, W. Tanner, *EMBO J.* **13** (1994) 4737.
37. C. F. Lu, P. N. Lipke, J. Kurjan, *Mol. Cell. Biol.* **14** (1994) 4825.
38. J. M. Van Der Vaart, L. H. P. Carro, J. W. Chapman, F. M. Klis, C. T. Verrips, *J. Bacteriol.* **180** (1995) 3735.
39. P. N. Lipke, R. Ovalie, *J. Bacteriol.* **180** (1998) 3735.
40. A. Roy, F. C. Lu, D. L. Marikwas, P. Lipke, J. Kurjan, *Mol. Cell. Biol.* **11** (1991) 4196.
41. J. R. Jonhston, H. P. Reader u J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, A. R. W. Sait (Uredn.), *Yeast Genetics, fundamental and applied aspects*, Springer Verlag, New York, 1983, str. 205–224.

42. M. Bony, D. Thines-Sempoux, P. Barre, B. Blondin, J. Bacteriol. **179** (1997) 4929.
43. I. Moukadiri, J. Armero, A. Abad, R. Sentandreu, J. Zueco, J. Bacteriol. **179** (1997) 2154.
44. H. Shiomi, H. Kitagaki, H. Ohmori, Y. Iimura, K. Ito, J. Bacteriol. **180** (1998) 3381.
45. K. G. Hardwick, J. C. Boothroyd, A. D. Rudner, H. R. Pelham, EMBO J. **11** (1992) 4187.
46. H. Kitagaki, H. Shimoi, K. Itoh, Eur. J. Biochem. **249** (1997) 343.
47. V. Mrša, M. Ecker, S. Strahl-Bolsinger, M. Nimtz, L. Lehle, W. Tanner, J. Bacteriol. **181** (1999) 3076.
48. J. Seidl, W. Tanner, Yeast **13** (1997) 809.
49. O. Sertil, B. D. Cohen, K. J. A. Davies, C. V. Lowry, Gene **192** (1997) 199.
50. A. Toh-e, S. Yasunaga, H. Nisogi, K. Tanaka, T. Oguchi, Y. Matsui, Yeast **9** (1993) 481.
51. P. Russo, W. Kalkkinen, H. Sareneva, J. Paakkola, M. Makarow, Proc. Nat. Acad. USA **89** (1992) 3671.
52. V. Mrša, W. Tanner, Yeast **15** (1999) 813.

SUMMARY

Localisation and physiological role of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins

D. Kokanj and V. Mrša

Yeast cell wall is composed of about 85–90% carbohydrate and the remaining 10–15% protein. About half of the carbohydrate part of the wall is made of glucose organised in long unbranched chains in which monomeric units are linked by β -1,3-glycosidic linkages forming the structural fundament providing the required mechanical integrity and stability of the cell wall, thus fulfilling its major biological role. β -1,3-glucan serves also as a support for other molecules by which a yeast cell “sees” and “feels” its environment, most importantly for proteins. The cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contains a number of different mannoproteins. They are considered to play different roles in building, maintaining and modifying the wall itself through the life cycle. Besides, they are important for interactions of cells with their surrounding, the example of which are intercellular interactions during agglutination or flocculation. Cell wall proteins can be divided in three groups according to the mechanism by which they are attached to the wall. The first group of proteins is noncovalently connected to the cell wall structural polysaccharides and the identification of several members of this group showed that, most probably, they all possess enzymatic activities. The second group comprises proteins covalently attached to β -1,6-glucan, and they can be released from the wall by different glucanase preparations. Finally, a group of proteins can be extracted from the wall by 30 mM NaOH but the actual link by which they are attached to the cell wall is unknown.

In this review a survey of yeast cell wall proteins is made with an emphasis on our current knowledge of biochemical interactions involved in the incorporation of different groups of proteins into the wall.

Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb,
Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia

Received October 12, 2001
Accepted March 29, 2002

