

*Saccharomyces cerevisiae*의 *KGD1* 유전자 결손이 세포벽 생합성에 미치는 영향

김성우 · 안기웅 · 박윤희 · 박희문*

충남대학교 생명시스템과학대학 미생물 · 분자생명과학과

Effect of *KGD1* Deletion on Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*

Sung Woo Kim, Ki-Woong Ahn, Yun-Hee Park and Hee-Moon Park*

Department of Microbiology & Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received June 2, 2010. Accepted June 17, 2010)

ABSTRACT: *KGD1* gene was cloned by functional complementation of defects in β -1,3-glucan synthase activity of the previously isolated *Saccharomyces cerevisiae* mutant LP0353, which displays a number of cell wall defects at restrictive temperature. We performed the gene disruption experiment to characterize the function of *KGD1* gene, which encodes β -ketoglutarate dehydrogenase, in cell wall biosynthesis. The disruption of *KGD1* showed the decreased growth rate, the increase of chitin synthase activity, alterations in cell wall composition, and increase of susceptibility to cell wall inhibitors such as Calcofluor white and Nikkomycin Z. These results suggested that *KGD1* might be involved in cell wall biogenesis, especially the biosynthesis of β -1,6-glucan and chitin in *S. cerevisiae*.

KEYWORDS: β -1,3-glucan synthase, Cell wall composition, Chitin synthase, *KGD1*, *Saccharomyces cerevisiae*

균류의 세포벽은 세포의 형태를 결정할 뿐 아니라, 외부 환경에 대한 물리적인 보호와 삼투압적 지지를 가능하게 해 주는 구조이다(Vink *et al.*, 2002). *Saccharomyces cerevisiae* 세포벽은 키틴, 베타-1,6-글루칸, 베타-1,3-글루칸, 그리고 mannoprotein으로 구성되어 있다(Latge, 2007). 이러한 세포벽은 매우 동적인 구조체로 시간적 및 공간적으로 엄격한 조절을 받는다. 효모의 영양 생장기에는 세포벽이 합성되어 확장되거나 분해되며 세포와 세포를 구별하는 격벽은 세포분열 주기 동안 특정시기 및 위치에서 만들어 진다(Hohmann *et al.*, 2003; Spreghini *et al.*, 2003).

효모의 세포벽에 관한 연구는 세포벽 합성 및 분해 효소와 세포벽의 조립과 관련된 유전자와 그들을 조절하는 다양한 유전자들에 대한 연구로 진행되고 있으며, 약 1200개의 유전자들이 효모의 세포벽 합성에 직간접적으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Lussier *et al.*, 1997). 효모의 세포벽 합성과 분해 및 조립의 조절 기작은 일부만 알려져 있는데, Rapamycin에 대한 약제 감수성과 연관된 TOR(Target Of Rapamycin) 신호전달 기작과 다양한 외부 환경에 반응하여 세포벽 강도를 조절하는 MAPK 경로 등이 있다(Hohmann *et al.*, 2003). 한편, 일반적으로 세포벽에 결함을 가지고 있는 돌연변이의 탐색은 베타-1,3-글루카네이즈와 정상 세포벽 구조를 직간접적으로 방해하는 것으로 알려진 화학물질인 Calcofluor

white, Congo red, SDS 등에 대한 민감도 증가에 기반을 두고 있다(de Groot *et al.*, 2001; Lussier *et al.*, 1997). 이러한 과정으로 확인된 돌연변이는 삼투안정제의 존재에 의해 회복되는 양상을 보이는 특성이 있다. *S. cerevisiae*의 세포벽 연구는 균류의 형태변화에 관한 연구뿐 아니라 세포벽 성분의 변화를 동반하는 병원성 균류 연구를 위한 모델 시스템으로 새로운 항진균제 개발에 도움을 줄 수 있다는 점에서 관심의 대상이 되고 있다(Cabib *et al.*, 1988).

