

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavla Luxová

Ustavení a změny polarity v průběhu buněčného cyklu

Saccharomyces cerevisiae

Cell polarity establishment and changes during

Saccharomyces cerevisiae cell cycle

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Ivana Malcová, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2011

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména své školitelce RNDr. Ivaně Malcové, CSc., především za cenné rady, které mi udělovala během konzultací, časovou vstřícnost, trpělivost a přátelský přístup.

Další mé poděkování patří rodičům, za vytvoření příjemného pracovního prostředí, a také přátelům, jmenovitě Kateřině Vokáلكové za jazykovou korekturu.

Abstrakt

Buněčnou polaritu lze definovat jako asymetrickou organizaci a distribuci biomolekul, buněčných organel a struktur, která je důležitá pro řadu buněčných procesů a její vytvoření je esenciální pro zdravý vývoj všech organismů. Tato práce se zaměřuje na hlavní mechanismy založení buněčné polarity, jejího udržení a změn v průběhu buněčného cyklu u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, která je jedním z preferovaných modelových organismů. Pro přesnou determinaci místa, kde následně vznikne nová buňka, jsou určujícím prvkem prostorové značky nahromaděné v místě předchozího dělení. K jejich rozpoznání jsou zapotřebí Rho GTPázy, které působí na své efektory a tím ovlivňují aktinový cytoskelet a septiny. Tyto struktury jsou nezbytné pro polarizovaný růst pupene. Růst a vývoj pupene je provázaný a regulovaný spolu s buněčným cyklem, na jehož konci se pupen oddělí, čímž vznikne nová buňka. Proces zrodu nové, mladé buňky, která je schopná projít mnohem větším počtem dělení než zbývají její matce, je novou výzvou ke studiu polarity z hlediska stárnutí buněk.

Abstract

Cell polarity can be defined as an asymmetric organization and distribution of biomolecules, cellular organelles and structures which are important for many cellular processes. Cell polarity establishment is essential for the proper development of all organisms. This work focuses on main mechanisms of cell polarity establishment, its maintenance and changes during *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. Budding yeast is one of the preferred model organism. Bud site selection is determined by the spatial landmarks which are accumulated at the previous division site. The spatial landmarks are recognized by Rho GTPases which act on their effectors and thus affect the actin cytoskeleton and septins. These structures are essential for polarized bud growth that is coordinated with the cell cycle. Newborn cells arising after the bud separation from the mother cell at the end of each cycle are able to undergo many more division cycles than their mothers what is a new challenge to study cell polarity in terms of cell aging.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract	5
Obsah	6
Klíčová slova a použité zkratky	7
Úvod.....	8
1 Buněčný cyklus a jeho regulace	9
2 Typy pučení.....	11
3 Ustavení polarity.....	12
3.1 Prostorové značky.....	12
3.2 Modul Bud1.....	13
3.3 Aktivace Cdc42 a polarizace aktinu	14
4 Změna polarity na konci buněčného cyklu	18
4.1 Cytokineze a separace buněk	19
Závěr.....	21
Použitá literatura.....	22

Klíčová slova a použité zkratky

Klíčová slova

polarita buňky, pupen, aktin, septiny, cdc42, cytokineze, dceřiná buňka

Zkratky

AMR (*actomyosin ring*) = aktinomyosinový prstenec

CDK (*cyclin-dependent kinase*) = cyklin dependentní kináza

CLB (*B-type cyclin*) = cyklin typu B

CLN (*cyclin*) = cyklin typu A

ERC (*extrachromosomal ribosomal DNA circles*) = kruhové ribosomální DNA

GAP (*GTPase - activating protein*) = protein aktivující GTPázu

GEF (*guanine-nucleotide-exchange factor*) = výměnný faktor

GTP (*guanosine triphosphate*) = guanosintrifosfát

MEN (*mitotic exit network*) = síť mitotického výstupu

RAM (*regulation of Ace2 activity and cellular morphogenesis*) = síť proteinů regulující aktivitu Ace2

SPB (*spindle pole body*) = jaderný plak

Úvod

Buněčnou polaritu lze definovat jako asymetrickou organizaci a distribuci biomolekul, buněčných organel a struktur. Vytvoření buněčné polariry je esenciální pro řadu dějů odehrávajících se v jednobuněčných i mnohobuněčných organismech. Buňky svými polarizovanými ději, které zahrnují ustavení osy polariry, signální dráhy různých GTPáz, změny v cytoskeletu včetně exocytózy a endocytické recyklace, odpovídají na vnější i vnitřní signály.

Pro studium buněčné polariry je často používaným modelovým organismem kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Tento jednobuněčný, eukaryotický mikroorganismus s vysokou rychlostí množení může existovat i v haploidní formě, což je výhodné pro sledování vlivu mutací v jednotlivých genech. Hlavními přednostmi *S. cerevisiae* je kompletně osekvenovaný genom a nemalé množství velmi účinných technik pro manipulaci s ním, jakož i existence mnoha kolekcí mutantů a velké množství dat z analýz různých procesů na celogenomové úrovni. Jelikož lze většinu morfologických znaků buněčného cyklu u *S. cerevisiae* pozorovat optickým mikroskopem (čehož bylo využito i při studiu mutantů buněčného cyklu nositelem Nobelovy ceny L. Hartwellem), je výhodou i existence nástrojů pro pozorování lokalizace proteinů v živé buňce, včetně kolekce kmenů s fluorescenčně značenými proteiny.

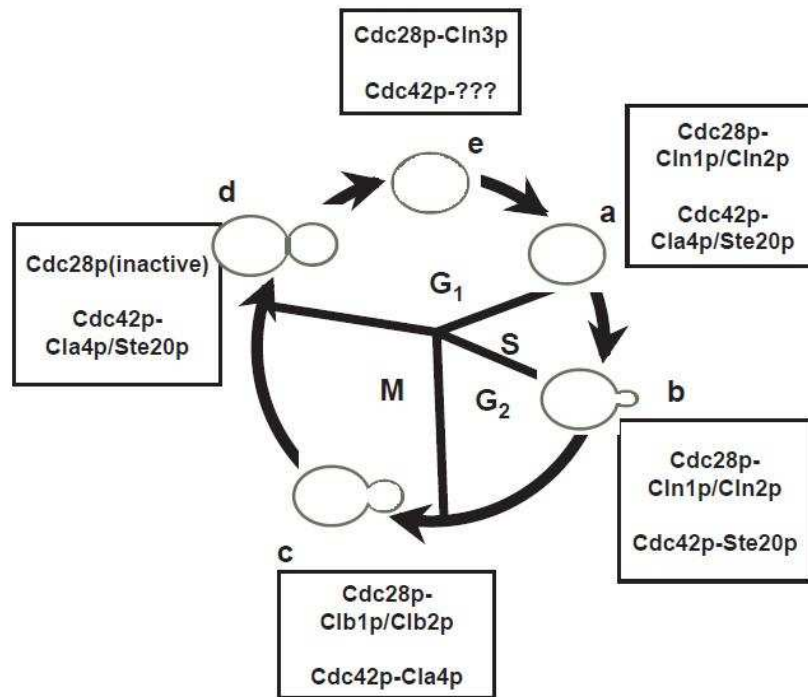
Tato práce se snaží podat přehlednou informaci o ustavení a změnách polariry v průběhu buněčného cyklu kvasinky *S. cerevisiae*. V první kapitole je pro upřesnění časoprostorové orientace dějů popsán buněčný cyklus s kontrolními body a nastíněn způsob jeho regulace. Jelikož může *S. cerevisiae* existovat v haploidní i diploidní formě, jsou v následující kapitole uvedeny rozdíly v pučení u obou forem, které se odrážejí i v určení polaritní osy. Problematika vytvoření a udržení polariry, s níž souvisí i vznik nové buňky, je detailně probrána ve třetí kapitole. Na konci cyklu dochází k přesměrování polariry do místa, kde proběhne oddělení buněk. Tyto procesy zahrnuje čtvrtá, závěrečná kapitola. Některé děje nemohou být do detailů popsány vzhledem k jejich obsáhlosti. Je ale nutné je uvést alespoň stručně pro srozumitelnost dále uváděných informací, i když by mohly být námětem celé další práce. Také z tohoto důvodu jsou mechanismy a signální dráhy týkající se buněčné polariry popsány pouze pro haploidní buňky kvasinky *S. cerevisiae*.

