



***Saccharomyces cerevisiae'* de Morfogenezin Moleküler Temeli**

Özlem Abacı Günyar

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Bornova, İZMİR

Öz:Bu derlemede, *S. cerevisiae'* nin hücrel morfogenezin temelini oluşturan mekanizmalar özetlenmiştir. Mitotik hücre döngüsü ve eşleşme sırasında polarizasyonu düzenleyen anahtar sinyalleşme yol izleri tanımlanmıştır. Makalede açıklanan mekanizmalar mayalar için spesifik olmasına rağmen, hücre polaritesinin altında yatan temel prensipler ve sinyalleşme yol izlerinde görevli temel öğelerin evrimsel süreç içerisinde korunmuş olduğu görülmektedir. Mayalarda bulunan GTPaz' lar ve düzenleyici proteinleri diğer ökaryotik orgaizmalar ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle, tomurcuklanan maya *Saccharomyces cerevisiae* çevresel uyarılara cevap olarak hücrel asimetri ve hücre polaritesinin kurulması çalışmaları kullanılarak model organizma olmuştur.

Anahtar Kelimeler: *S. cerevisiae*, maya, polarite, morfogenez

The Molecular Basis of Morphogenesis in *S. cerevisiae*

Abstract:In this review, the mechanisms underlying cellular morphogenesis of the *S. cerevisiae* are summarized. Key signaling pathways that regulate polarization during the mitotic cell cycle and during mating have been identified. Although the specific mechanisms for yeast described in this article, it seems to be conserved basic principles underlying the cell polarity and basics in the signaling pathway in the evolutionary process. Therefore, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been an model organism for the study of the establishment of cellular asymmetry and cell polarity in response to specific physiological cues.

Keywords: *S. cerevisiae*, yeast, polarity, morphogenesis

GİRİŞ

Hücre polarizasyonu (kutuplaşma) çoğu ökaryotik hücrenin gelişiminde merkezi rol oynamaktadır. Besin transportu, nöronal sinyalleşme prosesi, hücre hareketi gibi önemli hücrel olaylarda rol oynamaktadır. Hücre polarizasyonu hücre içi ve hücre dışı uyarılara cevap olarak oluşur. Bu uyarılar, lokal hücre iskeletinin yeniden organize olmasına yol açan sinyalleşme yol izlerini aktive eder. Hücre iskeleti elemanları salgısal veziküller gibi membran organellerinin hedefine yönlmesine yardım eder. Bu şekilde polarite ekseninin uzamasına

yardım eder. Hücre iskeleti elemanları olan mikrotubuller ve aktinlerin koordineli organizasyonu hücre polarizasyonunun gerçekleşmesi için kritik rol oynamaktadır (Momany, 2002; Martin ve Chang, 2005; Orlando ve ark., 2010; Harris, 2014).

Tomurcuklanan maya *S. cerevisiae'* de 3 tip polarize gelişim karakterize edilmiştir.

- 1-Tomurcuklanma ile vejetatif büyüme
- 2-Feromonlere cevap olarak eşleşme uzantılarının oluşumu (shmoo)
- 3-Kötü koşullara cevap olarak filamentöz gelişim (Park ve Bi, 2007, Slaughter ve ark., 2013).



S. cerevisiae'de 3 tip hücre vardır. MAT (Mating Type) lokusunda yer alan genetik bilgi ile belirlenen a ve α hücreler (haploid hücreler) ve a/ α hücrelerdir (diploid hücre) (Sheu ve ark., 2000; Haber 2012). Bu hücreler hücre döngüsünün geç G1 fazında kritik boyuta ulaştıkları zaman tomurcuklanırlar. Tomurcuklanma başlangıçta tomurcuk ucuna doğrudur (apikal büyüme) ve sonradan nükleus bölünmesi ve sitokinez gerçekleşene dek tomurcuğun tüm yüzeyi eşit oranda genişler (izotropik büyüme) (Sheu ve ark., 2000; Momany, 2002, Arkowitz ve Bassilana, 2011; Slaughter ve ark., 2015). Polarize gelişimin ikinci formu a haploid ve α haploid hücre, a/ α diploid hücre oluşturmak üzere birbirine yönelip eşleştiği (eşleşme, çaprazlaşma) zaman gözlenir. Tomurcuklanma (budding) sırasında polarizasyon hücre döngüsü ile ilgili olan internal sinyallere cevap olarak oluşurken, eşleşme sırasında hücre polarizasyonu dış sinyaller nedeni ile tetiklenir. Karşı eşleşme tipindeki hücre tarafından üretilen peptid yapıda olan çaprazlaşma faktörlerine (feromonlara) cevap olarak polarizasyon gerçekleşir. Her iki durumda da (tomurcuk oluşumu veya eşleşme uzantılarının oluşumu sırasında) polarize aktin hücre iskeletinin organizasyonu ve polarize hücre uzaması gerçekleşir (Park ve Bi, 2007; Slaughter ve ark., 2013).

