

Stellungnahme der ZKBS
zur Eignung von etablierten Laborstämmen von *Komagataella phaffii*
als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen
gemäß § 8 Absatz 1 GenTSV

1 Allgemeines

Nach § 7 Abs. 5 GenTSV ist es erforderlich, dass neue biologische Sicherheitsmaßnahmen (hier: Vektor- und Empfänger-systeme) durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit anerkannt werden müssen. Unter § 8 Abs. 1 der GenTSV wird ausgeführt, nach welchen Voraussetzungen die Verwendung eines Empfängerorganismus als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt werden kann. Diese sind erfüllt, wenn 1. eine wissenschaftliche Beschreibung und eine taxonomische Einordnung des Empfängerorganismus vorliegen, 2. die Vermehrung des Empfängerorganismus nur unter Bedingungen möglich ist, die außerhalb gentechnischer Anlagen selten oder nicht angetroffen werden, 3. der Empfängerorganismus für Mensch, Tier und Pflanzen nicht pathogen ist und keine umweltgefährdenden Eigenschaften aufweist und 4. der Empfängerorganismus nur einen geringen horizontalen Genaustausch mit anderen Spezies betreibt.

In dieser Stellungnahme wird geprüft und bewertet, ob etablierte Laborstämmen der Spezies *Komagataella phaffii* die o. g. Voraussetzungen erfüllen.

1.1 Wissenschaftliche Beschreibung

Die Spezies *Komagataella phaffii* (vormals: *Pichia pastoris*) gehört zur Familie der *Phaffomycetaceae* [1, 2]. Die Familie umfasst Hefen, die sich durch Knospung vermehren und gehört zu den Ascomyceten [3]. *K. phaffii* wurde erstmalig 1954 aus dem Exsudat einer kalifornischen Schwarzeiche aus dem Yosemite-Nationalpark isoliert. Die Spezies kolonisiert das Exsudat von Bäumen [4]. *K. phaffii*-Zellen sind methylotroph, aerob und haben eine ellipsoide oder sphäroide Form [1]. Stämme der Spezies sind primär haploid und vermehren sich vegetativ, können sich jedoch unter Stickstoff-limitierten Kulturbedingungen auch sexuell fortpflanzen [5].

Unter nährstoffreichen Bedingungen vermehrt sich *K. phaffii* ungeschlechtlich durch Knospung. Wenn Stickstoffquellen fehlen und geeignete Kohlenstoffquellen vorhanden sind, können sich *K. phaffii*-Zellen kreuzen [5]. Die sexuelle Fortpflanzung ist homothallisch, d. h. unabhängig vom *mating type* (MAT)-Kreuzungstyp. Zellen können nach Induktion der Fortpflanzung eine 138 kbp große Region auf Chromosom 4 invertieren und somit ihren Kreuzungstyp ändern (sog. *mating type switching*) [6]. Bei der Kreuzung fusionieren zwei Zellen unterschiedlicher Kreuzungstypen zu einer MAT α /MAT α -diploiden Zelle. Im Anschluss kommt

es zur meiotischen Teilung, bei der vier haploide Ascosporen entstehen [4]. Die Rekombinationsrate während der Meiose ist in *K. phaffii* circa 3,5-fach niedriger als in *Saccharomyces cerevisiae* und liegt bei circa 25 *crossover*-Events pro Meiose [4].