1 Buněčný cyklus a jeho regulace

Buněčný cyklus je sled událostí, jehož výsledkem je vytvoření nové buňky. Doba buněčného cyklu zahrnuje období od vzniku buňky do jejího rozdělení, takže během jednoho cyklu dojde ke vzniku jedné mateřské a jedné nové buňky – dceřiné. Buněčný cyklus se skládá ze čtyř fází následujících za sebou v pořadí G1, S („*synthesis*“), G2 a M („*mitosis*“) fáze (viz. **Obr. 1**). Dané fáze netrvají stejně dlouho a jejich délka se liší v závislosti na organismu, ve kterém buněčný cyklus probíhá.

Správnost průběhu buněčného cyklu, tedy i růstu buňky, je ověřována dvěma morfologickými kontrolními body („*checkpointy*“). Při nesplnění jejich podmínek se růst zastaví, dokud nedojde k opravě chyby. První „*checkpoint*“, známý jako START, se objevuje na konci G1 fáze předešlého cyklu a kontroluje velikost buňky i příhodnost vnějších podmínek, což zaručí správně načasovaný vstup do nového cyklu. Druhá kontrola následuje před zahájením mitózy, kdy musí mít buňka správně navázané chromozomy na mikrotubuly dělicího vřeténka (Putnam et al., 2009).

Události definující jednotlivé fáze cyklu řídí klíčové komplexy, složené z cyklin dependentní kinázy (CDK) a cyklinů. Komplexů různých cyklin-CDK je u evolučně vyspělejších organismů více, neboť zastávají v buňce i jiné funkce (Wittenberg, 2005). U kvasinky *S. cerevisiae* hraje klíčovou roli pouze jediná cyklin dependentní kináza Cdc28 (u eukaryot označována jako Cdk1), jejíž aktivita je nutná nejen pro správné načasování iniciace pupene, replikace DNA, formace mitotického vřeténka, rozdělení chromozomů, buněčné morfogeneze, ale i pro další události (Enserink and Kolodner, 2010; Küntzel et al., 1996; Mendenhall and Hodge, 1998). V *S. cerevisiae* rozlišujeme dva typy cyklinů, typ A a B, lišící se syntézou a aktivací v průběhu cyklu (viz. **Obr. 1**). Skupina cyklinů typu A zahrnuje tři geny *CLN1*, *CLN2* a *CLN3* kódující příslušné cykliny (Wittenberg, 2005). Jejich syntéza je načasovaná na G1 fázi a asociace s Cdc28 je vyžadována pro průchod STARTem (Kilmartin and Adams, 1984). Skupinu B cyklinů kóduje šest genů: *CLB1*, *CLB2*, *CLB3*, *CLB4*, *CLB5* a *CLB6* (Wittenberg, 2005), přičemž aktivita Clb5 a Clb6 je vyžadována v S fázi; Clb3 a Clb4 na přechodu S a G2 fázi a při mitóze jsou přítomné Clb1 a Clb2 (McInerney, 2011).

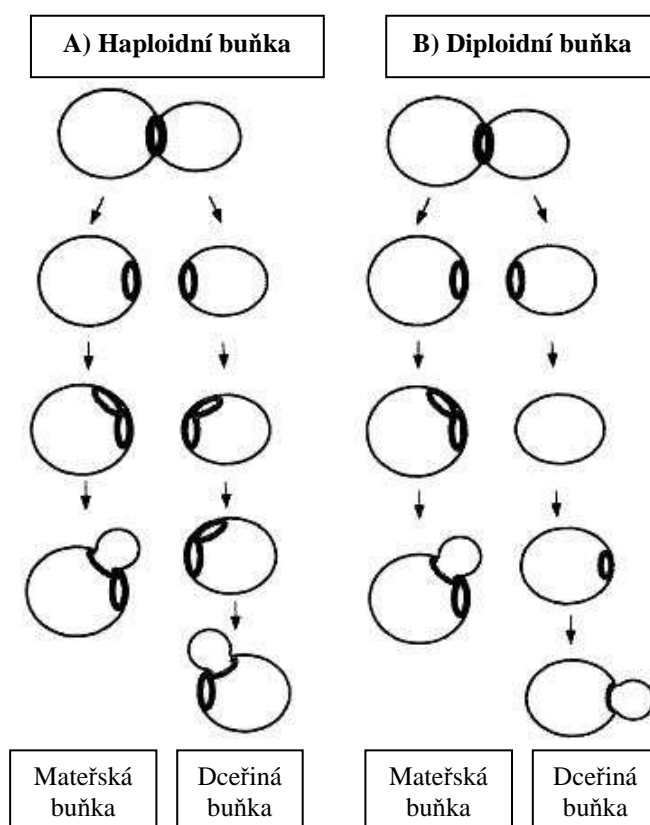


Obr. 1: *Buněčný cyklus.* Na obrázku jsou znázorněny fáze buněčného cyklu (G₁, S, G₂, M) a morfologické změny růstu pupene během něj. V rámečcích jsou vypsány proteinové komplexy a proteiny důležité pro určité fáze buněčného cyklu. Převzato z (Pruyne and Bertscher, 2000a) a upraveno.

2 Typy pučení

Buňky *S. cerevisiae* se rozmnožují především nepohlavním způsobem, tzv. pučením, při kterém se na mateřské buňce vytváří pupen, jenž je základem dceřiné buňky. Pupen prochází buněčným cyklem, během něhož roste a získává vlastní buněčné organely i genetický materiál. Na konci buněčného cyklu dojde k separaci pupene od mateřské buňky.

