

Maya Hücre Duvar Yapısının Dinamikleri

Nazife Yiğit¹, Mehlika Benli²

Giriş

Hücre duvarı maya hücrelerinin plazma membranını dıştan saran yaklaşık 100- 200nm kalınlığında bir örtüdür. Bu örtü hücre kuru ağırlığının %15- 30'ini oluşturmaktadır. Büyük çoğunluğu polisakkaritlerdir (%80- 90) olup, bunlar mannanlar ve glukanlardır. Kuru ağırlığın en küçük yüzdesini ise kitin oluşturmaktadır. Hücre duvar yapısının diğer komponentleri ise proteinler, lipitler ve inorganik fosfattır.

Maya hücre duvarı hücre morfolojisini korumak, hücreyi desteklemek, savunmak için gereklidir. Duvar sayesinde dış ortamda meydana gelen ozmotik değişikliklerden hücre korunur. Geçirgen bir bariyer olan hücre duvarı, hücre içi madde geçirgenliğini de ayarlamakta ve hücrenin bir araya gelerek yığın oluşturması (flokkulasyon), seksüel aglutinasyon gibi yapısal olaylarda hücre-hücre etkileşimlerinde baş rol oynamaktadır.

Maya Hücre duvarı, elastik bir yapıya sahiptir. Fizyolojik ve ozmotik yolla gelen zararlardan korunmayı, aynı zamanda hücre şeklinin belirlenmesini sağlamaktadır. Hücre duvarının iç tabakası büyük ölçüde duvarın mekanik kuvvetliliğinden sorumludur ve aynı zamanda duvarın en dış tabakasını oluşturan proteinler için bir tutunma bölgesidir. Bu proteinler arasında seksüel aglutininler ve flokkulinler de yer almaktadır. En dış protein tabakası aynı zamanda hücre duvarının geçirgenliğini de sınırlamaktadır. Böylece hücre duvarı, membran bozucu bileşikler ve yabancı enzimlere karşı hücre membranını koruyucu bir kılıf görevini üstlenir. Maya hücre duvarının moleküler organizasyonu genel olarak bilinmektedir. Fakat organizasyon ve moleküler kompozisyonu çevre şartlarına bağlı olarak değişebilmektedir. Dış etkilerle protein-polisakkarit kompleksinin oluşumu ve düzeni farklılaşmaktadır (1).

Sert, eğilip bükülmez bu yapı, moleküler seviyede kolayca anlaşılır statik ve çok dinamik bir yapıya sahiptir. Maya hücre duvarları, gelişme sırasında yeni materyallere ihtiyaç duymakta ve hücre büyüklükleri artmaktadır. Hücre birleşmesi (Kavuşma), sporülizasyon, pseudohifsel gelişme veya tomurcuklanma gibi morfojenetik değişimlere ayak uydurmak zorundadır. Bu modifikasyonlarda yalnızca nicel değil nitel

¹ Dr., Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 71450 Yahşihan / Kırıkkale

² Dr., Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 06100 Beşevler / Ankara. Yazışmadan sorumlu yazarın e-mail adresi: benli@science.ankara.edu.tr

modifikasyonlara da gerek duyulmaktadır. Bunlardan başka hücre duvar kompozisyonu farklı çevre koşullarında farklılıklar göstermektedir (2).

Genel hatlarıyla bilinen kimyasal kompozisyonda maya hücre duvarı glukanlar, mannopteinler ve kitinden oluşmaktadır. Duvar yapısında majör komponent β - Glukandır (β -Glukanlar β 1,3 Glukan veya β 1,6 Glukan olarak veya her ikisi birden bulunmaktadır). Hücre duvarının dayanıklılığını glukanlar sağlarlar ve mikrofibriler yapıda şekillenmişlerdir. Hücre duvarı β 1,3 Glukan ve kitin tabası halindedir. Bu tabakanın dış yüzeyine mannopteinler yapışmıştır. Mannoproteinler hücre geçirgenliğinde önemlidir fakat aglutininler ve flokkulinler gibi davranarak yapısal proteinler olarak görev yapabilirler. Kitin N- Asetilglukozamin'in bir polimeridir ve maya hücre duvarlarının yalnızca %2-4 kadarını oluşturur. Genellikle kitin mayalarda tomurcuklanma izi çevresinde lokalize olmaktadır. Bazı pseudohifsel gelişim gösteren mayalarda *Candida albicans* gibi hücre duvar muhtevasında kitin miktarı fazladır. Bazı maya türlerinde de kitin bulunmamaktadır (2, 3).

