



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



Università degli Studi
di Sassari

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIE MICROBICHE AGRO-
ALIMENTARI**

Università degli i studi di Sassari

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI AGRARIE E BIOTECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

SEZIONE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA

**Studio proteomico
della parete cellulare di
Saccharomyces cerevisiae
in condizioni di stress**

Tutor:
Prof.ssa Marilena Budroni

Coordinatore:
Prof. Giovanni Antonio Farris

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Francesca Fancellu

**CICLO XXI
2005-2008**

INTRODUZIONE	4
Risposta allo stress dei lieviti	5
Stress associati alla fermentazione vinaria	7
Stress osmotico	9
Carenza di nutrienti	10
Etanolo.....	12
Temperatura.....	13
Anaerobiosi	14
Altri fattori.....	15
Peculiarità dei ceppi produttori di biofilm	15
La parete cellulare di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Struttura molecolare della parete cellulare	20
Dinamica della parete cellulare	27
Funzioni della parete cellulare	30
Adesine	32
Spettrometria di massa (MS)	39
Identificazione delle proteine attraverso spettrometria di massa	43
SCOPO DEL LAVORO	48
MATERIALI e METODI	50
Ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
Terreni utilizzati	51
Isolamento della parete cellulare	52
Analisi ESI-Q-TOF	53
Preparazione del campione per l'analisi tramite Spettrometria di Massa	53
Analisi dei campioni con LC/MS/MS	54
Identificazione delle proteine tramite database	55
Analisi trascrizionale RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)	56
Estrazione RNA e retrotrascrizione.....	56
Reazione di PCR	56
RISULTATI	58
Alcune proteine “GPI-modificate” caratterizzano la parete cellulare dei ceppi flor	59

Trascrizione dei geni <i>FLO11</i>, <i>GAS1</i>, <i>GAS3</i>, <i>GAS5</i>, <i>HPF1</i>.	73
Gene <i>FLO11</i>	75
Gene <i>GAS1</i>	76
Gene <i>GAS3</i>	77
Gene <i>GAS5</i>	78
Gene <i>HPF1</i>	79
DISCUSSIONE	80
Alcune proteine “GPI-modificate” caratterizzano la parete cellulare dei ceppi flor	81
Hpf1p e Flo11p predispongono la parete cellulare alla formazione del biofilm?	91
BIBLIOGRAFIA	96

INTRODUZIONE

Risposta allo stress dei lieviti

Il regno dei funghi consiste di circa 1.5 milioni di specie, la diversità delle quali va di pari passo con l'eterogeneità degli ambienti in cui i funghi stessi vivono (Hawksworth *et al.*, 1995). Il phylum *Ascomycota* rappresenta il gruppo più abbondante e più vario fra i funghi, e i suoi membri vivono in differenti nicchie ecologiche. Molte delle nicchie in cui i funghi vivono sono instabili, le loro caratteristiche variano frequentemente e in maniera improvvisa, sottoponendo a situazioni stressanti i loro abitanti. I microrganismi spesso devono affrontare situazioni di carenza di nutrienti, variazioni di temperature esterne, di osmolarità, di umidità, pH, esposizione a sostanze tossiche e competizione con altri gruppi microbici. Gli improvvisi cambiamenti delle condizioni possono alterare l'omeostasi e la normale fisiologia cellulare. Per questo motivo le cellule hanno sviluppato sistemi in grado di monitorare le caratteristiche dell'ambiente, che consentono loro di attivare rapidamente meccanismi di difesa contro gli stress ambientali.

L'utilizzo di diverse tecniche molecolari ha consentito di evidenziare la variazione di espressione dell'intero genoma in differenti organismi, quando sottoposti a stress di diversa natura (Estruch, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Abramova *et al.*, 2001a/b; Gasch *et al.*, 2007; Erkina *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2008). Questi studi hanno mostrato che ciascuna specie reagisce, alle variazioni dell'ambiente circostante, modulando la risposta in maniera specifica in termini di geni coinvolti, di valore delle variazioni di espressione e di cinetica della risposta. Tuttavia, oltre ad una risposta specifica, alcune specie mostrano una risposta di espressione genica comune che viene detta "risposta a stress ambientali" (*Environmental*

Stress Response - ESR). Questa risposta è conservata in lontani parenti come *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, anche se alcuni aspetti della risposta allo stress e della sua regolazione sembrano essersi evoluti nel tempo.

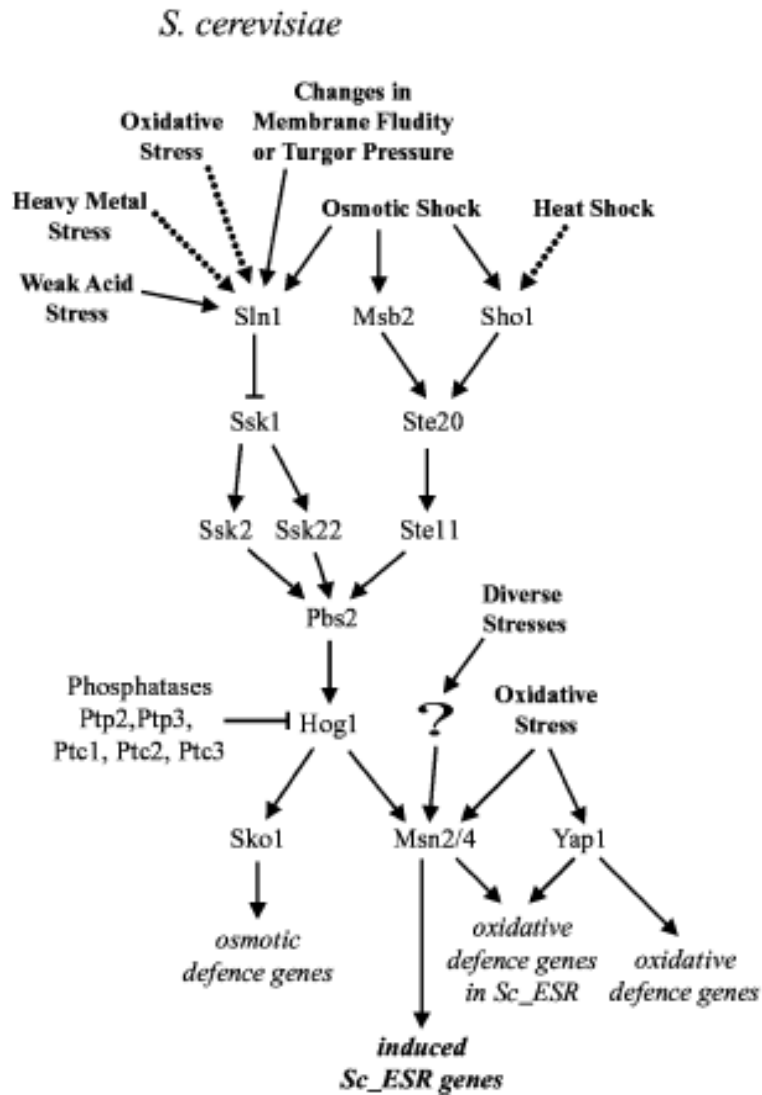


Fig.1: Proteine coinvolte nella regolazione delle pathways Hog1–Sty1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Alcune proteine intermedie e fattori di trascrizione addizionali, correlati a Hog1, sono stati omessi per semplicità (Gasch, 2007). Le frecce punteggiate rappresentano le condizioni che portano alla fosforilazione di Hog1p pur mancando l'accumulazione di Hog1p nel nucleo, alcuni stress, infatti, non sono in grado di attivare l'accumulazione di Hog1p nel nucleo, ma incrementano la fosforilazione della kinasi (MAPK) (Winkler *et al.*, 2002; Bilsland *et al.*, 2004; Sotelo *et al.*, 2006).

In principio, la ESR è stata descritta in *Saccharomyces cerevisiae*; in condizioni di stress è indotta la trascrizione di circa 300 geni mentre di altri 600 viene repressa la trascrizione in risposta a diversi tipi di stress: da calore, ossidativo o riducente, osmotico, da carenza di nutrienti, danni al DNA e pH estremi (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000). La velocità di inizio e la qualità di ESR sembra essere associata all'intensità dello stress, dal momento che cellule esposte a una dose maggiore del fattore stressante spesso mostrano cambiamenti più ampi nell'espressione dei geni ESR; questo indica che l'inizio della risposta allo stress ambientale è strettamente correlato con il livello di stress praticato sulla cellula (Gasch *et al.*, 2000).

Stress associati alla fermentazione vinaria

La fermentazione alcolica vinaria è un processo chimico attuato principalmente da *Saccharomyces cerevisiae* (Ivorra *et al.*, 1999). Durante questo processo gli zuccheri presenti nel mosto vengono convertiti in alcool e CO₂. *Saccharomyces cerevisiae* è un lievito “addomesticato” e questa sua peculiarità risale a tempi ben lontani. Infatti, i primi processi fermentativi riguardanti la produzione della birra, del vino o del pane, risalgono a migliaia di anni fa. Si può, quindi, pensare che questo periodo sia servito al lievito per adattarsi a particolari condizioni ambientali, diverse ed avverse rispetto a quelle della sua nicchia ecologica. Questo adattamento, alle diverse condizioni ed anche ai diversi stress, lo ha candidato come “il lievito” delle fermentazioni in campo alimentare, ed in particolare per le fermentazioni vinarie, panarie e birrarie (Donalies *et al.*, 2008).

La fermentazione alcolica, intesa in termini di crescita microbica, può essere suddivisa nelle fasi di latenza, esponenziale e stazionaria. Durante la fase di latenza il lievito adatta il proprio metabolismo alle alte concentrazioni iniziali di glucosio/fruttosio, per essere in grado di crescere e trasformare questi zuccheri in etanolo. Nella fase esponenziale, si ha un aumento -esponenziale- della biomassa e vengono prodotti un terzo dell'etanolo totale e la maggior parte del glicerolo. Nella fase stazionaria, sono prodotti i rimanenti due terzi di etanolo e i composti aromatici che determinano la qualità finale del prodotto (Salmon e Barre, 1998). In tutte queste fasi, le cellule di lievito, sono sottoposte a condizioni di stress quali: la carenza di nutrienti (Boer *et al.*, 2003), l'anaerobiosi (ter Linde *et al.*, 1999; Kwast *et al.*, 2002), lo stress da etanolo (Alexandre *et al.*, 2001), lo stress osmotico (Yale e Bohnert, 2001) e, in alcuni casi, le basse temperature (Homma *et al.*, 2003; Pizarro *et al.*, 2008).

Saccharomyces cerevisiae reagisce agli stress attraverso meccanismi di risposta generali e/o specifici. In contrasto, con le risposte transitorie osservate in studi di laboratorio (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001), Marks *et al.* (2008) hanno osservato modificazioni globali, nella gran parte dei trascritti, durante il processo fermentativo, evidenziando una risposta di adattamento alla condizione di stress tipica della fermentazione. Questo lavoro ha permesso di rilevare, dopo 15 giorni di fermentazione vinaria, variazioni significative nei livelli di trascrizione per il 40% del genoma di lievito; modificazioni messe in atto, dal lievito, per adattarsi alle condizioni di fermentazione del mosto. Fra i geni evidenziati, 223 sono stati definiti geni di "risposta agli stress fermentativi" (Fermentation Stress Response - FSR).

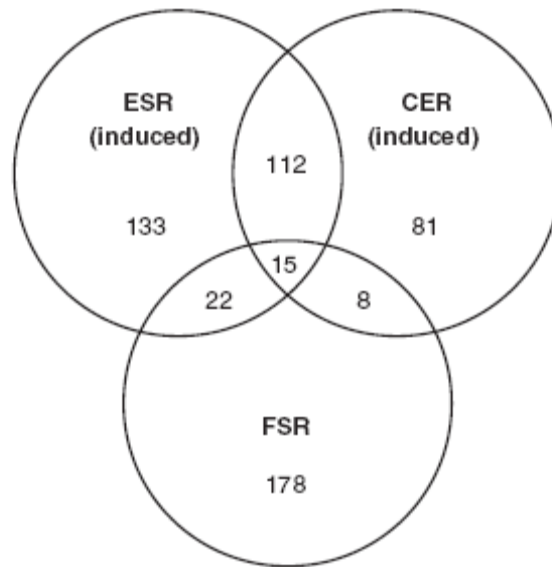


Fig.2: Diagramma di Venn, che illustra il numero di geni associati alle risposte trascrizionali agli stress. ESR: geni indotti in risposta a stress ambientali (Gasch *et al.*, 2000). CER: geni indotti da comuni condizioni ambientali (Causton *et al.*, 2001). FSR: geni indotti in risposta agli stress della fermentazione vinaria (Marks *et al.*, 2008).

Stress osmotico

Uno dei primi fattori di stress al quale il lievito va incontro, una volta inoculato nel mosto, è l'elevata concentrazione zuccherina che è di circa 21,4% (w/v) (Marks *et al.*, 2008). Gli zuccheri presenti nel mosto sono fondamentalmente costituiti da glucosio e fruttosio in rapporto 1:1. È stato evidenziato come, una elevata concentrazione del fruttosio rispetto al glucosio, sia inibente per lo sviluppo del lievito (Schutz e Garfner, 1993; 1995). Il lievito pertanto, una volta inoculato nel mosto, va incontro a condizioni ipertoniche che generano un flusso di acqua dall'interno verso l'esterno della cellula, e risponde a questo shock con diversi meccanismi, fra i quali sono inclusi la modificazione della parete cellulare e del citoscheletro (Rep *et al.*, 2000; Slaninova *et al.*, 2000), e la biosintesi del glicerolo, tesi a ristabilire l'equilibrio osmotico (Hohmann, 1997). Sono stati

individuati alcuni geni coinvolti nella risposta allo stress osmotico: *HSP12* (Varela *et al.*, 1995; Karreman *et al.*, 2007), *CTT1*, gene che codifica per la catalasi (Schuller *et al.*, 1994; He e Fassler, 2005), *GLO1* coinvolto nella sintesi del glicosilato e *GPD1* richiesto per la sintesi del glicerolo (Albertyn *et al.*, 1994; Kaino e Takagi, 2008). L'accumulo di glicerolo cellulare durante lo stress osmotico è di rilevante importanza nel processo di vinificazione, sia perché questo composto è il più rappresentato quantitativamente dei sotto prodotti della fermentazione alcolica sia perché condiziona positivamente la qualità del vino, contribuendo alla sua rotondità e pienezza.

Carenza di nutrienti

I fattori che condizionano la disponibilità di elementi nutritivi per il lievito sono numerosi: la varietà dell'uva, le caratteristiche pedoclimatiche, le condizioni del vigneto e le tecniche enologiche utilizzate per preparazione del mosto (macerazione, chiarificazione, travasi, ecc.). I nutrienti possono essere classificati in necessari per la proliferazione, ed in necessari per il mantenimento dello stato non proliferante, ma comunque metabolicamente attivo delle cellule. I nutrienti richiesti per uno stato non-proliferante comprendono una fonte di energia, una fonte di azoto e composti necessari per minimizzare gli effetti inibitori dell'etanolo. Questi vengono definiti come "fattori di sopravvivenza" (Lafon-Lafourcade e Ribereau-Gayon, 1984; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979) ed includono acidi grassi saturi e insaturi, ergosterolo, trealosio, prolina e glicina (Thomas e Rose, 1975; Lloyd *et al.*, 1993; Mansure *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 1999). Considerato che il trealosio è un disaccaride formato dal glucosio e che la prolina

è presente in grande quantità nel succo d'uva, durante la fermentazione alcolica il lievito non dovrebbe andare in contro a carenza di questi due composti. Diverso è, invece, il caso della glicina, presente in concentrazioni molto limitate, e dei composti lipidici, la cui sintesi è inibita in anaerobiosi. L'azoto ed il fosfato sono i due macronutrienti maggiormente considerati come causa degli arresti di fermentazione. *Saccharomyces cerevisiae* per adattarsi alla disponibilità dei nutrienti presenti deve modificare il suo metabolismo. Questo implica una condizione di stress per le cellule e, nelle condizioni di laboratorio, anche una diminuzione del tasso di fermentazione (Bauer e Pretorius, 2000). Inoltre, la completa assenza di, uno o più, elementi nutritivi essenziali comporta il blocco dello sviluppo e l'entrata in fase stazionaria. Le cellule arrestano il loro ciclo nella fase G1 e modificano il loro metabolismo in modo da assicurare la propria sopravvivenza. Si osserva infatti, una generale riduzione dell'attività metabolica, l'accumulo di carboidrati di riserva e di protezione, quali glicogeno e trealosio, l'induzione di proteine Hsp e la modificazione della parete cellulare. È stato dimostrato che in fermentazione questi sistemi, di risposta ed adattamento allo stress, vengono attivati per difficoltà delle cellule a percepire la disponibilità di elementi nutritivi presenti nell'ambiente (Puig e Perez-Ortin, 2000; Varela *et al.*, 2005). Per esempio, viene rallentato l'assorbimento di aminoacidi in un substrato con elevate concentrazioni di etanolo, ed è chiaro che in questo tipo di risposta, giocano un ruolo fondamentale le caratteristiche fisico-chimiche della membrana cellulare; queste, infatti, condizionano l'attività delle proteine ad essa associate, comprese quelle deputate alla percezione del segnale nutrizionale.

Etanolo

L'etanolo è un composto tossico per la gran parte degli organismi viventi anche a concentrazioni relativamente basse. L'effetto inibitorio che svolge questo alcol durante la fermentazione è ben noto (Piper, 1995; Chandler *et al.*, 2004). Infatti, all'inizio della fermentazione spontanea del mosto d'uva i microrganismi presenti sono numerosi e appartengono a specie diverse: *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Scizosaccharomyces*, ecc. (Pretorius *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2000; Valero *et al.*, 2007); con il procedere della fermentazione, e quindi con l'aumento del grado alcolico, si assiste alla progressiva scomparsa delle specie meno resistenti. Intorno ai 4-6° alcolici l'unica specie rinvenibile è *Saccharomyces cerevisiae*. Tuttavia, anche su questo lievito l'etanolo esercita degli effetti inibitori, determina un rallentamento del tasso specifico di crescita e conseguentemente dell'efficienza fermentativa (Beavan *et al.*, 1982; Baue e Pretorius, 2000; You *et al.*, 2003). Sono state descritte numerose conseguenze dovute alle elevate concentrazioni di etanolo: inibizione della crescita (Thomas e Rose, 1979; Dinh *et al.*, 2008), modificazione della fluidità della membrana (Thomas *et al.*, 1978; Aguilera *et al.*, 2006), alterazione della morfologia vacuolare ed endocitosi, cambiamenti nella composizione lipidica della membrana (Arenborg *et al.*, 1995), induzione dei geni *HSP* (Piper *et al.*, 1994) ed, infine, inibizione dell'attività enzimatica (Lopes *et al.*, 1999). L'etanolo ha anche altri effetti sulla fisiologia della cellula, uno di questi è la diminuzione dell'attività dell'acqua (Hallworth, 1998). La risposta della cellula ad elevate concentrazioni di etanolo è molto simile alla risposta da stress termici ed entrambe potrebbero essere legate proprio alla diminuita attività

dell'acqua: sintesi di trealosio, induzione di proteine da shock termico (HSP) e produzione di enzimi antiossidanti (Piper, 1995; Izawa *et al.*, 2008). In aggiunta, si osservano dei cambiamenti fondamentali nella membrana plasmatica con incremento nella percentuale di acidi grassi insaturi e steroli (Arneborg *et al.*, 1995).

Insieme all'etanolo, bisogna valutare anche l'elevata tossicità dell'acetaldeide, intermedio immediatamente precedente alla sintesi di etanolo. Alcuni autori hanno infatti osservato come in ceppi diversi la resistenza all'etanolo è condizionata da un differente contenuto di acetaldeide cellulare (Jones, 1989; 1990; Budroni *et al.*, 2005).

Temperatura

Ogni cambiamento nella temperatura ambientale viene percepito dalla cellula come stress (Piper, 1997). È stato infatti visto come l'esposizione delle cellule di lievito a temperature estreme possa influenzare negativamente il tasso di fermentazione (Sharf e Magalith, 1983, Suutari *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 1997). I lieviti vinari sono particolarmente sensibili anche a limitati cambiamenti di temperatura a causa dell'effetto sinergico di altri fattori di stress associati alla fermentazione alcolica, quali l'elevato livello di etanolo (Piper, 1997). Come nel caso dell'etanolo, la membrana plasmatica è il target principale dell'effetto inibitorio delle alte e basse temperature (Watson, 1987; Suutari *et al.*, 1990), che comportano variazioni nella fluidità della membrana e, di conseguenza, nelle attività delle proteine ad essa associate. A basse temperature si ha una riduzione della fluidità e quindi, per i trasportatori, una maggiore difficoltà nell'attuare quel

cambio di conformazione necessario per il rilascio dei nutrienti all'interno della cellula. Al contrario, l'esposizione ad elevate temperature comporta un aumento della fluidità con conseguente dissociazione della struttura del trasportatore durante il cambio di conformazione (Vigh *et al.*, 1998; 2007). Oggi la gran parte delle fermentazioni vinarie industriali vengono condotte a temperature controllate: 10-15° C durante la vinificazione in bianco e 18-25°C per la vinificazione in rosso. Tuttavia, è difficile controllare le variazioni di temperatura che avvengono nei grandi fermentatori industriali, in particolare il metodo utilizzato per il raffreddamento del mosto potrebbe condizionare, positivamente o negativamente, i problemi di fermentazione.

Anaerobiosi

L'ossigeno gioca un ruolo fondamentale nel processo fermentativo, è richiesto come componente strutturale in numerose molecole organiche e la sua completa assenza rende impossibile la fermentazione (Visser *et al.*, 1990; Ribereau-Gayon *et al.*, 2000). La carenza di ossigeno infatti, influisce negativamente su alcuni processi cellulari quali la fosforilazione ossidativa e la sintesi di acidi grassi insaturi e steroli. *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni di sviluppo in cui l'ossigeno è limitante, induce la trascrizione di un set di geni, detti geni di ipossia, normalmente repressi in aerobiosi (Zitomer e Lowry, 1992; Kwast *et al.*, 2002). Questi geni, che codificano per enzimi coinvolti nell'utilizzo dell'O₂ da parte della cellula, sembra vengano espressi in modo da massimizzare l'utilizzo del poco ossigeno disponibile nell'ambiente (Kwast *et al.*, 1998). Meno chiara è la funzione di altri geni che vengono espressi unicamente in anaerobiosi; fra questi i

componenti delle famiglie PAU, DAN e TIR che codificano per proteine di parete e la cui espressione è associata alle condizioni che si realizzano durante la fermentazione vinaria (Kondo *et al.*, 1991; Kowalski *et al.*, 1995; Donzeau *et al.*, 1996; Marguet e Lauquin, 1996; Sertil *et al.*, 1997; Rachidi *et al.*, 2000; Abramova *et al.*, 2001b; Abe, 2007).

Altri fattori

Numerosi altri fattori vengono percepiti come stress da *Saccharomyces cerevisiae*. Questi includono la presenza di elevati livelli di SO₂ (40–100 mg/l) (Pizarro *et al.*, 2007), in particolare all'inizio della fermentazione, e di CO₂ durante la produzione di vini frizzanti. Inoltre, la presenza di microrganismi antagonisti, così come di tossine di origine fungina o batterica, costituiscono un altro problema potenziale (Ribereau-Gyon *et al.*, 2000).

Peculiarità dei ceppi produttori di biofilm

Si definiscono flor quei lieviti responsabili dell'affinamento biologico di alcuni vini speciali (Sherry, Vins Jaunes, Vernaccia) in seguito alla formazione di un biofilm (flor) più o meno esteso sulla superficie del vino (Cantarelli e Martini, 1969; Santa Maria e Vidal, 1973; Jackson, 1994). I tempi di formazione del biofilm, così come la sua morfologia e la persistenza sulla superficie, variano in funzione del ceppo e delle caratteristiche del substrato di crescita.

I ceppi flor appartengono principalmente alla specie *Saccharomyces cerevisiae* (Farris *et al.*, 1976; Faticenti *et al.*, 1976). Questi ceppi che devono subire una serie di stress dovuti, in principio, alle condizioni tipiche della fermentazione e, in

seguito, alla formazione di biofilm mostrano una elevata resistenza a tali condizioni di stress (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Aranda *et al.*, 2002).

In genere i ceppi flor al termine della fermentazione alcolica, durante lo shift diauxico, utilizzano l'etanolo come principale fonte carboniosa. Durante la formazione del biofilm l'alcool etilico viene da prima ossidato ad acetaldeide e successivamente ad acido acetico (Antonelli *et al.*, 1995; Aranda e del Olmo, 2003). Durante la formazione del biofilm, in vino, il lievito è sottoposto a condizioni particolarmente restrittive a causa della prolungata esposizione ad elevati livelli di etanolo ed acetaldeide, noti per essere agenti mutageni e inibitori di varie attività metaboliche (Castrjon *et al.*, 2002; Ristow *et al.*, 2003). Di conseguenza i ceppi flor mostrano caratteristiche peculiari, tra le quali un elevato polimorfismo del mtDNA (Castrjon *et al.*, 2002), la presenza di una delezione di 24 bp nella regione ITS1 (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2004), e differenti caratteristiche genetiche (Fernandez-Espinar *et al.*, 2000; Querol *et al.*, 2003) fra queste, la vitalità delle spore (Johnston *et al.*, 2000). Nei ceppi vinari non-flor questo carattere varia da 0 a 98% (Ristow *et al.*, 1995), di solito la vitalità delle spore nei ceppi flor è inferiore (Budroni *et al.*, 2005). La bassa vitalità delle spore può essere dovuta a diverse cause, quali perdita di regioni cromosomiche durante la germinazione (Sancho *et al.*, 1986). Un'altra importante differenza è la capacità di fermentare e/o assimilare galattosio e maltosio. La maggior parte dei ceppi vinari non-flor è in grado di utilizzare galattosio e maltosio, mentre la maggior parte dei ceppi flor non è in grado di fermentare e assimilare questi zuccheri (Budroni *et al.*, 2005). Johnston e collaboratori (2000) hanno riportato che il fenotipo GAL₀ (incapacità di utilizzare

galattosio) è dovuto a mutazioni nei geni *GAL7* e *GAL10*, che sono localizzati nel cromosoma II e sono vicini ad almeno cinque ORF che sono inclini a rotture del doppio filamento indotte da meiosi (DSB) nei ceppi flor spagnoli (Infante *et al.*, 2003). La frequenza del fenotipo GAL₀ è diversa nei due gruppi: 75% nei ceppi flor e 39% nei ceppi non flor (Budroni *et al.*, 2005).