Tüm polarize gelişim tipleri Cdc42 (GTPaz) tarafından regüle edilmektedir. GTPaz Cdc42 çoğu ökaryotik hücrede hücre polarizasyonu için gerekli merkezi bir regülatör proteindir (Heinrich ve ark., 2007; Johnson ve ark., 2011). Cdc42 asıl olarak aktin organizasyonunda rol oynar. Fakat aynı zamanda salgı bileşenleri ile doğrudan etkileşim yoluyla polarize ekzositoz için de gereklidir. Diğer tüm küçük GTPaz' lar gibi Cdc42 GDP ile bağlantılıdır ve inaktiftir veya GTP bağlı olarak aktif haldedir. Cdc42 GTP bağlı veya GDP bağlı formları ile, iki konformasyon arasında gidip gelerek hücre içerisindeki çeşitli proteinleri etkiler ve onların da konformasyonlarının değişmesine ve fosforillemelerine yol açarak hücre içi sinyal iletimini tetiklerler. GDP' nin GTP' ye değişimi ve bundan

dolayı Cdc42' nin aktivasyonu "GEF proteini" olan (guanin exchange factor; guanin-nükleotid değiştirme faktörü) Cdc24 (GEF Cdc24) ile katalize edilmektedir. GTPaz aktive edici proteinler (GAPs; GTPase activating proteins) olan Rga1, Rga2 ve Bem3 GTP' nin hidrolizini stimüle eder. İlave olarak, Cdc42' nin aktivasyonu GDI Rdi1 (guanine nucleotide dissociation inhibitor) ile düzenlenir.

Cdc42 bir kez aktive olduğunda; aktin hücre iskeletinin ve septinlerin organizasyonu sağlar ve ekzositik sistemin elemanları ile iletişime girer. Polarize aktin hücre iskeleti ekzositoza rehberlik ederek polarize hücre büyümesine neden olur (Smith ve ark., 2002; Park ve Bi, 2007; Harris, 2014). Aktif Cdc42 polarize gelişim bölgesinde kendi efektörleri ile iletişindedir. 3 sınıf Cdc42 efektörü (modülatör) vardır. 1- Formin Bni1, 2- PAKs (p21-activated kinases) olan Ste20, Cla4, Skm1, 3- Gic1 ve Gic2 maya spesifik proteinler' dir. Bu efektörlerin aktivitesi aktin kabloların ve septin yapıların lokal montajına neden olur ve bu yapılar yeni başlayan tomurcuk bölgesine vezikül ekzositozunu yönlendirir (Park ve Bi, 2007; Harris, 2004).

1. *S. cerevisiae*'de Gözlenen Polarize Gelişim Tipleri

1.1. Tomurcuklanma ile Vejetatif Büyüme

1.1.1. Aktin Organizasyonu

S. cerevisiae'de bulunan aktin yamalar; polarize gelişim bölgesinde konsantre olmuştur. Aktin yamalar, endositoz ile ilgili yapılardır ve plasma membranında Arp2/3 kompleks ile birikimi gerçekleşen dallanmış aktin filamentleri ağını içerir. Arp2/3 kompleks aynı zamanda aktin yamaların hareketinden sorumludur (Taxis ve ark., 2006; Mosoley ve Goode, 2006). Aktin kablolar; formin ailesine ait Bni1 ve Bnr1 tarafından biriktirilmiş uzun dallanmamış aktin filamentleri demetlerini içermektedir. Aktin kablolar boyunca hareket eden tip V miyozin ekzositoz vezikülleri, mRNA' ları ve organelleri taşır. Kablolar taşıma için otoban rolü üstlenirler.



Bu anlamda aktin yapılar hücre içi taşıma için gerekli yapılardır (Lipkin 2011; Slaughter ve ark., 2015). Cdc42' nin aktivasyonu sadece aktin hücre iskeletinin yeniden organizasyonu değil aynı zamanda küçük G proteinlerinin (Sec4 ve Rho1) indüksiyonunu da sağlar. Sec4 tomurcuk büyümesi için gerekli veziküller ile tomurcuğa destek sağlar. Rho1 yeni hücre duvar bileşenlerinin sentezini indükler (1,3-β-glukan sentaz aktivitesi ile 1,3-β-glukan sentezini ve bu sentez için gerekli genlerin ekspresyonunu stimüle eder). Rho1 aynı zamanda tomurculanma prosesi için aktin hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu düzenler (Roumanie ve ark., 2005; Orlando 2010).

1.1.2. Aktin Kablolar ve Ekzositoz

Aktin kablolar anne hücreden tahmini tomurcuk oluşum bölgesi veya yavru hücre kısmına hücrenin korteksi boyunca hizalanır. Aktif aktin yamaların kümelenildiği hücre büyüme bölgesine doğru polarize olurlar. Bu nedenle aktin kablolar ve aktin yamaların polarize ekzositozu yönlendirdiği düşünülür (Orlando, 2010).

Tomurculanan bir mayada aktin kablolar tomurcuk ucunda lokalize olan formun Bni1 ile veya tomurcuk boyun kısmında lokalize olan Bnr1 ile biriktirilir. Bu genlerin delesyonun halinde kablolar oluşmaz sonuçta hücre büyük yuvarlak ve tomurcuksuz hale gelir (Orlando, 2010).

Ekzositoz, bir hücre içi vezikülün plazma membranına hareketini ve veziküler membran ve plazma membranı füzyonunun ardından hücre dışı boşluğa veziküler içeriğin salınımını içermektedir. Polarizasyon sırasında polarite oluşumundan sorumlu elemanlar ve ekzositoz arasında interaksiyon başlar. Endoplazmik retikulumda (ER) oluşan ekzositozu gerçekleştirecek olan veziküller, Golgi kompleksi ile kaynaşır, Golgi boyunca taşınır ve Golgiden oluşan salınım vezikülleri ile plazma membranına taşınır (Özgüneş, 2004; Brennwald ve Rossi, 2007; He ve Guo, 2009).