Hücre duvarında varlığı düşünülen enzimler ve yapısal proteinlerin lokalizasyonu ile ilgili çalışmalar, büyük ölçüde hücre duvarıyla ilişkili fonksiyonların önceden tahmin edilmesini sağlayacaktır. Maya genom analizi, hücre duvarı ile ilişkili fenotipler için mutant koleksiyonların büyük ölçüde taranması, ekspresyon profil analizi ve proteomiks çıkarılması gibi çalışmalar sonucu maya hücre duvar biyosentezinden sorumlu genlerin keşfedilmesi sağlanacaktır. Bu genlerin tanımlanması yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi ve yeni hedeflerin bulunmasına izin verebilecektir (2).

Hücre Duvar Mimarisi

Hücre Duvar Özellikleri ve Kompozisyonu

Hücre duvarı fiziksel Koruma ve ozmotik destek sağlayan güçlü bir yapıdadır. Negatif boyama teknikleri ile hücre duvarının elektron mikroskopik analizi sonucunda hücrenin gelişme durumu ve genetik özelliklerine bağlı olarak yaklaşık 70- 100 nm kalınlığında elektron- şeffaf içsel bir tabaka ve elektron- yoğun dışsal tabaka olmak üzere iki tabakalı bir yapıda olduğu gözlenmiştir. Mayalanma sürecinde elektron- şeffaf iç tabakanın kalınlığı 200nm' ye kadar çıkmaktadır.

Hücre duvarının mekanik sağlamlığı esas olarak iç tabaka ile sağlanmaktadır. Bu iç tabaka ise Kitin ve β 1,3 Glukan'dan oluşmakta ve kuru ağırlığın yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (Tablo 1).

Hücre yüzeyinden glikolize edilmiş mannopteinlerden oluşan dış tabaka hücre – hücre tanıma olayından sorumludur. Aynı zamanda bu tabaka bitki hücre duvarlarında olduğu gibi hücre duvarını parçalayan enzimlere ve bazı yabancı enzimlere karşı plazma membranını koruyarak, duvarın iç yüzeyine ulaşmasına engel olurlar.

Tablo 1. *Saccharomyces cereviae* 'da hücre duvar makromolekülleri, kuru ağırlık yüzdeleri ve bu makromoleküllerin sentez bölgeleri

Makromoleküller	Kuru Ağırlık (%)	Sentez Bölgesi
Mannoproteinler	35 - 40	Salgı yolu
β 1,6 Glukan	5 -10	Plazma membranı
β 1,3 Glukan	50 - 55	Plazma membranı
Kitin	1 - 2	Plazma membranı

Hücre yüzey proteinlerinin karbohidrat yan zincirleri çok sayıda fosfodiester köprüleri içerir, bu da fizyolojik pH değerinde etkilidir ve hücre yüzeyinde negatif yüklerin artmasına neden olur. Bu yan zincirler aynı zamanda duvarın hidrofilik özellik kazanmasından sorumludur. Su tutucu özelliği dolayısı ile hücrenin kuraklıktan korunmasını sağlar.

En dışta bulunan protein tabakası hücre duvarı kuru ağırlığının üçte birini oluşturmaktadır. Hücre duvar proteinleri β 1,3 Glukan – kitin ağına ya dolaylı olarak bir β 1,6 Glukan kısmıyla yada doğrudan kovalent bağlarla bağlanır.

