

ISOLATION OF MUTANTS DEFECTIVE IN CYTOSOLIC β -GALACTOSIDASE DEGRADATION IN THE METHYLOTROPHIC YEAST *KOMAGATELLA PHAFFII*

Z. MINGXING ^{1,2}, O. DMYTRUK ¹, K. DMYTRUK ¹, Y. KANG ², A. SIBIRNY ^{1,3*}

Department of Molecular Genetics and Biotechnology,
Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine,
Lviv, 79005, Ukraine

State Key Laboratory of Functions and Applications
of Medicinal Plants & Institution of One Health Research,
Guizhou Medical University, Guizhou, 550014, Guiyang, China
Institute of Biotechnology, University of Rzeszow,
Rzeszow, 35-601 Poland

* Correspondence: Sibirny A., e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

The certain cytosolic enzymes and recombinant proteins in methylotrophic yeast Komagatella phaffii expressed under methanol-induced promoters undergo selective degradation and proteolysis when transferred from methanol to glucose medium via autophagic pathway. However, the mechanism underlying the specific degradation cytosolic proteins in yeast, remain unclear. To this end, we developed a simple method for isolating mutants with impaired degradation of cytosolic proteins in our previous study. This method utilized the K. phaffii strain expressing β -galactosidase under the control of the methanol-induced FLD1 promoter, fused with GFP. The β -galactosidase of methanol-grown K. phaffii strain can be directly assayed on plates through X-Gal staining, therefore, offering an opportunity to isolate the mutants defective in inactivation of cytosolic proteins in K. phaffii. In this study, chemical mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) was applied to select autophagy-defective mutants in this system. Mutants showing blue color on YPD plates with X-Gal after methanol induction were obtained. Selected mutants display higher specific activity of β -galactosidase shift from methanol to glucose compared to the wild-type strain. It was also observed that, after shift from methanol to glucose, the mutants exhibited stronger fluorescence compared to the parental strain. The specific activity of alcohol oxidase, which is involved in methanol metabolism, varies among the individual mutants. Additionally, the analyzed mutants exhibited growth defects under nitrogen starvation conditions and showed increased phloxine B staining, indicating impairments in general autophagy.

Key words: β -galactosidase; MNNG; selective autophagy, Komagatella phaffii.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2025

СЕЛЕКЦІЯ МУТАНТІВ З ПОШКОДЖЕНОЮ ДЕГРАДАЦІЄЮ ЦИТОЗОЛЬНОЇ β -ГАЛАКТОЗИДАЗИ У МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *KOMAGATELLA PHAFFII*

Деякі цитозольні ферменти та рекомбінантні білки, гени яких експресуються під контролем метанол-індукованих промоторів, підлягають автофагійній деградації при перенесенні клітин метилотрофних дріжджів *Komagatella phaffii* з метанол-вмісного середовища на середовище з глюкозою. Однак механізм, що лежить в основі специфічної деградації цитозольних білків у дріжджах, залишається не дослідженим. З цієї метою, у нашій попередній роботі, було розроблено метод селекції мутантів із порушеною деградацією цитозольних білків. Цей метод базувався на використанні штаму *K. phaffii*, що експресує гібридну β -галактозидазу поєднану з GFP під контролем метанол-індукованого промотора гена *FLD1*. Активність β -галактозидази можна візуалізувати на чашках Петрі з метанол-вмісним середовищем та хромогенним субстратом X-Gal, що дає можливість ізолювати мутантів з пошкодженою інактивацією цитозольних білків у *K. phaffii*. У даній роботі для селекції відповідних мутантів було використано N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин. Було отримано колекцію мутантів, які мали синє забарвлення на чашках з багатим глюкозо-вмісним середовищем з X-Gal після індукції метанолом. Відібрані мутанти виявляли підвищену активність β -галактозидази та більш інтенсивну флуоресценцію гібридного фермента при перенесенні клітин з метанолу на глюкозу порівняно з вихідним штамом. Питома активність алкоголь-оксидази, яка бере участь у метаболізмі метанолу, варіювала серед окремих мутантів. Селекціоновані мутанти виявляли дефекти росту за умов азотного голодування та посилене забарвлення флоксином В, що вказує на порушення загальної автофагії. Ключові слова: β -галактозидаза; N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин; селективна автофагія; *Komagatella phaffii*.

