

## CRABTREE POZİTİF VE CRABTREE NEGATİF MAYA TÜRLERİNDE *GCR1* GENİNİN *IN SILICO* ANALİZİ

### *IN SILICO* ANALYSIS OF *GCR1* GENE IN CRABTREE POSITIVE AND CRABTREE NEGATIVE YEAST SPECIES

Tülay TURGUT GENÇ<sup>ID</sup>

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye.

Ataberk ÇAKAN<sup>ID</sup>

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale, Türkiye.

Melih GÜNAY<sup>ID</sup>

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale, Türkiye.

Geliş Tarihi / Received: 26.08.2021  
Kabul Tarihi / Accepted: 20.09.2021

Araştırma Makalesi/Research Article  
DOI: 10.38065/euroasiaorg.698

### ÖZET

Oksijen varlığında ve glikozun yüksek konsantrasyonunda maya hücrelerinin fermentasyon yapması Crabtree etkisi olarak adlandırılır. Crabtree etkisine sahip olan maya türleri Crabtree pozitif ve sahip olmayan maya türleri Crabtree negatif olarak adlandırılır. Crabtree negatif maya türleri çoğunlukla endüstriyel alanda heterolog protein üretimi için kullanılırken, Crabtree pozitif maya türleri kanser hücrelerinde metabolik olayların anlaşılmasında kullanılmaktadır. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde glikolitik yolda yer alan enzimleri kodlayan genler Gcr1p tarafından kontrol edilmektedir. Gcr1p glikolitik genlerin promotor bölgelerinde yer alan CT elementlerine bağlanarak transkripsiyonlarını aktive etmektedir. Çalışmamızda Sc-Gcr1p ile benzerlik gösteren proteinleri içeren Crabtree pozitif ve negatif maya türleri belirlenerek bu maya türlerinde protein benzerlik analizleri ve ilgili proteinleri kodlayan genlerin promotor analizleri farklı veri tabanları ve analiz programları kullanılarak *in silico* olarak karşılaştırması yapıldı. Bu amaçla, SGD, UNIPROT, NCBI-Genome ve Yeasttract veri tabanları ile BLASTp-NCBI, MEGA-X ve Chromatin Folding V2 programları kullanıldı. SGD veri tabanı kullanılarak Sc-Gcr1p ile eşleşme gösteren 32 farklı maya türü tespit edildi. Bu maya türlerinden 5 farklı Crabtree pozitif ve 5 farklı Crabtree negatif maya türü seçilerek *in silico* analizler bu maya türleri kullanılarak gerçekleştirildi. Protein analizleri ve promotor analizleri sonrasında, maya türleri arasında tespit edilen benzerliklerin ve farklılıkların Crabtree pozitif ve Crabtree negatif maya türleri için spesifik olmadığı türler arasında değişkenlik gösterdiği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *GCR1*, Gcr1p, Crabtree etkisi, Maya

### ABSTRACT

The use of fermentation in the presence of oxygen and at high glucose concentrations is referred to as the Crabtree effect. Yeast species that have the Crabtree effect are called Crabtree positive, and yeast species that do not have the Crabtree effect are called Crabtree negative. While Crabtree negative yeast strains are mostly used for heterologous protein production in the industrial field, Crabtree positive yeast strains are used to understand metabolic events in cancer cells. The genes encoding the enzymes involved in the glycolytic pathway in *S. cerevisiae* yeast cells are controlled by Gcr1p. Gcr1p binds to CT elements located in the promoter regions of glycolytic genes and activates their transcription. In our study, Crabtree positive and negative yeast strains containing Sc-Gcr1p similar proteins were determined, and protein similarity analyzes and promoter analyzes of genes encoding the relevant proteins in these yeast strains were compared *in silico* using different databases and analysis programs. For this purpose, SGD, UNIPROT, NCBI-Genome and Yeasttract databases and BLASTp-NCBI, MEGA-X and Chromatin Folding V2 programs were used. Using

the SGD database, 32 different yeast strains were identified that matched with Sc-Gcr1p. Five different Crabtree positive and 5 different Crabtree negative yeast strains were selected from these yeast strains and *in silico* analyzes were performed using these yeast strains. After protein analysis and promoter analysis, it was determined that the similarities and differences between yeast species were not specific for Crabtree positive and Crabtree negative yeast species, but varied between species.

