

<https://doi.org/10.17816/ecogen17447-55>

## АНАЛИЗ ГЕНОВ ПОЛИАМИНОКСИДАЗ У МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *KOMAGATAELLA PHAFFII*

© А.В. Иванова, А.В. Сидорин, Е.В. Самбук, А.М. Румянцев

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Иванова А.В., Сидорин А.В., Самбук Е.В., Румянцев А.М. Анализ генов полиаминоксидаз у метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 4. — С. 47–55. <https://doi.org/10.17816/ecogen17447-55>.

Поступила: 17.06.2019

Одобрена: 02.12.2019

Принята: 17.12.2019

✿ Полиамины присутствуют во всех живых клетках и регулируют широкий спектр биологических процессов. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* полиаминоксидаза Fms1p превращает спермин в спермидин и 3-аминопропаналь, что необходимо для синтеза пантотеновой кислоты и гипузинирования. В данной работе показано, что ортологи гена *FMS1* дрожжей *S. cerevisiae* присутствуют у всех основных представителей подотдела *Saccharomycotina*, однако их копияность различна. У дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) идентифицированы два гена полиаминоксидаз (*KpFMS1* и *KpFMS2*) и изучена регуляция активности их промоторов.

✿ **Ключевые слова:** полиаминоксидазы; метилотрофные дрожжи; *Komagataella phaffii*; *Pichia pastoris*.

## THE ANALYSIS OF THE POLYAMINE OXIDASE GENES IN THE METHYLOTROPHIC YEAST *KOMAGATAELLA PHAFFII*

© A.V. Ivanova, A.V. Sidorin, E.V. Sambuk, A.M. Rumyantsev

St. Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Cite this article as: Ivanova AV, Sidorin AV, Sambuk EV, Rumyantsev AM.

The analysis of the polyamine oxidase genes in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*.*Ecological genetics*. 2019;17(4):47-55. <https://doi.org/10.17816/ecogen17447-55>.

Received: 17.06.2019

Revised: 02.12.2019

Accepted: 17.12.2019

✿ Polyamines are present in all living cells and regulate a wide range of biological processes. In *Saccharomyces cerevisiae* the polyamine oxidase Fms1p converts spermine to spermidine and 3-aminopropionaldehyde, which is necessary for the synthesis of pantothenic acid and hypusination. This paper shows that *S. cerevisiae* *FMS1* gene orthologs are present in all major representatives of the *Saccharomycotina* subdivision, but their copy numbers are different. In the *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) yeast, two polyamine oxidase genes (*KpFMS1* and *KpFMS2*) were identified, and the regulation of their promoters activity was studied.

✿ **Keywords:** polyamine oxidases; methylotrophic yeast; *Komagataella phaffii*; *Pichia pastoris*.

### ВВЕДЕНИЕ

Полиамины — группа алифатических поликатионов, которая обнаружена у прокариотических и эукариотических организмов. У высших эукариот, в том числе и у грибов, наиболее часто встречаются путресцин, спермидин и спермин. Функции полиаминов определяются их химической структурой. При физиологических рН полиамины имеют положительный заряд и за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий могут действовать как лиганды, связываясь с ДНК, РНК, белками, фосфолипидами и нуклеозидтрифосфатами [1, 2]. Предполагают, что полиамины могут участвовать в регуляции экспрессии генов как за счет изменения структуры ДНК и модуляции сигнальных путей, так и за счет связывания с транскрипционными факторами. Полиамины избыточны у всех живых организмов. Дефицит полиаминов приводит к прекращению роста клеток, однако их интенсивное накопление может

быть цитотоксично, что свидетельствует о необходимости строгой регуляции внутриклеточного пула этих соединений [2, 3]. В последнее время интерес к полиаминам вызван их возможным использованием в качестве антипролиферативных соединений.

Уровень полиаминов в клетке контролируется комплексом биосинтетических (орнитиндекарбоксилаза, S-аденозилметионинкарбоксилаза, спермидинсинтаза и сперминсинтаза) и катаболических (спермидин/сперминацетилтрансфераза, флавиносодержащая полиаминоксидаза, Си-содержащая диаминоксидаза) ферментов [2]. Полиаминоксидаза представляет особый интерес, так как она превращает спермин в спермидин и 3-аминопропаналь. Окисление 3-аминопропанала необходимо *S. cerevisiae* для синтеза пантотеновой кислоты [4], в то время как спермидин участвует в реакции гипузинирования (важной модификации трансляционного фактора eIF-5A) [5].

Филогенетический анализ полиаминоксидаз был проведен у животных и растений. У животных обнаружено, что в процессе эволюции предковый ген полиаминоксидазы РАО был дублирован, и в результате возникли два белка паралога позвоночных, кодируемые генами SMO и АРАО [6]. Геном *Arabidopsis thaliana* содержит минимум пять полиаминоксидаз. Анализ субстратной специфичности белка показал, что полиаминоксида AtPAO3 окисляет спермидин и спермин и продуцирует  $H_2O_2$ . Показано, что полиаминоксидазы растений *A. thaliana* AtPAO2, AtPAO3 и AtPAO4 локализованы в пероксисомах [7]. У животных один из белков полиаминоксидаз содержит сигнал транспорта в пероксисомы и также может быть локализован в этих органеллах.