Naumov *et al.* (1994) hanno dimostrato per i ceppi vinari l'esistenza di due soli loci *MAL* (*MAL1* e *MAL3*), localizzati sul cromosoma VII e II rispettivamente. La perdita della capacità di utilizzare il maltosio (fenotipo MAL₀) è stata osservata nel 9% dei ceppi non flor e nel 73% dei ceppi flor (Budroni *et al.*, 2005). Considerando che i lieviti flor, durante l'invecchiamento, producono elevate concentrazioni di acetaldeide e che quest'ultima è la principale causa del DSB e di altre modificazioni cromosomiche (Ristow *et al.*, 1995), Budroni e collaboratori (2005) hanno ipotizzato che i fenotipi GAL₀ e MAL₀ sono dovuti a danni nel DNA dovuti ad elevate concentrazioni di acetaldeide. Allo stesso modo, la ridotta vitalità delle spore, osservata nei ceppi flor, potrebbe essere causata da complementi cromosomali anormali.

La formazione del biofilm, così come gli altri tipi di aggregazione cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*, è la risposta fenotipica a vari stress a cui va incontro la cellula nel corso della fermentazione, in condizioni di carenza nutrizionale, di variazioni di pH. La formazione del biofilm è correlata con la modificazione della parete cellulare e in particolare del suo strato più esterno.

La parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*

La parete cellulare rappresenta la linea di confine tra la cellula e l'ambiente esterno e media sia la ricezione del segnale sia la risposta allo stress. Per questi motivi è il comparto cellulare di elezione per lo studio della risposta allo stress di *Saccharomyces cerevisiae*. La parete è costituita da due strati: un reticolo interno di polisaccaridi, povero in proteine, che forma una maglia porosa, e uno strato fibrillare esterno di mannoproteine GPI-dipendenti, legate covalentemente al reticolo sottostante di polisaccaridi (Klis *et al.*, 2006).

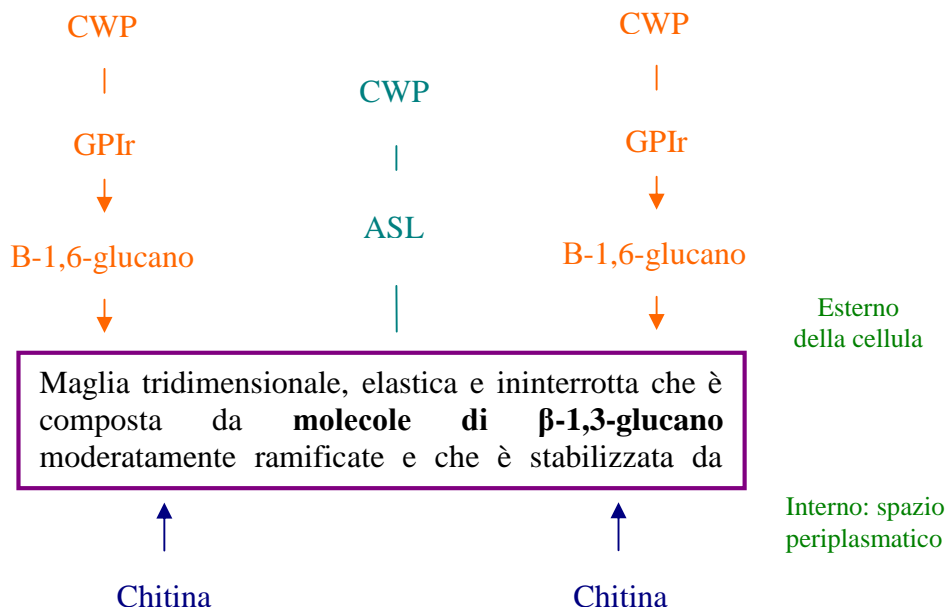


Fig.3: Organizzazione molecolare della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*. Le GPI-CWPs costituiscono la maggior parte delle proteine covalentemente legate della parete. Le ASL-CWPs includono le Pir-CWPs (Pir1p, Hsp150p, Pir3p, Cis3p). GPIr: residuo (senza frazione lipidica) di un'ancora GPI. ASL: legame sensibile agli alcali. Adattato da Klis *et al.*, 2002.

La parete cellulare è una maglia tridimensionale in cui i polisaccaridi sono formati da glucosio, mannosio e N-acetilglucosammina (GlcNAc). Uno dei polisaccaridi del glucosio, il β -1,3-glucano, è il maggiore componente strutturale della parete.

L'altro, il β -1,6-glucano, è presente in quantità minore ma è molto importante per i legami tra le molecole. I polisaccaridi del mannosio sono legati alle proteine per formare lo strato di mannoproteine, localizzato principalmente sulla superficie esterna e che agisce come filtro per composti ad alto peso molecolare, impedendo che questi vengano a contatto con la membrana plasmatica (Zlotnik *et al.*, 1984; Levin, 2005). Infine, la ridotta quantità di GlcNAc presente nella parete (1-3%) va a formare la chitina, polisaccaride lineare formante microfibrille che sono stabilizzate da ponti idrogeno. Nella forma cristallina, le microfibrille possono orientarsi in maniera parallela, antiparallela o alternate (Kramer and Koga, 1986). La chitina è localizzata soprattutto nel setto di distacco della gemma dalla cellula madre, la lunghezza delle catene di chitina nella parete cellulare e nelle gemme è stimata essere ~ 100 e 190 residui di GlcNAc, rispettivamente (Kang *et al.*, 1984; Klis *et al.*, 2002). Nella parete cellulare circa il 40 ÷ 50% delle catene di chitina sono legate all'estremità non riducente di β -1,3-glucano attraverso un legame β -1,4 che lega l'estremità riducente del polimero di chitina (Kollar *et al.*, 1995; Lesage and Bussey, 2006). Malgrado la sua ridotta quantità, la chitina è essenziale per la sopravvivenza della cellula (Shaw *et al.*, 1991; Cabib *et al.*, 2001).

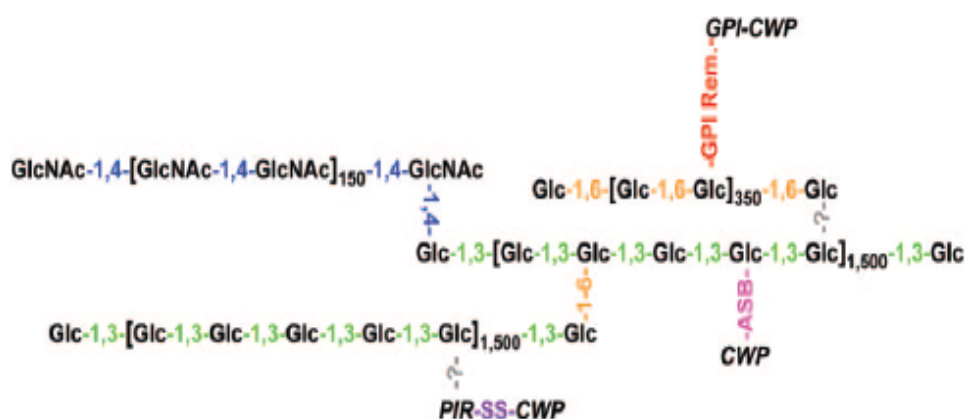


Fig.4: Rappresentazione schematica dei componenti della parete cellulare e legami: architettura della parete cellulare laterale. i legami β -1,3 , β -1,4 e β -1,6 glucosidici sono rappresentati in verde, blu e arancio, rispettivamente. Le mannoproteine della parete (**CWP**) possono essere legate al β -1,3-glucano attraverso legami sensibili agli alcali (**ASB**) o alle proteine PIR (**PIR**) attraverso legami disolfuro (SS). Le proteine GPI (**GPI-CWP**) sono legate al β -1,6-glucano attraverso un residuo dell'ancora GPI (**GPI-Rem**). I legami fra β -1,3-glucano e β -1,6-glucano o proteine PIR non sono ancora stati caratterizzati (?). Nota: la figura illustra in maniera qualitativa i legami della parete ma non è rispettata la loro stechiometria (tratta da Lesage and Bussey, 2006).

Struttura molecolare della parete cellulare

Saccharomyces cerevisiae spende una considerevole quantità di energia metabolica nella costruzione della parete cellulare. A seconda delle condizioni di crescita, la massa della parete cellulare può essere stimata in circa il 10-25% della massa totale della cellula espressa in peso secco (Orlean 1997; Lipke e Ovalle, 1998; Klis *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga e Francois 2003; Yin *et al.*, 2005). Il più importante polisaccaride di supporto è il β -1,3-glucano scarsamente ramificato (Fleet 1991; Manners *et al.*, 1973). Vista la presenza di catene laterali, le molecole di β -1,3-glucano possono legarsi solo attraverso ponti idrogeno, portando alla formazione di una maglia tridimensionale continua. Questa maglia è altamente elastica ed è notevolmente estesa in normali condizioni osmotiche in quanto le cellule sono al 100% del loro volume.

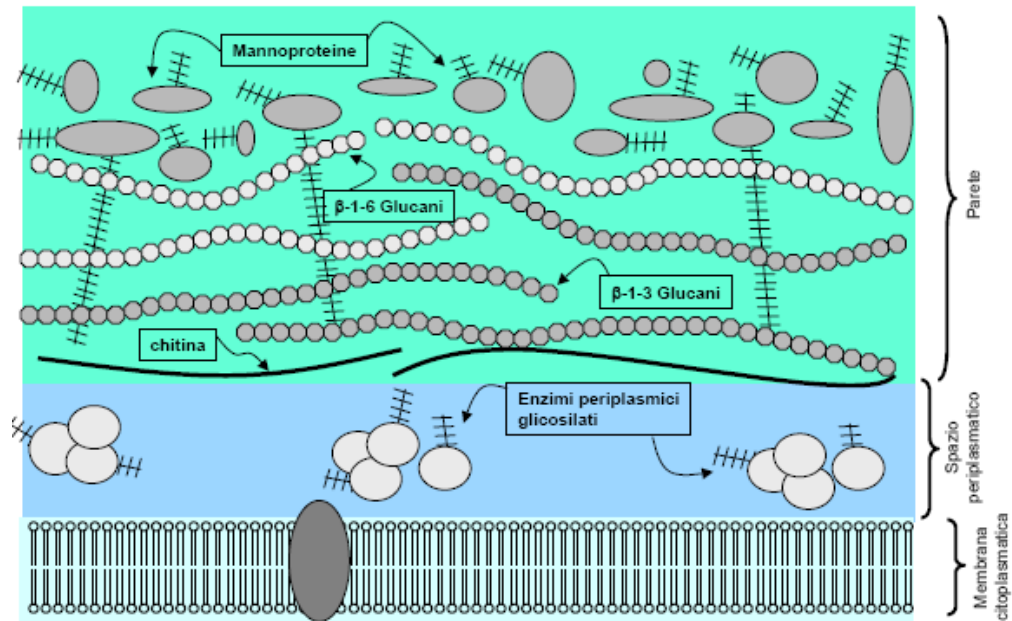


Fig.5: La parete cellulare di lievito (Biologia Generale per la Viticoltura e l'Enologia–MICROBIOLOGIA GENERALE – dott. Simone Guglielmetti, Anno Accademico 2008/2009, http://users.unimi.it/sguglie/Microbiologia_Generale_Enologia-Viticoltura_2008-2009_PARTE%20PRIMA.pdf)

Quando le cellule vengono trasferite in soluzioni ipertoniche si contraggono e possono perdere circa il 60% del volume originale, che corrisponde ad una perdita di superficie di circa 40-50%. La contrazione è totalmente reversibile quando le cellule sono trasferite nella soluzione originale (Morris *et al.*, 1986). L'elasticità della parete rispecchia la struttura delle molecole di β -1,3-glucano le quali hanno una forma flessibile ed elicoidale, come una molla che può esistere in diversi stati di estensione. Quando altri lieviti come *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Pichia* spp. e *Schizosaccharomyces* spp. sono esposti a soluzioni ipertoniche si comportano come *Saccharomyces cerevisiae*, ciò indica che la combinazione fra forza meccanica ed elasticità è il principio architettonico più diffuso nella costruzione della parete di diverse specie di lieviti (Klis *et al.*, 2006).

Il primo tipo di legame fra i componenti della parete che è stato caratterizzato è il legame β -1,4 fra le estremità riducenti di GlcNAc, di una catena di chitina e le

estremità non-riducenti del glucosio del β -1,3-glucano (Kollàr *et al.*, 1995). Altri studi hanno mostrato una associazione fra le mannoproteine, il β -1,6-glucano e il β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1996). Infine, sono stati identificati e parzialmente caratterizzati i legami di un complesso che include i tre componenti della parete più la chitina (Kollàr *et al.*, 1997). In questo complesso il β -1,6-glucano occupa una posizione centrale, ad esso sono direttamente legati il β -1,3-glucano e la chitina attraverso un legame glicosidico, mentre la mannoproteina è legata al polisaccaride attraverso l'estremità di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI).

- | |
|--|
| <p>A. CWP-GPIr \rightarrow β-1,6-glucano \rightarrow β-1,3-glucano</p> <p>B. CWP-ASL -β-1,3-glucano</p> <p>C. CWP-GPIr \rightarrow β-1,6-glucano \leftarrow chitina</p> <p>D. CWP[- ASL - β-1,3-glucano] - GPIr \rightarrow β-1,6-glucano \rightarrow β-1,3-glucano</p> <p>E. CWP[- ASL - β-1,3-glucano] - GPIr</p> |
|--|

Fig.6: Complessi proteina-polisaccaride noti in pareti cellulari di *Saccharomyces cerevisiae*. Le frecce rappresentano i legami glicosidici e sono orientate dall'estremità riducente di una macromolecola verso l'estremità non riducente del polisaccaride accettore.

- (A) - complesso fra una GPI-CWP e β -1,6-glucano \rightarrow β -1,3 -glucano, è in genere quello più abbondante;
- (B) - seconda tipologia più abbondante di complessi CWP – polisaccaride. La natura del legame fra una ASL-CWP e β -1,3-glucano è sconosciuta: le Pir-CWPs appartengono a questa categoria;
- (C) - complesso che diventa più importante in risposta a stress di parete;
- (D e E) - piccolo insieme di GPI-CWPs ibrido, direttamente connesso sia al β -1,6-glucano (attraverso una coda GPI) che al β -1,3-glucano (attraverso un legame sensibile agli alcali, complesso D) o solo al β -1,3-glucano (attraverso un legame sensibile agli alcali, complesso E). Il legame glicosidico fra chitina e β -1,3-glucano è stato omesso per chiarezza. CWP: cell wall protein; GPIr: coda GPI priva della frazione lipidica che unisce l'estremità carbossiterminale, di una proteina matura GPI-modificata, al network di polisaccaridi di parete; ASL: legame sensibile agli alcali (Klis *et al.*, 2006).

Queste ancore sono state identificate come segnali per l'incorporazione delle proteine nella parete cellulare dopo il transito attraverso la membrana plasmatica (Lipke e Ovalle, 1998).

Dopo la sintesi proteica, le proteine sono traslocate nel reticolo endoplasmatico dove le sequenze segnale N- e C- terminali vengono rimosse e un'ancora GPI viene legata alla nuova estremità C-terminale. Successivamente le proteine legate alle code GPI sono glicosilate seguendo una via metabolica di secrezione e dopo sono incorporate nella membrana plasmatica (Kinoshita e Inoue, 2000). Nei lieviti molte proteine-GPI vengono trasferite dalla membrana plasmatica alla parete cellulare e si legano covalentemente al β -1,6-glucano con un meccanismo sconosciuto (Kapteyn *et al.*, 1999b).

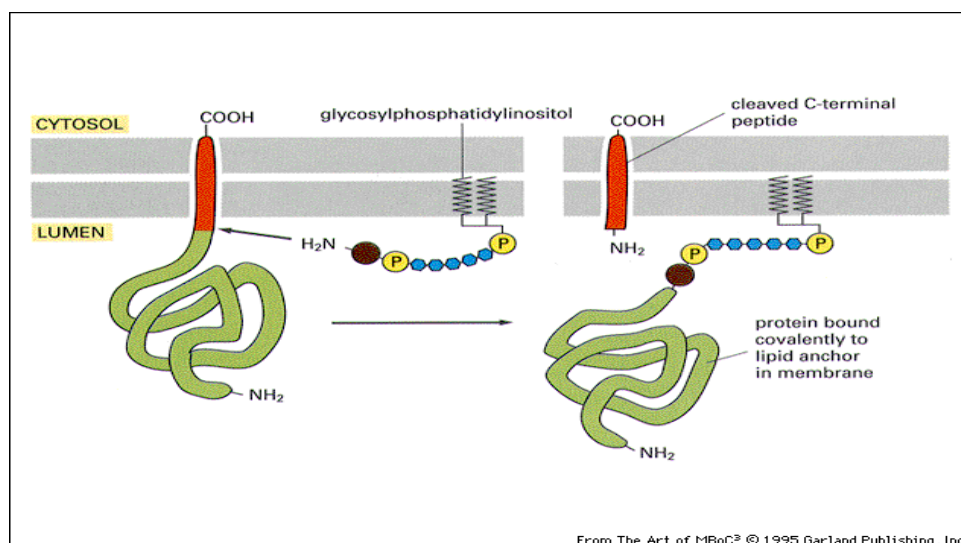


Fig.7: Proteine ancorate tramite GPI: in alcune proteine di membrana si ha il taglio di un peptide carbossiterminale che viene scambiato con un'ancora di glicosilfosfaditilinositolo (GPI). (The Art of MBoC³, © 1995 Garland Publishing, Inc) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mboc4/ch12f57.gif>.

Oltre al complesso descritto è stato isolato un altro complesso che manca della mannoproteina. L'identificazione di un composto chitina- β -1,3-glucano ha

suggerito l'idea di un “blocco di base flessibile” (Kollàr *et al.*, 1997), o “modulo” (Lipke e Ovalle, 1998) per la costruzione della parete. Questi moduli, di struttura variabile, potrebbero formare un reticolo intorno alla cellula costituendo, in tal modo, un involucro necessariamente continuo. I moduli possono essere legati fra loro attraverso legami idrogeno. È anche possibile che le ramificazioni di β -1,3-glucano legate alla catena principale dal legame β -1,6, siano più lunghe di quelle ipotizzate precedentemente, e questo fornirebbe gli strumenti per una maglia praticamente senza fine di polisaccaridi ramificati intorno alla cellula.

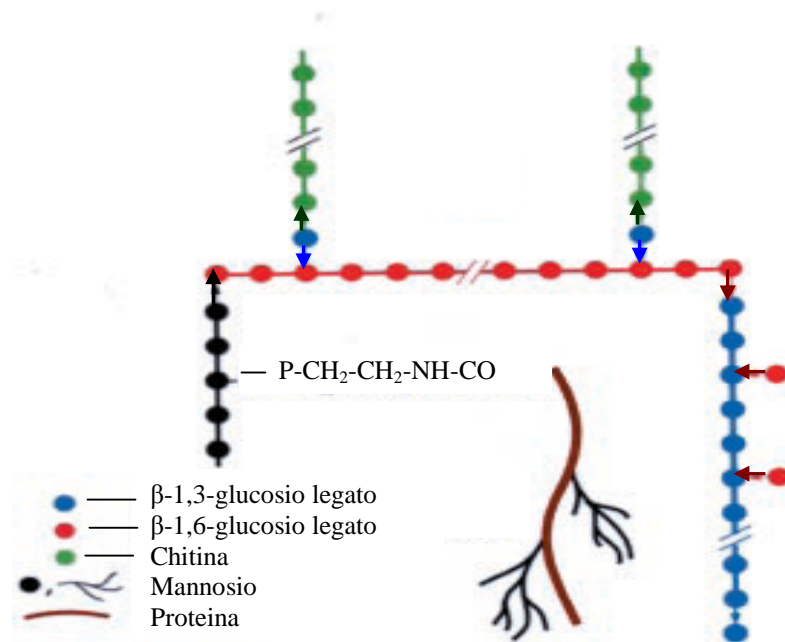


Fig.8: Struttura di un complesso che contiene tutti i componenti della parete cellulare. La freccia indica le estremità riducenti. P è il gruppo fosfato (Cabib *et al.*, 2001).

La maggior parte delle proteine di parete cellulare (CWPs) sono GPI-modificate (GPI-CWPs) e perciò indirettamente legate alla maglia di β -1,3-glucano. Inoltre, è stato identificato anche un piccolo gruppo di proteine chiamate ASL (alkali-sensitive-linkage)-CWPs che sono direttamente legate alla maglia di β -1,3-glucano attraverso un legame non identificato, sensibile ai composti mediamente

alcalini (Fig.6 B). Alle ASL-CWPs appartiene la famiglia delle Pir (Proteins with internal repeats)-CWPs, Pir1p, Hsp150p/Pir2p, Pir3p, Cis3p (De Groot *et al.*, 2005). Le GPI-CWPs sono state ritrovate nello strato più esterno della parete, mentre le Pir-CWPs sembrano essere uniformemente distribuite nello strato scheletrico più interno, in accordo con il loro essere direttamente legate alle macromolecole di β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1999). Cis3p, a differenza delle altre tre Pir-CWPs, ha una singola sequenza ripetuta DGQJQ, Castillo *et al.* (2003) hanno dimostrato che questa particolare sequenza è richiesta per legare la proteina al β -1,3-glucano. Le sequenze ripetute contenenti il motivo DGQJQ (dove J sta per qualsiasi aminoacido idrofobico), sono direttamente coinvolte nel legame della proteina Pir alla maglia del β -1,3-glucano. Si può, pertanto, ipotizzare che le Pir-CWPs all'aumentare del numero di sequenze ripetute possano legare più molecole di β -1,3-glucano, stabilizzando notevolmente la parete (Klis *et al.*, 2006). Curiosamente tutte le Pir-CWPs sono più espresse all'inizio della fase G1 del ciclo cellulare, quando la cellula cresce in modo isotropico e nuovi componenti della parete cellulare devono essere inseriti e legati alla maglia di macromolecole esistente. In accordo con il ruolo di legare β -1,3-glucano nella costruzione della parete cellulare, la permeabilità della parete è minore durante l'inizio della fase G1 rispetto alle altre fasi del ciclo cellulare (De Nobel *et al.*, 1991; Zimkus e Chaustova, 2003). Inoltre, in accordo con il ruolo descritto, le Pir-CWPs sono fortemente espresse in risposta a stress della parete come lo shock da calore (Kapteyn *et al.*, 1999; Moukadiri *et al.*, 1999; Boorsma *et al.*, 2004); la delezione dei geni corrispondenti induce ipersensibilità della cellula a Calcofluorwhite e Congo red, composti che perturbano la parete (Mrsa *et al.*,

1999). La sequenza DGQJQ è stata riscontrata anche in altre proteine (Cwp1p, Cwp2p, Tir1p, Tir2p e la putativa GPI-CWP Yhr126c) (Kapteyn *et al.*, 2001); inoltre, anche alcune GPI-CWPs (Aga1p, Tir1p, Tir4p e Dan4p) contengono sequenze interne ripetute che sono state trovate soprattutto nelle proteine di superficie (Verstrepen *et al.*, 2005).

Il numero delle sequenze ripetute spesso varia fra ceppi diversi di *Saccharomyces cerevisiae* e questo è dovuto a una relativamente alta frequenza di eventi di ricombinazione nei domini ripetuti. Questa variabilità influenza le proprietà della superficie della cellula come l'idrofobicità, la flocculazione, la formazione dei biofilm e i fenotipi correlati, e contribuisce alla virulenza dei funghi patogeni (Weig *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2005; Pinna, 2008).

La parete cellulare contiene anche proteine che sono legate in maniera non covalente, come Bgl2p, o attraverso ponti disolfuro ad altre proteine, come la subunità dell'agglutinina Aga2p nelle cellule MATa (Klebl e Tanner, 1989 Cappellaro *et al.*, 1994). Quando le cellule sono biotinilate e successivamente trattate con ditiotreitolo, vengono liberate un numero limitato di proteine, sette delle quali possono essere identificate come Bgl2p, Cis3p, Cts1p, Exg1p, Scw4p, Scw10p e Sun4p (Cappellaro *et al.*, 1998). Le quali sono tutte proteine secrete con un peptide segnale N-terminale e sono probabilmente mannosilate, dal momento che si legano alla Concanavalina A, indicando che seguono la classica via metabolica di esportazione delle proteine (Cleves *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 2000).

E' stato dimostrato che molte proteine citosoliche, così come gli enzimi glicolitici, possono anche essere componenti intrinseci della parete cellulare e che arrivano

alla superficie della cellula attraverso una via metabolica non-classica di esporto delle proteine (Klis *et al.*, 2006).

