

## Tec1 Proteininin *NTH1* Promotoruna Bağlanması Moleküler Modellemesi

Tülay TURGUT GENÇ<sup>1\*</sup>

Selen ÇAKAS<sup>2</sup>

**ÖZET:** *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinde trehaloz molekülü enerji kaynağı ve stres metaboliti olarak görev yapmaktadır. Trehalozun sentezinde ve yıkımında görevli proteinlerin ve ilgili genlerinin ekspresyonları sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Stres koşullarında sentezlenen trehalozun yıkımında görev alan *NTH1* geni transkripsiyonel ve post-translasyonel olarak regüle edilmektedir. Özellikle transkripsiyonel regülasyonda rol alan transkripsiyon faktörlerinin tümü henüz bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmada öncelikle *NTH1* promotor bölgesinin biyoinformatik analizi yapıldı ve bağlanma olasılığı bulunan transkripsiyon faktörleri belirlendi. Bu faktörlerden Tec1 transkripsiyon faktörünün *NTH1* promotoruna potansiyel üç boyutlu *NTH1* promotor-Tec1p bağlanma modeli farklı veri tabanları ve DNA-protein docking programları kullanılarak oluşturuldu. Elde edilen modelleme üzerinde yapılan ölçümlerde Tec1 proteininin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının kuvvetli olduğu belirlendi. Ayrıca Tec1 proteininin TEA-DNA bağlanma bölgesinin *S. cerevisiae* ve diğer canlılarda yapılan BLAST analizi sonucunda TEA-DNA bağlanma bölgesinde bulunan 22 amino asitin tüm canlılarda % 100 korunduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *NTH1*, Tec1p, DNA-Protein 3D modelleme, *Saccharomyces cerevisiae*

### The Molecular Modelling of Tec1 Protein Binding to *NTH1* Promoter

**ABSTRACT:** The trehalose molecule acts as an energy source and stress metabolite in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. The proteins and their encoded genes involved in the synthesis and breakdown of trehalose are tightly controlled. *NTH1* gene that is responsible from the degradation of stress accumulated-trehalose, is regulated transcriptionally and post-translationally. Not all of the transcription factors involved in transcriptional regulation are yet to be known. For this reasons, in this study the bioinformatic analysis of *NTH1* promoter region was performed and transcription factors that are likely to bind were identified. Of these factors, Tec1 transcription factor was used to construct the potential three-dimensional *NTH1* promoter-Tec1p binding model by using different databases and DNA-protein docking programs. The measurements in the obtained three dimensional model revealed that the probability of Tec1 protein binding to the *NTH1* promoter was too high. In addition, BLAST analysis of the TEA-DNA binding site in *S. cerevisiae* and other organisms revealed that 22 amino acids in the TEA-DNA binding region were 100% conserved in all living organisms.

**Keywords:** *NTH1*, Tec1p, DNA-Protein 3D modelling, *Saccharomyces cerevisiae*

<sup>1</sup> Tülay TURGUT GENÇ (Orcid ID: 0000-0001-5074-3572), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup> Selen ÇAKAS (Orcid ID: 0000-0002-1494-4083), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, Türkiye

\* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Tülay TURGUT GENÇ, e-mail: tturgutgenc@comu.edu.tr

\* Bu çalışma Selen ÇAKAS'ın Yüksek Lisans tezinin bir bölümüdür.

## GİRİŞ

*Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinde, karbon ve enerji kısıtlamasına bağlı olarak sentezlenen trehaloz molekülü ortam koşullarının normale dönmesiyle birlikte hızlıca yıkılır [Lillie ve Pringle, 1980]. Stres koşullarında biriktirilen trehalozun hidrolizinden sorumlu olan nötral trehalaz enzimi *NTH1* geni tarafından kodlanır [Nwaka ve Holzer, 1998]. TPS kompleksini oluşturan genlerin promotor bölgelerinde bulunan STRE elementleri *NTH1* promotor bölgesinde de bulunmaktadır [Ruis ve Schüller, 1995; Nwaka ve ark., 1995a, 1995b]. Msn2 ve Msn4 transkripsiyon faktörleri ilgili genlerin promotor bölgelerinde bulunan STRE dizilerine bağlanarak stres koşullarında bu genlerin transkripsiyonlarını aktive etmektedir [Martinez Pastor ve ark., 1996].