Veziküller rota olarak aktin kablolarını kullanarak tip V miyozin Myo2 yolu ile taşınır. Bu

taşıma aynı zamanda Rab GTPaz olan Sec4 ve onun GEF' i Sec 2' ye bağlıdır. Bunların her ikisi de veziküller ile bağlantılıdır. Rab proteinleri veziküle tutunur ve hedef membran üzerindeki bir efektör proteinle ve SNARE' lerle özgül olarak etkileşerek SNARE kompleksinin (v-SNARE/t-SNARE kompleksi) oluşmasını sağlar. Böylece vezikül doğru hedefi bulur. Dolayısı ile Sec4 (Rab proteini) ve onun GEF'i Sec2 sekresyon vezikülleri ile bağlantılıdır. Anne hücreden yavru hücreye vezikül taşınması için gereklidir. Veziküllerin bağlanması evrimsel olarak korunmuş eksokist ismi verilen kompleks sistem ile yönetilir. Bu eksokist kompleksi Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 olmak üzere 6 alt birimlidir (Brennwald ve Rossi, 2007; He ve Gou, 2009; Wloka ve ark., 2013; Feyder ve ark., 2015).

Plazma membranına (yani tomurcuk ucuna) vezikülün ulaşması üzerine, vezikül üzerindeki eksokist komponentleri zaten tomurcuk ucunda lokalize olan Sec3 ve Exo70 ile etkileşime girer ve tüm eksokist oluşur. Bu tüm eksokistin oluşumu (yani tüm eksokist alt birimleri birleşir ve kompleksi oluşturur) SNARE proteinleri aracılığı ile vezikülün bağlanması için gereklidir. Bu nedenle her bir vezikül transportu döngüsünde eksokist oluşur. Plazma membranında fonksiyonunu tamamladıktan sonra Sec4-GTP, Msb3 ve Msb4 GTPaz aktive eden proteinleri (GAP) ile hidroliz olur ve Sec4-GDP sitosole geri döner (Brennwald ve Rossi, 2007; Feyder ve ark., 2015).

1.1.3. Endositoz

Ökaryotik hücreler "endositoz" ile bazı molekülleri, membranlarından oluşturdukları veziküller aracılığı ile içeri alırlar. Bu veziküller endozom kompleksi ile kaynaşır. Buradan tomurculanan veziküller Golgiye ve lizozomlara taşınır. Bu şekilde bir geri taşınım da yine veziküller aracılığı ile sürer (Özgüneş, 2004). Memeli hücrelerindeki lizozomun karşılığı mayalardaki vakuollerdir. Maya vakuollerinin önemli görevlerinden biri de kullanılmış biyolojik makromolekülleri yeniden işleyip kullanılabilir hale getirmektir (Benli ve Yiğit 2004).



Vakuollar hidrolizasyon sonucunda yıkıma uğrayan substrat proteinleri hücre tarafından tekrar kazanılmaktadır (Benli ve Yiğit, 2004). Bu şekilde *S. cerevisiae*'de endositoz hücre yüzey proteinlerinin ve membranlarının geri dönüşümünden sorumludur (Feyder ve ark., 2015; Goode ve ark., 2015).

En iyi karakterize edilmiş endositik kargo proteinleri;

1-Çaprazlaşma (eşleşme) faktörleri (feromonların) reseptörleri, 2-Veziküler SNARE (V-SNARES)' dir. Endositoz bu proteinlerin hücre yüzeyinde polarite dağılımının korunması için gereklidir. Ayrıca integral membran proteinleri de endositik ve ekzositik veziküller içinde toplanır ve endositoz ile polarize edilir (Harris, 2004).

Endositozda anahtar proses; endositik veziküllerin birikimini yöneten aktin yamaların montajıdır. Hem tomurcuklanan hem de füzyon bölünen mayalarda, aktin yamalar aktif hücre duvar birikimi olan bölgelerde akümüle olur. Bni1 ve Bnr1 mutantlarının karakterizasyonu mutantların polarite ekseninin belirlenmesi yeteneğinde olduğunu ve polar gelişimi başlattığı ve sonunda polariteyi korumada yetersiz olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu mutantlar endositoz yapmada kusurludur. Bu gözlemler polaritenin korunması için endositozun korunması yönünde kuvvetli delillerdir (Harris, 2004; Goode ve ark., 2015).

1.1.4. Cdc42 Polarizasyonun Oluşturulması ve Korunması

Polarize büyüme bölgesinde Cdc42' nin polarizasyonu 2 şekilde gerçekleşmektedir.

1-Cdc42'nin aktin-temelli iletimi

Cdc42'nin GDP bağlı formu sekresyon vezikülleri ile tip V miyozin Myo2 aktin kabloları üzerinde taşıyor. Cdc42-GDP kargo yapısı Msb3 ve Msb4 veya diğer Cdc42-GDP kompleksine bağlanabilen faktörlerce tutuluyor ve GEF Cdc24 tarafından aktivasyon için hazır hale getiriliyor. Cdc42-GTP' nin akümüasyonu aktin kabloların formin protein ailesi üyeleri tarafından birikimini başlatır. Bu şekilde internal Cdc42 polarize bölgeye transport edilir ve sonuçta daha fazla aktin kabloların birikimi

gerçekleşir (Park ve Bi, 2007; Slaughter ve ark., 2009; Arkowitz ve Bassilana, 2011).