Dinamica della parete cellulare

E' stato stimato che, in seguito a delezione, circa 1200 geni mostrano un fenotipo correlato alla parete cellulare, supportando così la teoria che la costruzione della parete è parte integrante della fisiologia cellulare (De Groot *et al.*, 2001). Non sorprende quindi, che la parete cellulare possa variare in composizione e spessore a seconda della composizione del terreno di crescita, della temperatura di crescita, del pH esterno e del livello di ossigeno (Aguilar-Uscanga e Francois, 2003). Molto meno invece, si conosce riguardo alle possibili variazioni di lunghezza e di grado di ramificazione dei polisaccaridi strutturali e di glicosilazione e fosforilazione delle proteine della parete cellulare. Non è noto inoltre, se la cellula preferisca utilizzare polisaccaridi complessi specifici per le diverse fasi del ciclo cellulare o per diversi processi morfogenetici come la formazione di mat cellulare, crescita pseudoifale, formazione di biofilm, o quando entra in fase stazionaria o durante la sporificazione. E' stato dimostrato che l'utilizzo del complesso CWP-GPI $\rightarrow\beta$ -1,6-glucano \leftarrow chitina aumenta fortemente in risposta a stress di parete, avvalorando la tesi che l'utilizzo di complessi di polisaccaridi di parete specifici possa verificarsi in altre situazioni (GPI: residuo GPI, senza la frazione lipidica che si lega all'estremità carbossiterminale di una proteina di parete) (Kapteyn *et al.*, 1997; Kollar *et al.*, 1997). Tuttavia, a fronte di questo grande numero di proteine correlate con la parete sembra che la cellula sia in grado di selezionare poche proteine specifiche di superficie a seconda delle condizioni colturali (Caro

et al., 1997). L'analisi del trascrittoma e di singoli geni di lievito confermano questa ipotesi (Ter Linde *et al.*, 1999; Smits *et al.*, 1999; Abramova *et al.*, 2001; Boere *et al.*, 2003; Lagorce *et al.*, 2003; Boorsma *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Tai *et al.*, 2005). Due singolari esempi riguardano il confronto fra cellule in crescita esponenziale e cellule in fase stazionaria, e ancora, cellule cresciute in condizioni aerobiche e anaerobiche (Klis *et al.*, 2006). Le pareti delle cellule in fase esponenziale, coltivate in un terreno ricco, differiscono molto dalle pareti delle stesse cellule dopo uno shift diauxico, che stanno per entrare in fase stazionaria. Le cellule dopo lo shift diauxico possiedono pareti meno permeabili e sono più resistenti alle glucanasi (De Nobel *et al.*, 1990). Questa caratteristica è accompagnata da un radicale cambiamento nei profili delle proteine ottenuti dalla filtrazione di frammenti di CWP (Shimoi *et al.*, 1998). Per esempio, Sed1p è presente in basse concentrazioni nelle cellule in crescita esponenziale, mentre in fase stazionaria diventa la proteina (CWP) più abbondante. L'analisi del trascritto globale delle cellule in fase stazionaria è in accordo con questi risultati, mostrando che il livello del trascritto di *SEDI* aumenta più di 10 volte (Gasch *et al.*, 2000). Sed1p possiede sette potenziali siti di *N*-glicosilazione, inoltre contiene quattro residui di cisteina, caratteristiche che riducono la permeabilità della parete, e che spiegano i fenotipi accennati (De Nobel *et al.*, 1990; Shimoi *et al.*, 1998). Inoltre, la delezione di *SEDI* riduce drasticamente la resistenza delle cellule alla zimoliasi (Shimoi *et al.*, 1998). Molto interessante è il fatto che *SEDI* sia fortemente espresso durante lo stress da calore, ossidativo e iperosmotico, e questo suggerisce che Sed1p abbia una generale funzione di protezione dagli stress (Boorsma *et al.*, 2004; Gasch *et al.*, 2000; Hagen *et al.*, 2004). In fase stazionaria sono fortemente

espressi anche geni come *SPI1* e *GSC2* che codificano la sub-unità catalitica alternativa del complesso β -1,3-glucano-sintasi, o come *RPI1* che codifica un fattore di trascrizione che prepara le cellule ad entrare nella fase stazionaria, portando ad una parete cellulare più robusta, (Gasch *et al.*, 2000; Puig e Perez-Ortin, 2000; Sobering *et al.*, 2002). In accordo con quanto detto, una sovraespressione di *RPI1* porta ad un aumento dei livelli di trascrizione di *SED1*, *GSC2* e *BGL2*. Successivamente Shimoi e collaboratori (1998) hanno dimostrato che anche i profili di gel filtrazione di frammenti di CWP, separati proteoliticamente da cellule provenienti sia da colture statiche che in agitazione differiscono nettamente e che Tir1p si presenta in maggiori quantità nelle pareti estratte da cellule in condizioni statiche (Kitagaki *et al.*, 1997). Considerato che le colture statiche devono far fronte a ridotti livelli di ossigeno, è stata proposta proprio la carenza di ossigeno come responsabile delle differenze osservate nei profili di gel filtrazione delle proteine di parete. Altri autori hanno dimostrato che in condizioni di anaerobiosi i livelli di trascrizione dei geni *DAN1*, *DAN4*, *FLO11*, *TIR1*, *TIR2*, *TIR3* e *TIR4* sono elevati (Ter Linde *et al.*, 1999; Abramova *et al.*, 2001a; Abramova *et al.*, 2001b; Cohen *et al.*, 2001; Tai *et al.*, 2005;). Quando *TIR1*, *TIR3* o *TIR4* sono deleti singolarmente le cellule non sono in grado di crescere in presenza di azoto, dimostrando che queste proteine hanno un ruolo vitale, ancora non ben chiarito, in queste condizioni di crescita (Abramova *et al.*, 2001a). La comparsa di un nuovo gruppo di geni che codificano per GPI-CWP espresse in condizioni di anaerobiosi è accompagnata da una forte riduzione dei livelli del trascritto dei geni *CWP1* e *CWP2*, che codificano per le GPI-CWP e che sono altamente espresse in condizioni di aerobiosi (Abramova *et al.*, 2001a).

Inoltre, i livelli dei trascritti dei geni *PAU1*, *PAU3*, *PAU4*, *PAU5* e *PAU6* che codificano per proteine secrete (SP $\wedge\wedge\wedge$), di funzione e destinazione sconosciuta, sono elevati in condizioni di anaerobiosi (Rachidi *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2005).

Funzioni della parete cellulare

La parete cellulare di lievito i) è coinvolta nella **stabilizzazione delle condizioni osmotiche interne; ii) fornisce protezione contro gli stress fisici; iii) mantiene la forma della cellula; iv) funge da impalcatura per le proteine:**

i) L'osmolalità del citoplasma di *Saccharomyces cerevisiae* e di altri funghi è solitamente maggiore rispetto all'esterno delle cellule. Questo porterebbe ad un ingresso di acqua all'interno della cellula con una conseguente perturbazione delle condizioni interne di reazione e causerebbe un eccessivo rigonfiamento della cellula, provocando la lisi della membrana plasmatica. Per limitare tale afflusso di acqua i funghi costruiscono una parete resistente ed elastica che blocca l'ingresso dell'acqua (Hohmann *et al.*, 2007).

ii) La parete cellulare agisce anche come rivestimento protettivo. La combinazione di notevole forza meccanica e alta elasticità permette alla parete di trasmettere e ridistribuire gli stress fisici, in questo modo offre un'efficace protezione contro i danni meccanici (Morris *et al.*, 1986; Koch, 2003).

iii) Le cellule di lievito possono crescere con forma ovale o con una forma più allungata in carenza di azoto o durante la crescita pseudoifale o invasiva (Gimeno *et al.*, 1992). Le forme spettacolari dei funghi superiori sono un esempio straordinario di come la parete cellulare possa contribuire alla morfogenesi (Klis *et al.*, 2006).

iv) I polisaccaridi della parete cellulare del lievito, e dei funghi in generale, agiscono come impalcatura per uno strato esterno di glicoproteine (Zlotnik *et al.*, 1984; Tokunaga *et al.*, 1986; Osumi *et al.*, 1998). Collettivamente, queste glicoproteine, e in particolare le loro catene laterali di carboidrati N-legati, limitano la permeabilità della parete cellulare alle macromolecole, proteggendo in questo modo lo scheletro di polisaccaridi dall'attacco di proteine esterne (Zlotnik *et al.*, 1984; De Nobel *et al.*, 1990). Inoltre, possono anche limitare la fuoriuscita nel mezzo di intermedi solubili derivanti dalla costruzione della parete. L'alto grado di glicosilazione delle proteine e la presenza, nelle catene laterali di carboidrati, di gruppi fosfato carichi negativamente probabilmente contribuiscono alla ritenzione dell'acqua (Klis *et al.*, 2006).

Oltre a queste funzioni collettive, sono molto importanti le funzioni specifiche delle singole proteine. Diversi autori riportano che lo strato proteico della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae* può, in qualunque stadio fisiologico, essere costituito da almeno 20 differenti glicoproteine e che la sua composizione può variare a seconda delle condizioni di crescita (Kitagaki *et al.*, 1997; Shimoi *et al.*, 1998; De Groot *et al.*, 2004; De Groot *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005). Le proteine della parete cellulare rendono la cellula in grado: di riconoscere partners in grado di associarsi, di crescere sotto forma pseudoifale e invasiva e in alcuni casi patogena; di flocculare, di formare un biofilm, aiutano inoltre, le cellule a trattenere il ferro e a favorire l'assorbimento degli steroli e sono richieste per la crescita in condizioni anaerobiche (Cappellaro *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 1999; Abramova *et al.*, 2001; Protchenko *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2001; Wilcox *et al.*, 2002; Alimardani *et al.*, 2004). Le proteine di parete

possono inoltre influenzare fortemente l'idrofobicità della superficie cellulare (CSH: *cell surface hydrophobicity*), che influenza l'aderenza dei microrganismi a materiali plastici (Doyle and Rosenberg, 1990; Verstrepen e Klis, 2006; Ishigami *et al.*, 2006). Nel lievito *Candida albicans* la CSH influenza la virulenza attraverso il controllo dell'adesione dei microrganismi all'epitelio delle cellule (Masuoka e Hazen, 1997). La CSH è importante inoltre, nella tecnologia delle fermentazioni; per esempio la CSH nei ceppi della birra determina la flocculazione (Smit *et al.*, 1992; Verstrepen *et al.*, 2003; Claro *et al.*, 2006). Un elevato livello di CSH nelle cellule di lievito può facilitare il contatto cellula-cellula nella soluzione e può portare ad una interazione più stabile fra le flocculine e i loro recettori sulla superficie cellulare.

Adesine

Le adesine sono localizzate sulla superficie della parete cellulare e qui fungono da mediatori fra la cellula e l'ambiente esterno. Queste proteine sono responsabili dell'adesione cellulare fra le cellule e delle interazioni con la superficie biotica o abiotica di accrescimento. In particolare, sono coinvolte nello sviluppo della gemma nel *mating*, nell'interazione con gli ospiti (mammiferi e piante) importanti nella simbiosi e nella patogenesi, nelle variazioni di morfologia della colonia, nella formazione del biofilm. In altri termini, si può affermare che le adesine svolgono un ruolo chiave in due tipologie di interazioni che possiamo chiamare "sociali" e "antisociali" (Dranginis *et al.*, 2007). La prima tipologia, che è stata definita sociale, è rappresentata da interazioni intraspecifiche nell'accoppiamento e nella differenziazione, come quelle mediate dalle agglutinine in *Saccharomyces*

cerevisiae e dalle galectine in *Coprinus cinereus* (Lipke *et al.*, 1992; Walser *et al.*, 2005), e come la formazione di colonie e biofilm che aderiscono e invadono i substrati (Guo *et al.*, 2000; Hakanpaa *et al.*, 2006; Kumamoto *et al.*, 2005; Naglik *et al.*, 2006; Nobile e Mitchell, 2006; Staab *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Le interazioni “antisociali” sono invece tipiche dei legami fra patogeni e organismo ospite. Nei lieviti ascomiceti fra le adesine ritroviamo le galectine EPA di *Candida glabrata*, le proteine idrofobiche di parete cellulare e le proteine Asl di *Candida albicans* (Hoyer, 2001; Gaur e Klotz, 1997; Fu *et al.*, 1998; Filler, 2006; Cormack *et al.*, 1999).

Le adesine di lievito sono *proteine mosaico* in quanto sono costituite da diversi domini con funzioni distinte. La loro localizzazione, nello strato più esterno della superficie delle pareti cellulari, ne determina l’ordine dei domini e perciò la l’architettura globale (Dranginis *et al.*, 2007). I domini sono disposti in un ordine standard: un segnale di secrezione N-terminale; domini di legame; domini centrali glicosilati opzionali, ricchi in treonina, che facilitano le interazioni omotipiche cellula-cellula; ramificazioni *N*- ed *O*- glicosilate che elevano i domini di legame al di sopra della superficie della parete; e le regioni C-terminali che fanno da tramite fra legami incrociati covalenti e la matrice della parete attraverso un’ancora GPI.

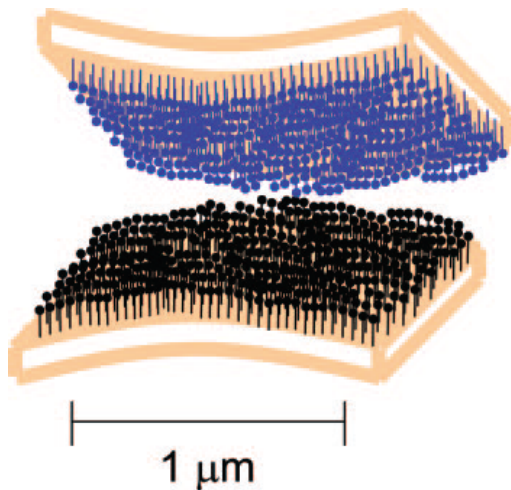


Fig.9: Concentrazione di adesine in vivo: adesine mostrate sulle pareti cellulari di due opposte cellule di lievito. La lunghezza della proteine è disegnata in scala, lo spessore è stato esagerato per renderlo visibile (Dranginis *et al.*, 2007)

Le adesine mediano l'aggregazione tra le cellule per formare aggregati che, in substrati liquidi, possono flocculare o flottare e formare un biofilm. In substrati solidi possono dare luogo a fenomeni di aggregazione come la crescita invasiva, filamentosa e di adesione. Tutte queste interazioni sono di tipo asessuale, cioè possono avvenire anche fra cellule con lo stesso mating type, non sono parte della risposta sessuale, e alcune sono correlate alla formazione di biofilm su superfici solide (Reynolds e Fink, 2001).

Saccharomyces cerevisiae possiede una famiglia di geni che codificano per adesine che comprende *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* e *FLO11* (Teunissen e Steensma, 1995; Lo e Dranginis, 1996; Lambrechts *et al.*, 1996; Zara *et al.*, 2005; Verstrepen *et al.*, 2004; Govender *et al.*, 2008). Di questi, solo *FLO11* è espresso nella maggior parte dei ceppi di laboratorio di *Saccharomyces cerevisiae*, nei quali manifesta un'abbondanza di fenotipi. L'espressione di *FLO11* è richiesta per la flocculazione in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (Lo e Dranginis, 1996) e per l'invasione dei substrati e la formazione di pseudoife nel ceppo $\Sigma 1278b$ (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo e Dranginis, 1998). Flo11p rende il lievito in

grado di adattarsi alle variazioni nutrizionali tramite lo switch dimorfico dalla forma lievitiforme a quella pseudoifale, in grado di invadere il substrato ed esplorarlo in risposta a carenza di azoto nelle cellule diploidi; questa modalità di crescita è considerata una forma di adattamento e di risposta allo stress nutrizionale per le specie non capaci di movimento allo scopo di recuperare i nutrienti in zone del substrato non ancora esplorate dalla colonia (Gimeno e Fink, 1992; Gimeno *et al.*, 1992). Flo11p gioca un ruolo importante nella polarizzazione della forma della cellula oltre al suo ruolo nell'adesione (Palecek *et al.*, 2000). L'adesina Flo11p è necessaria per tenere insieme le cellule nelle catene ramificate. Perciò l'espressione delle adesine può regolare la morfologia della colonia e l'invasione. Nelle cellule aploidi Flo11p è coinvolta nella crescita invasiva in risposta a carenza di glucosio (Cullen e Sprague, 2000), e di aminoacidi (De Las Penas *et al.*, 2003). L'aderenza al substrato è il passo essenziale per l'invasione (Guo *et al.*, 2000). Presumibilmente, l'invasione viene poi realizzata dall'efficienza della divisione cellulare da parte delle cellule aderenti.

Inoltre, *FLO11* è necessario per la formazione di biofilm su agar, per l'adesione alle superfici plastiche (Reynolds e Fink, 2001), per la formazione del biofilm su superfici liquide (Ishigami *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2006; Ishigami *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda la formazione di biofilm su superfici liquide, sono stati descritti e ipotizzati diversi meccanismi che favoriscono la risalita cellulare. Secondo Cantarelli e Martini (1969), la risalita delle cellule è da attribuire ad un maggiore contenuto dei lipidi totali in fase esponenziale di crescita, ciò

determinerebbe la risalita delle cellule in seguito ad una diminuzione del loro peso specifico. Iimura *et al.* (1980b) identificano nell'aumento dell'idrofobicità di superficie, dovuta all'aumento del contenuto di acidi grassi insaturi sulla superficie cellulare, la causa della risalita. A supporto di questa ipotesi Farris *et al.* (1993) hanno rilevato un incremento del livello d'insaturazione degli acidi grassi totali nel passaggio dalla fase sommersa delle cellule (planktonica) alla fase di biofilm. Martinez *et al.* (1997) prendono in considerazione il ruolo aggregante e di trasporto della CO₂ che, intrappolata dagli aggregati cellulari, determinerebbe una minore densità delle cellule e consentirebbe il trasferimento delle stesse dalla fase planctonica a quella superficiale. Zara *et al.* (2005) hanno dimostrato che la glicoproteina di parete Flo11p svolge un ruolo importante nell'interfaccia aria-liquido, tra biofilm e superficie del liquido, in quanto le cellule del biofilm hanno una maggiore densità di galleggiamento rispetto al terreno di sospensione. Il modello proposto da Zara *et al.* (2005) riprende in parte l'ipotesi formulata da Martinez *et al.* (1997); infatti, l'aumento di espressione di *FLO11* durante lo shift diauxico porta ad un incremento dell'idrofobicità della superficie cellulare, che favorisce la formazione di aggregati multicellulari. Gli aggregati idrofobici intrappolano il diossido di carbonio prodotto dalla fermentazione dello zucchero residuo (<0.2%), e le bolle che si formano si portano sulla superficie del liquido per formare un biofilm.

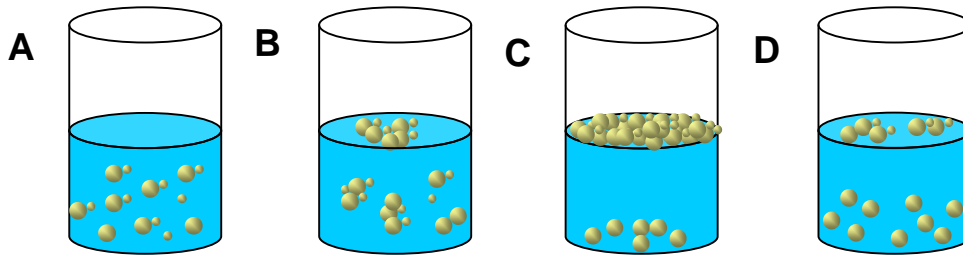


Fig.10: Modello di formazione di biofilm. (1) Le cellule di lievito fermentano gli zuccheri del mosto sia in sospensione che sul fondo del vessel; non si ha formazione di biofilm. (2) Durante lo shift diauxico, quando la quantità di zuccheri raggiunge valori intorno al 0,2%, le cellule iniziano ad aggregarsi in flocculi multicellulari a causa dell'aumento dell'idrofobicità della superficie cellulare. I flocculi intrappolano CO₂, continuano ad evolversi utilizzando gli zuccheri residui e sono trasportati sulla superficie cellulare. (3) Sulla superficie del liquido si forma un biofilm. Le cellule dello strato più superficiale del biofilm sono in contatto diretto con l'aria che permette la crescita quando gli zuccheri sono completamente consumati. (4) Nel biofilm iniziano a formarsi delle rotture e i frammenti precipitano sul fondo del vessel a causa della carenza di nutrienti quali azoto, vitamine, o vengono uccise dall'esposizione prolungata ad alte concentrazioni di etanolo e acetaldeide (Zara *et al.*, 2005).

Il modello proposto è supportato da diversi lavori: *FLO11* conferisce idrofobicità alla superficie delle cellule di lievito (Reynolds *et al.*, 2001) e in ceppi di laboratorio l'espressione di *FLO11* è repressa dal glucosio (Rupp *et al.*, 1999; Kuchin *et al.*, 2002; De Risi *et al.*, 1997). L'idrofobicità consente alle cellule la rapida risalita verso la superficie (Verstrepen *et al.*, 2003). I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* che formano biofilm all'interfaccia aria-liquido sono idrofobici (Farris *et al.*, 1993; Imura *et al.*, 1980a). Sebbene il modello proposto da Zara *et al.* (2005) non escluda altre cause di aumento dell'idrofobicità di superficie cellulare diverse da *Flo11p*, suggerisce che l'espressione di *FLO11* nei ceppi flor differisce significativamente da quella di ceppi di laboratorio che esprimono *FLO11* ma non formano biofilm all'interfaccia aria-liquido. Una differenza nota è che l'attivatore trascrizionale *FLO8* possiede una mutazione non senso in ceppi di laboratorio derivati da S288c (Liu *et al.*, 1996).

I diversi fenotipi di *FLO11* potrebbero essere spiegati come un conseguenza della variazione in adesione in diverse circostanze. Quanti siano i ceppi di lievito che possono manifestare diverse caratteristiche correlate a *FLO11* è un mistero che necessita di maggiori studi, per esempio, *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* necessita di *FLO11* per la flocculazione (Lo e Dranginis, 1996; Dranginis *et al.*, 2007), mentre $\Sigma 1278b$ che esprime *FLO11* non è in grado di flocculare (Guo *et al.*, 2000). È evidente che altri fattori devono essere coinvolti in questo fenomeno; fra questi potrebbero essere coinvolti le differenze di sequenza e/o i differenti gradi di glicosilazione (Dranginis *et al.*, 2007).

Spettrometria di massa (MS)

La spettrometria di massa è una potente tecnica di caratterizzazione strutturale delle proteine. Lo sviluppo di un elevato numero di strategie analitiche, basate sull'impiego di differenti tecniche spettrometriche, ha reso la spettrometria di massa una tecnologia indispensabile per l'interpretazione delle informazioni codificate nel genoma (Salzano e Crescenzi, 2005). Attualmente la MS è la tecnica preferita per la caratterizzazione e il controllo di qualità delle proteine ricombinanti e di altre macromolecole, un'attività importante nel settore delle biotecnologie. E' anche comunemente utilizzata per l'identificazione di proteine, sia in progetti di biochimica classica sia in quelli di proteomica su larga scala. Infine, poiché la MS misura il peso molecolare di una proteina, è il metodo preferito per l'individuazione e la caratterizzazione di modificazioni post-traduzionali e potenzialmente è in grado di identificare qualsiasi modificazione covalente che altera la massa di una proteina.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti (En-Ong e Mann, 2005). Tale miscela è ottenuta ionizzando le molecole del campione, principalmente facendo loro attraversare un fascio di elettroni ad energia nota.

Le molecole così ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni, più leggeri, secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica. Il diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato

sottoposto. Uno spettrometro di massa è costituito da una sorgente di ionizzazione, un analizzatore e un rivelatore di corrente ionica prodotta.

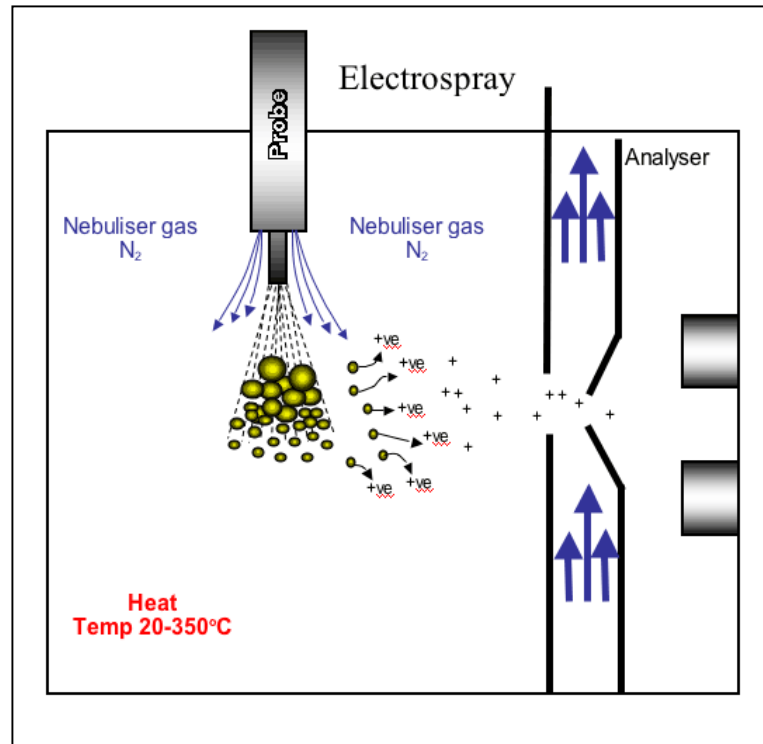


Fig.11: Ionizzazione ESI. La sostanza è introdotta in soluzione in un ago capillare e ne fuoriesce sotto forma di aerosol (goccioline di diametro di 1-2mm). Tra l'ago e il mantello della camera (elettrodo cilindrico) è creata una differenza di potenziale di alcuni KV che induce sulle goccioline un eccesso di carica positiva. A causa delle loro ridotte dimensioni, il solvente evapora rapidamente da ogni gocciolina che diventa sempre più piccola; la densità di carica aumenta finché diventa così alta da determinare l'espulsione di ioni di soluto dalla gocciolina. Gli ioni così prodotti sono poi spinti attraverso un sistema di fenditure fino ad entrare nella zona a bassa pressione dove sono accelerate verso l'analizzatore.

www.ich.ucl.ac.uk/.../HPLC_ESI_MS.html

Il campione viene introdotto nella sorgente di ionizzazione dello strumento e le molecole di campione vengono ionizzate, dal momento che gli ioni sono più facili da “manipolare” rispetto alle molecole neutre. Questi ioni nella regione dell'analizzatore di massa, vengono separati in base al rapporto massa/carica (m/z); gli ioni separati vengono rilevati e il segnale inviato ad un data-system

dove i rapporti m/z sono confrontati con la loro abbondanza ionica relativa e il tutto analizzato tramite un computer che fornisce uno spettro di massa.

La spettrometria di massa viene utilizzata per l'analisi di proteine e peptidi sin dal 1989, quando sono state introdotte due nuove tecniche "soft" per la ionizzazione in fase gassosa di grosse molecole, polari e altamente cariche (Karas e Hillenkamp, 1988; Fenn *et al.*, 1989).

Nella *ionizzazione per elettro-nebulizzazione* (Electrospray – ESI) gli ioni si presentano sottoforma di una soluzione liquida a pressione atmosferica, mentre nella *ionizzazione laser assistita da matrice* (matrix-assisted laser desorption ionization - MALDI), una pulsazione laser porta alla sublimazione del campione su una matrice cristallina secca. I dispositivi che trasformano gli analiti in fase gassosa e li ionizzano sono detti "sorgenti" (Andersen *et al.*, 1996). Ci sono quattro tipi fondamentali di analizzatori di massa usati per lo studio delle proteine: a trappola ionica (IT), a tempo di volo (TOF), a quadrupolo (Q), e a risonanza ionica elettronica in trasformata di Fourier (FT-ICR). Questi presentano differenze nel modello e nella prestazione e ognuno ha i propri punti di forza e di debolezza. Due analizzatori possono essere combinati insieme per svolgere una spettrometria di massa a due stadi (spettrometria di massa tandem, detta comunemente MS/MS). Nella MS/MS, con diversi meccanismi nei differenti spettrometri di massa, gli ioni peptidici vengono isolati e frammentati e viene misurato il rapporto massa/carica dei frammenti. I più comuni analizzatori di massa tandem, in grado di svolgere la frammentazione peptidica, sono a trappola ionica con quadrupolo (IT), a triplo quadrupolo (QqQ), a quadrupolo-tempo di volo (Q-TOF), a doppio tempo di volo (TOF-TOF).