Hücre duvarı oldukça elastik yapıdadır. Maya hücreleri hipertonic solüsyona atıldığında, büzülür ve ozmotik strese bağlı olarak başlangıç hacimlerinin % 60'ından fazlasını kaybederler. Bu geri dönüşümlü bir olaydır. Tekrar orijinal ortamlarına atıldıklarında eski hacimlerine dönerler. Duvarın elastikiyet kabiliyeti diğer canlı hücrelerin duvarlarından daha fazla geçirgen olması ile açıklanmaktadır (1).

Yapılan çalışmalarda değişken olabilen hücre duvarı mimarisi çıkarıldığında, çözünür olmayan β 1,3 Glukan fiberlerin bütün hücre yüzeyini sardığı, bunlara kovalent bağlarla kitinin bağlanması sonucu duvarın iç kısmının inşa edildiği görülmektedir. Duvarın dış kısmı ise mannoproteinler ile çevrelenmiştir (Mannoproteinler hücre duvar proteinleri olarak isimlendirilmekte ve CWP's kısıltması ile ifade edilmektedir.) Kovalent bağlarla bağlanan makromoleküller iki esas bloğa ayrılmaktadır. Bunlardan birinci blokta sırasıyla kitin - β 1,3 Glukan - β 1,6 Glukan ve ona bağlı bir glikozil fosfatidil inositol türevi içeren GPI – CWP bulunmaktadır. İkinci blokta ise hücre duvar proteinleri doğrudan β 1,3 Glukana bağlanmakta sırasıyla kitin - β 1,3 Glukan – Pir-CWP kompleksini oluşturmaktadır. Bu GPI- CWP ve Pir-CWP blokları hücre duvarının yapısal birimlerini oluşturur ve Esnek çimento blokları gibi iş yaparlar. Hücre duvar yapısının istenen esnekliği kazandıran bu modüler model ile mayaların hayatları boyunca hücre duvarlarında gerçekleşecek modifikasyonları güzel bir biçimde açıklamaktadır.

Periplazmik olarak tarif edilen mannoproteinler yalnızca hücre duvarına tutunur ve çözünür durumda kalır. Genel olarak gelişme ortamına salınan bu proteinler kompleks muamelelere gerek kalmadan basit olarak parçalanmakta ve çözünebilmektedir.

Kitin ve β 1,3 Glukan, ilgili enzimler (sintazlar) kullanılarak plazma membranında sentezlenirler. Bu enzimler integral membran proteinleridir, kitin ve β 1,3 Glukan gibi

polimerlerin vektörel sentezini katalize etmektedirler. β 1,6 Glukan biyosentez yolu Endoplazmik Retikulum' da sentezin başladığı, Golgi aygıtında devam ettiği ve hücre yüzeyinde tamamlandığı düşünülmektedir. Son zamanlarda bu polimerlerin büyük bir kısmının hücre yüzeyinde sentezlenebileceği ileri sürülmektedir. Mannoproteinler hücre içinde sentezlenir, salgılama yolu boyunca proteolisiz ve / veya glikozilasyon gibi post-tranlasyonel modifikasyonlara tabi tutulur. Son olarak Hücre yüzeyinde farklı bölgelere hedeflendirilirler.

Yukarıda tanımlanan modüler modele göre farklı polisakkaritler ve mannoproteinler çimento blokları oluşturmak için farklı glikozik bağlantılarla plazma membranının dış kısmına içten bağlı hale gelirler. Bu olay olgun hücre duvar matriksini oluşturmak için sıra ile çapraz bağlantılarla gerçekleşir. Bakteriyal peptidoglikan sentezinde Penisilin Bağlama Proteinleri (PBPs) ile katalizlenen transpeptidasyona benzer. Fungal hücre duvar sentezinin son adımları hücre yüzeyinde gerçekleşir. Plazma membranının yüzeyinde veya hücre duvarının kendi içinde yerleşmiş olan özel çapraz bağlama enzimleri ile dışarı taşınırlar. Antifungal muamelede yoğun olarak kullanımı söz konusu olabilecek bu enzimlerin tanımlanması funguslarla mücadelede oldukça önemli bir konudur (2).

