

ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА БИОТИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ *Komagataella phaffii*

© 2023 А.С. Макеева, А.В. Сидорин, В.В. Иштуганова,
М.В. Падкина, А.М. Румянцев*

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: rumyantsev-am@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2023

После доработки 26.07.2023

Принята к публикации 31.07.2023

Метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* активно используются в биотехнологии для синтеза рекомбинантных белков. В связи с высокой практической значимостью этих дрожжей необычайно важным является тщательный подбор условий культивирования и оптимизация состава сред. В данной работе на уровне транскриптома было изучено влияние дефицита биотина на экспрессию генов у этих дрожжей. Было показано, что ответ клеток *K. phaffii* на недостаток биотина сильно зависит от источника углерода в среде. В средах, содержащих глицерин, дефицит биотина приводил к активации генов метаболизма биотина, глиоксилатного цикла и синтеза ацетил-СоА в цитоплазме, а также подавлению генов глюк- и липогенеза. В средах, содержащих метанол, дефицит биотина в первую очередь приводил к подавлению генов, вовлеченных в синтез белков, и активации ответа клетки на окислительный стресс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Komagataella phaffii*, биотин, глицерин, метанол, транскриптомный анализ, дифференцированная экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972523090166, EDN: WVQDFI

ВВЕДЕНИЕ

Дрожжи *Komagataella phaffii* (также известные как *Pichia pastoris*) – высокоэффективный продуцент рекомбинантных белков. Они используются для синтеза интерлейкинов, интерферонов, антимикробных пептидов, ферментов и множества других белков, а также пищевых добавок [1].

Благодаря особенностям физиологии и метаболизма *K. phaffii* обладают рядом преимуществ в качестве системы экспрессии. Эти дрожжи обеспечивают правильную укладку гетерологичных эукариотических белков и их посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и формирование дисульфидных связей. Недавно для *K. phaffii* были также разработаны методы модификации систем гликозилирования, которые позволяют синтезировать в этих дрожжах белки, гликозилированные по типу белков млекопитающих

и человека [1]. Из-за низкого уровня секреции собственных эндогенных белков *K. phaffii* привлекательны в качестве системы для синтеза секреторных белков. Эти дрожжи относятся к так называемым «Крэбтри-негативным» дрожжам, которые характеризуются дыхательным типом метаболизма. В связи с этим *K. phaffii* демонстрируют большую скорость роста и высокую плотность клеток при культивировании на сравнительно простых и дешевых средах [2, 3].

K. phaffii способны утилизировать различные источники углерода, в частности, глицерин и метанол. В ходе окислительного метаболизма глицерин фосфорилируется с образованием глицерин-3-фосфата, который затем окисляется до дигидроксиацетонфосфата (DHAP). DHAP преобразуется в глицеральдегид-3-фосфат (GAP) и вступает в путь гликолиза. В качестве альтернативы GAP может вступать в реакции глюконеогенеза за счет ак-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; DAPA – 7,8-диаминопелларгонат; DHAP – дигидроксиацетонфосфат; GAP – глицеральдегид-3-фосфат; KAPA – 8-амино-7-оксонаноат; ОхАс – оксалоацетат; PEP – фосфоенолпируват; PEPCK – фосфоенолпируваткарбоксикиназа.

* Адресат для корреспонденции.

тивности цитозольных альдозаз, которые катализируют обратимое преобразование DHAP и GAP в фруктозо-1,6-бисфосфат (F-1,6-BP). F-1,6-BP превращается в фруктозо-6-фосфат, который может вступать в реакции пентозо-фосфатного пути [4].

Утилизация метанола в клетках *K. phaffii* начинается с окисления метанола до формальдегида под действием алкогольоксидазы. Этот процесс происходит в пероксисомах. Затем формальдегид может быть окислен в пути диссимиляции либо ассимилирован клеткой за счет конденсации с ксилулозо-5-фосфатом (Xu5P). В результате последней реакции Xu5P и формальдегид преобразуются в дигидроксияцетон и GAP, которые далее метаболизируются в цитоплазме [5].

Экспрессия генов метаболизма метанола (*MUT*-генов) строго регулируется в зависимости от источника углерода: она подавляется в присутствии глюкозы или глицерина в среде и индуцируется в присутствии метанола. Сильные метанол-индуцируемые промоторы *MUT*-генов, такие как промотор гена алкогольоксидазы 1 (*AOX1*), широко используются для экспрессии гетерологичных генов в *K. phaffii*.

Производство белков в *K. phaffii* обычно происходит с использованием двухстадийной схемы культивирования, чтобы разобщить процессы накопления биомассы и синтеза белка. На первой стадии дрожжевые клетки выращивают в среде с глицерином. В таких условиях экспрессия гетерологичных генов под контролем промотора *AOX1* подавлена. После переноса клеток в среду, содержащую метанол, происходит индукция синтеза белка. В связи с важностью *K. phaffii* как объекта биотехнологии в настоящее время активно изучается влияние состава культивационной среды на физиологию этих дрожжей [6–11].

Биотин (или витамин Н) является важным компонентом, необходимым для роста разных организмов. Он играет значительную роль как кофактор ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования в процессах липогенеза, глюконеогенеза и метаболизма аминокислот. Было также показано, что биотин участвует в контроле метаболизма углерода и адаптации к изменениям в содержании источника углерода в среде [12].

Бактерии, растения и некоторые низшие грибы способны синтезировать биотин *de novo*. Многие другие организмы вынуждены получать этот витамин из пищи. В отличие от большинства микроорганизмов, некоторые виды дрожжей, включая *K. phaffii* и большинство штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, потеряли

способность синтезировать биотин самостоятельно. Метаболизм биотина и последствия биотинового голодания изучались в основном у дрожжей *S. cerevisiae*, и очень мало известно об этих процессах у *K. phaffii*.