*NTH1* gen ekspresyonu farklı sinyal yolları ile regüle edildiği gibi, Msn2/4 aracılığıyla TOR sinyal sistemi üzerinden de düzenlenmektedir. TOR (Target of Rapamycine) sinyal yolağı azot açlığına karşı oluşturulan cevapta önemli rol oynamaktadır. *S. cerevisiae* maya türü tarafından tercih edilen azot kaynakları amonyum tuzları ve glutamin olup, bu azot kaynaklarının olmadığı durumlarda hücreler farklı azot kaynaklarını kullanmaktadır [Cooper, 2002]. *NTH1* promotor bölgesinde (-1000bç) yapılan analiz sonucunda *NTH1* promotorunda yirmi beşe yakın transkripsiyon faktörünün fiziksel bağlanma dizilerinin bulunduğu belirlendi. Bu transkripsiyon faktörlerinden Tec1 transkripsiyon faktörünün beş tane bağlanma bölgesi bulunduğu gözlemlendi.

Tec1 (Transposon Enhancement Control 1) transkripsiyon faktörü pseudohifsel üremeden sorumlu genlerin promotorlarında bulunan TCS (TEA/ATTS Consensus Sequence) elementlerine bağlanarak transkripsiyonlarını aktive etmektedir [Madhani ve Fink, 1997]. Tec1 transkripsiyon faktörü aynı zamanda MAPK ve TOR sinyal yolları arasında bağlantı kurarak maya

hücrelerinin gelişimini etkilemektedir. Ayrıca Tec1 proteininin stabilitesi TOR sinyal sistemi üzerinden pozitif olarak kontrol edilmektedir [Brückner ve ark., 2011].

*NTH1* ve *TEC1* genlerinin transkripsiyonel regülasyonu TOR sinyal sistemi üzerinden gerçekleştiğinden ve *NTH1* geninin promotor bölgesinde Tec1p bağlanması için gerekli TEA/ATTS elementlerini içerdiğinden Tec1 proteininin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığı DNA-protein docking çalışması yapılarak belirlenmeye çalışıldı. Farklı veri tabanları ve bilgisayar programları kullanılarak gerçekleştirilen *in silico* DNA-Protein bağlanma modellemesinde, Tec1 proteininin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının yüksek olduğu görüldü. Ayrıca Tec1 proteininin DNA'ya bağlanabilmesi için gerekli TAE domaininin farklı organizmalarda gerçekleştirilen BLAST analizi sonucunda 22 amino asitin tüm canlılarda tamamen korunduğu ve değişmediği tespit edildi.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### *In silico* çalışmalar

Çalışmada SGD (*Saccharomyces cerevisiae* Genome Database) veri tabanından alınan 1000 bç uzunluğundaki *NTH1* promotor bölgesi kullanıldı. JASPAR CORE veri tabanı kullanılarak *NTH1* promotoru üzerinde Tec1p TEA/ATTS DNA bağlanma bölgeleri belirlendi. SGD veri tabanından alınan 486 amino asitlik Tec1p dizisi ve Tec1p'nin TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesine denk gelen 75 amino asitlik dizisinin I-TASSER programı kullanılarak tahmini üç boyutlu modellemesi yapıldı (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>). *NTH1* promotorunda Tec1p, TEA/ATTS-DNA bağlanma elementleri 3D-DART webserver programına gönderildi ve Pdb formuna dönüştürüldü (<http://dna.ccs.tulane.edu/>). I-TASSER programından gönderilen Pdb dosyaları VMD (Visual Molecular Dynamics) programı kullanılarak hidrojen içermeyen forma

dönüştürüldü ve tekrar Pdb formatına çevrildi (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). I-TASSER ve VMD programı ile elde edilen Pdb dosyaları ile 3D-DART webserver programından gelen Pdb dosyaları NPDock-Genesilico.pl sitesine yüklendi ve olası bağlanma modelleri elde edildi. VMD (Visual Molecular Dynamics) programı ile modeller görselleştirildi.