본 연구진은 선행연구를 통하여 비허용 온도에서 베타-1,3-글루칸 합성효소의 활성이 저해되고 베타-1,3-글루칸 함량이 감소한 삼투감수성 돌연변이주 LP0353을 제조하고 분석함으로써 베타-1,3-글루칸 합성과 관련하여 최소한 두 개의 유전자가 관여함을 확인하였다(Song *et al.*, 1992; 이 등, 1994; 진 등, 1995). 또한 기능적 상보성에 의거하여 LP0353 균주의 온도의존성 삼투감수성과 베타-1,3-글루칸 합성효소의 결함을 회복하는 *SOO1/RET1*을 클로닝하였다(Lee *et al.*, 1999). 또한 비허용 온도에서 돌연변이의 온도의존성 삼투감수성은 회복시키지 않으나 베타-1,3-글루칸 합성효소의 활성을 부분적으로 회복시키는 두 개의 유전자, *GBG1/AYR1*과 *KGD1*을 동정하였다(Ahn *et al.*, 2010; 진 등, 1995). *GBG1/AYR1*은 NADPH 의존적 1-acyl dihydroxyacetone phosphate reductase로 phosphatidic acid와 인지질 생합성과 관련되어 있을 뿐 아니라 (Athenstaedt and Daum, 2000; Zahedi *et al.*, 2006), 효모의 세포벽 합성과 연관되어 있는 것으로 밝혀졌다(Ahn

*Corresponding author <E-mail : hmpark@cnu.ac.kr>

et al., 2010). 본 연구에서는 *KGD1*이 세포벽 합성에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험을 수행하였는데, *KGD1* 유전자의 파괴가 세포벽 합성 효소의 활성 및 다양한 약제에 대한 감수성의 변화를 초래하는 것으로 조사되어, *KGD1*이 효모의 세포벽 합성에 연관되어 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

S. cerevisiae LP0353(*MATa ura3-52 lys2-801 soo1-1 Bgs*)은 유전자의 클로닝에, F808(*MATa ura3-52 leu2-3,112 his4-519 ade1-100*)균주는 유전자 파괴 실험에 사용하였다. 효모의 배양을 위한 완전배지로는 YPD(yeast-extract peptone, dextrose) 배지를 최소배지로는 SD(synthetic dextrose) 배지를 사용하였으며(Burke *et al.*, 2000), 플라스미드의 증식을 위한 대장균 DH5 α 의 배양은 Ampicillin이 첨가된 LB(Luria broth) 배지를 이용하였다.

DNA 조작 및 미생물 형질전환

대장균의 형질전환, 플라스미드 DNA의 추출, 제한효소 절단 및 ligation은 Sambrook 등의 방법에 따라 수행하였다(Sambrook *et al.*, 1989). 효모의 형질전환은 lithium acetate 방법에 따라 수행하였으며(Ito *et al.*, 1983), 효모의 플라스미드 YEplac195, YCplac33과 YIplac211은 *KGD1* 유전자 클로닝과 파괴에 사용하였다.

KGD1 돌연변이주의 제작

유전자 파괴를 위하여 YEplac195 multi-cloning site내에 삽입되어 있는 *KGD1* 유전자를 대상으로 PCR을 수행하여 얻은 약 720 bp와 750 bp의 절편을 pT7Blue-T 벡터에 *HindIII*와 *AatII*, *BamHI*과 *EcoRI* 제한효소를 이용하여 삽입한 후, 다시 여기에 YIplac211 벡터의 *URA3* 유전자를 *BamHI*과 *AatII*제한효소를 이용하여 삽입하였다. 이렇게 재조합된 플라스미드를 PCR로 증폭하여 *KGD1* 유전자 내의 970 pb 정도의 염기가 제거되고 1.6 kb정도의 *URA3* 유전자가 삽입되어 있는 linearized construct를 제조한 후 F808 균주로 형질전환 하였다.