**Keywords:** *GCR1*, Gcr1p, Crabtree effect, Yeast

## 1. GİRİŞ

*Saccharomyces cerevisiae* maya türü gelişmiş ökaryotlarda hücresel ve moleküler mekanizmaların anlaşılması için kullanılan tek hücreli model organizmadır. Endüstriyel olarak yaygın kullanımının yanında, kanser araştırmalarında ve anti-kanser ilaç araştırmalarında da kullanılmaktadır (Parapouli ve ark., 2020; Menacho-Márquez ve Murguía, 2007). Mayalar alkolik fermentasyon yeteneğine bağlı olarak, zorunlu aerobik ve fakültatif aerobik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Fakültatif mayalar, mitokondriyel solunum yapabilmesinin yanı sıra oksijen eksikliğinde alkolik fermentasyon yaparak CO<sub>2</sub> ve etanol üretebilmektedir (Fredlund 2004; Gancedo ve Serrano, 1989). Maya hücreleri oksijenin varlığında fermentasyon sürecini baskılamaktadır ve aerobik solunum aracılığı ile gerekli enerji üretimini sağlamaktadır. Pasteur etkisi olarak adlandırılan bu olay birçok maya türünde görülmektedir (Barnett, 1997). Crabtree etkisi ise, bazı maya türlerinin oksijen varlığında mitokondriyel genleri baskılayarak fermentasyon yapabilmesidir (Crabtree, 1929). Fermentasyon sonucunda az miktarda enerji sağlanmasına rağmen, yüksek oranda alkol ve asetat elde edilmektedir. Crabtree etkisine sahip maya türleri Crabtree pozitif (örneğin *S. cerevisiae*), sahip olmayan maya türleri ise Crabtree negatif (örneğin *Kluyveromyces lactis*) olarak iki gruba ayrılır (De Deken, 1966; Breunig ve ark., 2000). Crabtree negatif mayalar, ATP ve biyomas üretimi yüksek olduğundan, endüstriyel olarak daha çok tercih edilmektedir. Örneğin, Crabtree negatif olan *Candida utilis* maya türü endüstride glutatyon ve maya ekstraktı üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant *C. utilis* maya hücreleri kullanılarak laktat ve izopropanol üretilmektedir (Breunig ve ark., 2000; Ikushima ve ark., 2009; Tamakawa ve ark., 2012; 2013). Crabtree pozitif maya türleri ise, kanser hücrelerinde gözlenen Warburg etkisi ile benzer bir metabolizmaya sahip olmasından dolayı kanser araştırmalarında, kanser hücrelerinin metabolizmasının anlaşılmasında ve bazı ilaç denemelerinin gerçekleştirilmesinde kullanılmaktadır (Diaz-Ruiz ve ark., 2011; Hammad ve ark., 2016).

Glikoliz hücre içine alınan glikozun hızlı bir şekilde piruvata indirgenmesini içeren önemli bir metabolik yoldur. Bu yolda görev alan tüm enzimler ve ilgili genleri sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Uemura ve Jigami, 1995). Metabolik yolak sonucunda oluşan piruvat Crabtree pozitif maya hücrelerinde alkole dönüşürken kanser hücrelerinde laktata dönüştürülür. Bu nedenle Crabtree pozitif maya hücrelerinde ve kanser hücrelerinde glikoz transportu ve kullanımı çok yüksektir. *S. cerevisiae* maya hücrelerinde, *GCR1* (GlyColysis Regulator 1) geni tarafından kodlanan Gcr1 transkripsiyon faktörü glikolitik yolda yer alan genlerin transkripsiyonel regülasyonunda görev almaktadır. *GCR1* gen mutasyonu taşıyan *S. cerevisiae* maya hücrelerinde glikolitik yolda görevli birçok genin ekspresyon seviyesi azalmaktadır. Gcr1 proteini glikolitik genlerin promotor bölgelerinde bulunan 5'-CTTCC-3' (CT kutusu) konsensus dizisine bağlanarak transkripsiyonlarını aktive etmektedir (Baker, 1986; 1991; Scott ve Baker, 1993). Ayrıca, glikolitik genlerin dışında, Gcr1 proteini piruvattan alkol oluşumunda görev alan alkol dehidrogenaz (*ADH1*) geninin de promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Hu ve ark., 2007).