Die ersten *K. phaffii*-Isolate wurden ab den 1960er Jahren in der Stammsammlung der Universität von Kalifornien gelagert. Alle in der Grundlagenforschung und Biotechnologie genutzten *K. phaffii*-Stämme lassen sich auf einen Stamm (NRRL Y-11430; Synonym CBS 7435) zurückführen, der sich von einem der 1954 isolierten Stämme aus dieser Stammsammlung ableitet [7]. Aufgrund der methylotrophen Eigenschaft der Hefe patentierte die Philips Petroleum Company 1979 diesen Stamm. Aufgrund einer Verkürzung des Leserahmens des *HOC1*-Gens ist die Struktur der Mannan-Zellwand des Stammes verändert, was die Transformierbarkeit und Proteinsekretion verbessert [7]. Ursprünglich war die Verwendung der Hefe als proteinreiches Futtermittel geplant, jedoch führte die Öl-Krise der 70er Jahre zu steigenden Methanolpreisen, sodass die Produktion im Vergleich zu anderen proteinreichen Futtermitteln wie Soja nicht mehr konkurrenzfähig war. In den folgenden Jahren wurde der Stamm als Plattform zur Proteinexpression eingesetzt und die Patente wurden 1993 an weitere Lizenznehmer abgegeben [8]. Seit 2023 steht auch ein lizenzfreier *K. phaffii*-Stamm (NCYC 2543) mit Expressionssystemen zur Verfügung, der sich ebenfalls aus der Stammsammlung der Universität von Kalifornien ableitet und dessen Genomsequenz mit der von NRRL Y-11430 praktisch identisch ist [7]. *K. phaffii* wird primär als Proteinexpressionsplattform in der Grundlagenforschung und Biotechnologie eingesetzt [9–11]. Die spontanen und eingeführten Mutationen von *K. phaffii*-Stämmen sind vielfältig und gut charakterisiert [7, 8]. Die Genome verschiedener Laborstämme von *K. phaffii* sind vollständig sequenziert [7, 12]. Die beiden zuvor genannten Stämme (NRRL Y-11430 und NCYC 2543) und ihre Derivate werden im Folgenden als etablierte Laborstämme von *K. phaffii* bezeichnet.

Bei den etablierten Laborstämmen von *K. phaffii* handelt es sich um wissenschaftlich sehr gut charakterisierte Modellorganismen mit einer taxonomisch eindeutigen Einordnung.

1.2 Pathogenes Potential von *Komagataella phaffii*

Es liegen keine Berichte über Infektionen mit *K. phaffii* beim Menschen, in Tieren oder in Pflanzen vor. Das Genom von *K. phaffii* weist keine Virulenzfaktoren auf, wie sie in anderen pathogenen Hefen vorkommen [12–14]. Pathogene Hefen besitzen häufig die Fähigkeit zum Pseudohyphenwachstum. *K. phaffii* besitzt die *FLO*-Gencluster, die diesen Phänotyp ermöglichen, jedoch erfolgt die Aktivierung dieser Gene und Ausprägung des Phänotyps nur bei niedrigen Wachstumsraten, hohem pH und Stickstoff- und Kohlenstofflimitierung [15, 16].

Das pathogene Potential von etablierten Laborstämmen der Hefe wurde in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht. Im Mausmodell führte die intravenöse Injektion von 1×10^6 koloniebildenden Einheiten (KBE) von *K. phaffii* nicht zu pathologischen Veränderungen in verschiedenen Gewebetypen der Maus [17]. Die Hefezellen wurden spätestens 144 Stunden nach Injektion eliminiert. Inokulierte Mäuse blieben gesund und waren hinsichtlich der Nahrungsaufnahme und ihrem Körpergewicht unauffällig. Als Kontrolle wurde Mäusen dieselbe Menge eines pathogenen *Candida albicans*-Stamms verabreicht. Mit *C. albicans* infizierte Mäuse verloren stark an Gewicht und verstarben im Zeitraum von sechs Tagen. In einer weiteren Untersuchung im Mausmodell wurde die orale Gabe von 1×10^7 KBE von *K. phaffii* untersucht [18]. Es konnte gezeigt werden, dass nach 72 Stunden nur noch sehr wenige *K. phaffii*-Zellen im

Magen-Darm-Trakt nachweisbar waren. Bei den Versuchstieren wurden keine pathologischen Effekte oder Veränderungen des Verhaltens beobachtet. Bei Untersuchungen in Masthühnern hatte die Fütterung von 1×10^6 bis 10^7 KBE *K. phaffii* je g Trockenfutter über einen Versuchszeitraum von mehreren Wochen keine negativen Effekte [19, 20]. Die Fütterung von 1×10^7 KBE *K. phaffii* je g Trockenfutter an Wachteln über mehrere Wochen beeinträchtigte ebenfalls nicht die Gesundheit der Tiere [21]. Die Haltung von Salinenkrebse in Aquariumwasser mit einer Konzentration von 10^7 KBE *K. phaffii* je ml hatte keine negativen Auswirkungen auf die Krebse [23].