Дрожжи *S. cerevisiae* имеют 6 биотин-зависимых ферментов, вовлеченных в метаболизм сахаров, жиров и аминокислот: цитоплазматическая (*Acc1*) и митохондриальная (*Hfa1*) ацетил-СoА карбоксилазы; пируваткарбоксилазы *Pyc1*, *Pyc2*; амидолиаза мочевины *Dur1,2* и кофактор аминокислотирования тРНК *Arg1*. Ковалентное присоединение биотина к белкам *Pyc1,2* и *Acc1* осуществляется биотин-протеинлигазой *Bpl1* [13]. Несмотря на то что большинство штаммов *S. cerevisiae* являются ауксотрофами по биотину, они способны синтезировать биотин из таких предшественников, как 8-амино-7-оксонаноат (КАРА), 7,8-диаминопеларгонат (ДАРА) и детиобиотин. Ферменты, обеспечивающие превращение КАРА через ДАРА и детиобиотин в биотин кодируются генами *BIO3*, *BIO4*, *BIO2*. Транспортёр биотина *Vht1* обеспечивает поглощение экзогенного биотина, а его предшественники транспортируются через мембранный белок *Bio5* [13]. Некоторые штаммы *S. cerevisiae* также располагают генами *BIO1* и *BIO6*, чьи продукты участвуют в вышележащих этапах биосинтеза биотина. Они обеспечивают образование КАРА из пимелиновой кислоты, что позволяет клеткам медленно расти на среде без биотина [14].

Дрожжи *K. phaffii* имеют только ортолог гена *BIO2*, позволяющего расти на среде с детиобиотином, тогда как остальные гены биосинтеза биотина у них отсутствуют. Было показано, что *K. phaffii* способны расти на среде с КАРА и ДАРА или на среде без биотина только после интеграции и сверхэкспрессии соответствующих генов *S. cerevisiae*. Таким образом, штаммы *K. phaffii*, используемые для производства белков, нуждаются в добавлении большого количества этого витамина в среду [15].

Целью данного исследования является изучение влияния дефицита биотина на экспрессию генов в клетках *K. phaffii* на уровне транскриптома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. В работе использовался штамм дрожжей *K. phaffii* X-33 («Thermo Fisher Scientific», США).

Модификации стандартных сред BMG (buffered minimal glycerol) и ВММ (buffered minimal methanol) с разными концентрациями

биотина использовались для культивирования *K. phaffii* и транскриптомного анализа. Сначала приготовили исходные растворы сред BMG и BMM без биотина. Они содержали 100 мМ фосфата калия (рН 6,0), 1% глицерина (для сред BMG) или 0,5% метанола (для сред BMM), а вместо коммерческой смеси YNB (содержащей биотин) была использована соответствующая смесь витаминов (за исключением биотина), солей, источников азота и микроэлементов (таблица). Смесь была составлена на основе рецепта коммерческой YNB без аминокислот, содержащей сульфат аммония («Sigma-Aldrich», США; #Y0626 KG).

Среды BMG и BMM без биотина обозначены как BMG(B–) и BMM(B–). BMG(B+) и BMM(B+) содержали биотин в концентрации 2 мкг/литр ($2 \times 10^{-7}\%$). BMG(B++) и BMM(B++) содержали 400 мкг/литр ($4 \times 10^{-5}\%$) биотина.

Клетки дрожжей культивировались при 30 °С.

Культивирование клеток *K. phaffii* для транскриптомного анализа. В 300 мл среды BMG(B+) с глицерином и BMM(B+) с метанолом вносили клетки штамма X-33. После 22 ч культивирования из каждой культуры отбирали 2 равных объема (по 90 мл). Клетки из этих объемов собирали с помощью центрифугирования (10 мин при 3000 g). Для каждого варианта источника углерода клетки из одной пробы разводили в 90 мл среды с соответствующим источником углерода и без биотина. Клетки из второй пробы разводили в 90 мл соответствующей среды с концентрацией биотина 400 мкг/литр. Из каждой пробы отбирали по 3 объема по 20 мл и культивировали их отдельно в течение 24 ч.

Выделение РНК и приготовление библиотек.

Тотальная РНК была выделена из клеток с использованием набора YeaStar RNA Kit («Zymo Research», США; #R1002). После выделения пробы обрабатывали ДНКазой («Thermo Fisher Scientific»; #EN0525) и очищали с помощью набора CleanRNA Standard («Евроген», Россия; #BC033). Качество выделенной РНК оценивали с помощью агарозного гель-электрофореза.

300 нг тотальной РНК каждого образца использовали для приготовления библиотек с помощью набора QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina («Lexogen», Австрия; #015.96). Качественный и количественный анализ образцов производили с помощью флуориметра Qubit и капиллярного электрофореза в системе Agilent 2200 TapeStation System («Agilent Technologies», США). Секвенирование производили с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2 (1 × 300; «Illumina»,

Состав смеси витаминов, солей и микроэлементов

Компонент	Концентрация
Витамины	
Пантотенат кальция	0,8 мг/литр
Фолиевая кислота	4 мкг/литр
Инозитол	4 мг/литр
Никотиновая кислота	0,8 мг/литр
4-Аминобензойная кислота	0,4 мг/литр
Пиридоксин HCl	0,8 мг/литр
Рибофлавин	0,4 мг/литр
Тиамин HCl	0,8 мг/литр
Микроэлементы	
Борная кислота	1 мг/литр
Сульфат меди	0,08 мг/литр
Йодид калия	0,2 мг/литр
Хлорид железа (III)	0,4 мг/литр
Сульфат марганца	0,8 мг/литр
Молибдат натрия	0,4 мг/литр
Сульфат цинка	0,8 мг/литр
Соли	
Одноосновный фосфат калия	1 г/литр
Сульфат магния	0,5 г/литр
Хлорид натрия	0,1 г/литр
Хлорид кальция	0,1 г/литр
Сульфат аммония	5 г/литр

США; #MS-102-2002) на секвенаторе MiSeq («Illumina»).