Existují dva typy pučení: axiální, vyskytující se u haploidních buněk, a bipolární, u diploidních buněk. Jednotlivé vzory pučení lze odlišit podle místa zakládání nových pupenů a lokalizace jizev vzniklých po oddělení pupene (viz. **Obr. 2**). U bipolárního vzoru se pupeny vytvářejí střídavě na obou pólech buňky, což potvrzují i zde přítomné prstence jizev. Axiální typ pučení je typický vznikem pupene vždy na témže pólu a jizvy se na něm objevují ve shlucích (Chant and Pringle, 1995). Oba typy pučení mají odlišné sady proteinů, které označují místa pro vypučení. Tyto proteinové sady jsou schopny vázat a regulovat modul Bud1, vyskytující se v obou buněčných typech. Ten interaguje s klíčovým regulátorem polarity Cdc42. (Gao et al., 2011). Následující kapitoly se týkají pouze axiálního vzoru pučení.



Obr. 2: Vzory pučení. Pro haploidní buňky je charakteristický axiální vzor pučení (A). Diploidní buňky pučí bipolárním vzorem (B). Tmavé kruhy na povrchu buněk znázorňují jizvy, které jsou pozůstatkem cytokineze. U haploidních buněk je do středu značky ukládán materiál pro budoucí pupen. U buněk bipolárních jsou tyto značky ztraceny a materiál se ukládá na opačné straně buňky. Převzato z (Flescher et al., 1993) a upraveno.

3 Ustavení polarity

Reakce na vnitřní či vnější podněty vedou v buňce k ustanovení osy polarity, která se podílí na řadě buněčných procesů, jako je např. morfogeneze, určení tvaru buňky nebo řízený pohyb. U *S. cerevisiae* se vytváří pouze jediná osa polarity, jež se podílí na označení místa pro vznik nového pupene. Určujícím prvkem jsou prostorové značky – Bud3, Bud4, Ax11, Ax12, nahromaděné v místě předchozího dělení. Pro jejich rozpoznání je zapotřebí Rho GTPáz, které působí na své efekторы a tím ovlivňují aktinový cytoskelet, septiny a řízený transport molekul. Tyto struktury a procesy jsou vyžadovány pro tvorbu a následný růst pupene.

3.1 Prostorové značky

U axiálního typu pučení vytváří produkty genů: *AXL1*, *BUD3* (Chant et al., 1995), *BUD4* a *AXL2/BUD10* prostorovou značku (Halme et al., 1996; Roemer et al., 1996). Jejich aktivita zároveň brání expresi genů nutných pro projev bipolárního vzoru. Pokud některý z axiálních genů chybí, nastane u haploidních buněk změna a buňka začne pučet bipolárním způsobem (Chant et al., 1995; Halme et al., 1996; Roemer et al., 1996; Sanders and Herskowitz, 1996).

Mezi nejlépe prostudované proteiny, hrající klíčovou roli při axiálním pučení, patří protein Bud3 (Chant et al., 1995; Guo et al., 2011). Tento protein interaguje s dalšími značkovými proteiny (Guo et al., 2011) a jejich lokalizace v buňce je závislá na buněčném cyklu. V průběhu pučení se vyskytují v oblasti krčku, tj. oblasti společné mateřské i dceřiné buňce, kde mají podobu prstence. Prstenec se na začátku cytokineze rozdělí na dva na sobě nezávislé prstence, jež obklopují krček z obou stran a mezi nimiž se vytvoří septum. Po buněčné separaci obdrží každá buňka, tj. mateřská a dceřiná, komplex proteinů, které se spolupodílí na tvorbě prostorové značky (Guo et al., 2011; Kang et al., 2001). Část komplexu zde zůstává a tvoří signál, podle kterého se v jeho blízkosti umístí Ax11 s Ax12 ve formě tečky a spolu se septinovým prstencem určují místo pro založení pupene. Není znám přesný mechanismus, kterým se proteiny přesouvají do místa budoucího pupene, ale pravděpodobně závisí na aktivaci dráhy Cdc42 (Zheng et al., 1994). V pozdější fázi růstu se do krčku přesouvají zbylé značky a asociují s Ax11, Ax12. V místě oddělení buněk dochází ke spolupráci všech prostorových značek se skupinou GTP vazebných proteinů, zvaných septiny.

Septiny slouží jako proteinové lešení („*scaffold*“), ukotvující značkové proteiny těsně pod plasmatickou membránu (Flescher et al., 1993). V buňce rostoucí vegetativně jsou

syntetizovány tyto septiny: Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 a Shs1 (Iwase et al., 2007), existuje i septin syntetizovaný pouze při sporulaci. Tyto proteiny také vytvářejí difúzní bariéru v oblasti krčku (Longtine and Bi, 2003), která přispívá k ustanovení asymetrie buněčné morfologie mezi mateřskou a dceřinou buňkou. Tato asymetrie je klíčová pro správnou polarizaci buňky (Barral et al., 2000; McMurray and Thorner, 2009; Roncero and Sanchez, 2010; Takizawa et al., 2000). Umístění septinů se v buňce během cyklu nemění, dochází jen ke změnám v jejich uspořádání. Těsně před zahájením nového buněčného cyklu se v místě budoucího pupene vytvoří prstenec (Oh and Bi, 2011), skrz nějž pak prorůstá nově vznikající pupen. Během růstu pupene se septinová vlákna o 90° otáčí a tím se struktura prstence přemění ve strukturu podobnou přesýpacím hodinám, která se rozšíří po celé délce krčku (Oh and Bi, 2011). Tato struktura nejen krček stabilizuje, ale funguje i jako výše popsaná difúzní bariéra (McMurray and Thorner, 2009; Roncero and Sanchez, 2010). Před začátkem cytokineze se struktura přesýpacích hodin musí rozdělit na dva prstence, což je pod kontrolou signální dráhy mitotického výstupu MEN (Meitinger et al., 2010). Mezi septinové prstence se umístí „mašinerie“ potřebná pro cytokinezi, která vytvoří primární a sekundární septum (McMurray and Thorner, 2009; Oh and Bi, 2011). Po ukončení cytokineze a buněčné separace zůstane v každé buňce jeden septinový prstenec, který se spolupodílí na prostorové značce pro budoucí vypučení (Iwase et al., 2006).

3.2 Modul Bud1

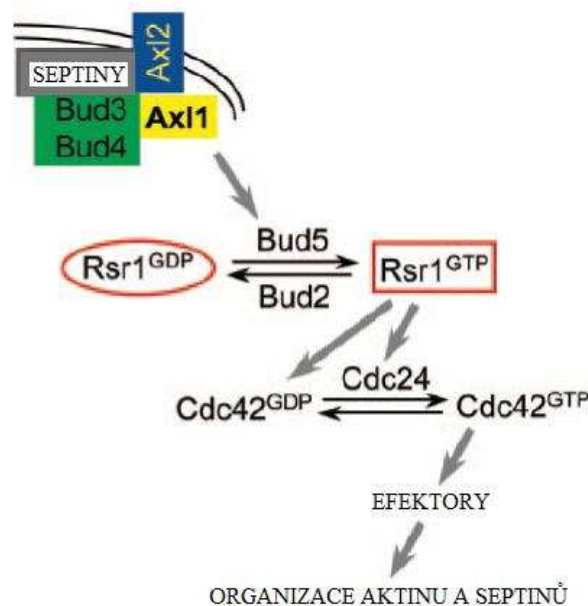
GTPázový modul Bud1 se podílí na rozpoznávání prostorových značek, tudíž i na výběru místa pučení (Chant and Pringle, 1995). Modul je tvořený z proteinu Bud1 (=Rsr1) z rodiny Ras proteinů, vázajícího a hydrolyzujícího GTP, a z jeho regulátorů Bud2 a Bud5 (Bender and Pringle, 1989). Při absenci některé komponenty tohoto modulu v místě vznikajícího pupene může docházet k abnormálnímu pučení (Casamayor and Snyder, 2002).