효모의 세포막 현탁액 추출 및 세포벽 합성 효소의 활성 측정

효모의 세포막 분획은 유리 비드를 사용하여 준비하였다(Choi and Cabib, 1994; Lee *et al.*, 1999). 글루칸 합성 효소 활성은 앞서 보고된 방법에 따라 측정하였으며(Kang and Cabib, 1986; Lee *et al.*, 1999), 키틴 합성 효소의 활성은 Choi와 Cabib의 방법을 이용하였다(Choi and Cabib, 1994). 모든 반응은 반복 수행하였으며 반응결과 형성된 비용해성 물질의 방사능은 glass fiber filters(Whatman Inc., Clifton, NJ, USA)로 거른 뒤, 액체 섬광계수기로 측정하였다. 베타-1,3-글루칸 합

성효소와 키틴 합성 효소의 비활성은 표준조건 하에서 1 mg의 효소 단백질에 의해 한 시간 동안 합성된 glucose와 N-acetyl glucosamine의 농도로 환산하였다. 사용한 단백질의 농도 측정은 bovine serum albumin을 표준으로 Lowry 등의 방법에 따라 정량하였다(Lowry *et al.*, 1951).

세포벽 분획 및 분석

세포벽 분획은 기존에 보고된 바 있는 실험과정에 따라 수행하였다(Lee *et al.*, 1999; Manners *et al.*, 1973). 각각의 분획으로부터 글루칸 함량은 orcinol-sulphuric acid 방법에 따라 측정하였고(White and Kennedy, 1986), 키틴의 함량은 chitinase 처리 후에 Tracey(1956)의 방법에 의하여 측정하였다.

세포벽 저해제에 대한 감수성

Zymolyase 저항성 실험은 기존의 방법(Ishiguro *et al.*, 1997)을 변형하여 수행하였다. 효모는 1.2 M sorbitol을 포함한 YPD 배지에서 대수기 중반까지 배양하고 세포를 수득하였다. 수득한 세포를 세척한 뒤 OD₆₀₀가 0.4가 되도록 멸균수에 희석하고, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액에 녹인 Zymolyase를 최종 농도가 2 mg/ml이 되도록 첨가하여 30°C에서 배양하였다. 90분마다 흡광도를 측정하여 세포의 성장을 확인하였다. 세포벽 합성 저해제의 MIC (minimum inhibitory concentration; 최소저해 농도)의 측정은 Kurtz 등의 방법을 참고하였다(Kurtz *et al.*, 1994).

결과 및 고찰

KGD1 유전자의 동정

선행 연구에서 본 연구진은 LP0353의 베타-1,3-글루칸 합성 효소의 결함을 부분적으로 회복시키는 8.5 Kb 크기의 클론을 분리한 바 있다(진 등, 1995). 이 양성클론의 염기서열을 분석한 결과, *Yil124w*와 *Yil125w*에 해당하는 두 개의 ORF가 포함되어 있음을 확인하였다. *Yil124w*는 *GBG1/AYR1*으로 NADPH 의존적 1-acyl dihydroxyacetone phosphate reductase를 암호화하며, phosphatidic acid와 인지질 생합성과 관련되어 있다(Athenstaedt and Daum 2000; Zahedi *et al.*, 2006). 또한 *GBG1/AYR1*은 효모의 세포벽 합성에도 연관되어 있는 것으로 밝혀졌다(Ahn *et al.*, 2010). 한편, ORF *Yil125w*는 *KGD1* 유전자로 α -ketoglutarate dehydrogenase를 암호화 하고 있으며(Repetto and Tzagoloff 1989), 이는 tricarboxylic acid (TCA) cycle에서 α -ketoglutarate로부터 succinyl-CoA의 형성을 촉매하는 효소이다(Arikawa *et al.*, 1999; Repetto and Tzagoloff 1989). *KGD1* 돌연변이는 TCA cycle을 통하여 ATP를 생산할 수 없기 때문에 glycerol, ethanol, lactate 등이 유일 탄소원으로 제공된 경우에 생장이 감소한다(Smaczynska-de Rooij *et al.*, 2004). 그러나, YPD 완전배지에서 *KGD1* 돌연변이는 생장이 조금 감소하거나 혹은 정상과 차이가 없다고 보고된 바도 있다(Arikawa *et al.*, 1999; Smaczynska-deRooij *et al.*,

