

Edición genética en *Pichia pastoris*: una prueba de concepto

Proyecto de grado para optar por el título de Biólogo

Tesista

Juan Pablo Puerta Gallo; estudiante de Biología

Asesor

PhD. Diego Fernando Villanueva Mejía, profesor titular Universidad EAFIT

Universidad EAFIT

Medellín, Colombia

2020

Resumen: *Pichia pastoris* es una levadura metanolótrifca usada ampliamente por la industria biotecnológica desde los años 80 debido a múltiples características atrayentes tales como su facilidad de crecimiento y su independencia de medios de cultivo específicos. En esta investigación se realizaron experimentos de puesta a punto de protocolos de transformación genética, así como la inserción de un plásmido para verificar la eficacia de los procesos de transformación en la levadura. Los resultados sugieren que la cepa *Pichia pastoris* X33 difiere en los valores de su cinética de crecimiento comparada con otras cepas previamente reportadas y la transformación genética mediada por el plásmido p53 no tuvo resultados satisfactorios. Se propone a *Pichia pastoris* como plataforma de producción de una proteína recombinante conjugada gracias a las herramientas de edición genética tales como CRISPR-Cas9 (para expresión de manera constitutiva) o inserción de cromosomas artificiales de levadura (YAC) (para expresión episomal inducida)

Introducción

A través de los años, los científicos han utilizado diferentes organismos para la producción de proteínas de interés, tales como microorganismos (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras), células de insecto, líneas celulares mamíferas y *Pichia pastoris* (Asada et al., 2011). La levadura conocida como *Pichia pastoris* (posteriormente denominada *Komagataella pastoris*) (Kurtzman, 2009) es un hongo no filamentoso metanolotrófico perteneciente a la clase Saccharomycetes que se ha usado ampliamente en el campo de la biotecnología debido a que es un microorganismo cuyo uso abarca la producción de proteínas recombinantes, así como su uso para estudiar la función de genes importantes en los microorganismos y el impacto que tendría si estos no funcionaran de manera adecuada (Liu et al., 2019; Näätsaari et al., 2012); así como de tener la facilidad de realizar procedimientos postraduccionales a las proteínas que expresa, como por ejemplo, agregar un grupo glicosídico o la adición de puentes disulfuro (Cregg et al., 1985; Filyak et al., 2013).

Una de las características atrayentes de *P. pastosris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes es su alta velocidad de proliferación y la gran variedad de medios de cultivo que se ha usado para su crecimiento, que, además de ser económicos, el escalamiento industrial es fácil y no presenta mayores contratiempos a comparación de otras células como los cultivos de tejido humano (Näätsaari et al., 2012). Otra característica importante de esta levadura es su gran variedad de genes que pueden ser expresados bajos condiciones muy específicas, como ejemplo, los genes AOX1 y AOX2, genes para la producción de un metanol deshidrogenasa, proteína que se encarga de metabolizar el metanol para producir una fuente de carbono alternativo para la levadura; estos genes se han utilizado ampliamente como promotores de producción de proteínas recombinantes ya que puede ser estimulado de manera sencilla con medios de cultivo ricos en metanol (Carnicer Heras, 2012; Näätsaari et al., 2012). Por esta razón, desde hace más de cuarenta años, Phillips Petroleum Company introdujo una cepa de *Pichia pastoris* con fines de producción comercial de una proteína de interés (Valli et al., 2016). Además de la producción de moléculas humanas tales como los receptores acoplados a proteínas G (Asada et al., 2011) se ha llevado a cabo en esta levadura metanolótrica.

Recientemente, el uso de levaduras para la producción de proteínas recombinantes está ampliamente empleado con diferentes propósitos: por ejemplo, Y. Liu et al., 2019, editaron genéticamente la levadura *S. cerevisiae* con el propósito de producir, de manera *de novo*, un péptido encargado de la ingesta de alimento y la homeostasis energética de las células mamíferas, éste conocido como oleoiletanolamida (OEA, por sus siglas en inglés). Asimismo, el uso de *P. pastoris* dentro del campo biotecnológico ha estado en aumento en la última década: Desde el año 2012, la inyección Jetrea® (ocriplasma) ha sido producida por ThromboGenics utilizando el sistema de producción heteróloga de *Pichia pastoris*, así como la compañía Dyax ha producido Kalbitor desde el año 2009 usando el mismo sistema de expresión (Walsh, 2014).

Una de las ventajas al utilizar el modelo de producción de proteínas en *Pichia pastoris* es el estado de seguridad otorgada por la FDA (Food and Drugs Administration) a una de las proteínas de consumo animal, la fosfolipasa C, la cuenta con la clasificación GRAS (generalmente reconocido como seguro) desde el año 2006 (Ahmad et al., 2014), dicha clasificación también fue otorgada al Kalbitor. Gracias a esto, se abre una ventana de oportunidades para la investigación en la producción de proteínas para el consumo humano que ayuden a suplir las necesidades nutricionales que se enfrenta el mundo hoy en día.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, alrededor de 452 millones de personas sufren de algún tipo de insuficiencia nutricional y 167 millones de niños sufren algún tipo de malnutrición. Asimismo, en el informe de El Estado de Seguridad Alimentaria y Nutrición en el mundo advierte que, sólo los países asiáticos y aquellos con ingresos medianos-altos tienen suficiente alimento para suplir la cantidad mínima de 400 g por persona (FAO et al., 2019), por lo cual hay que buscar alternativas novedosas para tratar de suplir dicha escasez nutricional.

Desde que Emil Fischer realizó la primera síntesis de un dipéptido en el año 1901, múltiples avances se han realizado en el campo de la síntesis de proteínas tales como la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS por sus siglas en inglés) la cual aprovecha las características fisicoquímicas de los aminoácidos para unirlos a una fase sólida con sus extremos amino y carboxilo protegidos con agentes químicos fáciles de remover para la posterior adición de más aminoácidos de manera cíclica (Nilsson et al., 2005). Gracias a esta técnica ha sido posible la producción de péptidos de manera química, sin embargo, ésta tiene limitantes como el tamaño del péptido producido, por ello la unión de péptidos de hasta 40 aminoácidos para producir una proteína de mayor tamaño puede convertirse en una tarea laboriosa.

Por otra parte, el uso de la biotecnología ha facilitado la obtención de proteínas de interés debido a que se tiene capacidad de introducir directamente los genes que codifican para la proteína que se desean expresar, así mismo, se puede diseñar estrategias para realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas de interés (Gupta et al., 2016), proceso que no se puede llevar a cabo con la síntesis química. Igualmente, al obtener una cepa transformada que exprese la proteína de interés, esta puede ser replicada y utilizada el

tiempo que cada investigación lo requiera, mientras que con la producción química esto no es posible porque sólo se obtiene un péptido por cada reacción realizada.