Hücre duvarı çapraz bağlama aktivitesi ile ilgili olabileceği tahmin edilen birkaç mannoprotein *S. cerevisiae* 'da tanımlanmıştır. Bunların isimleri: Bgl2 (4), Gas1 (5), Crh1 ve Chr2'dir (6). Ancak hücre duvarı oluşumu ve yeniden düzenlenmesinden sorumlu olan proteinlerin birçoğu henüz bilinmemektedir.

β 1,3 Glukan Ağı

Hücre duvarının mekanik gücü ve dayanıklılığı yapılarında var olan β 1,3 Glukan' a bağlıdır. Anilin mavisi ile boyanabilen β 1,3 Glukan çukur heliks ailesi (Hollow helix family) olarak adlandırılan gruba dahildir. Diğer bir deyişle β 1,3 Glukan zincirleri genişleyebilen esnek yaylı bir tele benzemektedir. Bu özelliği hücre duvarının elastikiyetini açıklamaktadır. β 1,3 Glukan, helikal yapıya sahiptir ve yalnızca lateral duvarlarda çok az kristalize olabilir. Hücrenin durağan fazlarında β 1,3 Glukan molekülü yaklaşık 1500 glukoz monomerden oluşmaktadır. Bu molekülün polimerizasyon derecesi çevresel durumlara bağlıdır. Maya gelişme fazına ve karbon kaynağına bağlı olarak iki β 1,3 Glukan Sintaz kompleksi kullanmaktadır. Maya ergin hale geldiğinde, hücre durağan faza girdiğinde β 1,3 Glukan zincirleri kısmi olarak dallanır ve yaklaşık %3-4 β 1,6 – bağı ile bağlanmış glukoz kökü içermektedir. β 1,3 Glukanın dallanma derecesi aynı zamanda mayanın gelişme durumuna bağlıdır.

Dayanıklı uzun aralıksız zincirlerden oluşan segmentlerin varlığı zincir içi etkileşiminin kararlılığını sağlamaktadır. Böylece üç boyutlu ağ sisteminin oluşumuna izin verilmektedir. Bunlara uyumlu olarak, izole edilmiş duvarların negatif boyama ile yapılan elektron mikroskop çalışmalarında, yaklaşık 20 – 60 nm genişliğine sahip ince ağ yapılı eleklerden oluştuğu saptanmıştır (1).

Lateral Duvarların Asıl Parçası: Kitin

Maya hücre duvar yapısında kitinin lineer (doğrusal) zincirler şeklinde oluştuğuna inanılmaktadır. Lateral duvarlarda ve tomurcuklanma izi etrafında düzgün bir şekilde yerleşmiştir. Tomurcuk izi bölgesinde izole edilen kitin yaklaşık 190 N- Asetilglukozamin monomerinden oluşmaktadır. Fakat lateral duvarlarda kitinin ne miktarda olduğu bilinmemektedir.

Kitin analizlerinde fluoresan boya olan Kalkoflour beyazı kullanılmakta ve kitini görünür hale getirmektedir. Bu metot ile *S. cerevisiae* 'nın kitin analizleri yapılabilmektedir(1).

S. cerevisiae 'da kitin sentezi üç sentetaz ile sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Normal şartlar altında lateral duvarlarda kitin düşük seviyelerde bulunur. Tomurcuk izi çevresinde % 1-2, bunun dışındaki bölgelerde % 0,1-0,2 seviyelerindedir. Genetik olarak zayıf hücre duvar yapısına sahip hücrelerde anormal şartlar altında kitin sentezi, kurtarma mekanizmasının bir parçası olarak aktive edilmekte ve hücrenin lateral duvarında kuru ağırlığın % 20'sine kadar çıkabilmektedir.