Биоинформатический анализ. С помощью программы Trimmomatic [16] были удалены адаптеры и индексы и отфильтрованы прочтения. Качество прочтений проверяли с помощью программы FastQC [17]. Для выравнивания использовали геном дрожжей *K. phaffii*

(ASM2700v1) и аннотацию из базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Прочтения выравнивали с помощью hisat-2 [18] со стандартными параметрами. После выравнивания прочтения отсортировали и проиндексировали с помощью samtools [19]. Для подсчета количества выровненных прочтений использовали программу featureCounts [20]. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили при помощи языка программирования R (версия 3.6.3) и библиотеки DESeq2 (версия 1.24.0) [21]. Для дальнейшего анализа использовались гены, скорректированное значение p -value которых было меньше 0,05 и значение логарифма изменения экспрессии ($\log_2\text{FoldChange}$) было больше 0,5 по модулю.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток *K. phaffii* для транскриптомного анализа. Биотин в концентрации 2 мкг/литр часто используется для культивирования дрожжей *S. cerevisiae*, тогда как гораздо более высокие концентрации рекомендуется использовать для *K. phaffii*. В нашем исследовании мы культивировали клетки *K. phaffii* в 2 этапа. Сначала мы растили штамм X-33 в средах BMG(B+) и BMM(B+). На этом этапе мы использовали концентрацию биотина 2 мкг/литр, чтобы на последующих этапах культивирования эффекты голодания по биотину проявились быстрее и ярче. При культивировании *K. phaffii* для производства рекомбинантных белков используются разные ис-

точники углерода. Поэтому мы исследовали влияние недостатка биотина при росте этих дрожжей на средах с глицерином и метанолом в качестве источников углерода и энергии.

На втором этапе клетки собирали с помощью центрифугирования и переносили на среды с соответствующим источником углерода и разными концентрациями биотина: BMG(B–) и BMM(B–) без биотина; BMG(B++) и BMM(B++) – с биотином в концентрации 400 мкг/литр. После 24 ч культивирования из клеток выделяли тотальную РНК для последующего транскриптомного анализа. Схема культивирования представлена на рис. 1.

Чтобы показать, что полученные результаты достоверно отражают изменения в экспрессии генов, мы сравнили транскриптомные данные, полученные из культур, выращенных на средах с высоким содержанием биотина и разными источниками углерода – метанолом и глицерином (BMG(B++) против BMM(B++)). Аналогичный анализ ранее проводился и в других исследованиях [22–24]. Рост клеток *K. phaffii* на таких разных источниках углерода приводит к значительным изменениям в экспрессии генов. Среди 1607 генов, продемонстрировавших изменение экспрессии, мы проанализировали те, которые вовлечены в метаболизм метанола. Как и ожидалось, гены алкогольоксидазы (PAS_chr4_0821, PAS_chr4_0152), гены, вовлеченные в диссимиляционный (PAS_chr3_1028, PAS_chr3_0867, PAS_chr3_0932) и ассимиляционный (PAS_chr3_0832, PAS_chr3_0834, PAS_chr3_0841, PAS_chr3_0951) пути метаболизма метанола, а также гены биогенеза пероксисом (PAS_chr2-2_0186,

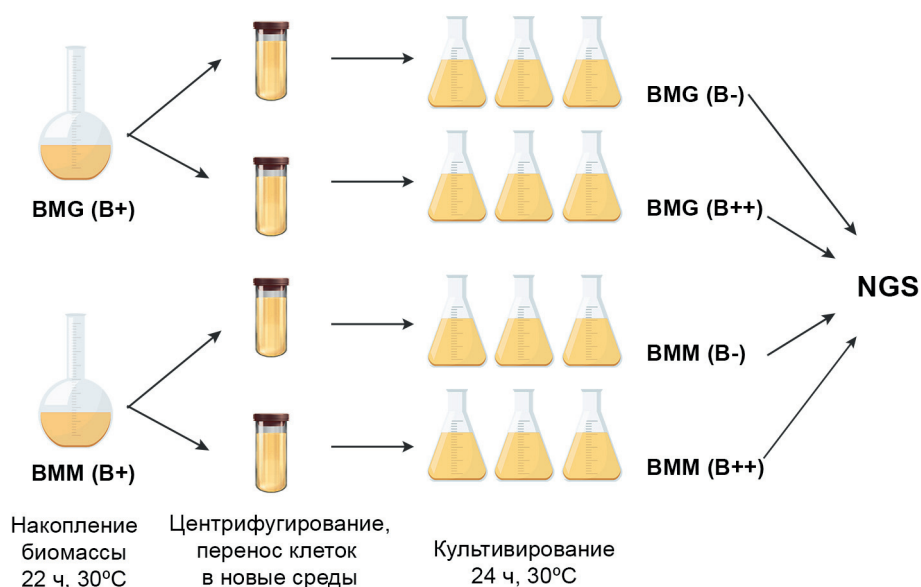


Рис. 1. Схема культивирования. NGS – секвенирование нового поколения (next generation sequencing)

PAS_chr4_0794) были индуцированы в присутствии метанола и репрессированы на глицерине. Эти результаты, а также данные по другим генам, которые далее будут обсуждаться в этой работе, приведены в табл. П1 в Приложении.

Далее мы сосредоточились на изучении влияния биотинового голодания на клетки *K. phaffii*, выращенные в средах с различными источниками углерода. Для этого транскриптомные данные, полученные после культивирования в среде с глицерином и высоким содержанием биотина, сравнивали с аналогичной средой без биотина (BMG(B++) против BMG(B–)). Такой же анализ проводили для среды с метанолом в качестве источника углерода (BMM(B++) против BMM(B–)). Результаты анализа с использованием DESeq2 для генов, характеризующихся дифференциальной экспрессией при голодании по биотину, приведены в табл. П2 в Приложении для сред с глицерином (BMG(B++) против BMG(B–)) и в табл. П3 в Приложении – для сред с метанолом (BMM(B++) против BMM(B–)).

Влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках *K. phaffii*, выращенных на глицерине. Транскриптомный анализ показал, что голодание по биотину оказывает сравнительно слабое влияние на экспрессию генов в клетках *K. phaffii*, использующих глицерин в качестве источника углерода. Заметное изменение активности было отмечено только для 22 генов (табл. П4 в Приложении). Среди них экспрессия 14 генов была повышена, а 8 – понижена в условиях голодания по биотину. Гены, продемонстрировавшие повышенную экспрессию, вовлечены в метаболизм биотина и тиамина, глиоксилатный цикл, транспорт мочевины, окисление ацетальдегида, синтез ацетил-CoA и его карнитин-опосредованный транспорт.

Среди активированных генов первую группу составляют гены метаболизма биотина, кодирующие биотинпермеазу (PAS_FragB_0023), биотинсинтазу Bio2 (PAS_chr1-3_0052) и биотин-протеинлигазу (PAS_chr3_0569). Таким образом, недостаток биотина приводит к повышению экспрессии генов, обеспечивающих транспорт биотина, биосинтез биотина из его предшественника дитиобиотина и ковалентное присоединение биотина к апоферментам. Эти результаты согласуются с более ранними работами, посвященными регуляции метаболизма биотина в *S. cerevisiae*. В этих дрожжах недостаток биотина приводил к повышению экспрессии генов пермеазы биотина (*VHT1*), биотинсинтазы (*BIO2*) и биотин-протеинлигазы (*BPL1*). Регуляция этих генов зависит от транскрипционного фактора Vhr1, который является сенсором

биотина и связывается с регуляторными участками BRE (biotin response element), расположенными в промоторах регулируемых генов [25, 26].

В клетках, выращенных в условиях недостатка биотина, помимо генов биотинового метаболизма, была отмечена активация генов, вовлеченных в синтез тиамина. Тиамин является важным соединением для клеточного энергетического метаболизма, поскольку его производные служат кофакторами для различных ферментов, таких как транскетолазы, пируватдекарбоксилазы, пируватдегидрогеназы и оксоглутаратдегидрогеназы. Таким образом, тиамин необходим для реакций окислительного декарбоксилирования пирувата, цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и пентозофосфатного пути. У *S. cerevisiae* синтез тиамина *de novo* является энергетически затратным процессом. Поэтому он запускается только при очень низком внутриклеточном уровне тиаминпирофосфата [13]. Помимо роли тиамина в качестве кофактора ферментов, показано, что он также задействован в ответе клеток на абиотический стресс. В частности, экспрессия генов синтеза тиамина активировалась при окислительном и осмотическом стрессе [27, 28]. Таким образом, активация генов, вовлеченных в синтез тиамина, в голодающих по биотину дрожжах *K. phaffii* может указывать на то, что в таких условиях в клетках возникает повышенная потребность в тиамине.

Экспрессия генов, кодирующих ключевые ферменты глиоксилатного цикла, изоцитратлиазу (PAS_chr1-4_0338) и малатсинтазу (PAS_chr4_0191) возрастала в условиях голодания по биотину (рис. 2). Глиоксилатный цикл протекает в пероксисомах и превращает двухуглеродные соединения в четырехуглеродную молекулу – сукцинат, который затем входит в ЦТК. У *S. cerevisiae* глиоксилатный цикл позволяет использовать двухуглеродные субстраты (такие как ацетат или этанол) для генерации предшественников для синтеза сахаров и других органических соединений. Глиоксилатный цикл также играет важную роль в преобразовании ацетил-CoA, образованного в результате β -окисления жирных кислот. Регуляция генов изоцитратлиазы и малатсинтазы осуществляется в зависимости от источника углерода в среде. Синтез этих ферментов репрессирован в клетках *S. cerevisiae*, выращенных на глюкозе, и дерепрессирован в среде без глюкозы [29]. Повышенная экспрессия генов, кодирующих эти ферменты у *K. phaffii*, испытывающих дефицит биотина, свидетельствует об участии биотина в адаптации клеток к различным источникам углерода.

превращение PEP в ОхАс катализируется биотинзависимой пируваткарбоксилазой. В условиях дефицита биотина этот путь синтеза ОхАс подавляется. Однако ОхАс также может быть синтезирован через глиоксилатный цикл с помощью изоцитратлиазы и малатсинтазы. Согласно нашим результатам, гены этих ферментов действительно активировались у голодающих по биотину *K. phaffii* (рис. 2).

Наблюдаемое подавление РЕРСК также согласуется с результатами работы Kumar и Rangarajan [35]. В этом исследовании сообщалось о регуляции экспрессии РЕРСК в зависимости от концентрации биотина. Экспрессия РЕРСК регулируется белком ROP (репрессор РЕРСК), который обеспечивает катаболитную репрессию РЕРСК в клетках *K. phaffii*, выращенных в среде с избытком глюкозы и дефицитом биотина. ROP также участвует в регуляции метаболизма метанола в качестве репрессора гена *AOX1* [36].

При недостатке биотина в дрожжах *K. phaffii* также понижалась экспрессия гена альтернативной оксидазы. Она осуществляет перенос электронов от убихинона напрямую на кислород, значительно сокращая стандартный путь транспорта электронов. Функции альтернативной оксидазы разнообразны. Она может участвовать в защите клетки от активных форм кислорода (АФК), осмотического стресса, воздействия H_2O_2 или ингибиторов основной дыхательной цепи. У *K. phaffii* альтернативная оксидаза, вероятно, вносит большой вклад в жизнеспособность клеток. Было показано, что сверхэкспрессия ее гена немного увеличивает скорость роста, в то время как его удаление приводит к усилению окислительного стресса и гибели клеток. Также сообщалось, что его экспрессия зависит от уровня глюкозы в среде и снижается при истощении источника углерода [37]. Такая взаимосвязь экспрессии гена альтернативной оксидазы и доступности источника углерода также согласуется с представлением о том, что биотиновое голодание нарушает углеродный метаболизм в клетках *K. phaffii*.