### Biyoinformatik analizler

Tec1 proteinin içerdiği TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesi farklı fungus ve canlı türlerinde Uniprot ve NCBI webserver programları kullanılarak tarandı. Tec1p ile homoloji gösteren proteinler ve TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesi ile eşleşme gösteren diziler belirlenerek kaydedildi. Daha sonra türlerde ve popülasyonlarda DNA ve protein hizalanması yaparak evrimsel benzerliklerin ve farklılıkların saptanmasında ağırlıklı olarak kullanılan MEGA ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) yazılımı kullanılarak Tec1 proteinin TEA/ATTS DNA bağlanma bölgesinde korunmuş olan bölgeler ve içerdikleri amino asitler MEGA 7.0 analiz programı kullanılarak belirlendi.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### NTH1-Tec1p 3D bağlanma modeli

Tec1 transkripsiyon faktörü, homeodomain ailesinin bir üyesi olup, Helix-Turn-Helix DNA motifine sahiptir. Tec1 proteini, TEA/ATTS dizisine sahip genlerin promotorlarına bağlanarak ekspresyonlarını düzenlemektedir. Tec1p transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma bölgesi

((A(G/C/T)C(G)AT(A)TC(G)C(T)C(T/G/A))

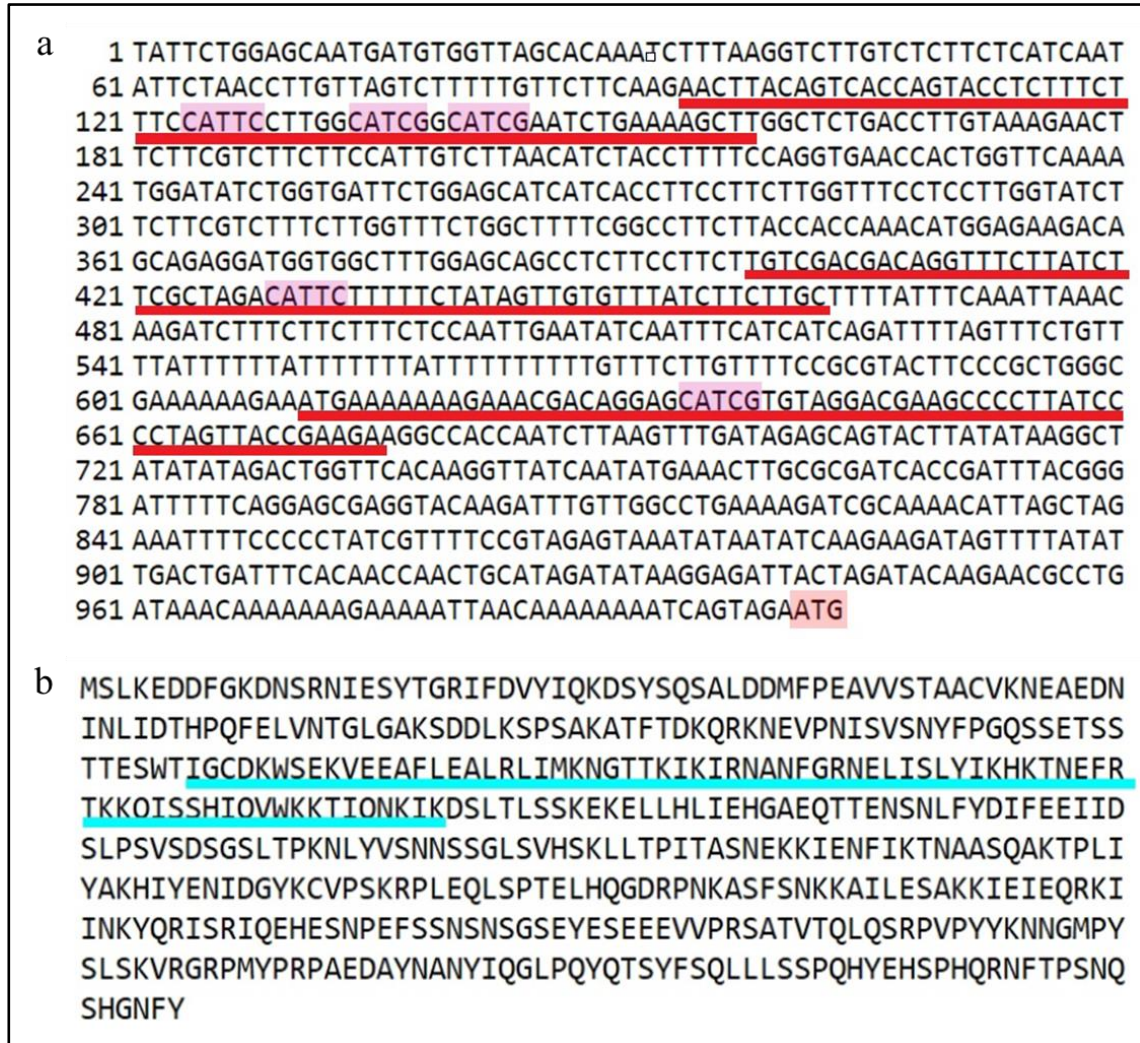
(ID MA0406.1) JASPAR CORE veri tabanı kullanılarak elde edildi. SGD (*Saccharomyces* Genome Database) veri tabanından alınan 1000 bç uzunluğundaki NTH1 promotor bölgesinde Tec1p bağlanma bölgeleri belirlendi (Şekil 1a). NTH1 promotorunda beş adet potansiyel Tec1p bağlanma bölgesi tespit edildi. NTH1 promotoru üzerinde olası Tec1 DNA bağlanma bölgelerini içerecek şekilde 65 bç uzunluğunda DNA