Kitin sentezinden sorumlu olan sentetaz enzimi CHS3 geni tarafından kodlanan bir multi-membran proteindir. Katalitik bölgesi plazma membranının sitozolik bölgesindedir (1).

Kitinin maya hücrelerinin tomurcuklanarak bölünmesinde önemli rolü vardır. Ana maya hücresi ile yavru hücre kitinden oluşan bölme ile birbirinden ayrılmaktadır. Kitin sentez mekanizması antifungal uygulamalar için hedef durumundadır. Fakat inhibisyonun nasıl gerçekleştirilebileceği henüz tam olarak açıklanamamaktadır (7).

β 1,6 – Glukan

1,6 – Glukan olgun halde oldukça fazla dallanmış yaklaşık 130 glukoz monomerinden oluşmaktadır. Suda çözünebilir bir polimerdir. 1,6–Glukan, glukan ağ sistemine, 1,3–Glukana bağlanarak dahil olmaktadır. Bu bağlanma da ancak Glikozil Fosfatidil İnositol (GPI) 'ün varlığında gerçekleşmektedir. Bu şekilde hücre duvarı ağ sisteminde GPI → 1,6–Glukan → 1,3– Glukan kompleksi oluşturmaktadır. Aynı zamanda 1,6–Glukan, stres anında kitin bağlayıcı olarak görev yapmaktadır. 1,6–Glukan biyosentezi endoplazmik retikulumda başlayan ve plazma membranında gerçekleşen basamaklı bir işlem olarak tarif edilmekte fakat tam açıklanamamaktadır (1, 8).

Hücre Duvar Proteinleri (CWP's)

En dış hücre duvar tabakasını mannoproteinler oluşturmaktadır Bu proteinlerin % 90'ı karbohidrat fraksiyonları ile glikozilleştirilmiştir. Dış tabakayı oluşturan mannoprotein tabakası daha içte bulunan fibriler tabakadan daha az geçirgendir. Az geçirgenlik

özelliği, Asparajin köklerine ve disülfid köprülerinin varlığına, yüksek derecede dallanmış ve uzun karbohidrat yan zincirlerine bağlı olarak gerçekleşmektedir.

Maya hücre yüzeyi çok sayıda negatif yük içermektedir, bunun sebebi ise N- ve O- bağlı mannozil yan zincirlerinde bulunan fosfodiester köprüleridir(1).

Hücre duvar organizasyonunda polisakkaritler merkezi rol oynamaktadır.Mümkün olan sentez mekanizmalarında hücre duvarında bulunan polisakkaritlere proteinler bağlanmakta ve fizyolojik öneme sahip bağlar kurulmaktadır (9). Hücre duvar polisakkaritlerine kovalent olarak bağlanan proteinlerin iki ana sınıfı vardır:

GPI – bağımlı hücre duvar proteinleri (GPI – CWPs): Bu proteinler dolaylı olarak 1,3– Glukan'a bağlan proteinlerdir. Bu proteinler önce 1,6 – Glukan'a bağlanır ondan sonra 1,3 – Glukan'a bağlanırlar. Bu bağlanma işi için de, GPI ye ihtiyaç duyarlar. Örneğin: *S. cerevisiae* 'da çalışılmış GPI- CWP proteini Sag 1'dir ve seksüel aglutinasyondan sorumludur (1, 10).

Pir proteinleri (Pir- CWPs): Bu proteinler doğrudan 1,3 – Glukan'a bağlanabilirler. *S. cerevisiae* 'da bu tarz çalışan dört protein ayırt edilmiştir. Bunlar Pir 1, Pir 2 / Hsp 150, Pir 3 ve Pir 4 / Cis 3 'dür, bu proteinler immünolojik görevler üstlenmişlerdir.