У грибов полиамины регулируют широкий круг биологических явлений: диморфизм, формирование спор и апрессорий. В некоторых случаях они регулируют вирулентность грибов — патогенов животных и растений [8]. Лучше всего изучена ФАД-зависимая (флавинадениндинуклеотид) полиаминоксида Fms1p *Saccharomyces cerevisiae* [9], участвующая в биосинтезе  $\beta$ -аланина и пантотеновой кислоты. Дрожжи с делецией гена *FMS1* не способны расти на среде без пантотеновой кислоты или  $\beta$ -аланина, а в случае сверхэкспрессии гена *FMS1* под контролем *ADHI* промотора, трансформанты секретируют пантотеновую кислоту в среду [4]. В то же время у других представителей подотдела *Saccharomycotina* количество генов полиаминоксидаз варьирует и связь копияности генов полиаминоксидаз с метаболизмом не ясна.

В данной работе проведен анализ ортологов полиаминоксидаз у представителей подотдела *Saccharomycotina*, идентифицированы гены полиаминоксидаз *KpFMS1* и *KpFMS2* метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) и изучена их регуляция.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Сравнение аминокислотных последовательностей полиаминоксидаз

Ортологи белка *S. cerevisiae* Fms1p у представителей группы *Saccharomycotina* были найдены с помощью алгоритма BLASTp со стандартными параметрами [10]. Множественное сравнение аминокислотных последовательностей полиаминоксидаз проводили в программе Mega X [11]. Найденные последовательности были выравнены с помощью программы CLUSTAL W [12]. Для построения филогенетического дерева использовали метод Maximum Likelihood (ML). Наилучшей моделью для данного метода оказалась LG+G [13]. Построение ML дерева проводилось с использованием модели LG+G и с 500 повторностями анализа bootstrap. Полученное дерево было укоренено с помощью внешней группы — грибов *Neurospora crassa*. Визуализировали

дерево с помощью программы FigTree v1.4.3 (<http://influenza.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### Праймеры

Все праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Таблица 1

### Последовательности праймеров, использованных в работе

Название	Последовательность (5' → 3')
KpFMS1F	AAAGACGTCAGGGTACACGGTATTGTGAGA
KpFMS1R	AATGGATCCTGATAGCCGATTGCAATGTT
KpFMS2F	AAAAAGACGTCGTTTCGAATAATTAGTTGTT
KpFMS2R	AATGGATCCGTTGGTATTGTGAAATAGACG
RHO5R	CGGAATCCAAAACATTGTT

### Плазмиды

В работе были использованы плазмиды pAL2-T (Евроген, Россия) и pPIC9-AOX1-RHO5 [14].

### Штаммы

В работе были использованы штаммы дрожжей *K. phaffii* 4-GS115 (*his4 phox*) и tr2-4-GS115 (*phox PAOX1-RHO5*) [14], а также штамм бактерий *E. coli* DH5 $\alpha$ , (*fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44*  $\Phi$ 80 $\Delta$  (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*).

### Среды и условия культивирования

Для культивирования штаммов дрожжей использовали следующие среды. YEPD: 2 % глюкоза, 2 % пептон, 1 % дрожжевой экстракт, 2,4 % агар. МФО: 0,73 М  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,18 мМ  $CaCl_2$ , 20 мМ Na-цитратный буфер (pH 4,6), витамины, микроэлементы. Источники углерода (глицерин или метанол) — 1 %, источник азота (сульфат аммония) — 0,2 %. Для культивирования бактерий использовали среду LB: 1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 170 мМ NaCl, бензилпенициллин —  $5 \cdot 10^5$  е. а./л. Штаммы *K. phaffii* выращивали при температуре 30 °C, *E. coli* — при температуре 37 °C.

### Конструирование плазмид pPIC9-РКpFMS1-RHO5 и pPIC9-РКpFMS2-RHO5

Для получения плазмид pPIC9-РКpFMS1-RHO5 и pPIC9-РКpFMS2-RHO5 проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами к промоторам генов *KpFMS1* (KpFMS1F и KpFMS1R) и *KpFMS2* (KpFMS2F и KpFMS2R) и хромосомной ДНК штамма *K. phaffii* 4-GS115 в качестве матрицы. Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей проводили согласно [15]. Последовательности промоторов были клонированы в полученный ранее вектор pPIC9-RHO5 [14] с использованием сайтов рестрикции AatII и BamHI.

При этом происходило замещение промотора гена алкогольоксидазы 1 *AOX1* на промоторы генов полиаминоксидаз *KpFMS1* и *KpFMS2*. Трансформацию бактерий проводили согласно [16]. В результате были сконструированы плазмиды, в которых под контролем промоторов генов *KpFMS1* и *KpFMS2* находятся последовательности репортерного гена кислой фосфатазы (КФ) *PHO5* дрожжей *S. cerevisiae*. Также эти плазмиды содержат ген *HIS4* в качестве селективного маркера.

Структуру итоговых плазмид рPIC9-РКрFMS1-РНО5 и рPIC9-РКрFMS2-РНО5 проверяли с помощью методов ПЦР и рестриционного анализа.

