

Białka pozyskiwane na drodze mikrobiologicznej produkcji znajdują szerokie zastosowanie jako leki, szczepionki, komponenty testów diagnostycznych, w produkcji żywności, środków piorących, czyszczących, kosmetyków, a także w przetwórstwie odpadowej biomasy. Podczas procesu produkcji, komórki mikrobiologicznego producenta są narażone na rozliczne czynniki stresowe, powodowane zarówno przez warunki zewnętrzne, jak i wewnętrzne ograniczenia, powstałe na skutek wymuszonego przekierowania metabolizmu w pożądanym przez człowieka kierunku. Wysoki potencjał do produkcji pożądanego białka w trakcie bioprodukcji jest wypadkową wielu czynników, a w tym - wydajnością komórkowej maszynery produkcji białek (translacyjno-sekrecyjnej) oraz odpornością komórek producenta na pojawiające się stresy środowiskowe.

Zarówno wysoce sprawna maszynery translacyjno-sekrecyjna, jak i odporność na czynniki stresowe to cechy złożone, które zależą od prawidłowego i skoordynowanego działania wielu procesów w komórce, za które odpowiadają liczne geny i białka. Złożony charakter tych cech powoduje, że próby ich ulepszenia stanowią poważne wyzwanie, jako że trudno jest precyzyjnie wskazać warunkujące je elementy (poszczególne geny, ich kombinacje czy procesy). Modyfikacja jednego czy kilku genów jest często kompensowana przez naturalne mechanizmy komórkowe dążące do zachowania homeostazy. Z tego względu uważa się, że w przypadku modyfikacji cech złożonych, rozsądnym rozwiązaniem są jedynie podejścia globalne, pozwalające na wprowadzanie licznych, wielokierunkowych („masowych”) zmian. Tradycyjnie takie modyfikacje wprowadzano losowo, od czego się obecnie odchodzi przez wzgląd na brak kontroli nad przebiegiem procesu ulepszenia. Jednym z nowatorskich rozwiązań jest wywoływanie masowych zmian w funkcjonowaniu komórki poprzez kontrolowane manipulacje czynnikami transkrypcyjnymi. Czynniki transkrypcyjne (TFs) to wewnątrzkomórkowe elementy białkowe zawiadujące ekspresją genów w odpowiedzi na bodźce pochodzące z zewnątrz / wewnątrz komórki, powodujące masowe zmiany w funkcjonowaniu komórki. Warto podkreślić, że odpowiedź komórki wywołana na skutek działania danego TF jest skoordynowana, adekwatna i ukierunkowana, co oznacza, że modulacji podlegają rozliczne i pozornie niepowiązane ze sobą elementy molekularne (przykładowo: metabolizm energetyczny, funkcjonowanie błon komórkowych i metabolizm aminokwasów), które w efekcie powodują kompleksową i możliwie najskuteczniejszą odpowiedź na dany bodziec, jaką komórka może wygenerować.

W niniejszym projekcie planuje się wskazać TFs przyczyniające się do zwiększonej odporności komórek mikroorganizmów na czynniki stresowe typowo zaistniałe w warunkach procesów biotechnologicznej produkcji, oraz/lub umożliwiające zwiększoną produkcję wartościowych białek, które dalej mogą być stosowane w rozmaitych dziedzinach działalności człowieka. Badania będą prowadzone z wykorzystaniem drożdży *Yarrowia lipolytica*. *Y. lipolytica* to bezpieczny gatunek drożdży niekonwencjonalnych (status GRAS wydany przez FDA i EFSA) obecnie szeroko stosowany w badaniach naukowych i w praktyce przemysłowej m.in. do produkcji pasz (dla koni i bydła), białek (np. lipaza, proteaza), kwas(k)u cytrynowego, czy naturalnego, bezkalorycznego słodzika (erytrytolu). Większość TFs w *Y. lipolytica* została zidentyfikowana dopiero niedawno, na podstawie skanowania całkowitego sekretomu z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych, lecz ich funkcja molekularna pozostaje nadal nieznana.

Planuje się przeprowadzić prace eksperymentalne z wykorzystaniem biblioteki 125 rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica*, w których geny kodujące nowo-zidentyfikowane TFs zostaną poddane nadekspresji wraz z łatwo-wykrywalnymi białkami reporterowymi. Biblioteka ta zostanie poddana intensywnemu skryningowi w rozmaitych warunkach (także stresowych) celem wskazania TFs odpowiadających na zadany czynnik środowiskowy. Zaprojektowany plan eksperymentalny obejmuje 78 różnych wariantów hodowli. Warunki (w tym stresowe) zostały wybrane na podstawie ich znanego wpływu na wzrost i aktywność metaboliczną *Y. lipolytica* oraz innych, spokrewnionych gatunków, adekwatności do procesów produkcyjnych, oraz ich znanej interakcji z efektywnością produkcji białek. Planuje się badać, czy manipulacja TFs spowoduje, że komórki będą mogły wzrastać i zachować żywotność w warunkach niekorzystnych, np. obniżonej dostępności tlenu, nieoptymalnej dostępności składników pokarmowych, kwaśnym pH czy przy zmianie temperatury. Pogłębione badania planuje się przeprowadzić z TFs, których nadekspresja umożliwi komórkom *Y. lipolytica* produkcję białek pomimo zaistnienia niekorzystnych warunków środowiskowych.

W badaniach zostaną wykorzystane nowoczesne metody pozwalające na prowadzenie wielu hodowli i analiz równoległe. Badania zostaną przeprowadzone z wykorzystaniem nowatorskich technik i rozwiązań, tj. klonowanie modułowe GoldenGate, edycja genomu CRISPR-Cas9, zminiaturyzowane, wysokoprzepustowe techniki hodowli, transformacji i oznaczeń biochemicznych. Charakterystyka regulomów (genów podległych) wybranych TF zostanie przeprowadzona z wykorzystaniem kompleksowych technik omicznych (RNAseq) i ciągłych hodowli bioreaktorowych w warunkach stanu-ustalonego.

Wyniki projektu pozwolą na zdobycie wiedzy podstawowej o znacznym potencjale aplikacyjnym. Przewiduje się zdobycie nowej wiedzy na temat molekularnych podstaw działania komórek, tj. niepoznanych TF, ich funkcji, mechanizmów działania i roli w kształtowaniu biotechnologicznie istotnych cech; oraz wskazanie nowych strategii inżynierii genetycznej o istotnym wpływie na badania podstawowe i aplikacyjne. Według najlepszej wiedzy zespołu badawczego, tak szeroko-zakrojone, kompleksowe badania nad wpływem TF na produkcję heterologicznych białek w powiązaniu z działaniem czynników stresowych nie zostały dotychczas przeprowadzone dla *Y. lipolytica*, ani innych gatunków drożdży.