Bud1 je rovnoměrně rozmístěn pod plasmatickou membránou a v oblasti budoucího pupene dochází k jeho dynamické aktivaci a deaktivaci. To je dáno přítomností proteinu aktivujícího GTPázu (GAP) Bud2 (Park et al., 1993) a výměnného faktoru (GEF) Bud5 (Chant et al., 1991) v budoucím místě pupene. Protein Bud2 stimuluje GTPázovou aktivitu Bud1, což vede k hydrolyze GTP na GDP a následné deaktivaci Bud1 (Park et al., 1993). Bud5 naopak stimuluje aktivaci Bud1 podpořením vazby GTP do vazebného místa (Chant et al., 1991; Kang et al., 2001). Bud5 navíc umožňuje proteinu Bud1 tvořit homodimery Bud1-Bud1 a heterodimery s Rho GTPázou Cdc42. Dimerizace GTPáz může zvýšit efektivitu při tvorbě buněčné asymetrie (Kang et al., 2010).

3.3 Aktivace Cdc42 a polarizace aktinu

GTPáza Cdc42 z rodiny Rho proteinů je klíčovým prvkem buněčné polarity u většiny eukaryotických organismů a přesná časoprostorová regulace její aktivity je esenciální pro ustavení osy polarizovaného růstu, a tudíž i pro zajištění správného vývoje buňky (Drees et al., 2001; Peterson et al., 1994; Richman et al., 2002).

Podobně jako všechny GTPázy může i Cdc42 existovat ve dvou konformačních stavech, tj. s navázaným GDP, nebo GTP. Tuto změnu konformace regulují dvě skupiny proteinů GAP a GEF stejně jako u výše popsané GTPázy Bud1 (viz. **Obr. 3**). GEF protein Cdc24 aktivuje Cdc42 následně po interakci s aktivním Bud1 v místě budoucího pupene (Sloat et al., 1981; Zheng et al., 1994; Ziman and Johnson, 1994). Aktivovaný Cdc42 působí na své efekторы, čímž spouští signální dráhu vedoucí k polarizaci aktinu, exocytóze a aktivaci septinů. Cdc42 se po předání signálu rychle inaktivuje za podpory GAPů, kterých je známo více. Patří mezi ně Bem3 (Zheng et al., 1993), Rga1 (Stevenson et al., 1995), Rga2 (Smith et al., 2002) a Bem2 (Bender and Pringle, 1991; Peterson et al., 1994). Tyto GAPy svou interakcí s Cdc42 ovlivňují, kam se bude signál z dráhy Cdc42 dále šířit (Smith et al., 2002).

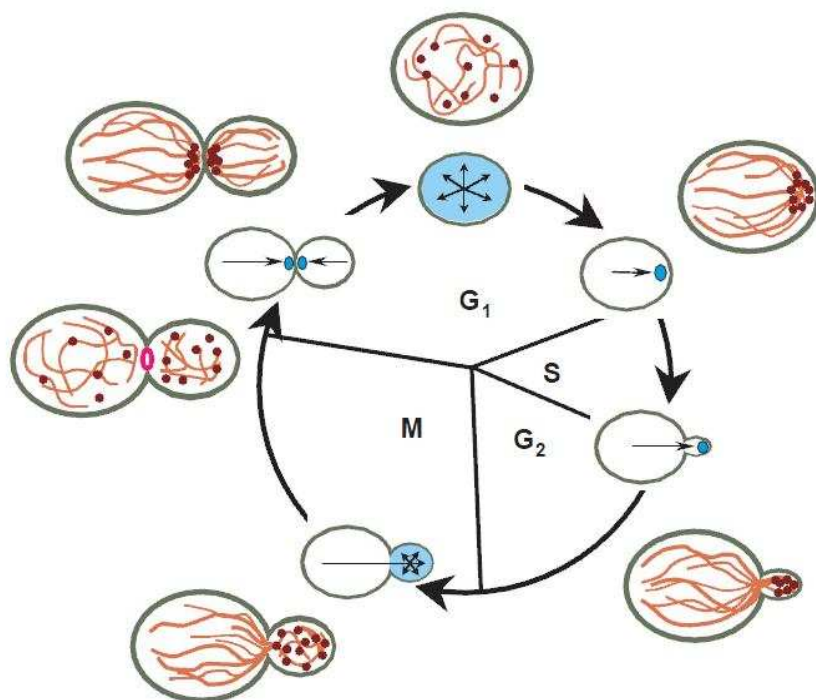


Obr. 3: Model signální dráhy řídící pučení v haploidních buňkách. Šipky ukazují postupné šíření signálu, vedoucí od kortikálních prostorových značek k organizování aktinového cytoskeletu a septinů. Převzato z (Park and Bi, 2007) a upraveno.

Cdc42 je umístěn pod cytoplazmatickou membránou a v průběhu buněčného cyklu dochází ke změnám v jeho lokalizaci, což způsobuje změny polarizace v buňce (Richman et al., 2002; Ziman et al., 1993). Na počátku růstu pupene jsou aktivní Cdc42 a polarisom

nahromaděny ve vrcholu pupene, kam společně nasměrovávají i aktinový cytoskelet (aktinové kabely a tečky) a tím polarizují růst směrem do špičky (tzv. apikální růst). Polarisom funguje jako lešení („*scaffold*“) pro komplexy spojené se signalizací Cdc42, které jsou uloženy pod plasmatickou membránou, a dopravuje signály vysílané komplexem Cdc42-Cla4 k aktinovému cytoskeletu (Kadota et al., 2004). Jeho nejdůležitější součástí jsou proteiny známé jako forminy (Bni1, Bnr1), které jsou klíčovým prvkem pro podporu polarizace aktinového cytoskeletu (Buttery et al., 2007; Dong et al., 2003; Vallen et al., 2000). Při jejich absenci dochází k poškození aktinu a nesprávnému nasměrování aktinových kabelů (Buttery et al., 2007). Na přechodu G2 a M fáze dochází k redistribuci GTPázy Cdc42 a jejího rozmístění do celého prostoru pupene. Jelikož umístění aktinu sleduje lokalizaci Cdc42, dochází k jeho depolarizaci (viz. **Obr. 4**), tzn. že aktinové kabely nejsou v pupenu výrazně orientovány a aktinové tečky jsou rozmístěny v celém objemu pupenu (Doyle and Botstein, 1996). Apikální růst se tím mění v izotropický, tedy že pupen roste ve všech směrech rovnoměrně a jeho výsledkem je elipsoidní tvar (Casamayor and Snyder, 2002; Pruyne and Bretscher, 2000a). Na konci mitózy se opět mění lokalizace Cdc42 a protein se vrací zpátky do krčku mezi mateřskou a dceřinou buňku, čímž dochází i ke změně polarizace v buňce. V závislosti na tom dochází i k repolarizaci aktinového cytoskeletu (Doyle and Botstein, 1996). Aktinové tečky se nahromadí do oblasti krčku, kam se nasměrují i aktinová vlákna, která tvoří kontraktilní řetězce spolu s těžkými řetězci Myosinu II (Myo1). Tyto řetězce jsou esenciálním prvkem aktinomyosinového prstence (AMR), který se v krčku vytvoří na začátku cytokineze a je potřebný pro její efektivnější průběh (Roncero and Sanchez, 2010).