#### Получение штаммов PFMS1-4-GS115 и PFMS2-4-GS115

Плазмидами рPIC9-РКрFMS1-РНО5 и рPIC9-РКрFMS2-РНО5 трансформировали штамм 4-GS115. Для этого плазмиды линейаризовали с помощью эндонуклеазы рестрикции *StuI* и трансформировали клетки дрожжей методом электропорации [17]. При этом происходила интеграция генетической конструкции в геном *K. phaffii*. Селекцию трансформантов проводили за счет восстановления прототрофности по гистидину. Для анализа интеграции плазмиды выделяли хромосомную ДНК из трансформантов и проводили ПЦР с праймерами к промоторам генов полиаминоксидаз и гену *PHO5* (*KpFMS1F* и *PHO5R* для PFMS1-4-GS115; *KpFMS2F* и *PHO5R* для PFMS2-4-GS115).

#### Молекулярные методы

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции *BamHI*, *AatII* и *StuI* производили при условиях, предложенных фирмой-производителем ферментов (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Дефосфорилирование вектора производили с помощью фосфатазы *FastAP* (Thermo Fisher Scientific Inc., США) одновременно с гидролизом ДНК эндонуклеазами рестрикции. Очистку ДНК из агарозных гелей и реакционных смесей проводили с помощью наборов *Cleanup Standard* (Евроген, Россия). Лигирование фрагментов ДНК проводили с помощью *T4* ДНК лигазы (Евроген, Россия). Выделение плазмидной ДНК проводили с помощью наборов *Plasmid Miniprep* (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР использовали наборы реактивов *Epcyclo Plus PCR* (Евроген, Россия). Электрофорез фрагментов ДНК проводили в 0,7 % агарозном геле в буфере *TAE* [18].

#### Качественное определение активности кислой фосфатазы

На поверхность среды с выросшими колониями дрожжей накладывали бумажные фильтры, смоченные раствором субстрата  $\alpha$ -нафтилфосфата и красителя синего прочного Б, растворенных в 0,1 М цитратного буфера рН 4,6 до концентрации 2 мг/мл. Через 10 мин оценивали интенсивность окрашивания колоний дрожжей [19].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Биоинформатический анализ протеомов дрожжей подотдела *Saccharomycotina*

На первом этапе работы изучили распространенность полиаминоксидаз среди основных представителей подотдела *Saccharomycotina* (отдел *Ascomycota*). Для этого с помощью алгоритма BLAST провели поиск гомологичных белков в протеомах 22 видов дрожжей, относящихся к разным семействам данного отдела, а также в протеоме мицелиального гриба *Neurospora crassa* (представителя подотдела *Pezizomycotina*, входящего в отдел *Ascomycota*). В качестве образца для сравнения использовали аминокислотную последовательность полиаминоксидазы дрожжей *S. cerevisiae* *Fms1p* [9]. Подобный подход применяли ранее при поиске полиаминоксидаз среди фитопатогенных грибов [8]. Результаты представлены на рис. 1.

Показано, что полиаминоксидазы и соответствующие им гены присутствуют у всех исследованных видов из разных семейств подотдела *Saccharomycotina*. При этом в зависимости от систематического положения количество белков полиаминоксидаз и соответствующих им генов у исследованных видов разное: 1) основные представители семейств *Ascoideaceae*, *Phaffomycetaceae*, *Saccharomycetaceae* содержат только один ген, 2) представители семейств *Debaryomycetaceae*, *Metschnikowiaceae* и клады *Yarrowia* — два гена, 3) представители семейства *Pichiaceae* — 3 гена. Исключением для этого семейства являются дрожжи *Komagataella phaffii* (больше известные под своим старым названием — *Pichia pastoris*), у которых обнаружены два гена. Этот вид дрожжей является представителем клады *Komagataella*, которую в работе [20] относят к парафилетическому семейству *Pichiaceae*.

Проведение филогенетического анализа с использованием последовательностей генов полиаминоксидаз оказалось затруднено большими различиями между нуклеотидными последовательностями обнаруженных генов. Поэтому проводили множественное сравнение аминокислотных последовательностей всех полиаминоксидаз, обнаруженных у исследуемых видов дрожжей (рис. 2).

Полученные результаты позволяют объединить аминокислотные последовательности полиаминоксидаз в группы (ПАО) на основании их сходства. Группа ПАО1 объединяет белки, обнаруженные у представителей семейств *Ascoideaceae*, *Phaffomycetaceae*, *Saccharomycetaceae*, у которых был выявлен только один ген полиаминоксидаз. Группы ПАО2.1 и ПАО2.2 объединяют белки, обнаруженные у представителей семейства *Metschnikowiaceae*, у которых было выявлено два гена. ПАО3.1, ПАО3.2 и ПАО3.3 объединяют белки, обнаруженные у представителей семейства *Pichiaceae*, у большинства из которых было выявлено