Zusammenfassend zeigt sich, dass etablierte Laborstämme von *K. phaffii* apathogen sind und kein Risiko für den Menschen, Tiere und Pflanzen darstellen.

1.3 Vermehrungsfähigkeit von etablierten Laborstämmen von *Komagataella phaffii* außerhalb gentechnischer Anlagen

Beim Einbringen von NRRL Y-11430-abgeleiteten *K. phaffii*-Stämmen in nicht sterile Flusswasserproben reduziert sich die Zellzahl von 5×10^6 KBE je ml um vier Zehnerpotenzen innerhalb von 20 Tagen [22]. Nach 70 Tagen in nicht sterile Flusswasserproben überlebten nur noch wenige *K. phaffii*-Zellen (Reduktion um sechs Zehnerpotenzen) [22]. In Suspensionen von nicht sterilen Bodenproben (Ackererde) in nicht sterilen Flusswasser sank die Zellzahl der NRRL Y-11430-abgeleiteten *K. phaffii*-Stämme innerhalb von zwölf Tagen um drei Zehnerpotenzen auf höchstens 10^2 KBE je ml Erdsuspension und innerhalb von 30 bzw. 70 Tagen um sechs Zehnerpotenzen (Stammabhängig) [22]. In beiden Untersuchungen konnte keine Stagnation der Zellzahlreduktion beobachtet werden. Es ist daher davon auszugehen, dass keine einzelne Subpopulation der Hefe in Boden- und Wasserproben überlebte.

Als Kontrolle wurde der als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannte *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm S288c eingesetzt [22]. Die Zellzahl des *S. cerevisiae* S288c-Stamm reduzierte sich in den Flusswasserproben nach 70 Tagen von 1×10^6 KBE je ml um sechs Zehnerpotenzen. In den Bodenproben reduzierte sich die Zellzahl innerhalb von zwölf Tagen um drei Zehnerpotenzen. Mangels eines ausreichend selektiven Mediums gegen die natürlichen Keime in den Umweltproben konnten keine weiteren Daten zu späteren Zeitpunkten erhoben werden.

Diese Daten zeigen, dass etablierte Laborstämme von *K. phaffii* nur für eine relative kurze Zeit in der Lage sind, in Böden und Gewässern zu überleben. Eine dauerhafte Etablierung in der Umwelt ist nicht zu erwarten.

1.4 Gentransfer von *Komagataella phaffii* zu anderen Organismen

Im Gegensatz zu verschiedenen Bakterienspezies sind Pilze allgemein nicht in der Lage, DNA aktiv via Konjugation und Transformation zu übertragen[24–26]. Auch für *K. phaffii* liegen keine Hinweise auf eine natürliche DNA-Aufnahmekompetenz oder andere Arten des horizontalen Gentransfers vor.

Bei gentechnischen Arbeiten gelangt DNA nur unter solchen Bedingungen in *K. phaffii*-Zellen, die die Zellwand und die Zellmembran hierfür durchlässig machen, z. B. durch die Anwendung

physikalischer (Elektroporation) oder chemischer Methoden (enzymatisch vermittelte Sphäroplastengenerierung, Polyethylenglykol/Ca²⁺-Schock, LiCl) [27].

Neben der Aufnahme von DNA im Verlauf von artifizieller Transformation sind Hefen in der Lage, genetisches Material über die geschlechtliche Fortpflanzung zu vererben. Kreuzungen innerhalb der Spezies *K. phaffii* findet nur unter spezifischen Kulturbedingungen statt [5] und sind in natürlichen Umgebungen, wie z. B. in Flusswasserproben, nicht nachweisbar [22]. Ferner können *K. phaffii*-Stämme mit verwandten Spezies der Gattung *Komagataella* lebensfähige Hybride hervorbringen [28]. Spezies der Gattung *Komagataella* kommen im Exsudat europäischer und amerikanischer Bäume sowie in verrottendem Holz vor [28]. Die Entstehung von Hybridzellen bei der Kreuzung ist umso unwahrscheinlicher, je weniger eng die Spezies miteinander verwandt sind.

Insgesamt ist der Gentransfer bei *K. phaffii* nur in geringem Maße möglich und beschränkt sich auf eng verwandte Spezies.