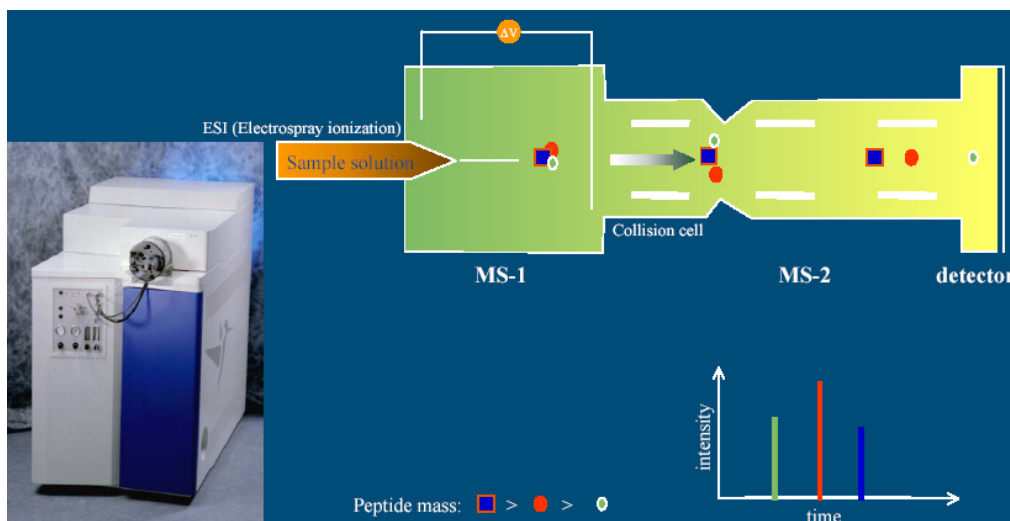


Fig.12: Combinazione di due spettrometri di massa. Da sinistra: ionizzatore (ESI), primo analizzatore di massa (MS-1), cella di collisione (collision cell), secondo analizzatore di massa (MS-2), detector che converte l'energia cinetica delle particelle in arrivo in segnale elettrico.

<http://www.plant.wageningen-ur.nl/projects/hybtech/Liu/Proteomics/Q-TOF.jpg>

La prestazione dei differenti spettrometri di massa tandem varia in termini di precisione, risoluzione, robustezza e facilità di utilizzo. I diversi analizzatori possono essere accoppiati con le diverse sorgenti in maniera che si abbia un elevato numero di possibili configurazioni strumentali. In particolare, due differenti configurazioni dello spettrometro di massa sono usate per produrre la maggior parte dei dati di proteomica pubblicati finora: a trappola ionica accoppiato con una sorgente ESI (ESI-IT) e a tempo di volo accoppiato con una sorgente MALDI (MALDI-TOF). Le apparecchiature ESI-IT sono molto resistenti, confrontate con le altre sono poco costose e semplici da utilizzare, sebbene la loro precisione sia abbastanza bassa. Una recente evoluzione dell'analizzatore a trappola ionica è quello "lineare" o "duo-dimensionale" che supera la precisione dell'analizzatore a trappola ionica tradizionale (trappola a tre dimensioni), raggiungendo inoltre un incremento in sensibilità e risoluzione (Hager, 2002; Shwartz *et al.*, 2002). Le apparecchiature MALDI-TOF hanno il

vantaggio di una maggiore sensibilità e di un più alto potere di risoluzione, anche se non danno informazioni sulla sequenza. Strumenti più recenti hanno una sorgente MALDI accoppiata con un analizzatore Q-TOF (Krutchinsky *et al.*, 2001) o TOF-TOF (Medzihradszky *et al.*, 2000) e sono perciò in grado, utilizzando la sensibilità della sorgente MALDI, di effettuare il sequenziamento del peptide. Le conformazioni strumentali che includono spettrometri di massa a trappola ionica e FT-ICR avranno, in un futuro prossimo, una maggiore diffusione nei laboratori di proteomica.

Identificazione delle proteine attraverso spettrometria di massa

Gli esperimenti di MS per l'identificazione delle proteine sono basati soprattutto sull'analisi dei peptidi. La spettrometria di massa può misurare la massa di proteine intatte ma la sensibilità dello spettrometro è molto inferiore rispetto all'analisi dei peptidi; comunque, la massa delle proteine intere non può essere misurata con sufficiente accuratezza per scopi di identificazione; infine, le proteine sono difficili da maneggiare e molte condizioni di solubilizzazione non sono compatibili con la MS.

Tuttavia nella maggior parte dei casi, per l'identificazione delle proteine, sono richieste informazioni sulla sequenza. La MS è molto più adatta ad ottenere informazioni sulla sequenza dai peptidi (maggiore di 20 aminoacidi) piuttosto che dalle intere proteine. Le informazioni parziali della sequenza possono essere ricavate dalle proteine intatte con strumenti molto sofisticati come gli spettrometri di massa FT-ICR, attraverso un approccio detto "top-down" (Mørtz *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2003). Nel primo passo di un esperimento di proteomica, le proteine

interessanti vengono purificate da cellule o tessuti utilizzando diverse metodologie, quali il frazionamento fisico e/o biochimico, il più recente dei quali è basato fondamentalmente su tecniche cromatografiche, che includono affinità di purificazione. Questo è attualmente il campo più critico e impegnativo, considerata l'importanza di lavorare con un sottoinsieme significativo di proteine e la difficoltà ad ottenerle. Il campione proteico parzialmente purificato generalmente viene ulteriormente frazionato attraverso un gel di elettroforesi mono-dimensionale (1D-gel). Queste strategie riguardano soprattutto studi di proteomica funzionale. L'insieme delle proteine possono anche essere separate attraverso un gel di elettroforesi di poliacrilammide bi-dimensionale (2D-PAGE), un potente metodo basato sulla separazione ortogonale per punto isoelettrico e peso molecolare (O'Farrel, 1975; Rabilloud, 2002). 2D-PAGE è ancora una delle tecnologie più utilizzate per studi di proteomica globale. La banda del gel (1D-gel) o lo spot (2D-gel) viene tagliata e le proteine vengono digerite usando differenti proteasi e/o reagenti chimici. La Tripsina è una proteasi efficiente e molto stabile che taglia in maniera specifica all'estremità C-terminale dei residui di Lisina e Arginina. I peptidi generati dal taglio con Tripsina hanno un residuo basico all'estremità carbossi-terminale e, in media, la giusta taglia in grado di essere rilevata e sequenziata con uno spettrometro di massa. Per questo la tripsina è l'enzima più utilizzato in studi di identificazione.

Oltre alle già citate strategie nelle quali mix di proteine sono prima separate con elettroforesi 1D o 2D e successivamente processate con spettrometro di massa, sono note altre metodologie. Ampiamente utilizzate sono le metodiche "gel free" che fanno riferimento soprattutto al frazionamento bidimensionale di miscugli di

peptidi. Il campione proteico (un lisato cellulare non-frazionato o un mix di proteine parzialmente purificato) viene ridotto, alchilato e digerito in soluzione, in seguito, la mix di peptidi ottenuta viene frazionata attraverso una colonna a scambio cationico (SCX), che separa i peptidi sulla base della loro carica, e le frazioni derivate sono ulteriormente separate su una colonna a fase inversa (RP). Questo passo di “cromatografia multidimensionale” viene utilizzato per la separazione di mix di proteine molto complesse con la tecnica nota come “tecnologia multidimensionale per l’identificazione delle proteine” (MudPIT) (Washburn *et al.*, 2001). Al momento questo approccio sembra essere la soluzione migliore per l’analisi di campioni che non possono essere separati in maniera efficiente su gel a causa delle loro proprietà chimico-fisiche. Nella maggior parte dei casi, le mix di peptidi generate dalla digestione multipla di mix di proteine non vengono introdotte direttamente nello spettrometro di massa ma vengono prima separate con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). I peptidi sono eluiti da colonne RP utilizzando concentrazioni crescenti di solventi organici, i quali permettono la separazione dei peptidi sulla base della loro idrofobicità. La colonna cromatografica è collegata in linea con uno spettrometro di massa dotato di una sorgente ESI che ionizza i campioni a partire da una fase liquida utilizzando le così dette tecniche LC-ESI-MS. In LC-ESI-MS l’intensità del segnale è direttamente proporzionale alla concentrazione dell’analita, per questo i peptidi dovrebbero essere eluiti nel minor volume possibile. Questo può essere realizzato riducendo i diametri interni delle colonne cromatografiche; le colonne capillari più utilizzate hanno diametri interni di 50-150 μm e possono lavorare con un flusso minimo di 100 nl/min. Un flusso così ridotto, in sorgenti elettrospray

appositamente progettate chiamate sorgenti nano-spray, è in grado di produrre un getto stabile. Strumenti di questo tipo sono conosciuti come sistemi nano-LC-MS. Una volta che la mix di peptidi è stata analizzata attraverso MS, le proteine vengono identificate attraverso il confronto con una lista di masse sperimentali di peptidi, misurata con elevata accuratezza, con le masse peptidiche calcolate teoricamente e ottenute da una digestione *in silico* di tutte le proteine presenti in un determinato database, considerando la specificità della proteasi utilizzata. Questo approccio è detto “fingerprinting della massa peptidica” (PMF). Per l’analisi PMF sono disponibili diversi algoritmi. Il PMF è stato largamente utilizzato per l’identificazione di spot proteici purificati da gel 2D e analizzati con l’ausilio di MALDI-TOF. Comunque, l’identificazione delle proteine si ottiene in maniera più efficiente utilizzando informazioni sulla sequenza derivate dallo spettro ionico di decomposizione indotta per collisione (CID), ottenuto con strumenti in grado di operare analisi MS/MS. Negli esperimenti MS/MS, viene isolato uno specifico ione peptidico e la sua frammentazione è indotta dalla collisione con un gas inerte. Esistono delle “regole” di frammentazione (Biemann, 1992) che aiutano nell’interpretazione degli spettri di massa tandem; è stata proposta una nomenclatura comune per la sequenza degli ioni in MS/MS (Roepstorff e Fohmann, 1984). Gli spettri di frammentazione non possono essere utilizzati per ottenere una intera sequenza peptidica; per esempio, la sequenza di un peptide non può essere determinata *de novo* in un esperimento di MS, ma vengono confrontati con i database proteici globali utilizzando diversi algoritmi come Peptide Sequence Tags (Mann e Wilm, 1994), Sequest (Eng *et al.*, 1994), Mascot (Perkins *et al.*, 1999). I dati ottenuti da tale confronto riguardano l’identità

dei peptidi che in un secondo momento vengono usati per compilare una lista di proteine. Di solito una proteina può essere identificata attraverso due o tre peptidi. Se è solo un singolo peptide ad identificare una proteina sono pertanto necessarie ulteriori conferme.

SCOPO DEL LAVORO

La fermentazione alcolica e il successivo affinamento sono processi biotecnologici altamente stressanti per il lievito. La parete cellulare è il primo comparto cellulare che si interfaccia con l'ambiente esterno e perciò direttamente coinvolta nella risposta allo stress. Lo scopo di questa tesi di ricerca è stato quello di studiare le variazioni nella composizione proteica della parete cellulare in ceppi vinari e non di *Saccharomyces cerevisiae* in 2 diverse condizioni colturali e 2 fasi di crescita. In particolare

1) è stata confrontata la composizione della parete cellulare dopo 24 (Log) e 48 (Sta) ore di crescita su un terreno liquido (YPD) e dopo 72 su terreno di florizzazione (YNB+4%EtOH) (FlorYNB). Poco si conosce sulla regolazione dei geni che portano alla formazione del biofilm e sulle proteine codificate da tali geni. Per questo motivo, nel presente lavoro, si è voluto studiare, con l'ausilio delle tecniche di spettrometria di massa, in particolare la tecnica ESI-Q-TOF, il profilo proteico della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae* in ceppi flor wild-type (*M23*, *M25*) per confrontarli con un ceppo vinario non flor, *EC1118*, e con ceppi di laboratorio, *3238-32* (flor), *3238-32ΔFLO11* (non flor) e *CEN.PK113.7D* (non flor), considerato il modello per lo studio dei ceppi industriali. I risultati di tale esperimento hanno evidenziato che *FLO11*, *GAS1*, *GAS3*, *GAS5* e *HPF1* sono geni che codificano per proteine coinvolte nella risposta della parete cellulare agli stress e per questo si è deciso di intraprendere un approccio quantitativo di analisi della trascrizione di questi geni attraverso la qRT-PCR.

MATERIALI e METODI

Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzati in questo lavoro sono:

Ceppi			Provenienza
M23	Wild-type	FLOR+	DISAABA
M25	Wild-type	FLOR+	DISAABA
3238-32	<i>MATα leu2-Δ1 lys2-801 ura3-52</i>	FLOR+	Zara <i>et al.</i> , 2005
3238-32 Δ FLO11	<i>MATα leu2-Δ1 lys2-801 flo11Δ::URA3 ura3-52</i>	FLOR -	Zara <i>et al.</i> , 2005
CEN.PK113.7D	<i>MATα URA3 HIS3 LEU2 TRP1 MAL2-8 SUC2</i>	FLOR -	
EC1118	Lievito commerciale per fermentazione vinaria	FLOR -	Lallemand

Terreni utilizzati

I ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono stati fatti crescere in terreno YPD liquido (1% estratto di lievito, 2% peptone, 2% glucosio) per 24 (OD600 ~ 1,5); e 48 ore (OD600 ~ 8) (200 rpm a 30°C). Per favorire la formazione di biofilm, una parte della coltura, dopo 48 ore di crescita in YPD, è stata prelevata, lavata e inoculata in terreno di florizzazione (YNB (Difco) contenente 4% (EtOH, Zara *et al.*, 2002).

Una parte della coltura, dopo 24 ore di crescita in YPD, è stata utilizzata per l'isolamento della parete cellulare (de Groot *et al.*, 2004) e la stessa procedura è stata effettuata una volta che la coltura ha raggiunto le 48 ore di crescita. La restante parte è stata lavata 2 volte con YNB ed è stata poi trasferita in YNB+ 4% EtOH e lasciata in condizioni statiche per 72 ore a 28°C per permettere la formazione del biofilm. Si è proceduto, in principio, al recupero delle cellule formanti il biofilm separatamente dalle cellule del fondo, ma visto che i risultati

dei profili proteici della parete cellulare non presentavano differenze si è preferito recuperare l'intera massa cellulare, cioè cellule del fondo più cellule del velo, e procedere con l'isolamento della parete cellulare (de Groot *et al.*, 2004). Quattro mg di campione disidratato di parete cellulare sono stati utilizzati per analisi tramite spettrometria di massa, come descritto da Yin *et al.*, (2005), e l'elenco dei picchi ottenuti tramite MS/MS è stato usato per l'identificazione delle proteine di parete tramite confronto con il database: MASCOT.

(http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS).

Isolamento della parete cellulare

Le cellule, dopo 24 ore e 48 ore di crescita in YPD e dopo 72 ore in terreno di florizzazione, sono state raccolte e lavate con 10mM Tris-HCl, pH 7.5, per essere poi trasferite in Eppendorf con il tappo a vite (Sarstedt; $\sim 2 \times 10^9$ cellule per tubo in 1 ml di volume) e centrifugate a 7000 rpm per 1 min. Una volta eliminato il surnatante le cellule sono state risospese in 200 μ l di 10mM Tris-HCl, pH 7.5. Nella stessa eppendorf sono state aggiunte le biglie di vetro (diametro 0.25-0.5mm) (Emergo BV, Landsmeer, The Netherlands) e 10 μ l di cocktail inibitore di proteasi (Sigma, St. Louis, Mo.). Utilizzando la FastPrep instrument (Bio-Savant Fast Prep 120 machine , Qbiogene, Carlsbad, Calif.) si è proceduto alla rottura delle cellule facendo 3 corse a velocità 6 per 30 sec/corsa, mettendo successivamente i campioni in ghiaccio per 15 min e ripetendo le 3 corse a velocità 6 con 30 sec/corsa. Utilizzando un microscopio ottico è stata controllata l'avvenuta rottura delle cellule e, quando necessario, è stato ripetuto il trattamento con la "FastPrep instrument". Il lisato cellulare è stato raccolto attraverso ripetuti

lavaggi delle biglie di vetro con NaCl 1M, è stato centrifugato a 3000 rpm per 5 min per isolare le pareti cellulari. Queste ultime sono state lavate ripetutamente con NaCl 1M fino ad ottenere il surnatante limpido e successivamente con acqua sterile 2 volte. Durante questi lavaggi i campioni sono stati tenuti in ghiaccio per evitare la denaturazione della proteina.

Una volta isolate le pareti cellulari, si è proceduto alla purificazione con un trattamento a caldo con SDS-extraction buffer (100mM Na-EDTA, 50mM Tris-HCl, 2% (W/V) SDS, 50 mM β -mercaptoetanol, pH 7,8) a 100°C per 10 min. I campioni sono stati centrifugati (3000 rpm per 5 min), è stato eliminato il surnatante ed è stato ripetuto il trattamento a caldo con SDS-extraction buffer. I trattamenti con NaCl 1M ed SDS extraction buffer permettono di rimuovere le proteine non legate covalentemente e i contaminanti intracellulari. Per rimuovere l' SDS-extraction buffer i campioni sono stati lavati con acqua sterile. Il pellet ottenuto è stato congelato in azoto liquido per effettuare la liofilizzazione delle pareti isolate. I campioni liofilizzati sono stati conservati a -20°C

Analisi ESI-Q-TOF

Preparazione del campione per l'analisi tramite Spettrometria di Massa

Le pareti cellulari liofilizzate (4 mg) sono state risospese in una soluzione contenente 100 mM NH_4HCO_3 e 10 mM ditiotreitolo e incubate per 1 h a 56°C. Dopo la centrifugazione (3000 rpm per 5 min), il pellet è stato S-alcilato con una soluzione contenente 100 mM NH_4HCO_3 e 55 mM iodoacetamide per 45 min, a temperatura ambiente, al buio. Le pareti cellulari sono state lavate tre volte con 50 mM NH_4HCO_3 . Per il taglio proteolitico con l'enzima Tripsina (Roche Applied

Science, Nonnenwald 2, 82372 Penzberg, Germany), le pareti sono state incubate in 50 mM NH_4HCO_3 overnight a 37°C usando un rapporto CWP/enzima di 50:1. I campioni digeriti sono stati centrifugati e il surnatante contenente i peptidi in soluzione è stato purificato (desalificato) e concentrato utilizzando una colonna μC18 ZipTip (Millipore). Il pool di proteine ottenuto è stato analizzato tramite cromatografia liquida ad alta pressione su nanoscala e spettrometria di massa tandem composto da un Quadrupolo e da un Time Of Flight ad accelerazione ortogonale (Q/oaTOF) (Waters, Milford, Mass.).

Analisi dei campioni con LC/MS/MS

I prodotti della digestione con tripsina sono stati analizzati tramite LC/MS/MS (cromatografia liquida ad alta pressione su nanoscala e spettrometria di massa tandem) utilizzando un sistema Ultimate nano-LC (Dionex, Sunnyvale, Calif.) e uno spettrometro MicroMass Q-TOF mass (Waters, Milford, Mass.). I campioni di peptidi derivati, da 1 a 10 μg , sono stati iniettati attraverso un micro autocampionatore (FAMOS) e concentrato su una precolonna da 5mm con 300 μm (diametro interno). I peptidi sono stati caricati e separati su una colonna PepMap 150 mm (Dionex) con 75 μm (diametro interno) utilizzando un programma con gradiente di acetonitrile e 0.1% di acido formico. La parte terminale del nano-LC con un flusso di 300 nl/min è stato collegato in linea con un Q-TOF utilizzando un PicoTip rivestito e saldato con silicone (FS360-20-10CE; New Objective, Woburn, Mass.). I peptidi sono stati selezionati automaticamente dallo spettro in esame per frammentazione indotta da collisione utilizzando Masslynx software. Gli spettri di MS/MS ottenuti sono stati processati e analizzati con i software

Biolynx and Masslynx Pepseq. Per l'identificazione delle proteine, gli spettri e le sequenze di amino acidi ottenuti sono stati analizzati con il software MASCOT e confrontati con il database SGD (Saccharomyces Genome Database; <http://www.yeastgenome.org/>).

Identificazione delle proteine tramite database

Per l'identificazione delle proteine è stato utilizzato il software MASCOT della Matrix-Science (<http://www.matrixscience.com>) che ha permesso di eseguire le ricerche in un database non-ridondante contenente sequenze proteiche.

I parametri utilizzati sono stati:

- ◆ Tipologia di analisi: MS/MS Ion Search
- ◆ Enzima: semiTripsina
- ◆ Modificazioni fisse: Carbamidometile (C)
- ◆ Modificazioni variabili: Deamidazione (NQ)
- ◆ Valori di massa: Monoisotopici
- ◆ Massa proteica: non limitata
- ◆ Tolleranza della massa peptidica: ± 2 Da
- ◆ Tolleranza della massa del frammento: ± 0.8 Da
- ◆ Numero massimo di tagli mancati: 1
- ◆ Tipologia di strumento: ESI-QUAD-TOF

(da Mascot Search Results, <http://www.matrixscience.com>):

Analisi trascrizionale RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

Estrazione RNA e retrotrascrizione

1×10^8 cellule dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* sono state prelevate dalle tre diverse fasi di crescita. Inizialmente le cellule sono state centrifugate a 14000 giri per 1 min. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet cellulare è stato lavato una volta in acqua sterile per eliminare le tracce residue del terreno di crescita. Per conservare il campione e facilitarne la successiva lisi cellulare, il pellet è stato congelato a -80°C . Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit RNeasy® Midi (QIAGEN cat. n°75142) che contiene le DNasi per eliminare eventuale DNA genomico residuo. Il campione di RNA è stato conservato a -80°C . Per la successiva retrotrascrizione dell'mRNA in cDNA è stato utilizzato il kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN cat. n° 205310), utilizzando gli oligo dT forniti nel kit come primers per la retrotrascrizione.

Reazione di PCR

200 ng del cDNA ottenuto sono stati utilizzati come template per la reazione di PCR Real-Time utilizzando il termociclatore “iCycler iQ Real-Time PCR detection system instrument” (Bio-Rad, Milano). Sono stati utilizzati i seguenti reagenti in volume totale di 25 μl per reazione: 2mM MgCl_2 ; 0,2mM dNTPs; 1 μl SYBR Green (1:20.000); 0,2 μM Primer Up; 0,2 μM Primer Lo; 0,5 U Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen cat 10966). I primer utilizzati sono stati i seguenti: *HPF1_RIGHT* (5'-AGGTTGATGGAGCAATGGAG-3'), e *HPF1_LEFT* (5'-CAGGTTCCGTTTCCATCAGT-3') per l'amplificazione di *HPF1*, *GAS1_LEFT* (5'-AGCTCCAGCCACCTCTATCA-3') e *GAS1_RIGHT* (5'-TTCATTACCGGCGAAGAAAC-3') per l'amplificazione di *GAS1*, *GAS3_LEFT*

(5'-CACCAGTCCATCTTCAAGCA-3') e *GAS3_RIGHT* (5'-CGCCTTTACTTTTGGAGCTG-3') per l'amplificazione di *GAS3*, *GAS5_LEFT* (5'-CTCGCAAGATCATTCCCATT-3') e *GAS5_RIGHT* (5'-GTGGGGGTATTGACATCCAG-3') per l'amplificazione di *GAS5*, *FLO11Rtup* 5'-AGGTTCAAATGGTGCCAAGA-3' e *FLO11Rtlo* 5'-AGCCACGCTAGAAGCAGAAG-3' per l'amplificazione di *FLO11*. Il protocollo termico prevede un primo ciclo a 95°C per 3 minuti in modo da attivare la Taq polimerasi Hot-Start utilizzata. Successivamente sono stati eseguiti 45 cicli a 95°C per 45 sec, 58°C per 30 sec e 72°C per 30 sec. La fluorescenza è stata misurata durante la fase di estensione. Al termine della reazione di PCR è stata effettuata una curva di Melting che permette di evidenziare una eventuale contaminazione dei campioni. Questa reazione consiste nel misurare il livello di fluorescenza dei campioni facendo variare la temperatura della reazione da 50°C a 95°C. Se la variazione nel livello di fluorescenza avviene a diverse temperature allora nella reazione sono presenti amplificati aspecifici e il risultato dell'espressione non viene accettato. Infine per poter confrontare il livello di espressione in momenti diversi e fra ceppi diversi ci si è riferiti al valore dell'espressione del gene *housekeeping ACT1*.

Per la normalizzazione dei risultati ottenuti è stata utilizzata la formula:

$$\text{Espressione Relativa} = 2^{-[(\text{Ct YFG} \times \text{Eff YFG}) - (\text{Ct HKG} \times \text{Eff HKG})]}$$

Ct YFG = ciclo soglia determinato per il gene di interesse

Eff YFG = efficienza di reazione calcolata per il gene di interesse

Ct HKG = ciclo soglia determinato per il gene housekeeping.

Eff HKG = efficienza di reazione calcolata per il gene housekeeping

RISULTATI

Alcune proteine “GPI-modificate” caratterizzano la parete cellulare dei ceppi flor

Lo scopo degli esperimenti di spettrometria di massa è stato quello di caratterizzare il profilo proteico della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*. In particolare sono state analizzate e confrontate le proteine di parete di ceppi flor, autoctoni e di laboratorio, e di ceppi vinari non flor commerciali e di laboratorio. Tutti i ceppi sono stati analizzati in fase logaritmica (LogYPD), stazionaria (StaYPD) in YPD (terreno ricco) e in YNB più etanolo (FlorYNB) (Zara *et al.*, 2005). La tecnica utilizzata, ESI-Q-TOF, permette un'indagine qualitativa della composizione proteica della parete cellulare. Nell'analisi dei risultati, inoltre, bisogna tener conto di alcuni limiti della tecnica, infatti peptidi di dimensioni molto grandi (oltre i 1500 Da) e/o molto piccoli (sotto i 400 Da) non sono letti dalla macchina, e quindi proteine con elevato grado di *O*-glicosilazione, pur presenti nel campione, non vengono identificate.