Gracias a las ventajas que ha demostrado tener la levadura *Pichia pastoris* frente a otros modelos de producción heterólogos, es indispensable conocer y comprender de manera amplia el crecimiento y el comportamiento de la levadura para sus posteriores aplicaciones en el campo biotecnológico, farmacéutico, alimentario y agroindustrial, por lo cual se plantea este trabajo de grado con el fin de identificar de manera preliminar los aspectos básicos de la cepa *Pichia pastoris* X33 en condiciones de laboratorio, para el mejoramiento de las técnicas de transformación, y su posterior utilización en proyectos de edición genética. Condiciones tales como el crecimiento a 30°C en medio YPD y el crecimiento bajo condiciones de estrés por antibiótico fueron evaluadas para el logro del objetivo.

Materiales y métodos

A. Material microbiológico usado en la investigación

En esta investigación se utilizó la levadura *Pichia pastoris* X33, obtenida mediante un Acuerdo de Transferencia de Materiales (ATM) desde la Corporación de Investigaciones Biológicas de Medellín (CIB), la cual, a su vez, fue obtenida a través de la casa comercial ThermoFisher Scientific (Número de catálogo: C18000). En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad EAFIT de la ciudad de Medellín, la cepa de *Pichia pastoris* X33 se encuentra en proceso de registro para la colección de especímenes biológicos.

B. Evaluación del crecimiento de *Pichia pastoris* X33 en condiciones de laboratorio

Con el fin de conocer de manera detallada los parámetros de crecimiento que permitan dilucidar el comportamiento en condiciones de laboratorio de la cepa *Pichia pastoris* X33, se establecieron preinóculos de 50 ml en medio YPD (composición para 1 litro: 10 gramos de extracto de levadura, 20 gramos de peptona, 10 gramos de glucosa) los cuales se dejaron en crecimiento durante 48 horas previas al montaje de las curvas de crecimiento a una temperatura de 30°C con agitación constante de 180 revoluciones por minuto (rpm). Al momento de iniciar las curvas de crecimiento, se midió la densidad óptica (DO) de los preinóculos a una longitud de onda de 600nm; debido a que se tomó como densidad óptica inicial igual a 0.3 por los reportes previos realizados por (De Ghellinck et al., 2014), estos preinoculos fueron ajustados a dicha DO.

El montaje de las curvas de crecimiento se realizó por triplicado en Erlenmeyer de 500 mililitros, el volumen final de cada curva depende de la absorbancia inicial del preinóculo y se estimó con la fórmula de la dilución química ($C_1V_1 = C_2V_2$). La toma de muestras se realizó cada hora durante las primeras 24 horas; y luego cada 24 horas durante 5 días. Para las curvas de crecimiento, no hubo reposición de medio de cultivo (YPD) ni adición de otros compuestos que pudieran modificar o alterar el crecimiento del microorganismo tales como azúcares u hormonas.

C. Curva de calibración para *Pichia pastoris* X33

Luego de realizar las respectivas curvas de crecimiento para la levadura *P. pastoris*, se realizó una curva de calibración para, de esta manera, poder cuantificar de manera más exacta la cantidad de células por mililitro que se obtiene previamente a cada experimento. Para realizar la curva de calibración, se tomó una solución madre de células de *P. pastoris* crecida durante 48 horas a 180rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en proporción 1:10 y de cada una de estas soluciones, se tomó 20µl y se observaron a través de la cámara de Neubauer, así como la cuantificación de la D.O para cada una de las diluciones.

D. Ingeniería genética en la levadura

Con el fin de realizar una prueba de concepto que permita en un futuro cercano profundizar en un programa de mejoramiento genético de *P. pastoris* mediante edición genética, inicialmente se planteó utilizar el plásmido p53 (Sigma Aldrich), cuya secuencia codifica para la expresión de la proteína Cas9 junto con el ARN guía (sgRNA) para el gen de plantas Fad2. Además, el plásmido posee los orígenes de replicación pVS y pUC (ambos de origen bacteriano, el primero para mejorar la expresión en *E. coli* para su clonación, el segundo sirve para mejorar la expresión en *Agrobacterium tumefaciens*, así como para mejorar la estabilidad del plásmido). Adicional a esto, posee los promotores de expresión para plantas monocotiledóneas AtU6 (promotor de la RNA polimerasa III) y 35S (promotor de virus del mosaico de la coliflor, promotor fuerte en plantas); y los genes de resistencia para kanamicina e higromicina (Figura 1).

Para la clonación del plásmido, este se ha sido insertado en *Agrobacterium tumefaciens* donde se cultivó en medio de cultivo YEP (composición para 1 litro: 10 gramos de peptona universal, 10 gramos de extracto de levadura y 5 gramos de cloruro de sodio). Debido a que el microorganismo debe encontrarse bajo condiciones de estrés para expresar adecuadamente el plásmido, se agregó al medio de cultivo los siguientes antibióticos con sus diferentes concentraciones: kanamicina (50µg/mL), streptomycin (50 µg/mL) y rifampicina (60 µg/mL).

Luego de 1 día a 37°C, se realizó la extracción del plásmido (Mini-Prep) utilizando el protocolo diseñado por Green & Sambrook (2016). Para verificar la extracción exitosa del plásmido, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se evidenció la presencia de una banda correspondiente al peso molecular del plásmido, 13.549 pares de bases (pb).

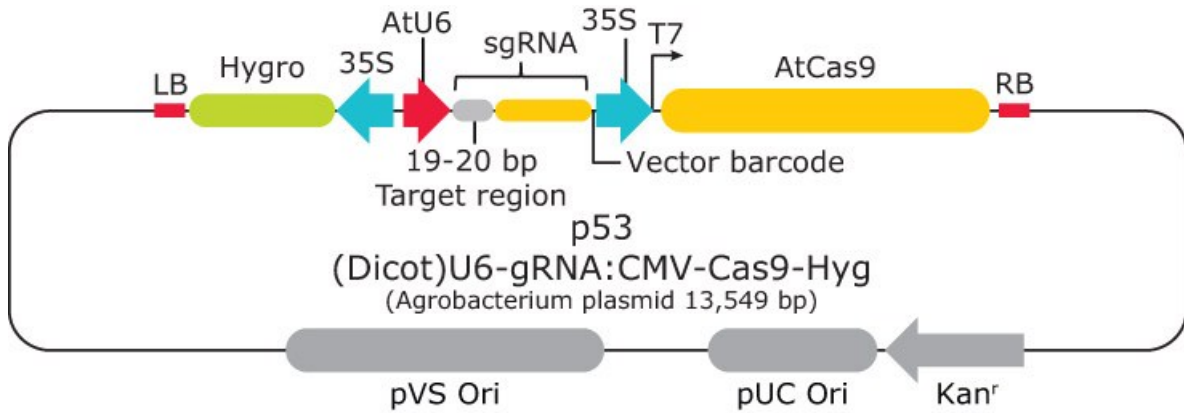


Figura 1: Esquematación del plásmido p53 utilizado para los primeros acercamientos en la edición genética de *Pichia pastoris* X33.

E. Prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC) para la levadura *Pichia pastoris* X33

Con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) para los antibióticos que se utilizaron como marcadores de expresión genética, kanamicina e higromicina. Para ello, se realizó un gradiente de concentraciones en un plato de 96 pozos. Las concentraciones utilizadas en esta investigación se encuentran registradas en la Figura 2.

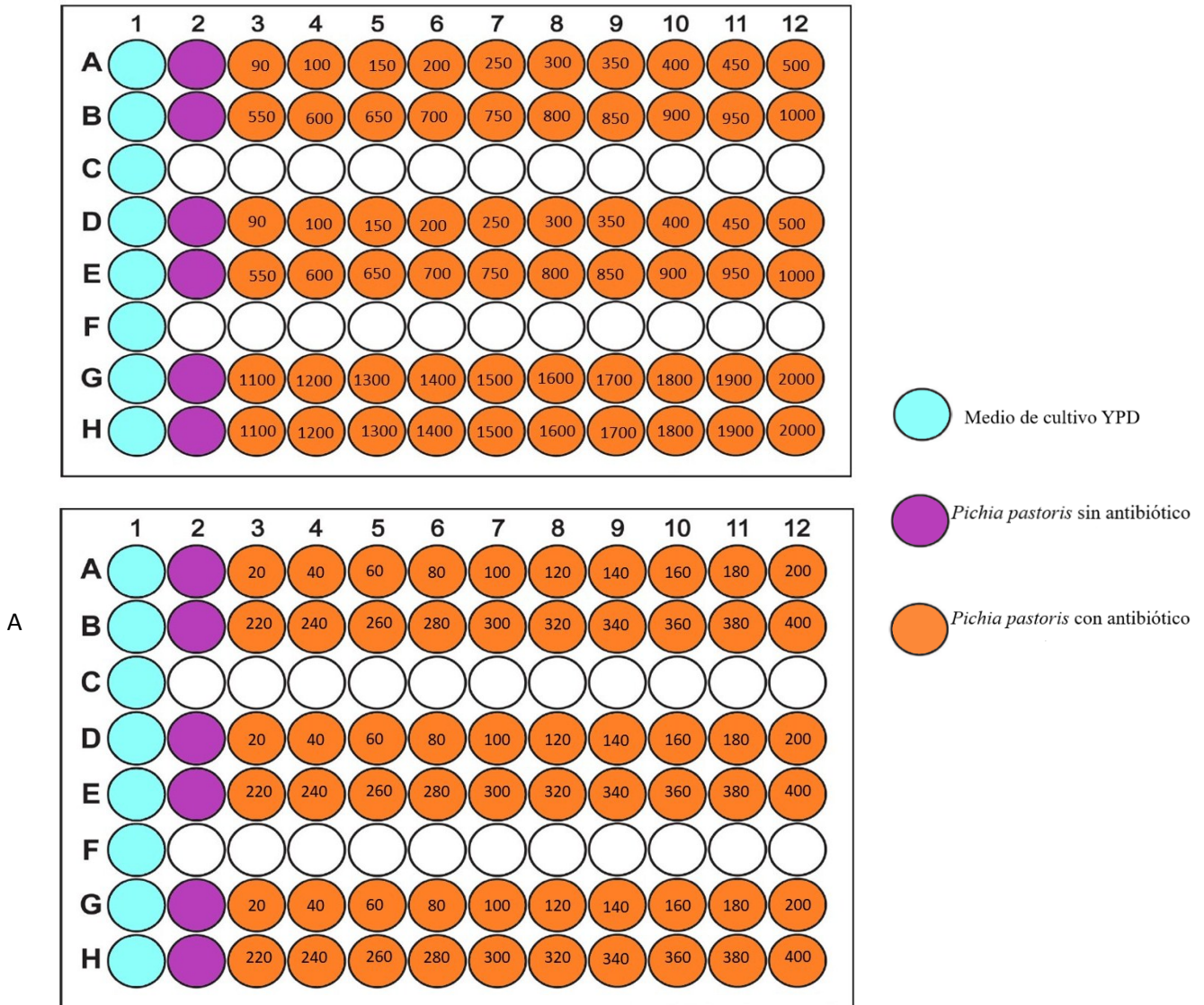


Figura 2: Esquematización de las concentraciones (en µg/ml) utilizadas de kanamicina (A) y de higromicina (B) en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para la levadura metanolotrófica *Pichia pastoris* X33. Para el experimento, se tomaron cultivos independientes de *P. pastoris* x33 y fueron diluidos hasta obtener una concentración de 2×10^6 UFC l⁻¹, que fueron determinados gracias a la curva de calibración obtenida previamente.

F. Metodología de transformación genética en *Pichia pastoris*

Múltiples estrategias se han llevado a cabo a través de los años para realizar la transformación exitosa de la levadura *Pichia pastoris* (tabla anexa), estas van desde la transformación genética mediada por la producción de esferoplastos (Burgers & Percival, 1987; Cregg et al., 1985; Sinha et al., 2005), uso de electroporación (Suga & Hatakeyma, 2003) y el uso de cationes para la permeabilización de la membrana lipídica de la levadura

(Ito et al., 1983). Para efectuar la inserción del plásmido p53 y, de esta manera, llevar a cabo los primeros acercamientos a las técnicas de transformación mediadas por ingeniería genética, se propuso el uso del protocolo creado por (Ito et al., 1983) para la transformación genética de levaduras a través de cationes alcalinos, basado en los efectos caotrópicos causados en las membranas de las levaduras mediados por cationes monovalentes tales como el Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺ y Li⁺.

Este protocolo inicia con el crecimiento de las levaduras de manera aeróbica en 100ml de medio YPD con agitación continua a 180rpm. En el momento que la levadura alcance su fase mid-log, las células deben ser centrifugadas a 1000 gravedades (g) durante 5 minutos. Luego, el pellet debe ser lavado con una solución preparada con Tris-HCl (pH 8.0) y EDTA (buffer TE). En este punto, es necesario la verificación de la DO, ya que es necesario que la concentración de las células sea de 2×10^6 células l⁻¹. Posterior, se toman 0.5 ml de células en suspensión a la concentración anteriormente mencionada y se le adiciona un volumen igual de acetato de litio a una concentración de 0.2 molar (M). Después de una hora de incubación a 30°C a 140rpm, se toma 0.1ml de la suspensión de células y es incubado a una temperatura de 30°C durante 30 minutos con 15µl de ADN plasmídico. A continuación, 0.1ml de polietilenglicol (PEG) 4000 al 70% (m/v) preparado y esterilizado previamente es adicionado a la suspensión celular.

Luego de una hora en incubación a 30°C a 140 rpm, las células son expuestas a una temperatura de 42°C durante 5 minutos, este choque térmico es un paso fundamental para la captura del material genético por parte de la levadura, mencionan los autores. Inmediatamente pasados los 5 minutos, las células son puestas a temperatura ambiente. Finalmente, las células son lavadas con agua estéril dos veces y luego sembradas en medio sólido de selección con el antibiótico específico para el plásmido utilizado.