2-Cdc42' nin Bem1 temelli aktivasyonu: Aktin yokluğunda hücreler adaptör protein Bem1'e bağlı bir mekanizma ile polarize gelişimi gerçekleştirebilir. Bem1 çoklu bağlanma bölgesi içeriyor ve polarite oluşturmaktan sorumlu diğer elemanlar ile etkileşiyor. Cdc42, Cdc24 ve PAK Cla4 bir araya getiriliyor ve sonuçta Cdc24 Cla4 tarafından fosforile oluyor ve büyüme bölgesinde daha fazla Cdc42-GTP akümüasyonu gerçekleşiyor. Bu efektörlerin aktivitesi aktin kabloların ve septin yapıların lokal montajına neden olur ve bu yapılar yeni başlayan tomurcuk bölgesine vezikül ekzositozunu yönlendirir. *BEM1*'deki delesyon ölümcül değil, fakat $\Delta bem1$ hücreleri ısıya duyarlı ve polarize gelişimde kusurlu bulunmuştur (Park ve Bi, 2007; Slaughter ve ark., 2009; Arkowitz ve Bassilana, 2011).

1.1.5. Tomurcuklanma Sırasında Hücre Polarizasyon için Eksen Belirlenmesi

S. cerevisiae farklı hücre tiplerinde polarize gelişim için tomurcuk bölgesinin (bud site, cortical site) seçiminde farklı desenler sergilerler. *S. cerevisiae*' de her bir hücre döngüsünde yeni bir tomurcuk oluşur. Tomurcuk oluşum bölgesi tomurcuk-yer seçimi modülünü içeren bir grup protein tarafından belirlenir. Her biri kendi modülü ile belirlenen 2 farklı tomurcuklanma deseni mevcuttur (Park ve Bi, 2007; Kang ve ark., 2012; Slaughter ve ark., 2015).

Haploid a ve α hücrelerinde (aksial desen) hem anne ve hem de yavru hücreler önceki bölünme bölgesinin hemen bitişiğinde bir tomurcuk bölgesi seçerler. Tersine, diploid a/ α hücreleri bipolar desende anne hücreleri yavru hücrelere bitişik veya hücrenin diğer ucunda bir tomurcuk bölgesi seçer. Oysa yavru hücreler bir önceki tomurcuk oluşum bölgesinden uzak bir bölge seçer (Park ve Bi, 2007; Kang ve ark., 2012; Slaughter ve ark., 2015).

Farklı tomurcuklanma desenleri plasma membranı ile bağlantılı hücre tipi spesifik kortikal markırlara cevap olarak oluşur.



Bu spesifik tomurcuklanma deseninin (aksial ve bipolar tomurcuklanma deseni) üretimi için moleküler yol izlerinde görevli 3 grup gen vardır (Park ve Bi, 2007).

1-*RSR1/BUD1*, *BUD2* ve *BUD5*' yi içeren modül iki tip tomurcuklanma deseni için de gerekli ve bundan dolayı genel tomurcuk bölgesi seçim modülü olarak rol oynar. 2- *BUD3*, *BUD4*, *AXL1* ve *AXL2/BUD10*' yi içeren modül sadece aksial desen oluşumundan sorumlu modüldür. 3- *BUD7-BUD9*' yi içeren modül sadece bipolar desen için gerekli oluşumundan sorumlu modüldür (Park ve Bi, 2007). *BUD* genleri ürünleri polarize büyüme için ve spesifik bir yöne olan büyüme için bölgenin seçimi ile ilgilidir ve bu nedenle bu genlerde delesyon tomurcuk oluşum bölgesinin seçiminde kusura neden olur (Park ve Bi, 2007).

Rsr1 GTPaz modülü: Rsr1, Bud2 ve Bud5

Bu modül iki tip tomurcuklanma deseni için de gereklidir ve genel tomurcuk bölgesi seçim modülü olarak rol oynar. Bu nedenle burada mekanizma ayrıntısı ile verilmiştir.

Rsr1, Bud2 ve Bud5' den oluşan Rsr1 GTPaz modülü, RAS GTPaz ailesine aittir ve Cdc24 ile etkileşime girer. Tomurcuk bölgesindeki Bud5 Rsr1'i GTP bağlı forma döndürür. Yani Bud5 Rsr1 için GEF rolü oynar. Rsr1-GTP, Cdc24 ve Cdc42 ile bağlantı kurar. Bud2, Rsr1 ile birlikte olan GTP' nin hidrolizinden sorumludur ve Rsr1 için GAP rolü oynar. GDP bağlı Rsr1' in Cdc24' den ayrılması Cdc24' ü aktive eder. Ve sonuçta Cdc24, Cdc42 üzerindeki GDP' yi GTP' ye değiştirir. Cdc42-GTP aktin montajını ve polar eksenin kurulması için vezikül ekzositozunu başlatır. Bu şekilde Rsr1 GTPaz, GAP Bud2 ve GEF Bud5 büyüme için uygun bölgenin seçimi ile ilgilidir (Park ve Bi, 2007).

1.1.6. Maya Tomurcuklanması Sırasında Polarite Kurulmasının Zamansal Kontrolü

S. cerevisiae' de morfogenez hücre döngüsünde pek çok noktada nükleer bölünme ile koordine edilir. Hücre döngüsünde belli noktalar

geçiş noktalarıdır (geç G1 ve G2/M fazında başlar) ve farklı CDK (Siklin Bağımlı kinazlar; Cyclin Dependent Kinases) kompleksleri nükleer bölünme için gerekli olayları başlatır. Aynı kompleks spesifik morfogenetik cevabı da aktive eder (Harris, 2004). Örnek olarak başlangıç noktasında, DNA replikasyonunu başlatan aynı kompleks aynı zamanda polarite oluşumunu sağlayan tomurcuk bölgesinin organizasyonunu da yönlendirir. Sonra, farklı CDK kompleksleri aynı zamanda apikal büyümeden izotropik tomurcuk büyümesine değişimi yönlendirir. Son olarak; CDK kompleksinin yıkımı sitokinez için hazırlanan anne-tomurcuk boyun kısmına morfogenezde rol oynayan elemanların tekrar lokalize olmasına neden olur (Harris, 2004).