2004). YPD 완전배지에서 보여주는 *KGD1* 돌연변이의 생장 속도의 차이는 실험에 사용한 균주의 유전적 배경의 차이로 인한 것으로 여겨지며, 본 실험에서 제조한 *KGD1* 돌연변이는 생장이 약간 감소하였다. 그 동안 *KGD1*에 대한 연구는 대사과정과 연관되어 진행되었을 뿐 본 연구진이 접근한 바와 같이 세포벽 합성과의 관련성을 조사한 바는 없다.

세포 내 *KGD1* 유전자수가 베타-1,3-글루칸 합성 효소의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자, *KGD1* ORF를 high-copy No. 플라스미드(YEplac195)와 Low-copy No. 플라스미드(Ycplac33)에 각각 클로닝 하였다. 각각의 플라스미드를 LP0353 균주에 도입하고 베타-1,3-글루칸 합성 효소의 활성을 비교하였다. 세포 내 유전자 수와 상관없이 *KGD1* 유전자가 도입된 돌연변이주 LP0353의 효소활성은 증가하였으나 야생형에 비해서는 활성이 낮았다(Table 1). 또한 세포벽 구성성분의 분석에서도 *KGD1* 도입 균주가 야생형에 비해 전체 글루칸 대비 베타-1,3-글루칸의 함량이 낮으나, LP0353균주보다 증가했음을 확인하였다. *KGD1* 결손 돌연변이 및 회복 균주를 대상으로 베타-1,3-글루칸 합성효소의 활성 및 베타-1,3-글루칸의 함량을 확인하는 추가 실험이 요구되긴 하나, 이상의 결과는 *KGD1*이 베타-1,3-글루칸 합성 효소의 활성에 관여하고 있음을 나타낸다.

KGD1 유전자 파괴가 세포벽 합성효소 활성에 미치는 영향

세포벽 합성 및 세포벽 조립과 연관된 *KGD1*의 기능을 분석하기 위하여 *Akgd1* 돌연변이를 제조하고 Southern Blot으로 확인하였다(Fig. 1). *KGD1* 결손돌연변이는 그 기능과 연관되어 glycerol, ethanol, lactate 등이 유일 탄소원으로 제공된 경우 생장이 감소하나 YPD 완전배지에서의 생장은 실험그룹에 따라 다소 다르게 나타나는 것으로 보고된 바 있는데 (Arikawa *et al.*, 1999; Smaczynska-deRooij *et al.*, 2004), 본 실험실에서 제조한 *KGD1* 돌연변이의 경우에는 YPD에서의 생장이 약간 감소하였다(Fig. 2). 이러한 생장속도 차이는 실험에 사용한 균주의 유전적 배경의 차이에 기인한 것으로 여겨진다.

Table 1. Assay of β -1,3-glucan synthase activity and quantitative analysis of cell wall composition in LP0353 strain expressing Kgd1

Strain	β -glucan synthase ^a (%)	β -glucan ^b			
		total glucan ^c	β -1,3 glucan ^d	β -1,6 glucan	β -1,3 glucan /total glucan ^e
Wild type	103.6 (100)	8314.8	7590.0	724.8	91.3 (100)
LP0353	27.2 (26.3)	2976.0	1993.0	982.8	67.0 (73.4)
LP0353+YCp	24.0 (23.2)	3954.0	2781.6	1172.4	70.3 (77.0)
LP0353+YEp	24.8 (23.9)	ND*	ND*	ND*	ND*
LP0353+YCpKGD1	35.5 (34.5)	3746.4	3025.2	721.2	80.7(88.4)
LP0353+YEpKGD1	39.9 (38.5)	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND, not determined.