fragmentleri seçilerek 3D-DART programına gönderildi. Bu program aracılığıyla 65 bç uzunluğundaki DNA bölgeleri “tec1p\_tea1.pdb”, “tec1p\_tea2.pdb” ve “tec1p\_tea3.pdb” dosyaları olmak üzere 3 adet pdb uzantılı dosya oluşturuldu.

UniProt veri tabanı kullanılarak SGD veri tabanından elde edilen Tec1 protein dizisindeki 75 amino asit uzunluğundaki DNA bağlanma bölgesi belirlendi (Şekil 1b). Yüksek oranda korunmuş olan bu amino asit dizisi I-TASSER programına gönderilerek 3 boyutlu hale getirildi. I-TASSER programına gönderilen 7686 atomlu Tec1 proteinin 3D yapısı, Visual Molecular Dynamics (VMD) programı ile hidrojen atomları uzaklaştırılarak 3798 atom sayısına düşürüldü ve “tec1\_nonH.pdb” şeklinde kaydedildi.

I-TASSER ve VMD programı ile elde ettiğimiz Pdb uzantılı dosyalar (tec1\_nonH.pdb) ile 3D-DART webserver programından gelen Pdb uzantılı dosyaları (“tec1p\_tea1.pdb”, “tec1p\_tea2.pdb” ve “tec1p\_tea3.pdb”) NPDock-Genesilico.pl web sitesine gönderilerek Docking çalışması gerçekleştirildi. Bu çalışma sonunda “tec1p\_tea2.pdb” ve “tec1p\_tea3.pdb” DNA fragmentleri ile yapılan DNA-Protein Docking çalışmaları sonuç vermedi. Diğer DNA fragmenti, “tec1p\_tea1.pdb”, (“aactacagtcaccagtcacctttttccattccttGGCA<sub>88</sub>T<sub>8</sub><sub>9</sub>C<sub>90</sub>G<sub>91</sub>gcacgaatctgaaaagctt”) ile yapılan çalışma ise olumlu sonuçlandı. Elde edilen potansiyel üç boyutlu NTH1 promotor-Tec1p bağlanma modeli Şekil 2’de verildi.