Обобщая результаты транскрипционного анализа экспрессии генов дрожжей *K. phaffii*, выращенных на средах с глицерином при дефиците биотина, можно сделать вывод, что биотин играет важную роль в углеродном обмене. Недостаток биотина провоцировал перестройку клеточного метаболизма, сопровождающуюся усилением активности глиоксилатного цикла и синтеза ацетил-СоА в цитоплазме; в то же время глюконеогенез и липогенез были репрессированы. Сходные результаты были

получены Ortega-Cuellar et al. [12] на дрожжах *S. cerevisiae*. Показано, что у этих дрожжей, выращенных на средах без биотина в условиях избытка глюкозы, активно экспрессируются гены, обеспечивающие высокоаффинный транспорт глюкозы, карнитин-опосредованный транспорт ацетил-СоА, работу ЦТК, окисление жирных кислот и прохождение глиоксилатного цикла. При этом экспрессия генов липогенеза репрессирована. Таким образом, экспрессия генов в клетках *S. cerevisiae*, испытывающих недостаток биотина, соответствовала условиям дефицита глюкозы, что указывает на то, что у дрожжей биотин играет важную роль в углеродном метаболизме и адаптации к разным источникам углерода.

Влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках *K. phaffii*, выращенных на метаноле. Более заметные изменения экспрессии генов при биотиновом голодании наблюдались на среде с метанолом по сравнению с глицерином. Среди 153 дифференциально экспрессируемых генов 91 активировался на среде без биотина, а 62 были подавлены (табл. П5 в Приложении). Интересно, что только ген фосфоенолпируваткарбоксикиназы (PAS_FragB_0061) демонстрировал одинаковый характер экспрессии на средах с глицерином и метанолом. Ген изоцитратлиазы (PAS_chr1-4_0338) активировался при дефиците биотина в среде с глицерином, но репрессировался на среде с метанолом (рис. 3). Все остальные гены, демонстрирующие разную экспрессию в зависимости от биотина, были разными в условиях метанола и глицерина.

В среде с глицерином при дефиците биотина активировались гены метаболизма биотина. Однако в среде с метанолом их уровень экспрессии существенно не изменялся. Сравнение профилей экспрессии генов на средах с разными источниками углерода (табл. П1 в Приложении) показывает, что ген биотинпермеазы (PAS_FragB_0023) активируется в средах с метанолом даже в присутствии высокой концентрации биотина. Помимо гена биотинпермеазы, среди 13 генов, которые активировались при недостатке биотина на средах с глицерином, 2 гена также активировались на средах с метанолом и высокой концентрацией биотина (ген митохондриальной альдегиддегидрогеназы (PAS_chr3_0987) и ген ацетат-СоА-лигазы (PAS_chr3_0403)). Среди 8 генов, экспрессия которых была снижена при биотиновом голодании на средах с глицерином, 7 генов также репрессировались на средах с метанолом и высокой концентрацией биотина (PAS_FragB_0061, PAS_chr4_0181,

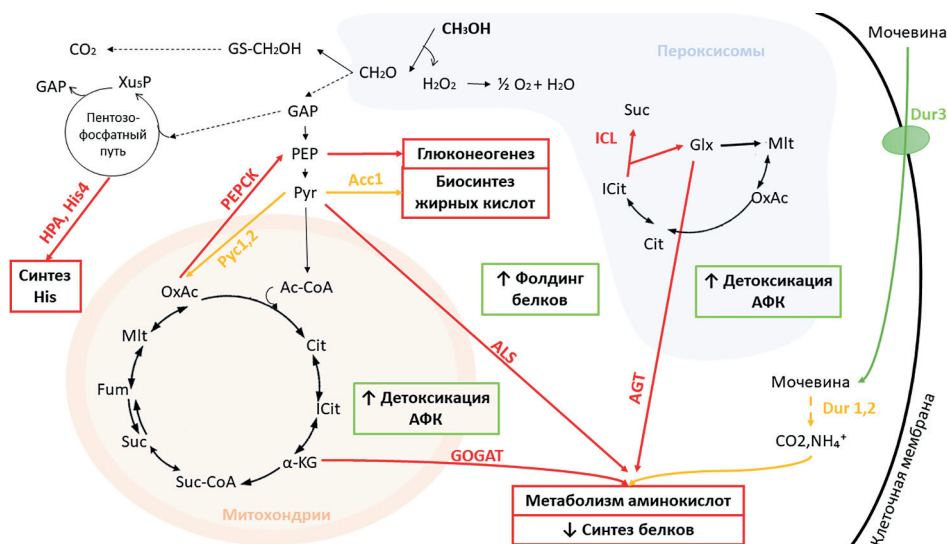


Рис. 3. Предполагаемая схема влияния дефицита биотина на метаболизм в клетках *K. phaffii* при росте на метаноле. Зеленым цветом отмечены белки и процессы, которые активируются при дефиците биотина; красным — репрессируются. Оранжевым обозначены процессы, в которых задействованы биотинзависимые ферменты. α -KG — α -кетоглутарат; Ac — ацетат; Ac-CoA — ацетил-CoA; Acc1 — ацетил-CoA карбоксилаза; AGT — аланин-глиоксилат аминоксидотрансфераза (ген PAS_chr4_0416); ALS — ацетоллактатсинтаза (ген PAS_chr4_0228); Cit — цитрат; Dur1,2 — амидолиаза мочевины; Dur3 — транспортер мочевины (ортолог гена *S. cerevisiae* DUR3; PAS_chr4_0439); Fum — фумарат; Glx — глиоксилат; GOGAT — глутаматсинтаза (ген PAS_chr3_1024); His4 — гистидинол-дегидрогеназа (ген PAS_chr1-4_0160); HPA — гистидинол-фосфат-аминотрансфераза (ген PAS_chr2-1_0684); ICit — изоцитрат; ICL — изоцитратлиаза (ген PAS_chr1-4_0338); Mlt — малат; OxAc — оксалоацетат; PEP — фосфоенолпируват; PEPCK — фосфоенолпируват-карбоксикиназа (ген PAS_FragB_0061); Pyc1,2 — пируваткарбоксилаза; Pyr — пируват; Suc — сукцинат; Suc-CoA — сукцинил-CoA

PAS_chr3_0408, PAS_chr2-2_0267, PAS_chr1-1_0108, PAS_chr2-2_0484, PAS_chr4_0352).

