

IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA CRISPR CAS9 PARA LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DE *PHAFFIA RHODOZYMA*.

Oscar U. García Flores, Luis B. Flores Cotera, Rodolfo M. Moreno, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN, Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de Mexico 07360, oscar.ulises@cinvesta.mx

Palabras clave: CRISPR, astaxantina, carotenoides

Introducción. *Phaffia rhodozyma* es una levadura basidiomiceta que sintetiza astaxantina, un potente antioxidante carotenoide. Las células de *Phaffia rhodozyma* acumulan astaxantina cuando enfrentan condiciones de estrés como limitación de nutrientes (e.g. nitrógeno o cobre) (1,2), presencia de sustancias tóxicas (e.g. antimicina, triclosán, fluconazol) (3) o mutaciones que afectan la cadena respiratoria (4) o el metabolismo del nitrógeno. Si bien se han empleado estrategias para que las células de *Phaffia rhodozyma* enfrenten condiciones estresantes y acumulen una mayor cantidad de astaxantina, algunas de ellas tienen algunos inconvenientes. La limitación de nutrientes y adición de sustancias tóxicas disminuyen el crecimiento de la levadura. Un lento crecimiento, aumenta los costos y las sustancias tóxicas complican los procesos de purificación. Por otra parte, las cepas mutantes que son obtenidas por mutagénesis aleatoria además de ser inestables con frecuencia presentan efectos negativos en el crecimiento y metabolismo. En levaduras como *S. cerevisiae* se han utilizado los sistemas CRISPR catalítico, interferente y activador, para mutar, inhibir o activar la expresión de genes y mejorar la producción de algunos compuestos de interés biotecnológico como los carotenoides (5). Además, con el uso de estas técnicas que son más precisas, es posible no afectar el crecimiento de la levadura. *P. rhodozyma* de forma nativa sintetiza carotenoides entre ellos la astaxantina, además puede metabolizar gran variedad de sustratos por lo que es una excelente plataforma para ser utilizada en la producción de astaxantina. Particularmente, una mutación dirigida a un gen que disminuya la función de uno de los complejos de la cadena respiratoria podría promover la acumulación de astaxantina.

El objetivo del presente trabajo es implementar la técnica CRISPR Cas9 para realizar mutaciones en los genes crtYB y SCO1.

Metodología. La estrategia está dividida en 2 etapas: La primera etapa consiste en implementar el sistema CRISPR Cas9 mediante la construcción de plásmidos que expresen la proteína Cas9 y el gRNA. El sistema permitirá producir una mutación en el gen crtYB (que cataliza el primer paso de la síntesis de carotenoides)

para generar un fenotipo albino en la levadura, lo que indicaría que el sistema está funcionando. En la segunda etapa, se utilizarán los plásmidos construidos para realizar una mutación en el gen SCO1 (que participa en el ensamble del complejo IV de la cadena respiratoria).

Resultados. Para la primera etapa 4 plásmidos han sido diseñados y construidos: un plásmido que expresa la proteína Cas9, dos plásmidos modulares que expresan los gRNA, (cada uno de ellos emplea un sistema diferente para su expresión), y un último plásmido que contiene una versión modificada del gen crtYB, que funciona como un molde de recombinación homóloga. Los plásmidos construidos ya fueron mandados a secuenciar y no se encontró ninguna mutación que pueda afectar el funcionamiento de estos. Los gRNA dirigidos al gen crtYB ya fueron diseñados y clonados en los plásmidos modulares, se ha estandarizado un ensayo para la identificación de mutantes y actualmente se está trabajando en la transformación de la levadura.

Conclusiones. De acuerdo con los resultados, el sistema CRISPR Cas9 es una técnica precisa para la modificación genética en levaduras, el gen crtYB es un buen control ya que además de no ser esencial para la levadura permite conocer a través del fenotipo si el sistema está funcionando.

Agradecimiento. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento y por la beca otorgada con el número de registro 814997.

Bibliografía.

1. Chávez, C., Flores, Z., Marsch, M., Montes, M., Sánchez, S., Cancino, J. & Flores, C. (2010) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 197 (10): 1129-1139.
2. Flores, L. & Sánchez, S. (2001a), *Biotechnol. Lett.* 23(10): 793-797.
3. Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G. & Li, Y. (2011) *FEMS Yeast Res.* 11(2): 192-201.
4. An, G., Schuman, D. & Johnson, E. (1989) *Appl Environ Microbiol.* 55(1): 116-124
5. Lian, J., Hamedirad, M., Hu, S., & Zhao, H. (2017) *Nat. Commun.* 8(1): 1688.