2 Empfehlung

Nach § 8 Absatz 1 GenTSV werden etablierte Laborstämme von *Komagataella phaffii* (NRRL Y-11430 und NCYC 2543 einschließlich Derivate) als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt.

3 Begründung

Etablierte Laborstämme der Spezies *K. phaffii* erfüllen die Voraussetzungen des § 8 Abs. 1 GenTSV für die Anerkennung als Empfängerorganismen für biologische Sicherheitsmaßnahmen. Sie sind sowohl wissenschaftlich sehr gut beschrieben, als auch apathogen für den Menschen, Tiere und Pflanzen. Das Überleben von etablierten Laborstämmen von *K. phaffii* außerhalb gentechnischer Anlagen ist gut untersucht und es wurde gezeigt, dass die Hefen nur für kurze Zeiträume in Böden und Gewässern überlebensfähig sind. Diese Hefen stellen somit keine Gefahr für die Rechtsgüter nach § 1 Abs. 1 GenTG dar. Horizontaler Gentransfer von *K. phaffii* auf andere Mikroorganismen ist nicht zu erwarten.

Informationen dazu, ob einzelne Laborstämme von *K. phaffii* entsprechend der in dieser Stellungnahme festgelegten Kriterien als Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet sind, werden in der [Datenbank der Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen](#) gesammelt und zur Verfügung gestellt, die von der ZKBS-Geschäftsstelle geführt wird.

4 Literatur

1. **Kurtzman CP** (2005). Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**(Pt 2):1–4.
2. **Kurtzman CP** (2009). Biotechnological strains of *Komagataella (Pichia) pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**(11):1–4.
3. **Bernauer L, Radkohl A, Lehmayr LGK, Emmerstorfer-Augustin A** (2020). *Komagataella phaffii* as Emerging Model Organism in Fundamental Research. *Front Microbiol* **11**:1–12.

4. **Braun-Galleani S, Dias JA, Coughlan AY, Ryan AP, Byrne KP, Wolfe KH** (2019). Genomic diversity and meiotic recombination among isolates of the biotech yeast *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Microb Cell Fact* **18**(1):1–9.
5. **Feng D, Stoyanov A, Olliff JC, Wolfe KH, Lahtchev K, Hanson SJ** (2020). Carbon source requirements for mating and mating-type switching in the methylotrophic yeasts *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* and *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Yeast* **37**(2):237–45.
6. **Ata Ö, Ergün BG, Fickers P, Heisteringer L, Mattanovich D, Rebnegger C, Gasser B** (2021). What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? *FEMS Yeast Res* **21**(8):1-9.
7. **Claes K, van Herpe D, Vanluchene R, Roels C, van Moer B, Wyseure E, Vandewalle K, Eeckhaut H, Yilmaz S, Vanmarcke S, Çıtak E, Fijalkowska D, Grootaert H, Lonigro C, Meuris L, Michielsens G, Naessens J, van Schie L, Rycke R de, Bruyne M de, Borghgraef P, Callewaert N** (2024). OPENPichia: licence-free *Komagataella phaffii* chassis strains and toolkit for protein expression. *Nat Microbiol* **9**(3):864–76.
8. **Cereghino JL, Cregg JM** (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**(1):45–66.
9. **Kumar R, Kumar P** (2019). Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Res* **19**(2):1-18.
10. **Moraes LM, Marques HF, Reis VC, Coelho CM, Leitão MD, Galdino AS, Porto de Souza, Thais P., Piva LC, Perez AL, Trichez D, Almeida JR de, Marco JL de, Torres FA** (2024). Applications of the Methylotrophic Yeast *Komagataella phaffii* in the Context of Modern Biotechnology. *J Fungi (Basel)* **10**(6):1–14.
11. **Cheng J, Chen J, Chen D, Li B, Wen Z, Jin Y, Sun C, Yang G** (2024). Development of *Komagataella phaffii* as a cell factory for efficient de novo production of β -caryophyllene. *N Biotechnol* **85**:52–8.
12. **Sturmberger L, Chappell T, Geier M, Krainer F, Day KJ, Vide U, Trstenjak S, Schiefer A, Richardson T, Soriaga L, Darnhofer B, Birner-Gruenberger R, Glick BS, Tolstorukov I, Cregg J, Madden K, Glieder A** (2016). Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence. *J Biotechnol* **235**:121–31.
13. **Reyes TF, Chen Y, Fraser RZ, Chan T, Li X** (2021). Assessment of the potential allergenicity and toxicity of *Pichia* proteins in a novel leghemoglobin preparation. *Regul Toxicol Pharmacol* **119**:1–11.
14. **Jin Y, He X, Andoh-Kumi K, Fraser RZ, Lu M, Goodman RE** (2018). Evaluating Potential Risks of Food Allergy and Toxicity of Soy Leghemoglobin Expressed in *Pichia pastoris*. *Mol Nutr Food Res* **62**(1):1–9.
15. **Aggarwal S, Mishra S** (2022). Yeast-Mycelial Dimorphism in *Pichia pastoris* SMD1168 Is Triggered by Nutritional and Environmental Factors. *Curr Microbiol* **79**(7):1–9.
16. **De S, Rebnegger C, Moser J, Tatto N, Graf AB, Mattanovich D, Gasser B** (2020). Pseudohyphal differentiation in *Komagataella phaffii*: investigating the FLO gene family. *FEMS Yeast Res* **20**(5):1-15.
17. **Becerril-García MÁ, Flores-Maldonado OE, González GM, García-González G, Hernández-Bello R, Palma-Nicolás JP** (2022). Safety profile of intravenous administration of live *Pichia pastoris* cells in mice. *FEMS Yeast Res* **22**(1):1–8.
18. **França RC, Conceição FR, Mendonça M, Haubert L, Sabadin G, Oliveira PD de, Amaral MG, Silva WPd, Moreira ÂN** (2015). *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**(19):7953–61.
19. **de los Santos DG, de los Santos JRG, Gil-Turnes C, Gaboardi G, Fernandes Silva L, França R, Gevehr Fernandes C, Rochedo Conceição F** (2018). Probiotic effect of *Pichia pastoris* X-33 produced in parboiled rice effluent and YPD medium on broiler chickens. *PLOS ONE* **13**(2):1-7.