Можно предположить, что в том случае, когда клетки *K. phaffii* растут на среде с метанолом в качестве источника углерода, им требуется больше биотина, чем при росте на среде с глицерином. Таким образом, в среде с метанолом процессы, несколько сходные с биотиновым голоданием, наблюдаются даже при высокой концентрации биотина. Это частично объясняет различие между группами дифференциально экспрессируемых генов в средах с разными источниками углерода. На средах с метанолом и высокой концентрацией биотина некоторые гены уже демонстрируют уровни экспрессии, сходные с наблюдаемыми на средах с глицерином и без биотина (например, ген пермеазы биотина PAS_FragB_0023). При переносе клеток на среды с метанолом и без биотина эти гены сохраняют свой уровень экспрессии.

Самую большую группу генов, экспрессия которых снижается при биотиновом голодании на средах с метанолом, составляют гены, связанные с синтезом белков. Шесть из этих генов кодируют белки малой субъединицы рибосомы (PAS_chr4_0247, PAS_chr1-1_0077, PAS_FragD_0015, PAS_chr1-4_0423, PAS_chr2-1_0784, PAS_chr2-1_0482); 8 генов кодируют белки большой субъединицы рибосомы

(PAS_chr1-1_0345, PAS_chr4_0814, PAS_chr1-4_0352, PAS_chr4_0208, PAS_chr1-4_0412, PAS_chr4_0107, PAS_chr1-1_0337, PAS_chr1-4_0275). Другие гены участвуют в процессинге рРНК и биогенезе 60S-субъединицы рибосомы (PAS_chr4_0464, PAS_chr1-1_0446), процессинге тРНК (PAS_chr1-4_0457) и аминоксидировании (PAS_chr3_0949, PAS_chr2-1_0346).

При дефиците биотина на среде с метанолом подавляются гены, вовлеченные в биосинтез аминоксидов. К ним относятся гены, кодирующие аланин-глиоксилат аминоксидотрансферазу (PAS_chr4_0416), ацетоллактатсинтазу (PAS_chr4_0228), глутаматсинтазу (PAS_chr3_1024), гамма-глутамилфосфатредуктазу (PAS_chr4_0665), гистидинол-фосфат-аминотрансферазу (PAS_chr2-1_0684), треониндезаминазу (PAS_chr1-4_0243) и гистидинол-дегидрогеназу (PAS_chr1-4_0160) (рис. 3).

Эти результаты показывают, что на средах с метанолом при дефиците биотина подавляется синтез белка. Похожие эффекты наблюдались в клетках *S. cerevisiae* в условиях ограничения питательных веществ, включая голодание по углероду и азоту [38–40]. Интересно, что в среде с глицерином при дефиците биотина не наблюдалось значительное снижение экспрессии генов, связанных с синтезом белков. Это можно объяснить тем, что метаболизм метанола требует синтеза большого количества

ферментов для его утилизации, например, алкогольоксидазы. Эти ферменты могут составлять до 30% общего содержания белка в клетках *K. phaffii* [41]. По всей видимости, при росте на метаноле в условиях недостатка биотина клетки *K. phaffii* не могут поддерживать такой активный синтез белка и репрессируют соответствующие гены.

Большая группа генов, активированных в условиях дефицита биотина на метаноле, включает в себя гены, связанные с обезвреживанием АФК и окислительно-восстановительными реакциями клетки. Эти гены кодируют тиол-специфические пероксиредоксины (PAS_chr1-4_0659, PAS_chr2-1_0502), тиоредоксин (PAS_chr4_0284), тиоредоксинпероксидазу (PAS_chr2-2_0220), супероксиддисмутазу (PAS_chr4_0786), митохондриальный пероксиредоксин (PAS_chr1-1_0433). Среди них также можно отметить ген PAS_chr2-2_0382, который является ортологом гена *S. cerevisiae* *HYR1*, кодирующего глутатионпероксидазу, также функционирующую как рецептор перекиси водорода [42]. Ранее для клеток *S. cerevisiae* также была показана активация генов, участвующих в детоксикации АФК и клеточных окислительно-восстановительных реакциях в условиях недостатка аминокислот или азотного голодания [39, 40].

Интересно, что в условиях дефицита биотина в среде с глицерином нами не было отмечено значительной активации этих генов. Известно, что утилизация метанола сама по себе провоцирует окислительный стресс в клетках *K. phaffii*, и в условиях роста на метаноле клеткам необходимо бороться с большим количеством АФК [43]. Предположительно, дефицит биотина может вызывать окислительный стресс в клетках *K. phaffii*. И в среде с метанолом, где клетки уже испытывают окислительный стресс, это приводит к дальнейшей активации генов, участвующих в детоксикации АФК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые на уровне транскриптома было изучено влияние дефицита биотина на экспрессию генов в клетках биотехнологически значимых дрожжей *K. phaffii*. Голодание по биотину приводило к изменению экспрессии разных групп генов. Ряд эффектов, в частности, активация генов метаболизма биотина, глиоксилатного цикла и синтеза ацетил-СоА в цитоплазме, а также подавление генов глюको- и липогенеза ранее также наблюдались у модельных дрожжей *S. cerevisiae* [12]. Некото-

рые эффекты, в частности подавление активности генов, участвующих в синтезе белков, и активация генов, связанных с ответом клетки на окислительный стресс, ранее обнаруживались у *S. cerevisiae* в ответ на различные лимитирующие факторы [38–40].

В нашей работе было впервые продемонстрировано, что у дрожжей *K. phaffii* проявление и набор наблюдаемых эффектов, вызванных дефицитом биотина, необычайно зависит от доступного источника углерода: глицерина или метанола. Дефицит биотина вызывал более заметные изменения в экспрессии генов дрожжей *K. phaffii*, культивируемых в средах с метанолом, по сравнению со средами с глицерином. Активация гена биотинпермеазы и репрессия ряда генов, наблюдаемые в ответ на недостаток биотина при росте в средах с глицерином, происходят в средах с метанолом даже при высокой концентрации биотина. Это может быть связано с различной потребностью клеток *K. phaffii* в биотине в зависимости от доступного источника углерода.