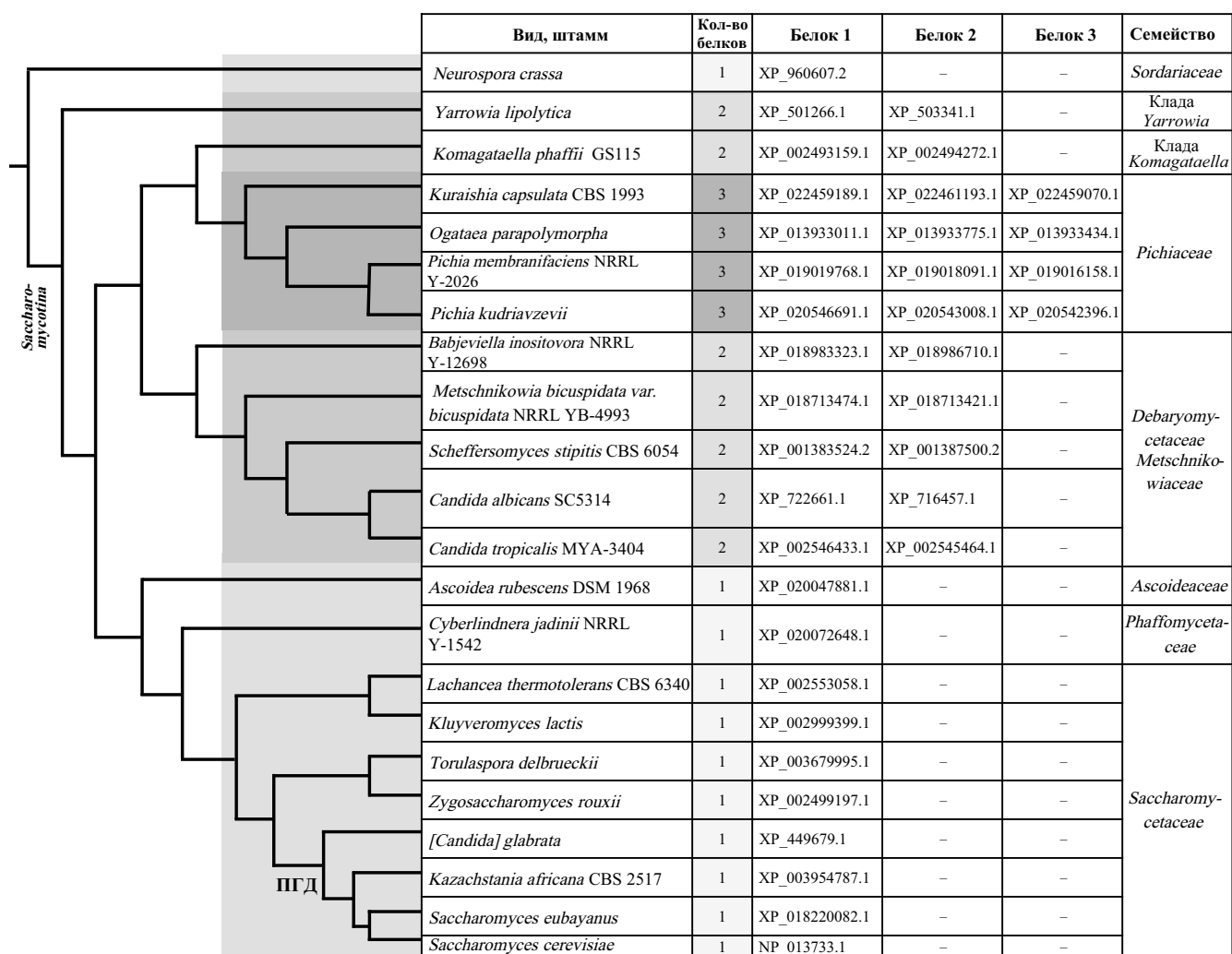


Рис. 1. Распространенность полиаминоксидаз среди основных представителей подотдела *Saccharomycotina*. Филогенетические отношения показаны, основываясь на результатах, полученных в работе [20]. Обозначение ПГД отделяет родственные виды, предки которых претерпели полногеномную дупликацию [28]

три гена. К этим группам (ПАО3.1 и ПАО3.2) относятся также белки дрожжей *Babjeviella inositolovora* (*Debaryomycetaceae*, два гена). Внутри самих групп ПАО результаты множественного сравнения последовательностей в целом отражают филогенетические отношения в соответствующих семействах подотдела *Saccharomycotina*.

## 2. Биоинформатический анализ внутриклеточной локализации полиаминоксидаз

Побочным продуктом реакций, осуществляемых полиаминоксидазами, является перекись водорода, которая опасна для клеток. Поэтому у растений и у животных некоторые полиаминоксидазы направляются в пероксисомы [7]. Для всех полиаминоксидаз был проведен поиск сигнальных последовательностей, обеспечивающих их транспорт в различные клеточные органеллы, в первую очередь в пероксисомы. Известны два основных типа сигналов, обеспечивающих

транспорт белков в пероксисомы — PTS1 и PTS2 (Peroxisomal Targeting Signals). Наиболее распространенным является сигнал PTS1, который встречается более чем у 95 % белков матрикса пероксисом. Исходно сигнал PTS1 был определен как последовательность из трех аминокислот на С-конце белка — SKL. Однако затем было показано, что этот сигнал может варьировать и представляет из себя консенсусную последовательность [21]. Результаты анализа последовательностей полиаминоксидаз на наличие сигналов пероксисомной локализации представлены на рис. 2.