Resultados

Crecimiento del microorganismo en condiciones de laboratorio

Gracias a las curvas de crecimiento para la levadura *Pichia pastoris* X33 se pudo observar de manera gráfica el periodo en el cual las células entran en su fase exponencial. Esto se logró al ajustar la densidad óptica en un gráfico semilogarítmico versus el tiempo (Figura 4). Además, la figura 3B sugiere que esta cepa alcanza su periodo de fase exponencial a las 24 horas.

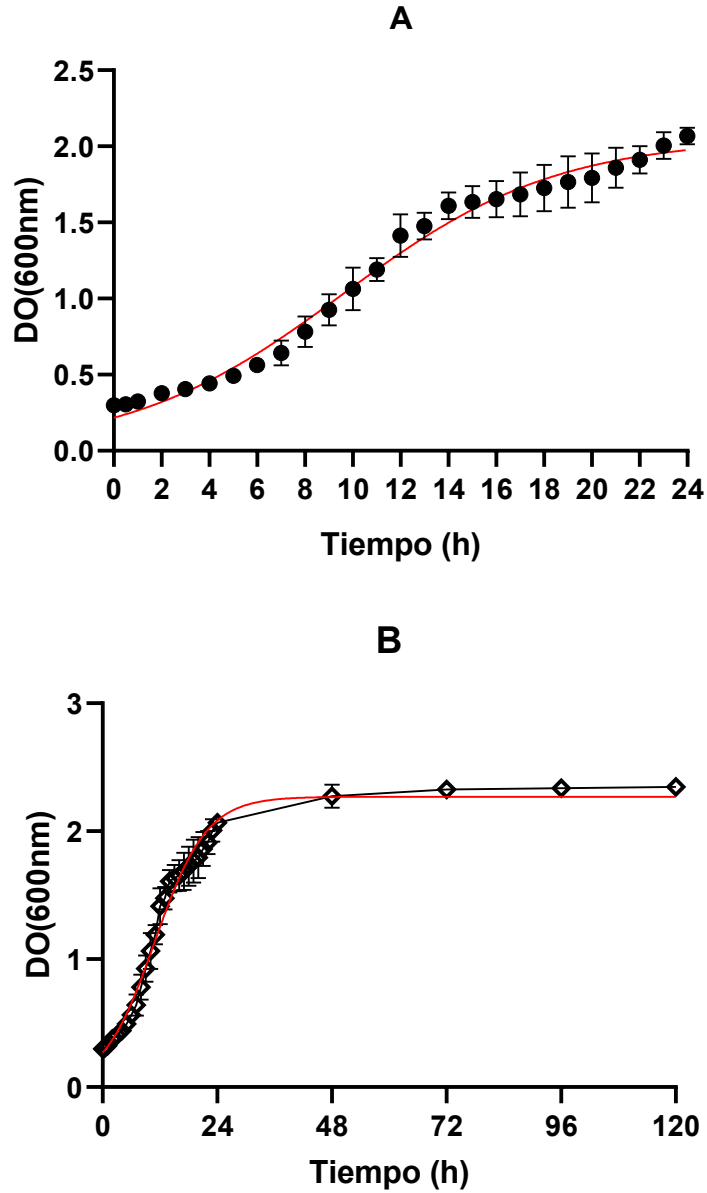


Figura 3: Curvas de crecimiento de *Pichia pastoris* X22 con sus respectivas líneas de error para cada punto de muestreo y la línea de tendencia (en rojo). A) gráfica del crecimiento de las primeras 24 horas de la levadura. B) gráfica del crecimiento durante las 24 horas posteriores, con toma de muestra cada 24 horas durante cinco días.

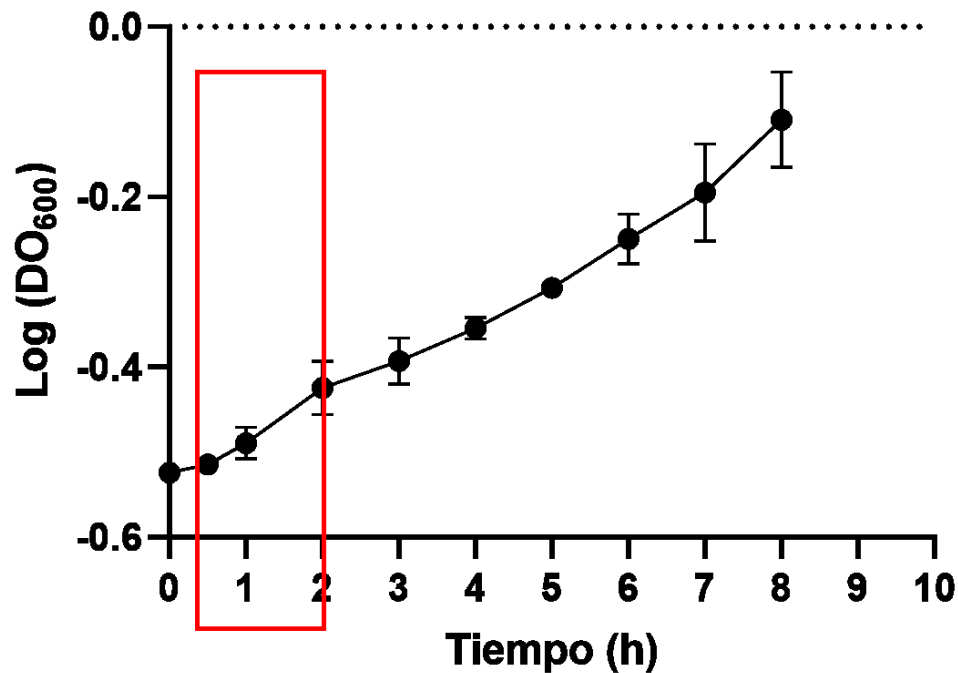


Figura 4: Logaritmo de densidad óptica versus tiempo de las primeras horas del crecimiento de la levadura *P. pastoris* X33. En el recuadro rojo se encuentra marcado el periodo de crecimiento exponencial.

Debido a que la curva de crecimiento se realizó durante cada hora por 24 horas (figura 2.A), es posible determinar múltiples valores de interés relacionados al crecimiento del microorganismo, tales como la constante de crecimiento (K) y el tiempo de duplicación (t), los cuales fueron obtenidos utilizando la ecuación (1) descrita por Frank H. Stephenson, 2010. Los valores promedio utilizados para determinar la K son los obtenidos entre los tiempos de 0.5 h y 2 h y fueron reemplazados en la ecuación (2).

$$(1) \log(N) = \log(N_0) + Kt$$

$$(2) \frac{\log(N) - \log(N_0)}{t} = K = \frac{0.001}{\text{minutos}}$$

Para determinar el tiempo de duplicación, ya conociendo la constante de crecimiento para *Pichia pastoris* X33 ($K=0.001 \text{ minutos}^{-1}$), se procede a determinar el tiempo de duplicación, la cual se halla gracias a la ecuación (1) reemplazando los valores para los que $N=2$ y $N_0=1$, lo cual expresa el tiempo necesario para que una célula de *Pichia pastoris* X33 se divida en dos células (ecuación (3)). Al realizar el reemplazo de los valores indicados previamente, se obtiene la ecuación (4) con la cual se puede determinar el tiempo de duplicación (t), indicado en la ecuación (5) cuyo valor es igual a 4.9 horas.