Son yıllarda kanser araştırmalarında oldukça yoğun bir şekilde maya türleri metabolik modelleme çalışmalarında, gen terapilerinde ve ilaç uygulamalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca moleküler alanda gerçekleşen teknolojik gelişmeler sayesinde mikroarray ve RNAseq gibi farklı analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Böylece elde edilen biyoinformatik veriler bilim insanlarının yararlanabilmesi için farklı veri tabanları ve sunucular üzerinden kullanıma sunulmuştur. Örneğin

SGD (*Saccharomyces* Genome Database) genetik ve moleküler çalışmalar sonucu oluşturulmuş oldukça geniş kapsamlı bir veri tabanıdır. Bu veri tabanı içinde farklı maya suşlarıyla ilişkili genlerin, proteinlerin, metabolik yolların ve temel olan birçok araştırmanın verileri bulunmaktadır. SGD veri tabanı, maya hücresinin genetik işleyişi, fizyolojik yapısı ve regülasyonu ile ilgili temel bilgilerin öğrenilmesi ve geliştirilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir (Winzeler ve ark., 1999; Cherry ve ark., 2012). Çalışmamızda, Warburg etkisine benzerlik gösteren Crabtree pozitif maya türleri ve Crabtree negatif maya türlerinde *GCR1* geninin *in silico* analizi yapıldı. Crabtree pozitif ve negatif maya türlerinde *GCR1* gen bölgesi, promotor bölgesi ve Gcr1 proteinin dizi analizlerinin karşılaştırılması yapılarak aralarındaki benzerlik ve farklılıklar belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca, Gcr1 proteinin bağlanabilmesi için gerekli olan CT promotor elementleri ve olası nükleozom pozisyonları belirlendi.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

*S. cerevisiae* maya türüne ait *GCR1* geni ve promotor bölgesi ile Gcr1 proteinine ait amino asit dizisi SGD (<https://www.yeastgenome.org>) veri tabanı üzerinden alınarak “.fasta” formatında kaydedildi. Daha sonra, SGD veri tabanında bulunan “Analyze Sequence” seçeneğinde yer alan “Blastp vs Fungi” sekmesi kullanılarak Sc-Gcr1p ile benzerlik gösteren proteinleri içeren maya türleri belirlendi. Blossum62 parametresi kullanılarak varsayılan parametreler ile Protein Blast analizi yapıldı. Sc-Gcr1p ile benzerlik gösteren proteinleri içeren maya türleri arasından beş Crabtree pozitif ve beş Crabtree negatif maya türü seçildi ve sonraki çalışmalar bu maya türleri ile yapıldı.

Seçilen maya türlerinin Gcr1 proteini ve Gcr1 benzeri protein (Gcr1-like protein, Gcr1-Lp) dizilerine ait erişim numaraları kullanılarak “UNIPROT” protein veri tabanı (<https://www.uniprot.org/>) üzerinden amino asit dizileri indirildi. Gcr1 proteini lösin-fermuar yapısında DNA bağlanma modeline sahip bir transkripsiyon aktivatörüdür. Bu nedenle Sc-Gcr1 proteinin lösin-fermuar yapısı ile DNA bağlanma bölgesine ait amino asit dizileri ile seçilen maya türlerine ait Gcr1 ve Gcr1-L proteinleri MEGA-X programı kullanılarak benzerlik gösteren aminoasit dizileri belirlendi ve “.fasta” formatında kaydedildi. Amino asit dizileri arasındaki benzerlik MEGA-X programı içerisinde yer alan ClustalW programında hizalanarak belirlendi (Kumar ve ark., 2018). Hizalama parametreleri, BLOSSUM ve varsayılan parametre olarak kabul edildi. Böylece proteinlerin lösin fermuar yapıları ve DNA bağlanma bölgeleri arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edildi.

*S. cerevisiae* maya türünün *GCR1* genine ait promotor dizisi “Yeasttract” (<http://www.yeasttract.com/>) veri tabanından alındı. Seçilen Crabtree pozitif ve negatif maya türlerinin Gcr1-Lp için kodlu gen bölgelerine ait promotor dizilerinin belirlenmesi için National Center for Biotechnology Information (NCBI) bünyesinde bulunan NCBI-Genome veri tabanı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) kullanıldı. NCBI-Genome veri tabanı üzerinden seçilen maya türlerinin genomu, transkript dizileri ve proteinlerine ait amino asit dizileri alındı. Genom üzerinde olası *GCR1* ile ilişkili genlerin ORF bölgeleri dikkate alınarak başlangıç nükleotidinden (+1/ATG) yaklaşık 1000 nükleotid geriye doğru olan DNA bölgesi olası promotor bölgesi olarak “.fasta” formatında kaydedildi. Ancak bazı promotor bölgelerinin uzunluğu bir önceki gene ait ORF dikkate alındığında 1000nt altında kaldı. CT kutusu taraması ise, başlangıç nükleotidi (+1/ATG) ile -250bp arasındaki promotor bölgesi içerisinde yapılarak CT kutularının yerleri belirlendi. Promotor bölgelerinde bulunması muhtemel nükleozomların pozisyonları Chromatin Folding V2 programı ([www.dna.ccs.tulane.edu](http://www.dna.ccs.tulane.edu)) kullanılarak tespit edildi.