Полученные результаты важны для оптимизации условий культивирования при синтезе рекомбинантных белков с помощью дрожжей *K. phaffii* с использованием систем культивирования со сменой источника углерода.

Вклад авторов. А.М. Румянцев, М.В. Падкина — концепция и руководство работой; А.С. Макеева, В.В. Иштуганова — проведение экспериментов; А.В. Сидорин — проведение биоинформатического анализа; А.С. Макеева, А.М. Румянцев — обсуждение результатов исследования; А.С. Макеева, А.М. Румянцев — написание текста; А.М. Румянцев, М.В. Падкина — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа проведена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в соответствии с соглашением № 075-15-2022-322 от 22.04.2022 о предоставлении гранта в виде субсидии из Федерального бюджета Российской Федерации. Грант предоставлен в рамках государственной поддержки создания и развития Научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., and Farsiani, H. (2020) *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 5867-5881, doi: 10.1002/jcp.29583.
- Cregg J. M. (2007) Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems, *Methods Mol. Biol.*, **389**, 1-10, doi: 10.1007/978-1-59745-456-8_1.
- Heisteringer, L., Gasser, B., and Mattanovich, D. (2020) Microbe profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*, *Microbiology*, **166**, 614-616, doi: 10.1099/mic.0.000958.
- Carneiro, C. V. G. C., Serra, L. A., Pacheco, T. F., Ferreira, L. M. M., Brandão, L. T. D., de Moura Freitas, M. N., Trichez, D., and Almeida, J. R. M. (2022) Advances in *Komagataella phaffii* engineering for the production of renewable chemicals and proteins, *Fermentation*, **8**, 575, doi: 10.3390/fermentation8110575.
- Hartner, F. S., and Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts, *Microb. Cell Fact.*, **5**, 1-21, doi: 10.1186/1475-2859-5-39.
- Ergün, B. G., Berrios, J., Binay, B., and Fickers, P. (2021) Recombinant protein production in *Pichia pastoris*: from transcriptionally redesigned strains to bioprocess optimization and metabolic modelling, *FEMS Yeast Res.*, **21**, foab057, doi: 10.1093/femsyr/foab057.
- Ghosalkar, A., Sahai, V., and Srivastava, A. (2008) Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production, *Bioresour. Technol.*, **99**, 7906-7910, doi: 10.1016/j.biortech.2008.01.059.
- Joseph, J. A., Akkermans, S., Cornillie, E., Deberlanger, J., and Van Impe, J. F. M. (2023) Optimal culture medium selection and supplementation for recombinant thaumatin II production by *Komagataella phaffii*, *Food Bioprod. Process.*, **139**, 190-203, doi: 10.1016/j.fbp.2023.04.001.
- Matthews, C. B., Kuo, A., Love, K. R., and Love, J. C. (2018) Development of a general defined medium for *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 103-113, doi: 10.1002/bit.26440.
- Rumiantsev, A. M., Padkina, M. V., and Sambuk, E. V. (2013) Effect of nitrogen source on gene expression of first steps of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*, *Genetika*, **49**, 454-460, doi: 10.7868/S0016675813040115.
- Rumjantsev, A. M., Bondareva, O. V., Padkina, M. V., and Sambuk, E. V. (2014) Effect of nitrogen source and inorganic phosphate concentration on methanol utilization and *PEX* genes expression in *Pichia pastoris*, *ScientificWorldJournal*, **2014**, 1-9, doi: 10.1155/2014/743615.
- Ortega-Cuellar, D., Hernandez-Mendoza, A., Moreno-Arriola, E., Carvajal-Aguilera, K., Perez-Vazquez, V., Gonzalez-Alvarez, R., and Velazquez-Arellano, A. (2010) Biotin starvation with adequate glucose provision causes paradoxical changes in fuel metabolism gene expression similar in rat (*Rattus norvegicus*), nematode (*Caenorhabditis elegans*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *J. Nutrigenet. Nutrigenomics*, **3**, 18-30, doi: 10.1159/000318054.
- Perli, T., Wronska, A. K., Ortiz-Merino, R. A., Pronk, J. T., and Daran, J. M. (2020) Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **37**, 283-304, doi: 10.1002/yea.3461.
- Hall, C., and Dietrich, F. S. (2007) The reacquisition of biotin prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* involved horizontal gene transfer, gene duplication and gene clustering, *Genetics*, **177**, 2293-2307, doi: 10.1534/genetics.107.074963.
- Gasser, B., Dragosits, M., and Mattanovich, D. (2010) Engineering of biotin-prototrophy in *Pichia pastoris* for robust production processes, *Metab. Eng.*, **12**, 573-580, doi: 10.1016/j.ymben.2010.07.002.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120, doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Leggett, R. M., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B. J., Waite, D., and Davey, R. P. (2013) Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics, *Front. Genet.*, **4**, 288, doi: 10.3389/fgene.2013.00288.
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., and Salzberg, S. L. (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 907-915, doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A., Davies, R. M., and Li, H. (2021) Twelve years of SAMtools and BCFtools, *GigaScience*, **10**, giab008, doi: 10.1093/gigascience/giab008.
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, **30**, 923-930, doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Zhang, C., Ma, Y., Miao, H., Tang, X., Xu, B., Wu, Q., Mu, Y., and Huang, Z. (2020) Transcriptomic analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 during heterologous protein production using a high-cell-density fed-batch cultivation strategy,