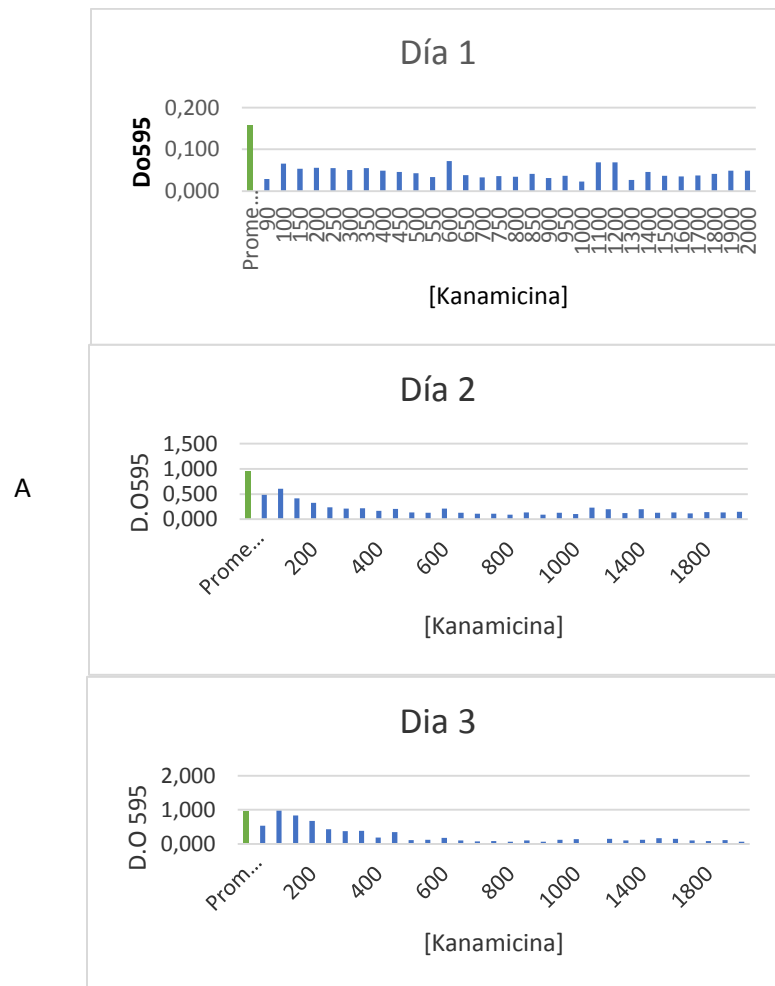
$$(3) \log(2) = \log(1) + Kt$$

$$(4) 0.301 = 0 + Kt$$

$$(5) t = \frac{0.301}{k} = 299,64 \text{ minutos} = 4,9 \text{ horas}$$

Concentración Mínima Inhibitoria

Las concentraciones mínimas inhibitorias reportadas en esta investigación fueron determinadas gracias al análisis de la desviación estándar poblacional de la DO obtenida para cada una de las concentraciones utilizadas versus este valor de la DO del control (sin antibiótico) de esta manera, se pudo determinar que el valor más bajo es el correspondiente a [Kar A ina]=1000 µg/ml. Por otra parte, para las concentraciones utilizadas de higrom..... muestran una notable reducción del crecimiento de la levadura metanoltrófica para todas las concentraciones utilizadas, sin embargo, de manera estadística se determinó que la concentración de [higromicina]=220 µg/ml es la que mayor afectación en el crecimiento de *P. pastoris* tiene (datos no mostrados).