Показано, что среди исследованных полиаминоксидаз, выделяются группы ПАО2.2 и ПАО3.2, представители которой часто (в 6 случаях из 9) содержат на С-конце сигнал PTS1, соответствующий консенсусной последовательности. При этом у трех белков последовательность на С-конце не соответствует консенсусной, но очень близка к ней. Последовательности

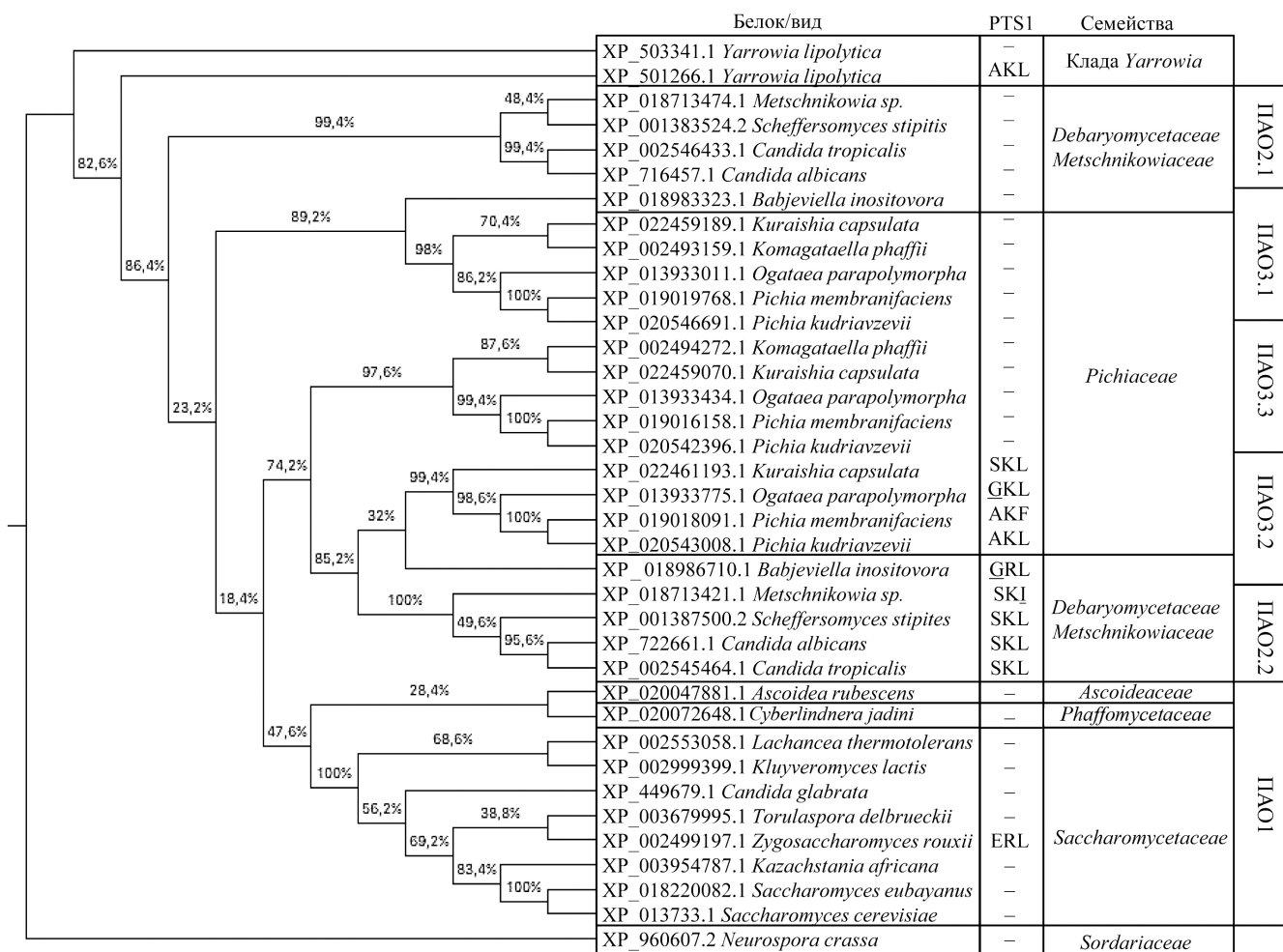


Рис. 2. Результаты множественного сравнения аминокислотных последовательностей полиаминоксидаз исследуемых видов дрожжей. Показана представленность последовательностей PTS1, обеспечивающих локализацию белка в пероксисомах, на С-конце полиаминоксидаз исследованных видов дрожжей. Подчеркиванием выделены аминокислоты, отличные от известной для *S. cerevisiae* консенсусной последовательности [22]

полиаминоксидаз также были проанализированы с использованием сервиса DeepLoc-1.0. Для предсказания локализации белка в клетке данная программа использует подход, основанный не на поиске известных сигнальных последовательностей, а на машинном обучении [22]. С использованием данного алгоритма в качестве наиболее вероятного варианта локализации полиаминоксидазы дрожжей *K. phaffii* XP\_002494272.1 (ген *KpFMS2*) были предсказаны пероксисомы.

Дрожжи *K. phaffii*, исследуемые в данной работе, относятся к метилотрофам, которые способны использовать метиловый спирт в качестве единственного источника углерода и энергии. Первые реакции пути утилизации метанола происходят в пероксисомах, что также связано с образованием перекиси водорода при окислении метанола до формальдегида алкогольоксидазами [23]. Анализ генома *K. phaffii* показал, что у этого вида дрожжей идентифицированы два несцепленных гена полиаминоксидаз *KpFMS1* и *KpFMS2*. При этом

один из них (*KpFMS2*) расположен рядом с геном алкогольоксидазы 1 (*AOX1*). Гены *KpFMS2* и *AOX1* располагаются «голова к голове» (head to head), и их промоторные области могут перекрываться (рис. 3), что может влиять на регуляцию транскрипции *KpFMS2*.