Per individuare quale potesse essere il sistema di segmentazione proteica che produce il maggior numero di peptidi identificabili con la tecnica ESI-Q-TOF, le proteine di parete del ceppo *M25* sono state digerite con Tripsina, con HCl a pH acido (pH=2) e con la combinazione dei due. È risultato che il taglio solo con Tripsina fornisce il numero maggiore di enzimi identificabili (dato non mostrato). Questo enzima è stato quindi utilizzato per la preparazione di tutti i campioni studiati.

I risultati ottenuti per mezzo del database Matrix Scienze - Mascot Search Results (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MS) sono stati analizzati considerando i peptidi che identificano esclusivamente la

proteina considerata e scartando i peptidi che possono identificare due o più proteine.

Dall'analisi dei risultati (Tab.1) si denota che, in generale, le proteine "GPI-modificate", cioè le proteine che si legano al reticolo di β -1,3-glucano attraverso un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI), sono espresse maggiormente nei ceppi *M23*, *M25*, produttori di biofilm e nei loro derivati di laboratorio (*3238-32* e *3238-32 Δ FLO11*), al contrario per le proteine ASL, legate direttamente al network di β -1,3-glucano, non si riscontrano differenze fra i ceppi analizzati. Infatti, le proteine Cwp1p, Ssr1p, Crh1p, Ecm33p (GPI), e Pir1p, Pir2p, Pir3p, Scw4p (ASL) sono state identificate in tutti i ceppi e in tutte le condizioni testate.

Nella tabella 2 sono illustrati i peptidi attraverso i quali, per ogni campione analizzato, è stato possibile individuare la proteina. Nei riquadri in verde è indicato lo score, cioè il punteggio associato a ciascun peptide. Lo score è dato dalla formula $-10*\text{Log}(P)$, dove P è la probabilità che il risultato osservato sia dovuto al caso. I punteggi dei peptidi > 44 indicano identità o ampia omologia ($p<0.05$).

Nel presente lavoro sono stati considerati solo i peptidi che hanno valore assoluto per la proteina identificata e non possono essere identificati nella sequenza aminoacidica di altre proteine.

In alcuni casi lo stesso peptide ricorre in campioni diversi, provenienti da ceppi diversi e in diverse fasi di crescita, come nel caso del peptide K.QSDDATGVAIRPTSK.S che è stato ritrovato, in tutti i campioni testati, con un punteggio elevato e ha permesso di identificare Cwp1p. Questo è anche il caso del peptide R.IGSIVANR.Q che ha permesso di identificare Pir1p e del peptide

K.SSGTLEMNLK.G che ha permesso di identificare Pir2p. Si può dedurre, quindi, che alcune sequenze di aminoacidi sono altamente conservate; lo stesso non si può affermare per le altre proteine identificate nel presente lavoro.

Crh2p/Utr2p è stata identificata nel ceppo *M25* (StaYPD), nel ceppo 3238-32 Δ *FLO11* in fase LogYPD e in fase FlorYNB e nel ceppo di laboratorio *CEN.PK113.7D* (StaYPD). La proteina Crh2p è coinvolta nella costruzione della parete cellulare e viene localizzata nei siti di crescita (gemme) della parete (Rodriguez-Peña *et al.*, 2002).

Del gruppo delle proteine Gas (Gas1p, Gas2p, Gas3p, Gas4p, Gas5p), sono state isolate Gas1p, Gas3p, Gas5p con una frequenza di isolamento (campioni in cui è stata isolata la proteina sul totale dei campioni testati) abbastanza uniforme in tutti i ceppi e in tutte le condizioni testate (Tab.1).

Alcune proteine come la mannosio-proteina Tip1p e la proteasi aspartica Yps1p sono state identificate una sola volta. In particolare Tip1p è stata isolata solo nel ceppo flor di laboratorio 3238-32 in fase StaYPD e Yps1p solo nel ceppo flor *M23* (StaYPD). Questo è dovuto al fatto che il taglio della proteina con Tripsina crea un gran numero di peptidi di piccole dimensioni che non vengono letti dallo strumento quindi la probabilità di identificare la proteina è bassa.

La mannosio-proteina Hpf1p (Dupin *et al.*, 2000) è stata identificata nei ceppi *M25*, *M23*, 3238-32 e 3238-32 Δ *FLO11*, in diverse fasi di crescita (Tab.1) mentre il suo omologo Hpf1'p, che presenta il 71% di similarità con Hpf1p, esclusivamente nel ceppo 3238-32 Δ *FLO11*.

La flocculina Muc1p/Flo11p è stata ritrovata nei ceppi *M23* (StaYPD) e 3238-32 (LogYPD e FlorYNB). La bassa frequenza di isolamento di tale proteina è da

imputare alla sua conformazione, in particolare l'elevata presenza di Treonina e Serina nel dominio centrale conferisce un numero elevato di siti di *O*-glicosilazione; inoltre, il taglio enzimatico con Tripsina limita il numero di peptidi identificabili con la tecnica utilizzata.

Con l'isolamento della proteina Sag1p nei ceppi aploidi 3238-32 e 3238-32 Δ FLO11 (ceppi MAT α) si è confermato il dato di Doi e collaboratori (1989). Sag1p, infatti, è un' α -agglutinina che si lega ad Aga1p durante l'agglutinazione ed è espressa solo in cellule α (Doi *et al.*, 1989).

La proteina ASL Cis3p/Pir4p è assente solo nel ceppo flor di laboratorio 3238-32 in tutte le condizioni testate e nel suo delecto 3238-32 Δ FLO11 (LogYPD e StaYPD). Questa proteina differisce dalle restanti proteine Pir in quanto non è indotta da stress da calore ed è espressa durante la fase G2 del ciclo cellulare di *Saccharomyces cerevisiae*. Pir4p, infatti, è coinvolta nella sintesi di nuova parete cellulare durante la formazione della gemma (Moukadiri *et al.*, 1999).

Scw10p, proteina omologa di Scw4p, è presente nella parete cellulare dei ceppi 3238-32 Δ FLO11 e 3238-32, in alcune fasi di crescita dei ceppi M23 (Flor YNB) ed M25 (LogYPD), mentre è totalmente assente nel ceppo vinario commerciale e nel ceppo di laboratorio.

Tab.1: Identificazione tramite LC/MS–MS di CWP in ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

CWPs		M25			M23			3238-32			ΔFLO11			EC1118		CEN.PK113.7D	
		Log	Sta	Flor	Log	Sta	Flor	Log	Sta	Flor	Log	Sta	Flor	Sta	Flor	Sta	Flor
Cwp1	GPI	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
Ssr1	GPI	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Crh1	GPI	×	×	×	×	×	×	×	×	×			×		×	×	×
Crh2	GPI		×								×		×			×	
Gas1	GPI	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×			×	
Gas3	GPI	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×		×		
Gas5	GPI	×		×		×	×						×		×	×	
Ecm33	GPI		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
Yps1	GPI					×											
Flo11	GPI					×		×		×							
Hpf1	GPI	×		×	×	×	×	×		×			×				
Hpf1'	GPI												×				
Tip1	GPI									×							
Sag1	GPI							×	×	×			×	×			
Pir1	ASL	×	×	×	×	×	×	×	×	×			×	×	×	×	×
Pir2	ASL	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	
Pir3	ASL		×	×		×	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×
Pir4	ASL	×	×	×	×	×	×						×	×	×	×	
Scw4	ASL	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×	

Ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*: M25, M23, 3238-32, 3238-32ΔFLO11, EC1118, CEN.PK113.7D.
Log: fase logaritmica (crescita in YPD liquido per 24 ore);
Sta: fase stazionaria (crescita in YPD liquido per 48 ore);
Flor: sviluppo in YNB + 4% di EtOH per permettere la formazione di biofilm (flor)
CWP: (cell wall proteins) proteine di parete cellulare.
 GPI: proteine GPI-modificate;
 ASL: proteine ASL

Tab. 2: Sequenze peptidiche di CWP in ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* identificate tramite LC-MS-MS (ESI-Q-TOF)

Proteina	Peptide	Massa		M23			M25			3238-32			ΔFLO11			EC1118		CEN.PK	
		Observed	Mr(expt)	Log	Sta	Flor	Log	Sta	Flor	Log	Sta	Flor	Log	Sta	Flor	Sta	Flor	Sta	Flor
Cwp1p	K.DGHLNYK.S	423,74	845,47	18	13	17		21							41	62			
	K.LKFDDDK.Y	440,76	879,51			21													
	V.VNEDGSFK.E	448,24	894,47													22			
	I.KDGHLNYK.S	487,33	972,64		37														
	K.LKFDDDKY.A	522,30	1.042,58		25														
	L.SVYSDNGTLK.L + Deam (NQ)	542,80	1.083,59		37							31				52			
	K.DGSSYIFSSK.Q	545,74	1.089,46					43						42					
	K.QSDDATGVAIR.P	566,77	1.131,52			68													
	F.SIKDGHLNYK.S	392,24	1.173,70		13										25	28			
	F.SIKDGHLNYK.S	587,86	1.173,70	60	43		44			35		24			59	59			
	Y.LSVYSDNGTLK.L + Deam (NQ)	599,34	1.196,66												58				
	K.YAVVNEDGSFK.E	614,84	1.227,67			57		71											
	A.DSEEFGLVSIR.S	626,34	1.250,66		59	56		65	67			67							
	K.QSDDATGVAIRPT.S + Deam (NQ)	665,89	1.329,76			77													
	K.EGESDAATGFSIK.D	699,88	1.397,74			46		94											
	Y.AIKDGSSYIFSSK.Q	701,92	1.401,82																
	K.QSDDATGVAIRPTSK.S	773,35	1.544,68	125	104	149	120	124	135	120		88	113	13	128	124			
	K.QSDDATGVAIRPTSK.S	515,95	1.544,82	55	38			19				28	42	65	65				
	K.LGSGSGSFEATITDDGK.L	821,44	1.640,87		160	157		135	166				147			144	154		
	K.FDDDKYAVVNEDGSFK.E	924,89	1.847,76	121		140	80	30	95		93					134	99		
K.FDDDKYAVVNEDGSFK.E	616,99	1.847,96					41												

Francesca Fancellu

Studio proteomico della parete cellulare di *Saccharomyces cerevisiae* in condizioni di stress

Tesi di dottorato in Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Università degli Studi di Sassari

	K.LGSGSGSFEATITDDGKLF	941,95	1.881,88				39								175	156	188		
	K.LGSGSGSFEATITDDGKLF	628,32	1.881,95	97															
Cwp1p	R.SGSDLQYLSVYSDNGTLK.L	973,93	1.945,85			120		107	101						101				
	R.SGSDLQYLSVYSDNGTLK.L + 2 Deam (NQ)	974,54	1.947,07			96		87											
	K.SSSGFYAIKDGSSYIFSSK.Q	1.016,06	2.030,11			33			14						86				
	K.EGSESDAATGFSIKDGHLNYK.S	742,66	2.224,95												137				
Ssr1p	L.ACVAQVGK.S	416,73	831,45	29			42				32					17	32	27	
	Y.CEHENSAVKK.C	601,26	1.200,50				53												
	-.TPPACLLACVAQVGK.S	792,98	1.583,95					133											
	K.SSSTCDSLNVQTCY.C	811,35	1.620,68								51					65			
	K.CLDSICPNNDADAAAY.S	849,84	1.697,66	54								37							
	K.KCLDSICPNNDADAAAY.S	914,02	1.826,02	13			50									83	74	64	
	K.CLDSICPNNDADAAAYSAFK.S	1.066,52	2.131,02			153						109		87					
	K.CLDSICPNNDADAAAYSAFK.S	711,37	2.131,08					22											
	K.CLDSICPNNDADAAAYSAFK.S + Deam (NQ)	1.066,99	2.131,97					113			107								
	K.KCLDSICPNNDADAAAYSAFK.S + Deam (NQ)	753,98	2.258,91											46					
	K.SSSTCDSLNVQTCYCEHENSAVK.K	892,66	2.674,97			161						80							
	K.SSSTCDSLNVQTCYCEHENSAVK.K + Deam (NQ)	893,05	2.676,14			96	60			120	90								
	K.SSSTCDSLNVQTCYCEHENSAVKK.C	701,78	2.803,08	38								62	52	73	33				
	K.SSSTCDSLNVQTCYCEHENSAVKK.C + Deam (NQ)	935,69	2.804,05	90						137	181		111		92	114			83
Crh1p	K.WFTDLK.H	405,23	808,44					23			23								
	R.YDNPSLK.S	418,73	835,45					9											
	W.YLDGESVR.V	469,72	937,43							45									
	Y.TLDWAMDK.T	490,26	978,51														28		

	K.RYDNP SLK.S	496,75	991,48	34		52		40	45		36	36		42		27	
	K.VIVTDYSTGK.K	541,81	1.081,60					57	61			61					56
	K.VIVTDYSTGKK.Y	605,82	1.209,63					8	33					50			61
Crh1p	K.YGSDGLSMTLAK.R	621,77	1.241,53					84	73								
	R.GEFHGVDTPTDK.F	651,85	1.301,69					64									
	K.TTWYLDGESVR.V	663,81	1.325,60			35		35	41								
	Y.DRGEFHGVDTPTDK.F	787,39	1.572,77									42					
	K.YTYGDQSGSWESIEADGGSIIY.G	1.143,02	2.284,02		70		68					66					
	K.KYTYGDQSGSWESIEADGGSIIY.G	1.207,10	2.412,18	33							21					28	11
	K.YTYGDQSGSWESIEADGGSIIYGR.Y	1.249,49	2.496,97												99		
Crh2p	K.FKDYSSK.L	437,71	873,40											37			
	K.NSGGTVLSSTR.A	539,77	1.077,53								42						
	K.TSHLAGVVTGF.I	544,82	1.087,62														55
	Y.VYTSSSEFLAK.D	616,32	1.230,63										36				
	R.YSFSHDSMPVPICK.S	914,47	1.826,92					32									
Gas1p	K.KLNTNVIR.V	479,28	956,55	39	38	26	38	25	17	80		42					
	Y.MYFEETNK.Y	531,26	1.060,51							26							29
	R.QYISDKNYR.K	593,78	1.185,55											45			
	K.YGAYSFCTPK.E	597,31	1.192,61			53		71				55		47			
	-.DDVPAIEVVGNK.F	628,38	1.254,74					41					36				
	K.YGLV SIDGNDVK.T	639,84	1.277,66	49													
	F.SEYGCNEVTPR.L + Deam (NQ)	656,34	1.310,67	35						60			49				
	S.EINKISPTSANTK.S	702,81	1.403,60			14											
	Y.VIADLAAPATSINR.D	706,50	1.410,99	40	37						37				29		

R.KIPVGYSSNDDDEDTR.V + Deam (NQ)	848,37	1.694,72			25												
K.ADFYGINMYEWCWK.S	877,40	1.752,78						104			108						
K.TLDDFNYSSEINKISPTS.A + Deam (NQ)	1.073,41	2.144,81	34		15												

Gas3p	A.MLPIHIK.N	426,71	851,42								13						
	Y.SAADNTDLR.L	481,71	961,42							89							
	K.ESEISSDSIYK.C	629,32	1.256,63			26				50	36	47		21			
	K.DDFVNLESQK.N	654,38	1.306,74			31											
	K.YLQCNSLDGK.V	656,33	1.310,64									49					
	R.IYSLNPDLNHDK.C	714,88	1.427,74	19													
	R.IYSLNPDLNHDK.C	714,92	1.427,83				39	10									
	R.TFDEVSEGLYGGLK.N	757,91	1.513,81					81				34					
	F.SGNEVINDQSDYAK.I	770,36	1.538,70				44							57			
	R.ADPSGTYSLSYLSR.V	772,83	1.543,64					75	69								
	K.SKGVGNIVNVSFSQSG.Y + 2 Deam (NQ)	790,41	1.578,81			7											
	R.DAYAFQQLGVNTR.I	791,37	1.580,72						76	91							
	Y.AILDVNSGNYGESLNR.A	861,45	1.720,89							119	50	85				52	
	R.FIKPSSATNSESNEVFFVK.G	1.123,51	2.245,00			30											
	R.FIKPSSATNSESNEVFFVK.G	749,35	2.245,02			71									31		
	K.NVFSGLVYVEYTEEANNYGLVK.L + Deam (NQ)	1.234,03	2.246,04			25											
	K.LDDSGSLTYKDDFVNLESQK.N	796,41	2.386,22									117					
K.NYPNVLGFFSGNEVINDQSDYAK.I + Deam (NQ)	1.296,05	2.590,08			22												
K.GVDYQPGSSGYDADSDTDILSDPEVCAR.D + Deam (NQ)	1.016,13	3.045,47									20						

Gas5p	R.YDPACSY.N	875,30	874,29				22												
	R.QIPVGYSA.A.D	453,74	905,47											71					
	Y.GLVQIDGDKVTK.L	636,90	1.271,78				47											34	
	L.ILDVNTPTSISR.Y	693,92	1.385,82															37	
	Y.LILDVNTPTSISR.Y	750,48	1.498,94		32													23	
	K.LTDFENLKNEYSK.V	800,89	1.599,76								88								
Gas5p	K.LYQDYSVPVFLSEFGCNQVK.S	1197,02	2.392,03				82												
Ecm33p	K.VIDGFNK.V	396,73	791,45	17						21			3						
	K.KITGDLNMQEL.I	631,34	1.260,67							15							8		
	K.KVNVFNINNR.Y	666,39	1.330,76					51	50			50							
	K.VGQSLIVSNDELSK.A + Deam (NQ)	788,96	1.575,92		103	113		87					62	123				105	
	K.LQSNQAIQGDSFVCK.N + Deam (NQ)	812,91	1.623,81		85				63	86	32		74						
	K.KLQSNQAIQGDSFVCK.N + Deam (NQ)	584,99	1.751,94															29	25
	K.KLQSNQAIQGDSFVCK.N + Deam (NQ)	876,96	1.751,91	67						87	30						54		
	F.STDLQNANNIIVSDTTLESVEGFSTLK.K	966,18	2.895,52									77							
Yps1p	Y.DLENLEISMAQAR.Y	745,48	1.488,94		41														
Flo11p	G.FPTALVPR.G	450,78	899,55								50								
	R.GSSEGTSCNSIVNGCPNLDFNWH.M + Deam (NQ)	1277,16	2.552,31		100														
Hpf1p	A.ILNGGSVSVGLQR.R + Deam (NQ)	601,35	1.200,69								74								
	N.AILNGGSVSVGLQR.R + Deam (NQ)	636,89	1.271,76								35								
	F.SFSNAILNGGSVSVGLQR.R + Deam (NQ)	854,58	1.707,15		58		47												
	F.SFSNAILNGGSVSVGLQR.R + 2 Deam (NQ)	854,62	1.707,22	54									45						
	Y.LHYPDTFTGQTVVFK.G	877,10	1.752,19																
	K.GEVTFSPYSNSGAFSFSN.A	948,98	1.895,95				23												

Pir2p	K.GGILTDGK.G	380,68	759,35	25														
	K.GGILTDGK.G	760,39	759,39			31												
	R.IGSIVANR.Q	415,28	828,54		45	47	45	45	53			41		41	45		53	43
	K.GGILTDGKGR.I	487,27	972,52		34							34	21	45				
	K.TSGTLEMNLK.G	547,27	1.092,52		66			86	65			73		65				
	K.TSGTLEMNLK.G + Oxidation (M)	555,34	1.108,66											44				
	A.VSQIGDGQIQATTK.T + 2 Deam (NQ)	724,91	1.447,81									16						
	R.QFQFDGPPPQAGAI.Y	736,94	1.471,86		3													
Pir2p	R.QFQFDGPPPQAGAIY.A	818,37	1.634,73				27		89					86				
	Q.CTPVHLEAIDLIDC.-	828,37	1.654,73	80				61	51					80		76		
	R.QFQFDGPPPQAGAIYAA.G	889,46	1.776,90					67	73			101		100				
	R.QFQFDGPPPQAGAIYAAG.W	917,97	1.833,93									24						
	R.QFQFDGPPPQAGAIYAAGW.S	1.011,05	2.020,08					110										
	T.FYNLYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	1.021,02	2.040,02									83						
	H.IGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	1.021,06	2.040,10		67	87		73	54						78	67	82	
	R.QFQFDGPPPQAGAIYAAGWS.I	1.054,57	2.107,13			20												
	Y.DEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	808,04	2.420,36	96														
	Y.DEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	1211,69	2.421,36	93	132		10								93	127	133	
	N.LYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	1.349,66	2.697,30									19						
	N.LYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	900,14	2.697,41		49	145	33	85						78	89	59		
	R.QFQFDGPPPQAGAIYAAGWSITPDGN.L	1353,20	2.704,39					15										
	Y.NLYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	938,16	2.811,46		138	80		70	60									
	Y.NLYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.- + Deam (NQ)	1.406,80	2.811,58		141		75									12	143	
T.FYNLYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC.-	1.041,55	3.121,62			103						105							

Trascrizione dei geni *FLO11*, *GAS1*, *GAS3*, *GAS5*, *HPF1*.

Tramite Real-time PCR è stato analizzato il livello di trascrizione dei geni *FLO11*, *GAS1*, *GAS3*, *GAS5*, *HPF1*. Questi geni sono stati scelti perché risultano coinvolti nella risposta agli stress. Negli esperimenti condotti, infatti, i ceppi sono stati sottoposti a stress dovuto a carenza di nutrienti (StaYPD), stress da etanolo e stress dovuto al passaggio delle cellule da glucosio (fonte di carbonio fermentescibile) a etanolo (fonte di carbonio non fermentescibile) (FlorYNB).

FLO11, *GAS1*, *GAS3*, *GAS5* e *HPF1* codificano per proteine GPI-modificate, quindi proiettate verso la superficie della cellula (Kapteyn *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2006) che svolge un ruolo fondamentale nella risposta allo stress.

HPF1 è regolata dai fattori di trascrizione Msn2p e Msn4p che mediano la risposta a diverse forme di stress e inducono la trascrizione di una serie di geni contenenti le sequenze STRE (*stress responsive element*) CCCCT.

FLO11 è coinvolto nella formazione del biofilm su superfici liquide (Zara *et al.*, 2005) e altri fenotipi di interazione cellula-cellula e cellula-superficie, in condizione di carenza nutrizionale (Caro *et al.* 1997; Guo *et al.* 2000; Reynolds e Fink, 2001; Reynolds *et al.*, 2008). *FLO11* infatti presenta nel promotore i siti di attacco per i fattori di trascrizione Ste12p e Tec1p. Ste12p attiva geni coinvolti nelle pathway che regolano la crescita invasiva e pseudoifale e collabora con Tec1p per la regolazione di geni specifici per la crescita invasiva in mancanza di fonti azotate e/o zucchero fermentescibile.

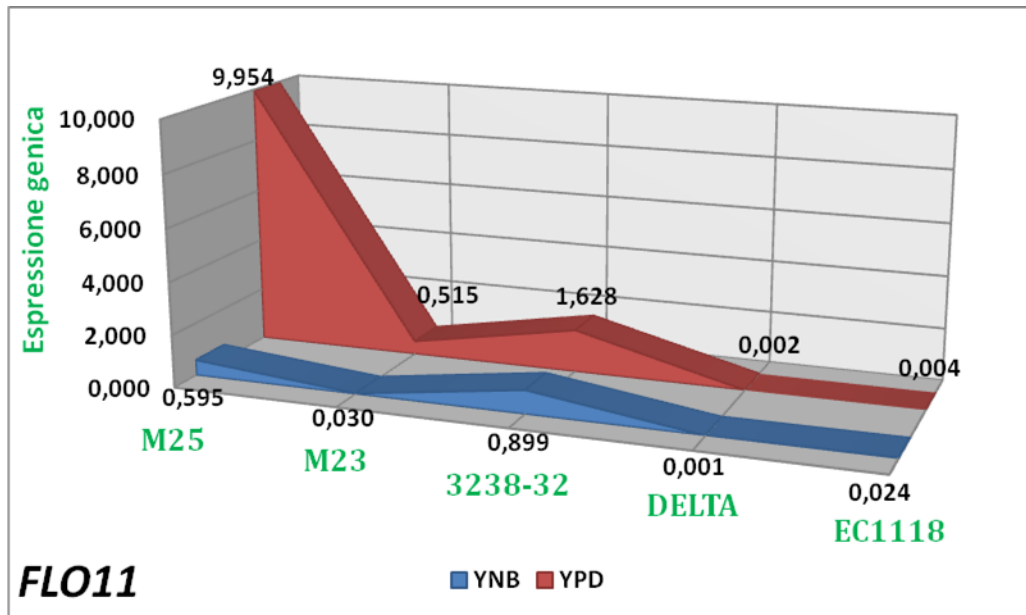
La scelta dei geni *GAS* è dovuta al loro coinvolgimento nella costruzione della parete cellulare e nella risposta compensativa agli stress della parete (Arroyo *et al.*, 2007). La parte centrale di queste proteine presenta un dominio catalitico

responsabile della specifica attività enzimatica nella biogenesi della parete. Sono coinvolte nel processo di rimodellamento nei siti di crescita dove la parete è più plastica, come le estremità ifali o il sito di crescita della gemma (Arroyo *et al.*, 2007). Sul promotore di *GAS1* è presente il sito di attacco per il fattore di trascrizione Rpn4p che è attivato in risposta a stress diversi; sul promotore di *GAS3* agiscono i fattori di trascrizione Hap4p e Rox1p che mediano la risposta della cellula in condizioni ipossiche e il promotore di *GAS5* è regolato dai fattori di trascrizione, ritrovati anche in *FLO11*, Ste12p e Tec1p.

Il livello di trascrizione dei geni considerati è stato misurato dopo 48 di crescita in YPD (OD₆₀₀ ~ 8) (StaYPD) e dopo 72 ore in terreno YNB + 4% EtOH (FlorYNB).

Per poter confrontare il livello di espressione in momenti diversi e fra ceppi diversi ci si è riferiti al valore dell'espressione del gene *housekeeping ACT1* (ACT=1).