B

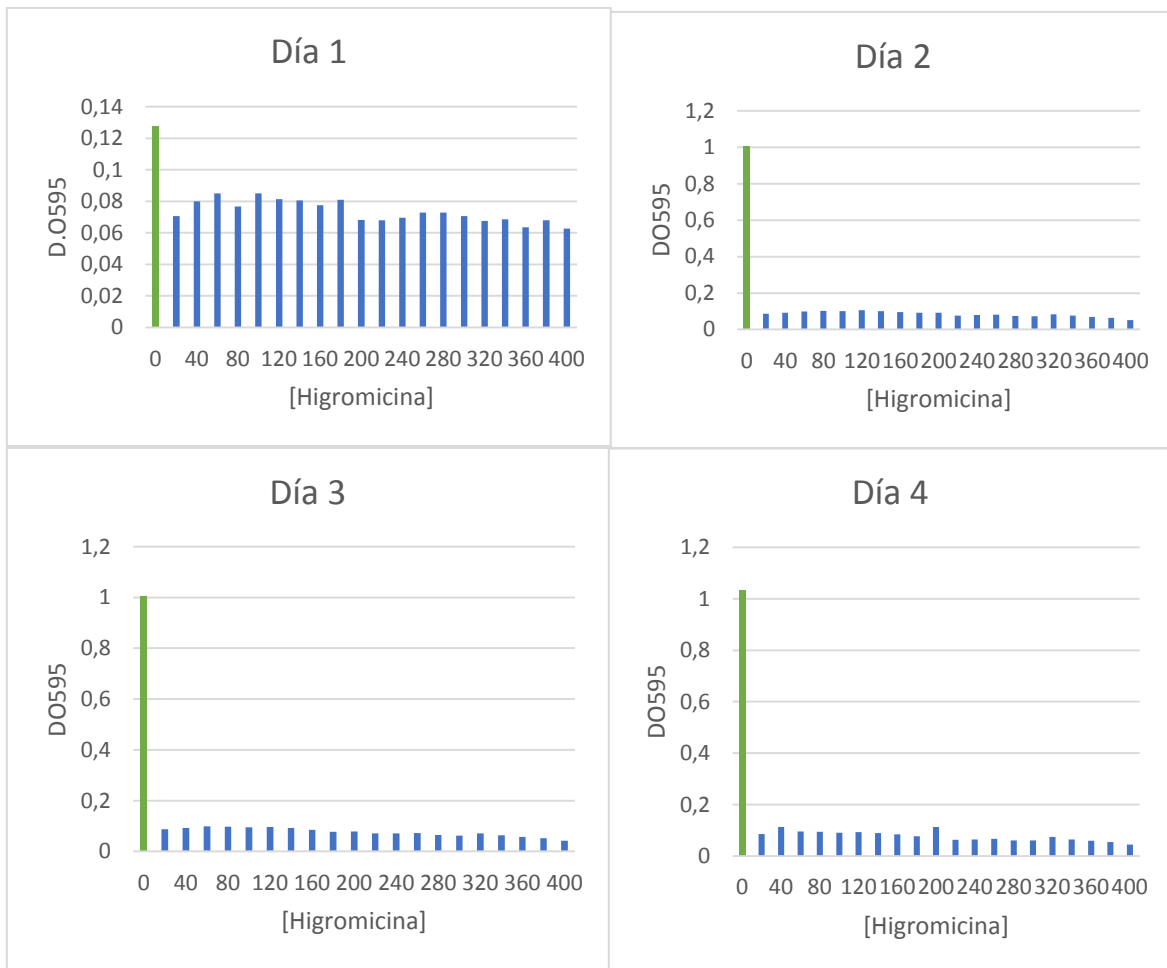


Figura 5: Histograma de barras de los promedios de la densidad óptica versus la concentración de (A) kanamicina e (B) higromicina de los antibiogramas realizados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria para *Pichia pastoris* X33. Cada barra representa el promedio obtenido de la densidad óptica entre cada experimento.

Plataforma biotecnológica mediante transformación genética

Para usos prácticos de la investigación, se optó por utilizar el protocolo de transformación creado por (Ito et al., 1983) debido a su simpleza y poco empleo de reactivos costosos o difíciles de conseguir, además, la composición de la membrana de *Pichia pastoris* no posee una composición compleja de azúcares difíciles de degradar (principalmente quitina, manosa y β -glucanos)(Aguilar-Uscanga & François, 2003) por lo cual es fácil de desintegrar con metodologías no tan agresivas con ácidos débiles e iones para permeabilizar la pared y, así, ingresar de manera mucho más sencilla el material genético exógeno.

El proceso de desintegración de la membrana fue verificado a través de la densidad óptica luego de realizar la lisis alcalina con la solución de acetato de litio al 0.2M debido a que hubo una reducción de la densidad óptica comparada con el cultivo de origen de las células

utilizadas (reducción de la DO= \pm 0.1). Sin embargo, luego de platear en medio de cultivo con el marcador de selección (YPD con kanamicina 1000 μ g/ml) no se obtuvo crecimiento de colonias positivas para la transformación genética con el plásmido p53. Para todos los procesos de transformación se utilizó la kanamicina como marcador de selección.

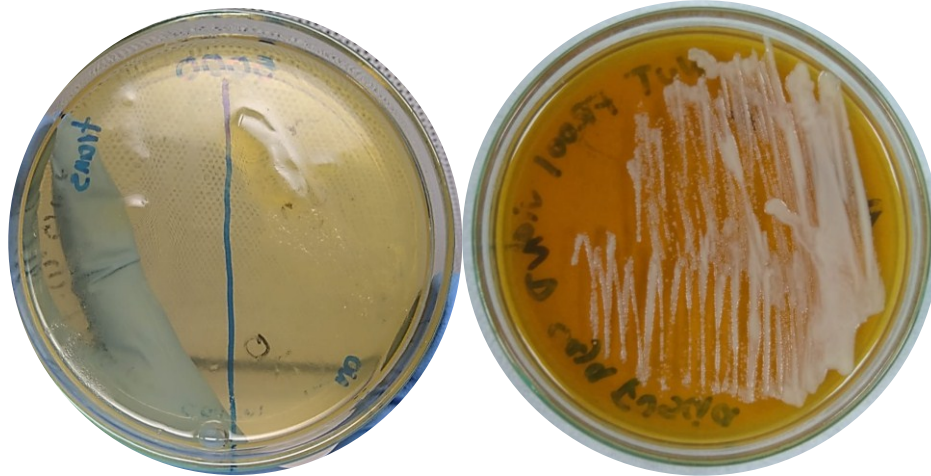


Figura 6: Fotografías de los medios de cultivo de selección (YPD + 1000 μ g/ml) dos días después del proceso de transformación. A la izquierda, las células de *P. pastoris* X33 después del proceso de transformación mediado por el protocolo de (Ito et al., 1983). A la derecha, células cosechadas del cultivo sin transformar de *Pichia pastoris* X33.

Discusión

Gracias al potencial biotecnológico que posee la levadura metanolotrófica para la producción de proteínas recombinantes, se plantea esta investigación con el fin de realizar los primeros acercamientos a la edición genética de *Pichia pastoris* X33 conociendo de primera mano los aspectos más importantes de su crecimiento, así como las posibles respuestas que puede tener esta cepa frente a los diferentes marcadores de selección.

Crecimiento del microorganismo

Los resultados de la curva de crecimiento permitió identificar el tiempo al cual la levadura alcanza su fase estacionaria, el cual es 24 horas, tiempo que difiere de investigaciones anteriores donde se ha mostrado que este punto es alcanzado a las 72 horas (De Ghellinck et al., 2014), así como se ha reportado este punto a las 60 horas (Eissazadeh et al., 2017) y a las 55 horas en un medio de cultivo diferente al YPD (Arjmand et al., 2013). Por otra parte, la constante de crecimiento (K) también se ha reportado con valores distintos para *Pichia pastoris* X33, los cuales han sido de 0.018 h^{-1} y 0.014 h^{-1} (Looser et al., 2014). Asimismo, el tiempo de duplicación ha sido reportado con valores distintos para la levadura: (Kalidas, 1999) con tiempo de duplicación para *Pichia pastoris* en 90 minutos. Sin embargo, estos autores resaltan que este tiempo depende de la fuente de carbono que utiliza la levadura al momento de crecer, puesto que en metanol este tiempo de duplicación es de 6 horas. Gracias a los resultados obtenidos, se puede inferir que *P. pastoris* X33 es una cepa altamente proliferante bajo las condiciones de crecimiento presentadas, ventaja que se

puede aprovechar al momento de realizar técnicas de transformación genética debido a que los tiempos de espera serán menores en comparación de otras levaduras de uso biotecnológico tales como *Saccharomyces cerevisiae*, a la cual se ha reportado una constante de crecimiento de $\leq 0.059/h$ y su correspondiente tiempo de replicación (≥ 11.5 h) (Olivares-Marin et al., 2018).

Efecto de los antibióticos en *Pichia pastoris* X33

De manera interesante, los resultados de los antibiogramas para kanamicina e higromicina realizados a la levadura muestran comportamientos opuestos, siendo la kanamicina un débil inhibidor del crecimiento mientras que la higromicina parece retardar el crecimiento de ésta desde la concentración más basal (90 $\mu\text{g/ml}$). En artículos recientes, el uso de la higromicina como marcador de selección de manera satisfactoria y las concentraciones que se usaron posterior a la transformación genética varía dependiendo de la necesidad del autor: (Voit, 2017) reporta el uso de concentraciones de 300, 500, 1000, 2000 y 4000 90 $\mu\text{g/ml}$ en medio YPD para la expresión de un plásmido que codifica para la expresión de la proteína $\beta 2AR$, un receptor acoplado a proteínas G. Asimismo, (Junjie et al., 2014) reportan el uso de 200 $\mu\text{g/ml}$ para inducir la expresión de un vector diseñado para conferirle resistencia al antibiótico a *Pichia pastoris* gracias al gen de resistencia *hph* de *Klebsiella pneumoniae* y demuestran sus resultados al obtener expresión de proteína verde fluorescente.