Hücre duvar proteinleri çeşitli fonksiyonlara sahiptir: Hücre duvar geçirgenliği, su tutumu, adezyon, seksüel aglutinasyon, flokkulasyon, pseudohifsel gelişim gibi olaylardan sorumludur. Hücre bölünmesi sırasında duvar glukanlarının yeniden oluşumu, bölünme ve hücre duvarının güçlenmesi de yine hücre duvar proteinleri tarafından sağlanmaktadır. Yine hücre gelişim fazları olan sporülasyon, duraklama veya anaerobik gelişme gibi fazları kontrol eden, ayrıca hücreye demir alımı gibi metabolizma olaylarını koordine eden hücre duvar proteinleridir (1).

Saccharomyces cerevisiae 'nın hücre duvarında bulunan karbohidratların analizi, N-asetilglukozamin, mannoz ve glukoz içerdiğini ortaya koymuştur (11).

Bu güne kadar maya hücre duvarları çevresel faktörlere bağlı kompozisyonlarında sınırlı değişiklikler yapan son derece kararlı yapılar olarak biliniyordu. Son yıllarda özellikle *S. cerevisiae* üzerinde yapılan moleküler çalışmalar, gelişim evrelerine ve çevresel faktörlere bağlı olarak hücre duvar yapılarında büyük değişikliklerin olduğunu ve sanıldığıının aksine son derece dinamik yapılar sergilediği ortaya konulmuştur. Ancak dinamizmin nasıl olduğu ve düzenlemenin nasıl yapılabildiği henüz tam olarak açıklanamamaktadır. Özellikle çoklu stres altında hücre duvarının kendiliğinden verdiği cevap araştırılmaya değer bir konudur. Daha önce de bahsedildiği gibi mayaların ve hifsel gelişim gösteren fungusların hücre duvar yapısının ve biyosentezinin tam olarak ortaya konulması, yeni antifungal bileşiklerin geliştirilmesi için cazip bir hedef durumundadır (2, 12).

Kaynaklar

1. Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S., 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, 26(3):239-256.
2. Molina M., Gil C., Pla J., Arroyo J., Nombela C., 2000. Protein localization approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. Microscopy Research and Technique, 51: 601-612.
3. http://www.google.com.tr/search?q=cache:zk3qinWBVzoJ:biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/02_Cellfunction.htm+%22+yeast+cell+wall+%22&hl=tr
4. Goldman R.C., Sullivan P.A., Zakula D., Capobianco J.O., 1995. Kinetics of beta- β 1,3 Glukan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the BGL2 gene. Eur. J. Bio-Chem., 227: 372378.
5. Popolo L., Vai M., 1999. The Gas1 glycoprotein, a putative wall polmer cross- linker. Biochim. Biophys. Acta., 1426: 385 – 400.
6. Rodriguez- Pena J.M., Arroyo J., Nombela C., 2000. A novel family of cell wall related proteins regulated differently during the yeast life cycle. Mol. Cell Biol 20: 3245- 3255.
7. <http://www.google.com.tr/search?q=cache:oxoFsW7d358J:www.dmu.edu/bn/yeastcellwall.htm+%22research+objective:+the+synthesis+of+the+yeast+cell+wall%22&hl=tr>
8. Montijn, R.C., Vink, E., Muller, W.H., Verkleij, A.J., Van Den Ende, H., Henrissat, B., Klis, F.M., 1999. Localization of synthesis of beta 1,6 glukan in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol., 181:7414- 7420.
9. Kollàr, R., Reinhold, B.B., Petràkovà, E., Yeh H.J.C., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., Cabib, E., 1997. Architecture of the yeast cell wall. Biochem. and Molec. Biol., 272(28):17762-17775.
10. Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J.E., Shimoj, H., Lipke, P.N., Klis, F.M. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. Glycobiology, 6: 337-345.
11. Montijn, R.C., Van Rinsum, J., Van Schagen, F.A., Klis, F.M., 1994. Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. J. Biol. Chem., 269(30): 19338-19342.
12. Pèrez, P., Ribas, J.C., 2004. Cell wall analysis. Methods, 33(3):245-251.