Gene *FLO11*

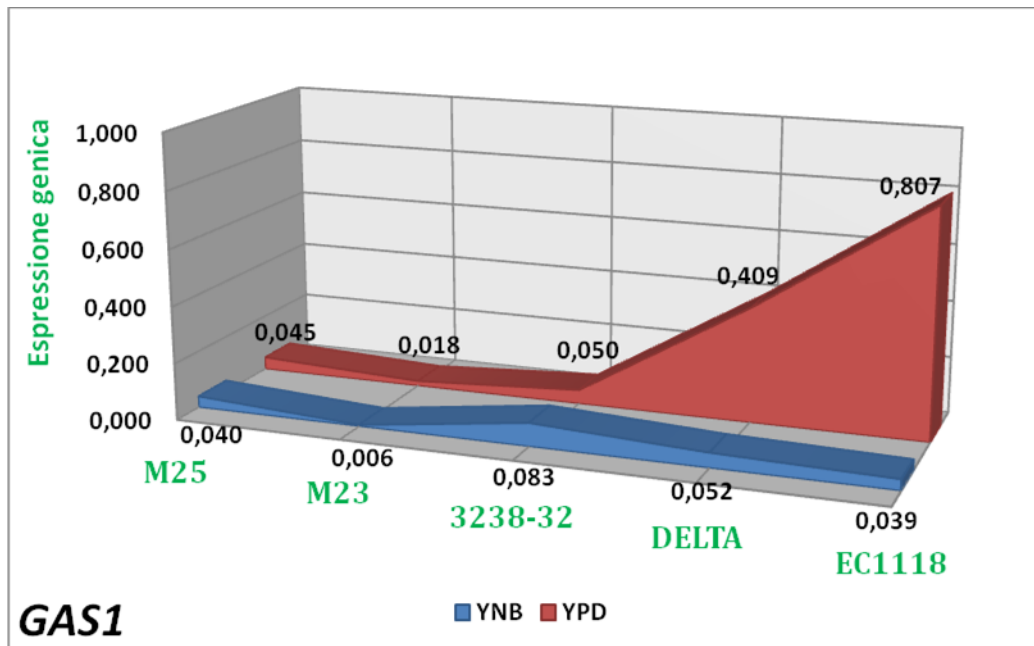


<i>FLO11</i>	Livello di trascritto	
Ceppi	FlorYNB	StaYPD
<i>M25</i>	0,595	9,954
<i>M23</i>	0,030	0,515
<i>3238-32</i>	0,899	1,628
<i>DELTA</i>	0,001	0,002
<i>EC1118</i>	0,024	0,004

Fig.3 Quantificazione del livello di trascritto dell'mRNA di *FLO11* mediante qRT-PCR nei ceppi *M25*, *M23*, *3238-32*, *3238-32ΔFLO11*, *EC1118*.

Il gene *FLO11* presenta un livello di espressione più elevato nei ceppi che formano biofilm (*M25*, *M23*, *3238-32*) in StaYPD rispetto alle cellule in FlorYNB. I ceppi *3238-32ΔFLO11* ed *EC1118* mostrano un livello di espressione vicino allo zero.

Gene *GAS1*

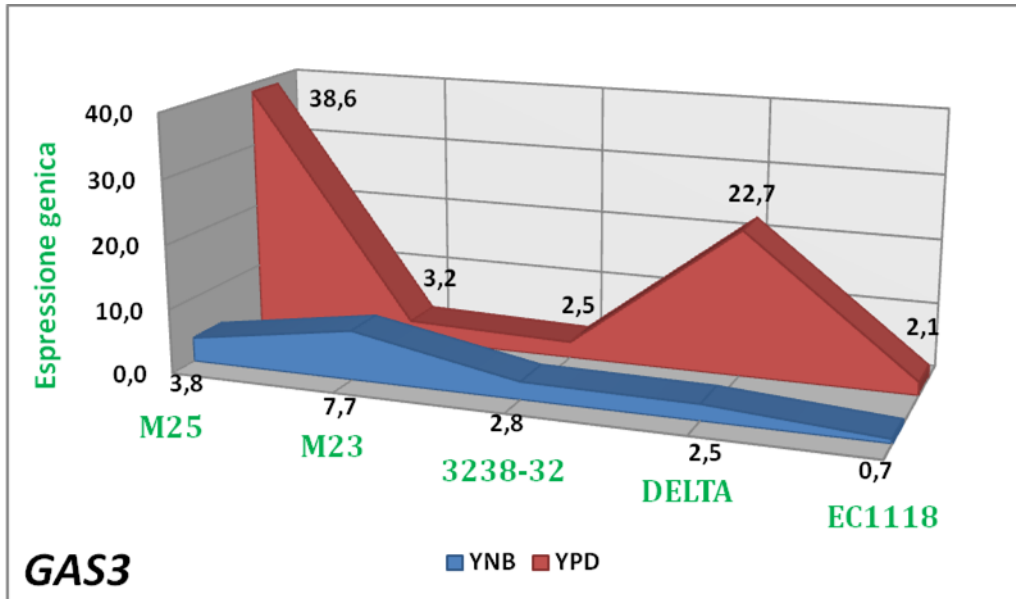


<i>GAS1</i>	Livelli di trascritto	
	FlorYNB	StaYPD
<i>M25</i>	0,040	0,045
<i>M23</i>	0,006	0,018
<i>3238-32</i>	0,083	0,050
<i>DELTA</i>	0,052	0,409
<i>EC1118</i>	0,039	0,807

Fig.4 Quantificazione del livello di trascritto dell'mRNA di *GAS1* mediante qRT-PCR nei ceppi *M25*, *M23*, *3238-32*, *3238-32ΔFLO11*, *EC1118*.

Il gene *GAS1* presenta un livello di espressione più elevato nei ceppi non formanti biofilm (*3238-32ΔFLO11* ed *EC1118*) e nella fase StaYPD. I ceppi *M25*, *M23*, *3238-32* mostrano un livello di espressione vicino allo zero.

Gene *GAS3*

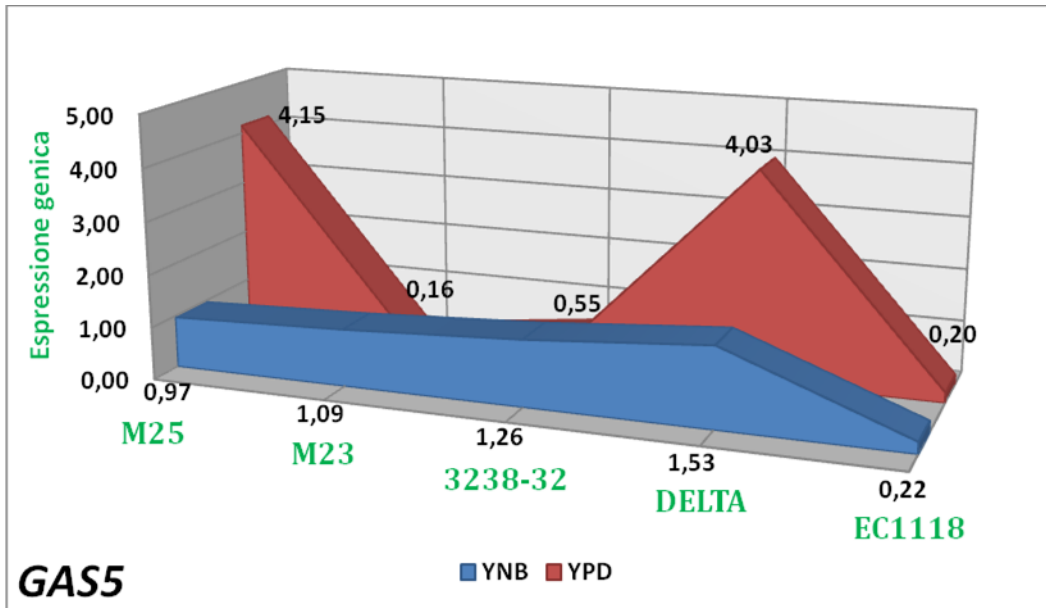


<i>GAS3</i>	Livelli di trascritto	
	FlorYNB	StaYPD
<i>M25</i>	3,8	38,6
<i>M23</i>	7,7	3,2
<i>3238-32</i>	2,8	2,5
<i>DELTA</i>	2,5	22,7
<i>EC1118</i>	0,7	2,1

Fig.5 Quantificazione del livello di trascritto dell'mRNA di *GAS3* mediante qRT-PCR nei ceppi *M25*, *M23*, *3238-32*, *3238-32ΔFLO11*, *EC1118*.

Il gene *GAS3* presenta un livello di espressione più elevato nei ceppi *M25* e *3238-32ΔFLO11* (StaYPD). Il ceppo *M23* è l'unico ceppo in cui il livello di espressione è maggiore nelle cellule prelevate da terreno di florizzazione rispetto alle cellule cresciute in YPD. *EC1118* mostra un livello di espressione di *GAS3* maggiore in StaYPD rispetto alla fase FlorYNB e il ceppo *3238-32*, con valori di espressione di circa 2,5, non mostra differenze di espressione fra le due fasi di crescita.

Gene *GAS5*

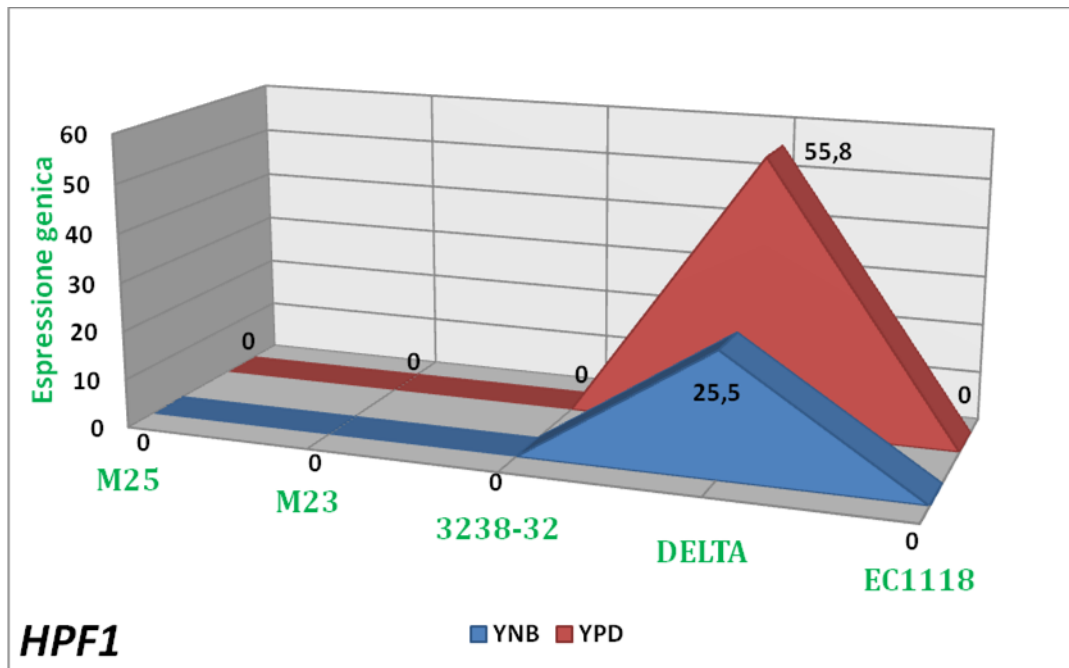


<i>GAS5</i>	Livelli di trascritto	
Ceppi	FlorYNB	StaYPD
<i>M25</i>	0,97	4,15
<i>M23</i>	1,09	0,16
<i>3238-32</i>	1,26	0,55
<i>DELTA</i>	1,53	4,03
<i>EC1118</i>	0,22	0,20

Fig.6 Quantificazione del livello di trascritto dell'mRNA di *GAS5* mediante qRT-PCR nei ceppi *M25*, *M23*, *3238-32*, *3238-32ΔFLO11*, *EC1118*.

Il gene *GAS5* presenta un livello di espressione più elevato nei ceppi *M25* e *3238-32ΔFLO11* nella fase StaYPD. *M23* è espresso maggiormente in FlorYNB rispetto alla fase StaYPD così come il ceppo *3238-32*. il ceppo commerciale vinario *EC1118* non presenta variazione di espressione nelle due fasi di crescita.

Gene *HPF1*



<i>HPF1</i>	Livelli di trascritto	
Ceppi	FlorYNB	StaYPD
<i>M25</i>	0	0
<i>M23</i>	0	0
<i>3238-32</i>	0	0
<i>DELTA</i>	25,5	55,8
<i>EC1118</i>	0	0

Fig.7 Quantificazione del livello di trascritto dell'mRNA di *HPF1* mediante qRT-PCR nei ceppi *M25*, *M23*, *3238-32*, *3238-32ΔFLO11*, *EC1118*.

Il gene *HPF1* è sovraespresso solo nel ceppo *3238-32ΔFLO11* con valori elevati sia in YPD che in etanolo e maggiori in YPD. Tutti gli altri ceppi presentano un valore di espressione pari a zero.

DISCUSSIONE

Alcune proteine “GPI-modificate” caratterizzano la parete cellulare dei ceppi flor

Per caratterizzarne il profilo proteico di 6 ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, attraverso l'analisi con metodiche di spettrometria di massa (MS) degli estratti di parete cellulare, è stato effettuato un inventario di proteine di parete (CWPs), legate covalentemente e isolate in diverse condizioni e fasi di crescita. L'identificazione delle proteine tramite ESI-Q-TOF è un metodo chiaro e diretto, infatti per riconoscere una proteina sono sufficienti di solito solo due peptidi differenti (En-Ong e Mann, 2005). L'isolamento e l'identificazione dei peptidi specifici per una proteina confermano la presenza della proteina nel campione. Tuttavia, la mancata identificazione di un peptide non significa necessariamente che la proteina non sia presente nel campione, ma potrebbe semplicemente significare che i peptidi isolati sono inferiori, di numero, alla soglia di lettura. Per questo motivo, l'identificazione attraverso spettrometria di massa fornisce un'immagine molto limitata delle proteine presenti in un campione (En-Ong e Mann, 2005). Inoltre, sebbene l'approccio proteomico basato sulla MS permetta di identificare prontamente un gran numero di proteine, by-passando la visualizzazione su gel, non è possibile valutare l'abbondanza di tali proteine nel campione in termini quantitativi (En-Ong e Mann, 2005). Si può comunque avere un'idea dell'abbondanza della proteina dal punteggio (score) attribuito, dal software, a tale proteina che è il risultato della somma dei punteggi dei peptidi attraverso i quali è stata identificata. Ne consegue che un alto punteggio di identificazione può essere considerato direttamente proporzionale all'abbondanza della proteina (Allet *et al.*, 2004).

Con l'analisi MS sono state identificate complessivamente 20 proteine. Fra queste, 14 sono proteine-GPI-modificate (GPI-CWPs) e le restanti sei proteine sono legate alla maglia di β -1,3-glucano mediante un legame sensibile agli alcali (ASL-CWPs). Si può affermare, in generale, che dalla prima analisi qualitativa non si presentano differenze marcate imputabili al diverso comportamento dei ceppi nelle situazioni studiate. Un'unica grossa differenza si nota per il ceppo di laboratorio *CEN.PK113.7D*. Quando sottoposto a sviluppo in terreno minimo con aggiunta di etanolo (YNB+4%EtOH per 72 ore) presenta degli isolati di parete cellulare anomali, non appartenenti esclusivamente alla parete, questo ci porta a pensare che le cellule di *CEN.PK113.7D* nelle condizioni descritte subiscano dei danni irreversibili e per questo, in seguito ad isolamento della parete, vengono isolate proteine come Icl1p, che è indotta dall'esposizione ad etanolo (Fernandez, *et al.* 1992), Tdh2p e Tdh3p presenti soprattutto nel citoplasma e nella parete (Delgado *et al.*, 2001) e Acs1p che è espressa durante la crescita su fonte di carbonio non fermentiscibile e in condizioni anaerobiche (Kratzer e Schüller, 1995).

Tutti gli altri ceppi, nelle condizioni testate, hanno mostrato un inventario di proteine simile. Le proteine che hanno avuto una elevata frequenza di isolamento (campioni in cui è stata isolata la proteina sul totale dei campioni testati), in generale in tutti i ceppi e, soprattutto nelle diverse fasi, non possono considerarsi esclusivamente responsabili e/o coinvolte nella formazione di biofilm, ma hanno in genere un ruolo strutturale come Cwp1p e/o enzimatico come la proteina Crh.

Fra queste, ad esempio, le proteine Cwp1p e Ssr1p (proteine GPI-modificate), sono presenti negli isolati di parete di tutti i ceppi analizzati. Cwp1p e Ssr1p sono proteine di piccole dimensioni (24268 Da e 23268 Da rispettivamente) che

possiedono un'elevata quantità di residui di Serina e Treonina e sono altamente *O*-glicosilate (*Saccharomyces* Genome Database, www.yeastgenome.org). Queste proteine sembrano non avere funzioni enzimatiche ma possono essere importanti nel determinare le proprietà della superficie cellulare. Cwp1p è regolata dal ciclo cellulare e mostra un incremento dei livelli del trascritto nella fase S/G2 (Caro *et al.*, 1998). È una proteina non essenziale per la crescita, sia in terreno minimo che in terreno ricco, ma è importante in condizioni di stress come l'esposizione a Congo red e Calcofluor white (Van Der Vaart *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1994) ed è inoltre altamente espressa in condizioni di stress che portano alla riduzione del contenuto di β -1,3-glucano nella parete cellulare (Shimoi *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998). La sequenza aminoacidica di Cwp1p, in seguito al taglio con Tripsina, permette di evidenziare un gran numero di peptidi. Fra questi K.QSDDATGVAIRPTSK.S insieme a K.LGSGSGSFEATITDDGK.L sono quelli a più alta frequenza di isolamento e con i punteggi maggiori.

Un'altra proteina con funzione strutturale è Ccw14p (Ssr1p) che è stata isolata nello strato più interno della parete cellulare (Mrsa *et al.*, 1999b). È stato successivamente dimostrato che questa proteina è identica (100% di similitudine) a Icw1p con una percentuale di residui di Treonina e Serina del 40% (Moukadiri *et al.*, 1997). La distruzione della ORF che codifica per Icw1p causa un incremento di sensibilità all'azione della Zimoliasi e questo indica che tale proteina ha un ruolo strutturale in associazione con il glucano (Moukadiri *et al.*, 1997).

Crh1p, proteina che appartiene alla famiglia 16 delle idrolasi glucosidiche, sembra avere un ruolo, diretto o indiretto, nel legare la chitina alla maglia di β -1,3-glucano (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000; Cabib *et al.*, 2007). È una proteina espressa sia

durante la crescita vegetativa che in fase di sporificazione. La sovraespressione di *CRH1* porta un incremento sostanziale del complesso chitina- β -1,6-glucano; allo stesso tempo aumentano anche le piccole quantità di chitina legata al β -1,3-glucano, suggerendo che Crh1p in qualche modo contribuisca alla sua formazione (Cabib *et al.*, 2007). In accordo con questi autori anche nel presente lavoro Crh1p è stata identificata in tutti i ceppi e nella maggior parte delle condizioni testate, suggerendo che non ha un ruolo chiave nella formazione del biofilm dei ceppi vinari flor.

Crh1p e Crh2p sono proteine omologhe di glicosiltransferasi che trasportano le catene di chitina dalla chitina-sintasi III al β -1,6-glucano. Crh2p, a differenza di Crh1p, è stata isolata solo in pochi campioni. È una proteina di parete importante nel legame della chitina al β -1,6-glucano, sembra essere una chitina-transglicosidasi ed è localizzata soprattutto nella strozzatura della gemma. Ha un ruolo nel mantenimento della parete cellulare ed è espressa solo durante la crescita vegetativa (Rodriguez-Pena *et al.*, 2000, 2002; Cabib *et al.*, 2007). La frequenza di isolamento, se pur limitata, non è attribuibile al diverso background dei ceppi visto che è stata isolata sia in ceppi flor, come *M25* che in ceppi non flor vinari (*3238-32 Δ FLO11*) che nel ceppo di laboratorio. Probabilmente visto il suo ruolo strutturale, la causa della mancata identificazione, nella fase LogYPD dei ceppi *3238-32 Δ FLO11* ed *EC1118* e nella fase StaYPD del ceppo *3238-32 Δ FLO11*, è da imputare alla concomitanza di due fattori: peptidi di dimensioni ridotte e sensibilità dello strumento.

Come le proteine precedenti, Ecm33p è stata isolata in tutti i campioni studiati. Questo risultato, atteso, è spiegabile in quanto la famiglia genica a cui appartiene il gene *ECM33* è ubiquitaria e altamente conservata nel regno dei funghi (de Groot *et*

al., 2007). La Ecm33p è coinvolta nell'organizzazione della parete e pur avendo funzione molecolare sconosciuta (*Saccharomyces* Genome Database, www.yeastgenome.org), sembra avere un ruolo importante nella crescita apicale della gemma (Bidlingmaier e Snyder, 2002), nella biogenesi della parete cellulare ed è richiesta per assicurare integrità alla parete (Pardo *et al.*, 2004; Terashima, *et al.*, 2003; Reinders *et al.*, 2007).

Altre proteine con un ruolo generale strutturale per la parete sono le proteine Pir (*Protein with internal repeats*), appartenenti alla classe delle ASL, le quali sono state ritrovate nella totalità dei campioni studiati in questo lavoro. Fra le ASL, oltre alle Pir, sono state isolate le proteine Scw4/10p, che, a differenza delle Pir, hanno attività glucosidica. Tutte le proteine ASL sono caratterizzate dal fatto che non contengono un segnale C-terminale per il legame al GPI e sono direttamente legate alla maglia di β -1,3-glucano.

Le proteine Pir, in particolare, Pir1p, Pir2/Hsp150p, Pir3p, Pir4/Cis3p sono caratterizzate da un massimo di dieci unità ripetute conservate e non sono essenziali per la vitalità cellulare. Sono coinvolte in vari fenomeni biologici e sono fortemente espresse durante lo stress da calore e la carenza di azoto. In particolare Pir1p e Pir3p sono proteine *O*-glicosilate, importanti per garantire stabilità alla parete cellulare (Ecker *et al.*, 2006) e la cui espressione è regolata dal ciclo cellulare (Toh-e, *et al.*, 1993; Mrsa, *et al.*, 1997).

Gli enzimi Scw4p e Scw10p appartengono alla famiglia delle proteine Ggl2p, famiglia che comprende β -1,3-glucanasi/ β -1,3-glucanosiltransferasi (famiglia delle idrolasi glicosidiche 17) (Cappellaro *et al.*, 1998). Le proteine codificate dai geni *SCW4* e il suo omologo *SCW10* sono le prime proteine ad aver mostrato un

coinvolgimento nell'incrocio. L'incrocio del doppio mutante *scw4 scw10* X *scw4 scw10* ha, infatti, mostrato una bassa efficienza. Il ruolo della famiglia delle glucanasi Scw4p-Scw10p-Bgl2p in questo fenotipo non è ancora stato chiarito (Cappellaro *et al.*, 1998; Sestak *et al.*, 2004).

La proteina Sag1p, caratterizza la parete cellulare dei ceppi aploidi 3238-32 e del suo mutante $\Delta FLO11$ che sono ceppi Mata (Zara *et al.*, 2005). Sag1p è, infatti, una agglutinina- α di cellule α che si lega alla proteina Aga1p durante l'agglutinazione sessuale. La metà N-terminale è omologa della superfamiglia delle immunoglobuline e contiene siti di legame per un agglutinina-a, la metà C-terminale è altamente glicosilata e contiene ancore GPI (de Nobel *et al.*, 1995; Zhao, *et al.*, 2001).

In alcuni casi la sequenza proteica aminoacidica si è rivelata un limite per l'identificazione con l'ausilio della spettrometria di massa (MS); questo è il caso della proteina Tip1p, piccola mannoproteina di 20,727 KDa, appartenente alla famiglia delle proteine Srp1p/Tip1p, ricche di residui di Serina e Alanina (Fujii *et al.*, 1999; Kondo and Inouye 1991). Sia le dimensioni ridotte che l'elevato grado di O-glicosilazione dovuto alla presenza di Serina nella catena aminoacidica, probabilmente, hanno impedito l'identificazione di una proteina che era attesa in quanto indotta in risposta a stress, come lo shift diauxico (De Risi *et al.*, 1997).

Un'altra proteina attesa, ma non identificata, è Yps1p. Infatti, la proteasi aspartica Yps1p è stata isolata in un solo campione ma, anche in questo caso, visto il coinvolgimento di tale proteina nel rimodellamento della parete in seguito a stress (Krysan *et al.*, 2005) l'assenza è da attribuire ai limiti della tecnica.

Il presente lavoro ha permesso di identificare, inoltre, alcune proteine appartenenti alla famiglia delle Gas. In particolare sono state isolate Gas1p, Gas3p, e Gas5p. L'assenza delle proteine Gas2p e Gas4p conferma il dato di Ragni *et al.*, (2007b) secondo il quale tali proteine sono richieste per la formazione della parete delle spore di *Saccharomyces cerevisiae* mentre Gas1p e Gas5p sono espresse durante la crescita vegetativa (Ragni *et al.*, 2007b). Le Gas appartengono alla famiglia 72 delle idrolasi glicosidiche e si pensa siano direttamente coinvolte nel rimodellamento del β -1,3-glucano o nella formazione dei "cross-linking" fra le catene di β -1,3-glucano e di β -1,6-glucano (Mouyna *et al.*, 2000; Ragni *et al.*, 2007). Tutte le proteine Gas hanno una struttura modulare; possiedono una sequenza segnale per la secrezione e un dominio N-terminale, detto NtD, che misura circa 330-350 aminoacidi. L'NtD è il dominio catalitico putativo; i due residui glutammato, che sono conservati in tutte le proteine Gas e in tutti i membri della famiglia GH72, sono essenziali per la catalisi (Carotti *et al.*, 2004; Fonzi, 1999; Mouyna *et al.*, 2000b). Il dominio è registrato come "Glyco hydro 72" nel database "Pfam" (<http://www.sanger.ac.uk//cgibin/Pfam/getacc?PF03198>) ed assume una conformazione "TIM-barrel", motivo strutturale maggiormente conservato tra quelli osservati nelle proteine (Mouyna *et al.*, 1998; Papaleo *et al.*, 2006). Un piccolo segmento ricco in aminoacidi flessibili, come T, G, A, P e S, unisce il NtD alla regione C-terminale. Nella regione che comprende l'NtD e il legame putativo, le proteine Gas2, Gas3, Gas4 e Gas5 mostrano differenti livelli di identità degli aminoacidi con Gas1p, e in particolare, Gas2p è la più simile a Gas1p con una identità del 53%. La regione C-terminale mostra lunghezza variabile ed è molto diversa fra tutte le proteine Gas; solo nelle proteine Gas1p e Gas2p si evidenzia un

alto grado di identità (41%) dovuto alla presenza di un dominio C-terminale, detto Cys-box di circa 100 aminoacidi. Il dominio Cys-box è registrato come Pfam X8 (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF07983>). È molto interessante il fatto che questo dominio, che contiene un motivo di sei residui di cisteina, sia condiviso da alcuni membri della famiglia GH72, da alcune β -1,3-glucanasi della famiglia GH17 delle piante, così come da altre proteine di origine vegetale la cui funzione è sconosciuta. Questo dominio è stato recentemente classificato come CBM43 e nel caso della proteina Gas1p sembra essere essenziale per la funzione e la stabilità della proteina stessa (Carotti *et al.*, 2004).