Previamente, en las investigaciones realizadas por Haon et al., 2015, se demostró que la kanamicina no causa alteraciones en el funcionamiento normal de *Pichia pastoris*, sin embargo, en dicho estudio solo consideró una concentración del antibiótico (50 $\mu\text{g/ml}$) y el objetivo de estos investigadores fue analizar la estabilidad de proteínas recombinantes a diferentes condiciones de producción en *Pichia pastoris*. La concentración que en este trabajo se reporta es 20 veces mayor que la reportada por Haon et al., 2015.

Una ventaja clara del uso de altas concentraciones de antibióticos para la inducción de expresión de proteínas recombinantes es la disminución del crecimiento de agentes contaminantes tales como bacterias oportunistas presentes en el ambiente que pueden afectar en gran medida los experimentos de transformación genética. Además de esto, las investigaciones realizadas por (Voit, 2017) recalcan que el nivel de expresión del vector está relacionado a la concentración del marcador de selección que este utilice. Sin embargo, hay que ser precavidos con el uso de concentraciones tan elevadas ya que estas pueden afectar directamente la proteína recombinante que se quiere producir o incluso afectar el fenotipo de la levadura, impidiendo que esta pueda proliferar de manera adecuada.

Por otra parte, el costo-beneficio de utilizar concentraciones tan elevadas se pone en duda ya que esto puede incrementar costos de producción de las proteínas de interés, por lo cual es preferible utilizar otro marcador de selección tal como la zeocina, antibiótico utilizado ampliamente en investigaciones previas para la selección de células transformadas de *Pichia pastoris* (Arjmand et al., 2013; Nakamura et al., 2018; Papakonstantinou et al.,

2009; Voit, 2017) Esto debido a que la kanamicina es un antibiótico perteneciente a los aminoglicósidos y su mecanismo de acción es bloquear el funcionamiento normal de la subunidad ribosomal 30S presente en bacterias (PubChem, 2020).

Acercamientos a la edición genética de *Pichia pastoris* X33

En esta investigación se trató de realizar la edición genética de la levadura a través del plásmido p53, codificante para proteína Cas9 junto con el RNA guía para el gen Fad2 de plantas. Previamente, se realizó la verificación en el genoma de *Pichia pastoris* y se determinó que la secuencia que codifica para el RNA guía del plásmido p53 no posee secuencias homólogas al cual dirigirse y realizar la edición puntual, por lo pronto el plásmido es utilizado únicamente para conferirle resistencia frente a los marcadores de selección a la levadura *P. pastoris* X33 con el fin de realizar la prueba de concepto de edición genética en dicho organismo. Sin embargo, los resultados muestran que dicha resistencia no fue conferida.

Esta investigación busca realizar la prueba de concepto de la edición genética en el microorganismo *Pichia pastoris*, debido a que éste ha demostrado tener demasiadas ventajas frente a otros organismos de producción heteróloga de proteínas de interés. Las pruebas de concepto han demostrado ser útiles para anticiparse a las posibles problemáticas que acarrea una investigación mucho más profunda de un tema en específico (Kendig, 2016). Como ejemplo en específico las investigaciones realizadas por (Kaminski et al., 2016) quienes han probado la efectividad de un sistema CRISPR/Cas9 modificado en la eliminación del virus del VIH-1 en células de ratón, proyectando estos resultados en futuras investigaciones para el tratamiento de este virus en humanos.

Muchas razones pueden conllevar al resultado obtenido en este trabajo, una de ellas es la preferencia de codones para la expresión del material genético por parte de la levadura metanolotrófica, y dicha preferencia por codones ha evidenciado tener efectos en la velocidad de traducción, así como en la elongación de la proteína y el plegamiento de la misma (Zhou et al., 2016) Puesto a que el plásmido p53 no fue diseñado en primera instancia para la expresión dentro de una levadura, este puede no estar siendo expresado de manera óptima.

Otra posible explicación puede deberse a la aparente resistencia que presenta la levadura *P. pastoris* X33 frente al antibiótico utilizado como marcador de selección, kanamicina; resultados similares fueron hallados en la investigación de (Voit, 2017) donde la expresión del plásmido se vio afectada por concentraciones elevadas del marcador de selección y una aparente resistencia por parte de la levadura hacia la higromicina. Los procesos de transformación pueden que hayan ocurrido, sin embargo, como no hubo una presión de selección lo suficientemente estable, las células no tuvieron la necesidad de expresar el material exógeno introducido puesto que esto puede conllevar un gasto energético innecesario para las células (Subbiah et al., 2011). Otra razón contemplada para estos resultados negativos es alguna falencia metodológica al momento de utilizar el protocolo

diseñado por (Ito et al., 1983) o algún otro efecto deletéreo no contemplado anteriormente por alguno de los agentes químicos utilizados en este proceso.

Perspectivas futuras

Gracias a los acercamientos realizados en esta investigación, se puede encaminar investigaciones preliminares para el mejoramiento genético de *Pichia pastoris* y la producción de proteínas recombinantes de interés, así como la aplicación de técnicas vanguardistas en el campo biotecnológico tales como las desarrolladas por (Anzalone et al., 2019), los cuales desarrollaron una versión modificada de la proteína Cas9 unida a una transcriptasa reversa, la cual promete realizar modificaciones genéticas sin la necesidad de realizar un doble quiebre en la cadena de ADN o la inserción de material genético exógeno como guía de la endonucleasa (sgRNA).

Así mismo, la creación de una plataforma biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes de uso alimentario y farmacéutico con modificaciones postraduccionales similares a las generadas por las células humanas que eviten el reconocimiento por parte del sistema inmunológico es una de las posibilidades que está presente. Es de especial interés la producción de proteínas pertenecientes a la familia de las selenioproteínas, proteínas que poseen el aminoácido seleniocisteína en su sitio activo y que cumplen un rol importante defendiendo a las células contra el estrés oxidativo (Shetty et al., 2014).

Infortunadamente, los resultados del antibiograma realizados con la higromicina no fueron aplicados para el proceso de transformación, por lo cual se abre la posibilidad de realizar pruebas posteriores con este marcador de selección para los procesos de transformación de la levadura estudiada.

Agradecimientos

Los trabajos realizados en este artículo están logrados gracias a la dirección del Profesor, Dr. Diego Villanueva-Mejía, gracias al Profesor, Dr. Orville Hernández-Ruiz de la Corporación para Investigaciones Biológicas por otorgar la cepa de *Pichia pastoris* X33 utilizada para los experimentos de este trabajo.