- Front. Microbiol.*, **11**, 463, doi: 10.3389/fmicb.2020.00463.
23. Brady, J. R., Whittaker, C. A., Tan, M. C., Kristensen, D. L., 2nd, Ma, D., Dalvie, N. C., Love, K. R., and Love, J. C. (2020) Comparative genome-scale analysis of *Pichia pastoris* variants informs selection of an optimal base strain, *Biotechnol. Bioeng.*, **117**, 543–555, doi: 10.1002/bit.27209.
 24. Love, K. R., Shah, K. A., Whittaker, C. A., Wu, J., Bartlett, M. C., Ma, D., Leeson, R. L., Priest, M., Borowsky, J., Young, S. K., and Love, J. C. (2016) Comparative genomics and transcriptomics of *Pichia pastoris*, *BMC Genomics*, **17**, 550, doi: 10.1186/s12864-016-2876-y.
 25. Pirner, H. M., and Stolz, J. (2006) Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin–protein ligase, *J. Biol. Chem.*, **281**, 12381–12389, doi: 10.1074/jbc.M511075200.
 26. Weider, M., Machnik, A., Klebl, F., and Sauer, N. (2006) Vhr1p, a new transcription factor from budding yeast, regulates biotin-dependent expression of *VHT1* and *BIO5*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 13513–13524, doi: 10.1074/jbc.M512158200.
 27. Kowalska, E., Kujda, M., Wolak, N., and Kozik, A. (2012) Altered expression and activities of enzymes involved in thiamine diphosphate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative and osmotic stress, *FEMS Yeast Res.*, **12**, 534–546, doi: 10.1111/j.1567-1364.2012.00804.x.
 28. Wolak, N., Kowalska, E., Kozik, A., and Rapala-Kozik, M. (2014) Thiamine increases the resistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative, osmotic and thermal stress, through mechanisms partly independent of thiamine diphosphate-bound enzymes, *FEMS Yeast Res.*, **14**, 1249–1262, doi: 10.1111/1567-1364.12218.
 29. Duntze, W., Neumann, D., Gancedo, J. M., Atzpodien, W., and Holzer, H. (1969) Studies on the regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 83–89, doi: 10.1111/j.1432-1033.1969.tb00658.x.
 30. Berg, M. A., and Steensma, H. Y. (1995) *ACS2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose, *Eur. J. Biochem.*, **231**, 704–713, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb0751.x.
 31. Takahashi, H., McCaffery, J. M., Irizarry, R. A., and Boeke, J. D. (2006) Nucleocytosolic acetyl-coenzyme A synthetase is required for histone acetylation and global transcription, *Mol. Cell*, **23**, 207–217, doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.040.
 32. Strijbis, K., and Distel, B. (2010) Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism, *Eukaryot. Cell*, **9**, 1809–1815, doi: 10.1128/EC.00172-10.
 33. Madsen, C. T., Sylvestersen, K. B., Young, C., Larsen, S. C., Poulsen, J. W., Andersen, M. A., Palmqvist, E. A., Hey-Mogensen, M., Jensen, P. B., Treebak, J. T., Lisby, M., and Nielsen, M. L. (2015) Biotin starvation causes mitochondrial protein hyperacetylation and partial rescue by the SIRT3-like deacetylase Hst4p, *Nat. Commun.*, **6**, 7726, doi: 10.1038/ncomms8726.
 34. Kurita, O., and Nishida, Y. (1999) Involvement of mitochondrial aldehyde dehydrogenase *ALD5* in maintenance of the mitochondrial electron transport chain in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **181**, 281–287, doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08856.x.
 35. Kumar, N. V., and Rangarajan, P. N. (2011) Catabolite repression of phosphoenolpyruvate carboxykinase by a zinc finger protein under biotin and pyruvate carboxylase-deficient conditions in *Pichia pastoris*, *Microbiology*, **157**, 3361–3369, doi: 10.1099/mic.0.053488-0.
 36. Kumar, N. V., and Rangarajan, P. N. (2012) The zinc finger proteins Mxr1p and repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase (ROP) have the same DNA binding specificity but regulate methanol metabolism antagonistically in *Pichia pastoris*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 34465–34473, doi: 10.1074/jbc.M112.365304.
 37. Kern, A., Hartner, F. S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L., Fröhlich, K. U., and Glieder, A. (2007) *Pichia pastoris* 'just in time' alternative respiration, *Microbiology*, **153**, 1250–1260, doi: 10.1099/mic.0.2006/001404-0.
 38. DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science*, **278**, 680–686, doi: 10.1126/science.278.5338.680.
 39. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes, *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4241–4257, doi: 10.1091/mbc.11.12.4241.
 40. Gasch, A. P. (2003) "The environmental stress response: a common yeast response to environmental stresses", in *Yeast Stress Responses* (Hohmann, S., and Mager, W. H., eds) Vol. 1, Springer, Berlin, pp. 11–70.
 41. Couderc, R., and Barette, J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase, *Agrie. Biol. Chem.*, **44**, 2279–2289, doi: 10.1080/00021369.1980.10864320.
 42. Avery, A. M., and Avery, S. V. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases, *J. Biol. Chem.*, **276**, 33730–33735, doi: 10.1074/jbc.M105672200.
 43. Lin, N. X., He, R. Z., Xu, Y., and Yu, X. W. (2021) Oxidative stress tolerance contributes to heterologous protein production in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Biofuels*, **14**, 160, doi: 10.1186/s13068-021-02013-w.

EFFECT OF BIOTIN STARVATION ON GENE EXPRESSION IN *Komagataella phaffii* CELLS

A. S. Makeeva, A. V. Sidorin, V. V. Ishtuganova, M. V. Padkina, and A. M. Rumyantsev*

*Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University,
199034 Saint Petersburg, Russia; e-mail: rumyantsev-am@mail.ru*

Methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* are widely used in biotechnology as a host for recombinant protein production. Due to the practical significance of this yeast, it is extremely important to properly select the cultivation conditions and optimize the media composition. In this study the effect of biotin starvation on *K. phaffii* gene expression was investigated at transcriptomic level. It was demonstrated, that *K. phaffii* cell response to biotin deficiency strongly depends on the carbon source in the medium. In media containing glycerol, biotin deficiency led to activation of genes involved in biotin metabolism, glyoxylate cycle and synthesis of acetyl-CoA in cytoplasm, as well as repression of genes, involved in lipo- and gluconeogenesis. In methanol containing media, biotin deficiency primarily led to repression of genes, involved in protein synthesis, and activation of cell response to oxidative stress.

Keywords: *Komagataella phaffii*, biotin, glycerol, methanol, transcriptomic analysis, differential gene expression