## 3. SONUÇ ve TARTIŞMA

Çalışmamızda, SGD veri tabanı üzerinden *S. cerevisiae* maya türüne ait Gcr1 proteini ile benzerlik gösteren maya türleri NCBI-Blastp aracı kullanılarak belirlendi. Benzerlik gösteren maya türleri

arasından Crabtree pozitif ve Crabtree negatif özellikte olan 5 farklı maya türü seçildi. Crabtree pozitif olarak, *S. cerevisiae* (referans maya türü), *Saccharomyces eubayanus*, *Candida glabrata*, *Lahance fermentati* ve *Lahance thermotolerans* maya türleri, Crabtree negatif olarak, *Eremothecium cymbalariae*, *Eremothecium gossypii*, *Eremothecium sinicaudum*, *Kluyveromyces marxianus* ve *K. lactis* maya türleri seçildi. Seçilen maya türlerinin GenBank Assemble numaraları, gen tanımlamaları, suş kodları ve ilgili genlerin GenBank erişim numaraları Tablo1’de verildi. *S. cerevisiae* maya türüne ait Gcr1 proteini ile seçilen maya türlerinin Protein-Blast analizi sonucunda *K. marxianus* Gcr1 proteini (benzerlik oranı: %63,98) ve *S. eubayanus* maya türünde Gcr1 benzeri protein (Gcr1-like protein) (benzerlik oranı: %84,81) ile eşleşme bulundu. Diğer maya türlerinde ise karakterize edilemeyen (uncharacterized) protein olarak tanımlanmakla beraber *S. cerevisiae* *GCR1* ile syntenik homolog veya UNIPROT üzerinden Sc-Gcr1p ile benzer amino asit dizi içerdiği tespit edildi (Tablo 1). *K. lactis* maya türünde (GenBank Assemble No: GCA\_000002515.1) yaptığımız analiz sonucuna göre, Sc-Gcr1p ile eşleşme gösteren protein karakterize edilemeyen protein olarak tanımlanmasına rağmen, yapılan bir çalışmada *KIGCR1* geninin DNA dizisinin 767 amino asitlik bir açık okuma çerçevesine (ORF) sahip olduğu ve Sc-Gcr1p ile %48 benzerlik içerdiği belirlenmiştir (Haw ve ark., 2001). Ancak yaptığımız çalışmada Sc-Gcr1 protein ile *KIGcr1p* benzerlik oranı %67,90 olarak bulundu. Diğer maya türlerinde eşleşme gösteren protein dizilerinin Sc-Gcr1 protein dizisi ile benzerlik oranları *C. glabrata* için %48,71, *L. fermentati* için %36,78, *L. thermotolerans* için %37,91, *E. cymbalariae* için %66,45, *E. gossypii* için %60,20, *E. sinicaudum* için %67,31 ve *K. marxianus* için %63,98 olarak bulundu.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılmak üzere seçilen Crabtree pozitif ve Crabtree negatif maya türlerinin listesi ve analizlerde kullanılan erişim numaraları

GenBank Assemble No.	Maya Türü	Suş Kodu	GenBank Erişim No	Gen Tanımı
GCA_000146045.2	<i>S. cerevisiae</i>	S288-C	NP_015250.1	transcription regulator, <i>GCR1</i>
GCA_001298625.1	<i>S. eubayanus</i>	FM-1318	XP_018218957.1	<i>GCR1</i> -like protein
GCA_000002545.3	<i>C. glabrata</i>	CBS-138	XP_447030.2	uncharacterized protein
GCA_900074765.1	<i>L. fermentati</i>	-	SCW03601.1	uncharacterized protein
GCA_000142805.1	<i>L. thermotolerans</i>	CBS-6340	XP_002554024.1	uncharacterized protein
GCA_000235365.1	<i>E. cymbalariae</i>	DBVPG - 7215	XP_003647710.1	hypothetical protein
GCA_000091025.4	<i>E. gossypii</i>	ATCC-10895	NP_984616.1	uncharacterized protein
GCA_001548555.1	<i>E. sinicaudum</i>	ATCC-58844	XP_017987801.1	uncharacterized protein
GCA_000002515.1	<i>K. lactis</i>	NRRLY-1140	XP_455009.1	uncharacterized protein
GCA_001417885.1	<i>K. marxianus</i>	DMKU3-1042	XP_022674269.1	transcription regulator, <i>GCR1</i>

Maya türlerinin Sc-Gcr1p ile eşleşme gösteren proteinlerin içerdiği amino asit sayısı, bu amino asitler için kodlu DNA bölgesinin uzunluğu ve bu genler için seçilen promotor bölgesinin uzunluğu Tablo 2’de verildi. *S. cerevisiae* *GCR1* geni içerisinde 751nt uzunluğunda bir intron bulunduğundan kodlu DNA bölgesinin uzunluğu Tablo 2’de 3109nt olarak verildi.

