

Białka pochodzące z produkcji mikrobiologicznej są powszechnie stosowane w różnych obszarach działalności człowieka, takich jak medycyna, diagnostyka, produkcja żywności, artykułów gospodarstwa domowego, kosmetyków, czy biopaliw, a także w przetwarzaniu biomasy odpadowej. Znaczna część tych białek wytwarzana jest przy użyciu komórek drożdży, które, choć należą do bardzo wydajnych producentów białek, podlegają licznym ograniczeniom. Oszacowano, że dane białko wydzielane poza komórkę (w celu łatwiejszego oczyszczania) może być produkowane w nawet 1000-krotnie niższych ilościach niż teoretyczne maksimum, jeśli proces produkcji nie został zoptymalizowany na poziomie molekularnym i/lub bioprocessowym. Według innych szacunków ponad 30% wszystkich białek (zarówno obcych, jak i natywnych) jest przetwarzanych przez szlak sekrecyjnym, który kieruje białka na zewnątrz komórek. Szlak sekrecyjny jest bardzo złożony - obejmuje wiele genów/białek oraz liczne organella komórkowe. Dlatego modyfikacja lub usprawnienie tego szlaku wymaga dogłębnej wiedzy na temat biologii komórki. Biorąc pod uwagę, że światowy rynek białek stanowi jedną z kluczowych gałęzi obecnej biotechnologii przemysłowej, przynosząc corocznie miliardy dolarów (USD) przychodów, badania nad biologią szlaku sekrecyjnego są istotne zarówno dla badań podstawowych, jak i stosowanych.

Proponowany projekt będzie przeprowadzony z wykorzystaniem komórek drożdży niekonwencjonalnych *Yarrowia lipolytica*. *Y. lipolytica* to bezpieczny gatunek drożdży (status GRAS wydany przez FDA i EFSA) obecnie szeroko stosowany w badaniach naukowych oraz w praktyce przemysłowej m.in. do produkcji pasz (dla koni i bydła), białek (np. lipazy, proteazy), kwasu cytrynowego czy naturalnego, bezkalorycznego słodzika (erytrytolu). Gatunek ten stanowi także uznaną platformę biologiczną do produkcji rekombinowanych (obcych) białek sekrecyjnych (wydalanych na zewnątrz komórki) (rs-Prot) ze względu na wiele korzystnych cech jego szlaku sekrecyjnego.

W moich wcześniejszych badaniach porównałam globalne profile ekspresji genów w komórkach *Y. lipolytica* wytwarzających różne rs-Prot. Dzięki globalnemu podejściu (analiza ekspresji wszystkich genów w genomie) i dogłębnej analizie otrzymanych danych, badanie umożliwiło zdobycie ogromnej ilości nowej wiedzy. Udało się zidentyfikować geny i procesy biologiczne zaangażowane w syntezę i wydzielanie rs-Prot w *Y. lipolytica*. Wiele z nich okazało się podobnych do tych, które zaobserwowano w przypadku innych drożdży, więc oczekuje się, że mają podobną funkcję biologiczną. Ale nadal pozostały takie, których rola jest niepoznana.

W proponowanym projekcie chciałabym kontynuować badania nad syntezą i sekrecją rs-Prot u *Y. lipolytica*, wykorzystując zdobytą wcześniej wiedzę jako wskazówki dla strategii inżynierii genetycznej. Głównym celem projektu jest: i) zbadanie specyficznej funkcji wybranych genów o potwierdzonym zaangażowaniu w syntezę rs-Prot u *Y. lipolytica*, na podstawie wcześniejszych badań, oraz ii) ocena możliwości wykorzystania tych genów jako czynników usprawniających syntezę rs-Prot. Wybrane geny mogą potencjalnie odgrywać rolę w następujących procesach komórkowych: reakcja na stres oksydacyjny, degradacja proteolityczna i modyfikacje ściany komórkowej; co zostało wywnioskowane na podstawie ich podobieństwa do genów z innych gatunków drożdży, które są lepiej opisane niż *Y. lipolytica*.

Koncepcja polega na określeniu funkcji dziesięciu genów zaangażowanych w syntezę rs-Prot w *Y. lipolytica* poprzez ich nadekspresję (zwiększenie ilości aktywnego produktu białkowego) i delecję (eliminację produktu białkowego z komórki), a następnie ocenę wzrostu i fizjologii zmodyfikowanych komórek w hodowlach laboratoryjnych. Aby rzetelnie zbadać wpływ genów na syntezę rs-Prot, szczepy będą jednocześnie produkować tzw. białka reporterowe rs-Prot, o właściwościach umożliwiających ich łatwą analizę. Do przetestowania wpływu genów na różne białka wybrano dwa różne rs-Prots – jeden to enzym, a drugi – białko emitujące fluorescencję. Nadekspresja i delecja będą prowadzone przy użyciu nowoczesnych narzędzi inżynierii genetycznej, a powstałe szczepy będą hodowane w małej skali w zoptymalizowanych warunkach. Aby dokładnie opisać, jakie globalne zmiany spowodowały przeprowadzone modyfikacje genów, wybrane szczepy będą hodowane w ściśle regulowanych hodowlach bioreaktorowych i przeprowadzona zostanie analiza ekspresji wszystkich genów w komórce. Aparatura, narzędzia molekularne i umiejętności wymagane do realizacji projektu zostały opanowane i są używane w laboratorium.

Oczekuje się, że projekt dostarczy danych eksperymentalnych na temat molekularnych funkcji niescharakteryzowanych genów i ich wpływu na produkcję rs-Prot w *Y. lipolytica*. Ponadto przewiduje się, że w wyniku realizacji projektu zostaną wskazane i opisane inne geny powiązane z genami badanymi, w oparciu o globalne badania ekspresji genów. W związku z tym spodziewane jest zaproponowanie nowych strategii zwiększania produkcji białek sekrecyjnych u drożdży.

Projekt dostarczy nowej, ciekawej wiedzy podstawowej o dużym potencjale aplikacyjnym, a otrzymane wyniki zostaną opublikowane międzynarodowych czasopismach i zaprezentowane na konferencjach.