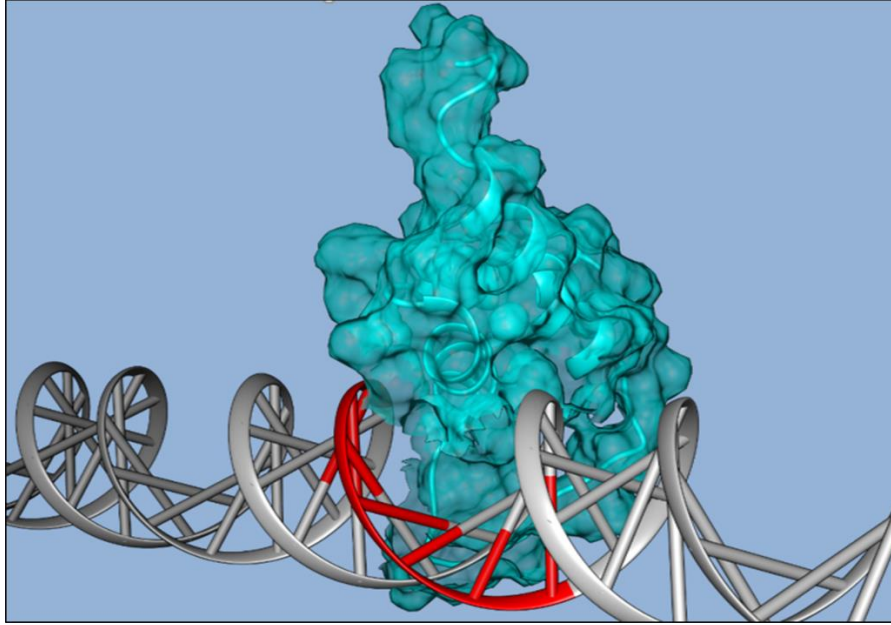
Tec1 proteinin DNA bağlanma bölgesinde bulunan amino asitler ile NTH1 promotorunda Tec1 bağlanma bölgesinde (“tec1p\_tea1.pdb”) yer alan nükleotidler arasındaki mesafe VMD programı kullanılarak angström olarak hesaplandı. NTH1 promotoru üzerinde Tec1 proteininin bağlanmasını gösteren 3D model ve amino asit-nükleotid arasındaki yakınlaşmalar Şekil 3’te verildi.



**Şekil 1. a)** NTH1 promotor bölgesi. DNA-Protein Docking çalışmalarında kullanılan DNA bölgelerinin (“tec1p\_tea1.pdb”, “tec1p\_tea2.pdb” ve “tec1p\_tea3.pdb”) kırmızı renkle işaretlendi. Tec1p bağlanma dizisini içeren bölgeler pembe renkle işaretlendi. **b)** Tec1 proteini amino asit dizisi. DNA-Protein Docking çalışmalarında kullanılan Tec1p DNA bağlanma bölgesi turkuaz renkle işaretlendi.

Tec1 proteininin 29. amino asiti İzolösin ( $I^{29}$ ) ile NTH1 promotorundaki 88. Adenin nükleotidinin ( $A_{88}$ ) atomları arasındaki olası mesafe 10,872 Å olarak, 44. amino asiti olan Lösin ( $L^{44}$ ) ile NTH1 promotorundaki 90. Sitozin nükleotidinin ( $C_{90}$ ) atomları arasındaki olası

mesafe 6,327 Å olarak hesaplandı. NTH1 promotorundaki 89. Timin ( $T_{89}$ ) ve 91. Guanin ( $G_{91}$ ) nükleotidleri, Tec1 proteininin 47. amino asiti Lizin ( $K^{47}$ ) ile olası etkileşim mesafesi sırasıyla 5,260 Å ve 4,352 Å olarak ölçüldü.