*S. cerevisiae* Gcr1 proteini ve seçilen maya türlerine ait amino asit dizileri MEGA-X programı içerisinde yer alan ClustalW algoritması ve Blossum parametresi kullanılarak hizalandı. *S. cerevisiae* Gcr1p dimerik yapıda olduğundan lösün fermuar yapısı ve DNA bağlanma bölgesi içermektedir. Tüm aminoasit dizilerinde lösün fermuar yapısı ve DNA bağlanma bölgelerine ait aminoasit dizilerinin taraması yapılarak seçilen maya türleri ile eşleşme gösteren aminoasit dizileri tespit edildi. Daha sonra, bu diziler ile referans *S. cerevisiae* maya türüne ait lösün fermuar yapısı ve DNA bağlanma bölgesine ait aminoasit dizileri MEGA-X programında aynı parametreler ile yeniden hizalandı. Elde edilen hizalama sonuçları lösün fermuar yapısı için Şekil 1’de, DNA bağlanma bölgeleri için Şekil 2’de gösterildi.

**Tablo 2.** Gcr1p ve Gcr1p ile eşleşen proteinlerin amino asit sayıları, kodlu DNA bölgelerinin ve analizlerde kullanılan promotor bölgelerinin uzunluğu

Maya Türü	Amino asit sayısı	Kodlu DNA bölgesi (nt)	Promotor bölgesi (nt)
<i>S. cerevisiae</i>	785	3108	974
<i>S. eubayanus</i>	854	2564	1000
<i>C. glabrata</i>	1017	3053	1000
<i>L. fermentati</i>	661	1985	1000
<i>L. thermotolerans</i>	670	2012	1000
<i>E. cymbalariae</i>	733	2201	1000
<i>E. gossypii</i>	712	2138	756
<i>E. sinicaudum</i>	743	2231	785
<i>K. lactis</i>	767	2303	1000
<i>K. marxianus</i>	815	2447	1000

Protein Sequences	
Species/Abbrv	
1. <i>S. cerevisiae</i>	K K L T T E N I R L S Q E I T Q L K A D M N S V G N V C N Q I L L L Q R Q
2. <i>S. eubayanus</i>	K K L T T E N I R L S Q E I T Q L K S D M N S V G N V C N Q I L Q L Q R Q
3. <i>C. glabrata</i>	K K L T T E N I R L S Q E I T Q L K S D L N S V T S M C N Q I L Q L Q R K
4. <i>L. fermentati</i>	R R F T L H N Q S L S Q E I Q N L R V E M G S M K Q L L S E L L Q S Q R Q
5. <i>L. thermotolerans</i>	R R F V L H N Q S L S E E I R E L K S E L R S M K Q L I S E L L S S Q R Q
6. <i>E. sinicaudum</i>	N K V S Q H N L R L N Q E I I S L K N E L N M N S M I Y Q V L Q F Q R Q
7. <i>E. gossypii</i>	A K T A Q D N T K L N S E I S D L K G K L N S M S S M I S Q L L E S Q R Q
8. <i>E. cymbalariae</i>	S K A S K E N C I L N E K L L C L R N E L N M N S M I S Q I L Q F Q R Q
9. <i>K. lactis</i>	K D L V T E N D K L S N E L R T M K S Q M A S M T A V V N Q I F H T Q R Q
10. <i>K. marxianus</i>	K D L V S E N D K L S K E I N S M K S Q I A S M N T M I S Q M F Q T Q R Q

**Şekil 1.** Gcr1p ve Gcr1 benzeri proteinlerin lösün fermuar yapısına ait amino asit dizilerinin MEGA-X programı ile hizalanması