CDK, polarite oluşumunu kontrol eden yol izlerine de etkilidir. Bu yol izleri Cdc42 aktivasyonunun zamanlaması ve lokalizasyonunu da düzenlemektedir. Mekanizmalardan birisi Cdc42 ve GEF Cdc24 ile birlikte hareket eder. Cdc24 Far1 ile birlikte nükleusta biriktirilir. Tomurcuklanma sırasında nükleustan çıkarken; G1 faz protein kinaz Cdc28' in aktivasyonu iç polarite sinyali oluşturur ve Far1' in degradasyonuna sebep olur. Bu şekilde Cdc24 serbest kalıp sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya geçer geçmez Cdc24 tomurcuk oluşum bölgesi ile etkileşime geçer ve GTPaz Cdc42' yi aktive eder. Aktive olan GTPaz Cdc42 aktin hücre iskeletini ve sonuç olarak ta hücreyi polarize eder (Yoshida ve Pellman, 2008; Harris, 2004).

Tomurcuk bölgesinde Cdc24 aynı zamanda Bem1, Bio1, Bio2 ile bağlantılıdır. Bio1 ve Bio2 G1 siklin CDK' nin substratlarıdır ve polarize gelişim için fosforilasyonları gereklidir. Bio1 mutantları CDK fosforilasyonu yapamazlar, polarize gelişim bölgesine yönlenebilirler ve polarize gelişimi koruyamazlar (Yoshida ve Pellman, 2008; Harris, 2004).

Diğer bir mekanizma; Cdc24' ün aktivasyonu Cdc42' yi aktive etmek için tek yol değildir. GAP' lerin inaktivasyonu Cdc42-GTP miktarını artırmaktadır. Yani Cdc42 aktivasyonu GAP' leri olan Rga2, Bem2 ve Bem3 inaktivasyonu ile de sağlanabilir.



Polarizasyon öncesi, Bem2 ve Bem3 sitoplazma ve hücre yüzeyinde lokalize olur. Burada bunlar inaktif durumda Cdc42' yi koruyorlar. Ardından Rga2 ile birlikte yeni başlayan tomurcuk bölgesinde akümüle olurlar. Fakat CDK aracılı fosforilasyonun bir sonucu olarak Rga2 ve Bem3 her ikisi de inaktif olur (Yoshida ve Pellman, 2008; Harris, 2004).

Her 2 mekanizmada da aktif GTP-bağlı Cdc42, sadece yeni başlayan tomurcukta mevcuttur. İleriki basamaklarda ilave basamaklar nükleer bölünme ile morfogenezi koordine eder. Örnek olarak; CDK kompleks sitokinetik aktin halkasının montajına izin vermek için anne-tomurcuk boyun kısmındaki Rho1 GTPazı lokal olarak aktive etmek için Polo kinaz ile bağlantılı olarak çalışır.

1.2. Feromonlara Cevap Olarak Eşleşme Uzantılarının Oluşumu (shmoo)

1.2.1. Eşleşme Sırasında Hücre Polarizasyonunda Cdc42' nin Rolü

Feromonlara cevap olarak eşleşme uzantılarının oluşumu sırasında polarize gelişim görülmektedir. Bu olay sırasında öncelikle karşı eşleşme tipindeki hücreler tarafından oluşturulan eşleşme feromonlarına cevap olarak haploid a veya α hücreleri eşleşme uzantısı oluşturmak için polarize olurlar ve eşleşme uzantısı (mating projection, shmoo) oluştururlar (Park ve Bi, 2007; Chen ve Thorner 2007).

Eşleşme feromonları (a faktör ve α faktör), a hücrenin α faktör reseptörü (STE2 tarafından kodlanan), ve α hücrenin a faktör reseptörü (STE3 tarafından kodlanan) tarafından algılanır. Her iki reseptörde heterotrimerik G proteinini alt birimleri aktive eder. Heterotrimerik G proteini plazma membranına bağlıdır. Heterotrimerik G proteini: α alt birim (Gpa1), β alt birim (Ste4) ve γ alt birim (Ste18) kompleksidir. GTP bağlı α altbirim $\beta\gamma$ alt biriminden ayrılır ve $\beta\gamma$ alt birimi MAPK (mitogen-aktivasyon protein kinase) kaskadının aktivasyonunu tetikler ve transkripsiyonel aktivasyon ve G1 tutuklanması ile sonuçlanır. Aynı zamanda feromon gradientine doğru polarize gelişimi başlatır. MAPK kinaz

kaskadı; Ste20 (PAK benzeri kinaz, MAPK kinaz kinaz), Ste5 (MAPK kinaz kaskadı için scaffold protein), Ste11 (MAPK kinaz kinaz), Ste7 (MAPK kinaz), Fus3 (MAP kinaz) ve Ste12 (transkripsiyon faktörü) içermektedir (Park ve Bi, 2007).