Aktin se v kvasinkové buňce zapojuje do řady dalších procesů, jako např. exocytóza a endocytóza (Galletta and Cooper, 2009), jež mají vliv na její polarizovaný růst. Aktinové kabely tvořené svazky aktinových vláken jsou během růstu pupene natažené v pomyslné ose směřující z mateřské buňky skrze krček do pupene (Adams and Pringle, 1984; Amberg, 1998) a tím vytvářejí dráhy pro polarizovaný transport (sekreci a exocytózu) váčků naplněných materiálem pro růst pupene (Fagarasanu and Rachubinski, 2007; Pruyne and Bretscher, 2000b). Transportovány jsou i mitochondrie a vakuoly (Hill et al., 1996; Simon et al., 1997). V endocytóze se naopak uplatňují aktinové tečky, což jsou krátká, větvená a pohyblivá aktinová vlákna. Ta se koncentrují v místech polarizovaného růstu (viz. **Obr. 4**) v blízkosti plasmatické membrány (Galletta and Cooper, 2009), na nich se formují váčky (endosomy), které nesou materiál z plasmatické membrány i buněčné stěny určený k degradaci, nebo k recyklaci. (Tarassov et al., 2008)



Obr. 4: Polarizace aktinu v průběhu buněčného cyklu. Vnější kruh tvořený pupeny zachycuje změny v lokalizaci aktinového cytoskeletu (červený). Ve vnitřním kruhu všestranné šipky symbolizují rovnoměrnou polarizaci buňky v rámci izotropického růstu. Jednosměrné šipky ukazují směr polarity při apikálním růstu pupene a změnu polarity před cytokinezí a rozdělením buněk. Převzato z (Pruyne and Bretscher, 2000b) a upraveno.

Při polarizovaném růstu dochází v místě budoucího pupene k narušení buněčné stěny, která zajišťuje životaschopnost buňky. Následná oprava a syntéza buněčné stěny nového pupene vyžaduje přísun specifického výstavbového materiálu, což je regulováno také proteinem Rho1. Rho1 funguje jako centrální regulátor signální dráhy zajišťující změny v celistvosti a pevnosti buněčné stěny v závislosti na fázi buněčného cyklu a různých stresových faktorech (Mazur and Baginsky, 1996; Qadota et al., 1996). Rho1 spolu s Cdc42 jsou jedinými esenciálními Rho GTPázami v kvasinkové buňce (Johnson and Pringle, 1990; Yamochi et al., 1994). Rho1 má dvě různé konformace, s navázaným GDP, či GTP, které jsou regulovány příslušnými GAPy – Sac7, Bag7, Bem2, Lrg1 (Schmidt et al., 2002a; Wang and Bretscher, 1995; Watanabe et al., 2001) a GEFem Tus1 (Schmelzle et al., 2002). Rho1 integruje signály z různých senzorů na povrchu buňky a aktivuje soubor efektorů regulujících expresi genů souvisejících s biogenesí buněčné stěny. Jako příklad lze uvést regulaci syntézy β -1,3-glukanu, hlavního polymeru buněčné stěny kvasinek, přímo v místě přestavby buněčné stěny (Drgonova et al., 1996; Mazur and Baginsky, 1996; Qadota et al., 1996). Lokalizace Rho1 pod plasmatickou membránou v místě vznikajícího pupene a v krčku během cytokineze

je nezávislá na aktinu (Drgonova et al., 1996; Yamochi et al., 1994). Zde je potřebný pro tvorbu AMR aktivovanou forminy a zřejmě i pro vytvoření sekundárního septa (Tolliday et al., 2001).

4 Změna polarity na konci buněčného cyklu

V předchozí kapitole je zmíněno, že na konci mitosy opět dochází ke změně polarity a Cdc42 se vrací do krčku mezi mateřskou a dceřinou buňkou. Stejně tak se repolarizuje aktinový cytoskelet. Všechny tyto změny mají za úkol zajistit, aby k oddělení mateřské a nově vzniklé dceřiné buňky došlo pouze v době, kdy dceřiná buňka obsahuje vše, co potřebuje ke svému fungování a reprodukci, včetně jádra. Buňky připravené k oddělení musí kontrolovat správné ukončení jaderného dělení (mitózu).

K tomu je zapotřebí dráha „výstupu z mitózy“ (MEN), která zahrnuje proteinovou fosfatázu Cdc14 (Taylor et al., 1997), proteinové kinázy Cdc5 (Visintin et al., 2003), Cdc15, Dbf2 (Visintin and Amon, 2001), Ras proteinu podobnou GTPázu Tem1 (Shirayama et al., 1994), a Dbf2-vazebný protein Mob1 (Meitinger et al., 2010; Yoshida and Toh-e, 2001). Významnou roli v této dráze hraje Cdc14 uložená v jadérku (Visintin et al., 1998), pro jejíž aktivaci je nutné opuštění jadérka v rané anafázi, regulované vytvořením komplexu Dbf2-Mob1 (Yoshida and Toh-e, 2001), a následný transport do cytoplazmy v pozdní anafázi (Yoshida and Toh-e, 2001). Fosfatáza Cdc14 iniciuje defosforylací svých substrátů inaktivaci hlavní kinázy Cdc28 (Visintin et al., 1998), čímž spouští výstup z mitózy (Yoshida and Toh-e, 2001). Pro inaktivaci Cdc28 je také zapotřebí degradace mitotických cyklinů, zprostředkovaná ubiquitin-dependentní dráhou a proteasomem (Visintin et al., 1998).

Všechny složky dráhy MEN jsou lokalizovány na jaderném plaku (SPB), který prochází krčkem do dceřiné buňky (Meitinger et al., 2010). Tato asymetrická lokalizace MEN, za kterou jsou zodpovědné jak „mašinérie“ buněčné polarity – hlavně Cdc42-signální dráha a formin Bni1 (Monje-Casas and Amon, 2009) –, tak i cytoplazmatické mikrotubuly, je důležitá i pro jeho regulaci (Seshan and Amon, 2004). MEN je inhibován mitotickým kontrolním bodem, který zastaví buněčný cyklus, pokud mitotické vřeténko není uspořádáno v ose mateřské buňky a pupene (Meitinger et al., 2010). Je zřejmé, že správná koordinace mitózy a vývoje (růstu) buňky je velmi důležitá. Inhibice polarizovaného růstu do doby, než proběhne mitóza, zajišťuje, že nedojde k předčasnému vypuštění. Tuto inhibici má na starosti protein Lte1, který je zároveň aktivátorem MEN dráhy a inhibítorem proteinu Bud1, zodpovědného za správný výběr pučícího místa a aktivaci Cdc42 (Geymonat et al., 2010).