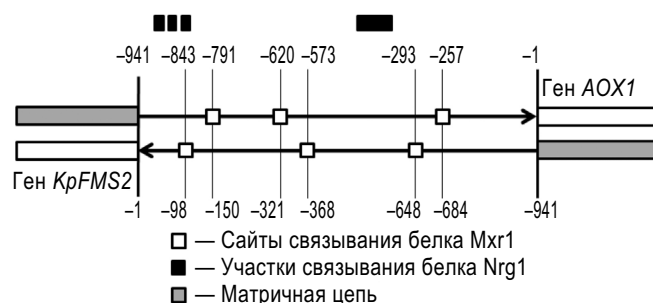


Рис. 3. Взаимное расположение генов *KpFMS2* и *AOX1* *K. phaffii*. Показаны сайты связывания транскрипционных факторов Mxr1p и Nrg1p, являющихся основными регуляторами промотора гена *AOX1*

### 3. Сравнительное изучение экспрессии генов *KpFMS1* и *KpFMS2* у дрожжей *K. phaffii*

Для исследования регуляции активности промоторов генов полиаминоксидаз были получены штаммы PFMS1-4-GS115 и PFMS2-4-GS115, которые содержат в своих геномах последовательность репортерного гена кислой фосфатазы PHO5 под контролем промоторов генов полиаминоксидаз. Для сравнения активности промоторов генов *KpFMS2* и *AOX1* был также использован полученный ранее [14] штамм tr2-4-GS115, содержащий ген PHO5 под контролем промотора гена *AOX1*. Штаммы высевали в серии разведений на твердые среды с различными источниками углерода и азота. В качестве источников углерода использовали глицерин и метанол. В качестве источников азота использовали сульфат аммония. Отдельно использовали полную среду YEPD, содержащую глюкозу, дрожжевой экстракт и пептон. Результаты качественного анализа активности репортерного гена PHO5 у штаммов PFMS1-4-GS115, PFMS2-4-GS115 и tr2-4-GS115 представлены на рис. 4.

На среде YEPD, где в качестве источника углерода используется глюкоза, а источником азота являются смесь аминокислот и олигопептидов, наблюдается активность промотора гена *KpFMS2*. В этих условиях активности промотора гена *KpFMS1* не было обнаружено, а экспрессии гена *AOX1*, как и следовало ожидать [24], не происходит.

На средах с глицерином в качестве источника углерода промоторы генов полиаминоксидаз неактивны. Экспрессия гена *AOX1* на таких средах была репрессирована глицерином.

На среде с метанолом в качестве источника углерода промоторы генов *KpFMS2* и *AOX1* активны. Активности промотора гена *KpFMS1* не было обнаружено.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что дубликации играют важную роль в эволюции живых организмов. Дубликации создают дополнительные копии генетического материала и вносят значительный вклад в создание разнообразия геномов. Судьба дублицированных генов может быть различной. Мутации могут накапливаться как в структурной, так

и в регуляторной частях. В результате в ходе эволюции с дублицированными генами могут происходить следующие процессы: 1) сохранение, при котором две копии гена сохраняют функцию предкового гена, 2) неофункционализация, при которой один из генов развивает новую функцию, тогда как другой сохраняет функцию предкового гена, 3) субфункционализация, в случае которой две копии развивают различные функции и работают совместно для того, чтобы компенсировать функцию предкового гена, и 4) специализация, когда две копии развивают различные функции, и при этом их общая функция также отличается от предковой функции (то есть здесь объединяются процессы неофункционализации и субфункционализации) [25, 26]. Кроме того, за счет изменения регуляторных областей структурные гены могут становиться частью других регулонов, отвечая на новые сигналы за счет взаимодействия с новыми регуляторными факторами.

В данной работе впервые проведен биоинформатический анализ распространенности полиаминоксидаз среди основных представителей подотдела *Saccharomycotina* (отдел *Ascomycota*). Продемонстрировано, что у всех исследуемых видов присутствуют полиаминоксидазы и соответствующие гены, однако их копияность различна. Показано, что количество копий коррелирует с систематическим положением исследуемых видов. Интересно, что представители семейства *Saccharomycetaceae*, к которому относятся дрожжи *S. cerevisiae*, а также родственных семейств *Ascoideaceae* и *Phaffomycetaceae* имеют только один ген полиаминоксидазы. При этом предки *S. cerevisiae* в ходе эволюции претерпели полногеномную дубликацию [27]. Таким образом, один из двух генов полиаминоксидаз, образовавшихся в ходе дубликации у *S. cerevisiae*, в дальнейшем был утрачен, и данному виду дрожжей достаточно активности одного гена.

В то же время у представителей других семейств подотдела *Saccharomycotina* сохранились два или даже три гена полиаминоксидаз. Последовательности этих генов сильно дивергировали, а кодируемые ими белки предположительно характеризуются различной внутриклеточной локализацией. У большинства проанализированных видов, представителей семейств *Debaryomycetaceae*, *Metschnikowiaceae*, *Pichiaceae* и клады *Yarrowia*, одна из полиаминоксидаз (группы ПАО2.2 и ПАО3.2) содержит последовательность, направляющую ее в пероксисомы. Белки дрожжей *B. inositolivora*, *Metschnikowia sp.* и *Ogataea parapolyomorpha*, относящиеся к данным группам полиаминоксидаз, несут на С-конце последовательности, которые хотя и не соответствуют консенсусной последовательности PTS1 *S. cerevisiae*, но очень близки к ней. Дальнейший анализ их локализации может расширить набор известных для дрожжей сигналов PTS1, направляющих белки в пероксисомы.