Şekil 2. Potansiyel 3D *NTH1* -Tec1p bağlanma modeli

### Tec1 TEA DNA bağlanma bölgesinin biyoinformatik analizi

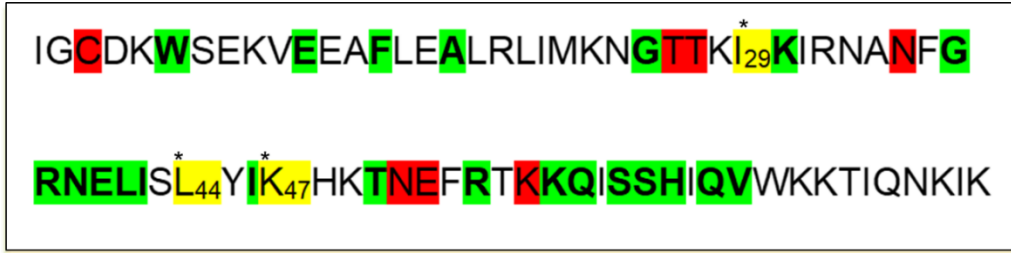
Tec1 transkripsiyon faktörünün içerdiği TEA-DNA bağlanma bölgesi, NCBI web sunucusu kullanılarak diğer canlılarda olup olmadığı araştırıldı. Diğer canlı türlerinde bulunan TEA bölgeleri 'fasta' formatında kaydedildi. MEGA 7.0 programı kullanılarak diğer canlılara ait TEA-DNA bağlanma bölgelerinin BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analizleri yapıldı (Şekil 4). TEA-DNA bağlanma bölgesinde bulunan heliks bölgeleri ve bu bölgelerde bulunan korunmuş amino asitler belirlenerek Şekil 5'te sunuldu.

*NTH1* promotorunda bulunan Tec1 bağlanma bölgesi ile Tec1 proteinin üç boyutlu bağlanma modellemesinde görev alan İzolösin (I29), Lösin (L44) ve Lizin (K47) amino

asitlerinin (sarı renkle işaretlenen) korunmuş bölgede bulunmasına rağmen tüm canlılarda % 100 korunan amino asitler olmadığı görüldü. Ayrıca *S. cerevisiae* maya türünde Tec1 transkripsiyon faktörünün TEA-DNA bağlanma bölgesi içinde yer alan Sistein (C3), Treonin (T26), Treonin (T27), Asparajin (N37), Asparajin (N57), Glutamik asit (E58) ve Lizin (K62) amino asitlerinin (kırmızı renkle işaretlenen) yerine diğer canlılarda sırasıyla Valin (V3), Arjinin (R26), Arjinin (R27), Lizin (K35), Glisin (G51), Lizin (K52) ve Arjinin (R55) amino asitlerinin geldiği belirlendi. TEA-DNA bağlanma bölgesinde bulunan 22 amino asitin (yeşil renkle işaretlenen) ise hizalama için kullanılan tüm canlılarda % 100 korunduğu tespit edildi.







Şekil 5. TEA-DNA bağlanma bölgesinde yer alan korunmuş amino asitler

(Yeşil: tüm canlılarda aynı olan amino asitler; sarı: değişiklik gösteren amino asitler; kırmızı: *S. cerevisiae* maya türünde farklı olan amino asitler)

## SONUÇ

DNA replikasyonu ve transkripsiyon aktivasyonu gibi birçok önemli biyolojik proseslerde DNA-protein interaksyonu önem taşımaktadır. Proteinlerin DNA molekülüne bağlanma modelleri genellikle X-ray kristalografi yöntemiyle belirlenebildiği gibi son zamanlarda bilgisayar tabanlı modellemeler kullanılmaya başlanmıştır. Farklı DNA-protein ve Protein-Protein modellemesi yapabilen bilgisayar programları geliştirilmiştir. Çalışmamızda bu programlardan 3D-DART ve I-TASSER bilgisayar programları kullanıldı.