Po ukončení mitózy a inaktivaci komplexu Cdc28-Clb je Cdc42 společně s dalšími články polaritní dráhy nasměrovaný do krčku, což vede k reorganizaci aktinových vláken a k cílenému transportu materiálu pro tvorbu septa do místa cytokineze. Septiny se zde nacházejí v podobě přesýpacích hodin, které se před vlastní cytokinezí rozdělí na dva prstence

(Roncero and Sanchez, 2010). Tímto rozdělením se vytvoří v krčku tzv. sendvičové lešení a mezi oba kruhy jsou nasměrovány veškeré komponenty nutné pro cytokinezi.

4.1 Cytokineze a separace buněk

Procesy cytokineze a následné separace buněk jsou v buněčném cyklu kvasinek rozlišovány – na rozdíl od buněčného cyklu např. savčích buněk, při kterém je separace braná jako součást cytokineze. *S. cerevisiae* se v tomto procesu liší od ostatních organismů třemi zásadními rozdíly:

- 1) místo určené pro oddělení buněk je determinováno již na počátku buněčného cyklu;
- 2) cytokineze zahrnuje formování septa, které se u živočišných buněk nevyskytuje z důvodu absence buněčné stěny;
- 3) AMR není esenciální pro cytokinezi, ale pomáhá zvýšit efektivnost cytokineze (Roncero and Sanchez, 2010; Schmidt et al., 2002b).

Pro zachování efektivity dějů souvisejících s rozdělení buněk a samotným ukončením buněčného cyklu je potřeba, aby došlo k následujícím procesům:

- 1) rozdělení cytoplasmy, které souvisí s kontrakcí aktinomyosinového prstence, bylo však prokázáno, že i formování septa může řídit oddělení cytoplasmy;
- 2) vzniku septa vedoucího k vytvoření buněčných stěn mezi oběma buňkami – mateřskou a dceřinou;
- 3) buněčné separaci, jejímž výsledkem je fyzické oddělení a vzniku dvou buněk (Vallen et al., 2000).

Aktinomyosinový prstenec se uspořádá mezi dvěma septinovými kruhy, kde už jsou v buněčné stěně základy primárního septa v podobě chitinového kruhu, které vytvořila chitin syntáza III – Chs3 (Schmidt et al., 2002b; Shaw et al., 1991). V tomto místě následně dojde k vytvoření chitinózního primárního septa ve formě disku chitin syntázou II – Chs2 (Schmidt et al., 2002b; Shaw et al., 1991), jež je do centra krčku dopravena pouze na určitou dobu. K dříve vzniklému primárnímu septu je z obou stran přikládán materiál buněčné stěny (β -1,3-glukan, β -1,6-glukan, mannanproteiny) a tím je vytvořeno sekundárního septum (Roncero and Sanchez, 2010). Vše je tak připraveno k separaci buněk.

Následující proces buněčné separace probíhá v G1 fázi dalšího (nového) buněčného cyklu. Účastní se ho hydrolytické enzymy s chitinázovou a glukanázovou aktivitou, které asymetricky degradují buněčnou stěnu (Roncero and Sanchez, 2010). Nejdůležitější funkci zastává chitináza, která degraduje primární septum pouze ze strany dceřiné buňky (Dohrmann et al., 1992; Kuranda and Robbins, 1991; O'Conallain et al., 1999) a tím fyzicky oddělí buňku

dceřinou od buňky mateřské. Po separaci buněk zůstane na jejich povrchu znatelné místo oddělení – jizva (viz. **Obr. 3**). U mateřské buňky je jizva, zvaná mateřská, menší díky chitinu, který je obsažen ve zbytku primárního septa a má schopnost se smršťovat. Jizva na dceřiné buňce se nazývá jizva zrodu nebo jizva zárodečná. Z počtu povrchových jizev lze odhadnout stáří pučící buňky.

Geny *CTS1* a *ENG1*, kódující chitinázu Cts1 a glukanázu Eng1 (Baladron et al., 2002; O'Conallain et al., 1999), jsou kontrolovány signalizační dráhou RAM, která prostřednictvím transkripčního faktoru Ace2 aktivuje syntézu všech proteinů specifických pro dceřinou buňku v časné G1 fázi (Roncero and Sanchez, 2010).

G1 fáze dceřiné buňky je v porovnání s mateřskou buňkou delší, což dceřiné buňce zajišťuje dostatek času na rozšíření metabolických zdrojů před zahájením nového dělení. Běžně je pomalejší průběh G1 fáze u dceřiné buňky vysvětlován podle modelu „kritické velikosti“. Podle něj zůstávají dceřiné buňky v G1 fázi tak dlouho, dokud nedosáhnou určité „kritické velikosti“ a mohou vstoupit do S fáze. Existuje však i jiný model, podle kterého není určujícím prvkem velikost, ale asymetrická distribuce transkripčního faktoru Ace2 v mateřské a dceřiné buňce (Laabs et al., 2003). Aktivita Ace2 je ovlivňována fosforylací či defosforylací. Neaktivní Ace2 je fosforylován kinázou Cdc28 a je lokalizován v cytoplasmě. Po inaktivaci Cdc28 ke konci mitózy je Ace2 defosforylován a přemístěn do jádra, kde od pozdní M fáze do brzké G1 fáze aktivuje sadu genů, které jsou exprimovány pouze v dceřiné buňce (O'Conallain et al., 1999).

Ihned po ukončení buněčného cyklu jsou v místě oddělení přítomné staré septinové prstence a komplexy proteinů, které zde společně vytvářejí prostorový signál pro proteiny určující nové pučící místo. V místě oddělení buněk musí také dojít k inaktivaci Cdc42. Do oblasti přiléhle prostorovému signálu se v podobě tečky přemístí proteiny vybírající místo pučení a přestavěný septinový kruh. Po průchodu STARTem je v tomto místě znovu aktivována GTPáza Cdc42. Tím je zahájen i polarizovaný růst vedoucí k tvorbě nového pupene, který opět projde celým buněčným cyklem, souvisejícím s jeho růstem a zakončeným vznikem nové buňky.

Závěr

Buněčná polarita je základem mnoha dějů odehrávajících se v jednobuněčných i mnohobuněčných organismech. Zkoumání buněčné polarity je důležité pro pochopení dalších procesů nejen v kvasinkové buňce, ale i u dalších eukaryotických organismů včetně člověka, jelikož základní polaritní mechanismy byly v průběhu evoluce zakonzervovány.

I přesto, že základní principy zřízení a udržení buněčné polarity jsou známy, je toto téma stále zkoumáno a jsou přinášeny nové detaily jednotlivých procesů, např. jakým způsobem je udržována dostatečně vysoká koncentrace aktivovaného proteinu Cdc42 v místě polarity. V poslední době se také objevují přístupy snažící se o komplexní pohled na regulaci polarity a jejího propojení s životním cyklem buňky. K tomu jsou využívána data získaná z analýz celého genomu a proteomu kvasinkové buňky v různých podmínkách ovlivňujících polaritu a jsou vytvářeny matematické modely, ze kterých je mj. možné usuzovat na hierarchii regulace celé polarity i jednotlivých v ní zúčastněných procesů.