Bibliografía

Aguilar-Uscanga, B., & François, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>

Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-

- replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. In *Nature* (Vol. 576, Issue 7785). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arjmand, S., Lotfi, A. S., Shamsara, M., & Mowla, S. J. (2013). Elevating the expression level of biologically active recombinant human alpha 1-antitrypsin in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.2225/vol16-issue1-fulltext-4>
- Asada, H., Uemura, T., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Shimamura, T., Tsujimoto, H., Ito, K., Sugawara, T., Nakane, T., Nomura, N., Murata, T., Haga, T., Iwata, S., & Kobayashi, T. (2011). Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microbial Cell Factories*, 10(May 2014). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-24>
- Burgers, P. M. J., & Percival, K. J. (1987). Transformation of yeast spheroplasts without cell fusion. *Analytical Biochemistry*, 163(2), 391–397. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90240-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90240-5)
- Carnicer Heras, M. (2012). *Systematic metabolic analysis of recombinant Pichia pastoris under different oxygen conditions A Metabolome and Fluxome Based Study*. 179. <http://www.tesisenxarxa.net/handle/10803/96813%5Cnhttp://hdl.handle.net/10803/96813>
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., & Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5(12), 3376–3385. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3376>
- De Ghellinck, A., Schaller, H., Laux, V., Haertlein, M., Sferrazza, M., Maréchal, E., Wacklin, H., Jouhet, J., & Fragneto, G. (2014). Production and analysis of perdeuterated lipids from *Pichia pastoris* cells. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092999>
- Eissazadeh, S., Moeini, H., Dezfouli, M. G., Heidary, S., Nelofer, R., & Abdullah, M. P. (2017). Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.017>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2019). The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns. In *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing* (Vol. 7, Issue 7). <https://doi.org/10.1109/JSTARS.2014.2300145>
- Filyak, Y., Finiuk, N., Mitina, N., Bilyk, O., Titorenko, V., Hrydzhuk, O., Zaichenko, A., & Stoika, R. (2013). A novel method for genetic transformation of yeast cells using oligoelectrolyte polymeric nanoscale carriers. *BioTechniques*, 54(1), 35–43. <https://doi.org/10.2144/000113980>
- Frank H. Stephenson. (2010). *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*.
- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2016). Basic and applied aspects of biotechnology. *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*, 1–520.

<https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7>

- Haon, M., Grisel, S., Navarro, D., Gruet, A., Berrin, J. G., & Bignon, C. (2015). Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01002>
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163–168. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.163-168.1983>
- Junjie, Y., Lei, N., Biao, C., Yingmiao, L., Yimeng, K., Haibin, W., & Liuyang, D. (2014). Hygromycin-resistance vectors for gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 31(February), 115–125. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Kalidas, C. (1999). *Pichia Pastoris*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1686–1692. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1260>
- Kaminski, R., Bella, R., Yin, C., Otte, J., Ferrante, P., Gendelman, H. E., Li, H., Booze, R., Gordon, J., Hu, W., & Khalili, K. (2016). Excision of HIV-1 DNA by gene editing: A proof-of-concept in vivo study. *Gene Therapy*, 23(8–9), 690–695. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.41>
- Kendig, C. E. (2016). What is Proof of Concept Research and how does it Generate Epistemic and Ethical Categories for Future Scientific Practice? *Science and Engineering Ethics*, 22(3), 735–753. <https://doi.org/10.1007/s11948-015-9654-0>
- Kurtzman, C. P. (2009). Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(11), 1435–1438. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0638-4>
- Liu, Q., Shi, X., Song, L., Liu, H., Zhou, X., Wang, Q., Zhang, Y., & Cai, M. (2019). CRISPR-Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1194-x>
- Liu, Y., Liu, Q., Krivoruchko, A., Khoomrung, S., & Nielsen, J. (2019). de novo oleoylethanolamide production. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0431-2>
- Looser, V., Bruhlmann, B., Bumbak, F., Stenger, C., Costa, M., Camattari, A., Fotiadis, D., & Kovar, K. (2014). Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1177–1193. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.008>
- National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 6032, Kanamycin. Retrieved October 29, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kanamycin>.
- Näätsaari, L., Mistlberger, B., Ruth, C., Hajek, T., Hartner, F. S., & Glieder, A. (2012). Deletion of the *pichia pastoris* ku70 homologue facilitates platform strain generation

- for gene expression and synthetic biology. *PLoS ONE*, 7(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039720>
- Nakamura, Y., Nishi, T., Noguchi, R., Ito, Y., Watanabe, T., Nishiyama, T., Aikawa, S., Hasunuma, T., Ishii, J., Okubo, Y., & Kondo, A. (2018). A Stable, Autonomously Replicating Plasmid Vector Containing *Pichia pastoris* Centromeric DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(15), 1–16.
- Nilsson, B. L., Soellner, M. B., & Raines, R. T. (2005). Chemical Synthesis of Proteins. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 34, 91–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.34.040204.144700.Chemical>
- Olivares-Marin, I. K., González-Hernández, J. C., Regalado-Gonzalez, C., & Madrigal-Perez, L. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* exponential growth kinetics in batch culture to analyze respiratory and fermentative metabolism. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(139), 1–10. <https://doi.org/10.3791/58192>
- Papakonstantinou, T., Harris, S., & Hearn, M. T. W. (2009). Expression of GFP using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker. *Yeast*, 26, 311–321. <https://doi.org/10.1002/yea.1666>
- Shetty, S. P., Shah, R., & Copeland, P. R. (2014). Regulation of selenocysteine incorporation into the selenium transport protein, selenoprotein P. *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 25317–25326.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.590430>
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M., & Meagher, M. M. (2005). Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon- τ . *Biotechnology and Bioengineering*, 89(1), 102–112. <https://doi.org/10.1002/bit.20318>
- Subbiah, M., Top, E. M., Shah, D. H., & Call, D. R. (2011). Selection pressure required for long-term persistence of bla_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4486–4493.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02788-10>
- Suga, M., & Hatakeyma, T. (2003). High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. *Current Genetics*, 43(3), 206–211.
<https://doi.org/10.1007/s00294-003-0385-4>
- Valli, M., Tatto, N. E., Peymann, A., Gruber, C., Landes, N., Ekker, H., Thallinger, G. G., Mattanovich, D., Gasser, B., & Graf, A. B. (2016). Curation of the genome annotation of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS7435 from gene level to protein function. *FEMS Yeast Research*, 16(6), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow051>
- Voit, A. (2017). *Expression of human G protein-coupled receptors in Pichia pastoris*. June.
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(10), 992–1000. <https://doi.org/10.1038/nbt.3040>
- Zhoua, Z., Danga, Y., Zhou, M., Li, L., Yu, C. H., Fu, J., Chen, S., & Liu, Y. (2016).

Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(41), E6117–E6125.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606724113>