Aynı tomurcuklanma olayında olduğu gibi Cdc42 eşleşme uzantısı oluşumunda da aynı rolü oynar. Cdc42 polarize büyümeyi düzenlediği gibi MAPK (Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz) sinyal yolunu da düzenler (Park ve Bi, 2007; Chen ve Thorner 2007). Far1 eşleşme sırasında önemli rol oynar. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü Far1, G1 siklin Cdc28 protein kinazın inhibitörü olarak hücrenin G1 safhasında tutuklanmasına neden olur. Far1 adaptör rolü oynayarak polarite oluşturmak üzere G $\beta\gamma$ ve Cdc42 GEF'i olan Cdc24'yi bağlar. Haploid G1 hücrelerinde, Cdc24 Far1 ile birlikte nükleusta bulunur. Eşleşme feromonlarının yokluğunda Cdc28 G1 siklinler (Cln1 ve Cln2) ile kompleks oluşturur ve bu da tomurcuk oluşumunda Far1' i degradasyonunu tetikler. Far1' in degradasyonu sonucu uygun tomurcuk bölgesinde Cdc24 polarite kurulması için Rsr1 GTPaz ile interaksyona girer. Rsr1 aynı zamanda tomurcuklanma sırasında Cdc24' ü aktive eder. Feromonlara cevap olarak ise Cdc28-Cln kinazın inaktivasyonu Far1' in stabil kalmasına neden olur. Far1-Cdc24 kompleksi Msn5 yardımı ile nükleustan stoplazmaya taşınır. Bu şekilde Cdc24 plazma membranındaki reseptör bağlantılı heterotrimerik G protein aktivasyon bölgesine yönelir ve Cdc42'yi aktive eder. Cdc42 ve diğer polarite proteinleri eşleşme uzantılarının uç kısmında lokalize olurlar. Aktin kablolar ve yamalar da uca doğru yönelirler. Septinler eşleşme uzantılarının tabanında yamalar gibi lokalize olurlar (Park ve Bi, 2007; Chen ve Thorner 2007; Côte ve ark., 2007).

Cdc42 ve GEF' i Cdc24, MAPK aktivasyonu için gereklidir. Cdc42 PAK Ste20' yi aktive eder. Polarite proteini Bem1 aynı zamanda Ste5 ile interaksyona girer. Ste5 scaffold proteindir ve MAPK yolunun komponentleri ile ilişkilidir.



Bem1-Ste5 interaksiyonu ve Cdc42 ve Bem1 arasındaki interaksiyon MAPK sinyal yol izini teşvikler. Cdc42 aktive bir kez aktive olduğunda Ste20 Ste11' i fosforiller ve aktive eder. Ste20 direkt olarak G protein β altbirimi Ste4 ile interaksiyona girer ve MAPK kaskadının G proteine bağlantısını sağlar. Ste20 ve Ste4 arasındaki bu etkileşim MAPK aktivasyonu için gereklidir (Park ve Bi, 2007; Chen ve Thorner 2007; Côte ve ark., 2007).

Eşleşme uzantısı oluşturmak için Cdc24 ve Cdc42 aynı zamanda hücre füzyonu sırasında membran proteini Fus1' in hücre-hücre kontakt zonunda lokalize olmasını sağlar. Cdc42, Bni1 ve polarizom komponenti Spa2 ile birlikte Fus1 sekresyon veziküllerinin hücre-hücre kontakt zonuna taşınmasında görev yapar. Bu veziküller karşı eşleşme tipindeki hücrenin duvarını degrade etmek için ve eşleşmenin ardından duvar oluşumunda görev yapan enzimleri taşır. Fus1 tomurcuklanma sırasında kitin sentaz Chs3 içeren vezikülleri membrana taşıyan Chs5 proteini ile interaksiyona girer. Spa2 eşleşme sırasında hücre füzyon zonundaki veziküllerin gruplaşması için gereklidir. Sonuçta hücre füzyonuna neden olur. Cdc42 ve Bni1 aktin kabloların lokalizasyonundan sorumludur. Polarize aktin kablolar Chs5 ile birlikte Chs3 içeren veziküllerin hücre füzyon bölgesine taşınmasını sağlayan Myo2 miyozine rehberlik eder. Fus1 plasma membranına Chs5 ile işaretli veziküller ile iletilir. Cdc42 plasma membranında Fus1' i korur (Park ve Bi, 2007; Chen ve Thorner 2007).

1.3. Kötü Koşullara Cevap Olarak Filamentöz Gelişim

1.3.1. Filamentöz Gelişim Sırasında Cdc42' nin Regülasyonu

Haploid hücreler besin sınırlamasına cevap olarak agara penetre olurlar. Bu gelişme tipi invazif gelişme olarak bilinir. Azot açlığı üzerine diploid hücreler pseudohif olarak bilinen dimorfik geçiş sergilerler. Bu filamentöz gelişim fungusun besin bulmak için geliştirdiği bir yapıdır. Hücre azot açlığına maruz kaldığı zaman bazı hücrel değişiklikler meydana gelir.

Bunlar; tomurcuklanma deseninin bipolardan unipolara değişimi, G2 fazında gecikme ile birlikte hücre uzaması, hücre yüzeyindeki yeni adhezif moleküllerin ekspresyonu sonucunda üretilen hücrel komponentler arasındaki adezyon ve arkasından hücre duvarı ve septum oluşumunda görevli enzimlerin ekspresyonunun inhibisyonudur (Park ve Bi, 2007; Cullen ve Sprague, 2012).