^aEnzyme activity was measured in membrane fractions and was expressed as mg (UDPG)/h·mg (protein).

^bThe units of β -glucan were expressed as mg/mg of cell wall dry-weight.

^cThe amount of total β -glucan was determined based on the carbohydrate content of the Zymolyase-insoluble pellet and solubilized supernatant before dialysis.

^dThe amount of β -1,3-glucan was the difference in between total carbohydrate content and β -1,6-glucan.

^eThe amount of β -1,3-glucan in GS-1-36 was taken as 100.

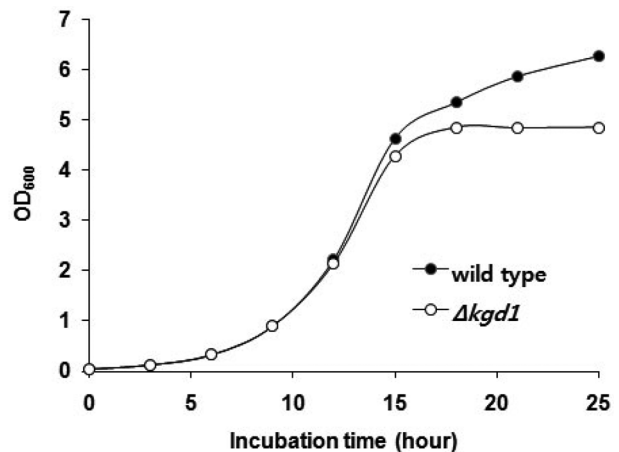


Fig. 2. Growth curve of *Akgd1* mutant. Cells were grown in YPD at 30°C. Cell growth was measured as OD₆₀₀ every 3 hours.

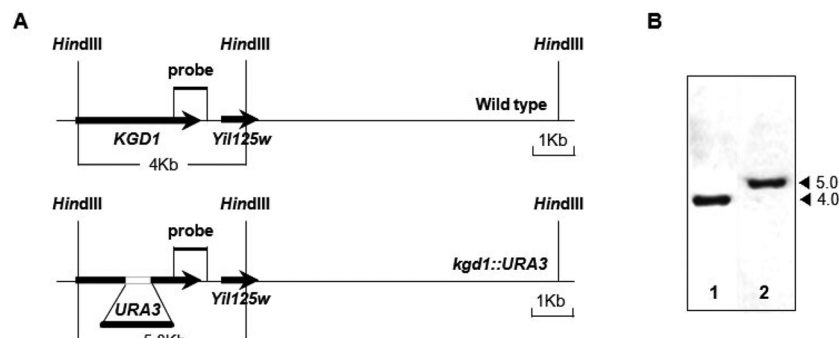


Fig. 1. Gene disruption of *KGD1* in *S. cerevisiae*. (A) A schematic representation of the gene disruption of *KGD1*. Black arrows stand for ORFs. The predicted sizes of fragments generated by *Hind*III-digestion are depicted. A 4 Kb fragment indicates *KGD1* wild type allele while the 5 kb fragment indicates the *kgd1::URA3* allele disrupted by inserted *URA3*. (B) The disruption of *KGD1* was detected by Southern blot using the indicated probe. wild type (lane1) and *Akgd1* (lane2)