Species/Abbrv	Protein Sequences
1. S. cerevisiae	- N E A I K Y K L S R E N K T I W D L Y A E W Y I G L N G K S I K K L I E N Y G W R R W K V S E D S H F F P T R R I I M D -
2. S. eubayanus	- N E A I K Y K L S R E N K T I W D L Y A E W Y I G L N G K S I K K L I E N Y G W R R W K V S E D S H F F P T R R I I M D -
3. C. glabrata	- L P L K Y K L S R D N K T I W D L Y A E W Y I G L N G Q P S I R K L I E D Y G Y R R W K V S D D S H F F P T R R V I I D -
4. L. fermentati	- - E A L K Y K L S R E N K T I W D L Y S E W Y I G L N G K P S I K S L I D T Y G W R R W K V S E D S H F F P T R R I I D D
5. L. thermotolerans	- - E V F K Y K L S R E N K T I W D L Y T E W Y V G L N G K P S I K S L I D T Y G W R R W K V S E D S H F F P T R R I I D D
6. E. sinicaudum	N S D S I K Y K L S R E N K T V W D L Y T E W Y T G L N G K P S I K S L I E K Y G W R R W K V S E D S H F F P T R R I I M N -
7. E. gossypii	P N E S I K Y K L S R D N K T I W D L Y T E W Y K G F D G K P S I K S L I E R Y G W R R W K V S D D S H F F P T R R I I N -
8. E. cymbalariae	P N E S I K Y K L S R E N K T I W D L Y T E W Y I G L N G K P S I K S L I E R Y G W R R W K V S D D S H F F P T R R I I N -
9. K. lactis	P N M D I K Y K L S R D N K T I W D L Y N E W Y H G L N G K L S I K E L I E K Y G Y R R W K V T E D S H F F P T R R I I D -
10. K. marxianus	P N R D I K Y K L S R D N K T I W D L Y N E W Y H G L N G K L S I K E L I E K Y G Y R R W K V A E D S H F F P T R R V I I D -

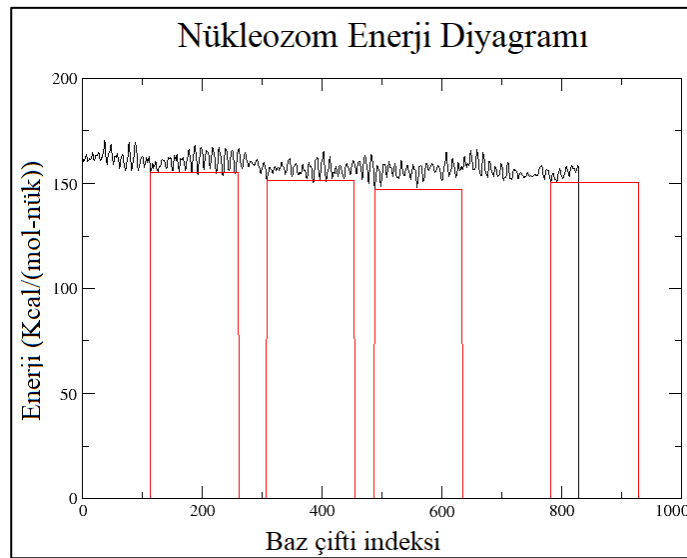
Şekil 2. Gcr1p ve Gcr1 benzeri proteinlerin DNA bağlanma bölgelerine ait amino asit dizilerinin MEGA-X programı ile hizalanması

MEGA-X programından elde edilen hizalama sonuçlarına göre lösün-fermuar yapısına ait amino asit dizilerinde benzerlik oranının oldukça düşük olduğu görüldü. Benzerlik oranı en az % 80 ve üzeri olan bölgeler renkli olarak işaretlendi. Ayrıca amino asit dizileri incelendiğinde, aynı cinse ait olan maya türlerinin lösün fermuar yapısında amino asit dizilerinde benzerliğin yüksek olduğu tespit edildi. Örneğin, *Saccharomyces* cinsine ait iki maya türünün aminoasit dizileri arasında sadece 2 aminoasit farklılığı görüldü.

Crabtree pozitif ve negatif maya türlerinin DNA bağlanma bölgelerine ait aminoasit dizilerinin MEGA-X programı ile yapılan hizalama sonucunda, maya türlerinin proteinlerinin DNA bağlanma bölgelerinde büyük oranda benzerlik olduğu gözlemlendi. Benzerlik oranı en az % 80 ve üzeri olan bölgeler renkli olarak işaretlendi. Çalışmamızda, referans *S. cerevisiae* maya türünün Gcr1p ile benzerlik gösteren Crabtree pozitif ve negatif maya türlerinin *in silico* analiz sonucuna göre, fonksiyonu tam olarak bilinmeyen bazı genlerin Gcr1 benzeri protein kodladığı biyoinformatik olarak gösterildi. Ayrıca, proteinlerin DNA bağlanma bölgelerinde yüksek oranda homoloji bulunması, bu proteinlerin DNA'ya bağlanabilme özelliğine sahip olabileceğini göstermektedir.