Besinsel sinyal membranda bulunan 2 protein tarafından algılanır. Bunlar bir osmosensör olan Sho1 ve mucin ile ilgili glikoprotein olan Msb2' dir. Her iki proteinde filamentöz gelişimi regüle etmek için birbirleri ile etkileşiyorlar. Bu Sho1 ve Msb2 tarafından alınan besinsel sinyal Ras2 tarafından da algılanır. Ras2 (guanine nucleotide binding protein) büyümeyi ve açlık cevabını düzenler. Azot açlığı Ras2 tarafından algılanır ve Ras2 hücre yüzey glikoproteinini olan Flo11 (flocculin)' in 2 farklı yol izi ile ekspresyonunu kontrol eder. Pseudohifal gelişim, invazif gelişim, flokasyon, biofilm oluşumu için gerekli bir yüzey proteindir (Park ve Bi, 2007; Cullen ve Sprague, 2012).

1- cAMP-bağımlı PKA yol izi (cAMP-protein kinase A (PKA) pathway), 2- MAPK yol izi (Wu ve Jiang, 2005; Park ve Bi, 2007; Tiedje ve ark 2008).

1- cAMP-bağımlı PKA yol izi (cAMP-protein kinase A (PKA) pathway) Bu yol izi antagonistik etki gösteren transkripsiyonel faktörler olan Flo8 ve Sfl1' i regüle eder. Transkripsiyonel aktivatör Flo8' i aktive eder. Ve transkripsiyonel represör Sfl1' i inaktive eder. Her ikisi de Flo11' in ekspresyonuna neden olur.

2-MAPK yol izi Msb2 membran proteini Cdc42-GTP ile interaksiyonda olduğunda FG (filamentöz gelişim)-spesifik MAPK yol izinin aktivasyonunu tetikliyor. Scaffold protein olan Ste50, Ste11 ile bağlantılıdır. Bu bağlantı optimal invazif gelişim ve hiperosmotik stres sinyalleşmesi için gereklidir. Fakat feromon cevabı üzerine etkisi azdır. g, 2005; Park ve Bi, 2007; Tiedje ve ark 2008).



Ste50 aynı zamanda Cdc42' nin C-terminal ucundaki "RA" Ras association bölgesi ile de ilgilidir. Ve böylece Ste11'nin Cdc42' nin bulunduğu plazma membranına doğru çekilmesini sağlar. Ve Ste11' de Ste20 tarafından aktive olur (Wu ve Jiang, 2005; Park ve Bi, 2007; Tiedje ve ark 2008; Lin ve ark., 2012).

Bu FG-spesifik MAPK yol izinin aktivasyonu Flo11'in ekspresyonuna neden olur. Fakat MAPK Kss1 Dig1/Dig2' yi baskılar böylece Flo11 ekspresyonu aktive etmek için Ste12 ve Tec1'e izin verir. Bu şekilde filamentöz gelişim ile ilgilidir. PKA yol izi ayrıca tomurcuklanma desenini de etkilemektedir (Wu ve Jiang, 2005; Park ve Bi, 2007; Tiedje ve ark 2008).

Her iki yol izi de G2' de gecikme ve sonuç olarak ta hücre uzamasına neden olur. Tomurcuklanma ve eşleşmede olduğu gibi Cdc42 efektörleri yardımı ile polarize aktin organizasyonunu regüle eder ve elongat hücre büyümesine yol açar.

Azot açlığına cevap olarak Ras2, Sok2, Phd1 ve Swi5 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu negatif olarak regüle eder. Sok2

transkripsiyon faktör Phd1 ve Swi5' in ekspresyonunu negatif olarak regüle eder, bu da Flo11'in ekspresyonunu direkt olarak veya yavru hücre spesifik transkripsiyon faktör Ash1 aracılığı ile aktive eder. Fakat Sok2 Swi5 ve Ace2 transkripsiyon faktörleri repress eder. Normalde Swi5 endoglukonaz Egt2'nin sentezinden ve Ace2 endokitinaz Cts1'in ekspresyonunu aktive eder. Azot açlığında Sok2 Swi5 ve Ace2' yi repress ettiğinden Egt2 ve Cst1 sentezlenmiyor. Dolayısı ile bu enzimler sitokinez sonrası hücre bölünmesinden sorumlu ama sentez edilmedikleri için filamentöz gelişim sırasında hücreler birbirinden ayrılmayıp birbirine bağlı kalmaktadır (Park ve Bi, 2007; Weiss, 2012).

Bu derleme çalışmasında, mitotik hücre döngüsü sırasında ve eşleşme sırasında polarizasyonu düzenleyen anahtar sinyalleşme yol izleri açıklanmıştır. Yapılan çalışmalar, hücre polarite gelişiminde küçük GTPaz' ların merkezi rollerini ortaya çıkarmaktadır. Bu GTPaz' ların efektörleri ve düzenleyicileri ile moleküler etkileşim çoklu farklı sinyalleşme yol izleri ile ilgilidir.

Kaynaklar

- Arkowitz, R.A., Bassilana, M., *Polarized growth in fungi: Symmetry breaking and hyphal formation*, Seminars in Cell & Developmental Biology, 22 (8) 806–815 (2011).
- Brenwald P., Rossi G., *Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: Yeast as a model for animal cells*, FEBS Letters, 581: 2119–2124 (2007).
- Benli M., Yiğit N., *Lizozomal Organel: Maya Vakuollerinin Fonksiyonları*, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 02(09) 9-13 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040902.pdf (2004).
- Bing He, B., Wei G., *The exocyst complex in polarized exocytosis*, Current Opinion in Cell Biology, 21:537–542 (2009).
- Chen R.E., Thorner J., *Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast Saccharomyces cerevisiae*, Biochim Biophys Acta, 1773(8):1311-40 (2007).
- Côte P., Sulea T., Dignard D., Wu C., Whiteway M., *Evolutionary Reshaping of Fungal Mating Pathway Scaffold Proteins*, mBio, 2(1)1-10 (2011).
- Cullen P.J., Sprague G.F. Jr, *The Regulation of Filamentous Growth in Yeast*, Genetics, 190: 23–49 (2012).
- Goode B.L., Eskin J.A., Wendland B., *Actin and Endocytosis in Budding Yeast*, Genetics, 199: 315–358 (2015).
- Haber J.E., *Mating-Type Genes and MAT Switching in Saccharomyces cerevisiae*, Genetics, 191: 33–64 (2012).



