

Streszczenie

Odporność na stres środowiskowy oraz synteza rekombinowanych białek (rProts) to złożone i silnie ze sobą powiązane cechy biologiczne, zależne od skoordynowanej aktywności wielu genów. Ponieważ czynniki transkrypcyjne (TFs) działają na wyższych poziomach kontroli ekspresji genów, stanowią obiecujące cele inżynierii takich złożonych cech. Ich aktywność podlega wielopoziomowej kontroli – od transkrypcji, poprzez translację aż po zmiany statusu aktywacji białka – zależnych od bodźców zewnętrznych i wewnętrznych. W niniejszej pracy zastosowano dwutorową strategię mającą na celu intensyfikację wybranych cech złożonych w drożdżach *Yarrowia lipolytica*: i) globalną modulację metabolizmu komórkowego poprzez ingerencję w TF oraz ii) precyzyjne sterowanie syntezą rProt w oparciu o specyficzne interakcje TF-promotor, umożliwiające ukierunkowane dostrajanie ekspresji wybranych genów.

Przeprowadzono kompleksowe badania przesiewowe kolekcji szczepów ko-nadekspresjonujących TF z rProt w różnych warunkach środowiskowych. Dla wszystkich testowanych TFs przeprowadzono integrację wielowymiarowych danych w celu identyfikacji wzorców regulacyjnych, natomiast wybrane TFs poddano dalszej charakterystyce przez wprowadzenie delecji. W odrębnej linii badań, analizowano wpływ nadekspresji wybranego TF, w wersjach pełnej i splicingowej, na ekspresję reporterowego genu klonowanego pod różnymi, ale specyficznymi dla tego TF, promotorami. Ponadto, celem wyjaśnienia poczynionych obserwacji, wykorzystano modelowanie komputerowe do przewidywania interakcji TF-DNA promotora i TF-ligand, a dane transkryptomiczne posłużyły do wyjaśnienia mechanizmu regulacji.

W ramach pracy zoptymalizowano protokół hodowli w mikroskali oraz utworzono bazę danych YaliFunTome, gromadzącą wyniki funkcjonalnego skriningu TFs w warunkach stresowych i istotnych dla produkcji rProt. Zidentyfikowano TFs pełniące rolę uniwersalnych „wzmocniaczy” i represorów syntezy rProt, a także TF wspomagający syntezę rProt przy obecności nie preferowanego źródła azotu. Wykazano powiązania niektórych TFs z odpornością na ograniczoną dostępność tlenu, jak również ich rolę w tolerancji na stres osmotyczny i oksydacyjny. TF *EUF1* został scharakteryzowany jako regulator siły kompatybilnego promotora, zwiększając siłę ekspresji, ale kosztem utraty indukowalności układu. Analizy oparte na „recykling danych” dodatkowo wykazały, że kontrola syntezy rProt przez TFs w wielu przypadkach prawdopodobnie obejmuje mechanizmy posttranskrypcyjne.

Podsumowując, uzyskane wyniki dowodzą, że TFs mogą stanowić wszechstronne narzędzia w inżynierii wybranych cech złożonych *Y. lipolytica*. Mogą działać jako globalne modulatory „przeprogramowując” szlaki metaboliczne bądź jako ukierunkowane regulatory specyficznych sekwencji promotorowych. W ramach pierwszego podejścia zaproponowano ogólne zależności, zgodnie z którymi poprawa asymilacji azotu sprzyjała syntezie rProts, natomiast wzmożony anabolizm węgla działał niekorzystnie. Przedstawione wyniki otwierają nowe perspektywy dla inżynierii opartej na TFs w zakresie syntezy rProts i odporności na stres środowiskowy oraz stanowią podstawę do dalszej funkcjonalnej charakterystyki TFs w tym niekonwencjonalnym gatunku drożdży.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, czynniki transkrypcyjne, inżynieria cech złożonych, białka rekombinowane, odporność na stres

30.09.2025

Maria Gorczyca

Abstract

Resistance to environmental stress and synthesis of recombinant protein (rProt) are complex and tightly interconnected biological traits that depend on the coordinated activity of multiple genes. Because transcription factors (TFs) act at higher regulatory levels of gene expression, they represent a promising targets for the engineering of such complex traits. Their activity is itself regulated at multiple layers, including transcription, translation, and protein activation status in response to stimuli. In this work, a twofold strategy was adopted to enhance selected complex traits in *Yarrowia lipolytica*: i) global modulation of cellular metabolism through TF perturbation, and ii) precise control of rProt synthesis via TF-promoter interactions.

A comprehensive screening approach was applied, combining co-overexpression library of TFs with rProt under variable environmental conditions. Multidimensional data integration was performed for all tested TFs to uncover regulatory patterns, while selected TFs were further characterized through targeted knock-outs. In a distinct line of investigation, the impact of selected TF overexpression, in spliced and unspliced versions, on the expression of reporter genes driven by different promoters specific to this TF was analysed. In addition, to explain the observed phenomena, computational modeling was employed to predict TF-DNA promoter interactions and TF-ligand binding, while transcriptomic data facilitated elucidation of the underlying regulatory mechanism.

This work established a protocol for reproducible microscale cultivation and introduced the YaliFunTome database, compiling functional screening data of TFs under stress and production-relevant conditions. Several TFs were identified as universal enhancers or suppressors of rProt synthesis, and one was found to promote rProt production specifically in the presence of a non-preferred nitrogen source. Distinct TFs were linked to altered resistance under oxygen limitation, with additional roles demonstrated in oxidative and osmotic stress tolerance. The TF *EUF1* was shown to act as a titrator of its cognate promoter, enhancing expression strength but comprising inducibility. Data-recycling approach highlighted that TF-mediated control of rProt synthesis likely extends beyond transcriptional regulation, implicating post-transcriptional mechanisms.

Together, these results demonstrate TFs as versatile tools for engineering selected complex traits in *Y. lipolytica*. They can act either as global modulators reshaping metabolic fluxes – where generalized pattern emerged, in which improved nitrogen assimilation proved beneficial for rProt synthesis while enhanced carbon anabolism was detrimental – or as targeted

regulators fine-tuning compatible promoters. These findings provide new perspectives for TF-based engineering of rProts and stress resistance and lay the foundation for functional characterization of TFs in this non-conventional yeast species.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, transcription factors, global metabolic engineering, recombinant proteins, stress resistance

30.09.2025

Maria Gorczyca