Jak bylo popsáno v předcházejících kapitolách, pro zřízení jediné osy polarity v *S. cerevisiae* je důležité rozpoznání tzv. prostorového signálu, aktivace GTPáz vedoucí ke změnám v uspořádání aktinového cytoskeletu a septinů. Během apikálního růstu pupene probíhá (za podpory aktinového cytoskeletu) transport všech výstavbových komponent směrem do vrcholu pupene. Vytváří se tak buněčná asymetrie, na které se významně podílí septinová difúzní bariéra a retrogradní (zpětný) transport molekul do mateřské buňky. U *S. cerevisiae* je v poslední době velmi aktuálním tématem studia buněčné stárnutí a ukazuje se, že je více než bylo dříve předpokládáno ovlivněno buněčnou polaritou. Polaritní procesy jsou totiž spojeny se stárnutím mateřské buňky a zároveň omlazováním buňky dceřiné, což znamená, že mateřská buňka během polarizovaného růstu pupene zajišťuje, aby se nově vzniklá dceřiná buňka narodila „mladá“, tj. aby měla plný replikativní potenciál (mohla se dostatečně dlouho množit). Septinová difúzní bariéra a zpětný transport molekul do mateřské buňky pomáhají odstranění poškozených nebo agregovaných proteinů a kruhových ribosomálních DNA (ERC), podílejících se na stárnutí buňky z nově vznikající buňky. Toto téma je vzhledem k již zmíněné konzervovanosti polaritních procesů zajímavé nejen pro kvasinkovou buňku, ale i pro buňky vyšších eukaryot a je zjevné, že studium polarity a s ní spojených procesů je nezbytné i při studiu stárnutí lidského organismu.

Použitá literatura

- Adams, A.E.M., and J.R. Pringle. 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 98:934-945.
- Amberg, D.C. 1998. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Molecular Biology of the Cell*. 9:3259-3262.
- Baladron, V., S. Ufano, E. Duenas, A.B. Martin-Cuadrado, F. del Rey, and C.R.V. de Aldana. 2002. Eng1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 1:774-786.
- Barral, Y., V. Mermall, M.S. Mooseker, and M. Snyder. 2000. Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Molecular Cell*. 5:841-851.
- Bender, A., and J.R. Pringle. 1989. Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by *CDC42* and three newly identified genes including the ras-related gene *RSR1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:9976-9980.
- Bender, A., and J.R. Pringle. 1991. Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 11:1295-1305.
- Buttery, S.M., S. Yoshida, and D. Pellman. 2007. Yeast formins Bni1 and Bnr1 utilize different modes of cortical interaction during the assembly of actin cables. *Molecular Biology of the Cell*. 18:1826-1838.
- Casamayor, A., and M. Snyder. 2002. Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 5:179-186.
- Chant, J., K. Corrado, J.R. Pringle, and I. Herskowitz. 1991. Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell*. 65:1213-1224.
- Chant, J., M. Mischke, E. Mitchell, I. Herskowitz, and J.R. Pringle. 1995. Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *Journal of Cell Biology*. 129:767-778.
- Chant, J., and J.R. Pringle. 1995. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 129:751-765.
- Dohrmann, P.R., G. Butler, K. Tamai, S. Dorland, J.R. Greene, D.J. Thiele, and D.J. Stillman. 1992. Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase. *Genes & Development*. 6:93-104.
- Dong, Y., D. Pruyne, and A. Bretscher. 2003. Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *Journal of Cell Biology*. 161:1081-1092.
- Doyle, T., and D. Botstein. 1996. Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:3886-3891.
- Drees, B.L., B. Sundin, E. Brazeau, J.P. Caviston, G.C. Chen, W. Guo, K.G. Kozminski, M.W. Lau, J.J. Moskow, A. Tong, L.R. Schenkman, A. McKenzie, P. Brennwald, M. Longtine, E. Bi, C. Chan, P. Novick, C. Boone, J.R. Pringle, T.N. Davis, S. Fields, and D.G. Drubin. 2001. A protein interaction map for cell polarity development. *Journal of Cell Biology*. 154:549-571.

- Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G.C. Chen, R.A. Ford, C.S.M. Chan, Y. Takai, and E. Cabib. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*. 272:277-279.
- Enserink, J.M., and R.D. Kolodner. 2010. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Division*. 5.
- Fagarasanu, A., and R.A. Rachubinski. 2007. Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology*. 10:528-538.
- Flescher, E.G., K. Madden, and M. Snyder. 1993. Components required for cytokinesis are important for bud site selection in yeast. *Journal of Cell Biology*. 122:373-386.
- Galletta, B.J., and J.A. Cooper. 2009. Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Current Opinion in Cell Biology*. 21:20-27.
- Gao, J.T., R. Guimera, H. Li, I.M. Pinto, M. Sales-Pardo, S.C. Wai, B. Rubinstein, and R. Li. 2011. Modular coherence of protein dynamics in yeast cell polarity system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:7647-7652.
- Geymonat, M., A. Spanos, S. Jensen, and S.G. Sedgwick. 2010. Phosphorylation of Lte1 by Cdk prevents polarized growth during mitotic arrest in *S. cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 191:1097-1112.
- Guo, J., T. Gong, and X.D. Gao. 2011. Identification of an Amphipathic Helix Important for the Formation of Ectopic Septin Spirals and Axial Budding in Yeast Axial Landmark Protein Bud3p. *Plos One*. 6.
- Halme, A., M. Michelitch, E.L. Mitchell, and J. Chant. 1996. Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Current Biology*. 6:570-579.
- Hill, K.L., N.L. Catlett, and L.S. Weisman. 1996. Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 135:1535-1549.
- Iwase, M., J. Luo, E. Bi, and A. Toh-E. 2007. Shs1 plays separable roles in septin organization and cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 177:215-229.
- Iwase, M., J.Y. Luo, S. Nagaraj, M. Longtine, H.B. Kim, B.K. Haarer, C. Caruso, Z.T. Tong, J.R. Pringle, and E.F. Bi. 2006. Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Molecular Biology of the Cell*. 17:1110-1125.
- Johnson, D.I., and J.R. Pringle. 1990. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *Journal of Cell Biology*. 111:143-152.
- Kadota, J., T. Yamamoto, S. Yoshiuchi, E. Bi, and K. Tanaka. 2004. Septin ring assembly requires concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 15:5329-5345.
- Kang, P.J., L. Beven, S. Hariharan, and H.O. Park. 2010. The Rsr1/Bud1 GTPase interacts with itself and the Cdc42 GTPase during Bud-Site selection and polarity establishment in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 21:3007-3016.
- Kang, P.J., A. Sanson, B. Lee, and H.O. Park. 2001. A GDP/GTP exchange factor involved in linking a spatial landmark to cell polarity. *Science*. 292:1376-1378.
- Kuranda, M.J., and P.W. Robbins. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 266:19758-19767.
- Küntzel, H., A. Schulz, and I.M. Ehbrecht. 1996. Cell cycle control and initiation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Chemistry*. 377:481-487.