한편, 예상과 달리 *Δkgd1* 돌연변이주에서 베타-1,3-글루칸 합성효소의 활성은 야생형에 비하여 약간 증가하였다(Fig. 3). *KGD1* 결손돌연변이는 야생형에 비해 키틴 합성 효소 I은 15%, 키틴 합성 효소 II는 53% 그리고 키틴 합성 효소 III는 28% 증가하였다. 이러한 결과는 LP0353의 베타-1,3-글루칸 합성 효소의 활성 결핍을 회복시키는 선행 실험의 결과와는 다소 차이가 있지만, 모든 세포벽 합성 효소 특히 키틴 생합성 효소에 영향을 주고 있음을 보여준다. 효소활성과 더불어 세포벽 당류의 분석 결과, Alkali-soluble 글루칸의 경우 야생형 균주에 비하여 *KGD1* disruptant의 경우 약 17% 정도 감소되었다(Table 2). Acid-soluble 글루칸, 즉, 베타-1,6-글루칸의 경우는 *KGD1* 결손돌연변이에서 약 15% 정도 증가하였고, Alkali/acid-insoluble 글루칸, 즉, 베타-1,3-글루칸의 경우는 큰 차이를 보이지 않았다. Mannan의 경우 야생형 균주에 비해 결손변이주의 함량이 17% 정도 감소하였으나, 키틴의 경우에는 15% 정도 증가하였다(Table 2). 세포벽 당류 분석은 *KGD1*이 베타-1,3-글루칸의 함량에는 영향을 미치지 않으나, 베타-1,6-글루칸과 알파 글루칸의 함량 변화를 유발하였음을 알 수 있다. 이상의 결과는 *KGD1*이 키틴생합성효소 활성화에 영향을 주며, 세포벽의 베타-1,6-글루칸과 알파 글루칸 함량에 영향을 줌으로써 효모의 세포벽 합성과정에 관여함을 시사한다.

KGD1 결손돌연변이주의 세포벽 합성 저해제에 대한 감수성 조사

KGD1 유전자 파괴에 의한 세포벽 합성 효소의 활성 변화가

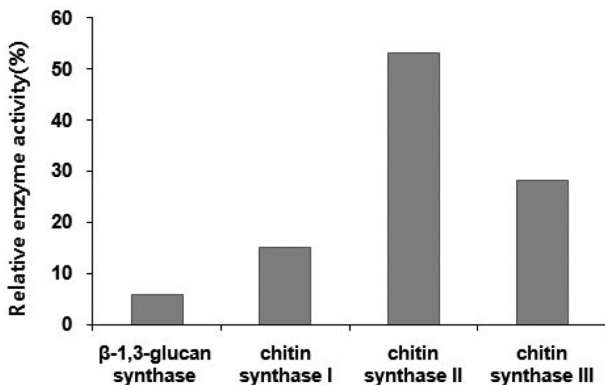


Fig. 3. Assays of enzymes related to cell wall biogenesis in *Δkgd1*. The values are presented as relative enzyme activities normalized to that of wild type. The experiment was performed three times.

Table 2. Quantitative analysis of cell wall composition in *Δkgd1*

Strain	Conc. (mg/g cell wall dry weight)				
	Alkali-sol- uble	Acid-sol- uble	Alkali-/Acid- insoluble	Mannan	Chitin
Wild type	186.13	2.60	26.40	98.30	6.21
<i>Δkgd1</i>	155.57	2.99	27.13	82.01	7.13

Table 3. Susceptibility of *Δkgd1* mutants to cell wall damaging agents

Strain	MIC (mg/ml)	
	Wild type	<i>Δkgd1</i>
Calcofluor white	4	20
Nikkomycin Z	4	0.8