REFERENCES

- An GH, Schuman DB, Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. Appl Environ Microbiol 55:116–24. <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.116-124>
- Bernauer L, Radkohl A, Lehmayr LGK (2021) Emmerstorfer-Augustin A, *Komagatella phaffii* as Emerging Model Organism in Fundamental Research. Front Microbiol 11:607028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.607028>
- Choi AM, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in

- human health and disease. *N Engl J Med* 368:651–662. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205406>
- Dmytruk O, Bulbotka N, Zazulya A, Semkiv M, Dmytruk K, Sibirny A (2021) Fructose-1,6-bisphosphatase degradation in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* occurs in autophagy pathway. *Cell Biol International* 45:528–535. <https://doi.org/10.1002/cbin.11304>
- Dmytruk O, Bulbotka N, Sibirny A (2020) Degradation of Methanol Catabolism Enzymes of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase in Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii*. *Cytol Genet* 54:393–397. <https://doi.org/10.3103/S0095452720050047>
- Farré JC, Manjithaya R, Mathewson RD, Subramani S (2008) Pp Atg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell* 14:365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.011>
- Gleeson MA, White CE, Meininger DP, Komives EA (1998) Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Meth Mol Biol* 103:81–94. <https://doi.org/10.1385/0-89603-421-6:81>
- Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Reports* 9:859–864. <https://doi.org/10.1038/embo.2008>
- Heisteringer L, Gasser B, Mattanovich D (2020) Microbe Profile: *Komagataella phaffii*: a methanol devouring biotech yeast formerly known as *Pichia pastoris*. *Microbiology(Reading)* 166:614–616. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000958>
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny AA, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5:539–545. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00296-x](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00296-x)
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34:259–269. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.026>
- Kirkin V, Rogov VV (2019) A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol Cell* 76:268–285. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.005>
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biologic Chem* 193:265–275
- Manjithaya R, Nazarko TY, Farré JC, Subramani S (2010) Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett* 584:1367–1373. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.019>
- Mastropietro G, Aw R, Polizzi KM (2021) Expression of proteins in *Pichia pastoris*. *Meth Enzymol* 660:53–80. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.07.004>
- Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Noda T (2008) Viability assays to monitor yeast autophagy. *Methods Enzymol* 451:27–32. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03202-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03202-3)
- Onodera J, Ohsumi Y (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 280:1582–31586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506736200>
- Pohl C, Dikic I (2019) Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science* 366:818–822. <https://doi.org/10.1126/science.aax3769>
- Polupanov AS, Sibirny AA (2014) Cytoplasmic extension peptide of *Pichia pastoris* glucose sensor Gss1 is not compulsory for glucose signaling. *Cell Biol Int* 38:172–178. <https://doi.org/10.1002/cbin.10189>
- Sibirny AA (2011) Mechanisms of Autophagy and Pexophagy in Yeasts. *Biochemistry* 76:1279–1290. <https://doi.org/10.1134/S0006297911120017>
- Sibirny AA (2016) Yeast peroxisomes: structure, functions and biotechnological opportunities, *FEMS Yeast Res* 16:3–4. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow038>
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333:169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-e)
- Waterham HR, de Vries Y, Russel KA, Xie W, Veenhuis M, Cregg JM (1996) The *Pichia pastoris* PER6 gene product is a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis and has sequence similarity to the Zellweger syndrome protein PAF-1. *Mol Cell Biol* 16:2527–2536. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.5.2527>
- Zazulya AZ, Semkiv MV, Stec M, Cyske Z, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G, Sibirny AA (2023) The *Komagataella phaffii* ACG1 gene, encoding β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, is involved in the autophagy of cytosolic and peroxisomal proteins. *Yeast* 40:367–376. <https://doi.org/10.1002/yea.3846>

Received October 28, 2024
Received November 07, 2024
Accepted January 18, 2025