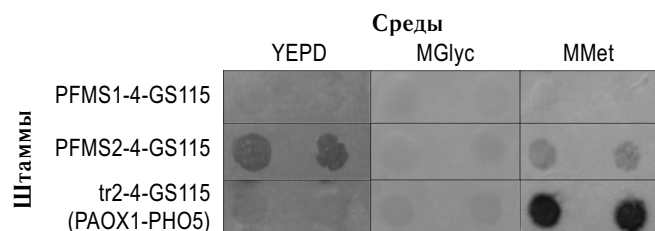


Рис. 4. Активность репортерной кислой фосфатазы штаммов *K. phaffii* PFMS1-4-GS115, PFMS2-4-GS115 и tr2-4-GS115 при росте на средах с различными источниками углерода и азота

Обнаруженные различия в представленности генов полиаминоксидаз могут быть связаны с особенностями метаболизма различных видов дрожжей. В этом отношении особенно интересно изучение регуляции генов полиаминоксидаз у метилотрофных дрожжей *K. phaffii*. Эти дрожжи способны использовать метиловый спирт в качестве единственного источника углерода и энергии. Алкогольоксидаза катализирует первую реакцию метаболизма метанола. Этот фермент работает внутри пероксисом, поскольку его активность сопряжена с образованием токсичного для клетки побочного продукта — перекиси водорода. Ген алкогольоксидазы 1 строго регулируется источником углерода в среде. На средах с глюкозой и глицерином наблюдается его репрессия, а на среде с метанолом происходит активация промотора данного гена [24]. Транскрипционный активатор Mxr1p является основным регулятором активности промотора гена *AOX1* [28].

В представленной работе показано, что один из двух генов полиаминоксидаз *K. phaffii* *KpFMS2* расположен рядом с геном *AOX1* «голова к голове». Сайты связывания белка Mxr1p 5'-СУСС-3' [29] распределены по всей области между кодирующими последовательностями генов *KpFMS2* и *AOX1* и находятся на разных цепях (см. рис. 3). Белок Nrg1p обеспечивает репрессию гена *AOX1* у *K. phaffii* при наличии глицерина и глюкозы в среде [30]. Одна из областей, с которой взаимодействует Nrg1p, расположена вблизи кодирующей последовательности гена *KpFMS2*, вторая — вблизи гена *AOX1* (см. рис. 3). Таким образом, промоторные области данных генов могут перекрываться, а сами они иметь сходные элементы регуляции.

В данной работе было впервые показано, что промотор гена *KpFMS2* (перекрывающийся с промотором гена *AOX1* и обеспечивающий транскрипцию в противоположном направлении) функционирует на средах с метанолом. Уровень его активности был заметно меньше, чем у промотора гена *AOX1*. Так же, как и промотор гена *AOX1*, промотор гена *KpFMS2* был неактивен на средах с глицерином в качестве источника углерода. Но в то же время этот промотор был активен на среде YEPD. То есть в отличие от промотора гена *AOX1*, его работа не подавляется глюкозой при росте *K. phaffii* на данной среде.

Таким образом, ген *KpFMS2* в результате хромосомных перестроек оказался сцепленным с геном *AOX1*. Данный ген сохраняет свои особенности регуляции, но на средах с глицерином и метанолом его промотор регулируется сходно с промотором гена *AOX1* и других генов метаболизма метанола, составляющих *MUT*-регулон. С одной стороны, это может являться побочным эффектом необычайно высокой активности промотора гена *AOX1*. Известно, что эукариотические промоторы могут обеспечивать транскрипцию длинных некодирую-

щих РНК (long noncoding RNAs) [31]. С другой стороны, вовлечение гена *KpFMS2* в *MUT*-регулон могло быть закреплено в ходе эволюции. В пользу этого предположения свидетельствует близость группы полиаминоксидаз ПАО3.3, куда относится белок, кодируемый геном *KpFMS2*, группе ПАО3.2, куда входят белки, несущие сигналы PTS1. И, хотя сам белок *KpFms2* *K. phaffii* такой последовательности не содержит, с помощью сервиса DeepLoc-1.0 для него предсказывается локализация в пероксисомах. Гены *MUT*-регулона активны при росте *K. phaffii* на средах с метанолом, когда в клетках этих дрожжей наблюдается активная сборка и работа пероксисом. Вовлечение гена *KpFMS2* в *MUT*-регулон, вероятно, оказалось выгодно и было отобрано в ходе эволюции.

Активности промотора гена *KpFMS1* в исследованных условиях не наблюдали. Это может быть следствием того, что этот промотор либо неактивен совсем, либо активируется в специфических условиях. Дальнейшее изучение функций и регуляции экспрессии генов полиаминоксидаз у *K. phaffii* важно как с теоретической точки зрения для понимания эволюции дублированных генов, так и с практической, в связи с огромной значимостью этих дрожжей и промоторов генов *MUT*-регулона для биотехнологии.

#### Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00750 мол\_а.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):1-14. <https://doi.org/10.1042/BJ20031327>.
- Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *J Mol Biol.* 2015;427(21):3389-3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>.
- Wallace HM. Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations? *Biochem Soc Trans.* 1998;26(4):569-571. <https://doi.org/10.1042/bst0260569>.
- White WH, Gunyuzlu PL, Toyn JH. *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of beta-alanine production from spermine. *J Biol Chem.* 2001;276(14):10794-10800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009804200>.
- Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine *in vivo* by the FMS1-amine oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(24):13869-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835918100>.