세포벽 합성 저해제에 대한 감수성에는 어떠한 영향을 주는지 확인하고자 하였다. 세포벽의 주요 성분인 베타-1,3-글루칸을 특이적으로 가수분해 하는 베타-1,3-글루카네이즈인 Zymolyase에 대한 감수성은 *Δkgd1* 돌연변이주와 야생형이 큰 차이를 보이지 않았다(결과 미제시). 이 결과는 베타-1,3-글루칸의 함량에서 큰 차이가 없었던 돌연변이주의 세포벽 구성성분 분석결과와 일치하였다(Table 2). 다양한 세포벽 합성 저해제에 대한 최소저해 농도를 측정한 결과, *Δkgd1* 돌연변이는 야생형에 비해 Calcofluor white에 대한 내성이 증가하였고 Nikkomycin Z에 대한 감수성을 보였다(Table 3). Calcofluor white는 키틴에 특이적으로 결합하는 염료로 세포벽 결합을 보이는 다양한 돌연변이가 감수성을 보이는 것으로 보고되었다. Calcofluor white에 대한 내성의 증가는 *Δkgd1* 돌연변이주에서 키틴의 함량이 감소함을 의미하나 세포벽 당류의 함량 분석 결과와 일치하지 않았다. Nikkomycin Z는 키틴 합성 저해제로 효모의 키틴 합성 효소 III에 특이적인 것으로 보고되었는데(el-Sherbeini and Clemas 1995), *Δkgd1* 돌연변이주의 Nikkomycin Z에 대한 감수성 증가는 키틴 합성 효소의 활성 증가와 일치하는 결과로 *KGD1*이 키틴의 생합성에 관련되어 있음을 시사한다. 반면 글루칸 합성 저해 물질인 L-688,786과 L-733,560 및 또 다른 키틴 합성 저해 물질인 Polyoxin D에 대한 감수성은 야생형과 큰 차이를 보이지 않았다(결과 미제시).

이상의 결과는 *KGD1*이 TCA cycle을 통하여 ATP 생산과 관련된 기능뿐만 아니라, 효모의 세포벽 합성과 관련된, 특히 키틴 생합성 효소의 활성화에 변화를 일으켜 생장 및 세포벽 합성 저해제에 대한 감수성의 변화를 유도함을 제시하고 있다.

적요

KGD1 유전자는 비허용온도에서 세포벽에 결합을 보이는 *Saccharomyces cerevisiae* LP0353 균주의 베타-1,3-글루칸 합성 효소의 활성을 회복시키는 유전자로 분리되었다. α -ketoglutarate dehydrogenase를 암호화하는 *KGD1* 유전자의 효모의 세포벽 합성과 연관된 기능을 분석하기 위하여 유전자 파괴를 시도하였다. *KGD1* 돌연변이는 생장속도가 감소하고, 키틴 합성 효소들의 활성이 증가하였으며, 세포벽 구성 당류의 함량에 변화를 보였다. 또한 Calcofluor white과 Nikkomycin Z 등과 같은 세포벽 합성 저해물질에 대해 감수성 변화를 나타냈

다. 이러한 결과들은 *KGD1*이 효모의 세포벽 특히 베타-1,6-글루칸과 키틴의 생합성에 영향을 주고 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구의 일부는 ‘과학기술처 선도기술개발사업’의 지원(박희문)과 ‘교육과학기술부 BK21사업’의 지원(박윤희)으로 이루어졌습니다.