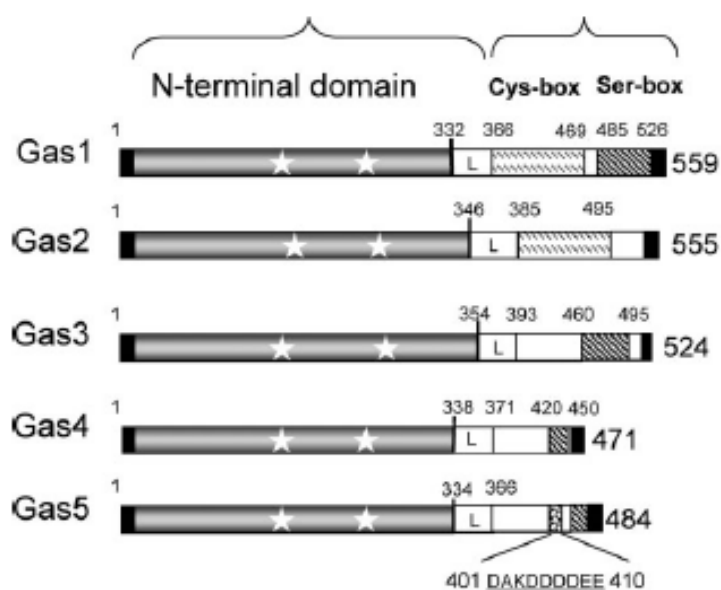


Fig.13: Architettura delle proteine Gas. Le parti nere alle estremità N- e C- terminali sono il peptide segnale e il segnale per il GPI. Le stelle indicano i residui catalitici: E161 e E262 in Gas1p (Carotti *et al.*, 2004), E176 e E275 in Gas2p, E169 e E283 in Gas3p, E161 e E266 in Gas4p, E160 e E262 in Gas5p. L è il segmento putativo di legame. Il Cys-box è il modulo ricco in cisteina, simile al CBM43, e il Ser-box è la regione ricca in Serina. È mostrata inoltre la breve regione acida di Gas5p. (Ragni *et al.*, 2007)

In Gas1p, Gas3p, Gas4p and Gas5p è presente una serie di residui di serina di lunghezza variabile (Ser-box) nella parte finale della regione C-terminale, che manca in Gas2p. È stato precedentemente dimostrato che il Ser-box non è richiesto per l'attività di Gas1p (Gatti *et al.*, 1994) e inoltre Gas5p contiene una sequenza altamente acida che potrebbe far parte di un segmento esteso e disordinato della proteina che include un Ser-box (Ragni *et al.*, 2007). Tutte le proteine Gas hanno all'estremità C-terminale un segnale di attacco per il GPI. Da sottolineare il fatto che Gas1p e Gas4p contengono un motivo di due aminoacidi basici contigui nella regione $\omega-1 \div \omega-4$ dove ω è il sito di legame del GPI. Questo motivo è il segnale per la localizzazione delle proteine nella membrana plasmatica (Caro *et al.*, 1997; Frieman e Cormack, 2003).

Pur essendo la proteina glucano-transferasi più studiata resta da chiarire il ruolo di Gas1p è una delle prime studiate nella formazione del complesso molecolare della parete cellulare (Plotnikova *et al.*, 2006). Studi precedenti confermano la localizzazione di Gas1p nella superficie del reticolo endoplasmatico ed il suo coinvolgimento nell'incorporazione delle mannoproteine legate covalentemente al glucano della parete cellulare attraverso un'ancora GPI. L'assenza della glucano-transferasi Gas1p in lievito porta ad un leggero rallentamento della crescita cellulare (Popolo e Vai, 1999).

A differenza della proteina il gene *GAS1* è quello meglio caratterizzato. Codifica per una glicoproteina localizzata fundamentalmente nella membrana plasmatica ed è stato dimostrato di recente che tale proteina è legata covalentemente alla membrana plasmatica per mezzo di legami covalenti (Popolo e Vai, 1999; Yin *et al.*, 2005).

Gas1p ha un ruolo chiave nell'assemblaggio della parete cellulare, infatti, attraverso

la sua attività β -1,3-glucanosiltransferasica, taglia e riliga i β -1,3-glucani, allungando la catena lineare (Carotti *et al.*, 2004; Mouyna *et al.*, 2000a). L'inattivazione di *GAS1* provoca una diminuzione della quantità di β -1,3-glucano nella parete che viene compensata con modificazioni nella composizione della parete le più sorprendenti delle quali sono l'incremento in chitina e in mannoproteine (Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998). L'isolamento della proteina Gas1p soprattutto nei ceppi autoctoni e nei loro derivati aploidi evidenzia una marcata attività di allungamento e rimodellamento della parete, probabilmente dovuta sia allo sviluppo cellulare che alla risposta agli stress a cui le cellule sono state sottoposte.

L'analisi del trascrittoma ha evidenziato che la coppia di geni *GAS1* e *GAS5* è espressa durante la crescita vegetativa ed è repressa durante la sporificazione e la meiosi, mentre la coppia dei geni *GAS2* e *GAS4* ha un pattern di espressione opposto. *GAS3* è debolmente espresso durante la crescita vegetativa e debolmente indotta durante la sporificazione (Chu *et al.*, 1998; Primig *et al.*, 2000).

I risultati da noi ottenuti con l'analisi proteomica sono in accordo con quelli di Gasch *et al.*, (2000), secondo cui queste proteine hanno mostrato un livello di espressione maggiore in condizioni di crescita stazionaria, di crescita su glucosio e in seguito ad esposizione ad etanolo. Visti i risultati positivi degli esperimenti di qRT-PCR che ha permesso di analizzare il livello del trascritto dell'mRNA del gene *GAS5* nel ceppo 3238-32, il mancato ritrovamento della proteina con la tecnica ESI-Q-TOF è da imputare ad un difetto della tecnica.

Hpf1p e Flo11p predispongono la parete cellulare alla formazione del biofilm?

E particolarmente interessante l'identificazione della proteina Hpf1p (*Haze-protective factor*). La mannoproteina, isolata per la prima volta nel moscato australiano "Muscat Gordo Blanco" (Waters *et al.*, 1993) e in seguito da vino rosso (Waters *et al.*, 1994) è importante da un punto di vista tecnologico in quanto riduce le dimensioni degli aggregati proteici colloidali nei vini bianchi e impedisce i fenomeni di intorbidamento (Dupin *et al.*, 2000; Lomolino *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2007). Hpf1p presenta il 76% di omologia con la proteina Awa1p, proteina fondamentale per il fenotipo "formazione di schiuma" e "idrofobicità della superficie cellulare" nei lieviti del Sake (Shimoi *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2005). Questa omologia, la presenza nel suo promotore dei fattori di trascrizione Msn2p e Msn4p e il fatto che non sia stata isolata nel ceppo vinario commerciale e nel ceppo di laboratorio ci hanno portato ad approfondire l'ipotesi di un possibile coinvolgimento di Hpf1p nella formazione del biofilm. Il risultato dell'approccio genomico, attraverso la qRT-PCR, ha però portato risultati in contrasto con i precedenti. Il gene *HPF1*, infatti, presenta un alto livello di espressione solo nel ceppo 3238-32 Δ FLO11. Avendo costruito i primers per l'esperimento di qRT-PCR sulla sequenza genica di S288c probabilmente la discordanza dei risultati è dovuta a possibili mutazioni nelle sequenze geniche del ceppo analizzato. Inoltre è noto che il ceppo di laboratorio S288c possiede geni che hanno sequenze simili a *HPF1* identificato in ceppi vinari, ma non è noto se gli isolati di S288c possiedono attività di protezione dall'intorbidamento (Brown, 2003).

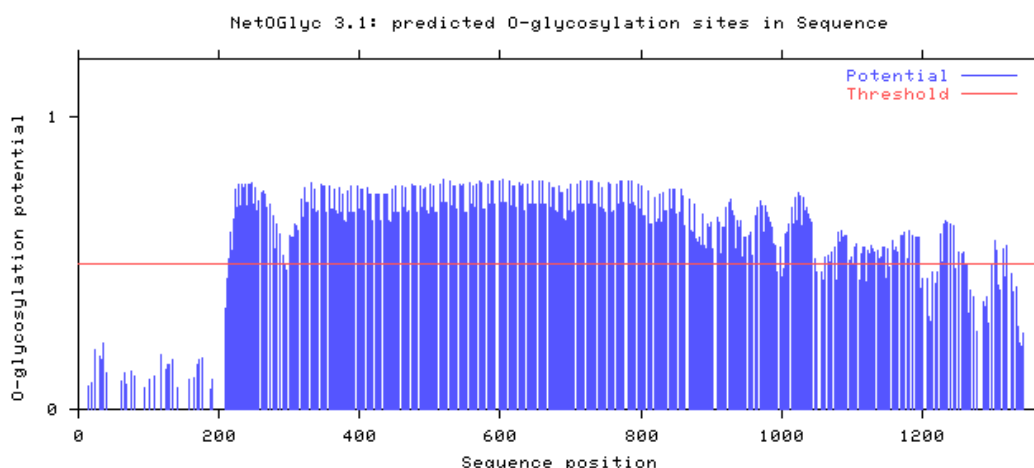


Fig.14: Predizione dei siti di *O*-glicosilazione della proteina Flo11p nel ceppo *Saccharomyces cerevisiae* S288c. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

Un risultato importante è stato l'identificazione di Flo11p/Muc1p in quanto è la prima volta che con l'utilizzo della spettrometria di massa (ESI-Q-TOF) si è riusciti ad isolare questa proteina. Tale proteina è stata identificata in StaYPD nel ceppo *M23*, in LogYPD e FlorYNB in 3238-32. Non è stata identificata in *M25* probabilmente a causa della sua struttura. Dall'analisi del gene *FLO11* in diversi ceppi flor wild-type (Pinna, 2008), *M25* presenta, per *FLO11*, alleli di taglia diversa. Flo11p è una glicoproteina ancorata tramite GPI alla superficie cellulare. E' un'adesina implicata nei diversi tipi di sviluppo (pseudoifale, invasivo, flocculento, biofilm) che *Saccharomyces cerevisiae* attua in risposta a stress nutrizionali. Questa risposta varia a seconda di numerosi fattori genetici e ambientali (Lambrechts, *et al.*, 1996; Zara *et al.*, 2005). La sua espressione è regolata dalle pathway MAPK, PKA e dalla pathway cAMP (Guo *et al.*, 2000; Zara *et al.*, 2005; Douglas, *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2008; Govender *et al.*, 2008).

Flo11p presenta una zona centrale di sequenze ripetute ricche di Serina e Treonina che, essendo siti di glicosilazione, fanno assumere alla proteina pesi molecolari notevoli.

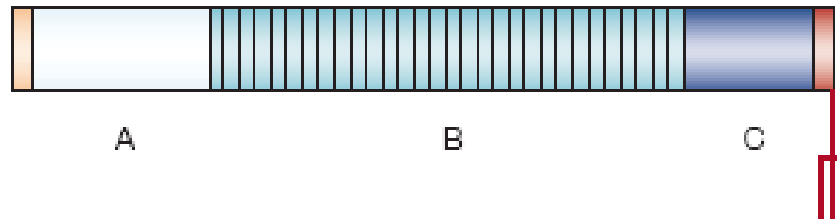


Fig.15: Domini di struttura delle adesine. Le sono costituite di tre domini A, B e C che sono preceduti da una sequenza segnale amino-terminale. Il dominio N-terminale (A) si pensa sia responsabile dell'adesione. Il dominio centrale (B) contiene una regione ricca di residui di Serina e Treonina che è codificata da sequenza nucleotidiche ripetute. Il dominio carbossi-terminale (C) contiene un sito per l'attacco covalente di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (in rosso). (Verstrepen *et al.*, 2004)

È stato osservato che ceppi wild-type vinari di *Saccharomyces cerevisiae* (Pinna, 2008) presentano lunghezze diverse delle zone ripetute e quindi dimensioni totali molto variabili per la stessa proteina. Quando la proteina viene digerita con Tripsina genera un insieme di peptidi le cui dimensioni e la cui sequenza aminoacidica sono difficilmente identificabili. Si può ipotizzare inoltre che essendo Flo11p una proteina superficiale il suo mancato isolamento può essere dovuto ad un danneggiamento e/ frammentazione nella fase di estrazione della parete cellulare che è stata effettuata utilizzando biglie di vetro o ad un legame della proteina alle stesse biglie di vetro (Dranginis *et al.*, 2007).

È stato studiato il livello di trascritto dell'mRNA di 5 geni di parete delle proteine che, identificate con la tecnica ESI-Q-TOF di spettrometria di massa, sono risultate più interessanti per lo scopo di questo lavoro. In particolare, *FLO11*, gene chiave

nella formazione del biofilm, con l'esperimento di qRT-PCR ha confermato essere un gene importante nei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* in grado di formare biofilm infatti i suoi livelli di espressione sono maggiori nei ceppi *M23*, *M25* e *3238-32* (Fig.3). Questi ceppi mostrano inoltre la maggior espressione nella fase di crescita StaYPD, in accordo con Gasch *et al.*, (2000) che riporta come l'espressione di *FLO11* sia maggiore in fase stazionaria, mentre presenta bassi livelli di espressione dopo l'esposizione ad etanolo (7%EtOH per 30min.) (Alexander *et al.*, 2001).

Il gene *GAS1*, presenta valori di espressione nettamente superiori nei ceppi non produttori di biofilm (*3238-32ΔFLO11*, *EC1118*). Precedenti lavori hanno evidenziato che *GAS1* è sovraespresso in seguito ad esposizione ad etanolo (7%EtOH per 30min) e quando viene sottoposto ad un rapido passaggio da fonti di carbonio fermentescibile a fonti di carbonio non fermentescibile (Alexander *et al.*, 2001; Kuhn *et al.*, 2001).

I valori di trascrizione di *GAS3* confermano i risultati della MS, infatti la proteina Gas3p è stata isolata in tutti i ceppi e il livello di espressione di *GAS3* nei campioni vinari e suoi derivati è superiore a 2, in particolare si ha una sovraespressione marcata nei ceppi *M25* e *3238-32ΔFLO11* in condizione StaYPD. Questo risultato è in accordo con Gasch *et al.*, 2000 che ha riportato una sovraespressione di *GAS3* in fase stazionaria. Anche se con valori differenti, lo stesso andamento si è avuto nell'analisi del gene *GAS5* che ha presentato valori di espressione maggiori sempre nella fase StaYPD per i ceppi *M25* e *3238-32ΔFLO11*. Una situazione sicuramente anomala si è registrata con i dati relativi ad *HPF1* (Fig.7) in cui solo il ceppo *3238-32ΔFLO11* ha dato valori positivi di espressione mentre tutti gli altri ceppi hanno

dato un livello di espressione pari a zero. L'anomalia è data dal fatto che le tecniche di MS con gli stessi ceppi e nelle stesse condizioni con hanno permesso di isolare la proteina Hpf1p. Come detto prima, questo può essere dovuto a mutazioni nei ceppi wild-type visto che i primers sono stati costruiti sulla sequenza di S288c. Questo dato necessita quindi di maggiori approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

- Abe F. 2007. Induction of *DAN/TIR* yeast cell wall mannoprotein genes in response to high hydrostatic pressure and low temperature. *FEBS Lett*, 581(25): 4993-8.
- Abramova N, Sertil O, Mehta S, Lowry CV. 2001a. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 183: 2881-2887.
- Abramova NE, Cohen BD, Sertil O, Kapoor R, Kelvin JAD e Lowry CV. 2001b. Regulatory mechanisms controlling expression of the *DAN/TIR* mannoprotein genes during anaerobic remodelling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157: 1169-1177.
- Aguilar-Uscanga B, Francois JM. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol*, 37: 268-274.
- Aguilera F, Peinado RA, Millán C, Ortega JM, Mauricio JC. 2006. Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol*, 110: 34-42.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA. 1994. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol*, 14(6): 4135-4144.
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B. 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 498: 98-103.
- Alexandre H, Blanchet S, Charpentier C. 2000. Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation. *FEMS Microbiol Lett*, 185: 147-150.
- Alimardani P, Regnacq M, Moreau-Vauzelle C, Ferreira T, Rossignol T, Blondin B, Berges T. 2004. *SUT1*-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem J*, 381: 195-202.

- Allet N, Barrillat N, Baussant T, Boiteau C, Botti P, Bougueleret L, Budin N, Canet D, Carraud S, Chiappe D, Christmann N, Colinge J, Cusin I, Dafflon N, Depresle B, Fasso I, Frauchiger P, Gaertner H, Gleizes A, Gonzalez-Couto E, Jeandenans C, Karmime A, Kowall T, Lagache S, Mahé E, Masselot A, Mattou H, Moniatte M, Niknejad A, Paolini M, Perret F, Pinaud N, Ranno F, Raimondi S, Reffas S, Regamey PO, Rey PA, Rodriguez-Tomé P, Rose K, Rossellat G, Saudrais C, Schmidt C, Villain M, Zwahlen C. 2004. In vitro and in silico processes to identify differentially expressed proteins. *Proteomics*, 4(8): 2333-51.
- Andersen JS, Svensson B, Roepstorff P. 1996. Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. *Nat Biotechnol*, 14(4): 449-57.
- Antonelli A, Galletti G, Farris GA, Carnacini A. 1995. Influenza di differenti ceppi di lievito flor su alcuni componenti volatili della Vernaccia di Oristano. *Atti del 2° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti. Volume II, Comunicazione parte II. Giardini NAXOS 24-27 maggio 1995*, 679-684.
- Aranda A, del Olmo M. 2003. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several *ALD* genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 20(8): 747-59.
- Aranda A, Querol A, del Olmo M. 2002. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol*, 177: 304-3012.
- Arneborg N, Hoy CE, Jorgensen OB. 1995. The effect of ethanol and specific growth rate on the lipid content and composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in a chemostat. *Yeast*, 11: 953-959.
- Arroyo J, Sarfati J, Baixench MT, Ragni E, Guillén M, Rodriguez-Peña JM, Popolo L, Latgé JP. 2007. The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. *Yeast*, 24(4): 289-96.
- Bauer FF, Pretorius IS. 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - A review. *S Afr J Enol Vitic*, 21: 27-51.

- Beaven MJ, Charpentier C e Rose AH. 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *NCYC J Gen Microbiol*, 128: 1447-1455.
- Bidlingmaier S, Snyder M. 2002. Large-scale identification of genes important for apical growth in *Saccharomyces cerevisiae* by directed allele replacement technology (DART) screening. *Funct Integr Genomics*, 1(6): 345-56
- Biemann K. 1992. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem*, 61:977-1010.
- Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A, Sunnerhagen P. 2004. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol*, 53: 1743-1756.
- Blanchard DC, Syzdek L. 1970. Mechanism for the water-to-air transfer and concentration of bacteria. *Science*, 170: 626-628.
- Boer VM, de Winde JH, Pronk JT, Piper MD. 2003. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *J Biol Chem*, 278: 3265-3274.
- Boorsma A, De Nobel H, Ter Riet B, Bargmann B, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. 2004. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21: 413-427.
- Brown SL, Stockdale VJ, Pettolino F, Pocock KF, de Barros Lopes M, Williams PJ, Bacic A, Fincher GB, Høj PB, Waters EJ. 2007. Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *YOL155c* and *YDR055w*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(6): 1363-76
- Brown SL. 2003. Investigation into the mechanism of action and biological role of *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins which reduce visible haziness in white wine. The University of Adelaide, PhD Thesis.
- Budroni M, Zara S, Zara G, Pirino G, Mannazzu I. 2005. Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Res*, 5(10): 951-8.

- Cabib E, Roh DH, Schmidt M, Crotti LB, Varma A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem*, 276: 19679-19682.
- Cantarelli C, Martini A. 1969. On the pellicle formation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 350 Supplement: Yeast symposium.
- Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W. 1994. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and α -agglutinin. *EMBO J*, 13: 4737-4744.
- Cappellaro C, Hauser K, Mrša V, Watzele M, Watzele G, Gruber C, Tanner W. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* a-agglutinin and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J*, 10: 4081-4088.
- Cappellaro C, Mrsa V, Tanner W. 1998. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol*, 180: 5030-5037.
- Caro LH, Smits GJ, van Egmond P, Chapman JW, Klis FM. 1998. Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiol Lett*, 161: 345-349.
- Caro LH, Tettelin H, Vossen JH, Ram AF, van den Ende H, Klis FM. 1997. *In silicio* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasmamembrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13: 1477-1489.
- Carotti C, Ragni E, Palomares O, Fontaine T, Tedeschi G, Rodríguez R, Latgé JP, Vai M, Popolo L. 2004. Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. *Eur J Biochem*, 271: 3635-3645.
- Castillo L, Martinez AI, Garcerá A, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. 2003. Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β -1,3-glucan. *Yeast*,

- Castrejon F, Codon AC, Cubero B e Benítez T. 2002. Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Syst Appl Microbiol*, 25: 462-467.
- Causton HC, Ren B, Seok Koh S, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. 2001. Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12: 323-337.
- Chandler M, Stanley GA, Rogers, Chambers P. 2004. A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 54: 427-454.
- Chi Z, Arneborg N. 1999. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*, 86(6): 1047-52.
- Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*, 282: 699-705.
- Claro FB, Rijsbrack K, Soares EV. 2007. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J Appl Microbiol*, 102(3): 693-700.
- Cleves AE, Cooper DNW, Barondes SH, Kelly RB. 1996. A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 133: 1017-1026.
- Cohen BD, Sertil O, Abramova NE, Davies KJA, Lowry CV. 2001. Induction and repression of *DANI* and the family of anaerobic mannoprotein genes in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through a complex array of regulatory sites. *Nucleic Acids Res*, 29: 799-808.
- Cormack BP, Ghori N, Falkow S. 1999. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*, 285:578-582.
- Cullen PJ, Sprague GF Jr. 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 13619-13624.
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, Dekker HL, de Jong L, Hellingwerf KJ, de Koster C, Klis FM. 2004. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell

- walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell*, 3: 955-965.
- de Groot PW, Yin QY, Weig M, Sosinska GJ, Klis FM, de Koster CG. 2007. Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 24(4): 267-78.
- de Groot PWJ, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol*, 42: 657-675.
- de Groot PWJ, Ruiz C, Vázquez de Aldana CR, Dueñas E, Cid VJ, Del Rey F, Rodríguez-Peña JM, Pérez P, Andel A, Caubín J, Arroyo J, García JC, Gil C, Molina M, García LJ, Nombela C, Klis FM. 2001. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genom*, 2: 124-142.
- De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP. 2003. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to *RAP1*- and *SIR*-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev*, 17: 2245-2258.
- De Nobel JG, Barnett JA. 1991. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay [review]. *Yeast*, 7: 313-323.
- De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T, Van den Ende H. 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6: 491-499.
- Delgado ML, O'Connor JE, Azorín I, Renau-Piqueras J, Gil ML, Gozalbo D. 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology*, 147 (Pt 2): 411-7.
- Demontis MA. 2003. Studio dell'espressione genica globale durante la formazione di biofilm in *Saccharomyces cerevisiae*. Tesi di dottorato, Biblioteche nazionali.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680-686.

- Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. 2008. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. PLoS ONE, 3(7): 2623.
- Doi S, Tanabe K, Watanabe M, Yamaguchi M, Yoshimura M. 1989. An alpha-specific gene, *SAG1* is required for sexual agglutination in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Genet, 15: 393-8.
- Donalies UEB, Nguyen HTT, Stahl U, Nevoigt E. 2008. Improvement of *Saccharomyces* Yeast Strains Used in Brewing, Wine Making and Baking. Adv Biochem Engin/Biotechnol, 111: 67-98.
- Donzeau M, Bourdineaud JP, Lauquin GJM. 1996. Regulation by low temperatures and anaerobiosis of a yeast gene specifying a putative GPI-anchored plasma membrane. Molecular Microbiology, 20: 449-459.
- Doyle RJ, Rosenberg M. 1990. Microbial cell surface hydrophobicity. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Dranginis AM, Rauceo JM, Coronado JE, Lipke PN. 2007. A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions. Microbiol Mol Biol Rev, 71(2): 282-94.
- Dupin IV, Stockdale VJ, Williams PJ, Jones GP, Markides AJ, Waters EJ. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: evaluation of extraction methods and immunolocalization. J Agric Food Chem, 48(4): 1086-95.
- Eng JK, McCormack AL, Yates JR. 1994. An approach to correlate MS/MS data to amino acid sequences in protein database. J Am Soc Mass Spectrom, 5: 976-89.
- En-Ong S, Mann M. 2005. Mass Spectrometry-based proteomics turns quantitative. Nat Chem Biol, 5: 252-62.
- Erkina TY, Tschetter PA, Erkine AM. 2008. Different Requirements of the *SWI/SNF* Complex for Robust Nucleosome Displacement at Promoters of Heat Shock Factor and Msn2- and Msn4-Regulated Heat Shock Genes. Mol Cell Biol, 28: 41207-1217.