- Harris S. D., Momany M., *Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm*, Fungal Genetics and Biology, 41: 391–400. (2004).
- Heinrich M., Köhler T., Möscher H., *Role of Cdc42-Cla4 Interaction in the Pheromone Response of Saccharomyces cerevisiae*, Eukaryotic Cell, 6(2) 317-327 (2007).
- Feyder S., Craene J.O., Bär S., Bertazzi D.L., Friant S., *Membrane Trafficking in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Model*, Int. J. Mol. Sci., 16: 1509-1525 (2015).
- Johnson J.M., Jin M., Lew D.J., *Symmetry breaking and the establishment of cell polarity in budding yeast*, Current Opinion in Genetics & Development, 21:740–746 (2011).
- Kang P.J., Hood-DeGrenier J.K., Park H.O., *Coupling of septins to the axial landmark by Bud4 in budding yeast*, Journal of Cell Science, 126: 1218–1226 (2012).
- Lin M., Li S.C., Kane P.M., Höfken T., *Regulation of vacuolar H⁺-ATPase activity by the Cdc42 effector Ste20 in Saccharomyces cerevisiae*, 11(4) 442-51. doi: 10.1128/EC.05286-11 (2012).
- Lipkin T.G.K., *Actin Cable Function and Regulation in the Budding Yeast, Saccharomyces cerevisiae*, Ph.D. Thesis, Columbia University Academic Commons, <http://hdl.handle.net/10022/AC:P:10388> (2011).
- Martin S., Chang F., *New End Take Off: Regulating Cell Polarity during the Fission*, Cell Cycle 4:8, 1046-1049 (2005).
- Momany M., *Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes*, Current Opinion in Microbiology, 5:580–585 (2002).
- Moseley J. B., Goode B.L., *The Yeast Actin Cytoskeleton: from Cellular Function to Biochemical Mechanism*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70(3) 605-645(2006).
- Orlando K., Suna X., Zhanga J., Lua T., Yokomizo L., Wang P., and Guo W., *Exo-endocytic trafficking and the septin-based diffusion barrier are required for the maintenance of Cdc42p polarization during budding yeast asymmetric growth*, Mol Biol Cell., 22(5) 624-33 (2011).
- Özgüneş N., *Hücredeki yoğun trafik: vezikülle taşıma*, Hacettepe Tıp Dergisi, 35:216-221 (2004).
- Park H.O., Bi E., *Central Roles of Small GTPases in the Development of Cell Polarity in Yeast and Beyond*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 71(1) 48-96 (2007).
- Roumanie O., Wu H., Molk J.N., Rossi G., Bloom K., Brennwald P., *Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex*, The Journal of Cell Biology, 170(4) 583–594 (2005).
- Sheu Y., Barral Y., Snyder M., *Polarized Growth Controls Cell Shape and Bipolar Bud Site Selection in Saccharomyces cerevisiae*, Mol Cell Biol., 20(14):5235-47 (2000).
- Smith G.R., Givan S.A., Cullen P., Sprague G.F., *GTPase-activating proteins for Cdc42*, Eukaryot Cell. 1(3) 469-80 (2002).
- Slaughter B.D., Smith S.E., Li R., *Symmetry Breaking in the Life Cycle of the Budding Yeast*, Cold Spring Harb Perspect Biol., 1(3) a003384. doi: 10.1101/cshperspect.a003384 (2009).
- Slaughter B.D., Smith S.E., Li R., Kang P.J., Hood-DeGrenier J.K., Park H., *Coupling of septins to the axial landmark by Bud4 in budding yeast*, Journal of Cell Science 126, 1218–1226 (2013).
- Taxis C., Maeder C., Reber S., Rathfelder, N., Miura K., Greger K., Stelzer E.H., Knop M., *Dynamic Organization of the Actin Cytoskeleton During Meiosis and Spore Formation in Budding Yeast*, Traffic, 6(7) 1628–1642 (2006).
- Wloka C., Vallen E.A., Thé L., Fang X., Oh Y., Erfei B., *Immobile myosin-II plays a scaffolding role during cytokinesis in budding yeast*, J. Cell Biol., 200(3) 271–286 (2013).
- Tiedje C., Sakwa I., Just U., Hofken, T., *The Rho GDI Rdi1 Regulates Rho GTPases by Distinct Mechanisms*, Molecular Biology of the Cell, 19: 2885–2896 (2008).
- Weiss E.L., *Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells*, Genetics, 192: 1165–1202 (2012).



Wu X., Jiang Y.J., *Possible integration of upstream signals at Cdc42 in filamentous differentiation of S. cerevisiae*, *Yeast*, 22: 1069–1077 (2005).

Yoshida S., Pellman D., *Plugging the GAP between cell polarity and cell cycle*, *EMBO reports*, 9:39–41. doi:10.1038/sj.embor.7401142 (2008).