참고문헌

- 이동원, 박상원, 진은희, 정재훈, 김진미, 박희문. 1994. 베타-1,3-글루칸 합성능이 손상된 *Saccharomyces cerevisiae* 돌연변이주의 유전적 분석. 한국유전학회지 16:259-268
- 진은희, 이동원, 김진미, 박희문. 1995. 베타-1,3-글루칸 생합성에 관여하는 *Saccharomyces cerevisiae* 유전자의 클로닝. 한국균학회지 23:129-138.
- Ahn, K.-W., Kim, S. W., Kang, H.-G., Kim, K.-H., Park, Y.-H., Choi, W.-J. and Park, H.-M. 2010. Deletion of *GBG1/AYR1* Alters Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycobiol* 38: In press.
- Arikawa, Y., Kuroyanagi, T., Shimosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto, K., Kodaira, R. and Okazaki, M. 1999. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 87:28-36.
- Athenstaedt, K. and Daum, G. 2000. 1-Acylidihydroxyacetone-phosphate reductase (Ayr1p) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the open reading frame *YIL124w* is a major component of lipid particles. *J Biol Chem* 275:235-240.
- Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T. 2000. Methods in Yeast Genetics : A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cabib, E., Bowers, B., Sbulati, A. and Silverman, S. J. 1988. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol Sci* 5:370-375.
- Choi, W. J. and Cabib, E. 1994. The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. *Anal Biochem* 219:368-372.
- de Groot, P. W., Ruiz, C., Vazquez de Aldana, C. R., Duenas, E., Cid, V. J., Del Rey, F., Rodriguez-Pena, J. M., Perez, P., Andel, A., Caubin, J., Arroyo, J., Garcia, J. C., Gil, C., Molina, M., Garcia, L. J., Nombela, C. and Klis, F. M. 2001. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics* 2:124-142.
- el-Sherbeini, M. and Clemas, J. A. 1995. Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:200-207.
- Hohmann, S., Mager, W. H., Gasch, A. P., Trott, A., Morano, K. A., Tamas, M. J., Wadskog, I., Adler, L., Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., Azevedo, D., Winderickx, J., Holsbeek, I., Lagatie, O., Giots, F., Thevelein, J. and Winde, H. d. 2003. Yeast Stress Response, Springer.
- Ishiguro, J., Saitou, A., Duran, A. and Ribas, J. C. 1997. *cps1+*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *FKS* genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J Bacteriol* 179:7653-7662.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:163-168.
- Kang, M. S. and Cabib, E. 1986. Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1 → 3)-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5808-5812.
- Kurtz, M. B., Douglas, C., Marrinan, J., Nollstadt, K., Onishi, J., Dreikorn, S., Milligan, J., Mandala, S., Thompson, J., Balkovec, J. M. and et al. 1994. Increased antifungal activity of L-733,560, a water-soluble, semisynthetic pneumocandin, is due to enhanced inhibition of cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2750-2757.
- Latge, J. P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66:279-290.
- Lee, D.-W., Ahn, G.-W., Kang, H.-G. and Park, H.-M. 1999. Identification of a gene, *SOO1*, which complements osmo-sensitivity and defect in vitro beta-1,3-glucan synthase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1450:145-154.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Roemer, T. W., Vo, D. H., Bondoc, D. C., Hall, J., Zhong, W. W., Sdicu, A. M., Davies, J., Klis, F. M., Robbins, P. W. and Bussey, H. 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147:435-450.
- Manners, D. J., Masson, A. J. and Patterson, J. C. 1973. The structure of a beta-(1 → 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J* 135:19-30.
- Repetto, B. and Tzagoloff, A. 1989. Structure and regulation of *KGD1*, the structural gene for yeast alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Mol Cell Biol* 9:2695-2705.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Smaczynska-de Rooij, I., Migdalski, A. and Rytka, J. 2004. Alpha-Ketoglutarate dehydrogenase and lipoic acid synthase are important for the functioning of peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Lett* 9:271-286.
- Song, M. R., Lee, D. W., Park, S. W., Bae, K. S. and Park, H. M. 1992. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in (1 → 3)-beta-D-Glucan synthase. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 20:642-646.
- Spreghini, E., Davis, D. A., Subaran, R., Kim, M. and Mitchell, A. P. 2003. Roles of *Candida albicans* Dfg5p and Dcw1p cell surface proteins in growth and hypha formation. *Eukaryot Cell* 2:746-755.
- Tracey, M. V. 1956. Chitin. In: Modern Methods of Plant Analysis. Eds. P. Peach and M. V. Tracey. Springer-Verlag. 264-274.
- Vink, E., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H., Brekelmans, S., de Nobel, H. and Klis, F. M. 2002. The protein kinase Kic1 affects 1,6-beta-glucan levels in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* 148:4035-4048.
- Zahedi, R. P., Sickmann, A., Boehm, A. M., Winkler, C., Zufall, N., Schonfisch, B., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C. 2006. Proteomic analysis of the yeast mitochondrial outer membrane reveals accumulation of a subclass of preproteins. *Mol Biol Cell* 17:1436-1450.