Tec1 proteini, promotor bölgesinde TEA/ATTS elementlerine sahip genlere bağlanarak, ekspresyonlarını düzenlemektedir [Köhler ve ark., 2002]. *NTH1* geninin transkripsiyonel regülasyonu ve Tec1 proteininin stabilitesi TOR sinyal sistemi üzerinden düzenlenmektedir. *NTH1* promotor bölgesinin analizi sonucunda Tec1 transkripsiyon faktörünün bağlanabileceği beş adet TEA/ATTS elementlerinin varlığı promotor bölgesinde tespit edildi. Bu TEA/ATTS elementlerinden yalnızca bir tanesine Tec1 transkripsiyon faktörünün bağlanma olasılığının olduğu diğerlerine is yaklaşma tespit edilemediği için bağlanma potansiyelinin olmadığı gözlemlendi. Bağlanma olasılığı olan DNA elementi kullanılarak, potansiyel 3D *NTH1*-Tec1p bağlanma modeli oluşturuldu. Tec1p amino asitleri ile *NTH1* promotor bölgesinde ("tec1p\_tea1.pdb") yer alan nükleotidler arasındaki mesafeler

hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Tec1 proteininin *NTH1* promotoruna bağlanma olasılığının oldukça yüksek olduğunu gösterdi. Ayrıca Tec1 transkripsiyon faktörünün içerdiği TEA-DNA bağlanma bölgesinin *S. cerevisiae* ve diğer canlılarda olup olmadığı araştırıldı. Diğer canlı türlerinde bulunan TEA bölgelerinin biyoinformatik analizi sonucunda özellikle ikici ve üçüncü heliks bölgesinde yoğun olmak üzere toplam 22 amino asitin tüm canlılarda değişmediği tespit edildi.

## KAYNAKLAR

- Brückner S., Kern S., Birke R., Saugar I., Ulrich HD., Mösch HU., 2011. The TEA Transcription Factor Tec1 Links TOR and MAPK Pathways to Coordinate Yeast Development. *Genetics*, 189(2): 479-494.
- Cooper TG., 2002. Transmitting the Signal of Excess Nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor Proteins to the GATA Factors: Connecting the Dots. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS), Microbiological Reviews*, 26(3): 223-238.
- Köhler T., Wesche S., Taheri N., Braus GH., Mösch HU., 2002. Dual Role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS Family Transcription Factor Tec1p in Regulation of Gene Expression and Cellular Development. *Eukaryotic Cell*, 1(5): 673-686.
- Lillie SH., Pringle JR., 1980. Reserve Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Responses to Nutrient Limitation. *Journal of Bacteriology*, 143: 1384-1394.

- Madhani H. D., Fink G. R., 1997. Combinatorial Control Required for the Specificity of Yeast MAPK Signaling. *Science*, 275 (5304): 1314-1317.
- Martinez-Pastor MT., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* Zinc Finger Proteins Msn2p And Msn4p are Required for Transcriptional Induction Through the Stress-Response Element (STRE). *The EMBO Journal*, 15: 2227–2235.
- Nwaka S., Kopp M., Holzer H., 1995a. Expression and Function of the Trehalase Genes Nth1 and Ybr0106 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 10193-10198.
- Nwaka S., Mechler B., Destruelle M., Holzer H., 1995b. Phenotypic Features of Trehalase Mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 360(3): 286-290.
- Nwaka S., Holzer H., 1998. Molecular Biology of Trehalose and the Trehalases in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research Molecular Biology*, 58: 197-237.
- Ruis H., Schüller C., 1995. Stress Signaling in Yeast. *Bioassays*, 17(11): 959-965.