6. Polticelli F, Salvi D, Mariottini P, et al. Molecular evolution of the polyamine oxidase gene family in Metazoa. *BMC Evol Biol.* 2012;12:90. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-90>.
7. Reumann S, Ma C, Lemke S, Babujee L. AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol.* 2004;136(1):2587-2608. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043695>.
8. Valdes-Santiago L, Cervantes-Chavez JA, Leon-Ramirez CG, Ruiz-Herrera J. Polyamine metabolism in fungi with emphasis on phytopathogenic species. *J Amino Acids.* 2012;2012:837932. <https://doi.org/10.1155/2012/837932>.
9. Landry J, Sternglanz R. Yeast Fms1 is a FAD-utilizing polyamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303(3):771-776. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00416-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00416-9).
10. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
11. Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
12. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
13. Le SQ, Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol.* 2008;25(7):1307-20. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>.
14. Rumjantsev AM, Bondareva OV, Padkina MV, Sambuk EV. Effect of nitrogen source and inorganic phosphate concentration on methanol utilization and PEX genes expression in *Pichia pastoris*. *Scientific World Journal.* 2014;2014:743615. <https://doi.org/10.1155/2014/743615>.
15. Guthrie C, Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* 1991;194:1-863. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)x0276-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)x0276-5).
16. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983;166(4):557-580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8).
17. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques.* 2004;36(1):152-154. <https://doi.org/10.2144/04361DD02>.
18. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). — М.: Наука, 1981. — 288 с. [Osterman LA. Metody issledovaniya belkov i nukleinykh kislot. Elektroforez i ul'tratsentrifugirovaniye (prakticheskoye posobiye). Moscow: Nauka; 1981. 288 p. (In Russ.)]
19. Самсонова М.Г., Падкина М.В., Краснопецева Н.Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Генетика. — 1975. — Т. 11. — № 9. — С. 104-115. [Samsonova MG, Padkina MV, Krasnopevtseva NG. Genetiko-biokhimicheskoye izucheniye kislykh fosfataz drozhzhey *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetika.* 1975;11(9):104-115. (In Russ.)]
20. Shen XX, Zhou X, Kominek J, et al. Reconstructing the backbone of the Saccharomycotina yeast phylogeny using genome-scale data. *G3 (Bethesda).* 2016;6(12):3927-3939. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034744>.
21. Notzel C, Lingner T, Klingenberg H, Thoms S. Identification of new fungal peroxisomal matrix proteins and revision of the PTS1 consensus. *Traffic.* 2016;17(10):1110-1124. <https://doi.org/10.1111/tra.12426>.
22. Almagro Armenteros JJ, Sonderby CK, Sonderby SK, et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics.* 2017;33(21):3387-3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>.
23. Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, et al. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 1985;5(5):1111-21. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.5.1111>.
24. Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, et al. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(9):3859-76. <https://doi.org/10.1093/nar/15.9.3859>.
25. Assis R, Bachtrog D. Neofunctionalization of young duplicate genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(43):17409-17414. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313759110>.
26. He X, Zhang J. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics.* 2005;169(2):1157-1164. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.037051>.
27. Kellis M, Birren BW, Lander ES. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2004;428(6983):617-624. <https://doi.org/10.1038/nature02424>.
28. Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ, et al. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 2006;26(3):883-897. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.883-897.2006>.
29. Kranthi BV, Kumar R, Kumar NV, et al. Identification of key DNA elements involved in promoter recognition



- by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1789(6-8):460-468. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.05.004>.
30. Wang X, Cai M, Shi L, et al. PpNrg1 is a transcriptional repressor for glucose and glycerol repression of AOX1 promoter in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*. 2016;38(2):291-298. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1972-4>.
31. Wilkinson D, Váňová L, Hlaváček O, et al. Long noncoding RNAs in yeast cells and differentiated subpopulations of yeast colonies and biofilms. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:4950591. <https://doi.org/10.1155/2018/4950591>.

---

 ☼ Информация об авторах

**Алина Владиславовна Иванова** — студентка 4-го курса кафедры генетики и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: alinalans@gmail.com.

**Антон Витальевич Сидорин** — бакалавр кафедры генетики и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. E-mail: antonsidorin@list.ru.

**Елена Викторовна Самбук** — д-р биол. наук, профессор кафедры генетики и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 8281-8020. E-mail: e.sambuk@spbu.ru.

**Андрей Михайлович Румянцев** — канд. биол. наук, младший научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии. ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. SPIN: 9335-1184. E-mail: rumyantsev-am@mail.ru.

---

 ☼ Authors and affiliations

**Alina V. Ivanova** — 4<sup>th</sup> year Student of the Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: alinalans@gmail.com.

**Anton V. Sidorin** — Bachelor of Science (BSc) in the Genetics and Biotechnology Department. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. E-mail: antonsidorin@list.ru.

**Elena V. Sambuk** — Doctor of Science, Professor of the Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 8281-8020. E-mail: e.sambuk@spbu.ru.

**Andrei M. Rumyantsev** — PhD, Senior Researcher of the Department of Genetics and Biotechnology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. SPIN: 9335-1184. E-mail: rumyantsev-am@mail.ru.