Gcr1 transkripsiyon aktivatör proteini glikolitik genlerin transkripsiyonlarını, Rap1 ve Abf1 gibi transkripsiyon regülarörleri ile interaksiyona girerek regüle etmektedir. Ayrıca, Gcr1 proteini *GCR1* promotorunda bulunan CT kutularına bağlanarak kendi transkripsiyonunu regüle etmektedir (Sasaki ve ark., 2005). Ancak, diğer glikolitik genlerin aksine, *GCR1* transkripsiyonunun regülasyonunu da Gcr1 proteini diğer transkripsiyon aktivatörlerinden bağımsız olarak yalnız hareket etmektedir. Promotor bölgesinde lokalize olan nükleozomların mobilizasyonu, transkripsiyon faktörlerinin ve regülatörlerinin (aktivatörler/inhibitörler) bağlanması ve transkripsiyonun regülasyonu için önemlidir. Bu neden çalışmamızda Gcr1 proteini ile benzerlik gösteren proteinleri kodlayan genlerin promotor bölgelerinde Sc-Gcr1 proteininin spesifik olarak bağlandığı CT elementi taraması yapıldı ve olası nükleozomların pozisyonları belirlenerek nükleozomların CT kutuları ile kapatılıp kapatılmadığı belirlendi.

Çalışmamızda *S. cerevisiae* maya türünün *GCR1* genine ait promotor dizisi, "Yeasttract" veri tabanından, diğer maya türlerinin Gcr1 proteini ile benzerlik gösteren proteinlerini kodlayan genlerin promotor bölgeleri NCBI-Genom veri tabanı kullanılarak belirlendi. Maya türlerine ait promotor bölgesine ait nükleotid dizilerinin muhtemel nükleozom pozisyonları Chromatin Folding V2 programı ile tespit edildi. *S. cerevisiae* maya türüne ait promotor bölgesinin enerji diyagramı örnek olarak Şekil 3'te verildi. Diğer maya türlerine ait nükleozom pozisyonları ise Tablo 3'te liste olarak CT elementlerinin pozisyonları ile birlikte verildi.



Şekil 3. *S. cerevisiae* maya türüne ait promotor bölgesinin nükleozom enerji diyagramı

**Tablo 3.** CT elementlerinin ve nükleozomların promotor bölgelerindeki pozisyonları

Maya Türü	CT Elementlerinin Pozisyonu (nt)	Nükleozomların Pozisyonu (nt)	
Crabtree Pozitif	<i>S. cerevisiae</i>	108-114/188-192	150-270/310-470/490-630/780-910
	<i>S. eubayanus</i>	-	0-175/200-350/690-820/830-1000
	<i>C. glabrata</i>	-	110-260/275-420/550-700/725-875
	<i>L. fermentati</i>	169-173/223-227	0-150/230-390/450-600/750-900
	<i>L. thermotolerans</i>	236-240	50-220/380-520/620-750/850-1000
Crabtree Negatif	<i>E. cymbalariae</i>	195-199	0-150/275-410/475-610/710-870
	<i>E. gossypii</i>	-	160-310 310-460/490-620
	<i>E. sinicaudum</i>	39-45	10-160/320-460/550-700
	<i>K. lactis</i>	145-149	40-200/310-460/605-750/810-970
	<i>K. marxianus</i>	134-138/191-195/204-208	20-180/300-450/460-605/650-800

Promotor analizi sonuçlarına göre, *E. gossypii* ve *E. sinicaudum* maya türlerinin promotor bölgesinde 3 olası nükleozom yapısını bulunabileceği, diğer tüm maya türlerinin promotor bölgelerinde ise 4 olası nükleozom yapısının bulunabileceği tespit edildi. *S. eubayanus*, *C. glabrata* ve *E. gossypii* maya türlerinin promotor bölgelerinde CT elementlerinin bulunmadığı belirlendi. *S. cerevisiae*, *E. sinicaudum*, *K. lactis* ve *K. marxianus* maya türlerinde CT kutularının nükleozom yapıları ile kapatıldığı gözlemlendi. Diğer maya türlerinde CT kutularının nükleozomlar tarafından kapatılmadığı ve açıkta kaldığı belirlendi. Gcr1p ya da Gcr1p benzeri proteinlerin CT elementlerine bağlanması nükleozomların pozisyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Eğer nükleozom yapıları CT elementlerini kapatmamış ise Gcr1 proteininin bu bölgelere bağlanabilmesi ve transkripsiyonu aktive edebilmesi daha kolay gerçekleşmektedir.

Çalışma kapsamında Crabtree pozitif ve negatif maya türlerinde Gcr1p ve Gcr1p benzeri proteinlerin yapıları arasında ve promotor analizlerinde farklılığa rastlanmamıştır. Tespit edilen benzerlikler ve farklılıklar türler arasında değişkenlik göstermekte olup Crabtree pozitif veya negatif maya türlerine özgü farklılıklar değildir.

### Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TÜBİTAK-2209-A programı kapsamında desteklenmiştir.

### KAYNAKÇA

Baker, H. V. (1986). Glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence of *GCR1*, null mutants, and evidence for expression. *Molecular and Cellular Biology*, 6(11), 3774-3784. DOI:10.1128/mcb.6.11.3774-3784.1986.

Baker, H. V. (1991). *GCR1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTC: sequence motif. *Proceedings of the National*



- Academy of Sciences of the United States of America, 88(21), 9443- 9447. DOI:10.1073/pnas.88.21.9443.
- Barnett, J. A. (1998). A history of research on yeasts. 1: Work by chemists and biologists 1789-1850. *Yeast*, 14(16), 1439-1451.
- Breunig, K. D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M. M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J. J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma H. Y., Wesolowski-Louvel, M., & Zeeman, A. M. (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), 771–780. DOI:10.1016/s0141-0229(00)00170-8
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S., & Wong, E.D., (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D700–D705.
- Crabtree, H. G., (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical Journal*, 23(3), 536–545. DOI:10.1042/bj0230536.
- De Deken, R. H. 1966. The crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(2), 149–56. DOI:https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149.
- Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., & Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 568–576. DOI:10.1016/j.bbabi.2010.08.010.
- Fredlund, E. (2004). *Central carbon metabolism in the biocontrol yeast Pichia anomala—influence of oxygen limitation* (Doctoral Dissertation). Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.
- Gancedo, C., & Serrano, R. (1989). Energy yielding metabolism. In: A. H. Rose & J.S. Harrison (Eds), *The Yeasts*. Academic Press, London.
- Hammad, N., Rosas-Lemus, M., Uribe-Carvajal, S., Rigoulet, M., & Devin A. (2016). The Crabtree and Warburg effects: Do metabolite-induced regulations participate in their induction? *Biochimica et Biophysica Acta* 1857, 1139–1146. DOI:https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.034.
- Haw, R., Yarragudi A. D., & Uemura, H. (2001). Isolation of GCR1, a major transcription factor of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 18(8), 729-35. DOI:10.1002/yea.718.
- Hu, Y., Rolfs, A., Bhullar, B., Murthy, T. V. S., Zhu, C., Berger, M. F., Camargo, A. A., Kelley, F., McCarron, S., Jepson, D., Richardson, A., Raphael, J., Moreira, D., Taycher, E., Zuo, D., Mohr, S., Kane, M. F., Williamson, J., Simpson, A., Bulyk, M. L., Harlow, E., Marsischky, G., Kolodner, R. D., & LaBaer, J. (2007). Approaching a complete repository of sequence-verified protein-encoding clones for *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research*, 17(4), 536-43. DOI:10.1101/gr.6037607.
- Ikushima S., Fujii T., Kobayashi O., Yoshida S., & Yoshida A. (2009). Genetic engineering of *Candida utilis* yeast for efficient production of L-lactic acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(8), 1818-1824. DOI:10.1271/bbb.90186.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. DOI:10.1093/molbev/msy096.
- Menacho-Márquez, M., & Murguía, J. R. (2007). Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clinical and Translational Oncology*, 9(4), 221-228. DOI:https://doi.org/10.1007/s12094-007-0043-2.

- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6 (1), 1–31. DOI:10.3934/microbiol.2020001.
- Sasaki, H., Kishimoto, T., Mizuno, T., & Uemura, H. (2005). Expression of GCR1, the transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is positively autoregulated by Gcr1p. *Yeast*, 22(4), 305-319.
- Scott, E. W., & Baker, H. V., 1993. Concerted action of the transcriptional activators *REBI*, *RAP1*, and *GCRI* in the high-level expression of the glycolytic gene *TPI*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), 543-550.
- Tamakawa, H., Ikushima S., & Yoshida S. (2012). Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(1), 73-75. DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.09.002.
- Tamakawa, H., Mita, T., Yokoyama, A., Ikushima, S., & Yoshida, S. (2013). Metabolic engineering of *Candida utilis* for isopropanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6231-6239. DOI:10.1007/s00253-013-4964-0.
- Uemura, H., & Jigami, Y. (1995). Mutations in *GCRI*, a Transcriptional Activator of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic genes, function as suppressors of *gcr2* mutations. *Genetics*, 139(2), 511-521. PMID:PMC1206363.
- Winzeler, E. (1999). Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901-906. DOI:10.1126/science.285.5429.901