20. **de los Santos JRG, Storch OB, Fernandes CG, Gil-Turnes C** (2012). Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. *Vet Microbiol* **156**(3):448–51.
21. **Gaboardi GC, Alves D, de los Santos DG, Xavier E, Nunes AP, Finger P, Griep E, Roll V, Oliveira P, Silva A, Moreira Â, Conceição F** (2019). Influence of *Pichia pastoris* X-33 produced in industrial residues on productive performance, egg quality, immunity, and intestinal morphometry in quails. *Sci Rep* **9**(1):1–10.
22. **Gangl S, Hilgarth M, Spielhauer C, Schneider F, Recher C, Geier T, Baumgartner M, Glieder A**. Viability of natural and genetically modified *Komagataella phaffii* strains. in Vorbereitung; Preprint und Versuchsdaten liegen der ZKBS vor
23. **Srinivasan R, Chaitanyakumar A, Subramanian P, Mageswari A, Gomathi A, Aswini V, Sankar AM, Ramya M, Gothandam KM** (2020). Recombinant engineered phage-derived enzymatic in *Pichia pastoris* X-33 as whole cell biocatalyst for effective biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* in aquaculture. *Int J Biol Macromol* **154**:1576–85.
24. **Mitrikeski PT** (2015). Pathways and Mechanisms of Yeast Competence: A New Frontier of Yeast Genetics. In Maruthachalam K, van den Berg MA (Hrsg.), Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 1, S. 223–37. Springer International Publishing, Cham.
25. **Mitrikeski PT** (2013). Yeast competence for exogenous DNA uptake: towards understanding its genetic component. *Antonie Van Leeuwenhoek* **103**(6):1181–207.
26. **Fitzpatrick DA** (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett* **329**(1):1–8.
27. **Cregg JM** (2007). DNA-Mediated Transformation. In Cregg JM (Hrsg.), *Pichia Protocols*, S. 27–42. Humana Press, Totowa, NJ.
28. **Naumov GI** (2015). The yeast *Komagataella*: A genetic genus in accordance with interspecies hybridization. *Microbiology (N Y)* **84**(4):538–43.