- Esteve-Zarzoso B, Fernandez-Espinar MT e Querol A. 2004. Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 151-158.
- Esteve-Zarzoso B, Peris-Torà MJ, García-Maiquel E, Uruburu F. 2001. Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines. *Appl Environ Microbiol*, 67: 2056-2061.
- Estruch F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*, 24(4): 469-86.
- Farris GA, Fatichenti F, Deiana P, Ceccarelli S. 1978. L'influenza della temperatura sull'accumulo di acetaldeide da parte di *Saccharomyces prostoserdovii* in fase flor. *Riv Vitic Enol*, 31: 129-142.
- Farris GA, Fatichenti F, Deiana P. 1976. *Ann Microbiol*, 26: 55-61.
- Farris GA, Sinigaglia M, Budroni M, Guerzoni ME. 1993. Cellular fatty acid composition in film-forming strains of two physiological races of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol*, 17: 215-219.
- Fatichenti F, Deiana P, Farris GA. 1976. *Ann. Fac. Agr. Univ. Sassari*, 24: 198-207.
- Fatichenti F, Farris GA. 1984. *Atti dell'Accademia Italiana della Vita e del Vino*, anno XXXV: 253-260.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246: 64-71.
- Fernández E, Moreno F, Rodicio R. 1992. The *ICL1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 204(3): 983-90.
- Fernandez-Espinar MT, Esteve-Zarzoso B, Querol A e Barrio E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97.
- Fidalgo M, Barrales RR, Ibeas JI, Jimenez J. 2006. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 11228-11233.
- Filler SG. 2006. *Candida*-host cell receptor-ligand interactions. *Curr Opin Microbiol*, 9: 333-339.

- Fleet GH. 1991. Cell walls. In *The Yeasts*, 2nd edn, vol 4, Rose AH, Harrison JS (eds). Academic Press: New York, 199-277.
- Fonzi WA. 1999. *PHR1* and *PHR2* of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β -1,3- and β -1,6-glucans. *J Bacteriol*, 181: 7070-7079.
- Frew NM. 1997. The role of organic films in air-sea gas exchange. In P. S. Liss and R. A. Duce (ed.), *The sea surface and global change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 121-172.
- Frieman MB, Cormack BP. 2003. The omega-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol Microbiol*, 50: 883-896.
- Fu Y, Ibrahim AS, Sheppard DC, Chen YC, French SW, Cutler JE, Filler SG, Edwards JE Jr. 2002. *Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. *Mol Microbiol*, 44: 61-72.
- García R, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem*, 279: 15183–15195.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 11: 4241-4257.
- Gasch AP. 2007. Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast*, 24: 961-976.
- Gaur NK, Klotz SA. 1997. Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALAI*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun*, 65: 5289-5294.
- Gimeno CJ, Fink GR. 1992. The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science*, 257: 626.

- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S.cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68: 1077-1090.
- Govender P, Domingo JL, Bester MC, Pretorius IS, Bauer FF. 2008. Controlled expression of the dominant flocculation genes *FLO1*, *FLO5*, and *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 74(19): 6041-52.
- Gujio S, Mauricio JC, Salmon JM, Ortega JM. 1997. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and flor film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast*, 13: 110-117.
- Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12158-12163.
- Hagen I, Ecker M, Lagorce A, Francois JM, Sestak S, Rachel R, Grossmann G, Hauser NC, Hoheisel JD, Tanner W, Strahl S. 2004. Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPIanchored mannoproteins. *Mol Microbiol*, 52: 1413-1425.
- Hager JW. 2002. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Comm Mass Spectrom*, 16: 512-26.
- Hakanpaa J, Szilvay GR, Kaljunen H, Maksimainen M, Linder M, Rouvinen J. 2006. Two crystal structures of *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI—the structure of a protein amphiphile with and without detergent interaction. *Protein Sci*, 15: 2129-2140.
- Hallsworth JE. 1998. Ethanol-induced water stress in yeast. *J Ferm Bioengineering*, 85: 125-137.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. *Ainsworth and Bigsby Dictionary of the Fungi*, 8th edn. CAB. International: Oxford, UK.
- He XJ, Fassler JS. 2005. Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 58(5): 1454-67.
- Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E. 2007. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*, 1780(11): 1217-35.

- Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. 2007. Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol*, 428: 29-45.
- Hohmann, S. 1997. Shaping up: The response of yeast to osmotic stress. In *Yeast Stress Responses* (S. Hohmann and W. H. Mager, Eds.), R. G. Landes, Austin, TX, 101–145.
- Homma T, Iwahashi H, Komatsu Y. 2003. Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology*, 46: 230-237.
- Hoyer LL, Hecht JE. 2001. The *ALS5* gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast*, 18: 49-60.
- Iimura Y, Hara S, Otsuka K. 1980a. Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in a film strain of *Saccharomyces*. *Agric Biol Chem*, 44: 1215-1222.
- Iimura Y, Hara S, Otsuka K. 1980b. Fatty acids as hydrophobic substances on the cell surface of a film strain of *Saccharomyces*. *Agric Biol Chem*, 44: 1223-1229.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM e Young ET. 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, 165: 1745-1759
- Ishigami M, Nakagawa Y, Hayakawa M, Iimura Y. 2004. *FLO11* is essential for flor formation caused by the C-terminal deletion of *NRG1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 237(2): 425-30.
- Ishigami M, Nakagawa Y, Hayakawa M, Iimura Y. 2006. *FLO11* is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70(3): 660-6.
- Ivorra C, Perez-Ortin JE, Del Olmo M. 1999. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering*, 64: 698-708.
- Izawa S, Kita T, Ikeda K, Inoue Y. Heat shock and ethanol stress provoke distinctly different responses in 3'-processing and nuclear export of *HSP* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, 414: 111-9.
- Jackson R S. 1994. *Wine science. Principles and applications*, Academic Press Inc., San Diego, Calif, 338-379.

- Jimenez J, Benitez T. 1988. Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentration depends on the mitochondrial genome. *Curr Genet*, 13: 461-469.
- Johnston JR, Baccari C e Mortimer RK. 2000. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res Microbiol*, 151: 583-590.
- Johnston JR, Baccari C, Mortimer RK. 2000. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Res Microbiol*, 151: 583-590.
- Jones RP. 1989. Biological principles for the effects of ethanol. *Enz Microb Tech*, 11: 130-153.
- Jones RP. 1990. Roles for replicative deactivation in yeast-ethanol fermentations. *Crit Rev Biotechnol*, 10: 205-22.
- Kaino T, Takagi H. 2008. Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79(2): 273-83.
- Kang MS, Elango N, Mattia E, Au-Young J, Robbins PW, Cabib E. 1984. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J Biol Chem*, 259(23): 14966-72.
- Kapteyn JC, Montijn RC, Dijkgraaf GJ, van den Ende H, Klis FM. 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 JC, Montijn RC, Vink E, de la Cruz J, Llobell A, Douwes JE, Shimoï H, Lipke PN, Klis FM. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology*, 6: 337-345.
- Kapteyn JC, Ram AF, Groos EM, Kollar R, Montijn RC, Van Den Ende H, Llobell A, Cabib E, Klis FM. 1997. Altered extent of cross-linking of β 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3-glucan content. *J Bacteriol*, 179: 6279-6284.

- Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H, Klis FM. 2001. Low external pH induces *HOG1*-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*, 39: 469-479.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. 1999a. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta*, 1426(2): 373-83.
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM. 1999b. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol*, 31: 1835-1844.
- Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 60: 2299-301.
- Karremans RJ, Dagueb E, Gaboriaudb F, Quilèsb F, Duvalc JFL, Lindsey GG. 2007. The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774: 131-137
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol*, 8: 378-384.
- Khan W, Augustyn OHP, van der Westhuizen TJ, Lambrechts MG, Pretorius IS. 2000. Geographic distribution and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape in South Africa. *S Afr J Enol Vitic*, 21: 17-31.
- Kinoshita T, Inoue N. 2000. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 4:632-638.
- Kitagaki H, Shimoi H, Itoh K. 1997. Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 249: 343-349.
- Klebl F, Tanner W. 1989. Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 171: 6259-6264.

- Klis FM, Boorsma A, de Groot PWJ. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23: 185-202.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, 26: 239-256.
- Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Sone H. 1998. Region of *FLO1* proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol*, 180: 6503-6510.
- Kobayashi O, Yoshimoto H, Sone H. 1999. Analysis of the genes activated by the *FL08* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, 36: 256-261.
- Koch AL. 2003. Development of the Sacculus marked emergence of the bacteria. *ASM News*, 69: 229-233.
- Kollar R, Petrakova E, Ashwell G, Robbins PW, Cabib E. 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1-3)$ -glucan. *J Biol Chem*, 270: 1170-1178.
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. $\beta(1-6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1-3)$ -glucan, and chitin. *J Biol Chem*, 272: 17762-17775.
- Kondo K e Inouye M. 1991. *TIP1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 266: 17537-17544.
- Kowalski LR, Kondo K, Inouye M. 1995. Cold-shock induction of a family of *TIP1*-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 15: 341-53.
- Kramer KJ e Koga D. 1986. Insect chitin: Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem*, 16: 851-877.
- Kratzer S, Schüller HJ. 1995. Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene *ACSI* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 161(1): 75-9.
- Krutchinsky AN, Kalkun M, Chait BT. 2001. Automatic identification of proteins with a MALDI-quadrupole ion trap mass spectrometer. *Anal Chem*, 73: 5066-77.

- Krysan DJ, Ting EL, Abeijon C, Kroos L, Fuller RS. 2005. Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 4(8): 1364-74.
- Kuchin S, Vyas VK, Carlson M. 2002. Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol*, 22: 3994-4000.
- Kumamoto CA, Vines MD. 2005. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*, 59: 113-133.
- Kwast KE, Burke PV, Poyton RO. 1998. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exp Biol*, 201: 1177-95.
- Kwast KE, Lai LC, Menda N, James DT 3rd, Aref S, Burke PV. 2002. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J Bacteriol*, 184: 250-65.
- Kwast KE, Lai LC, Menda N, James DT, Aref S, Burke PV. 2002. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J Bacteriol*, 184: 250-265.
- Lafon-Lafourcade S, Larue F, Ribereau-Gayon P. 1979. Evidence for the Existence of "Survival Factors" as an Explanation for Some Peculiarities of Yeast Growth, Especially in Grape Must of High Sugar Concentration. *Appl Environ Microbiol*, 38(6): 1069–1073.
- Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P. 1984. Developments in the microbiology of wine production. *Progress in Industrial Microbiology*.
- Lagorce A, Hauser NC, Labourdette D, Rodriguez C, Martin-Yken H, Arroyo J, Hoheisel JD, François J. 2003. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 278: 20345-20357.
- Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS .1996. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8419-8424.

- Lesage G, Bussey H. 2006. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70: 317-343.
- Levin DE. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69(2): 262-91.
- Lipke P N, Kurjan J. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev*, 56: 180-194.
- Lipke PN, Ovalle R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol*, 180: 3735-3740.
- Liu H, Styles CA, Fink GR. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 144: 967-978.
- Lloyd D, Morrell S, Carlsen HN, Degn H, James PE, Rowlands CC. 1993. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9(8): 825-33.
- Lo WS, Dranginis AM. 1996. *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol*, 178: 7144-7151.
- Lo WS, Dranginis AM. 1998. The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 9: 161-171
- Lomolino G, Curioni A. 2007. Protein haze formation in white wines: effect of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components prepared with different procedures. *J Agric Food Chem*, 55(21): 8737-44.
- Lopes DH, Meyer-Fernandes JR, Sola-Penna M. 1999. Effects of trehalose and ethanol on yeast cytosolic pyrophosphatase. *Z Naturforsch [C]*, 54: 186-90.
- Mann M, Wilm M. 1994. Error tolerant identification of peptides in sequence database by peptide sequence tags. *Anal Chem*, 66: 4390-9.
- Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC. 1973. The structure of a β -(1-3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J*, 135: 19-30.
- Marguet D, Lauquin GJ. 1986. The yeast *SRP* gene: positive modulation by glucose of its transcriptional expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 138: 297-303.

- Marks VD, Ho Sui SJ, Erasmus D, van der Merwe GK, Brumm J, Wasserman WW, Bryan J, van Vuuren HJ. 2008. Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res*, 8(1): 35-52.
- Martinez P, Valcarcel MJ, Perez L, Benitez T. 1998. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino Sherry: by-products and aroma compounds. *Am J Enol Vitic*, 49: 240-250.
- Martinez PA, Codon AC, Perez L, Benitez T. 1995. Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast*, 11: 1399-1411.
- Martinez PA, Perez L, Benitez T. 1997. Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine. *Am J Enol Vitic*, 48: 55-62.
- Masuoka J, Hazen KC. 1997. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Microbiology*, 143: 3015-3021.
- Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. 2000. The characteristic of peptide collision induced dissociation using a high performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal Chem*, 72: 552-8.
- Molina M, Gil C, Pla J, Arroyo J, Nombela C. 2000. Protein localization approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Tech*, 51: 601-612.
- Morris GJ, Winters L, Coulson GE, Clarke KJ. 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, 132: 2023-2034.
- Mørtz E, O'Connor PB, Roepstorff P, Kelleher NL, Wood TD, McLafferty FW, Mann M. 1996. Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass spectral data against sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8264-8267.
- Moukadiri I, Armero J, Abad A, Sentandreu R, Zueco J. 1997. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 179(7): 2154-62.

- Moukadiri I, Jaafar L, Zueco J. 1999. Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* mnn1 mnn9 double mutant by reducing agents. *J Bacteriol*, 181(16): 4741-5.
- Mouyna I, Fontaine T, Vai M, Monod M, Fonzi WA, Diaquin M, Popolo L, Hartland RP, Latgé JP. 2000a. Glycosylphosphatidylinositolanchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem*, 275: 14882-14889.
- Mouyna I, Hartland RP, Fontaine T, Diaquin M, Simenel C, Delepierre M, Henrissat B, Latgé JP. 1998. A 1,3- β -glucanoyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast Bgl2p. *Microbiology*, 144 11: 3171-3180.
- Mouyna I, Monod M, Fontaine T, Henrissat B, L  chenne B, Latgé JP. 2000b. Identification of the catalytic residues of the first family of β (1-3)glucanoyltransferases identified in fungi. *Biochem J*, 347 3: 741-747.
- Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle L, Tanner W. 1999a. Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 181 10: 3076-3086.
- Mrsa V, Seidl T, Gentzsch M, 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.
- Mrsa V, Tanner W. 1999b. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, 15: 813-820.
- Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P. 2006. *Candida albicans* *HWP1* gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol*, 55: 1323-1327.
- Naumov GI, Naumova ES e Michels CA. 1994. Genetic variation of the repeated mal loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, 136: 803-812.
- Nobile CJ, Mitchell AP. 2006. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*, 8: 1382-1391.

- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins J Biol Chem. 250 10: 4007-21.
- O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol, 54: 49.
- Orlean P. 1997. Biogenesis of yeast wall and surface components. In Cell Cycle and Cell Biology, vol 3, Pringle JR, Broach JR, Jones EW (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 229-362.
- Osumi M. 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. Micron, 29: 207-233.
- Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ. 2000. Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 156: 1005-1023.
- Pandey A, Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. Nature, 405: 837-46.
- Papaleo E, Fantucci P, Vai M, De Gioia L. 2006. Threedimensional structure of the catalytic domain of the yeast β -(1,3)-glucan transferase Gas1: a molecular modelling investigation. J Mol Model (Online), 12: 237-248.
- Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sánchez M, Gil C, 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.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. 1999. Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. Electrophoresis, 20: 3551-67.
- Pinna C. 2008. Studio dell'aggregazione cellulare in ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae*. Tesi di Dottorato.
- Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Perreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Recnacq M, Boucherie H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. Microbiology, 140: 3031-3038.

- Piper PW. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiology Letters*, 134: 121-127.
- Piper PW. 1997. The yeast heat shock response. In Hohmann S & Mager WH (eds). *Yeast stress responses*. R.G. Landes Company, Austin, 75-99.
- Pizarro FJ, Jewett MC, Nielsen J, Agosin E. 2008. Growth temperature exerts differential physiological and transcriptional responses in laboratory and wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 74(20): 6358-68.
- Plotnikova TA, Selyakh IO, Kalebina TS, Kulaev IS. 2006. Bgl2p and Gas1p are the major glucan transferases forming the molecular ensemble of yeast cell wall. *Dokl Biochem Biophys*, 409: 244-7.
- Popolo L, Vai M. 1999. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta*, 1426(2): 385-400.
- Pretorius IS, van der Westhuizen TJ, Augustyn OHP. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afr J Enol Vitic*, 20: 61-74.
- Primig M, Williams RM, Winzeler EA, Tevzadze GG, Conway AR, Hwang SY, Davis RW, Esposito RE. 2000. The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet*, 26: 415-423.
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. 2001. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276: 49244-49250.
- Puig S, Perez-Ortin JE. 2000. Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. *Yeast*, 16: 139-148.
- Rabilloud T. 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climb up the mountain. *Proteomics*, 2: 3-10.
- Rachidi N, Barre P, Blondin B. 2000. Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome-III right arm. *Curr Genet*, 37: 1-11.
- Rachidi N, Martinez MJ, Barre P, Blondin B. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* PAU genes are induced by anaerobiosis. *Mol Microbiol*, 35: 1421-1430.

- Ragni E, Coluccio A, Rolli E, Rodriguez-Peña JM, Colasante G, Arroyo J, Neiman AM, Popolo L. 2007b. *GAS2* and *GAS4*, a pair of developmentally regulated genes required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 6(2): 302-16.
- Ragni E, Fontaine T, Gissi C, Latgè JP, Popolo L. 2007. The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast*, 24(4): 297-308.
- Ram AF, Kapteyn JC, Montijn RC, Caro LH, Douwes JE, Baginsky W, Mazur P, van den Ende H, Klis FM. 1998. Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol*, 180: 1418-1424.
- Ram AFJ, Wolters A, Ten Hopen R, Klis FM. 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to Calcofluor white. *Yeast*, 10: 1019-1030.
- Ramon R Barrales, Juan Jimenez, Jose I Ibeas. 2007. Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 178(1): 145-56.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J Biol Chem*, 275: 8290-8300.
- Reynolds TB, Fink GR. 2001. Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291: 878-881.
- Reynolds TB, Jansen An, Xin Peng, Fink GR. 2008. Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryot Cell*, 7(1): 122-130.
- Ribereau-Gyon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdiou D. 2000. *Handbook of Enology: Vol 2: The Chemistry of Winemaking*, Wiley.
- Ristow H, Seyfarth A e Lochmann ER. 1995. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat Res*, 326: 165-170

- Rodriguez-Peña JM, Rodriguez C, Alvarez A, Nombela C, Arroyo J. 2002. Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J Cell Sci*, 115(Pt 12): 2549-58.
- Roepstorff P, Fohmann J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*, 11: 601.
- Romano P, Suzzi G, Turbanty L, Polsinelli H. 1994. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Letters*, 118: 213-218.
- Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H., Fink GR. 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J*, 18: 1257-1269.
- Salmon J, Barre P. 1998. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 64: 3831-3837.
- Salzano AM, Crescenzi M. 2005. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Ann Ist Super Sanità*, 41(4): 443-450.
- Sancho E, Hernandez E, Rodriguez-Navarro A. 1986. Presumed sexual isolation in yeast populations during production of sherry-like wine. *Appl Environ Microbiol*, 51: 395-397.
- Santa Maria J, Vidal D. 1973. Genetic control of "flor" formation by *Saccharomyces*. *J Bacteriol*, 113: 1078-1080.
- Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (*STRE*) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO J*, 13: 4382-4389.
- Schutz M., Gafner J. 1993. Sluggish alcoholic fermentation in relation to alterations of the glucose-fructose ratio. *Chem Mikrobiol Technol der Lebensm*, 15: 73-78.
- Schutz M., Gafner J. 1995. Lower fructose uptake capacity of genetically characterized strains of *Saccharomyces bayanus* compared to strains of

- Saccharomyces cerevisiae*: a likely cause of reduced alcoholic fermentation activity. *Am J Enol Vitic*, 46: 175-180.
- Sertil O, Cohen BD, Davies KJ, Lowry CV. 1997. The *DANI* gene of *S. cerevisiae* is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism. *Gene*, 192: 199-205.
- Sestak S, Hagen I, Tanner W, Strahl S. 2004. Scw10p, a cell-wall glucanase/transglucosidase important for cell-wall stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 150: 3197-208.
- Ong SE, Mann M. 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology*, 1: 252-262.
- Shaw JA, Mol PC, Bowers B, Silverman SJ, Valdivieso MH, Durán A, Cabib E. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol*, 114: 111-123.
- Shimoi H, Iimura Y, Obata T. 1995. Molecular cloning of *CWPI*: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein solubilized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J Biochem*, 118: 302-311.
- Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, Iimura Y, Ito K. 1998. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol*, 180: 3381-3387.
- Shimoi H, Sakamoto K, Okuda M, Atthi R, Iwashita K, Ito K. 2002. The *AWA1* gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. *Appl Environ Microbiol*, 68: 2018-2025.
- Shimizu M, Miyashita K, Kitagaki H, Ito K, Shimoi H. 2005. Amplified fragment length polymorphism of the *AWA1* gene of sake yeasts for identification of sake yeast strains. *J Biosci Bioeng*, 100(6): 678-80.
- Shwartz JC, Senko MW, Syka JE. 2002. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*, 13: 656-69.
- Slaninová I, Šesták S, Svoboda A, Farkaš V. 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, 173: 245-252.
- Smit GM, Straver H, Lugtenberg BJJ, Kijne JW. 1992. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell

- surface hydrophobicity as a major determinant. *Appl Environ Microbiol*, 58: 3709-3714.
- Smits GJ, Kapteyn JC, van den Ende H, Klis FM. 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol*, 2: 348-352.
- Sobering AK, Jung US, Lee KS, Levin DE. 2002. Yeast Rpi1 is a putative transcriptional regulator that contributes to preparation for stationary phase. *Eukaryot Cell*, 1: 56-65.
- Sotelo J, Rodriguez-Gabriel MA. 2006. Mitogen-activated protein kinase Hog1 is essential for the response to arsenite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 5: 1826-1830.
- Staab JF, Bahn YS, Tai CH, Cook PF, Sundstrom P. 2004. Expression of transglutaminase substrate activity on *Candida albicans* germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification. *J Biol Chem*, 279: 40737-40747.
- Suutari M, Liukkonen K, Laakso S. 1990. Temperature adaptation in yeast: the role of fatty acid. *J Gen Microbiol*, 136: 1469-74.
- Tai SL, Boer VM, Daran-Lapujade P, Walsh MC, de Winde JH, Daran JM, Pronk JT. 2005. Twodimensional transcriptome analysis in chemostat cultures. Combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 280: 437-447.
- Taylor GK, Kim YB, Forbes AJ, Meng F, McCarthy R, Kelleher NL. 2003. Web and database software for identification of intact proteins using top-down mass spectrometry. *Anal Chem*, 75: 4081-6.
- Ter Linde JJ, Liang H, Davis RW, Steensma HY, van Dijken JP, Pronk JT. 1999. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 181: 7409-7413.
- Teunissen AWRH, Steensma HY. 1995. The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*, 11: 1001-1013.
- Thomas DS, Hossack JA, Rose AH. 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, 117: 239-245.

- Thomas DS, Rose AH. 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. Arch Microbiol, 122: 49-55.
- Toh-E A, Yasunaga S, Nisogi H, Tanaka K, Oguchi T, 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.
- Tokunaga M, Kusamichi M, Koike H. 1986. Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. J Electron Microsc (Tokyo), 35: 237-246.
- Valero E, Cambon B, Schuller D, Casal M, Dequin S. 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Res, 7: 317-29.
- van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol, 177(11): 3104-10.
- Varela C, Cárdenas J, Melo F, Agosin E. 2005. Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. Yeast, 22(5): 369-83.
- Varela JCS, Praekelt UM, Meacock PA, Planta RJ, Mager WH. 1995 The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. Mol Cell Biol, 15: 6232-6245.
- Verstrepen KJ e Klis FM. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Mol Microbiol, 60: 5-15.
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H, Delvaux FR. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. Appl Microbiol Biotechnol, 61: 197-205.
- Verstrepen KJ, Jansen A, Lewitter F, Fink GR. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. Nat Genet, 37: 986-990.
- Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. Nat Rev Microbiol, 2: 533-540.

- Vigh L, Horváth I, Maresca B, Harwood JL. 2007. Can the stress protein response be controlled by 'membrane-lipid therapy'? *Trends Biochem Sci*, 32: 357-63.
- Vigh L, Maresca B, Harwood JL. 1998. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci*, 23: 369-74.
- Vinod PK, Sengupta N, Bhat PJ, Venkatesh KV. 2008. Integration of global signaling pathways, cAMP-PKA, MAPK and TOR in the regulation of *FLO11*. *PLoS ONE*, 3(2): 1663.
- Visser W, Scheffers WA, Batenburg-van der Vegte WH, van Dijken JP. 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 56: 3785-3792.
- Walser PJ, Kues U, Aebi M, Kunzler M. 2005. Ligand interactions of the *Coprinopsis cinerea* galectins. *Fungal Genet Biol*, 42: 293-305.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol*, 19(3): 242-7.
- Waters EJ, Pellerin P, Brillouet JMA. 1994. *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydr Polym*, 23: 185-191.
- Waters EJ, Wallace W, Tate ME, Williams PJ. 1993. Isolation and partial characterization of a natural haze protective factor from wine. *J Agric Food Chem*, 41: 724-730.
- Watson K. 1987. Temperature relations. In: *The Yeast*. Vol. 2: Yeast and the environment. AH. Rose (Ed.): 41-71. Academic Press. New York.
- Weig M, Jänsch L, Gross U, De Koster CG, Klis FM, De Groot PW. 2004. Systematic identification *in silico* of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology*, 150: 3129-3144.
- Wilcox LJ, Balderes DA, Wharton B, Tinkelenberg AH, Rao G, Sturley SL. 2002. Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J Biol Chem*, 277: 32466-32472.
- Winkler A, Arkind C, Mattison CP, Burkholder A, Knoche K, Ota I. 2002. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein

- kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell*, 1(2): 163-73.
- Yale J, Bohnert HJ. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem*, 276: 15996-16007.
- Yin QY, de Groot PW, Dekker HL, de Jong L, Klis FM, de Koster CG. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem*, 280: 20894-20901.
- You KM, Rosenfield CL, Knipple DC. 2003 Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol*, 69: 1499-1503.
- Zara S, Farris GA, Budroni M, Bakalinsky AT. 2002. *HSP12* is essential for biofilm formation by a Sardinian sherry strain of *S. cerevisiae*. *Yeast*, 19: 269-276.
- Zhao X, Daniels KJ, Oh SH, Green CB, Yeater KM, Soll DR, Hoyer LL. 2006. *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology*, 152: 2287-2299.
- Zimkus A, Chaustova L. 2003. The permeability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains with different cell wall architecture to lipophilic cation tetraphenylphosphonium and their transformation capability. *Biologija*, 3: 42-44.
- Zitomer RS e Lowry CV. 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 56: 1-11.
- Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol*, 159: 1018-1026.