- Laabs, T.L., D.D. Markwardt, M.G. Slattery, L.L. Newcomb, D.J. Stillman, and W. Heideman. 2003. ACE2 is required for daughter cell-specific G1 delay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:10275-10280.
- Longtine, M.S., and E.F. Bi. 2003. Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends in Cell Biology*. 13:403-409.
- Mazur, P., and W. Baginsky. 1996. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *Journal of Biological Chemistry*. 271:14604-14609.
- McMurray, M.A., and J. Thorner. 2009. Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Division*. 4.
- Meitinger, F., B. Petrova, I.M. Lombardi, D.T. Bertazzi, B. Hub, H. Zentgraf, and G. Pereira. 2010. Targeted localization of Inn1, Cyk3 and Chs2 by the mitotic-exit network regulates cytokinesis in budding yeast. *Journal of Cell Science*. 123:1851-1861.
- Mendenhall, M.D., and A.E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:1191-1243.
- Monje-Casas, F., and A. Amon. 2009. Cell Polarity Determinants Establish Asymmetry in MEN Signaling. *Developmental Cell*. 16:132-145.
- O'Conallain, C., M.T. Doolin, C. Taggart, F. Thornton, and G. Butler. 1999. Regulated nuclear localisation of the yeast transcription factor Ace2p controls expression of chitinase (CTS1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*. 262:275-282.
- Oh, Y., and E. Bi. 2011. Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends in Cell Biology*. 21:141-148.
- Park, H.O., and E.F. Bi. 2007. Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71:48-96.
- Park, H.O., J. Chant, and I. Herskowitz. 1993. BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature*. 365:269-274.
- Peterson, J., Y. Zheng, L. Bender, A. Myers, R. Cerione, and A. Bender. 1994. Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *Journal of Cell Biology*. 127:1395-1406.
- Pruyne, D., and A. Bretscher. 2000a. Polarization of cell growth in yeast I. Establishment and maintenance of polarity states. *Journal of Cell Science*. 113:365-375.
- Pruyne, D., and A. Bretscher. 2000b. Polarization of cell growth in yeast II. The role of the cortical actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*. 113:571-585.
- Putnam, C.D., E.J. Jaehnig, and R.D. Kolodner. 2009. Perspectives on the DNA damage and replication checkpoint responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*. 8:974-982.
- Qadota, H., C.P. Python, S.B. Inoue, M. Arisawa, Y. Anraku, Y. Zheng, T. Watanabe, D.E. Levin, and Y. Ohya. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*. 272:279-281.
- Richman, T.J., M.M. Sawyer, and D.I. Johnson. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryotic Cell*. 1:458-468.
- Roemer, T., K. Madden, J.T. Chang, and M. Snyder. 1996. Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes & Development*. 10:777-793.
- Roncero, C., and Y. Sanchez. 2010. Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast*. 27:521-530.

- Sanders, S.L., and I. Herskowitz. 1996. The Bud4 protein of yeast, required for axial budding, is localized to the mother/bud neck in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Biology*. 134:413-427.
- Schmelzle, T., S.B. Helliwell, and M.N. Hall. 2002. Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 22:1329-1339.
- Schmidt, A., T. Schmelzle, and M.N. Hall. 2002a. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 45:1433-1441.
- Schmidt, M., B. Bowers, A. Varma, D.H. Roh, and E. Cabib. 2002b. In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *Journal of Cell Science*. 115:293-302.
- Seshan, A., and A. Amon. 2004. Linked for life: Temporal and spatial coordination of late mitotic events. *Current Opinion in Cell Biology*. 16:41-48.
- Shaw, J.A., P.C. Mol, B. Bowers, S.J. Silverman, M.H. Valdivieso, A. Duran, and E. Cabib. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology*. 114:111-123.
- Shirayama, M., Y. Matsui, and A. Toh-E. 1994. The yeast TEM1 gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Molecular and Cellular Biology*. 14:7476-7482.
- Simon, V.R., S.L. Karmon, and L.A. Pon. 1997. Mitochondrial inheritance: Cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 37:199-210.
- Sloat, B.F., A. Adams, and J.R. Pringle. 1981. Roles of the CDC24 gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology*. 89:395-405.
- Smith, G.R., S.A. Givan, P. Cullen, and G.F. Sprague. 2002. GTPase-activating proteins for Cdc42. *Eukaryotic Cell*. 1:469-480.
- Stevenson, B.J., B. Ferguson, C. De Virgilio, E. Bi, J.R. Pringle, G. Ammerer, and G.F. Sprague Jr. 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*. 9:2949-2963.
- Takizawa, P.A., J.L. DeRisi, J.E. Wilhelm, and R.D. Vale. 2000. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science*. 290:341-344.
- Tarassov, K., V. Messier, C.R. Landry, S. Radinovic, M.M. Serna Molina, I. Shames, Y. Malitskaya, J. Vogel, H. Bussey, and S.W. Michnick. 2008. An in vivo map of the yeast protein interactome. *Science*. 320:1465-1470.
- Taylor, G.S., Y. Liu, C. Baskerville, and H. Charbonneau. 1997. The activity of CDc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. *Journal of Biological Chemistry*. 272:24054-24063.
- Tolliday, N., N. Bouquin, and R. Li. 2001. Assembly and regulation of the cytokinetic apparatus in budding yeast. *Current Opinion in Microbiology*. 4:690-695.
- Vallen, E.A., J. Caviston, and E. Bi. 2000. Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and Myo1p in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 11:593-611.
- Visintin, R., and A. Amon. 2001. Regulation of the mitotic exit protein kinases CDc15 and Dbf2. *Molecular Biology of the Cell*. 12:2961-2974.

- Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, and A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of CDK-dependent phosphorylation. *Molecular Cell*. 2:709-718.
- Visintin, R., F. Stegmeier, and A. Amon. 2003. The Role of the Polo Kinase Cdc5 in Controlling Cdc14 Localization. *Molecular Biology of the Cell*. 14:4486-4498.
- Wang, T.T., and A. Bretscher. 1995. The rho-GAP encoded by BEM2 regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 6:1011-1024.
- Watanabe, D., M. Abe, and Y. Ohya. 2001. Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast*. 18:943-951.
- Wittenberg, C. 2005. Cell cycle: Cyclin guides the way. *Nature*. 434:34-35.
- Yamochi, W., K. Tanaka, H. Nonaka, A. Maeda, T. Musha, and Y. Takai. 1994. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*. 125:1077-1093.
- Yoshida, S., and A. Toh-e. 2001. Regulation of the localization of Dbf2 and Mob1 during cell division of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Genetic Systems*. 76:141-147.
- Zheng, Y., R. Cerione, and A. Bender. 1994. Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *Journal of Biological Chemistry*. 269:2369-2372.
- Zheng, Y., M.J. Hart, K. Shinjo, T. Evans, A. Bender, and R.A. Cerione. 1993. Biochemical comparisons of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain. *Journal of Biological Chemistry*. 268:24629-24634.
- Ziman, M., and D.I. Johnson. 1994. Genetic evidence for a functional interaction between *Saccharomyces cerevisiae* CDC24 and CDC42. *Yeast*. 10:463-474.
- Ziman, M., D. Preuss, J. Mulholland, J.M. O'Brien, D. Botstein, and D.I. Johnson. 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Molecular Biology of the Cell*. 4:1307-1316.